

**Titre du projet :** Evolution adaptative de *Oenococcus oeni* pour améliorer et comprendre la tolérance à l'éthanol de cette bactérie lactique d'intérêt œnologique (EVAdO 3.0)

**1) Renseignements administratifs sur la direction de thèse<sup>1</sup> (1 page maximum) :**

Directeur de thèse HDR :  
Nom : GRANDVALET  
Prénom : Cosette

**2) Descriptif du projet de thèse :**

**Laboratoire d'accueil :** UMR PAM, Equipe AFIM, Institut Universitaire de la vigne et du Vin (IUVV), Université de Bourgogne, 2 rue Claude Ladrey, Dijon

**Direction de thèse :** C. Grandvalet, [cosette.grandvalet@institut-agro.fr](mailto:cosette.grandvalet@institut-agro.fr), tél : 03.80.39.62.66

**Titre du projet :** Evolution adaptative de *Oenococcus oeni* pour améliorer et comprendre la tolérance à l'éthanol de cette bactérie lactique d'intérêt œnologique (EVAdO 3.0)

**Description du projet :**

*Etat de l'art :* La bactérie lactique, *Oenococcus oeni*, est un acteur majeur de la fermentation malolactique des vins (FML), une étape qui fait suite à la fermentation alcoolique (FA) assurée par les levures [1]. La FML est recherchée dans l'élaboration de nombreux vins rouges et certains vins blancs pour ses impacts positifs liés entre autres à la décarboxylation du malate en lactate qui tend à diminuer l'acidité mais également par la consommation de sources nutritives qui confèrent une meilleure stabilité microbiologique aux vins [2]. La plupart du temps, les FML démarrent spontanément suite à la FA. Néanmoins certaines matrices œnologiques se révèlent particulièrement difficiles au maintien et à la survie des souches indigènes présentes et aptes à mener cette fermentation. L'acidité, la présence de SO<sub>2</sub>, d'éthanol et les carences nutritionnelles, contribuent aux retards et aux arrêts précoces des FML. Pour assurer le bon déroulement de ces fermentation et limiter les risques de dérives organoleptiques des vins, les professionnels du secteur ont recours à l'utilisation de ferments malolactiques [3,4]. Une sélection attentive est portée aux souches qui composent ces ferments pour optimiser leur fonctionnalité.

Deux paramètres physico-chimiques majeurs impactent la survie et la fonctionnalité des bactéries lactiques en vins : le pH et l'éthanol. La tolérance de *O. oeni* aux conditions œnologiques en fait l'espèce majoritairement présente en fin de FA [2]. Néanmoins, la survie de cette espèce peut être fortement affectée dans les vins acides, tels que les vins de champagne (pH<3,0). De plus, dans le contexte du changement climatique qui s'opère, la maturité des raisins tend à produire des moûts de plus en plus riches en sucre et donc des vins avec un degré alcoolique plus élevé laissant présager une complexification de l'efficacité fermentaire de *O. oeni*. La compréhension des mécanismes de tolérance de *O. oeni* aux conditions œnologiques, en particulier aux fortes concentrations en éthanol, apparaît fondamentale pour pouvoir anticiper le changement de la composition des matrices vinaïres et répondre aux enjeux de demain.

L'ensemble des souches de *O. oeni* caractérisées à ce jour forme quatre lignées génétiques majeures dits phylogroupes A, B, C et D [5]. La plupart des souches isolées de vins appartiennent au phylogroupe A. La résilience de ce phylogroupe en vin s'explique par une plus haute tolérance de ces bactéries à l'éthanol[6]. Diverses études rendent compte des mécanismes mis en jeu par *O. oeni* pour faire face aux stress environnementaux : le maintien de l'intégrité cellulaire par la synthèse de

<sup>1</sup> ATTENTION : selon l'article 16 de l'arrêté du 25 mai 2016, le total d'encadrants ne peut pas dépasser 2, sauf si l'un des encadrants appartient au monde socio-économique, qui peut venir en sus, ou en cas de co-tutelle; Le décompte des co-encadrements se fera au prorata du nombre d'encadrants : 1 pour 1 encadrant, ½ pour deux encadrants.

protéines de stress [7–9], la modification de la composition lipidique membranaire [10–12], la production d'exopolysaccharides [13], la formation de biofilms bactériens [14], ... Des travaux précédents menés au sein de notre laboratoire en collaboration avec l'Institut Pasteur (projet **EVAdO 2.0**) se sont intéressés à l'acido-tolérance de *O. oeni* et ont mis en évidence l'importance de la régulation du métabolisme des acides organiques, en particulier du citrate, dans la tolérance de la bactérie à l'acidité [15,16]. C'est par une approche d'évolution adaptative que ces travaux ont été menés et ont permis d'identifier des gènes impliqués dans l'acquisition de l'acido-tolérance [16,17]. L'évolution adaptative consiste à propager sur des milliers de générations une souche dans un environnement en exerçant progressivement une pression de sélection sur un paramètre physico-chimique donné (température, pH, nutriment,...). Cette approche constitue un outil pertinent pour identifier et comprendre les mécanismes mis en place par les bactéries au cours de leur adaptation à leur environnement. L'approche par évolution adaptative constitue un outil particulièrement bien approprié à *O. oeni* qui est une espèce qualifiée d'hypermutable du fait que son génome est dépourvu des gènes *mutS* et *mutL*, deux gènes essentiels au système de réparation post-répliatif des mésappariements de l'ADN (système MMR, *mutation mismatch repair*) [18]. En 2017, des expériences d'évolution adaptatives de *O. oeni* à l'éthanol ont été menées par une équipe australienne donnant lieu à la sélection d'une souche capable de tolérer plus de 20% d'éthanol [19]. Ces travaux n'ont pas donné lieu à une étude approfondie pour rendre compte des mécanismes moléculaires mise en jeu. Ainsi, ce projet vise à adapter progressivement une souche de *O. oeni* à des concentrations élevées en éthanol afin de mettre en évidence et de comprendre les mécanismes de tolérance de cette bactérie à l'éthanol.

**Objectifs et stratégie scientifique du projet EVAdO 3.0** : Dans un contexte de réchauffement climatique grandissant et imparable il est important de s'intéresser et de comprendre les mécanismes de tolérance de *O. oeni* à l'éthanol. *Comment expliquer la plus grande tolérance à l'éthanol des souches du phylogroupe A? Est-il possible d'acclimater des souches à des concentrations extrêmes d'éthanol sans impacter l'efficacité de la FML?* Pour répondre à ces interrogations et dans la continuité des recherches précédemment menées, une expérience d'évolution adaptative sera mise en œuvre par repiquages successifs d'une souche de *O. oeni* dans un milieu modèle progressivement enrichi en éthanol (WP1). La comparaison des génomes (WP2) des populations évoluées *versus* la souche parentale permettra d'identifier les gènes potentiellement impliqués dans la résistance de *O. oeni* à l'éthanol. Cette analyse sera réalisée en collaboration avec l'équipe de P. Glaser (Institut Pasteur, Paris) qui a précédemment contribué à l'étude sur l'acido-tolérance de *O. oeni* (**EVAdO 2.0**). Les populations évoluées seront évaluées pour leur résistance à l'éthanol et leur capacité fermentaire en milieu modèle (WP3). Un suivi du métabolisme permettra de mettre en évidence des réorientations potentielles des flux métaboliques en lien avec la réponse au stress. Une attention particulière sera portée à la composition lipidique membranaire des populations évoluées pouvant rendre compte d'éventuelles modifications en réponse au stress éthanol. Des mesures de la fluidité membranaire et du maintien de son intégrité en présence de fortes concentrations en éthanol seront réalisées. Ces données permettront de formuler des hypothèses quant à la fonction des gènes mutés au cours de l'évolution (WP4). Par complémentations génétiques et/ou par des approches d'ARN interférence, ces hypothèses seront validées ou invalidées (WP5). Enfin des tests de compétitivité (« *fitness* ») en conditions contrôlées seront mis en œuvre afin de mesurer le coût lié à l'alcool-tolérance (WP6).

**Financement du projet** : Les thématiques de ce projet doctoral sont inscrits dans le projet région CLIMIC (88 k€), qui soutiendra le fonctionnement de ces travaux (porté par S. Rousseaux, AFIM). Une demande de financement déposée dans le cadre Ferment du futur, FExFerm (186 k€), contribuera également au fonctionnement de ce projet (porté par C. Grandvalet et C. Eicher). La société Biolaffort (Flourac,33), partenaire du projet EvAdO 2.0 a également été sollicitée pour participer financièrement à la continuité de ce projet (10 k€).

**Connaissances et compétences requises** : La mise en œuvre de ce projet requière des compétences techniques et théoriques dans le domaine de la microbiologie, de bonnes connaissances du métabolisme microbien et de la génétique bactérienne. La maîtrise des outils d'analyse et de comparaison de génomes sera également nécessaire et pourra être renforcée au cours du doctorat. L'implication dans ce projet requière également la capacité à travailler en équipe, une bonne communication, une capacité de synthèse et de rédaction ainsi qu'une parfaite intégrité scientifique. Le respect des droits, des devoirs et des engagements dans la conduite du doctorat sont énoncés

dans la charte des thèses de l'Université de Bourgogne Franche -Comté et le règlement intérieur de l'école doctorale Environnements-Santé (<https://e2s.ubfc.fr/>).

**Rôle structurant de ce projet :** Les objectifs de ce projet sont en parfaite cohérence avec les thématiques de recherche développées au sein de l'UMR PAM à travers la compréhension des mécanismes de tolérance des micro-organismes à leur environnement dans le but d'optimiser la fonctionnalité des ferments du futur. La conduite de ce projet confortera incontestablement la position nationale et internationale de notre laboratoire en tant que leader dans la génétique de la bactérie lactique d'intérêt œnologique, *O. oeni*. Au-delà des connaissances fondamentales que ce projet sera amené à produire, ces recherches renforceront le partenariat établi avec l'équipe de P. Glaser (Institut Pasteur, Paris) et génèrera un ensemble de données numériques tant au niveau génomique que transcriptomique.

#### Calendrier prévisionnel de réalisation

| SEMESTRES   | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 |
|---|----|----|----|----|----|----|
| WP1 : Evolution adaptative des souches                              |    |    |    |    |    |    |
| WP2 : Génomique comparative (évoluée vs ancestrale)                 |    |    |    | R  |    |    |
| WP3 : Caractérisation phénotypique et lien avec le génotype         |    |    |    |    |    |    |
| WP4 : Transcriptome et <i>hyp.</i> sur les mécanismes de régulation |    |    |    |    | R  |    |
| WP5 : Validation/invalidation des hypothèses                        |    |    |    |    |    |    |
| WP6 : Capacité fermentaire des souches évoluées et <i>fitness</i>   |    |    |    |    |    | R  |

R : Rédaction de publications et du manuscrit de thèse

#### Références bibliographiques

- [1] Versari A, Parpinello GP, Cattaneo M. *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. *J Ind Microbiol Biotech* 1999;23:447–55. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900733>.
- [2] Lonvaud-Funel A. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1999;76:317–31.
- [3] Coucheney F, Desroche N, Bou M, Tourdot-Maréchal R, Dulau L, Guzzo J. A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. *International Journal of Food Microbiology* 2005;105:463–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.023>.
- [4] Fu J, Wang L, Sun J, Ju N, Jin G. Malolactic Fermentation: New Approaches to Old Problems. *Microorganisms* 2022;10:2363. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122363>.
- [5] Campbell-Sills H, El Khoury M, Favier M, Romano A, Biasioli F, Spano G, et al. Phylogenomic Analysis of *Oenococcus oeni* Reveals Specific Domestication of Strains to Cider and Wines. *Genome Biol Evol* 2015;7:1506–18. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv084>.
- [6] Balmaseda A, Lorentzen M, Dutilh L, Bauduin R, Guichard H, Ollivier S, et al. Alcoholic fermentation drives the selection of *Oenococcus oeni* strains in wine but not in cider. *International Journal of Food Microbiology* 2023;400:110276. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110276>.
- [7] Guzzo J, Jobin MP, Delmas F, Fortier LC, Garmyn D, Tourdot-Maréchal R, et al. Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as a function of environmental changes and growth phase. *Int J Food Microbiol* 2000;55:27–31.
- [8] Beltramo C, Desroche N, Tourdot-Maréchal R, Grandvalet C, Guzzo J. Real-time PCR for characterizing the stress response of *Oenococcus oeni* in a wine-like medium. *Research in Microbiology* 2006;157:267–74. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.07.006>.
- [9] Darsonval M, Julliat F, Msadek T, Alexandre H, Grandvalet C. CtsR, the Master Regulator of Stress-Response in *Oenococcus oeni*, Is a Heat Sensor Interacting With ClpL1. *Front Microbiol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03135>.
- [10] Grandvalet C, Assad-García JS, Chu-Ky S, Tollot M, Guzzo J, Gresti J, et al. Changes in membrane lipid composition in ethanol- and acid-adapted *Oenococcus oeni* cells: characterization of the *cfa* gene by heterologous complementation. *Microbiology (Reading, Engl)* 2008;154:2611–9. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/016238-0>.
- [11] Chu-Ky S, Tourdot-Marechal R, Marechal P-A, Guzzo J. Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: Effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2005;1717:118–24. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.015>.
- [12] Tourdot-Maréchal R, Gaboriau D, Beney L, Diviès C. Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*. *Int J Food Microbiol* 2000;55:269–73.

- [13] Dimopoulou M, Raffenne J, Claisse O, Miot-Sertier C, Iturmendi N, Moine V, et al. *Oenococcus oeni* Exopolysaccharide Biosynthesis, a Tool to Improve Malolactic Starter Performance. *Front Microbiol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01276>.
- [14] Bastard A, Coelho C, Briandet R, Canette A, Gougeon R, Alexandre H, et al. Effect of Biofilm Formation by *Oenococcus oeni* on Malolactic Fermentation and the Release of Aromatic Compounds in Wine. *Oenococcus oeni* 2016:613. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00613>.
- [15] Julliat F. Mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la réponse au stress chez *Oenococcus oeni* et évolution expérimentale. Thèse de doctorat. Bourgogne Franche-Comté, 2020.
- [16] Eicher C. Evolution adaptative et acidotolérance de la bactérie d'intérêt oenologique : *Oenococcus oeni*. Thèse en préparation. Bourgogne Franche-Comté, 2024.
- [17] Julliat F, Eicher C, Tourti N, Glaser P, Cabanel N, Coulon J, et al. Experimental evolution forcing *Oenococcus oeni* acid tolerance highlights critical role of the citrate locus. *Res Microbiol* 2023:104048. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2023.104048>.
- [18] Marcobal AM, Sela DA, Wolf YI, Makarova KS, Mills DA. Role of hypermutability in the evolution of the genus *Oenococcus*. *J Bacteriol* 2008;190:564–70. <https://doi.org/10.1128/JB.01457-07>.
- [19] Betteridge AL, Sumbly KM, Sundstrom JF, Grbin PR, Jiranek V. Application of directed evolution to develop ethanol tolerant *Oenococcus oeni* for more efficient malolactic fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017:1–12. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8593-x>.

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

Dans un contexte de changement climatique, la fermentation alcoolique des moûts de raisin produit des vins de plus en plus riches en éthanol ce qui entrave le bon déroulement de la fermentation malolactique (FML). Cette seconde fermentation, assurée par les bactéries lactiques, confère souplesse, rondeur et une stabilité microbiologique à la plupart des vins rouges. Deux paramètres majeurs impactent la survie des bactéries lactiques en vin : le pH et l'éthanol. Par sa haute tolérance aux conditions œnologiques, *Oenococcus oeni* est la principale bactérie lactique capable d'assurer le déroulement optimal de la FML en vin. Sa survie et sa fonctionnalité sont néanmoins mises à l'épreuve dans des vins particulièrement difficiles (pH<3,0, éthanol > 15%). Ce projet vise à mettre en œuvre une expérience d'évolution adaptative de *O. oeni* afin d'optimiser la tolérance de cette bactérie à l'éthanol. L'évolution adaptative consistera à propager une souche dans un environnement de plus en plus enrichi en éthanol afin de sélectionner des populations hautement tolérantes. Ces populations évoluées seront caractérisées au niveau génomique et une analyse de leur transcriptome et des flux métaboliques en conditions fermentaires permettra de rendre compte des mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'acquisition de la tolérance à l'éthanol. Des approches par complémentations génétiques et/ou ARN interférences viendront confirmer la justesse des mécanismes présumés. Une attention particulière sera portée aux changements induits dans la composition lipidique membranaire suite au procédé d'évolution et à l'impact sur la fluidité de la membrane. Ce projet donnera l'essor à des ferments de nouvelle génération apte à assurer la FML dans des matrices modifiées suite au changement climatique tout en apportant des connaissances fondamentales sur les mécanismes moléculaires mis en œuvre.

In a context of climate change, the alcoholic fermentation of grape must produces wines with high ethanol content, which negatively impact the malolactic fermentation (MLF) process. This second fermentation, driven by lactic acid bacteria, gives roundness and microbiological stability to most red wines. Two major parameters impact the survival of lactic acid bacteria in wine: acidity and ethanol. Due to its high tolerance to oenological conditions, *Oenococcus oeni* is the main lactic acid bacteria able to ensure the MLF in wine. However, its survival and functionality are decreased in hard wines (pH<3.0, ethanol > 15%). This project aims to implement an adaptive evolution experiment with *O. oeni* in order to optimize the tolerance of this bacterium to ethanol. Strains will be propagated in an increasingly ethanol-enriched environment in order to select highly tolerant populations. These evolved populations will be characterized at the genomic level. Transcriptomic and metabolic analyses will highlight the molecular mechanisms involved in ethanol tolerance under fermentation conditions. Genetic complementation and/or RNA interference technology will confirm the accuracy of the presumed mechanisms. Particular attention will be paid to the induced changes in the membrane lipid composition following the evolution process and the impact on the membrane fluidity. This project will produce new generation ferments able to ensure MLF in matrices modified by climate change as well as fundamental knowledge on the molecular mechanisms involved in ethanol-tolerance.

**Préciser le domaine de compétence dans la liste ci-dessous (2 choix possibles maximum – ne pas modifier les intitulés : ils sont imposés par certains sites web) :**

**Biologie**

**Sciences de la donnée (stockage, sécurité, mesure, analyse)**

**Mots clés :** Evolution expérimentale ([experimental evolution](#)), *Oenococcus oeni*, stress, vin ([wine](#)), éthanol ([ethanol](#))