

**TITRE DU PROJET : La réponse au stress chez *Oenococcus oeni*, une bactérie de la fermentation malolactique des vins : rôle du chaperon moléculaire Lo18 et des vésicules extracellulaires**

**1) Renseignements administratifs sur la direction de thèse (1 page maximum) :**

Directeur de thèse HDR :  
Nom : WEIDMANN  
Prénom : Stéphanie

**2) Descriptif du projet de thèse (devra inclure les rubriques suivantes) :**

- nom et label de l'unité de recherche (ainsi que l'équipe interne s'il y a lieu) : **Laboratoire PAM UMR 1517, Université de Bourgogne, AgroSup Dijon (Equipe AFIM)**

- localisation : **IUVV (Institut Universitaire de la Vigne et du Vin "Jules Guyot"), DIJON**

- nom du directeur de thèse et du co-directeur s'il y a lieu  
Directeur de thèse : **WEIDMANN Stéphanie**

- adresse courriel du contact scientifique : [stephanie.desroche@u-bourgogne.fr](mailto:stephanie.desroche@u-bourgogne.fr)

**- description du projet (2 pages maximum) :**

Lors du process de fabrication du vin, la fermentation alcoolique réalisée par les levures peut être suivie par la fermentation malolactique (FML) réalisée par des bactéries lactiques dont l'espèce *Oenococcus oeni*. Cette seconde fermentation permet d'assurer une haute qualité des vins en diminuant l'acidité totale, en modulant le profil organoleptique des vins ou en stabilisant le vin d'un point de vue microbiologique (Bartowsky et Borneman, 2011 Appl. Microbiol. Biotechnol. 92: 441-447). Face aux conditions environnementales drastiques des vins, une FML tardive ou inexistante peut être observée due à une forte mortalité des ferments utilisés. La qualité des vins peut alors être altérée et un retard de mise sur le marché observé. Dans ce contexte, mieux comprendre et mieux caractériser la réponse au stress des microorganismes est un enjeu primordial. Les bactéries lactiques possèdent un arsenal de réponse au stress parmi lesquels on peut trouver l'activation des H<sup>+</sup>-ATPase, la régulation de la fluidité membranaire, la formation de biofilm ou la synthèse de protéines de stress (Guzzo, J., 2011 dans E. Tsakalidou & K. Papadimitriou (Éds.):349-365). Ce dernier mécanisme de réponse au stress a été particulièrement documenté ces dernières années chez *O. oeni*. En effet, cette espèce bactérienne produit une « small Heat shock protein » (sHsp) nommée Lo18 qui est particulièrement importante pour ses activités de chaperon moléculaire et lipochaperon moléculaire (Bellanger *et al.*, 2023 Sci Report 13 : 19036).

Récemment un autre mécanisme de réponse au stress a été identifié chez les bactéries. Il s'agit de la production de vésicules membranaires (MVs). Les MVs sont des structures lipidiques de 20 à 500 nm de diamètre contenant diverses macromolécules, telles que des phospholipides, des protéines, des lipopolysaccharides (LPS) et des acides nucléiques (Brown *et al.*, 2015, Nat. Rev. Microbiol. 13:620-630). Elles représentent ainsi potentiellement des organelles de transport et de communication importantes au sein des communautés

microbiennes. Les MVs produites par les bactéries participent à une multitude de rôles physiologiques comme la communication inter ou intra-espèces, le développement de biofilm, l'attaque des phages, le transfert horizontal des gènes et la virulence pour les bactéries pathogènes (Ellis *et al.*, 2010, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 74:81-94). Les mécanismes de biogenèse ainsi que les rôles des MVs libérées par les bactéries à Gram positif restent encore peu décrits dans la littérature, contrairement aux bactéries à Gram négatif qui représentent la majorité du travail de recherche sur les vésicules bactériennes.

Un travail récemment engagé dans notre équipe a permis de mettre en évidence la production de MVs par la bactérie *O. oeni* sans pour autant que leurs rôles ne soient évalués.

**Le sujet de thèse que nous proposons sera de nature interdisciplinaire en combinant des approches de microbiologie moléculaire, de physiologie bactérienne, de biologie cellulaire avec l'utilisation de techniques d'imagerie, de microscopie et de méthodes biophysiques.** Le doctorant réalisera ses travaux de recherche au sein de l'UMR PAM (équipe AFIM) et bénéficiera d'une formation à la recherche sur un sujet extrêmement porteur pouvant déboucher sur des valorisations aussi bien fondamentales qu'appliquées. De plus, l'adossement à des plateaux techniques locaux (imagerie, protéomique) assureront un environnement propice à la réussite du travail de recherche du doctorant.

Dans ce contexte, le sujet proposé vise à caractériser la réponse adaptative de *O. oeni* via la production de MVs et la synthèse du chaperon moléculaire Lo18. Pour cela, 3 axes d'étude sont envisagés :

### **1. Production et caractérisation des MVs de *O. oeni* :**

Les MVs seront purifiées à partir du surnageant de culture d'une souche modèle de *O. oeni* et seront caractérisées au niveau de leur taille, de leur concentration et de leur composition (protéique et lipidique). Une combinaison de différentes approches (AFM : Atomic Force Microscopy, TEM : Transmission Electron Microscopy, SEM : Scanning Electron Microscopy, NTA : Nanoparticle Tracking Analysis, Confocal Microscopy) sera utilisée afin d'observer, de dénombrer et de mesurer les MVs purifiées à l'aide d'un protocole déjà mis en place au laboratoire. Au sein des MVs, la protéine de stress Lo18 sera particulièrement recherchée par des méthodes d'immunomarquage.

### **2. Détermination du rôle des MVs dans la réponse au stress chez *O. oeni* :**

La production de MVs sera évaluée dans la réponse à des stress environnementaux cohérents avec ceux rencontrés en vinification, avec un focus sur le stress éthanol, qui dans un contexte de réchauffement climatique sera de plus en plus présent. Pour cela, la survie et la capacité des bactéries à réaliser la FML en conditions drastiques seront testées en fonction de la production de MVs et de la synthèse de Lo18.

### **3. Impact des MVs sur la physiologie de *O. oeni* dans les conditions de vinification :**

Le rôle des MVs sera évalué au cours de la vinification. Pour cela, des conditions de culture d'*O. oeni* permettant la production de quantités variables de vésicules seront utilisées. Les ferments ainsi préparés seront testés dans un itinéraire de vinification. Les profils métabolomiques en fin de vinification seront établis et le lien avec la formation de vésicules sera analysé. Pour réaliser cette partie expérimentale, nous nous appuyons sur la plateforme de métabolomique DIVVA hébergée à l'IUVV.

En conclusion, ce projet de thèse permettra d'améliorer les connaissances sur les mécanismes adaptatifs mis en place par des bactéries fermentaires afin d'optimiser leur utilisation.

### **- Financement du projet – partie Recherche (montants acquis, type de contrat)**

- Projet de maturation VESIBIO financé par la SATT SAYENS - AQUIS
- Projet de recherche PROFILM financé par l'institut Carnot Qualiment. - AQUIS
- Solde d'un projet industriel disponible à la SATT SAYENS : - AQUIS
- Projet de structuration de la recherche CLIMIC financé par la région Bourgogne Franche-Comté : EN COURS DE DEPOT

### **- Connaissances et compétences requises**

Culture bactérienne et méthode de microbiologie classique  
Techniques d'étude de l'expression de gènes (PCR quantitative)  
Techniques d'études de protéines (extraction, quantification, Western blotting, etc...)  
Capacité rédactionnelle, esprit critique et ouvert aux échanges pluridisciplinaires  
Démarche collégiale dans le travail, Rigueur, Assurance à l'oral

### **Résumé en français et anglais (limité chacun à 1800 caractères)**

Lors du processus de fabrication du vin, la fermentation alcoolique réalisée par les levures peut être suivie par la fermentation malolactique (FML) réalisée par des bactéries lactiques et plus particulièrement par l'espèce *Oenococcus oeni*. Cette seconde fermentation permet d'assurer une haute qualité des vins en diminuant l'acidité totale, en modulant le profil organoleptique des vins ou en stabilisant le vin d'un point de vue microbiologique. Face aux conditions environnementales drastiques des vins, une FML tardive ou inexistante peut être observée due à une forte mortalité des ferments utilisés. Ainsi, mieux comprendre et mieux caractériser la réponse aux stress des microorganismes est un enjeu primordial. Ce projet de thèse vise donc à caractériser la réponse adaptative de *O. oeni* via la production de MVs et la synthèse du chaperon moléculaire Lo18. Pour cela, 3 axes d'étude combinant des approches de microbiologie moléculaire, de physiologie bactérienne, de biologie cellulaire avec l'utilisation de techniques d'imagerie, de microscopie et de méthodes biophysiques sont envisagés avec (i) la production et la caractérisation du contenu des MVs, (ii) la détermination du rôle des MVs en conditions de stress et (iii) l'impact de la production des MVs au cours du processus de vinification et sur le produit fini. Ce travail débouchera sur des valorisations aussi bien fondamentales qu'appliquées.

During the winemaking process, alcoholic fermentation carried out by yeasts can be followed by malolactic fermentation (MLF) carried out by lactic acid bacteria and more specifically by the *Oenococcus oeni* species. This second fermentation ensures high quality wines by reducing total acidity, modulating the organoleptic profile of the wines and stabilising the wine from a microbiological point of view. Given the drastic environmental conditions of the wines, late or non-existent MLF can be observed due to high mortality of the ferments used. A better understanding and characterisation of the microorganisms' response to stress is therefore of importance. The aim of this thesis project is therefore to characterise the adaptive response of *O. oeni* via the production of MVs and the synthesis of the Lo18 molecular chaperone. To achieve this, 3 areas of study combining molecular microbiology, bacterial physiology and cell biology approaches with the use of imaging techniques, microscopy and biophysical methods are envisaged for the (i) production and characterisation of the content of MVs, (ii) determination of the role of MVs under stress conditions and (iii) impact of MV production during the winemaking process and on the finished product. This work will lead to both fundamental and applied applications.

### **Préciser le domaine de compétence dans la liste ci-dessous : Biologie**

### **Mots clés :**