

Interactions micro-organismes - bois et impact sur les propriétés physico-chimiques du vin : fermentation malolactique par le biofilm de Oenococcus oeni

Alexandre Bastard

▶ **To cite this version:**

Alexandre Bastard. Interactions micro-organismes - bois et impact sur les propriétés physico-chimiques du vin : fermentation malolactique par le biofilm de Oenococcus oeni. Ingénierie des aliments. Université de Bourgogne, 2015. Français. NNT : 2015DIJOS069 . tel-01329294

HAL Id: tel-01329294

https://theses.hal.science/tel-01329294

Submitted on 9 Jun 2016

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

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

Université de Bourgogne – Franche-Comté,
Institut Universitaire de la Vigne et du Vin
UMR PAM - équipe VAlMiS
Ecole Doctorale Environnements-Santé

THESE de DOCTORAT

Discipline : Sciences des Aliments
Spécialité Microbiologie - Œnologie

Interactions Micro-organismes – Bois et Impact sur les Propriétés Physico-chimiques du Vin

Fermentation malolactique par le biofilm de *Oenococcus oeni*

présentée par

Alexandre Bastard

Le 7 décembre 2015

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne – Franche-Comté

Membres du jury :

Patrick Lucas	Université de Bordeaux	Rapporteur
Djamel Drider	Université de Lille	Rapporteur
Romain Briandet	INRA Jouy-en-Josas	Président du Jury
Joana Coulon	BioLaffort	Examinateur
Jean Guzzo	Université de Bourgogne	Directeur de thèse
Stéphanie Weidmann	Université de Bourgogne	Co-encadrant
Christian Coelho	Université de Bourgogne	Co-encadrant

Honi soit qui mal y pense

Table des matières

Remerciements **1**

Listes **3**

Liste des figures 3

Liste des tableaux 4

Liste des abréviations 5

Avant-propos **6**

I) Synthèse bibliographique **8**

I.1. Composition de la matière première, le raisin 9

I.2. La vinification, transformation du raisin en vin 14

I.2.1. La fermentation alcoolique (FA) 16

I.2.2. La fermentation malolactique (FML) 16

I.2.3. Les arômes issus des fermentations 20

I.3. L'élevage en fût 22

I.3.1. La composition du fût 22

I.3.2. La fabrication du fût 23

I.3.3. Les échanges bois-vin durant l'élevage en fût 26

I.4. Les bactéries lactiques du vin 29

I.5. *Oenococcus oeni* 32

I.5.1. Résistance de *O. oeni* au stress du vin 34

I.5.2. Métabolisme d'intérêt œnologique de *O. oeni* avec le vin 37

I.5.3. Métabolisme d'intérêt œnologique de *O. oeni* avec le bois 41

I.6. Alternatives pour réaliser la FML 44

I.6.1. La FML : une opération à perfectionner 44

I.6.2. Alternatives à *Oenococcus oeni* 45

I.6.3. La FML réalisée par des cellules immobilisées 46

I.7. Le biofilm 51

I.7.1. Cycle de vie du biofilm 52
I.7.2. Techniques d'observation de biofilms 54
I.7.3. La matrice : composition et fonctions 56
I.7.4. Le biofilm, une communauté bactérienne dynamique 61
I.7.5. Utilisation biotechnologique des biofilms 62
I.7.6. Les biofilms dans le vin 64

II) Objectifs 66
III) Résultats 69

III.1. "Using *Oenococcus oeni* biofilm to control malolactic fermentation and modulate the organoleptic qualities of wine." 70

III.1.1. Introduction 70
III.1.2. Article 1 72
III.1.3. Résultats complémentaires 106

III.2. "*Oenococcus oeni* planktonic and biofilm life-styles differentiation by their Exopolymeric Substances" 111

III.2.1. Introduction 111
III.2.2. Article 2 112

IV) Discussion et perspectives 127
V) Références bibliographiques 137

Remerciements

J’adresse mes remerciements à l’Université de Bourgogne et au Conseil Régional de Bourgogne pour leur soutien financier essentiel au bon déroulement de ce travail de thèse ainsi que pour m’avoir permis d’élargir mes compétences à travers le dispositif « Jeune Chercheur Entrepreneur », le Master Administration des Entreprises et les formations PREMICE.

J’exprime ma profonde gratitude à mon directeur de thèse Jean GUZZO de m’avoir confié ce sujet, ainsi qu’à mes encadrants Stéphanie WEIDMANN, Christian COELHO, Régis GOUGEON, pour le temps, les conseils et l’appui scientifique qu’ils m’ont accordés.

Merci aux membres du jury, aux rapporteurs Patrick LUCAS et Djamel DRIDER et aux examinateurs Romain BRIANDET et Joana COULON.

Merci à Hervé ALEXANDRE de m’avoir accueilli au sein de l’équipe VAlMiS mais également pour sa contribution à cette thèse.

Merci aux équipes VAlMiS, PAPC, à l’UMR PAM, à l’Institut Universitaire de la Vigne et du Vin et à leurs membres de m’avoir aidé durant ces trois années, Aurélie RIEU, Cosette GRANDVALET, Michèle GUILLOUX-BENATIER, Raphaëlle TOURDOT-MARECHAL, Vanessa DAVID, Julie LAURENT, Laurence NORET, Franck BAGALA …

Je remercie également toutes les personnes avec qui j’ai pu collaborer et qui m’ont permis de mener à bien ce projet :

- Merci à Marie-Laure LEONARD pour son aide et l’utilisation du matériel de l’ESIREM.
- Merci à Romain BRIANDET pour son accueil à l’INRA Micalis B2HM et à Alexis CANNETTE pour la semaine de manip en microscopie confocale.
- Merci à Aline BONNOTTE pour les heures passées à observer les biofilms au MEB.
- Merci à Pierre-Jean MEAUSOONE pour la découpe des douelles
- Merci à Karine GOURRAT de l’INRA chemosens pour l’aide pour les analyses d’arômes

Merci aux Domaines de Bourgogne d’avoir partagé avec moi leur vision de ce fabuleux univers qu’est le vin ainsi que pour les dons des fûts :

- Mélanie Sire (Maison Joseph Drouhin),
- Anne-Laure Hernette (Maison Antonin Rodet),
- Pierre Vincent (Domaine de la Vougeraie),
- Cyrille Jacquelin (Maison Albert Bichot).

Merci à la tonnellerie François Frère d’avoir parrainé ma thèse et à Seguin-Moreau pour les échantillons de bois.

Merci à la SATT Grand-Est et notamment à Lucie CHARRAUD d'avoir permis de valoriser une partie de ce travail en un brevet.

Merci aux doctorants, ex-doctorants et stagiaires du laboratoire, Magali MAITRE, Mohand SADOUDI, Chloé ROULLIER-GALL, Charlie DUVAL, Quoc-Bao VOVAN, Maud DARSONVAL, Cédric GRANGETEAU, You Zhong LIU, Cédric LONGIN, Jana AZZAZ, Arnaud HEUMANN, Clément PETITGONNET, Tiffany POLETTI, Clément LESNIAK, Sharenjit SINGH, Eva MONTMESSIN, Margaux BERTIN qui m'ont accompagné pendant ces trois ans.

Merci à mes amis doctorants des autres laboratoires, Vincent GRANDPERRET, Pauline TRAPET, Nicolas MALFONDET …

Merci aux doctorants JCE, Elodie BARBIER, Caroline PELTIER, Justin EMERY, Marion GIRARD, Fam-ky SEAPHANH et Mariele MANCEBO-HUMBERT pour leur solidarité durant le MAE.

Merci à mes anciens encadrants de stage, Jean-François CAVIN, Hélène LICANDRO et Doriane TROMPIER de m'avoir accueilli dans le monde de la recherche.

Merci à mes enseignants, professeurs du primaire, secondaire et du supérieur d'avoir partagé votre passion du savoir et de la connaissance.

Merci à mes parents de m'avoir encouragé et permis de poursuivre ces études.
Merci à mes amis « non-doctorants » d'avoir compris.
Merci à toi, Audrey, *« je n'sais pas comment te dire, ce que je n'peux pas écrire. Faudrait que j´invente des mots, qu´existent pas dans le dico ».*

Merci à tous, sans distinction, sans classement pour votre participation directe ou indirecte à cette thèse, votre aide n'est pas une variable quantifiable !

Listes

Liste des figures

Figure 1 : Structures chimiques des principaux acides phénols du vin. A gauche les dérivés de l'acide benzoïque ; au centre, les dérivés de l'acide cinnamique ; à droite les phénols volatils et les esters de l'acide tartrique. (Roland, 2010; Navarre and Langlade, 2010; Ribéreau-Gayon et al., 2012) *10*

Figure 2 : Structures des principaux polyphénols du vins (Tarascou, 2005). *12*

Figure 3: Structure chimique des précurseurs glycosylés présents dans le vin. Ces hétérosides sont composés d'une glycone (mono-, oligo- ou poly- saccharide) et d'une aglycone (principales familles chimiques listées). Ces deux parties peuvent être séparées par hydrolyses enzymatique ou chimique. (Navarro, 2006; Baumes, 2009) *13*

Figure 4 : Itinéraire schématique de vinification des vins rouges et blancs de Bourgogne (Illustrations BIVB). *15*

Figure 5 : Transports de l'acide L-malique dans la cellule de O. oeni et rôle de la FML dans le maintien du pH interne. Schéma réalisé à partir de Loubiere et al., 1992; Tourdot-Maréchal et al., 1993; Salema et al., 1994; Bartowsky, 2005; Bouix and Ghorbal, 2015. ..... *18*

Figure 6: A gauche les merrains sont séchés en plein air ; à droite les douelles avant l'assemblage. *24*

Figure 7 : A gauche les douelles sont mises en rose et cerclées ; à droite chauffe et serrage d'un tonneau à l'aide d'un câble d'acier se resserrant progressivement en bas. (Olivier Colas CC BY-SA 3.0 via Wikimedia Commons) *24*

Figure 8 : Impact du métabolisme du citrate de O. oeni sur les propriétés organoleptiques du vin : production d'acide acétique et de diacétyle (Ramos et al., 1995; Nielsen and Richelieu, 1999; Bartowsky and Henschke, 2004). *39*

Figure 9 : Les 5 étapes du développement en biofilm. L'adhésion réversible à la surface [1], l'adhésion irréversible à la surface [2], la croissance, formation de microcolonies [3], la maturation du biofilm [4] et le détachement [5] qui conduit à la colonisation d'une nouvelle surface. Les halos verts autours des cellules représentent les EPS. D'après (Monroe, 2007). *52*

Figure 10 : Observation en MEB de cellules planctoniques (a) cellules de biofilm (b) et de la surface du biofilm (c) de Lactobacillus plantarum subsp. plantarum JCM1149 (Kubota et al., 2008) *54*

Figure 11 : Reconstruction 3D de l'architecture du biofilm de Bacillus subtilis à partir d'images de CLSM, EPS marqués par une lectine (Bridier et al., 2013). *55*

Figure 12 : Evolution du spectre ATR-FTIR avec l'attachement et le développement en biofilm des cellules de Pseudomonas fluorescens. (Delille et al., 2007) *55*

Figure 13 : Observation du biofilm de Streptococcus mutans par trois techniques : MEB (a), MEB avec coloration au rouge de ruthénium (b) et VPSEM (MEB environnemental) (c). Les trois images ont été obtenue avec un distance de travail de 8,5mm et ont champ de 100µm. (Weber et al., 2014) *56*

Figure 14 : Comparaison des observations du biofilm de Pseudomonas aeruginosa par CLSM (à gauche) et MEB (à droite). (Alhede et al., 2012) *56*

Figure 15 : Photographies des douelles sur lesquelles les prélèvements ont été effectués *106*

Figure 16 : Ensemble des résultats d'adhésion et de croissance de O. oeni obtenus sur microplaque de polystyrène. Axe gauche : croissance, barres vertes pour le temps 3 jours, oranges pour 15 jours (Cristal Violet 0,5%) ; Axe droit et barres bleues : adhésion au temps 4h (CV 1%). Les souches sélectionnées sont marquées d'une étoile. Les barres d'erreur représentent l'écart-type des 3 répétitions biologiques..... 107

Figure 17 : Dénombrements des cultures en biofilm des 4 souches sélectionnées aux temps 4 heures, 3 jours et 15 jours. La biomasse est exprimée en UFC/cm² d'acier. Les barres d'erreur représentent l'écart-type des 3 répétitions biologiques..... 108

Figure 18 : Comparaison de la biomasse du biofilm de O. oeni Sabo11 sur bois en fonction de l'inoculum ($2{,}5.10^{7}$-10^{8} UFC/ml) et du temps de culture (3-5 jours). Le test statistique ANOVA suivi du test post hoc de Tukey HSD n'a pas déterminé de condition significativement différente des autres (P=0,05). 109

Figure 19 : Comparaison de la biomasse des biofilms de O. oeni ATCC BAA-1163 et Sabo11 sur différentes types de bois de chêne. Pour le fournisseur Arobois (Aro), il faut distinguer trois chauffes : légère (LB), moyenne (MB) et forte (HB). Pour le fournisseur Seguin Moreau (SM), il faut distinguer deux espèces de chêne : français (FR) et américain (US) ; deux chauffes : moyenne (M) et moyenne plus (M+). Le test statistique ANOVA suivi du test post hoc de Tukey HSD n'a pas déterminé de condition significativement différente des autres (P=0,05)..... 110

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux composés aromatiques extraits du bois par le vin et seuil de perception dans le vin (IFV; Ferreira et al., 2002) 28

Tableau 2 : Caractéristiques des principales bactéries lactiques rencontrées dans le vin 30

Tableau 3 : Fonctions et intérêts des composants de la matrice du biofilm (Flemming and Wingender, 2010)... 58

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP : adénosine-5'-diphosphate

ATP : adénosine-5'-triphosphate

ATR-FTIR : A*ttenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier en Réflexion Totale Atténuée

CFA : *Cyclic Fatty Acid*, acide gras cyclique

Clp : *Caseinolytic protein*

CLSM : C*onfocal Laser Scanning Microscopy*, microscope confocal à balayage laser

CtsR : *Class Three stress gene Repressor*, répresseur des gènes de réponse au stress classe III

EPS : *Extracellular Polymeric Substances*, substances exopolymériques

FLBA : *Fluorescent Lectin-Binding Analyses*, analyses de liaison de lectines fluorescentes

FML : fermentation malolactique

Hsp : *Heat Shock Protein*, protéine de réponse au stress

HS-SMPE-GC-MS : *Headspace Solid-phase Micro-Extraction coupled with Gas Chromatography Mass Spectrometry*, Micro Extraction en Phase Solide dans l'espace de tête couplée à une Chromatographie en phase Gazeuse avec détection en Spectrométrie de Masse.

LDH : Lactate DésHydrogénase

Lec : lectines

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

pHint : potentiel Hydrogène intracellulaire

RT-qPCR : *Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction*, PCR quantitative suite à une transcription inverse

sHsp : *small Heat shock protein*, protéine de réponse au stress de faible masse moléculaire

SEM : *Scanning Electron Microscopy*, MEB

VPSEM : *Variable Pressure Scanning Electron Microscope*, MEB environnemental

Avant-propos

Les fermentations alcooliques et malolactiques sont souvent dues à des micro-organismes indigènes présents sur les baies de raisin et sur le matériel viti-vinicole. Des phénomènes de fermentation spontanée liés à des micro-organismes (bactéries ou levures) immobilisés sur les matériaux utilisés lors de l'élaboration des vins peuvent être recherchés. De ce fait, la capacité des bactéries à adhérer à des supports et à se développer en biofilm peut donc avoir un impact sur la qualité du vin et présenter un intérêt technologique pour l'ensemencement du vin par des bactéries sélectionnées.

Il est également important de considérer que la formation de biofilms bactériens peut être impliquée dans l'apparition d'altérations. Les biofilms constituent des communautés microbiennes pouvant abriter d'une part des espèces favorables (telle que *Oenococcus oeni*), d'autre part des micro-organismes indésirables (telles que des bactéries acétiques, *Pediococcus* spp., *Brettanomyces bruxellensis* …).

Une meilleure connaissance de la composition des biofilms ainsi que des mécanismes mis en jeu pour leur développement est importante afin de mieux maitriser le processus de fabrication du vin. Par ailleurs, le développement de bactéries à l'interface entre le support et le vin peut moduler les transferts de molécules aromatiques dans le vin. Aucune étude à ce jour ne s'est intéressée à la mise en évidence de ces biofilms et à leurs effets bénéfiques ou négatifs au cours des différentes étapes de la vinification : des fermentations à l'élevage en fût.

Les matériaux utilisés au cours de la vinification sont principalement le bois (fût de chêne) ou l'acier (pour les cuves). Parmi la flore technologique, la bactérie lactique *Oenococcus oeni* est particulièrement recherchée puisqu'elle est capable de réaliser la fermentation malolactique, importante étape lors de l'élaboration des vins. Cette fermentation permet une désacidification du vin, une stabilisation microbiologique et chimique, et participe au développement des qualités organoleptiques du vin.

L'adhésion des bactéries sur des supports est principalement liée à la présence de protéines transmembranaires ou de protéines de surface. Elle peut également être liée à la production de molécules extracellulaires telles que les exopolysaccharides. Les exopolysaccharides sont les constituants majeurs de la matrice extracellulaire

du biofilm et ils contribuent à la résistance des bactéries aux différents agents antimicrobiens. Plusieurs études ont été réalisées afin de caractériser les exopolysaccharides de la bactérie lactique *O. oeni*. Comme mis en évidence pour d'autres bactéries lactiques, ces exopolysaccharides pourraient augmenter la survie de cette bactérie dans le vin. Il est connu que les bactéries sont plus résistantes sous forme de biofilm. Ce phénotype pourrait donc présenter un avantage pour l'ensemencement des vins. En effet, l'association bois-vin peut être à l'origine de technologies innovantes dans le domaine du vin.

Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que l'interface entre le bois et le vin est le siège de différents mécanismes physico-chimiques de diffusion d'oxygène, de transfert de composés du bois vers le vin et inversement de sorption de composés du vin par le bois. A ce jour, aucune étude n'a cependant considéré une interface bois-vin caractérisée par l'existence d'un biofilm bactérien. Or, un tel biofilm doit nécessairement être considéré comme un filtre régulant les différents mécanismes d'échange entre le bois et le vin, dont l'efficacité régulatrice est liée à sa physiologie et à ses propriétés structurales.

Ce manuscrit de thèse comprend un premier chapitre bibliographique qui décrit l'état de l'art de l'élaboration du vin, avec une attention particulière portée sur la fermentation malolactique réalisée par *O. oeni,* lors de l'élevage en fût de chêne et la formation de biofilm dans ce contexte.

Après avoir exposé les objectifs du sujet interaction micro-organismes – bois et l'impact sur les propriétés physico-chimiques du vin, les résultats sont présentés sous forme d'articles scientifiques et de résultats complémentaires. Le premier chapitre est consacré à la réalisation de la fermentation malolactique par le biofilm de *O. oeni* comme une nouvelle solution pour déclencher le processus de fermentation et garantir les qualités organoleptiques du vin. Le second chapitre traite de la caractérisation de la structure chimique de la matrice du biofilm de *O. oeni*. Enfin, une synthèse critique des résultats et des propositions de perspectives permettant de compléter ce travail sont proposées.

I) Synthèse bibliographique

I.1. Composition de la matière première, le raisin

Le raisin utilisé pour la fabrication du vin à partir de son jus fermenté est le fruit de la vigne, *Vitis vinifera*, greffée sur un pied de *Vitis labrusca*. Il se présente sous forme de baies associées en grappes. Ces baies sont riches en composés chimiques, nécessaires à la fabrication du vin. Les constituants majeurs des baies de raisin sont les sucres, ils atteignent à maturité une concentration de 200 à 300 g/l. Ils sont classés en trois catégories :

i. les **monosaccharides**, appelés oses, sous forme de glucose (~100 g/l) et de fructose (~100 g/l) et en plus faibles proportions (0,5 g/l) : arabinose, xylose, ribose. Ces trois derniers ne sont pas fermentescibles par les levures mais servent de nutriments pour les bactéries lactiques. (Navarre and Langlade, 2010; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012a)
ii. les **polysaccharides**, appelés osides. Les holosides sont des polymères constitués d'unités osidiques identiques comme l'amidon, la cellulose ou multiples comme le saccharose et les pectines. Le saccharose est un disaccharide indirectement fermentescible car les enzymes végétales et levuriennes l'hydrolyse en une molécule de glucose et de fructose. Il est présent à une concentration de 1,5 g/l. (Navarre and Langlade, 2010; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012a)
iii. les **hétérosides** sont des polysaccharides liés avec des macromolécules non glucidiques, les aglycones : composés phénoliques ou précurseurs d'arômes. Tout au long de la vinification, particulièrement lors des fermentations, leur hydrolyse chimique ou enzymatique libère ces composés qui ont une influence organoleptique sur le vin, même dans des concentrations très faibles (de l'ordre du microgramme par litre ou *ppb*). (Navarre and Langlade, 2010; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012a)

Les **acides organiques** sont les seconds constituants du raisin, ils donnent au vin son caractère acide. Il s'agit notamment de l'acide tartrique (2 à 10 g/l), de l'acide malique (1 à 7 g/l) et de l'acide citrique (0,5 à 2 g/l) (Lasik, 2013). L'acide tartrique est produit uniquement par la vigne. L'acide malique existe dans une grande majorité de fruits, où il joue le rôle de vecteur d'énergie. Il est plus ou moins facilement mobilisé en fonction des cépages (*cultivars*) : ceux qui le mobilisent facilement sont plantés dans les régions septentrionales ; ceux qui sont plantés dans

les régions méridionales ont généralement besoin d'une température élevée pour augmenter la quantité de sucre dans la baie. (Navarre and Langlade, 2010; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012a)

Les **composés phénoliques** sont une grande famille de molécules, qui a une forte influence sur les propriétés organoleptiques du vin. Les acides phénols, leur forme la plus simple, possèdent au moins un cycle aromatique (benzène) avec soit une fonction alcool (phénol) soit une fonction carboxylique (cinnamique) (Figure 1). Dans le vin, ils sont présents dans des concentrations allant de 10 à 200 mg/l et se trouvent sous la forme de (i) dérivés de l'acide benzoïque *i.e.* les acides salicylique, gallique, catéchique et vanillique ; (ii) dérivés de l'acide cinnamique, *i.e.* les acides coumarique, caféique et férulique. D'autres sont présents sous la forme d'esters de l'acide tartrique comme pour l'acide coutarique ou l'acide caftarique (Figure 1). (Navarre and Langlade, 2010; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012a)

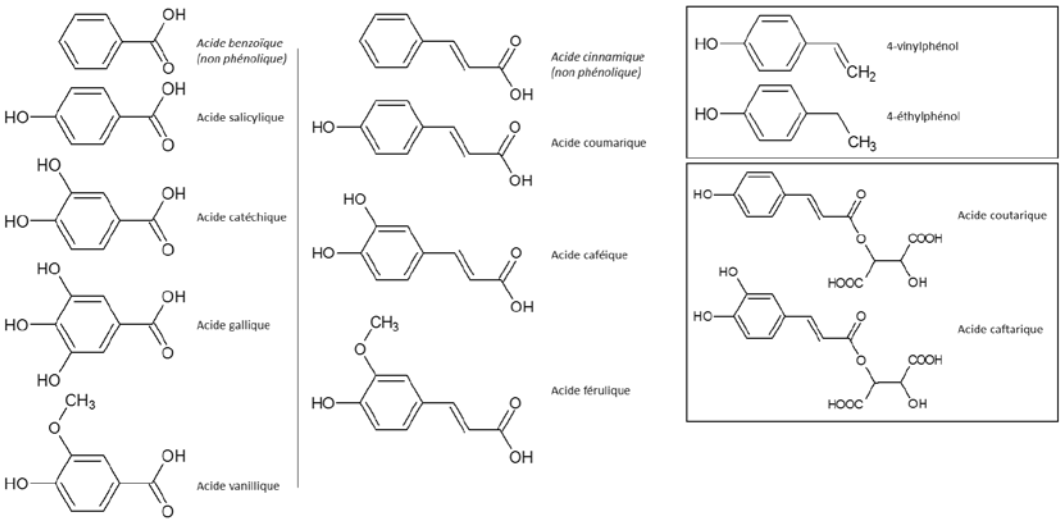


Figure 1 : Structures chimiques des principaux acides phénols du vin. A gauche les dérivés de l'acide benzoïque ; au centre, les dérivés de l'acide cinnamique ; à droite les phénols volatils et les esters de l'acide tartrique. (Roland, 2010; Navarre and Langlade, 2010; Ribéreau-Gayon et al., 2012a)

Les acides phénols sont précurseurs de **phénols volatils**, à l'origine de déviations aromatiques du vin, comme les vinyl-phénols (odeur pharmaceutique) et les éthyl-phénols (odeur animale) (Figure 1). Les acides phénols sont également susceptibles de former des quinones en s'oxydant (réactions avec l'oxygène, fer, cuivre …) ce qui entraîne un jaunissement du vin appelé le brunissement

enzymatique (action des laccases, tyrosinases …) (Waterhouse and Laurie, 2006; Karbowiak *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011; Casassa and Harbertson, 2014).

Les **polyphénols** sont constitués de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes. Les stilbènes sont les structures polyphénoliques les moins complexes présentes dans le vin, ils sont constitués de deux cycles benzéniques reliés par une chaine carbonée (Figure 2). Le principal représentant de cette catégorie est le resvératrol qui jouerait un rôle de résistance aux attaques fongiques (Pezet *et al.*, 2004). Les flavonoïdes ont une structure en deux cycles benzéniques reliés par un hétérocycle oxygéné (Figure 2). Ces polyphénols sont responsables de la couleur jaune aussi bien pour les cépages noirs (~100 mg/l) que blancs (~2 mg/l) et se trouvent dans la pellicule du raisin. (Figueiredo *et al.*, 2008)

Les **anthocyanes** sont des polyphénols hétérosidiques de structure similaire aux flavonoïdes, également localisées dans la pellicule du raisin (Figure 2). Ces pigments rouges sont présents sous différentes formes en équilibre : le pH, la teneur en SO_2 libre et la variation du potentiel d'oxydoréduction sont trois paramètres qui influencent la couleur qu'ils donnent au vin. Un pH bas favorise la forme de couleur rouge, au détriment des formes bleue, incolore et jaune et *vice versa*. En outre, en milieu réducteur la proportion des anthocyanes incolores augmente (He *et al.*, 2012). Les anthocyanes forment avec des copigments (acides phénols, coumarines, flavanols, acides aminés) des complexes qui stabilisent et intensifient la couleur (Boulton, 2001).

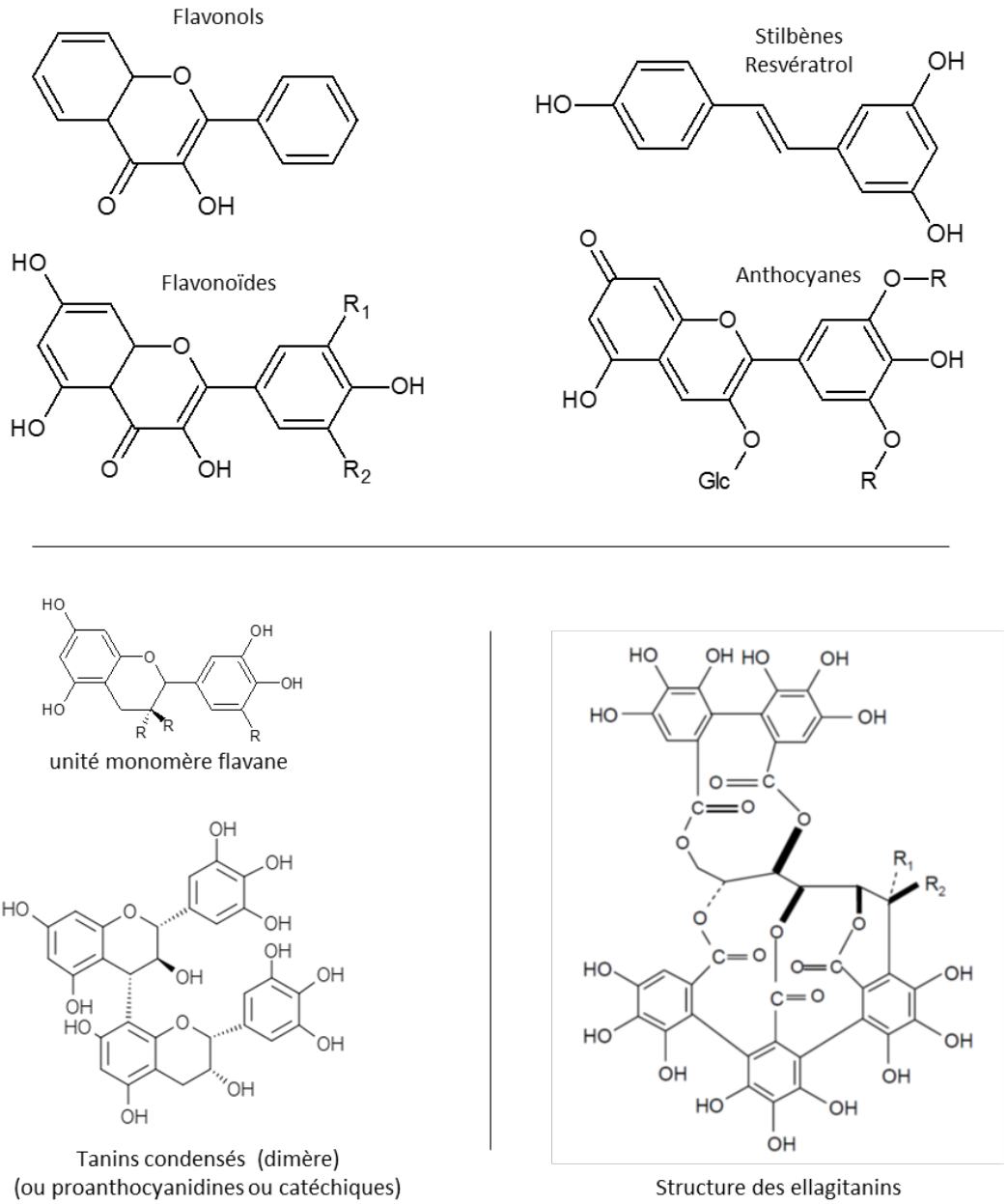


Figure 2 : Structures des principaux polyphénols du vins (Tarascou, 2005).

Les **tanins** sont des macromolécules phénoliques qui proviennent de deux sources. Les tanins condensés (ou catéchiques) se trouvent dans la pellicule, dans les pépins et dans la rafle : ce sont des polymères d'unité flavane (de 2 à >10-mères). De nature différente, les tanins hydrolysables (ellagiques, gallotanins) proviennent du bois de chêne (Vivas and Glories, 1996; Tarascou, 2005). Ces composés ont des structures chimiques et des configurations spatiales leur permettant de se complexer avec les protéines, les polysaccharides, les minéraux, les tanins eux-mêmes et les anthocyanes. La condensation des tanins avec les anthocyanes forme de nouveaux pigments, plus stables. (Mirabel *et al.*, 1999)

Les **composés aromatiques** sont présents en faibles concentrations individuelles dans le vin, à hauteur de quelques nanogrammes à microgrammes par litre. Leurs proportions varient fortement d'un cépage à l'autre. Ces composés volatils sont des acides, alcools, esters, aldéhydes. Les arômes provenant du raisin sont appelés arômes primaires (dits variétaux).

Le raisin contient également des **précurseurs d'arômes**, qui sont des arômes liés avec un ose (glucose ou arabinose), ils sont dits glycosylés. Ces aglycones deviennent aromatiques, c'est-à-dire détectables par le nez, après une hydrolyse qui résulte de l'activité glycosidasique des enzymes microbiennes (Figure 3). Les arômes-aglycones sont classés chimiquement parmi les terpènes, caroténoïdes et composés cystéinylés.

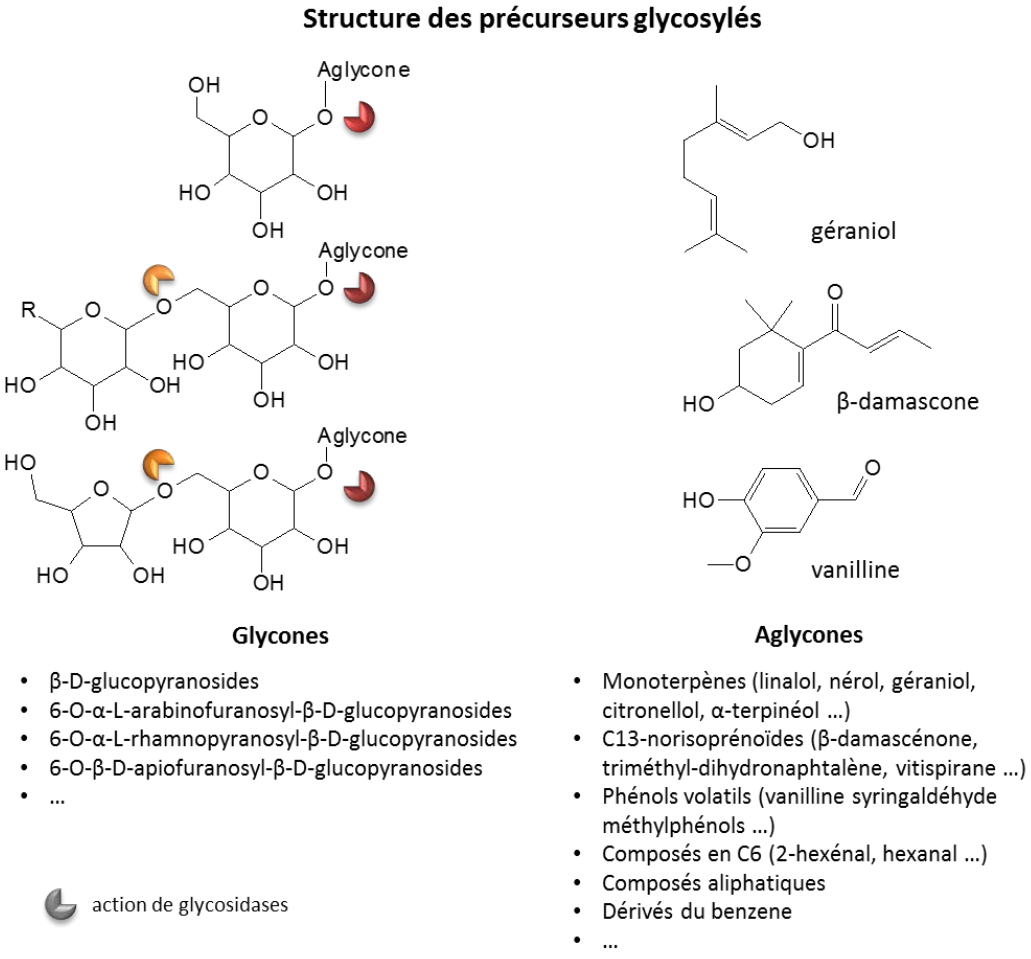


Figure 3: Structure chimique des précurseurs glycosylés présents dans le vin. Ces hétérosides sont composés d'une glycone (mono-, oligo- ou poly- saccharide) et d'une aglycone (principales familles chimiques listées). Ces deux parties peuvent être séparées par hydrolyses enzymatique ou chimique. (Navarro, 2006; Baumes, 2009)

Le raisin, comme tout composé biologique, contient des substances azotées. L'azote est présent sous forme minérale (ammoniacale) et organique (acides aminés, peptides)

I.2. La vinification, transformation du raisin en vin

La vinification est une suite de processus complexes de transformation du raisin en vin impliquant des levures et des bactéries. Ces microorganismes sont naturellement présents sur la peau du raisin dans les cuves, les fûts, dans l'ensemble de l'équipement utilisé lors de la vinification et même dans l'air du chai (Renouf *et al.*, 2005). Certaines étapes sont indispensables, d'autres sont laissées à la discrétion du vigneron en fonction du profil olfactif et gustatif recherché dans le vin final. Les méthodes de vinification varient en fonction des régions et des acteurs. Ce processus est décrit ci-dessous en reprenant les treize étapes utilisées dans l'élaboration des vins rouges de Bourgogne (Figure 4) :

i. Egrappage (éraflage), foulage : séparation des baies de raisin de la rafle et éclatement de celle-ci afin d'en libérer le jus.
ii. Encuvage : mise en cuve en acier du jus (moût) et des parties solides (pellicules et pépins) pour le processus de macération.
iii. Pigeage, remontage : le chapeau de marc (parties solides) est enfoncé dans le moût, qui est pompé et réintroduit par le haut en arrosant le chapeau de marc, afin d'en extraire les tanins et la couleur.
iv. **Fermentation alcoolique (FA)** : transformation des sucres du moût en alcool par les levures, qui libèrent de nombreux arômes. Le moût devient vin.
v. Ecoulage, décuvage : le vin est écoulé dans une autre cuve ou dans des fûts de bois. Il est appelé « vin de goutte ».
vi. Pressurage : le « vin de presse » est récupéré du marc
vii. Assemblage et débourbage : le vin de goutte et le vin de presse sont assemblés avant l'élevage. Ils restent troubles le temps que les particules les plus lourdes sédimentent, ces bourbes sont alors éliminées et le vin clair est mis en fût.
viii. **Fermentation malolactique (FML)** : Des bactéries lactiques, principalement de l'espèce *O. oeni,* transforment l'acide malique en acide lactique, ce qui

diminue l'acidité du vin et le stabilise. Cette étape n'est pas obligatoire, elle peut même être partielle.

ix. Soutirage, sulfitage : le vin clair est soutiré (il change de contenant) dans une cuve ou un fût, les lies grossières sont éliminées, les lies fines peuvent être conservées (élevage sur lies). Le vin est sulfité (SO_2) afin de le protéger des micro-organismes (cela arrête la FML) et de l'oxydation (le SO_2 bloque les oxydases et capte l'oxygène dissout).

x. **Elevage** : le vin est conservé en fût pendant plusieurs mois, des échanges se font avec le bois, le vin subit une évolution structurelle et aromatique.

xi. Soutirage, assemblage : le vin, soutiré de différents fûts, est assemblé en cuve afin d'homogénéiser le bouquet aromatique (l'âge des fûts influence les transferts).

xii. Collage : le vin est clarifié par une colle protéique, minérale ou synthétique qui précipite les particules en suspension.

xiii. Filtration et mise en bouteille.

Les trois étapes importantes pour ce sujet de thèse sont la fermentation alcoolique, la fermentation malolactique et l'élevage.

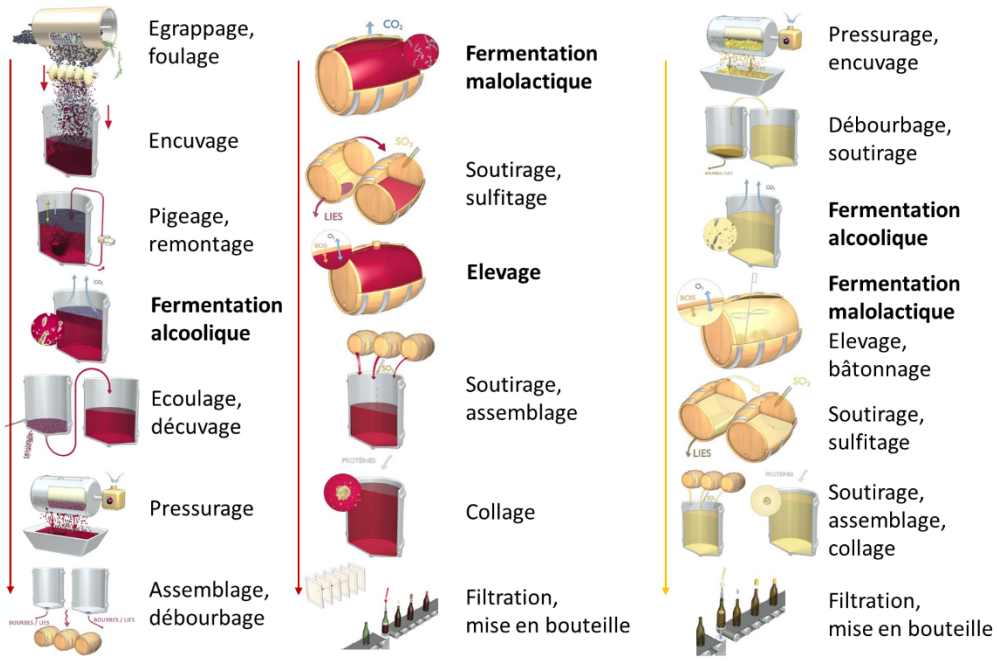


Figure 4 : Itinéraire schématique de vinification des vins rouges et blancs de Bourgogne (Illustrations BIVB).

I.2.1. La fermentation alcoolique (FA)

Dès l'entrée en chai, le raisin est généralement sulfité de 1 à 100 mg/l, selon l'état sanitaire de la vendange (Caboulet, 2002). Les levures fermentaires *Saccharomyces cerevisiae* sont moins sensibles au SO_2 et ont une croissance très forte dans ce milieu. Elles monopolisent donc l'écosystème microbien avec une biomasse de 10^7 à 10^8 UFC/ml durant la fermentation alcoolique, contre seulement 10^2 à 10^3 UFC/ml de *O. oeni* (Wibowo *et al.*, 1985). C'est ainsi qu'elles consomment les éléments nutritifs du milieu, en transformant les sucres fermentescibles en éthanol et en dioxyde de carbone. A cette fermentation s'ajoute de nombreuses voies secondaires qui produisent des composés d'intérêt œnologique (acide malique, glycérol, alcools supérieurs, acides gras, esters, *etc.*) car ils influencent significativement les caractéristiques organoleptiques du vin (Erasmus *et al.*, 2004; Swiegers *et al.*, 2005; Gammacurta *et al.*, 2014).

I.2.2. La fermentation malolactique (FML)

L'intérêt des chercheurs et des professionnels pour la fermentation malolactique est plus récent que pour la fermentation alcoolique (Davis *et al.*, 1985). Initialement, la fermentation malolactique était plutôt considérée comme « accidentelle ». Chez certains vignerons, elle se faisait de façon spontanée, sans intervention. D'autres essayaient plutôt d'éviter ce phénomène qu'ils ne maîtrisaient pas. L'évolution du goût du consommateur et les premiers résultats de la recherche ont permis de mettre en évidence deux intérêts de la fermentation malolactique : une maîtrise de l'acidité et une expression aromatique plus complexe.

La fermentation malolactique dans le vin est la **conversion enzymatique** de l'acide L-malique en acide L-lactique et CO_2. Ce phénomène suit généralement la fermentation alcoolique, mais il peut également se produire simultanément. L'activité de la fermentation malolactique est moins intense mais plus longue que celle de la fermentation alcoolique. Elle demande la plupart du temps entre 4 à 6 semaines.

Cette décarboxylation de l'acide malique en acide lactique n'est pas une réelle fermentation. En effet, la fermentation est un catabolisme anaérobie des nutriments organiques qui n'utilise pas de chaîne de transport d'électrons ni de phosphorylation

oxydative (Davis *et al.*, 1985). Ce processus est initié par des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus, Pediococcus* et *Oenococcus.* Actuellement, c'est l'espèce *O. oeni* qui a été privilégiée pour réaliser la FML en raison de son efficacité et de ses avantages gustatifs (Versari *et al.*, 1999; Lasik, 2013).

La plupart des bactéries lactiques transforment l'acide malique en acide lactique avec une formation intermédiaire d'acide pyruvique. En revanche, *O. oeni* convertit directement l'acide L-malique en une seule étape, grâce à l'enzyme malolactique (Lonvaud-Funel and Strasser de Saad, 1982; Salou *et al.*, 1994; Kourkoutas *et al.*, 2004). L'acide L-malique entre dans la cellule de *O. oeni* de deux façons (Figure 5). A un pH faible il est sous forme protonée (non chargée) et pénètre par diffusion passive à travers la membrane. Le transport passif représente la moitié du transport total de l'acide malique à pH 3,2 et est négligeable à pH 4,5 (Tourdot-Maréchal *et al.*, 1993). Cette réduction est due à l'ionisation de l'acide malique qui se déprotone progressivement avec l'augmentation du pH (Figure 5). L'anion malate pénètre également dans la cellule, cette fois-ci par transport actif, *via* la malate-perméase codée par le gène *mleP*. A l'intérieur de la cellule, l'acide L-malique est décarboxylé par l'enzyme malolactique en acide L-lactique et en CO_2 (Davis *et al.*, 1985) (Figure 5). Cette enzyme est composée de deux sous-unités identiques de 60 kDa. Elle a pour cofacteurs le NAD^+ et le manganèse (Mn^{2+}) (Lonvaud-Funel and Strasser de Saad, 1982; Salou *et al.*, 1994). Les conditions optimales pour son activité sont une température de 37°C et un pH 5,0. Dans le vin, il y a présence d'inhibiteurs de l'enzyme malolactique compétitifs comme l'acide succinique, l'acide citrique et l'acide tartrique et d'inhibiteurs non-compétitifs tels que l'acide L-lactique et l'éthanol (Naouri *et al.*, 1990). Chez *O. oeni*, le gène codant pour l'enzyme malolactique est organisé en opéron. L'opéron malolactique *mlE* est composé de trois gènes : *mleA*, qui code pour l'enzyme malolactique, *mleP* qui code pour la malate-perméase et m*leR* qui code pour le régulateur qui activerait la transcription de l'opéron malolactique (Labarre *et al.*, 1996).

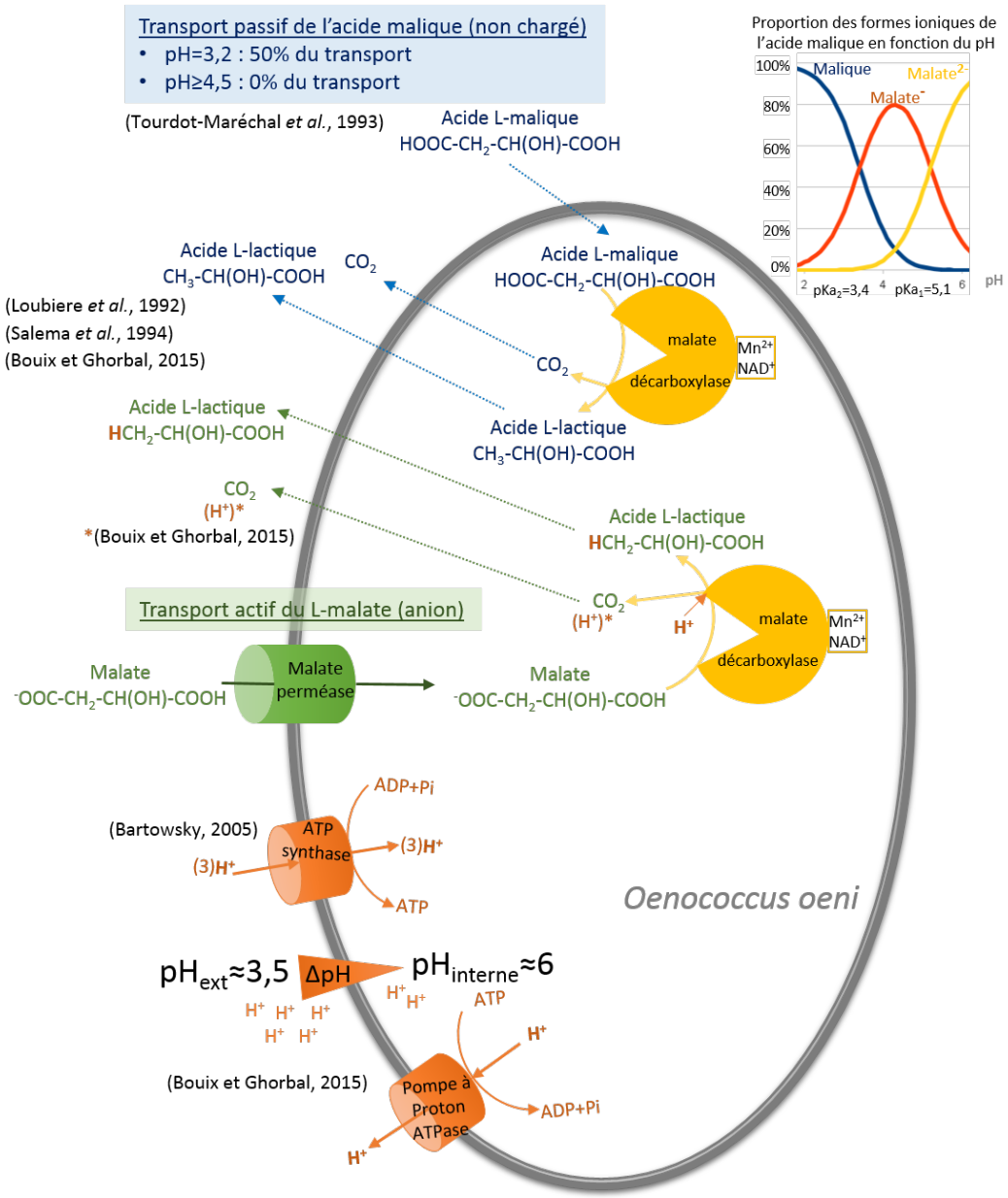


Figure 5 : Transports de l'acide L-malique dans la cellule de O. oeni et rôle de la FML dans le maintien du pH interne. Schéma réalisé à partir de Loubiere et al., 1992; Tourdot-Maréchal et al., 1993; Salema et al., 1994; Bartowsky, 2005; Bouix and Ghorbal, 2015.

O. oeni se sert de cette réaction pour **maintenir son pH interne,** voisin de 6 en conditions optimales (Salema *et al.*, 1994; Bouix and Ghorbal, 2015). Les protons sont excrétés de la cellule conjointement à l'acide lactique (Bartowsky, 2005) et éventuellement au CO_2 (Bouix and Ghorbal, 2015) (Figure 5). Le pH du vin étant voisin de 3,5, la différence de pH interne/externe permet aux ATP synthases de fournir de l'énergie à la cellule sous forme d'ATP (Salema *et al.*, 1994) (Figure 5). Cette régulation de pH interne lui permet ainsi de résister à un faible pH (<3,5) et

entraîne une désacidification du vin de 0,1 à 0,3 unité de pH. Ce phénomène de conversion d'acide malique en acide lactique est détectable à partir d'une population de *O. oeni* de 10^6 UFC/ml (Alexandre *et al.*, 2004), même si celles-ci ne sont pas en phase de croissance (Lafon-Lafourcade, 1970).

La FML joue un rôle important dans la détermination de la qualité finale de la plupart des vins en contribuant à la stabilisation microbiologique du vin final. La consommation des sucres résiduels et de l'acide malique permet d'inhiber une éventuelle activité microbienne (Nedovic *et al.*, 2000). De plus, il a été démontré que certaines bactéries lactiques, dont *O. oeni*, produisent des substances antibactériennes (bacteriocin-like inhibitory substances -BLIS). Ces substances inhibent la croissance des autres bactéries lactiques qui pourraient affecter la qualité du vin (Davis *et al.*, 1986; Yurdugül and Bozoglu, 2002; Osborne *et al.*, 2000; Alexandre *et al.*, 2004). Cependant, un vin insuffisamment protégé par SO_2 et n'ayant pas subi la fermentation malolactique pourra laisser place à des flores d'altération, transformant les nutriments encore présents dans le vin en acide lactique, acide acétique et autres métabolites. Cela se manifeste dans la bouteille par un trouble visuel et la présence de défauts organoleptiques (Kourkoutas *et al.*, 2004). Il est donc encouragé de réaliser la FML pour les vins qui vont subir un processus de maturation long tels que les Champagnes, les vins rouges de garde et certains vins blancs.

Une fermentation malolactique spontanée est possible mais reste imprévisible. En général, la fermentation malolactique débute après qu'ait eu lieu la fermentation alcoolique. Elle se déclenche spontanément dans certains fermenteurs, dans un laps de temps raisonnable. La durée de la FML dépend de la quantité initiale d'acide malique, de la population de *O. oeni* dans le vin et des conditions environnementales plus ou moins favorables à l'activité bactérienne. La FML peut donc mettre du temps à se déclencher, être trop longue voire incomplète. Il n'est pas rare qu'elle tarde dans certaines cuves. C'est pourquoi, le vigneron peut procéder à l'assemblage d'un tiers du volume d'un fermenteur où la fermentation s'est déclenchée, avec les deux tiers d'un fermenteur où la FML est bloquée. Il est également possible d'inoculer les lies d'un fermenteur ayant presque terminé la FML, dans un autre fermenteur où la FML n'a pas encore débuté. Ainsi, cela permet

d’accélérer le processus de fermentation. Cependant, cette méthode trouve ses limites lorsque le vigneron dispose de petits lots de vin, différenciés en fonction des appellations ou de la qualité de la vendange. L’assemblage est dans ce cas interdit ou non désiré par le vigneron lui-même (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012a). Aujourd’hui, avec une meilleure maîtrise des conditions de vinification et en particulier de la température et du sulfitage, les problèmes de blocage de la FML ont fortement diminué. La maitrise de la température reste toutefois un paramètre essentiel pour la réalisation d’une FML spontanée. Or, cela induit un coût souvent non négligeable pour le vigneron (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012a).

La majorité des domaines bourguignons, bordelais et des maisons champenoises a adopté la fermentation malolactique pour garantir la qualité de leurs vins (Bauer and Dicks, 2004). Cette opération induit un double effet : d'une part elle désacidifie le vin et d’autre part elle donne au vin un goût plus doux en remplaçant la saveur acide de l'acide malique, par la saveur plus douce de l'acide lactique. Mais la fermentation malolactique n'est pas systématique : en effet, tout comme la fermentation alcoolique, elle peut influer le profil organoleptique du vin et sa pratique dépend donc du type de vin recherché.

I.2.3. Les arômes issus des fermentations

Au cours de la fermentation alcoolique, les levures influencent le profil aromatique du vin par la production d’arômes fermentaires. Ces arômes sont de nature chimique diverse comme des esters, des alcools supérieurs, des composés carbonylés, des acides gras volatils ou encore des composés soufrés. Ils proviennent directement du métabolisme de la levure ou sont produits indirectement suite à l’action de glycosidases levuriennes. Ces enzymes sont capables d’hydrolyser les liaisons glycosidiques des hétérosides précurseurs d’arômes. Ceux-ci sont composés d’un ose et d’un aglycone, qui une fois libéré, devient volatile et odorant. Les aglycones peuvent appartenir à la famille chimique des mono-terpènes (Mateo *et al.*, 1997), à l’instar du linalol, du géraniol ou du nérol (Estévez *et al.*, 2004). D’autres composés, tels que les thiols volatils, sont présents dans le raisin sous forme de précurseurs inodores conjugués à la cystéine avec des liaisons carbone-soufre. Ils sont libérés par hydrolyse enzymatique (Dubourdieu *et al.*, 2006). Les levures sont

aussi capables de synthétiser plusieurs familles de composés chimiques telles que les alcools supérieurs, les esters, les acides et les mono-terpènes (Swiegers *et al.*, 2005; Carrau *et al.*, 2005).

La FML participe également aux modifications organoleptiques du vin. L'acide malique confère souvent au vin une sensation de « verdeur » et de « dureté ». La FML contribue alors à maîtriser l'acidité, à la rendre plus agréable et donner ainsi un vin plus souple (Lonvaud-Funel, 1999; Moreno-Arribas and Polo, 2005). Cette FML est largement recommandée dans certaines régions septentrionales de la France (Bourgogne, Champagne, Alsace, Loire), de l'Allemagne ou de l'Est des Etats-Unis où les raisins ont généralement des niveaux élevés d'acide malique. Ces vins nécessitent alors une désacidification pour être plus agréables au palais (Wibowo *et al.*, 1985; Davis *et al.*, 1985).

La FML peut également permettre d'éliminer certaines molécules aux arômes désagréables. En particulier, *O. oeni* contribue à la dégradation de l'acétaldéhyde, sous-produit de la FA, indésirable du point de vue sensoriel et de la santé. De plus, la dégradation de l'acétaldéhyde permet de diminuer les doses de sulfites nécessaires à la protection du vin (Osborne *et al.*, 2000; Alexandre *et al.*, 2004; Osborne *et al.*, 2006; Jackowetz and Mira de Orduña, 2012).

En parallèle, l'activité de *O. oeni* peut également contribuer à la richesse aromatique du vin de par ses métabolites et par la libération des précurseurs aromatiques présents dans le vin, tels que les arômes de fruits et de fleurs (Davis *et al.*, 1986; Maicas *et al.*, 1999; Versari *et al.*, 1999; Bauer and Dicks, 2004; Izquierdo Cañas *et al.*, 2008; Hernandez-Orte *et al.*, 2009). De même, lorsque la FML est réalisée en fût, elle permet d'affiner les arômes empyreumatiques transférés au vin (notes grillées, torréfiées, de miel).

En revanche, ce phénomène est généralement évité lorsque l'on souhaite obtenir un vin avec une plus grande fraicheur aromatique (Laaboudi *et al.*, 1995).

I.3. L'élevage en fût

L'élevage en fût consiste à laisser reposer le vin dans des tonneaux en chêne afin qu'il enrichisse et complexifie sa gamme aromatique. Cette période dure généralement entre six et vingt-quatre mois. Elle oscille autour de dix-huit mois dans le Bordelais et de dix mois en Bourgogne, mais est très spécifique à chaque vigneron. Durant l'élevage, le vigneron peut procéder à trois types d'opérations : l'ouillage, le soutirage et le bâtonnage.

Au cours du temps, une partie du vin s'évapore. L'**ouillage** consiste à combler le vide laissé dans le fût en le remplissant régulièrement afin que le vin ne s'oxyde pas.

Le **soutirage** consiste à retirer par transvasement les éléments solides du vin qui ont sédimenté. La lie est constituée de levures mortes, de débris et de macromolécules de raisin. Cette action permet d'oxygéner le vin et de rincer le fût. De fait, pendant la période d'élevage en fût, les risques microbiologiques sont supérieurs. C'est pourquoi, l'hygiène du fût est importante.

Enfin, le **bâtonnage** est une opération de remuage du tonneau qui peut être de deux à quatre fois par mois. Cela permet de garder le vin en contact des lies. Cette technique n'est pas utilisée par tous les vignerons et pour tout type de vin. Elle vise à apporter du « gras » (glycérol) au vin.

Il faut savoir que le bois s'épuise au fil des années. Il est généralement conseillé de garder un fût au maximum cinq ans, si l'on souhaite qu'il transmette des arômes boisés au vin. Au-delà de cette période, le fût n'est plus qu'un contenant permettant d'apporter une faible oxygénation.

I.3.1. La composition du fût

Dans le cadre de la tonnellerie, trois espèces de chêne sont utilisées pour fabriquer les fûts : le chêne sessile (*Quercus sessiliflora*), le chêne pédonculé (*Quercus pedunculata*) et le chêne américain *(Quercus Alba)*. Le bois de chêne est principalement composé de cellulose (40% masse sèche), d'hémicellulose (25%) et de lignine (25%) (Kollmann and Fengel, 1965).

La **cellulose** est un polymère linéaire formé d'un enchainement de D-glucose. Des liaisons hydrogènes s'établissent entre les chaînes de cellulose entrainant la formation de microfibrilles (Masson *et al.*, 1996).

L'**hémicellulose** a un rôle important de ligand entre les fibres de celluloses au niveau des parois cellulaires du bois. Elle est constituée d'une chaine linéaire de xylane sur laquelle vont se fixer des ramifications constituées de glucides, principalement mannose, arabinose, galactose et rhamnose (Masson *et al.*, 1996).

La **lignine** rigidifie la paroi et la rend étanche. C'est un polymère complexe constitué de trois composants majeurs : l'alcool sinapylique, l'alcool conifférylique et l'alcool *p*-coumarique (Monties, 1987).

En plus des trois composés majeurs cités précédemment, le bois est constitué d'autres composants extractibles grâce à un solvant tel que le vin (Viriot *et al.*, 1993; Moutounet *et al.*, 1989). Parmi eux se trouvent des ellagitanins qui ont un rôle important lors du vieillissement des vins rouges en fût de chêne car ils sont complexés avec d'autres molécules (tanins, pigments, composés phénoliques …) au cours de la micro-oxygénation du vin (Vivas and Glories, 1996) et vont influer l'aspect gustatif du vin en apportant de l'astringence (Singleton, 1995). Les autres composés extractibles du bois sont les coumarines et les acides phénols (Chen, 1970).

I.3.2. La fabrication du fût

La fabrication des fûts se déroule en trois étapes :

i. Le cœur du tronc est fendu en **merrains** qui sont séchés puis découpés en **douelles** (pièce de bois formant la paroi du tonneau (Figure 6)).

Le chêne peut être fendu traditionnellement ou scié mécaniquement. Cette opération est appelée le débitage des merrains. Le sciage a l'avantage d'être plus rapide mais surtout d'entraîner une perte de bois plus réduite que par fendage (50% pour le sciage contre 80% pour le fendage). Toutefois, le bois scié est moins solide et plus poreux du fait du sectionnement des fibres du bois.
Les merrains sont ensuite séchés afin d'atteindre une humidité proche de 16%, état à partir duquel le bois pourra être travaillé en tonnellerie. Le séchage peut être

réalisé à l'air libre entre 24 et 36 mois ou dans une étuve ventilée. A l'air libre, il permet au bois d'atteindre une maturité optimale et ainsi de diminuer la teneur en composés phénoliques. De plus, la présence d'eau de pluie et d'oxygène favorise certains phénomènes physicochimiques d'hydrolyses qui améliorent la qualité des merrains.

Ensuite, par l'opération de dolage qui consiste à donner au merrain la courbure extérieure du tonneau, le merrain deviendra douelle. Le tonnelier peut alors choisir de faire dégorger les douelles afin d'extraire certains composés transmettant de l'amertume au vin.



Figure 6: A gauche les merrains sont séchés en plein air ; à droite les douelles avant l'assemblage.

ii. le **cintrage** permet de donner sa forme au fût : sous l'effet de la chaleur du brasero, la partie rigide du bois, la lignine, s'assouplit et devient facilement déformable (Chatonnet *et al.*, 1989) (Figure 7).

Pour donner la courbure au bois, le tonnelier devra chauffer les douelles, ce qui permettra de leur donner leur forme convexe. A cet effet, il peut utiliser le brûlage traditionnel de bois de chêne, l'eau chaude ou encore la vapeur d'eau.



Figure 7 : A gauche les douelles sont mises en rose et cerclées ; à droite chauffe et serrage d'un tonneau à l'aide d'un câble d'acier se resserrant progressivement en bas. (Olivier Colas CC BY-SA 3.0 via Wikimedia Commons)

iii. la **chauffe** modifie la composition chimique du bois, génère des composés volatils et développe le potentiel aromatique du fût.

Une fois le cintrage réalisé, s'ensuit l'étape du **toastage** aussi appelée recuisson. Cette étape est essentielle car elle va déterminer la composition chimique du bois. En effet, par réaction de Maillard, de nouveaux composés volatils odorants sont formés (Cutzach *et al.*, 1999). Pour une chauffe légère, on pourra apprécier des notes de pain grillé ou de vanille. Pour des chauffes plus fortes, on reconnaîtra davantage de notes empyreumatiques (toastées, grillées, fumées).

Le traitement thermique du bois entraine des modifications chimiques grâce à la dégradation des différents composants pariétaux des cellules et des composés extractibles du bois. Ces transformations chimiques apparaissent à des températures de chauffe comprises entre 180°C et 250°C. L'hémicellulose est le premier constituant qui est affecté par le traitement (Fengel and Wegener, 1983). Sa dégradation entraine la formation d'acide acétique, mais également de furfural (5-méthyl-furfural (5MF) et 5-hydroxy-méthyl-furfural (5HMF) et autres aldéhydes (Chatonnet *et al.*, 1989). Ces composés sont responsables d'arômes d'amande grillée et de caramel (Vivas, 2002).

La dégradation de la lignine, présente dans les chaines de cellulose et d'hémicellulose du bois et dans les parois cellulaires, entraine la production de phénols volatils (gaïacol, 4-méthyl gaïacol, eugénol), d'aldéhydes phénols (vanilline, syringaldéhyde) et des phényls cétones (vanillone, syringone). Ces derniers ont un rôle organoleptique plus limité que les autres composés.

L'oxydation des acides gras, ayant lieu au cours du traitement thermique, entraine la formation de *trans* et *cis* whiskylactones impactant significativement l'arôme du vin, par des notes de noix de coco (Chatonnet *et al.*, 1989).

I.3.3. Les échanges bois-vin durant l'élevage en fût

Le bois est le seul matériau qui permet les échanges gazeux entre l'atmosphère et le vin. Grâce à ses particularités anatomiques et à sa porosité, l'oxygène peut migrer lentement à travers le bois de l'environnement jusqu'au vin. Ainsi, l'élevage en chêne est souvent pratiqué par le vinificateur pour permettre une micro-oxygénation du vin, qui en affine les arômes et pour atteindre une plus grande complexité organoleptique.

En particulier, la modification organoleptique résulte de multiples échanges de matières qui se mettent en place dès les premiers temps de contact entre le bois et le vin. La connaissance de ces composés odorants a permis d'étudier les principaux facteurs de libération de composés volatils du bois dans le vin, qui peuvent être regroupés en 3 catégories : le type de bois, les conditions de vinification et les conditions d'élevage.

En premier lieu, le vigneron doit choisir les **caractéristiques du fût**, que sont l'espèce de chêne et la chauffe. Le boisage sera différent en fonction de l'espèce utilisée (Waterhouse and Towey, 1994; Doussot *et al.*, 2002). Il en existe 3 principales :

- le chêne pédonculé *Quercus robur*, riche en composés phénoliques et en ellagitanins, pauvre en whiskylactones (noix de coco)
- le chêne sessile ou rouvre *Quercus petraea*, riche en lactones et en eugénol (clou de girofle) mais pauvre en ellagitanins
- le chêne blanc d'Amérique du Nord *Quercus alba*, riche en lactones et en eugénol.

L'intensité de la chauffe (180°C à 250°C) du bois va également induire une modification de la composition en molécules volatiles et extractibles (Chatonnet *et al.*, 1989; Chatonnet, 1995; Pérez-Coello *et al.*, 2000; Garde-Cerdán *et al.*, 2002; Guchu *et al.*, 2006).

En second lieu, l'extraction de composés aromatiques varie en fonction des **techniques de vinification** et des conditions d'élevage. Le vigneron peut choisir de réaliser sa fermentation alcoolique en fût de chêne. Le caractère réducteur de la

FA et le contact prolongé du vin avec les lies de levures vont diminuer les arômes boisés du vin. Par exemple, la vanilline peut être réduite en composés moins odorants. À l'inverse, ce caractère boisé peut être accentué dans les vins réalisant leur fermentation malolactique en fût. *O. oeni* est capable de libérer certains composés odorants présents sous forme de précurseurs glycosylés dans le bois de chêne.

En dernier lieu, ce sont également la durée et les **conditions d'élevage** qui pourront faire varier le boisage du vin. L'extraction des composés volatils du bois de chêne est influencée par le temps de contact du vin avec le bois. Plus l'élevage sera long, plus il y aura de composés du bois extraits dans le vin. De plus, dans le cas d'un fût neuf, les cinétiques d'extraction ont une forme exponentielle. Dans le cas d'un fût déjà utilisé, elles auront une forme linéaire (Rous and Alderson, 1983; Towey and Waterhouse, 1996; Spillman *et al.*, 1998). On estime empiriquement qu'un fût est épuisé au bout de 5 ans. Enfin, le vigneron peut utiliser différentes tailles de fût pour moduler le boisage du vin, de 30 à 700 litres. En effet, un plus grand contenant aura une surface d'échange réduite par rapport au volume de vin.

Les principaux descripteurs d'arômes boisés, caractéristiques des vins qui ont été élevés en fût de chêne, sont les épices, la vanille, la noix de coco, le pain toasté, le café et le chocolat. Ce bouquet aromatique boisé, composé de plusieurs dizaines de molécules odorantes, contient notamment les whiskylactones (noix de coco), la vanilline (vanille), l'eugénol et l'isoeugénol (clou de girofle) (Tableau 1) (Chassagne *et al.*, 2007).

Tableau 1 : Principaux composés aromatiques extraits du bois par le vin et seuil de perception dans le vin (IFV; Ferreira et al., 2002)

Famille	Composé	Descripteur	Seuil de perception
Lactone	cis-whiskylactone	noix de coco	790 µg/l
	trans-whiskylactone	noix de coco	67 µg/l
Aldéhydes-phénols	vanilline	vanille	995 µg/l
	méthyl-vanillate	vanille	3000 µg/l
	éthyl-vanillate	vanille	990 µg/l
	syringaldéhyde	planche	50000 µg/l
Phényls-cétones	acétovanillone	vanille	1000 µg/l
	propiovanillone	boisé	-
	syringol	épices	1800 µg/l
Phénols	eugénol	clou de girofle	6 µg/l
	gaïacol	fumé, brûlé	10 µg/l
	4-méthyl-gaïacol	fumée, suie	-
	4-éthyl-gaïacol	poivre, épice	100 µg/l
	4-vinyl-gaïacol	oeillet, girofle	1100 µg/l
	4-éthyl-phénol	cuir, écurie	500 µg/l
	4-vinyl-phénol	herbes froissées	180 µg/l
	phénols	encre, phénolées	-
	crésol	pharmaceutiques	31-58 µg/l
Composés de chauffe	furfural	amande grillées	3000 µg/l
	méthyl-5-furfural	amande amère	
	cyclotène	pain grillé	3100 µg/l
	maltol	fumée	11400 µg/l
	furfurylthiol	café	1 ng/l

I.4. Les bactéries lactiques du vin

Les bactéries du vin peuvent généralement être isolées par une technique classique de microbiologie, en les étalant sur un milieu nutritif gélosé, après dilutions en série de l'échantillon de vin dans l'eau physiologique stérile (NaCl à 9 g/l). Les bactéries lactiques sont habituellement cultivées sur gélose MRS (de Man, Rogosa et Sharpe) (De Man *et al.*, 1960) à un pH allant de 5 à 7. Il est conseillé d'ajouter du jus de tomate, du jus de raisin ou de l'acide malique au milieu pour augmenter la croissance bactérienne (Wibowo *et al.*, 1985). Du cyclohexamide à 0,1% peut également être ajouté pour inhiber la croissance des levures.

L'identification des bactéries lactiques est basée sur l'analyse de la morphologie des cellules, de leurs produits métaboliques et de leur capacité à assimiler certains substrats. Dans un premier temps, la morphologie des cellules peut être observée par microscopie optique couplée au test de coloration de Gram. Ensuite, la souche à identifier est cultivée dans un milieu contenant du glucose comme seule source de carbone. Les produits métaboliques résultants sont analysés afin de déterminer si la souche est homofermentaire (production uniquement d'acide lactique - *Pediococcus*), ou hétérofermentaire (production d'acide lactique accompagné d'éthanol, d'acide acétique … - *Oenococcus*, *Lactobacillus*) (Tableau 2).

Une des méthodes utilisése pour identifier les bactéries au niveau des espèces est la galerie API 50 CH (Bio-Mérieux). C'est une méthode biochimique qui présente le profil de fermentation de 49 glucides. Lorsque les bactéries métabolisent les glucides, elles produisent des composés acides qui sont détectés par un indicateur de pH coloré. Les espèces sont alors identifiées par la correspondance de leur profil de fermentation à une base de données. Cette méthode est bien adaptée pour identifier des bactéries en conditions optimales de croissance, des erreurs peuvent-être constatées lorsqu'elles sont isolées du vin. C'est pourquoi les méthodes d'identification génétique sont de plus en plus employées.
Le séquençage de l'ADN permettant la synthèse de l'ARNr 16S est utilisé pour analyser la phylogénie des bactéries, ainsi que pour l'identification de l'espèce. La séquence de ce gène comporte des régions fortement conservées, utilisées pour définir les amorces universelles et des régions variables permettant de discriminer

les espèces. Cette variation permet de comparer la séquence obtenue à celles présentes dans les bases de données et par homologie de séquence, il est possible de définir l'appartenance d'une bactérie à un genre ou à une espèce. (Rousseaux *et al.*, 2001)

Tableau 2 : Caractéristiques des principales bactéries lactiques rencontrées dans le vin

Caractéristique	*Lactobacillus*	*Leuconostoc*	*Oenococcus*	*Pediococcus*
Morphologie de la cellule	Bâtonnet long et fin	Sphérique +/- aplatie	Ovoïde en chainette	Sphérique en tétrade
Taille (µm)	1 à 10	0,7 à 1,2	0,5 à 1,2	0,4 à 1,4
Fermentation du glucose	Hétéro- et homolactique	Hétéro-lactique	Hétéro-lactique	Homo-lactique
Production de gaz (ferm. glc)	Oui et non	Oui	Oui	Non
Espèces isolées du vin	Hétérolactiques : *L. brevis, L. cellobiosis, L. buchneri, L. casei, L. curvatus, L. delbrueckii, L. fermentum, L. fructivorans, L. hilgardii, L. jensenii, L. kunkeei, L. nagelii, L. trichodes, L. vermiforme, L. sakei* Homolactiques : *L. plantarum*	*L. mesenteroides*	*O. oeni*	*P. pentosaceus, P. damnosus, P. parvulus*

Les bactéries lactiques trouvées lors de la vinification appartiennent à trois genres de trois familles différentes. La famille des *Lactobacillaceae* est représentée par le genre *Lactobacillus* et *Pediococcus*, celle des *Leuconostocaceae* par le genre *Oenococcus*.

Lactobacillus est un genre de bactéries à Gram positif très diversifiées. Elles sont non-mobiles et ont une forme de bâtonnet, plus ou moins long. Elles peuvent être individuelles, en paires ou en chaînettes. Dans le vin, on peut trouver les espèces *L. brevis, L. hilgardii, L.casei, L. plantarum.* Les *Lactobacillus* sont des bactéries anaérobies facultatives qui nécessitent un milieu riche contenant des sucres

fermentescibles et ont en général un métabolisme hétérofermentaire, excepté pour *L. plantarum* : le glucose est majoritairement transformé en acide lactique, mais aussi en acide acétique, éthanol et CO_2. Une forte présence des *Lactobacillus* dans le vin est plutôt considérée comme non-désirable dans une majorité de vins, à cause de déviations organoleptiques que ces bactéries peuvent entrainer. Cependant certaines espèces, notamment *L. plantarum*, peuvent être utilisées dans des vins plus favorables, comme en Afrique du Sud, Espagne, Argentine (López *et al.*, 2008; Lerm *et al.*, 2011; du Toit *et al.*, 2011; Valdés La Hens *et al.*, 2014).

Les bactéries du genre *Pediococcus* sont des cellules sphériques non-mobiles qui, du fait de leur séparation en deux plans, forment des tétrades bien reconnaissables au microscope. Elles sont anaérobies facultatives et nécessitent un milieu contenant des sucres fermentescibles pour leur développement. Elles ont un métabolisme homofermentaire : tout le glucose est métabolisé en acide lactique. Les deux espèces les plus trouvées dans le vin sont *P. pentosaceus* et *P. parvulus*. Si ces dernières arrivent à se développer suffisamment, elles peuvent altérer le vin (« maladie de la graisse » due à une production de glucane rendant le vin visqueux, « piqûre lactique » due à l'acide D-lactique) (Davis *et al.*, 1986; Edwards and Jensen, 1992; Lonvaud-Funel, 1999).

Certaines espèces de bactéries lactiques peuvent persister durant la fermentation alcoolique. Dans la majorité des cas, seule *O. oeni* est présente à la fin de la FA et effectue la fermentation malolactique (Lonvaud-Funel, 1999; Vuuren and Dicks, 1993).

I.5. *Oenococcus oeni*

O. oeni est une bactérie à Gram positif formant des chainettes composées de deux à plusieurs dizaines de coques ovoïdes de 0,5 µm. Elle est non mobile et non sporulante. C'est une bactérie lactique acidophile, anaérobie facultative, asporogène, mésophile, catalase négative et hétérofermentaire (Dicks *et al.*, 1995). Elle ne possède pas de cytochromes, ne réduit pas les nitrates, est non hémolytique et ne forme pas d'indole. Elle est chimiorganotrophe et nécessite donc un sucre fermentescible et un milieu riche pour se développer (De Man *et al.*, 1960). Sa croissance est lente ($\mu max < 0,1\ h^{-1}$) et son développement est favorisé en présence de CO_2 (10%) sur milieu gélosé, où les colonies sont inférieures à 1 mm. La croissance est optimale entre 20 et 30°C (Garvie, 1967; Dicks *et al.*, 1995; Richter *et al.*, 2001; Ritt *et al.*, 2008, 2009).

Cette espèce était auparavant classifiée sous le nom de *Leuconostoc oenos* (Garvie, 1967), mais elle est désormais séparée du genre *Leuconostoc* suite à des études phylogénétiques et à l'étude de son métabolisme (Martinez-Murcia *et al.*, 1993; Dicks *et al.*, 1995; Morse *et al.*, 1996). En effet, elle peut utiliser le saccharose comme substrat et se distingue également par une croissance optimale à pH 4,8. Elle appartient au groupe des bactéries lactiques, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Leuconostocaceae*. Au sein du genre *Oenococcus*, il n'y a que trois espèces : *Oenococcus oeni* (isolée du vin et du cidre), *Oenococcus kitaharae*, isolé du *Shochu*, une boisson alcoolique japonaise (Borneman *et al.*, 2012), et *Oenococcus alcoholitolerans*, isolée de la *cachaça* (Badotti *et al.*, 2014).

Actuellement soixante-deux génomes de *O. oeni* ont été séquencés et sont accessibles dans les bases de données mais un seul est complet et a été assemblé, celui de PSU-1 (ncbi.nlm.nih.gov/genome/541). Les génomes ont en moyenne une taille de 1,8 Mb, 37,9% en GC et 1815 gènes Le séquençage du génome de *O. oeni* PSU-1 a permis de mettre en évidence un haut degré de rationalisation génomique qui se serait produit au cours de son adaptation à l'environnement complexe du vin (Mills *et al.*, 2005; Makarova *et al.*, 2006).

Au cours de son évolution *O. oeni* aurait perdu les gènes *mutS* et *mutL* impliqués dans le système de réparation des mutations dues aux mésappariements (*mismatch repair system*) (Makarova *et al.*, 2006). Cela aurait permis une accumulation des

erreurs spontanées lors de la réplication de l'ADN, une forte diversité allélique et un haut niveau de polymorphisme (Marcobal *et al.*, 2008). Le génome de *O. oeni* possède également de nombreuses séquences nucléotidiques d'origine étrangère acquises par intégration horizontale de plasmides ou de bactériophages. Ces phénomènes confèrent à *O. oeni* des gènes qui auraient contribué à son adaptation au vin (Bon *et al.*, 2009).

La diversité génétique de *O. oeni* a été évaluée à partir de 258 souches provenant de zones géographiques diverses (Bourgogne, Champagne, Aquitaine, Italie, Chili, Afrique du Sud) et de différents milieux : vins rouge, blanc, champagne et cidre (Bridier *et al.*, 2010b). Il en résulte une répartition de l'espèce en deux groupes phylogénétiques A et B, et plusieurs sous-groupes reliés à des origines géographiques précises. La diversité allélique des souches de ces deux groupes suggère qu'elles ont évolués séparément, sans échange de matériel génétique entre eux. Selon les auteurs, l'éloignement génétique des deux populations pourrait aboutir à terme à l'apparition de deux espèces distinctes (Bridier, 2011). L'étude de la diversité phénotypique a montré une meilleure adaptation des souches du groupe A aux conditions de vinification, regroupant ainsi, la quasi-totalité des levains malolactiques testés. En revanche, les souches isolées du cidre ont été réunies en B. Les sous-groupes identifiés sont majoritairement composés de souches ayant une origine géographique commune (Chili, Afrique du Sud et Est de la France).

O. oeni est la bactérie lactique du vin qui est la plus recherchée pour effectuer la fermentation malolactique. En effet, cette espèce a développé des mécanismes de résistance aux conditions environnementales difficiles du vin, appelées stress, que sont notamment l'éthanol, l'acidité et la température (Guzzo *et al.*, 2000). De plus, elle participe à l'amélioration des qualités organoleptiques et à la stabilisation du vin par son métabolisme qui lui permet de dégrader l'acide malique et de contribuer à la libération de composés aromatiques désirables.

I.5.1. Résistance de *O. oeni* au stress du vin

Le stress est l'ensemble des facteurs environnementaux qui imposent des contraintes à un organisme affectant sa croissance réduite ou sa capacité à survivre. La cellule modifie son profil métabolique pour le rendre plus favorable à la croissance ou à la survie. En effet, pour répondre aux conditions stressantes, les micro-organismes ont développé de multiples mécanismes d'adaptation. Par exemple, les signaux externes peuvent déclencher de grands changements dans l'expression des gènes de réponse au stress, codant pour des protéines améliorant l'adaptation aux changements environnementaux et modifiant le métabolisme comme la synthèse d'acides gras pour la membrane.

Le vin est un milieu particulièrement stressant du fait de la présence de fortes concentrations d'éthanol (12 à 16%), d'un pH acide (3 à 3,5) et d'une faible concentration de nutriments, notamment de sucres (inférieur à 1 $g.l^{-1}$) et de sources azotées. Or, *O. oeni* se retrouve dans le moût à des concentrations très faibles, dans les premiers jours de vinification. Leur population est limitée à environ 10^4 UFC/ml, du fait de la compétition avec les levures qui ont un métabolisme plus rapide et des sulfites qui sont ajoutés par le vigneron pour assainir la vendange. Lors de la fermentation alcoolique, cette population chute à 10^2 UFC/ml, les levures produisent des substances inhibitrices, le 2-phényléthanol et des sulfites en plus de l'éthanol. Après la fermentation alcoolique, les levures ont consommé la majeure partie des sources de carbone et d'azote et ont produit de l'éthanol : cela va provoquer leur forte mortalité. L'autolyse qui en résulte peut libérer des nutriments permettant la croissance des bactéries mais ce phénomène est tardif (Alexandre *et al.*, 2004). Après une phase de latence, les cellules survivantes se multiplient et atteignent une population de 10^6 UFC/ml, à partir de laquelle la fermentation malolactique commence (Fleet *et al.*, 1984).
Les conditions physico-chimiques hostiles du vin constituent des sources de stress pour *O. oeni* qui peuvent entraîner un retard de la FML. Dans certains cas, plusieurs mois sont nécessaires pour obtenir un nombre suffisant de cellules capables de dégrader l'acide malique présent dans le vin. C'est désormais une pratique courante pour les vignerons ayant des échéances courtes d'avoir recours à l'inoculation d'une souche sélectionnée, la plupart du temps sous forme lyophilisée.

O. oeni est capable de s'adapter au milieu vin par trois réponses majeures : la synthèse de protéines de stress, la régulation de la fluidité membranaire ainsi que la régulation du pH interne.

Les bactéries sont capables de synthétiser des protéines dites de réponse au stress pour limiter la dénaturation et l'agrégation des autres protéines occasionnées par le stress. Ces protéines sont appelées *Heat Shock Proteins* (HSP) car elles ont été la première fois observées suite à un stress thermique (Ritossa, 1962; Tissiéres *et al.*, 1974). Elles ont ensuite été retrouvées chez de nombreux organismes confrontés à des stress divers (thermique, UV, osmotique, présence de polluants environnementaux …). Elles sont également utilisées par les cellules en phase de croissance, afin de donner une structure active aux protéines juste après leur synthèse (Narberhaus, 2002). Ces protéines, phylogénétiquement conservées, sont regroupées en 3 familles principales suivant leur masse moléculaire : les chaperons moléculaires universels, les protéines Clp et les Hsp de faible masse moléculaire (sHsp).

Un chaperon moléculaire est « une protéine qui se lie et qui stabilise un autre polypeptide instable, au travers de cycles de fixation et de libération régulés, et facilite le repliement et l'assemblage correct de ce polypeptide » (Hendrick and Hartl, 1993). Les chaperons moléculaires appartiennent aux systèmes Hsp60 (GroES, GroEL) et Hsp70 (DnaK, DnaJ, GrpE) qui sont ubiquitaires et très conservés chez les procaryotes et les eucaryotes. Ces 2 systèmes reconnaissent les surfaces hydrophobes des peptides dépliés et permettent leur repliement correct en utilisant de l'ATP. Le système Hsp60 est composé de GroEL (ou Hsp60) et de son co-chaperon GroES (Hsp10). Il est utilisé pour les polypeptides de 20 à 60 kDa (Narberhaus, 2002; Maitre, 2012). Le système Hsp70 (machinerie KJE) est composé de DnaK (Hsp70) avec deux co-chaperons DnaJ (Hsp40) et GrpE. Il est utilisé pour les peptides de masse moléculaire élevée, supérieure à 60 kDa (Narberhaus, 2002; Maitre, 2012).

Les protéines Clp (pour *Caseinolytic proteins* ou Hsp100) sont très conservées chez les procaryotes et chez les eucaryotes. L'étude du génome de *O. oeni* a mis en évidence cinq protéines Clp (Sugimoto *et al.*, 2008). ClpP est de type protéase et les quatre autres, ClpC, ClpL1, ClpL2, ClpX, sont de type ATPases. ClpP est une

protéase à sérine. Chez les bactéries à Gram positif, elle joue également un rôle dans le contrôle du taux intracellulaire des régulateurs de la réponse au stress (Chastanet and Msadek, 2003). Les ATPases sont des chaperons moléculaires ATP-dépendants. Lorsqu'elles sont associées à ClpP, elles permettent également de réguler l'activité protéolytique (Doyle and Wickner, 2009; Kress *et al.*, 2009).

Les protéines de réponse au stress de faible masse moléculaire (sHsp) sont des protéines ubiquitaires retrouvées chez l'Homme, les animaux, les plantes, les bactéries et archaebactéries. Néanmoins, elles ne semblent pas présentes chez les microorganismes ayant un génome de petite taille comme par exemple *Helicobacter pylori* 26695 (1,66 Mb), *Mycoplasma pneumoniae* M129 (0,81 Mb) et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* II1403 (2,37 Mb) (Narberhaus, 2002; Maitre, 2012). Les sHsp sont des chaperons moléculaires ATP-indépendants qui sont rapidement et abondamment synthétisés lors de stress environnementaux. Ce sont des monomères de 12 à 43 kDa qui s'organisent en structures oligomériques (Horwitz, 1992; Jakob *et al.*, 1993; Maitre, 2012). A ce jour, un seul gène codant pour une protéine de réponse au stress de faible masse moléculaire (sHsp) a été identifié dans le génome de *O. oeni* : il s'agit du gène *hsp18* qui code pour la protéine de stress Lo18. Cette protéine exerce une activité de chaperon moléculaire dans le cytoplasme. Elle est également retrouvée en interaction avec la membrane plasmique de *O. oeni*, en particulier lorsque le stress est intense (Jobin *et al.*, 1997; Delmas *et al.*, 2001; Coucheney *et al.*, 2005b). Elle joue un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité membranaire.
L'unique régulateur de la réponse au stress mis en évidence chez *O. oeni* est CtsR. Les gènes codant pour DnaK, DnaJ, GroEL, ClpP, ClpL, ClpC et Lo18 sont sous la gouvernance du régulateur transcriptionnel CtsR et forment le régulon *ctsR* (Fiocco *et al.*, 2010; Grandvalet *et al.*, 2005).

Les stress du vin et en particulier, l'éthanol et l'acidité, modifient la fluidité de la membrane de *O. oeni*, ce qui peut nuire à l'intégrité de la cellule. Pour rigidifier leur membrane, les bactéries *via* les désaturases peuvent modifier leur composition en acides gras, en augmentant notamment leur degré d'insaturation (Denich *et al.*, 2003). Elles peuvent également incorporer des cycles propanes grâce à l'enzyme Cyclopropane Fatty Acyl synthase (CFA synthase) (Chu-Ky *et al.*, 2005;

Grandvalet *et al.*, 2008). La sHSP Lo18 joue également un rôle dans le maintien de l'intégrité membranaire en s'associant à la membrane en conditions de stress (Coucheney *et al.*, 2005b). Cette protéine joue un rôle crucial dans la réponse aux stress chez *O. oeni*. Des études récentes ont montré qu'il existe une relation entre l'oligomérisation de Lo18 et son rôle dans la stabilisation des membranes et de la protection des protéines (Maitre *et al.*, 2012, 2014). Un autre mécanisme qui intervient sur la fluidité de la membrane serait lié à la production de caroténoïdes. En réaction au stress, *O. oeni* surexprime le gène *ggpps*, responsable de la production de la geranylgeranyl pyrophosphate synthase. Cette enzyme est impliquée dans la biosynthèse des caroténoïdes qui pourraient jouer un rôle dans la stabilisation de la membrane. Mais ce mécanisme est encore inconnu (Cafaro *et al.*, 2014).

Enfin, le maintien du pH interne suite à un stress acide est crucial. Pour cela, *O. oeni* peut utiliser trois mécanismes pour le réguler. Cette bactérie est équipée de "pompes à protons", la protéine membranaire H^+-ATPase, capable d'expulser un proton (H^+) *via* l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (Versari *et al.*, 1999; Fortier *et al.*, 2003). De plus, durant la fermentation malolactique, *O. oeni* se sert de l'expulsion du L-lactate pour augmenter son pH interne (*cf.* Figure 5). Enfin, la maitrise du pH interne résulte également de la production de composés basiques par des enzymes, qui décarboxylent certains acides aminés. Par exemple, les dégradations de la tyrosine de l'histidine et de l'ornithine forment, avec la captation d'un proton, des amines biogènes : la tyramine, l'histamine et la putrescine (Bonnin-Jusserand *et al.*, 2011; Romano *et al.*, 2012). L'expulsion de ces métabolites, ayant capté un proton, permet de réduire le pH interne.

I.5.2. Métabolisme d'intérêt œnologique de *O. oeni* avec le vin

De toutes les activités métaboliques que les bactéries lactiques peuvent effectuer dans le vin, la plus importante dans la vinification est la dégradation de l'acide malique dans le cadre de la fermentation malolactique.

L'intérêt de la FML ne réside pas uniquement dans la désacidification du vin. Les bactéries lactiques métabolisent d'autres substrats présents dans le vin pour assurer

leur multiplication, tels que des sucres, de l'acide citrique, de la glycérine et aussi des acides aminés. La libération de métabolites au cours de la FML est souche-dépendante. Cela explique une partie des divergences rencontrées dans la littérature scientifique ainsi qu'au sein des vignerons qui effectuent la FML avec des bactéries indigènes ou sélectionnées (Wibowo *et al.*, 1985; Laurent *et al.*, 1994; Boido *et al.*, 2009).

Les **glucides** sont la principale source d'énergie pour la croissance bactérienne. Après une fermentation alcoolique complète, il ne reste que quelques centaines de milligrammes de sucres résiduels par litre de vin, sous forme de glucose, fructose, xylose et arabinose. Ces sucres résiduels sont suffisants pour fournir l'énergie nécessaire à la croissance bactérienne pour permettre la formation d'une population suffisante pour effectuer la FML.

L'**acide citrique** est le troisième acide organique du vin par ordre de concentration, après l'acide tartrique et l'acide malique. Bien qu'il soit présent en de faibles concentrations, entre 0,5 et 1 g/l de vin, son importance sur les propriétés organoleptiques du vin n'est pas à négliger. En effet, le métabolisme de l'acide citrique contribue à augmenter l'acidité volatile du vin en le transformant en acide acétique (Figure 8). La fermentation de l'acide citrique conduit également à la production de composés cétoniques qui affectent l'arôme du vin, comme le diacétyle. Ce composé est désirable à de faibles concentrations (4 mg/l) car il renforce la complexité aromatique du vin avec des notes allant de la noisette au caramel. Alors qu'à une concentration supérieure à 4 mg/l, il devient indésirable en étant caractérisé par une note beurrée intense (Rankine *et al.*, 1969). Cependant, il semblerait que la majorité du diacétyle soit réduit en composés moins odorants comme l'acétoïne (3-hydroxybutanone) et le butane-2,3-diol (Figure 8) (de Revel *et al.*, 1989; de Revel and Bertrand, 1994; de Revel *et al.*, 1999). La présence de diacétyle dans le vin dépend des souches de *O. oeni*, du pH, de la température, du contact avec les lies de levures. De plus le sulfitage après FML empêche sa réduction (Figure 8) (Martineau and Henick-Kling, 1995; Nielsen and Richelieu, 1999; Bartowsky and Henschke, 2004).

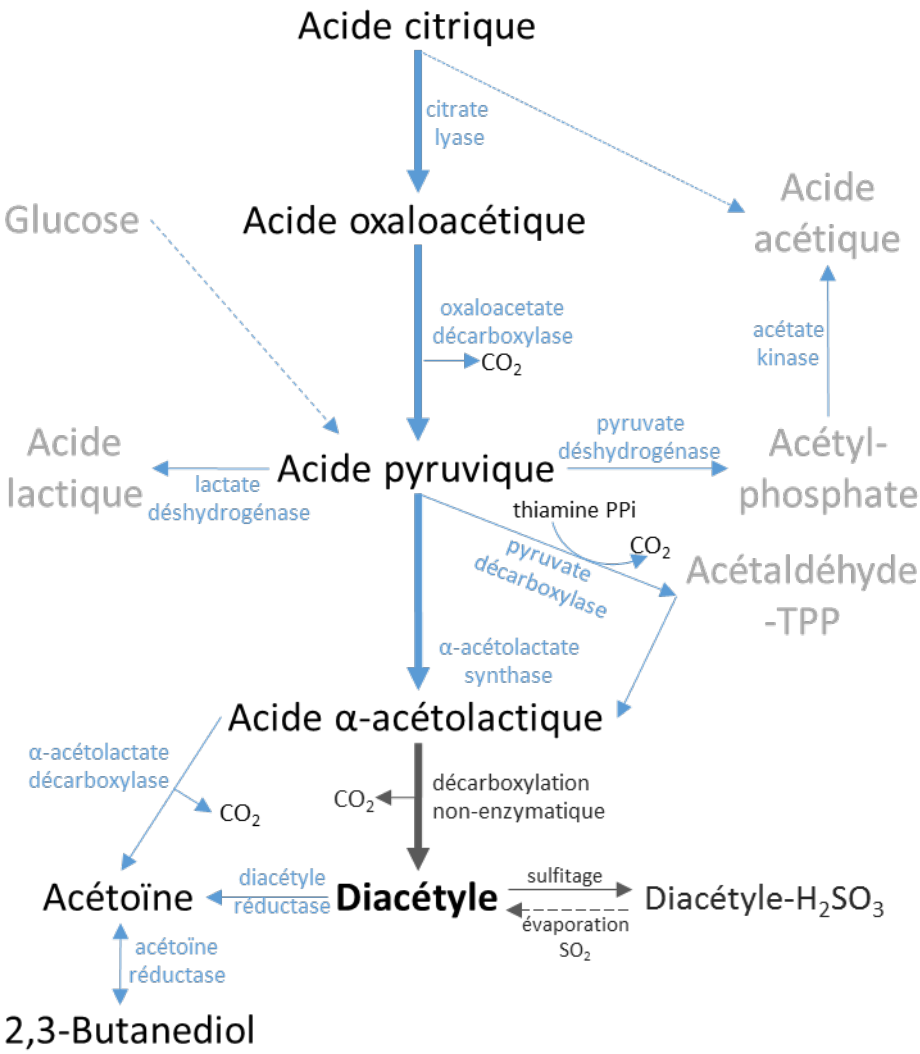


Figure 8 : Impact du métabolisme du citrate de O. oeni sur les propriétés organoleptiques du vin : production d'acide acétique et de diacétyle (Ramos et al., 1995; Nielsen and Richelieu, 1999; Bartowsky and Henschke, 2004).

La FML est aussi l'occasion pour *O. oeni* d'interagir avec des **composés phénoliques** du vin, plus particulièrement avec les dérivés de l'acide cinnamique. Ces acides hydroxycinnamiques, présents sous la forme d'acides férulique et coumarique, sont des précurseurs de la formation de phénols volatils : les 4-éthylgaïacol et 4-éthylphénol (Cavin *et al.*, 1993; Gury *et al.*, 2004). Ces molécules donnent au vin des notes animales qui ne sont pas indésirables à de faibles concentrations, mais qui deviennent gênantes à plus forte concentration, où elles sont caractérisées par des senteurs de sueur de cheval. Cette altération est typique de la contamination du vin par la levure *Brettanomyces bruxellensis* qui est

le principal producteur de ces phénols volatils à partir des mêmes précurseurs (Chatonnet *et al.*, 1995). Certaines bactéries lactiques du vin, en particulier l'espèce *Lactobacillus plantarum*, sont aussi capables de produire ces métabolites (Cavin *et al.*, 1993), mais cette décarboxylation est très dépendante de la souche (Couto *et al.*, 2006). Il semblerait que peu de souches de *O. oeni* aient ce métabolisme (Cavin *et al.*, 1993; Couto *et al.*, 2006; Ugliano *et al.*, 2006) mais que certaines souches soient impliquées indirectement en libérant des précurseurs utilisés ensuite par *B. bruxellensis* (Chescheir *et al.*, 2015).

Les **esters** du vin proviennent majoritairement du métabolisme des levures et dans une moindre mesure de celui des bactéries lactiques durant la FML (Sumby *et al.*, 2010). En particulier, *O. oeni* intervient dans la formation du (S)-lactate d'éthyle et du succinate de diéthyle (Sumby *et al.*, 2010; Lloret *et al.*, 2002).

Le moût contient également des **précurseurs d'arômes** glycoconjugués donc inodores. Ils sont libérés au cours de la vinification par des activités enzymatiques de type glucosidase, séparant l'aglycone de l'ose. Ces aglycones sont des composés aromatiques qui peuvent être des dérivés d'acide shikimique, des alcools aliphatiques, des terpénoïdes et des norisoprénoïdes (β-damascénone et β-ionones) (D'Incecco *et al.*, 2004; Ugliano *et al.*, 2006; Hjelmeland and Ebeler, 2014). Il a été montré que *O. oeni* était capable d'exercer une activité α- et β-glycosidase sur des macromolécules levuriennes, stimulant sa croissance (Guilloux-Benatier *et al.*, 1993). Elle possèderait également des enzymes capables d'hydrolyser d'autres glucides, telles que les β-glucosidase, β-xylosidase, β-arabinosidase, α-arabinosidase et β-rhamnosidase. Cette activité glucosidase utile à la croissance de *O. oeni*, lui permet également de libérer des précurseurs d'arômes (Grimaldi *et al.*, 2000; Mansfield *et al.*, 2002; Gagné *et al.*, 2011). Là encore, il existe de fortes variations entre les souches (Grimaldi *et al.*, 2000; Ugliano *et al.*, 2003; D'Incecco *et al.*, 2004; Ugliano and Moio, 2006). En général, l'activité glycosidase est conservée pour des pH rencontrés dans le vin (3 à 4 unités pH) et pour des températures de vinification usuelles (20 à 25°C) (Barbagallo *et al.*, 2004; Grimaldi *et al.*, 2005). Or, malgré la diminution de la concentration des hétérosides du fait de l'activité enzymatique, la concentration des aglycones n'augmente pas systématiquement dans le vin. En effet, il existerait un phénomène de rétention de

ces composés par des macromolécules (Dufour and Bayonove, 1999b) et parmi celles-ci, des polysaccharides d'origine bactérienne (Dufour and Bayonove, 1999a; Boido *et al.*, 2002). Toutefois, l'activité glycosidase libère bien des composés aromatiques, notamment des terpénols, de la β-damascénone (Ugliano *et al.*, 2003) de la 3-hydroxydamascone, de la vanilline (D'Incecco *et al.*, 2004), de la β-ionone, du linalol (Hernandez-Orte *et al.*, 2009). *O. oeni* a donc la possibilité de modifier le bouquet aromatique du vin *via* la libération de précurseurs glycoconjugués du raisin.

I.5.3. Métabolisme d'intérêt œnologique de *O. oeni* avec le bois

Lors de la fermentation du vin en fût, des échanges entre les microorganismes et le bois ont lieu. Outre l'extraction d'arômes du bois réalisée par le vin, les microorganismes vont utiliser comme substrats certaines molécules du bois, ce qui va influer le profil organoleptique du vin. Certains composés du bois comme les ellagitanins et les composés phénoliques peuvent avoir un rôle favorable sur la croissance de *O. oeni*. Le taux de croissance bactérienne est plus élevé en présence de bois et plus particulièrement lorsqu'il est chauffé (de Revel *et al.*, 2005). En effet, la chauffe du bois provoque une déstructuration de ses polymères (Hale *et al.*, 1999), libérant donc plus de précurseurs glycosylés (Gagné *et al.*, 2011).

Les composés du bois comportent des glucides et sont susceptibles d'être hydrolysés par les enzymes de la bactérie, afin de servir de source de nutriments. De la même façon que pour les composés glycoconjugués du raisin décrits dans le point I.5.2, *O. oeni via* ses glycosidases, est capable d'hydrolyser certains composés hétérosidiques du bois. Cela lui fournirait une source de glucides améliorant sa croissance (de Revel *et al.*, 2005; Bloem *et al.*, 2006).

Il a été identifié cinq activités glycosidases chez *O. oeni* : β-glucosidase, α-glucosidase, β-xylosidase, α-arabinosidase et α-rhamnosidase (Grimaldi *et al.*, 2005). Or, toutes les souches n'ont pas le même potentiel glycosidase (Grimaldi *et al.*, 2005; Bloem *et al.*, 2008). Il y a une variabilité importante entre les souches pour chaque activité glycosidase mais aussi au sein de chaque souche pour les cinq activités glycosidases (Gagné *et al.*, 2011).

Cette activité glycosidase a été démontrée par l'ajout d'enzymes de type β-glucosidase, α-L-arabinofuranosidase et α-L-rhamnopyranosidase dans des

extraits de bois, ce qui produit de la vanilline (Bloem *et al.*, 2006). Ces résultats mettent donc en évidence que des précurseurs glycoconjugués sont présents dans le bois de chêne et que l'activité glycosidase est impliquée dans la libération de la vanilline au cours de la FML en fûts de chêne. La concentration de vanilline observée pendant la croissance des bactéries lactiques en contact avec le bois ne peut pas être expliquée par la transformation de composés phénoliques par les bactéries lactiques (Bloem *et al.*, 2007). En effet, il a été montré que les bactéries lactiques ne sont pas en mesure de convertir de l'eugénol, de l'isoeugénol ou de l'acide vanillique en vanilline. Seule *O. oeni* est capable de convertir l'acide férulique en vanilline mais avec un rendement négligeable quant à l'impact sensoriel (Bloem *et al.*, 2007). Cette activité glycosidase aurait donc pour conséquence la libération de composés aromatiques dans le vin. En effet, en consommant le glucide du précurseur, *O. oeni* libère dans le vin le composé aromatique.

La libération de vanilline a été la réaction enzymatique la plus étudiée. L'addition simultanée de trois glycosidases (β-glucosidase, α-L-arabinofuranosidase and α-L-rhamnopyranosidase) permet d'obtenir une plus grande concentration de vanilline que par action de la β-glucosidase seule. Cela indique que différents types de glucides sont liés à la vanilline (Bloem *et al.*, 2006). Une étude approfondie des précurseurs de la vanilline a montré qu'ils étaient principalement des arabinoses et xyloses (Bloem *et al.*, 2008).

Par exemple, des études de l'effet de la fermentation malolactique sur le boisage d'un vin blanc de Sauvignon (de Revel *et al.*, 1999) et d'un vin rouge de Listán negro (Afonso, 2003) ont révélés qu'une plus grande complexité aromatique a été perçue lors de l'analyse sensorielle, avec des notes beurrées, épicées, vanillées, torréfiées et fumées. L'utilisation de bois neuf a accentué l'intensité de ces descripteurs. Les différences sensorielles ont été confirmées par des analyses chimiques montrant une plus grande concentration de vanilline, whiskylactone et d'eugénol (de Revel *et al.*, 1999).

La vanilline n'est pas le seul composé volatil lié à un glucide, d'autres aglycones ont été identifiées, comme la syringaldéhyde, les whiskylactones, l'eugénol et les composés furaniques qui sont donc de potentielles sources d'arômes (de Revel *et al.*, 1999; Bloem *et al.*, 2008; Gagné *et al.*, 2011; Gomez Garcia-Carpintero *et al.*, 2012).

L’impact aromatique de la FML en présence de bois est encore imprécis pour des raisons multifactorielles : le type de bois, la chauffe du bois, la souche de *O. oeni* et les composés aromatiques identifiés et suivis. Les variations en fonction du type de bois et de sa chauffe sont décrites dans la partie I.3.2.

I.6. Alternatives pour réaliser la FML

I.6.1. La FML : une opération à perfectionner

La fermentation malolactique est une étape devenue indispensable pour de nombreux vignerons. Or la FML spontanée n'est pas un processus simple et de nombreux problèmes peuvent survenir. Tout d'abord, la FML spontanée prend du temps. De plus, il existe souvent une période de latence entre la fin de la fermentation alcoolique et le déclenchement de la fermentation malolactique. Cette période est principalement due à la température trop basse, aux faibles quantités de nutriments présents dans le vin car ayant déjà été consommés par les levures durant la FA, ainsi que par la présence d'éthanol qui inhibe la croissance des bactéries lactiques. Or, pendant ce temps le vin est susceptible d'être contaminé par des flores d'altération. Pour la majorité des vignerons, l'objectif final est d'avoir une production maîtrisée à qualité constante, en limitant le risque d'accident de vinification. Il y a donc un besoin croissant de contrôler la fermentation malolactique, afin de pouvoir davantage maitriser son déclenchement, sa durée ainsi que son impact organoleptique. C'est pourquoi, des méthodes alternatives à la fermentation spontanée ont été développées.

L'inoculation directe de bactéries dans le vin a longtemps été un défi. A cause des conditions difficiles du vin, les bactéries inoculées ne parvenaient pas à se développer et la population bactérienne diminuait jusqu'à disparaitre complètement (Bauer and Dicks, 2004). La principale explication de cet échec vient du mode de culture en laboratoire extrêmement favorable à la croissance bactérienne. Or, cela ne permettait pas leur adaptation aux conditions environnementales stressantes du vin (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Des techniques alternatives ont été mises au point pour contourner cette difficulté, tout d'abord par l'inoculation du moût avant fermentation alcoolique. Avec cette méthode la consommation de l'acide malique est assurée, mais en cas de fermentation alcoolique languissante la croissance des bactéries lactiques dans ce milieu riche altère le vin (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). En effet, *O. oeni* est hétérofermentaire et produit de l'acide acétique et lactique en présence de sucre, ce qui nuit à la qualité du vin. Une autre méthode consistait à utiliser une importante biomasse capable de dégrader l'acide malique sans nécessiter de croissance. Or, cette inoculation massive est difficilement réalisable

en pratique et pose des problèmes économiques (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983). La meilleure solution a été de réactiver les bactéries avant inoculation, ce qui accroît leur résistance (Cecconi *et al.*, 2009). Cette réactivation consiste à utiliser du jus de raisin non sulfité, dilué à moitié (≈80 g de sucre par litre), supplémenté en extrait de levure, avec un pH ajusté à 4.5 (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983). Après plusieurs heures les bactéries sont ensuite inoculées à environ 10^6 UFC/ml. Cette méthode est efficace mais nécessite certaines connaissances microbiologiques qui limitent son utilisation chez le vigneron. Enfin, des avancées dans l'étude de la physiologie et dans la compréhension des mécanismes de la réponse au stress de *O. oeni* ont été réalisées (Jobin, 1999; Desroche, 2005). Cela a contribué à moderniser la préparation de ces levains et ainsi à pouvoir proposer des souches commerciales lyophilisées à inoculation directe. Pour cela, des souches d'intérêt sont sélectionnées pour leur capacité à résister particulièrement à l'alcool, à l'acidité, au SO_2 et à la lyophilisation. Un contrôle est effectué sur ces souches en s'attachant plus particulièrement à vérifier d'une part, leur capacité à consommer l'acide malique et à mettre en œuvre certaines activités enzymatiques leur conférant des propriétés œnologiques et d'autre part, à vérifier leur incapacité à produire des amines biogènes ou du β-glucane (Renouf, 2006; Lucas *et al.*, 2008).

I.6.2. Alternatives à *Oenococcus oeni*

Des tentatives de remplacement de *O. oeni* pour effectuer la fermentation malolactique ont également été envisagées. La plus simple est d'utiliser des levures du vin connues pour leur capacité de métabolisation de l'acide malique *via* la voie malo-éthanolique. Une étude a montré que *Saccharomyces paradoxus* RO88 et *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin 71B étaient capables de transformer l'acide malique mais de façon partielle (Redzepovic *et al.*, 2003). Ce phénomène est sans doute dû à l'absence de transport actif dans la cellule et à la faible affinité de l'enzyme malique de la levure pour son substrat (Husnik *et al.*, 2007; Sumby *et al.*, 2014). En revanche, *Schizosaccharomyces pombe* F a pu convertir 90% de l'acide malique mais n'a pas donné de résultats organoleptiques satisfaisants (Volschenk *et al.*, 2001; Redzepovic *et al.*, 2003).

Pour améliorer les performances de *S. cerevisiae*, des manipulations génétiques ont été effectuées. Par exemple, *S. cerevisiae* ML01 exprime le gène codant pour la malate-perméase de *S. pombe* (*mae1*) avec celui de l'enzyme malolactique de *O. oeni* (*mleA*) (Husnik *et al.*, 2006, 2007). Cette souche a été décrite comme produisant un vin de qualité. Elle a obtenu le statut *Generally Regarded As Safe* et a été commercialisée aux USA et en Moldavie par BioSpringer. Plusieurs autres manipulations génétiques de *S. cerevisiae* ont été effectuées pour lui permettre de convertir l'acide malique (Su *et al.*, 2014). Bien que ces souches donnent des résultats satisfaisants, les analyses révèlent que leur capacité fermentaire et leur impact organoleptique sont insuffisants pour qu'elles soient envisagées comme une solution crédible (Sumby *et al.*, 2014). De plus, l'utilisation d'Organismes Génétiquement Modifiés en agroalimentaire est fortement limitée d'un point de vue légal en Europe et une majorité de vignerons et de consommateurs expriment leur refus (Schuller and Casal, 2005).

I.6.3. La FML réalisée par des cellules immobilisées

Il existe une alternative émergente encore au stade de développement en laboratoire et encore non étendue à l'échelle industrielle pour réaliser la FML. Il s'agit de recourir à l'utilisation de bactéries immobilisées. Une bactérie immobilisée est une bactérie liée à un support. Le recours à des bactéries immobilisées est déjà largement développé dans l'industrie agroalimentaire (Kosseva, 2010). Ce procédé permet d'accumuler de la biomasse et d'obtenir des densités cellulaires plus grandes. En outre, l'intérêt majeur en processus industriel est d'avoir des opérations continues, grâce à un flux de substrat circulant dans un bioréacteur. De plus, l'immobilisation des cellules sur une surface permet de maintenir une séparation entre la biomasse et les produits fermentés et donc d'éviter d'avoir recours à des techniques supplémentaires telles que la filtration ou la centrifugation, qui génèrent des coûts additionnels (Verstrepen and Klis, 2006). Les cellules immobilisées ont été utilisées pour la production d'enzymes, d'acides aminés, d'acides organiques, d'alcool et d'arômes ainsi que pour des techniques de bioremédiation et de traitement des effluents (Kregiel, 2014).

Les tentatives d'utiliser à la fois des bactéries et des enzymes immobilisés pour convertir l'acide malique ont commencé dans les années 1970. L'intérêt de recourir à des cellules immobilisées pour la désacidification des vins est d'avoir un meilleur contrôle de l'opération, une production en flux continu, une meilleure tolérance des cellules à l'alcool, au SO_2 et au pH (Davis *et al.*, 1985). Enfin, une FML contrôlée par l'utilisation de bactéries lactiques sélectionnées immobilisées permet de maîtriser le développement de certains arômes d'intérêt, d'accélérer la FML par de plus grandes densités de cellules et de réutiliser les cellules pour des processus en continu (Lonvaud-Funel, 1995; Kosseva *et al.*, 1998; Maicas, 2001; Kourkoutas *et al.*, 2004).
Il existe quatre méthodes pour immobiliser des cellules sur un support : le piégeage dans une matrice poreuse, la fixation à une surface par adsorption, le confinement dans une enceinte et l'agrégation cellulaire (floculation) (Kourkoutas *et al.*, 2004; Genisheva *et al.*, 2014a).

Les premiers efforts se sont concentrés sur l'immobilisation de *O. oeni* en gel d'alginate. L'alginate était déjà largement répandu comme additif alimentaire. Une étude a montré que la FML déclenchée par cette technique avait pu être réalisée en trois jours avec 2.10^8 UFC/ml, dans un vin rouge italien (cépages Raboso et Barbera) (Spettoli *et al.*, 1982). Toutefois ce processus n'apportait pas d'amélioration significative par rapport à une inoculation standard, son activité a diminué avec le temps et la qualité du vin obtenu ne semblait pas satisfaisante (Colagrande *et al.*, 1994; Maicas, 2001). En outre, une dernière étude a révélé que les cellules libres étaient plus actives (Guzzon *et al.*, 2012). Ce phénomène est similaire pour la FML dans le cidre, où il est nécessaire d'utiliser cinq fois plus de *O. oeni* immobilisées que de cellules libres (Herrero *et al.*, 2001). Dans les années 90, d'autres supports ont été utilisés, comme le polyacrylamide, le κ-carraghénane, des gels de silice, de pectate, ou de chitosan, ensemencés avec *Lactobacillus sp.* qui ont donnés des résultats plus satisfaisants que les supports utilisés précédemment (Kosseva *et al.*, 1998; Maicas, 2001; Kosseva and Kennedy, 2004; Kourkoutas *et al.*, 2004). Globalement, la méthode la plus utilisée en biotechnologie pour piéger les cellules est le réseau de polyacrylamide. Or, il a été montré que les propriétés des cellules de *L. casei* immobilisées dans un gel de polyacrylamide ne sont pas supérieures à celles des cellules libres (Rossi and Clementi, 1984). En outre, cette

technique n'a pu être retenue en agroalimentaire pour des raisons de sécurité due à l'utilisation de polyacrylamide (Maicas, 2001). Les recherches se sont donc orientées vers un autre support compatible en agroalimentaire, le κ-carraghénane, déjà largement utilisé comme additif alimentaire. Or, la viabilité de *O. oeni* sur ce support n'a pas dépassé 48 heures, seule la moitié de l'acide malique était convertie (Crapisi *et al.*, 1987; Genisheva *et al.*, 2014a). En général, la méthode d'encapsulation limite le passage des nutriments vers les cellules piégées, ce qui conduit à terme, à une chute de l'activité (Genisheva *et al.*, 2014a). Un support réduisant ce phénomène a été mis au point : il s'agit de l'éponge de cellulose chargée positivement. Ainsi, il a été possible de fixer une biomasse importante de *O. oeni* sur des cubes de 8 mm (env. 2.10^9 UFC/g d'éponge). Ce procédé a permis de réaliser des FML complètes en 3 heures (avec env. 4.10^7 UFC/ml) contrairement à 24 heures pour les cellules libres (Maicas *et al.*, 2001). Cependant, l'activité a diminué au bout de 5 cycles de 24 heures (batchs successifs), surement à cause de la présence d'éthanol qui altère les cellules (Maicas *et al.*, 2001). Les expériences menées sur gel et en particulier sur l'immobilisation de cellules de *L. casei* dans un gel de pectate-chitosan utilisé pour la réalisation de FML sur un vin de Chardonnay ont mis en évidence un taux de dégradation de l'acide malique deux fois supérieur à celui des cellules libres (Kosseva *et al.*, 1998). Néanmoins, le métabolisme de *L. casei* implique la conversion de l'acide malique en acide lactique mais aussi en acide succinique et en acide acétique, qui altèrent le bouquet aromatique du vin. Un autre polymère a été étudié, la matière cellulosique délignifiée (*delignified cellulosic material* -DCM) obtenue à partir de sciures. Ce support est capable de piéger *O. oeni* et permet une stabilité d'un mois, mais la FML réalisée n'a pas été totale (54%) (Agouridis *et al.*, 2008). Dans une étude menée par Servetas *et al.* (2013), la fermentation alcoolique et la fermentation malolactique ont été réalisées simultanément dans un même fermenteur. Les cellules de *S. cerevisiae* ont été piégées dans un gel d'amidon et celles de *O. oeni* dans de la matière cellulosique délignifiée. Avec ce procédé, une FML complète a pu être réalisée en 5 jours à une température de 10°C (Servetas *et al.*, 2013).

La seconde méthode d'immobilisation est la fixation des cellules à support organique ou inorganique réalisée par adsorption (processus spontané) ou par interactions électrostatiques (Margaritis and Kilonzo, 2005). La rugosité de la

surface est un paramètre important favorisant cette adhésion (Brányik *et al.*, 2004). La méthode consiste à inoculer une suspension cellulaire sur un support. Les cellules sont captées par le support et alimentées par le milieu de culture (Maicas, 2001). C'est une technique simple, peu couteuse et relativement efficace tant que les paramètres du milieu ne changent pas (causant une désorption) mais qui peut être limitée en cas de passage à une échelle supérieure (de Ory *et al.*, 2004). De nombreux supports organiques ont été utilisés pour immobiliser des levures et fermenter le vin : pomme, pastèque, raisin sec, poire, coing mais aussi graines de blé, de maïs, d'orge (Genisheva *et al.*, 2014a). Ils sont compatibles avec l'utilisation agroalimentaire mais peuvent s'avérer couteux à grande échelle. *O. oeni* a été immobilisée sur des peaux et des rafles de raisin afin de réaliser la fermentation malolactique d'un vin (Genisheva *et al.*, 2013). Sur ces supports, la souche commerciale utilisée s'est montrée capable de réaliser des FML successives pendant 5 mois. *O. oeni* a également été immobilisée sur des peaux de raisin afin de réaliser une fermentation malolactique en continu. Cette souche commerciale ainsi préparée a consommé plus de 90% de l'acide malique du vin (Genisheva *et al.*, 2014b). La FML en continu dans un bioréacteur a également été étudiée avec *O. oeni* adsorbé sur des copeaux de bois (Janssen *et al.*, 1993). Bien que les taux de conversion d'acide malique obtenus ont été deux fois plus élevés que ceux observés pour des cellules libres et qu'une activité a été observée dans un vin à pH 3,15 et 13% d'éthanol, la FML n'a pas été complète du fait du procédé en continu (Janssen *et al.*, 1993).

La troisième méthode d'immobilisation est le confinement dans une enceinte, ce qui consiste à retenir les cellules avec des filtres microporeux sous forme de capsules ou de fibres creuses. La quatrième méthode est l'agrégation cellulaire qui est un phénomène naturel chez certains micro-organismes mais qui peut être déclenché artificiellement. Les cellules se lient les unes aux autres, ce qui forme des agrégats de taille macroscopique. Cela entraine la plupart du temps une sédimentation des cellules ou à l'inverse la formation d'un voile à la surface du milieu. C'est un processus complexe lié à l'expression des gènes de floculation, comme la famille *FLO* chez *S. cerevisiae* (Verstrepen and Klis, 2006; Genisheva *et al.*, 2014a; Rossouw *et al.*, 2015). Ces deux dernières méthodes d'immobilisation ne seront pas traitées car elles sont très peu utilisées dans le cas de la FML.

Il est difficile de comparer la performance des cellules immobilisées selon leur méthode d'immobilisation et leur support. En effet, la plupart du temps la biomasse inoculée n'est pas mesurée. Globalement, ce procédé semble réaliser la FML là où les cellules libres n'en sont pas ou peu capables. Il faut également tenir compte du biais de l'utilisation de bactéries commerciales adaptées au stress du vin, qui donnent forcément de meilleurs résultats. En outre, la diversité des vins utilisés rend la comparaison difficile : de faibles variations du pH (3,0-3,5) du taux d'éthanol (12-13%) de la concentration en acide malique (2-4 g/l) et en SO_2 (0-30 mg/l) impactent les performances de la méthode employée. Il est également difficile de comparer les modes de fermentation en lot (*batch*) et en continu. De plus, concernant les fermentations du vin, le processus en continu ne semble pas être nécessairement utile. Dans ce cas de figure, la matière première (moût, vin) risque d'être altérée et nécessite donc un traitement immédiat. Enfin, la qualité du vin est difficile à apprécier par analyse chimique (en se focalisant sur les molécules indésirables telles que l'acide acétique) et peu d'études ont intégré une analyse sensorielle par un jury.

Les alternatives technologiques employant des cellules immobilisées aboutissent à des résultats encourageants mais ne dépassent pas encore la praticité de l'inoculation de souches lyophilisées. De plus, des problèmes peuvent survenir lors de l'obtention de suffisamment de biomasse pour alimenter des bioréacteurs de taille industrielle (Maicas, 2001). Ces points constituent des freins majeurs pour passer de l'expérience en laboratoire à l'échelle industrielle. Ces essais ont cependant permis de mettre en œuvre des idées intéressantes aux résultats prometteurs, comme le procédé de multiplication de cellules sur un support et l'utilisation de copeaux de bois comme support pertinent pour la vinification.

I.7. Le biofilm

La vie bactérienne sous forme de culture liquide, appelée culture planctonique, est la plus souvent rencontrée dans la littérature scientifique. Cela est dû aux cultures réalisées en laboratoire dans des conditions standardisées. La culture planctonique a été privilégiée car elle est plus facile à maîtriser et a été utile pour l'étude de la physiologie bactérienne. Mais en réalité, elle constitue un biais dans l'étude des bactéries, car dans la nature celle-ci s'associent en communautés (Davey and O'toole, 2000). L'analyse détaillée de ces communautés *in situ* a bénéficié de l'amélioration des techniques de microscopie et de biologie moléculaire depuis la fin des années 1990 (Davey and O'toole, 2000). L'observation d'une grande variété d'habitats naturels a établi que la majorité des microbes se développent attachés à un support, au sein d'un écosystème structuré appelé biofilm et non comme des organismes libres (planctoniques) (Costerton *et al.*, 1995). Les biofilms sont constitués d'un ensemble de microorganismes et de leurs produits extracellulaires et se forment en adhérant à un support. Sous cette forme de vie spécifique, les cellules bactériennes dites sessiles font partie d'une communauté au sein d'une matrice d'exopolymères qu'elles ont synthétisée. Elles sont alors plus résistantes aux stress chimiques (acides, alcool, détergents …) ou physiques (température, pH, flux …).

Au sein des biofilms, les communautés bactériennes s'organisent et forment des machineries complexes en unissant plusieurs métabolismes microbiens. Ainsi, les biofilms jouent un rôle clé dans le cycle de la matière organique : dégradation de la matière organique, dégradation de nombreux polluants de l'environnement et intervention dans le cycle de l'azote, du soufre et de nombreux autres métaux, qui sont autant d'applications d'intérêt (Singh *et al.*, 2006). Ces propriétés font que les biofilms ne sont pas exclus du secteur agroalimentaire : dans certains cas ils présentent un danger de contamination avec des espèces pathogènes (Bridier *et al.*, 2015), dans d'autres cas ils sont utilisés pour leurs performances accrues dans la production d'éthanol (Germec *et al.*, 2015) et d'acide acétique (Crueger and Crueger, 2006).

I.7.1. Cycle de vie du biofilm

Le cycle de vie d'un biofilm est schématiquement divisé en 5 phases (Figure 9) : l'adhésion réversible à la surface [1], l'adhésion irréversible à la surface [2], la croissance [3], la maturation du biofilm [4] et le détachement [5].

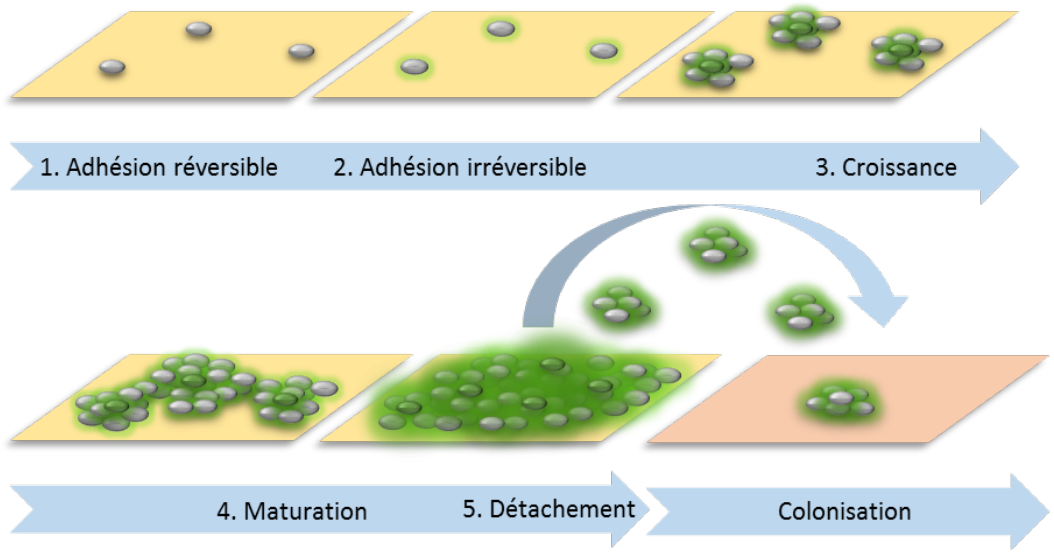


Figure 9 : Les 5 étapes du développement en biofilm.
L'adhésion réversible à la surface [1], l'adhésion irréversible à la surface [2], la croissance, formation de microcolonies [3], la maturation du biofilm [4] et le détachement [5] qui conduit à la colonisation d'une nouvelle surface.
Les halos verts autours des cellules représentent les EPS. D'après (Monroe, 2007).

L'adhésion des cellules à une surface constitue la première étape de la formation du biofilm. Ce phénomène est dépendant des caractéristiques physico-chimiques et géométriques des cellules et de la surface colonisée. Les bactéries adhérent préférentiellement aux surfaces hydrophobes, apolaires et rugueuses (Giaouris *et al.*, 2009). Les bactéries entrent en contact avec le support par des liaisons faibles de types van der Waals ou électrostatiques. Il s'agit d'interactions électriques de faible intensité entre les molécules. Le transport des cellules bactériennes vers l'interface peut être actif ou passif, suivant que l'on a affaire à des espèces mobiles ou non (Savage and Fletcher, 1985).

La formation du biofilm est déclenchée par la détection de changement de paramètres de l'environnement tels que le manque de nutriments, la variation de température, de pH, la présence d'antibiotiques, la communication intercellulaire

appelée *quorum sensing*, la coopération ou la compétition inter-espèce. Ces facteurs ne sont pas tous identifiés et varient fortement selon les espèces mais semblent être tous en lien avec une stratégie de survie (Pringle and Fletcher, 1986; Dewanti and Wong, 1995; O'Toole and Kolter, 1998; Parsek and Greenberg, 2005; Abee *et al.*, 2011; Shemesh *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2015). L'expression du génome des bactéries change lors du passage de l'état planctonique (du grec *planktós* : à la dérive, vagabonder) à l'état sessile (du latin *sessilis* : qui peut se tenir bien assis) provoqué par l'attachement à la surface (Ghigo, 2003).

Il s'ensuit donc un processus d'adhésion irréversible des bactéries à l'interface qui implique des variations importantes du métabolisme bactérien, une réorientation des cellules sur la surface, ainsi que la sécrétion des premières molécules de substances exopolymériques (EPS) (Figure 9) (Sauer *et al.*, 2002).

Avec la multiplication des bactéries en microcolonies et la poursuite de la sécrétion d'EPS les joignant les unes aux autres, commence alors la phase de croissance du biofilm (Figure 9). Dans un premier temps, la croissance s'effectue horizontalement sur la surface colonisée. Puis, des structures tridimensionnelles apparaissent quand le biofilm se développe (Walker and Marsh, 2004). La diffusion des solutés au sein du biofilm évolue au cours de la croissance et de la maturation du biofilm (Beyenal and Lewandowski, 2002), ce qui conduit à un changement des conditions de transport des substrats. Le biofilm modifie en permanence les conditions biochimiques de son milieu (pH, force ionique ...) par son activité métabolique, puisqu'il consomme des solutés et en produit d'autres.

La maturation débute lorsque l'état stationnaire de croissance est atteint (Figure 9). Il n'y a plus de changement majeur du biofilm mais des modifications structurelles peuvent encore intervenir, dues à la variation de la population des différentes espèces bactériennes présentes dans le biofilm (Walker and Marsh, 2004).

La dernière étape de ce cycle est le détachement (Figure 9). Il est déclenché soit par l'effet mécanique sous l'effet de l'écoulement d'un fluide, soit par la pénurie de nutriments entrainant une forte létalité (Donlan, 2002). Cela conduit alors à la remise en suspension de cellules bactériennes susceptibles à leur tour de recommencer un cycle en adhérant à une autre surface. Ces cellules semblent conserver temporairement leur « phénotype biofilm » lorsqu'elles sont en suspension, puis entrent dans une phase intermédiaire au « phénotype planctonique » (Rollet *et al.*, 2008).

I.7.2. Techniques d'observation de biofilms

La difficulté d'observation du biofilm a longtemps été un facteur limitant de son étude. En effet, la visualisation de la structure du biofilm par microscopie permet de mieux appréhender ce phénomène et donne des informations sur ses propriétés.
Une des premières méthodes d'observation des biofilms est la microscopie électronique à balayage (MEB). Cette technique nécessite une déshydratation puis une métallisation des échantillons pour que le flux d'électrons soit réfléchi. Le risque d'aplatir le biofilm et de mal estimer son épaisseur n'est pas négligeable (Figure 10) (Davey and O'toole, 2000). Néanmoins, la MEB reste une technique très utilisée car elle s'adapte à la majorité des échantillons, elle est bien maitrisée et est relativement accessible financièrement.

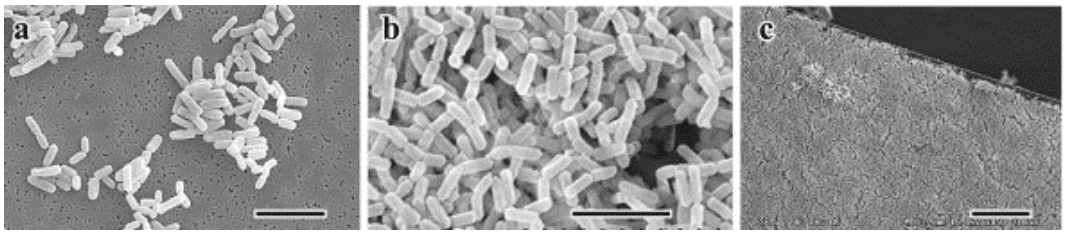


Figure 10 : Observation en MEB de cellules planctoniques (a) cellules de biofilm (b) et de la surface du biofilm (c) de Lactobacillus plantarum subsp. plantarum JCM1149 (Kubota et al., 2008)

D'autres méthodes ont été développées afin de réduire l'altération du biofilm et de pouvoir l'étudier dans son état. Par exemple, l'utilisation de microélectrodes pour doser le niveau d'oxygène au micromètre près, a permis de montrer que la structure du biofilm est hétérogène avec la présence de canaux permettant la circulation de l'eau et des métabolites (de Beer *et al.*, 1994).
La microscopie confocale à balayage laser (CLSM) a permis de mieux appréhender la structure tridimensionnelle du biofilm (Figure 11) (Lawrence *et al.*, 1991; de Beer and Stoodley, 1995; Bridier *et al.*, 2010a, 2013). Elle consiste à obtenir des « sections optiques » (axes x et y) de différentes profondeurs de l'échantillon (axe z) et à les assembler par traitement logiciel afin de recomposer l'échantillon en 3D. De plus, couplée au marquage spécifique des EPS par des lectines (FLBA), cette méthode a permis de montrer une certaine hétérogénéité dans la composition des polysaccharides entre les microcolonies du biofilm (Lawrence *et al.*, 2007).

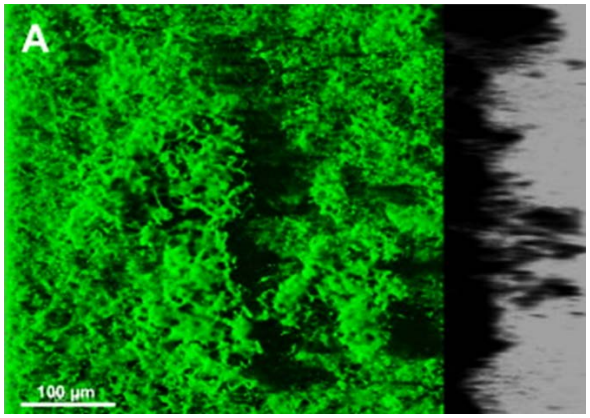


Figure 11 : Reconstruction 3D de l'architecture du biofilm de Bacillus subtilis à partir d'images de CLSM, EPS marqués par une lectine (Bridier et al., 2013).

Une approche originale pour la détection *in situ* d'un biofilm de *P. fluorescens* a été d'utiliser son empreinte spectrale infrarouge (IR) en mode réflexion totale atténuée (ATR). L'évolution des bandes du spectre correspondant aux protéines, polysaccharides et acides nucléiques a permis de suivre les premières étapes de l'adhésion bactérienne (Figure 12). L'obtention du profil spectral du biofilm de *P. fluorescens* a été une première étape pour établir une méthode de suivi de la qualité microbiologique des eaux de distribution (Delille *et al.*, 2007).

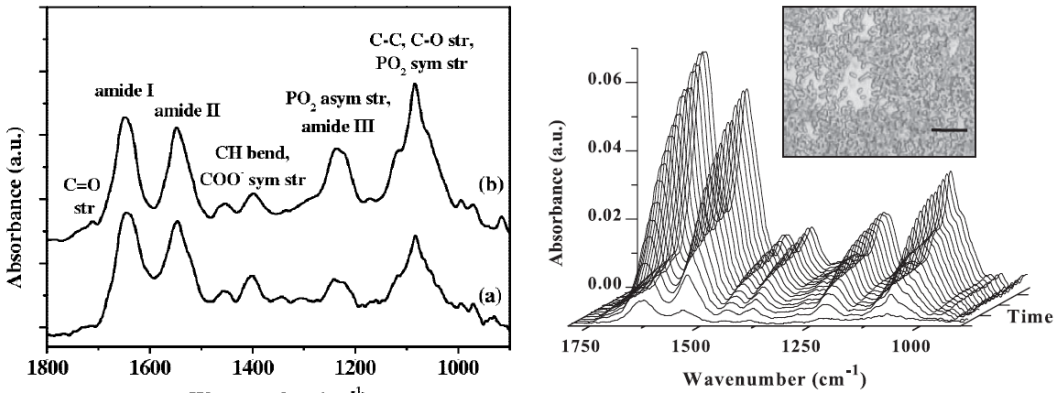


Figure 12 : Evolution du spectre ATR-FTIR avec l'attachement et le développement en biofilm des cellules de Pseudomonas fluorescens. (Delille et al., 2007)

Enfin, la microscopie électronique à balayage environnemental ou à pression variable (*variable pressure scanning electron microscopy*, *VPSEM*) est une évolution de la MEB. Elle permet une représentation plus fidèle de la morphologie du biofilm en évitant les étapes de déshydratation (Figure 13) (Weber *et al.*, 2014).

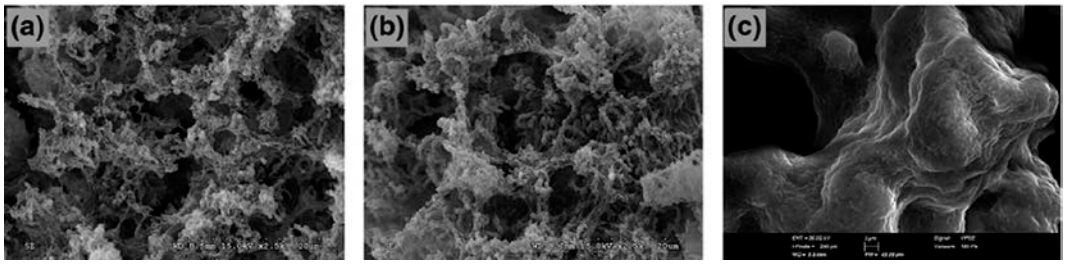


Figure 13 : Observation du biofilm de Streptococcus mutans par trois techniques : MEB (a), MEB avec coloration au rouge de ruthénium (b) et VPSEM (MEB environnemental) (c). Les trois images ont été obtenue avec un distance de travail de 8,5mm et ont champ de 100µm. (Weber et al., 2014)

Les techniques de microscopie confocale à balayage laser et de microscopie électronique à balayage sont complémentaires, ayant chacune leurs avantages et faiblesses. L'idéal est de pouvoir observer le biofilm avec ces deux méthodes, pour avoir une meilleure notion de détails dans le premier cas et de volume dans le second (Figure 14).

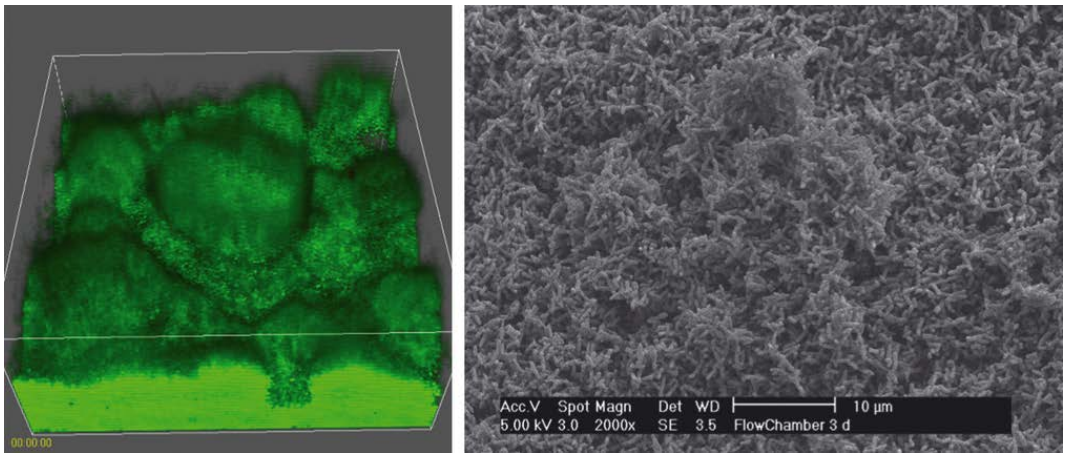


Figure 14 : Comparaison des observations du biofilm de Pseudomonas aeruginosa par CLSM (à gauche) et MEB (à droite). (Alhede et al., 2012)

I.7.3. La matrice : composition et fonctions

La matrice est un agglomérat de substances exopolymériques (EPS) produites par les cellules qui constituent le biofilm (Flemming and Wingender, 2010). Ainsi, elles sont abritées et isolées de l'environnement extérieur. En moyenne, la matrice représente 90% de la masse sèche du biofilm (les cellules 10%) (Flemming and Wingender, 2010). L'architecture et la structure tridimensionnelle du biofilm sont

influencées à la fois par les paramètres de l'environnement, tels que les flux du milieu liquide environnant la propriété de la surface, la disponibilité en nutriments mais aussi par des paramètres propres aux microorganismes comme la composition des EPS produits, la mobilité et la communication cellulaire (Stoodley *et al.*, 1997, 1999; Flemming and Wingender, 2010). La matrice est traversée par des canaux permettant la circulation des nutriments et des métabolites au sein du biofilm (Stoodley *et al.*, 1994; Costerton, 1995). Ils fournissent un moyen d'échange des nutriments et des métabolites et ainsi améliorent la disponibilité des nutriments et l'élimination des déchets métaboliques (Costerton *et al.*, 1995).

Les substances exopolymériques qui constituent la matrice, sont de nature polysaccharidique, peptidique et nucléique (Flemming *et al.*, 2007). La plupart des bactéries sont capables de produire des exopolysaccharides que ce soit sous forme de capsules ou d'excrétions. Les EPS permettent l'adhésion à une surface et l'adhésion des cellules entre elles. Elles immobilisent les cellules et permettent de les contenir dans un environnement restreint favorisant les synergies métaboliques et la communication intercellulaire. Elles jouent un rôle de protection contre la dessiccation (Ophir and Gutnick, 1994). Elles peuvent également servir à absorber des composés de nature antimicrobienne, tels que des métaux ou des toxines (Decho, 1990; Bellin and Rao, 1993; Flemming, 1993; Wolfaardt *et al.*, 1998). Les EPS sont à l'origine d'une douzaine de propriétés physico-chimiques conférant au biofilm des avantages pour sa survie, telles que l'adhérence, la rétention de l'eau, la structure et la cohésion (Tableau 3) (Flemming and Wingender, 2010).

Tableau 3 : Fonctions et intérêts des composants de la matrice du biofilm (Flemming and Wingender, 2010)

Fonction	Intérêt pour le biofilm	Types d'EPS impliqués
Adhérence	Colonisation de la surface par les cellules. Ancrage du biofilm.	Polysaccharides, protéines, ADN, molécules amphiphiles
Agrégation des cellules	Liaison entre les cellules. Immobilisation des bactéries. Fortes densités cellulaires. Reconnaissance des cellules entre elles.	Polysaccharides, protéines, ADN
Cohésion du biofilm	Forme la matrice Détermine l'architecture du biofilm. Stabilité mécanique du biofilm Permet la communication cellulaire.	Polysaccharides, protéines (telles que amyloïdes et les lectines), ADN
Rétention de l'eau	Maintien de l'hydratation du biofilm, résistance à la dessiccation.	Polysaccharides hydrophiles
Barrière de protection	Confère une résistance aux agents antimicrobiens (désinfectants, antibiotiques) ainsi qu'à l'oxygène.	Polysaccharides et protéines
Sorption de composés organiques	Accumulation d'éléments nutritifs. Sorption de xénobiotiques toxiques.	Polysaccharides chargés ou hydrophobes et protéines
Sorption de composés inorganiques	Sorption d'ions métalliques toxiques.	Polysaccharides chargés, protéines, phosphates et sulfates
Activité enzymatique	Fournir des nutriments à partir de la dégradation de macromolécules exogènes. Libération de cellules de biofilms.	Enzymes
Source de nutriments	Réserve de C, N, K	Potentiellement tout composant de la matrice
Echange d'informations génétique	Facilite le transfert horizontal de gènes entre les cellules de biofilm	ADN
Donneur ou accepteur d'électron	Activité redox	Protéines
Expulsion de composés cellulaires	Libération d'organites et de métabolites	Vésicules membranaires, lipopolysaccharides, phospholipides
Réserve de carbone	En cas de déséquilibre du ratio C/N	Polysaccharides
Inactivation d'enzyme	Accumulation, rétention et stabilisation d'enzymes	Polysaccharides et enzymes

L’analyse des EPS par extraction totale de la matrice semble très difficile. En effet, les exopolysaccharides peuvent être ancrés dans la surface des cellules (Flemming and Wingender, 2010). Leur extraction rompt la membrane de la cellule ce qui libère le contenu intracellulaire et biaise l’analyse. Les EPS étant de nature chimique diverse, plusieurs méthodes d’extraction ont été testées : centrifugation, filtration, chauffe, sonication, traitement chimiques, hydroxyde de sodium, (Brown and Lester, 1980; Wingender *et al.*, 1999, 2001; Tapia *et al.*, 2009) ou encore le fractionnement des EPS par résine échangeuse d’ions (Frølund *et al.*, 1996). En général, ces techniques d’extraction des EPS sont basées sur la solubilité des EPS dans l’eau. Cependant, bien qu’utilisées couramment, ces méthodes surestiment souvent la proportion de polysaccharides par rapport aux autres EPS (Decho, 1990) et provoque la perte des substances non solubles, comme la cellulose (Zogaj *et al.*, 2001; Römling, 2002).

Les EPS ont longtemps désigné les exopolysaccharides puisqu’ils sont un composant majeur de la matrice du biofilm. Aujourd’hui, on privilégie l’emploi de cet acronyme pour désigner les substances exopolymériques uniquement. Les exopolysaccharides sont de longues chaines de glucides, linéaires ou ramifiées, de masse moléculaire comprise entre 500 et 2000 kDa. (Frølund *et al.*, 1996; Wingender *et al.*, 2001; Flemming and Wingender, 2010). Au sein des souches d’une même espèce, la composition et le nombre d’unités glucidiques ainsi que la masse moléculaire des exopolysaccharides peuvent varier (Vaningelgem *et al.*, 2004). Certains exopolysaccharides peuvent être constitués d’une seule unité monomérique (par exemple : glucane chez *Leuconostoc* spp., fructane chez *Streptococcus* spp., cellulose chez *Gluconacetobacter xylinus*) mais sont principalement des hétéropolysaccharides composés de glucides neutres et chargés (comme l’alginate chez *P. aeruginosa*) (Vu *et al.*, 2009; Flemming and Wingender, 2010). Les exopolysaccharides chargés négativement sont liés entre eux par des cations multivalents, tel le Ca^{2+}. Cela renforce la structure du biofilm et rend son architecture plus compacte (Krstgens *et al.*, 2001). Des exopolysaccharides chargés positivement ont également été identifiés, notamment l'adhésine polysaccharidique intercellulaire (PIA) qui joue un rôle important dans l’agrégation des cellules et la colonisation de la surface notamment chez les espèces pathogènes comme *Staphylococcus aureus* et *S. epidermidis* (Jefferson, 2009).

La matrice du biofilm est également constituée de polymères peptidiques, que ce soit sous forme de protéines structurelles ou d'enzymes. Les protéines structurelles sont impliquées dans la stabilisation de l'architecture de la matrice (Flemming and Wingender, 2010). Certaines permettent de lier la surface des cellules à des exopolysaccharides, comme les lectines. Par exemple, chez *P. aeruginosa* LecA et LecB se lient spécifiquement au galactose et au fucose (respectivement) (Tielker *et al.*, 2005; Diggle *et al.*, 2006). Au sein de la même espèce, la protéine CdrA serait capable à la fois de lier un exopolysaccharide aux cellules, mais aussi des exopolysaccharides entre eux, participant davantage à la cohésion de la matrice (Branda *et al.*, 2006). Des protéines impliquées dans l'adhésion des cellules et dans la formation du biofilm ont été identifiées chez plusieurs espèces de bactéries (pathogènes) dont *S. aureus* : la famille des « Bap » (*biofilm-associated protein*) et des amyloïdes (Lasa and Penadés, 2006; Otzen and Nielsen, 2007). Enfin, les protéines ancrées à la surface des cellules comme les pili et les flagelles peuvent contribuer à la stabilité de la structure du biofilm en interagissant avec les exopolysaccharides (Flemming and Wingender, 2010).

Certaines des enzymes contenues dans la matrice sont capables d'hydrolyser les exopolysaccharides permettant donc aux cellules qui se multiplient dans le biofilm de réorganiser leur environnement. Ces enzymes sont également utiles pour que le biofilm colonise d'autres surfaces par le détachement de groupes de cellules (Flemming and Wingender, 2010). D'autres enzymes peuvent être piégées par les EPS, ce qui confère au biofilm une activité extracellulaire (Flemming and Wingender, 2010).

I.7.4. Le biofilm, une communauté bactérienne dynamique

Les biofilms peuvent être composés d'une population qui s'est développée à partir d'une ou plusieurs espèces. Au sein du biofilm, il existe une dynamique entre les bactéries d'une même espèce mais aussi entre les différentes populations bactériennes, ce qui aboutit à la mise en place de symbioses bactériennes. Ainsi, il est possible qu'après l'adhésion irréversible d'espèces bactériennes aptes à l'attachement (colonisateur primaire), d'autres espèces bactériennes incapables d'adhérer à la surface solide s'intègrent dans la matrice d'EPS et colonisent le biofilm (colonisateur secondaire). Il n'est pas rare que des synthrophies métaboliques se mettent en place : une espèce bactérienne utilise comme substrat un produit métabolique produit par une autre espèce (Andrews *et al.*, 2006).

Grâce à l'utilisation de technologies microscopiques et moléculaires (MEB, CLSM, RTqPCR, …), il a pu être démontré que les biofilms ne sont pas uniquement des microorganismes piégés dans une matrice. Ils représentent un système bien organisé de manière complexe et coordonnée, telle une communauté (Caldwell, 1995; O'Toole *et al.*, 2000). Les interactions entre bactéries au sein du biofilm et celles avec l'environnement du biofilm conduisent aux structures de biofilms complexes, hétérogènes et évolutives. Ainsi, certains biofilms présentent une sorte de stratification des populations bactériennes, par exemple dans le cas d'un milieu aérobie où les bactéries aérobies se trouvent en surface du biofilm et les espèces anaérobies en profondeur dans le biofilm (Lynch and Hobbie, 1988; de Beer *et al.*, 1994; Stewart, 2012).

Il existe des phénomènes de communication chimique entre les cellules bactériennes, fondés sur le phénomène du « *quorum sensing* » : chaque cellule produit des molécules libérées dans le milieu qui, lorsqu'elles se trouvent à une concentration seuil, déclenchent une réaction de la communauté. Cela peut donner des renseignements tels que la taille de la population, la phase de croissance, *etc*. De tels phénomènes de communication chimique jouent un rôle important dans les processus d'attachement et de détachement (Davies *et al.*, 1998). Les microorganismes exploitent ces communications intercellulaires afin de s'adapter à un environnement versatile. Du fait de la proximité entre les cellules, les biofilms constituent un environnement propice pour le transfert de gènes entre bactéries (dit

horizontal). Cela permet à certaines espèces de la communauté bactérienne de gagner des gènes leur permettant d'évoluer en fonction des conditions environnementales, comme par exemple des gènes de résistance aux antibiotiques (Davies, 1994; Ghigo, 2001).

Cette structure bactérienne peut atteindre des dimensions importantes : bien que les bactéries aient des diamètres de l'ordre du micromètre, les chaines d'exopolysaccharides produites par celles-ci peuvent avoir des longueurs de plusieurs micromètres. C'est ainsi que les biofilms peuvent être d'épaisseur millimétriques (Charbonneau *et al.*, 2006; Briandet *et al.*, 2012).

I.7.5. Utilisation biotechnologique des biofilms

La capacité de formation de biofilms mono-espèces par les microorganismes (Gross *et al.*, 2007), la résistance accrue des cellules sous forme de biofilm dans des environnements défavorables et leur capacité à se régénérer (Rosche *et al.*, 2009) sont autant d'intérêts et d'attraits pour l'utilisation de biofilms en biotechnologie. Les biofilms ont été envisagés pour la bioremédiation (Singh *et al.*, 2006). En effet, ils peuvent servir au traitement des eaux usées (Massol-Deya *et al.*, 1995), à la nitrification des sols (De Boer *et al.*, 1991), à la dégradation de polluants comme le benzaldéhyde (Li *et al.*, 2006) et le styrène (Gross *et al.*, 2007) grâce à leur activité métabolique couplée à leur résistance accrue aux substances toxiques.

De nombreuses études ont eu pour but la production de composés d'intérêt par des bioréacteurs permettant la culture de bactéries en biofilms. Les exemples sont souvent limités à l'échelle de laboratoire, mais ont démontré un réel potentiel. La production d'alcools est l'une des principales perspectives, notamment parce que les biofilms sont moins intoxiqués par ses produits métaboliques. Par exemple, la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été utilisée en bioréacteur à biofilm pour produire de l'éthanol à partir de résidus de canne à sucre (Tyagi and Ghose, 1982). De même, une autre étude a permis de produire de l'éthanol à coût réduit en fermentant des déchets agricoles de soja et d'avoine (Demirci *et al.*, 1997). De meilleurs rendements ont été obtenus avec l'utilisation de *Zymomonas mobilis*, qui a utilisé comme substrats le glucose (Kunduru and Pometto, 1996) et l'amidon (Weuster-Botz *et al.*, 1993). Globalement, la fermentation de glucides en

bioréacteurs à biofilm donne de meilleurs taux de production d'éthanol qu'avec des cellules planctoniques (Bland *et al.*, 1982; Tyagi and Ghose, 1982; Kunduru and Pometto, 1996; Maksimova, 2014).
D'autres productions d'alcool ont été envisagées, par exemple de butane-2,3-diol à partir de glucose et de lactosérum par des biofilms d'entérobactéries (Maddox *et al.*, 1988; Qureshi *et al.*, 2005) ou encore de butanol (Qureshi and Maddox, 1988; Qureshi *et al.*, 2000).

La synthèse d'acides organiques est aussi une potentielle utilisation des biofilms dans l'industrie. Par exemple, de l'acide lactique et de l'acide fumarique ont été produits par le *fungi* alimentaire *Rhizopus oryzae* en biofilm à partir d'amidon et de glucose (Tay and Yang, 2002; Cao *et al.*, 1996). L'acide lactique a également été produit par un biofilm mixte de *Lactobacillus casei* et de *Streptomyces viridosporus* (Demirci *et al.*, 1993).
L'exemple le plus abouti est la production de vinaigre à échelle industrielle, de 60 000 l. Un biofilm mixte de bactéries acétiques, *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus* et *Gluconobacter oxydans*, sur des copeaux de hêtre est utilisé pour convertir jusqu'à 90% de l'éthanol en acide acétique dans un bioréacteur en continu (Crueger and Crueger, 2006). Il est exploité par la société allemande Frings, qui aurait installé 300 bioréacteurs de ce type de par le monde.
Malgré ces succès, la principale limite de l'utilisation de bioréacteurs à biofilm repose sur la maitrise de la fluctuation de l'activité et sur la reproductibilité. Ainsi des processus en continu pourront être exploités à plus grande échelle par l'industrie qui nécessite une activité constante sur le long terme (Rosche *et al.*, 2009).

I.7.6. Les biofilms dans le vin

Le vin est un environnement stressant donc favorable à la formation de biofilms. Il a été remarqué que la levure fermentaire *Saccharomyces cerevisiae* et la levure d'altération *Brettanomyces bruxellensis* pouvaient former des biofilms dans le vin. Certaines souches de *S. cerevisiae* forment des biofilms à l'interface air-vin, appelés voiles, par floculation. Cet agglomération possède une matrice d'EPS qui protège les cellules du stress éthanolique (Espinazo-Romeu *et al.*, 2008; Smukalla *et al.*, 2008). Dans une autre étude, la plupart des souches testées de *Brettanomyces bruxellensis* étaient capable de former des biofilms sur une surface. Ce phénomène pourrait être en relation avec les contaminations fréquentes du matériel vinicole par cette levure indésirable (Joseph *et al.*, 2007).

La formation de biofilm mixtes levure-bactérie lactique est possible, elle a été mis en évidence par une coculture de *Saccharomyces cerevisiae* et *Lactobacillus casei* (Kawarai *et al.*, 2007).

Dans d'autres milieux, on a pu démontrer que chez une bactérie lactique, *Lactobacillus plantarum*, la formation de biofilm améliore la résistance au stress de l'éthanol (jusqu'à 40%) et au stress acide (jusqu'à 11% d'acide acétique). En observant les cellules au microscope électronique à balayage, les chercheurs ont remarqué que face à ces stress les cellules planctoniques sont très endommagées, alors que les cellules organisées en biofilm résistent mieux (Kubota *et al.*, 2008).

La question de la réponse de *O. oeni* aux conditions difficiles du vin via un phénotype biofilm se pose. A ce jour, deux études ont étudié la résistance de *O. oeni* adhérée sur lame d'acier aux bactériocines d'autres bactéries lactiques du vin (Nel *et al.*, 2002; Rojo-Bezares *et al.*, 2007). Seule l'étape d'adhésion a été prise en compte dans ces études et le biofilm de *O. oeni* n'a jamais été caractérisé.

La production d'exopolysaccharides par *O. oeni* sous forme planctonique a été étudiée. Quarante gènes impliqués dans leur production ont été identifiés (Dimopoulou *et al.*, 2012). L'expression de ces gènes est très variable en fonction des souches (Dimopoulou *et al.*, 2014). Plusieurs de ces gènes sont regroupés dans deux opérons, *eps1* et *eps2*, eux aussi variables suivant les souches. Les exopolysaccharides produits ont été caractérisés, selon les souches. Certains sont des homopolysaccharides de type β-glucane (glucose comme monomère), d'autres

sont des hétéropolysaccharides ayant comme monomères du galactose, glucose et rhamnose ou du glucose et mannose (Dimopoulou *et al.*, 2015).

La capacité de *O. oeni* à adhérer à un support, à produire des EPS et à résister au stress du vin, sont autant d'indices laissant présumer de sa capacité à former des biofilms dans le vin.

II) Objectifs

La vinification comprend plusieurs étapes dont la principale est la fermentation alcoolique. Cette fermentation, consistant à transformer des sucres du raisin en alcool, est réalisée par des levures qui libèrent par la même occasion des arômes fermentaires contribuant au bouquet aromatique du vin. La fermentation malolactique, capitale pour certains vins, est réalisée par la suite par des bactéries lactiques principalement de l'espèce *Oenococcus oeni*. Cette étape consiste à désacidifier le vin en convertissant l'acide malique en acide lactique, ce qui contribue à améliorer la qualité du vin. Cette seconde fermentation peut être réalisée en fût de chêne. L'élevage en fût permet au vin de gagner des arômes boisés.

Le vin est une solution chimique complexe présentant différents paramètres tels qu'une forte acidité, la présence d'éthanol et de sulfites : cet environnement est difficile pour la survie des microorganismes. Pour persister dans ces conditions, *O. oeni* actionne des mécanismes intracellulaires de résistance au stress tels que la synthèse de protéines de stress ou la modification de sa composition membranaire. De nombreuses études ont permis de caractériser ces mécanismes de résistance. Cependant aucune étude n'a porté sur les modes de culture de *O. oeni* et notamment sur sa capacité à se développer en biofilm, bien que cette forme de vie soit décrite pour la résistance accrue qu'elle confère aux cellules. En effet, les cellules en biofilm sont abritées dans une matrice de polymères qu'elles produisent et bénéficient de mécanismes biochimiques complexes favorisant leur survie. Dans ce contexte, les objectifs de la thèse étaient les suivants :

1. Caractériser le biofilm de *O. oeni*

Le premier objectif de ce travail était de déterminer si la bactérie *O. oeni* était capable de se développer en biofilm sur différents supports cohérents avec les matériaux utilisés en vinification. Ainsi la quantification des biofilms de *O. oeni* développés sur des coupons d'acier et de bois a été couplée à son observation en microscopie électronique à balayage (MEB). Un suivi en *time-lapse* du développement de ce biofilm a été réalisé par microscopie confocale à balayage laser, technique permettant de visualiser la structure tridimensionnelle du biofilm.

Afin d'analyser chimiquement la composition de la matrice du biofilm, les substances exopolymériques (EPS) ont été extraites et quantifiées. La nature

chimique des EPS (saccharidique, protéique) a alors été déterminée par l'analyse du spectre infra-rouge couplée à dosages colorimétriques.

2. Analyser les propriétés technologiques de ce biofilm

Dans l'objectif d'utiliser le biofilm pour réaliser la fermentation malolactique, deux propriétés technologiques ont été étudiées à savoir sa résistance au stress et sa capacité à décarboxyler l'acide malique.

La résistance du biofilm au stress du vin a été évaluée par suivi de la viabilité des cellules, en comparaison avec des cellules planctoniques. Afin d'essayer d'élucider les mécanismes mis en jeu pour aboutir à ce phénotype, l'expression de gènes impliqués dans la résistance au stress ainsi que dans la production d'EPS a été étudiée.

La capacité fermentaire du biofilm a été évaluée en suivant la fermentation malolactique dans le vin par dosage enzymatique. Son efficacité fermentaire a été mesurée en comparaison avec celle de cellules planctoniques adaptées.

3. Evaluer l'impact du biofilm de *O. oeni* dans les échanges bois-vin

Afin d'analyser l'impact potentiel du développement de bactéries à l'interface bois-vin, le processus de fermentation malolactique réalisée en fût a été reconstitué en laboratoire. Trois types de vin ont ainsi pu être comparés : un vin fermenté par des bactéries planctoniques en fût, un vin élevé en fût sans activité fermentaire ainsi qu'un vin fermenté par biofilm en fût. Une analyse chromatographique des arômes boisés du vin a été réalisée, pour mesurer l'influence de la présence d'un tel biofilm à l'interface des échanges bois-vin lors de l'élevage en fût pendant et après fermentation malolactique. L'activité enzymatique des bactéries et l'effet couvrant du biofilm, pouvant moduler les transferts de molécules aromatiques dans le vin, ont pu être étudiés.

III) Résultats

III.1. "Using *Oenococcus oeni* biofilm to control malolactic fermentation and modulate the organoleptic qualities of wine."

III.1.1. Introduction

La fermentation malolactique, seconde fermentation réalisée pour certains vins, permet une désacidification du vin et une amélioration de sa qualité. Elle est réalisée par des bactéries lactiques principalement de l'espèce *Oenococcus oeni* : cette espèce est privilégiée pour son efficacité et ses intérêts organoleptiques (Versari *et al.*, 1999). Or, cette fermentation est réalisée dans un milieu stressant, le vin. Il contient notamment de l'éthanol, un pH faible et des sulfites. La température dans les chais est souvent basse. C'est pourquoi, ce milieu est peu propice à la croissance de bactéries (Guzzo and Desroche, 2009; Guzzo, 2011). La capacité de *O. oeni* à résister au stress du vin et à garder son activité fermentaire est un sujet d'intérêt majeur.

Nous avons échantillonné des fûts de chêne ayant été utilisés pour réaliser la fermentation malolactique (FML) puis l'élevage du vin pendant sept mois. Les prélèvements ont montré que *O. oeni* adhère au bois et est capable de persister plusieurs mois dans le milieu stressant qu'est le vin.

Dans la majorité des habitats naturels, les microorganismes se développent attachés à un support, au sein d'un écosystème structuré appelé biofilm (Costerton *et al.*, 1995). Sous cette forme de vie, les cellules bénéficient d'une résistance accrue au stress (Kubota *et al.*, 2008; Coenye, 2010).

Ces deux propriétés que sont l'adhésion à une surface ainsi que la résistance au stress ont donc été étudiées pour *O. oeni.* Le travail effectué a dans un premier temps fait l'objet d'un dépôt de brevet « Utilisation de biofilms bactériens en œnologie », en France et à l'international. Les revendications principales portent sur un « procédé de préparation d'une boisson fermentée comprenant le déclenchement de la fermentation par inoculation de la boisson fermentescible avec des bactéries fermentaires sous forme de biofilm ».

Des cultures sur des matériaux utilisés dans la vinification, à savoir l'acier inoxydable et le bois, ont été réalisées. Des observations par microscopie électronique à balayage ont ainsi permis de mettre en évidence la formation de biofilms par *O. oeni*. Puis, nous avons évalué la capacité de résistance au stress du

vin de *O. oeni* sous forme de biofilm, en comparaison avec les cellules planctoniques.

Des travaux précédents ont montré que les cellules de *P. aeruginosa* exprimaient davantage des gènes de stress au sein du biofilm, lui conférant ainsi une résistance accrue (Coenye, 2010). Nous avons donc étudié l'expression des gènes marqueurs du stress chez *O. oeni*, sous sa forme planctonique et en biofilm ainsi que les gènes impliqués dans la production d'EPS pour connaître l'origine de la résistance au stress du biofilm de *O. oeni*.

En outre, l'intérêt pour le biofilm est croissant dans les industries agroalimentaires et biotechnologiques, en raison de la conservation de son activité métabolique en milieu stressant (Rosche *et al.*, 2009). La capacité fermentaire du biofilm de *O. oeni* dans le vin a donc été évaluée par comparaison avec celle des cellules planctoniques.

Enfin, des études ont montré que l'activité métabolique de *O. oeni* durant la FML réalisée dans un contenant en chêne, permet d'accentuer la libération d'arômes du bois dans le vin (Bloem *et al.*, 2008). Dans ce contexte, l'influence d'un biofilm de *O. oeni* sur les transferts de composés aromatiques entre le bois et le vin a donc été analysée par chromatographie (HS-SPME-GC-MS).

Cette étude est la première caractérisation du biofilm de *O. oeni*, de sa résistance au stress du vin et de son potentiel fermentaire. Les résultats obtenus sont présentés dans cette partie sous forme d'un article soumis à *Frontiers in Microbiology* et de résultats complémentaires.

III.1.2. Article 1

USING *OENOCOCCUS OENI* BIOFILM TO CONTROL MALOLACTIC FERMENTATION AND MODULATE THE ORGANOLEPTIC QUALITIES OF WINE

Using *Oenococcus oeni* biofilm to control malolactic fermentation and modulate the organoleptic qualities of wine

Bastard Alexandre[1], Coelho Christian[2], Briandet Romain[3], Canette Alexis[3], Gougeon Régis[2], Alexandre Hervé[1], Guzzo Jean[1], Weidmann Stéphanie[1]*

[1]UMR PAM – équipe VALMIS, IUVV, AgroSup Dijon - Université de Bourgogne, Dijon, France

[2]UMR PAM – équipe PAPC, IUVV, AgroSup Dijon - Université de Bourgogne, Dijon, France

[3]Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

*** Correspondence:** Dr. Stéphanie Weidmann, UMR PAM – équipe VALMIS, IUVV, 1 rue Claude Ladrey 21078 Dijon cedex, France
stephanie.weidmann@u-bourgogne.fr

Keywords: malolactic fermentation, *Oenococcus oeni*, biofilm, wine, oak

Abstract

The winemaking process involves alcoholic fermentation of must, often followed by malolactic fermentation. The latter, mainly carried out by the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*, is used to improve wine quality when acidity reduction is required. Moreover, it prevents microbial spoilage and improves the wine's organoleptic profile. In this study, sampling of wine oak barrels after malolactic fermentation and aging showed that *O. oeni* is able to resist several months in harsh wine conditions when adhered on oak. Since biofilm is a prevailing microbial lifestyle in natural environments, the capacity of *O. oeni* to form biofilms was investigated on winemaking material such as stainless steel and oak chips.

Scanning Electron Microscopy showed that *O. oeni* was able to adhere to these surfaces and form spatially organized microcolonies embedded in extracellular substances. To assess the competitive advantage of this mode of life in wine, properties of biofilm and planktonic cells were compared after inoculation in a fermented must (pH 3.5 or 3.2 and 12% ethanol). The results indicated that biofilm

culture of *O. oeni* conferred (i) increased tolerance to wine stress, and (ii) functional performance with effective malolactic activities. As oak is commonly used in wine aging, we focused on *O. oeni* biofilm on this material and its contribution to wine organoleptic properties, such as color and flavor description. Analytical chromatography results reveal that *O. oeni* biofilm developed on oak can modulate the wood-wine transfer of volatile aromatic compounds during malolactic fermentation and aging, compared to the same wine inoculated with adapted planktonic cells. This work characterizes the use of *O. oeni* biofilm in winemaking for the first time and could lead to new enological product developments for controlling malolactic fermentation.

Introduction

The winemaking process involves the alcoholic fermentation (AF) of must performed by yeast, often followed by malolactic fermentation (MLF) performed by lactic acid bacteria (LAB). MLF is involved in the quality of red, white and sparkling wines, for which it is necessary to reduce acidity (cool-climate regions). MLF also prevents microbial spoilage through nutrient consumption (sugars, malic acid) and the release of aromatic compounds which improves the organoleptic profile of wine (Bauer and Dicks, 2004). MLF is not in itself a fermentation process but rather the decarboxylation of the L-malate (di-acid) into L-lactate (mono-acid) and CO_2 by the malolactic enzyme (MLE). This reaction allows cells to regulate their internal pH and gain energy through the proton gradient across cell membranes (Versari *et al.*, 1999).

Several LAB genera including *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Oenococcus* are able to decarboxylate L-malate. Of the latter *O. oeni* appears best able to maintain its metabolism in an environment with low pH (ca. 3.5) and the presence of SO_2 (Vuuren and Dicks, 1993; Lonvaud-Funel, 1999). This bacterium can convert malic acid in a one-step reaction (Lonvaud-Funel and Strasser de Saad, 1982; Salou *et al.*, 1994; Kourkoutas *et al.*, 2004). Furthermore, MLF driven by *O. oeni* leads to improved organoleptic properties and microbiological stability of wine, through residual sugar consumption, bacterial fermentation of co-products and lactic acid production (Nedovic *et al.*, 2000; Lonvaud-Funel, 1995). However,

61 despite the efficiency of *O. oeni*, spontaneous MLF is difficult to predict. Several
62 physicochemical parameters of wine such as ethanol, low pH, and the presence of
63 sulfite can delay MLF. Winemakers increasingly need to control their production,
64 therefore the use of commercial starter cultures to induce MLF has become
65 common practice. However, because of the rapid loss of cell viability after
66 inoculation, the result is not always successful (Bauer and Dicks, 2004). Other
67 solutions have been sought. For instance, the gene encoding the malolactic enzyme
68 of *Oenococcus oeni* was expressed in genetically modified microorganisms such as
69 *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae*, but few countries allow
70 GMOs for food processing purposes (Schümann *et al.*, 2012). Likewise, the yeast
71 *Schizosaccharomyces pombe* was studied since it can convert malic acid through
72 malo-ethanolic fermentation. Nevertheless, it increases ethanol levels and provides
73 no beneficial aspects for MLF (Ansanay *et al.*, 1996; Versari *et al.*, 1999). It has
74 been shown that MLF does not necessarily require cell growth: non-proliferating
75 cells of *O. oeni* at 10^6 to 10^7 CFU/ml can decarboxylate malic acid (Lafon-
76 Lafourcade, 1970). These results suggest that, as described in previous works for
77 other alcoholic fermented beverages, surface-associated cells could be used to
78 perform MLF (Nedovic *et al.*, 2000; Kourkoutas *et al.*, 2004; Bányik *et al.*, 2005;
79 Nedović *et al.*, 2015; Genisheva *et al.*, 2014a, 2014b).

80 The capacity of *O. oeni* to compete in a harsh environment such as wine is due to
81 elaborate survival strategies of which we can mention the adjustment of membrane
82 stability by changing the ratio of saturated-unsaturated fatty acids (Grandvalet *et*
83 *al.*, 2008; Maitre *et al.*, 2014), and the synthesis of stress proteins (Jobin *et al.*, 1997;
84 Guzzo *et al.*, 2000; Beltramo *et al.*, 2006; Maitre *et al.*, 2012). In addition, *O. oeni*
85 can adapt to ethanol stress, especially via the synthesis of the small heat shock
86 protein Lo18 (Jobin *et al.*, 1997; Coucheney *et al.*, 2005; Maitre *et al.*, 2012, 2014).
87 Biofilm formation is another way to resist environmental stresses. This process has
88 been widely described for bacteria, since it represents the dominant mode of
89 microbial existence (Costerton *et al.*, 1995). A biofilm is a community of
90 microorganisms bound together in close proximity within their own protecting exo-
91 polymeric matrix involving metabolic cross-feeding, cell–cell interactions (Davey
92 and O'toole, 2000; Hojo *et al.*, 2009) and chemical and physical resistance. Due to
93 this specific organization, the biofilm is considered as a whole (Katharios-

Lanwermeyer *et al.*, 2014). The biofilm formation of the lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* enhances stress resistance to acetic acid (up to 11% v/v) and ethanol (up to 40% v/v). Indeed, using scanning electron microscopy (SEM) analysis of cell surfaces, it has been observed that these treatments severely damage planktonic cells whereas biofilm cells were only slightly damaged (Kubota *et al.*, 2008). Many examples of transformation processes using biofilm on the laboratory scale have been documented, such as wastewater treatment and ethanol production, but so far the production of acetic acid by acetic acid bacteria biofilm is the only industrial application of biofilms for transformation purposes (Maksimova, 2014).

Up to now, very little attention has been given to *O. oeni* biofilm formation, and only its bacteriocin resistance properties have been reported (Nel *et al.*, 2002). However, a connection has been reported between *O. oeni* EPS production and increased survival in wine (Dimopoulou *et al.*, 2015).

In this study, we investigated the involvement of *O. oeni* biofilm formation in cell resistance to wine stress. First, the spatial organization of *O. oeni* biofilm was characterized for the first time on different surfaces. Then, we investigated the survival and technological advantages associated with the biofilm mode of life by studying biofilm cell behavior in wine. Finally, as oak is commonly used in winemaking and especially aging material, we explored the impact of *O. oeni* biofilm on oak surfaces on the color and aromatic profile of wine.

Materials and Methods

Bacteria strains and growth media

This study was conducted using two strains: a sequenced reference strain ATCC–BAA 1163 (red wine, France, Aquitaine) and an enological strain SABO11 (red wine, South Africa). Bacteria were grown in MRS modified medium containing: MRS Broth conda® 50 g/l; fructose 10 g/l; L-malic acid 4 g/l. The pH was adjusted to 4.8 (NaOH concentrated solution). For solid MRSm medium, 25g/l agar was added.

Wine medium was obtained by the fermentation of a commercial white grape juice by commercial yeast (*Saccharomyces cerevisiae* Fermol PB 2023 (Spindal AEB Group). The outcome was standardized at 12% ethanol, pH3.2 or 3.5, fermentable sugars 2 g/l and L-malic acid 4 g/l.

Aligoté white wine from the 2014 vintage elaborated at the *Domaine viticole de l'Université de Bourgogne, Marsannay, France* was used for aroma analysis. This wine finished its alcoholic fermentation with the following enological parameters: 12% ethanol, pH 3.5 and L-malic acid 3.2 g/l.

All the media were sterilized by filtration (0.2 µm cut-off). Cultures were incubated in 28°C 10% CO_2 stove. All the assays were performed in triplicate.

Biofilm formation conditions

On stainless steel chips

Each 25×25 mm stainless-steel chip (Goodfellow) was immersed in 20 ml inoculated MRSm (2.10^7 CFU/ml). After incubation for 3 days, 7 days and 14 days (with a medium turnover every 3.5 days), the plate was rinsed twice with NaCl 150 mM, then placed in 10 ml saline solution with 700 mg of 0.1 mm diameter glass beads. The system was vortexed at maximal power for 2 minutes to tear the cells out. Then, the suspended cells were counted on a solid MRSm medium (following serial dilutions). It was previously verified that the bead treatments had torn all the adhered cells away and did not cause cell death.

The two-week-old biofilm was detached from the steel plate into the wine so that the surface could not protect cells from stress. This solution was sampled immediately (control) and after 1h, 4h and 24h.

On oak chips

The oak wood used in this study was characterized by a previous work (Duval *et al.*, 2013). The 25×25 mm oak chips were immersed in 20 ml of inoculated MRSm (2.10^7 CFU/ml). The medium was renewed every 3 days until the end of incubation (1, 2 or 4 weeks). To assess the biomass, the chips were rinsed twice with saline solution then placed in 10 ml of saline where the biofilm was brushed with a toothbrush (2 min per side). The cell concentration of the saline solution was counted on a solid MRSm medium (following serial dilutions).

To analyze biofilm survival in wine, the chips were rinsed twice with saline solution, transferred to wine and incubated for 1, 4, 7, 14 or 21 days. Their biomasses were counted as described above. All the assays were performed in triplicate.

On polystyrene microplate

250 µl of a mid-exponential phase culture (10^9 CFU/ml) was added to the wells of a polystyrene 96-well microtiter plate (Greiner Bio-one, France) with a µclear® base (Polystyrene, thickness of 190 µm ±10%) which allowed high resolution confocal imaging. After one hour of adhesion at 30°C, the wells were refilled with 250 µl MRSm.

Confocal laser scanning microscopy

Biofilms were fluorescently tagged by adding FM4-64 fluorescent membrane marker (Life Technologies, USA) in fresh medium according to the manufacturer's instructions. The plate was incubated for 40 hours at 30°C and mounted on the motorized stage of an inverted confocal microscope (Leica SP8 AOBS, LEICA Microsystems, Germany) at the INRA-MIMA2 imaging platform (www.jouy.inra.fr/mima2). Observations were performed using a 63X/1.2 N.A. water immersion objective lens (300 µm working distance). Biofilms were scanned using an argon gas laser with the 514 nm line (output power at 30%, AOTF at 10%) and the fluorescence emitted was recorded from 534 to 800 nm using a PMT

detector with a gain of 750 V. Single 2D sections of biofilms and 3D acquisitions were acquired at 600 Hz scan speed with a 512 x 512 image definition and a z-step of 1 µm between each xy image for a z-stack. Time-lapse automated acquisitions were performed with the LAS X High Content Screening A Matrix Screener module. Three-dimensional projections of biofilm structure were then reconstructed using the blend mode of the Easy 3D function of the IMARIS 7.7.2 software (Bitplane, Switzerland). Biofilm biovolumes (μm^3) were extracted from confocal image series using a homemade ICY routine as described previously (Sanchez-Vizuete *et al.*, 2015).

Scanning Electron Microscopy

Cells were fixed on stainless steel by a solution of 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 for 1 hour at 4°C. The samples were then washed three times with phosphate buffer for 20 minutes at room temperature. Dehydration was done by successive baths in increasing ethanol content (70, 90, 100%), then three times for 10 minutes each in successive baths of ethanol-acetone solution (70:30, 50:50, 30:70, 100) and air-dried. Afterwards, the samples were coated with a thin carbon layer using a CRESSINGTON 308R and observed with a JEOL JSM 7600F scanning electron microscope (JEOL, Ltd.). SEM was performed at 5 kV and the samples were observed at a working distance of 14.9 mm.

Malolactic conversion monitoring

MLF monitoring was performed according to the manufacturer's instructions using the "L-Malic acid Cat No. 020" kit from Biosentec.

Gene expression analysis

RNA extraction and cDNA preparation

Planktonic cells were sampled at the early stationary phase; 2-week old biofilms. Cells were centrifuged (8,000 *g*, 10 min) before being resuspended in 1 ml of Tri-reagent (Sigma) and disrupted with glass beads (100 µm) in a Precellys homogenizer (Bertin) for 6 series of 30 s at 6500 rpm. Nucleic acids were extracted in 0.2 volume of chloroform and purified by precipitation in 1 volume of isopropanol. RNA pellets were dried and resuspended in 30 µl of RNase-free water. Nucleic acid concentrations were calculated by measuring absorbance at 260 nm

using an Infinite 200 PRO spectrophotometer (Tecan). Before reverse transcription (RT), 2 µg of total RNA were treated with 2 U of DNase (Invitrogen), as described by the manufacturer. The absence of chromosomal DNA contamination was checked by real-time PCR. cDNAs were then synthesized by using an iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) as recommended.

Real-time PCR experiment

Real-time PCR as described by Desroche *et al*. (Desroche *et al.*, 2005) was used to quantify mRNA levels. Gene specific primers (Table 1) were designed to amplify the cDNAs of the transcripts of *ldhD, gyrA, hsp18, clpL1, cfa, groEL, levO, wobB, wobO, dsrO, mleA* with the Bio-Rad SYBR green kit in a Bio-Rad I-Cycler. This method was used to analyze their mRNA levels during planktonic growth at mid-exponential phase (10^9 CFU/ml) and 2-weeks of biofilm development on stainless-steel chips (2.10^6 CFU/cm^2) with or without wine stress (pH 3.5; 12% ethanol). The results were analyzed by using a comparative critical threshold method (ΔΔCT) in which the amount of targeted mRNA was first normalized using both the specific mRNA standard and then compared to a calibrator condition (Desroche *et al.*, 2005). *ldh* and *gyrA* genes encoding respectively for a glyceraldheyde-3-phosphate dehydrogenase and a gyrase were selected as internal standards since their transcript levels were stable under the conditions tested. mRNA quantification was performed in triplicate from total RNA extracted from three independent cultures.

Aromatic interactions between oak, wine and *Oenococcus oeni* assessed by HS-SPME-GC-MS.

HS-SPME-GC-MS was carried out using the method of Duval *et al.,* (2013). Five mL of one-month old wine was placed in a 20 mL sealed headspace vial (Supelco, Bellefonte, USA). Headspace vials were then placed in the agitator/incubator of an automatic headspace sampler (GERSTEL MPS 2, Gerstel Inc., Mülheim an der Ruhr, Germany) and incubated at 70°C for 10 min (incubation time) in order to promote volatile compounds in the headspace. Extractions were performed by immersing a DVB–CAR–PDMS fiber in the headspace for 60 min (extraction time). After each extraction, the extracted compounds were desorbed at 260°C for 7 min in the injection port of an HP 6890GC equipped with an MSD 5973 mass detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Calibration solutions were

processed in the same way using 5 mL of the wine matrix mixed with target compounds. Volatile compounds (eugenol, guaiacol, furfural, vanillin, cis- and trans-whisky lactone) were purchased from Sigma-Aldrich and used as received. We used 3,4-dimethylphenol as internal standard at 10 mg/l in each sample. Using highly aroma-concentrated calibration samples either alone or in mixture, we checked that there were no competition effects for the fiber between aromas. Chromatographic analyses were performed in biological triplicate and technical duplicate.

Chromatographic conditions

The oven program started at an initial temperature of 40°C for 3 min. The temperature was then increased at a rate of 7°C min^{-1} up to 230°C. A 0.8 mm I.D. liner was used and maintained at 270°C, splitless injection mode. The carrier gas was helium at 1.0 $ml.min^{-1}$ (99.996%). Ionization was performed by electronic impact (EI), with the electron multiplier set at 1600 eV. The temperatures used were 200°C for the trap, 60°C for the manifold, and 280°C for the transfer line. The compounds were quantified in selected ion storage (SIS) mode, by selecting the appropriate ion masses for each compound: furfural (95 + 96), guaiacol (109 + 124), whisky lactone (99), eugenol (164), 3,4-dimethylphenol (107+122), vanillin (151 + 152).

Color measurements

Color absorbance measurements and data acquisition and analysis were performed with a Konica Minolta CM-5 spectrophotometer using optical glass precision cells with a 50 mm path length (Hellma Analytics) and scanned over the range 740-360 nm (visible range). Black and white calibrations were performed using a standard black plate and an empty glass cell, respectively. Color was recorded using the CIE-L* a* b* uniform color space (CIE-Lab), using three dimensions (L*, a*, b*) of the Hunter color scale, where L* ranges from 0 for black to +100 for white, a* ranges from -50 for green to +50 for red, and b* ranges from -50 for blue to +50 for yellow.

Statistical analysis

Each experiment was carried out in triplicate. Error bars represent standard deviations. Student t-test and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's HSD (honest significant difference) post hoc test were used to analyze

268 significant differences between groups using XLSTAT Version 2014, Addinsoft;
269 $P = 0.05$. Principal Component Analysis of data was carried out with the same
270 software.

Table 1: Primers used for gene expression analysis

Target gene	Gene function	Forward primer (5′→3′)	Reverse primer (5′→3′)	Amplicon length (bp)	Reference
cfa	Cyclopropane fatty acid synthase	GGTATTACATTGAGCGAGGAG	CGTCTTTGAGATCACGATAATCC	113	Beltramo 2006
clpL1	Clp ATPase protein	ATTATAATGACGATCCCTTCGT	GGATCCCTGAACCGTTATTTGCTTGTTG	163	Desroche 2005
dsrO	Glycoside-hydrolase	GGTCGCTGCTGCTTAATTTC	CCGTGGTGTTTTGACATCAG	137	This study
groEL	Heat shock chaperone	TCCCACGAAGTTGAGGATTC	CGATACCTTTGGACTCTTCA	145	This study
gyrA	Gyrase α subunit	CAAGGACTCATAGATTGCCGAA	CGCCCGACAAACCGCATAAA	95	Desroche 2005
hsp18	sHsp Lo18	CGGTATCAGGAGTTTTGAGTTC	CGTAGTAACTGCGGGAGTAATTC	102	Beltramo 2006
ldhD	D-lactate dehydrogenase	GCCGCAGTAAAGAACTTGATG	TGCCGACAACACCAACTGTTT	102	Desroche 2005
mleA	Malolactic enzyme	CCGACAATTGCTGATACAATTGAA	GGCATCAGAAACGACCAGCAG	156	Beltramo 2006
levO	Fructansucrase	AATCAAGATACCGCCAGTGC	CCGAACCTGACCATTGTTCT	109	This study
wobB	Rhamnosyl-transferase	TGGTACAAATCGACCGACAA	AAAGTCCGTGATTGGTTTGC	75	This study
wobO	Pyruvyltransferase	TGTCGAATGGAACATGAACG	TGATCGTCTCGATGATTGGA	62	This study

Results

Adherent cells of *O. oeni* were detected on natural oak barrel

To investigate the presence of surface-associated microorganisms on wine equipment, natural oak barrels were sampled. They contained a *pinot noir* red wine aged for 8 months after alcoholic fermentation, with malolactic fermentation occurring in the 7th month. Sample cultures showed that yeasts and bacteria adhered on oak. The presence of *Oenococcus oeni* was confirmed by 16S DNA sequencing (data not shown), suggesting that microorganisms and particularly lactic acid bacteria, were able to withstand wine stress (low pH, ethanol, few nutrients) on this surface.

O. oeni can form biofilm on different surfaces

Stainless steel tanks and oak barrels are used in winemaking, therefore both surfaces were used to characterize *O. oeni* biofilm development. An *O. oeni* ATCC BAA-1163 population grown on a stainless steel chip was numbered after 3 days, 1 week and 2 weeks, respectively (Fig. 1A). On stainless steel the biofilm reached 4.10^5 CFU/cm^2 in 3 days. At 1 week, the biofilm almost reached a population of 10^6 CFU/cm^2 and then exceeded it after 2 weeks (2.10^6 CFU/cm^2) (Fig. 1A).

On oak, biofilm cells were around 60-fold more numerous than on steel with a population reaching 2.10^7 CFU/cm^2 and 10^8 CFU/cm^2 respectively at 3 days and 2 weeks (Fig. 1B). Biofilm growth slowed down from the second week and remained constant.

The difference between biofilm populations on steel and oak was confirmed by SEM observation (Fig. 2A-B). Although it did not cover the entire surface, the biofilm on oak appeared thicker, wider and more mature. Early stages of biofilm development were observed at each time on steel (3 days to 2 weeks), showing cell adhesion and microcolonies. Cells adhered, flattened, produced exopolymeric substances (EPS) that bonded them to the surface, and then eventually organized themselves in microcolonies (Fig. 2A). On oak, there was an observable transition between the 1-week stage and the 2-week growth stage. Indeed, at this point, most of the cells appeared to belong to a larger structure and merged in a matrix (Fig. 2B).

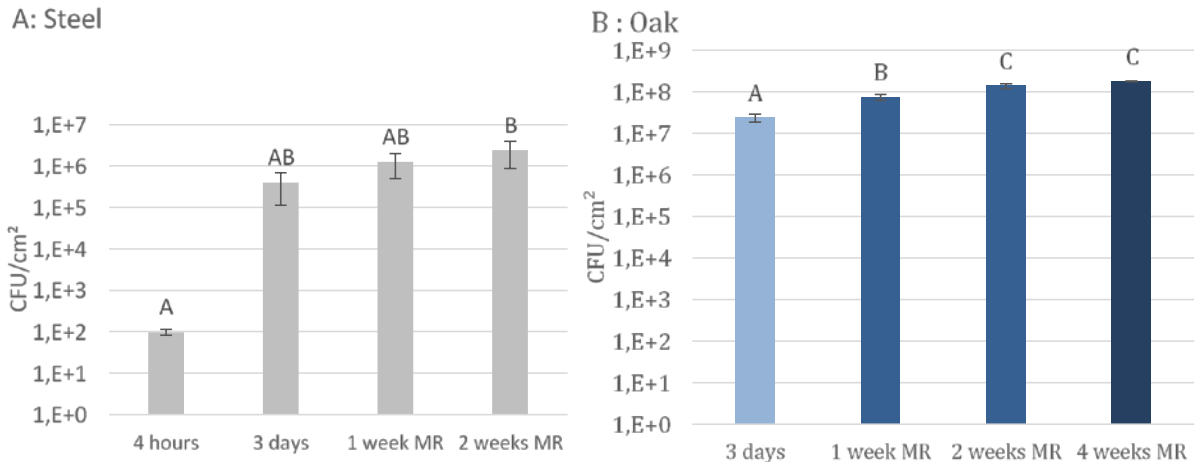


Figure 1: Adhesion (4 h) and biofilm growth (3 day, 1 week, 2 weeks) on stainless steel (A) or oak (B) of O. oeni ATCC BAA-1163 in MRSm renewed twice a week (MR). Biomass is expressed in CFU/cm². Error bars represent the standard deviation of three biological replicates, different letter means significant difference $P < 0.05$.

This matrix was observable as was a polymer that attached the cells to the surface (Fig. 2A: Steel, 2 weeks, x35 000 and Fig. 2B: oak, 2 weeks, x35 000), bonded them together (Fig. 2B: oak, 1 week, x35 000), and coated the surface of the biofilm so that the cells were indistinguishable (Fig. 2B: oak, 4 weeks, x35 000). According to these observations, the biofilm appeared mature from 2 weeks on oak.

To gain more insight into *O. oeni* biofilm formation dynamics, we used a Real-Time Confocal Laser Scanning Microscope (RT-CLSM) associated with a fluorescent membrane probes compatible with live *in situ* dynamics to monitor cell growth in 4D over 2 days (Fig.2A). Technically, this observation was not possible on wood chips (autofluorescence, non-transparency, interaction with the fluorophore) so measurements were performed in polystyrene microplates. Surface-associated *O. oeni* showed a rapid increase in biovolume, up to 4.10^5 µm^3 after 18 hours incubation (Fig. 2C).

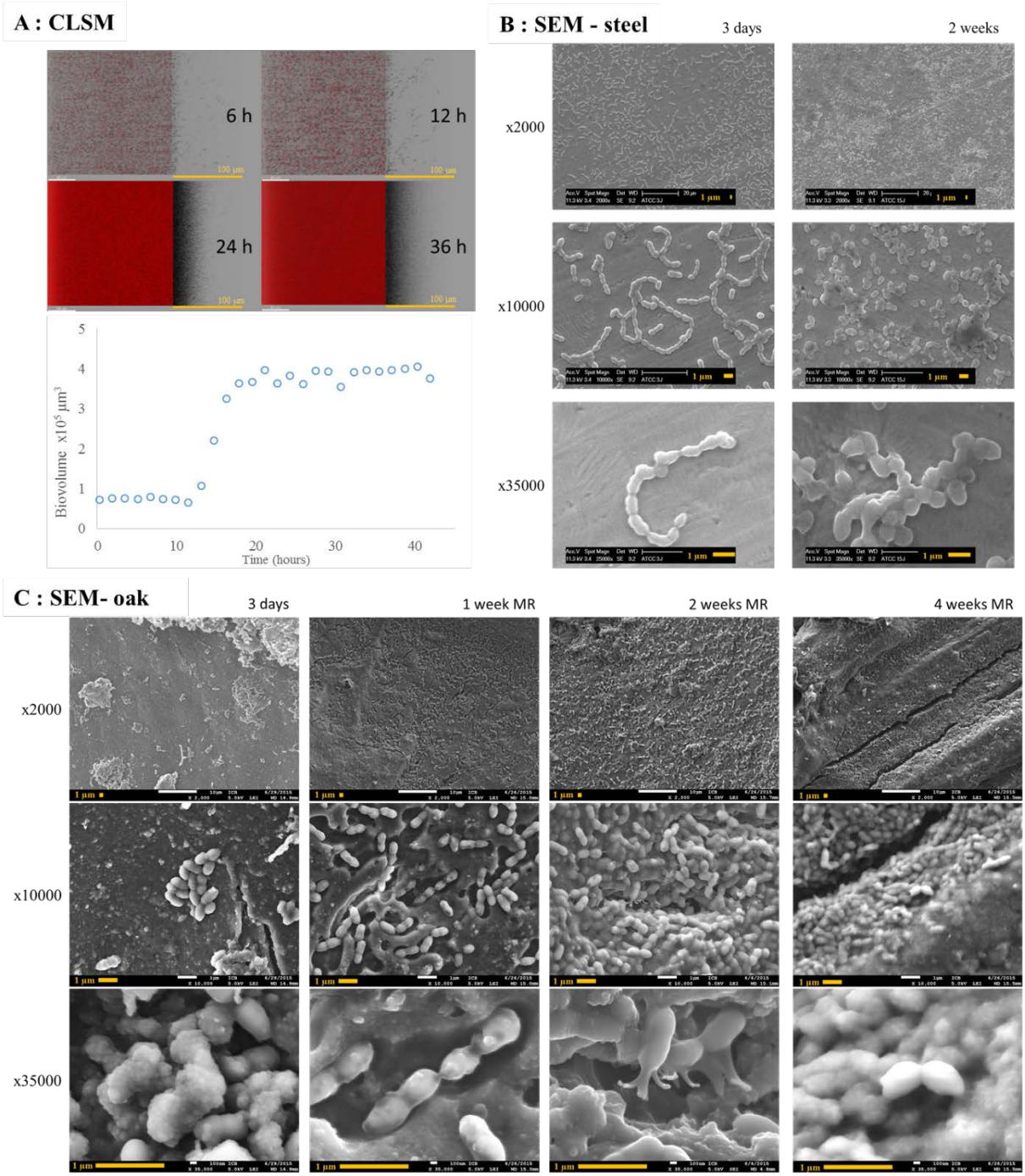


Figure 2: O. oeni ATCC BAA-1163 biofilm microscopy observations. ***A****: Confocal Laser Scanning Microscopy z-view time lapse of biofilm development at 6, 12, 24 and 36h on polystyrene microplates. Below, evolution of the biofilm biovolume.* ***B*** *and* ***C****: Scanning Electron Microscopy at x2000 x10,000 x35,000 of O. oeni ATCC BAA-1163 biofilm growth showing stages of formation on (****B****) steel at 3 days and 2 weeks growth and (****C****) oak at 3 days 1, 2, and 4 weeks.*

***O. oeni* biofilm, a mode of life allowing stress resistance**

The survival of planktonic and sessile cells detached for 2 weeks in wine was compared. Both samples were inoculated in wine medium at pH 3.2 with 12% ethanol, which represents severe stress conditions for *O. oeni*. Their survival was monitored for 24 hours (Fig. 3). Planktonic cells inoculated at 10^7 CFU/ml in this medium underwent total mortality within 4 hours, while cells detached from the biofilm (inoculated at 3.10^6 CFU/ml) had a loss of 1 log after 4 hours incubation. However, viability remained constant over 24 hours (Fig. 3).

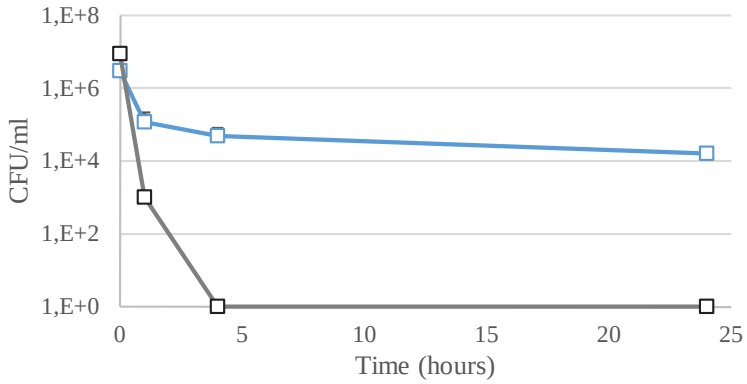


Figure 3: Evolution of O. oeni ATCC BAA-1163 population in wine. Grey curve: planktonic cells; blue curve: biofilm cells (2 week growth, medium renewed) detached from the steel. The wine used has pH 3.2; 12% ethanol. Error bars represent the standard deviation of three biological replicates.

The biofilm phenotype increased cell stress resistance, even after detachment from the surface. In order to investigate biofilm tolerance mechanisms, we studied the relative expression of a set of genes encoding for stress protein (*hsp18, clpL1, cfa, groEL*) (Fig. 4A) and a set of genes involved in exopolysaccharide production (*levO, wobB, wobO, dsrO*) (Fig. 4B), during the sessile phase (2-week old biofilm) and the planktonic phase (exponential phase) with or without stress (30 min in wine at pH 3.5 and ethanol 12%). As expected, genes related to stress response were overexpressed in stressed planktonic (PS) cells compared to non-stressed planktonic cells (P) (Fig. 4A). The *cfa* transcript level was slightly higher and the *groEL* transcript levels were six-fold higher. The highest increases were for *clpL1* and *hsp18* transcript levels, at approximately seventyfold and 150-fold. Regarding

sessile cells (B), all the genes studied in the non-stressed biofilm showed lower expression compared to the non-stressed planktonic cells (P). However, stress genes were over-expressed (except for *groEL*) when sessile cells were exposed to stress conditions (BS) (Fig. 4A).

The relative expression levels of four genes involved in EPS production in planktonic and biofilm cells, with or without stress, are described in Fig. 4B. In stressed planktonic cells (PS), *dsrO* and *levO* exhibited a fourfold decrease in transcription levels compared to the planktonic reference (P). Expressions of the genes studied and involved in the production of EPS were lower in the non-stressed biofilms cells (B) than in the planktonic reference (P) (2.9-fold to 6.7-fold) (Fig. 4B). In contrast, when biofilm cells were stressed (BS), the expression of these genes increased significantly (10 times the B levels).

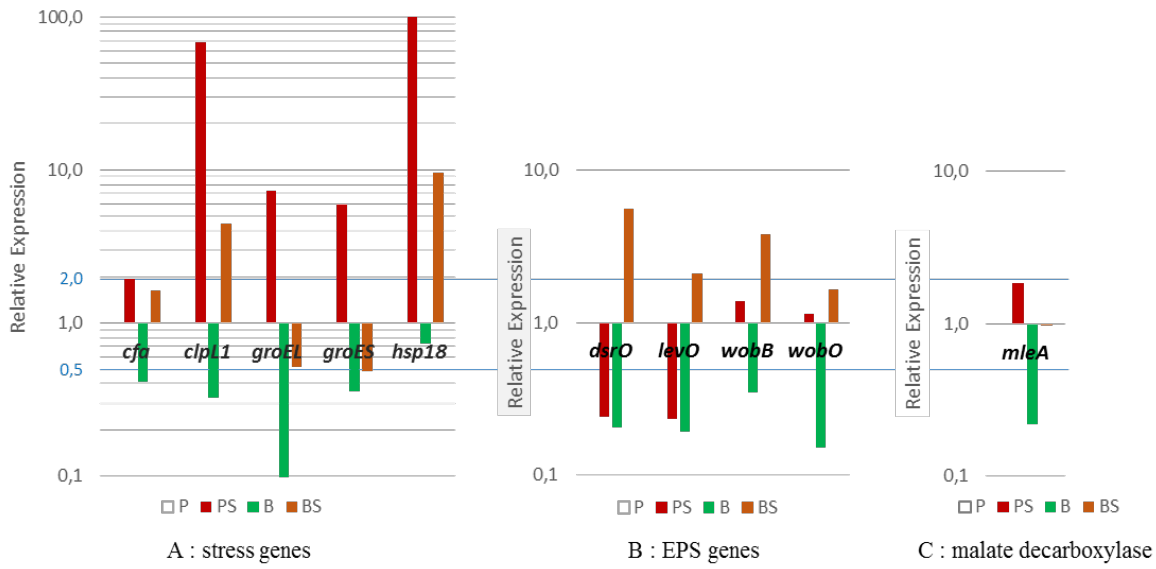


*Figure 4: Comparison of relative expression levels of (**A**) five stress genes, (**B**) four genes involved in EPS production, and (**C**) malolactic enzyme gene, of O. oeni ATCC BAA-1163 in planktonic exponential phase and two week growth biofilm. Planktonic cell gene expression without stress (P) was used as a calibrator and settled to 1; green bars represent biofilm cells without stress (B). Red bars represent planktonic stressed cells (PS), and orange bars stressed biofilm (BS), knowing that each group were exposed to a 30 minute wine stress (pH 3.5 ethanol 12%). Gene expression is quantified using RT-qPCR and the comparative critical threshold ($\Delta\Delta C_T$) method. The ldhD gene was used as the internal control. One representative repetition of the triplicate is shown, due to high levels of induction which obstruct the reading of the whole set of data.*

346 **Technological impact of wine inoculation with O. oeni biofilms instead of free**
347 **cells**

348 Since the biofilm phenotype provides improved stress resistance, biofilm
349 technological performance was investigated in comparison with planktonic cells.
350 To establish whether the biofilm of *O. oeni* keeps its enological properties, the
351 consumption of malic acid was monitored simultaneously with the quantitative
352 analysis of transcript levels of the gene encoding for the malolactic enzyme (*mleA*).
353 As shown in Fig. 4C, *mleA* is less expressed in biofilm cells (B) compared to
354 exponential-planktonic cells (P). However, when sessile cells were immersed in
355 wine (BS), their *mleA* transcription levels were similar to planktonic cells (P).
356 Indeed, at the time of sampling, malic acid was no longer present in the biofilm
357 culture medium, contrary to the wine medium. Therefore the biofilm sensed and
358 reacted to the malic acid concentration.

359 Microvinifications were carried out using a must fermented by *S. cerevisae*,
360 adjusted to pH 3.2 or pH 3.5, L-malic acid 4 g/l and 12% ethanol, inoculated with
361 *O. oeni* ATCC BAA-1163 biofilm on oak at 5.10^7 CFU/ml or planktonic cells as
362 reference (10^6 to 10^9 CFU/ml). After 4 days incubation in this wine (Fig 5), the
363 planktonic cells underwent total mortality regardless of the initial concentration
364 inoculated, suggesting that without pre-adaptation they are unable to survive in
365 wine and consequently unable to perform MLF. Despite this mortality, a very large
366 cell population (10^9 CFU/ml) could convert malic acid before dying. On the
367 contrary, cells organized in biofilm kept their ability to perform complete MLF,
368 probably due to their enhanced survival in wine (Fig. 5).

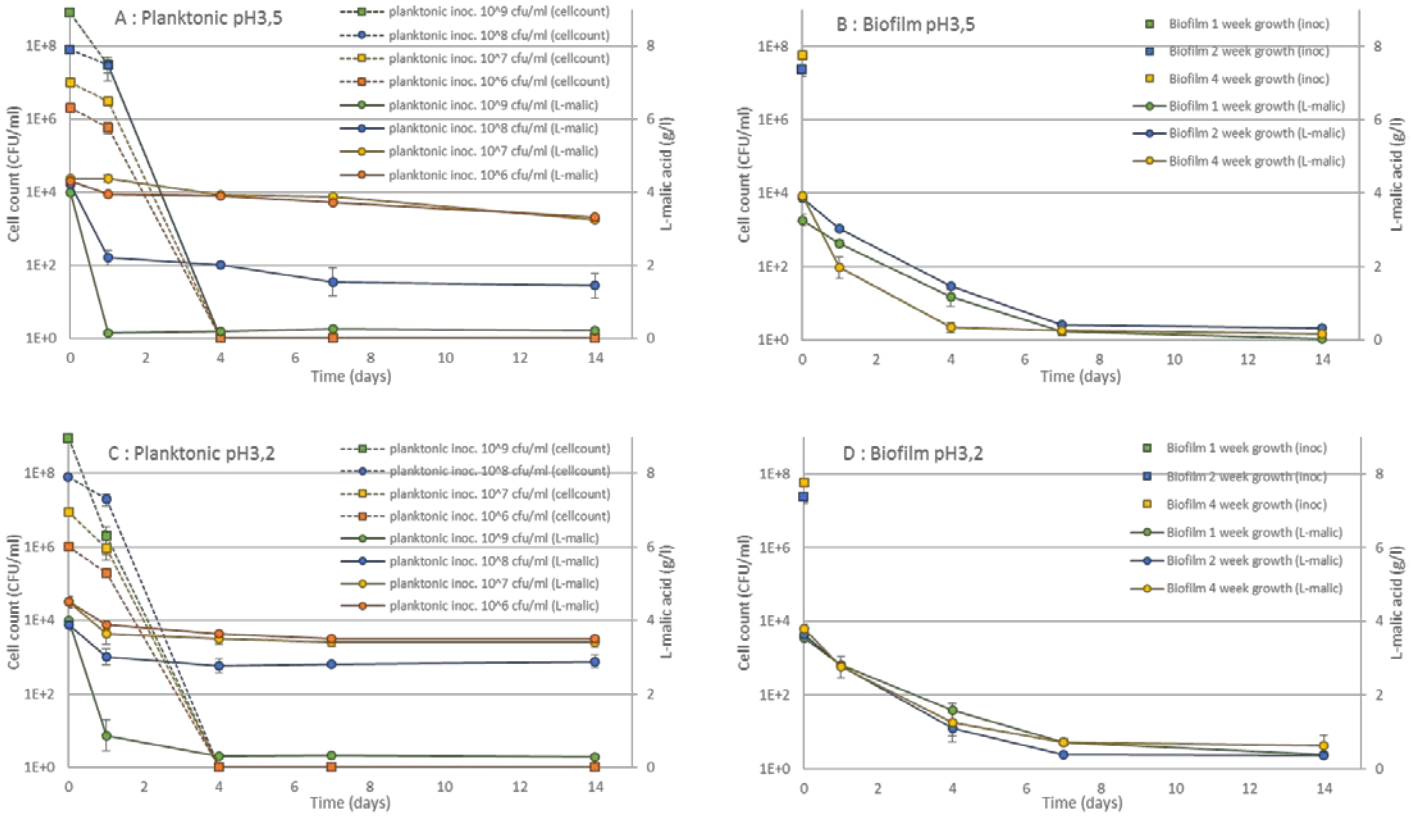


Figure 5: Comparison of L-malic acid conversion by O. oeni ATCC BAA-1163 planktonic (left side) and biofilm cells (right side) in wine medium (12% ethanol) at pH3.5 (up) and pH3.2 (bottom). Planktonic cells were inoculated from 10^6 CFU/ml to 10^9 CFU/ml then their mortality was monitored (dashed lines). Biofilms of 1, 2, 4 week growth on oak chip were inoculated at the equivalent of 10^8 CFU/ml. Error bars represent the standard deviation of three biological replicates.

Following this strategy, we made a comparison between an *O. oeni* lab strain ATCC BAA-1163 and Sabo11, a malolactic strain of technological interest (Fig. 6A). Indeed, Sabo11 completed 100% MLF whereas ATCC BAA-1163 converted 75% of the L-malic acid. This difference was not due to the biomass, because both populations exhibited the same viability through time, which decreased from 5.10^7 CFU/ml (beginning) to 10^3 CFU/ml (20 days after). Consequently, Sabo11 was more suitable for performing MLF than the lab strain, ATCC BAA-1163. Therefore this strain was used to perform a winemaking-like experiment involving interaction between bacteria, oak and wine. To this end, a planktonic culture of Sabo11 was adapted to wine stress with the *pied-de-cuve* method (Li *et al.*, 2012). As shown in Table 2, we compared 5 samples in which the presence of oak and the bacteria mode of life vary, in order to test an alternative to traditional wine inoculation through the *pied-de-cuve*. Therefore we used biofilms which were not adapted to wine conditions, unlike the planktonic culture. MLF monitoring in wine is shown in Fig. 6B. The adapted planktonic cells inoculated at 5.10^7 CFU/ml (P) grew from 2.10^6 to 6.10^6 CFU/ml and converted L-malic acid during the first ten days and then slowed down. The planktonic cells with oak chip (OP) also converted L-malic acid in ten days, and then stagnated, due to their decrease in population after ten days. The biofilm cultivated on oak (BO) inoculated at the equivalent of 5.10^7 CFU/ml performed complete MLF in six days. Interestingly, the biofilm released cells in wine, reaching 10^6 CFU/ml on the third day of MLF.

Table 2: Five conditions used to study O. oeni-oak-wine interaction. The wine is still the same, the inoculum is either absent, planktonic or biofilm culture of O. oeni strain Sabo11, oak chip is immerged or not.

Name	Medium	Inoculum	Oak
W	*Aligoté* wine pH3.5 12% ethanol	-	-
O		-	untoasted oak chips (120 g/l)
P		planktonic culture of adapted Sabo11 (5.10^7 CFU/ml)	-
OP		planktonic culture of adapted Sabo11 (5.10^7 CFU/ml)	untoasted oak chips (120 g/l)
BO		biofilm 2 week growth of Sabo11 (5.10^7 CFU/ml)	untoasted oak chips (120 g/l)

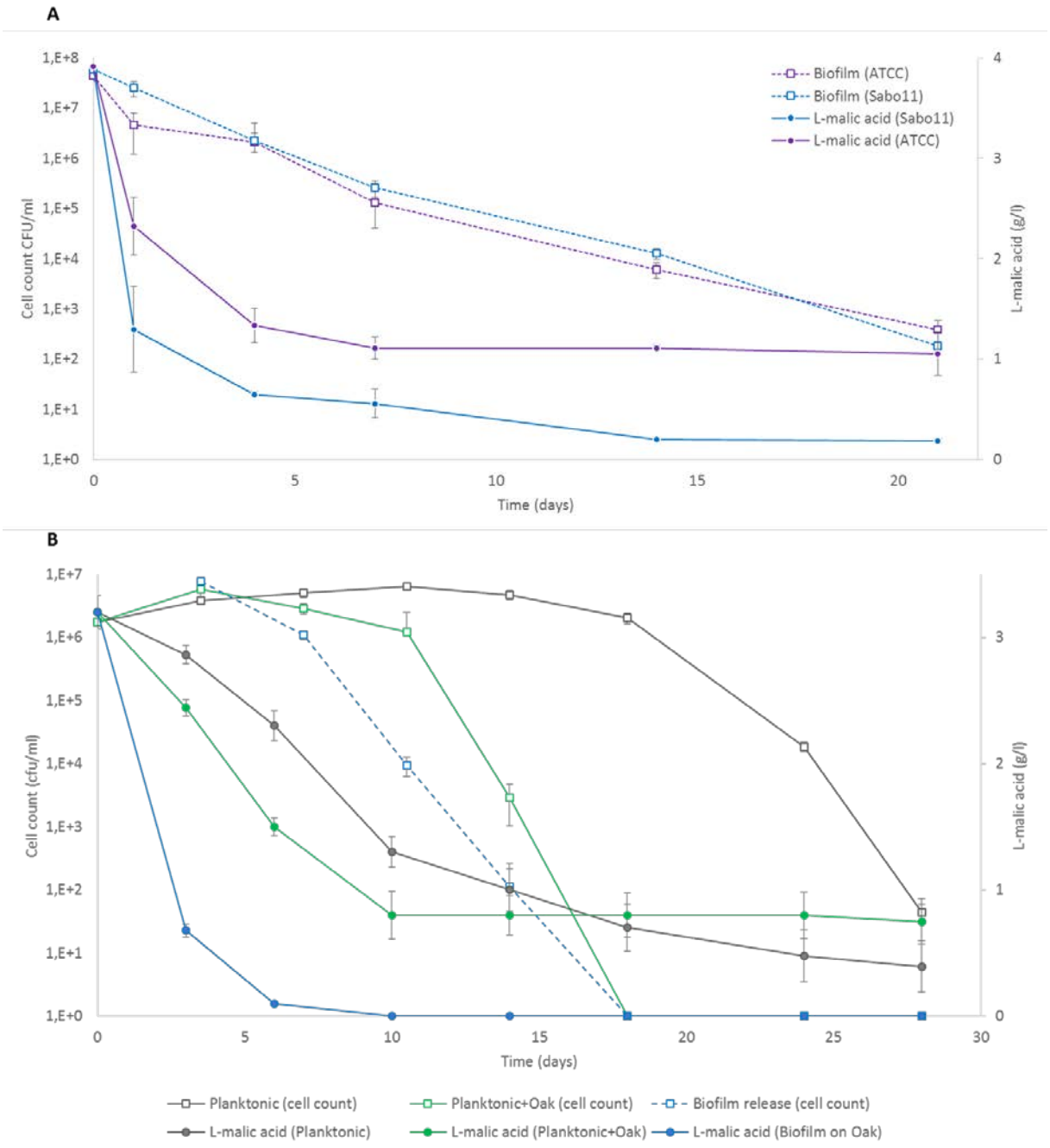


*Figure 6: **A**: Monitoring of the MLF in wine (pH3.5 ethanol 12%) by two O. oeni strains, grown in biofilm on oak during two weeks. Biofilm inoculum and survival are shown in dashed lines (□ ATCC BAA-1163; □ Sabo11). L-malic concentration is shown in straight lines (● ATCC BAA-1163; ● Sabo11).*
***B**: Monitoring of the MLF (□) and cell viability (●) in aligoté wine (pH3.5 ethanol 12%) by a planktonic adapted inoculum of O. oeni Sabo11 (grey lines), supplemented with oak chip (green lines), and biofilm on oak chip (blue lines). The blue dashed line represents the viables cells released by the biofilm in the wine. Error bars represent the standard deviation of three biological replicates.*

Following MLF with these experimental conditions, we focused on the molecular interactions between *Oenococcus oeni*, wine and oak chips. For that purpose, the concentration of six oak volatile compounds in wine have been assessed by an HS-SPME-GC-MS analysis (Fig. 7A). The MLF performed by planktonic cells without oak (P) is a control showing that the six compounds did not come from the wine or the bacterial metabolism. Oak chips immerged in wine without cells to perform MLF (O) represent a reference of compounds transfer without bacterial metabolism. The MLF with planktonic cells and oak chips (OP) influenced four compounds concentrations, by increasing them (cis-whiskylactone, trans-whiskylactone, and vanillin) or decreasing them (furfural) whereas no significant difference was observed for guaiacol and eugenol. The biofilm on oak chip condition (BO) released less oak volatile compounds than the O and OP conditions, except for the whiskylactones. The cis-whiskylactone levels of BO was similar to O, whereas the trans-whiskylactone level of BO was above the others.

We continued to monitor MLF under these experimental conditions, and focused on the molecular interactions between *Oenococcus oeni*, wine and oak chips. To do this, the concentration of six oak volatile compounds in wine was assessed by HS-SPME-GC-MS analysis (Fig. 7A). MLF performed by planktonic cells without oak (P) as a control showed that the six compounds did not come from the wine or the bacterial metabolism. Oak chips immerged in wine without cells to perform MLF (O) represented the reference compound transfer without bacterial metabolism. MLF with planktonic cells and oak chips (OP) influenced four compound concentrations, by increasing them (cis-whisky lactone, trans-whisky lactone, and vanillin) or decreasing them (furfural), whereas no significant difference was observed for guaiacol and eugenol. The biofilm under the oak chip condition (BO) released fewer oak volatile compounds than the O and OP conditions, except for the whisky lactones. The cis-whisky lactone levels of BO were similar to O, whereas the trans-whisky lactone level of BO was higher than the others. A principal component analysis was carried out to illustrate these aroma transfers from oak to wine as a function of direct inoculation process (Fig. 7B). This representation shows that two components F1 and F2 explain 84% of the variability of aroma concentrations. After only one month of micro-vinification, the biofilm lifestyle (BO) could be clearly distinguished from the planktonic lifestyle (OP). The

423 presence of planktonic bacteria increased the vanillin concentration compared to
424 the presence of the oak chip alone in the wine medium. This increase could be due
425 to enzymatic activities as described previously (de Revel *et al.*, 2005; Bloem *et al.*,
426 2006).

427 Wine color, which is another enological parameter, was investigated in these
428 micro-vinifications by the measurement of the chromatic L*a*b* values (Fig. 8).
429 Our study showed that MLF did not significantly change the color of wine (W *vs.*
430 P). Likewise, there was no difference between oak wine with or without MLF (OP
431 *vs.* O). Nonetheless, as expected, the impact of oak aging (O, OP) versus oak-less
432 conditions (W, P) was an increase in the magenta (a*) and the yellow (b*) colors in
433 the wine and a decrease of lightness (L*). Finally, biofilms on oak chip (BO)
434 reduced wine staining (a*, b*) and preserved lightness (L*) compared to planktonic
435 MLF wine with oak (OP).

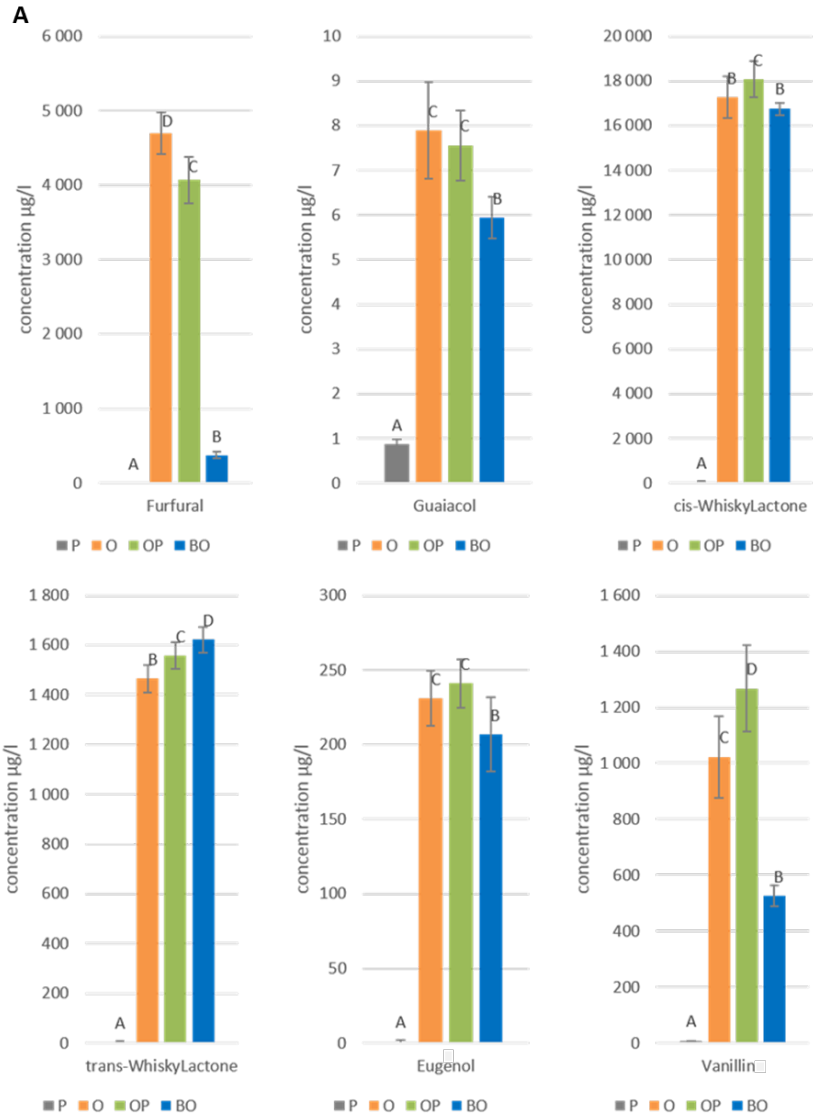

A
concentration µg/l
Furfural
Guaiacol
cis-WhiskyLactone
trans-WhiskyLactone
Eugenol
Vanillin
P O OP BO
B
cisWL
transWL
Vanillin
Furfural
Guaiacol
Eugenol
F1 (61,31 %)
F2 (22,72 %)

Figure 7: ***A****: HS-SPME-GC-MS analysis of six oak volatile compounds in wine after one month of aging: furfural, guaiacol, cis and trans-whiskylactones, eugenol and vanillin. Four conditions have been experimented, MLF by planktonic cells without oak (P in grey), oak chip immerged in wine without MLF (O in orange), a MLF by planktonic cells with oak chip (OP in green), a MLF performed by the biofilm on oak chip (BO in blue). Error bars represent the standard deviation of three biological and two technical replicates.*
B*: Projection of compositional data on principal components 1 and 2; the circled dots regroup the data of the six volatile compound analysis: oak only (orange) oak with MLF (green) and biofilm on oak MLF (blue).*

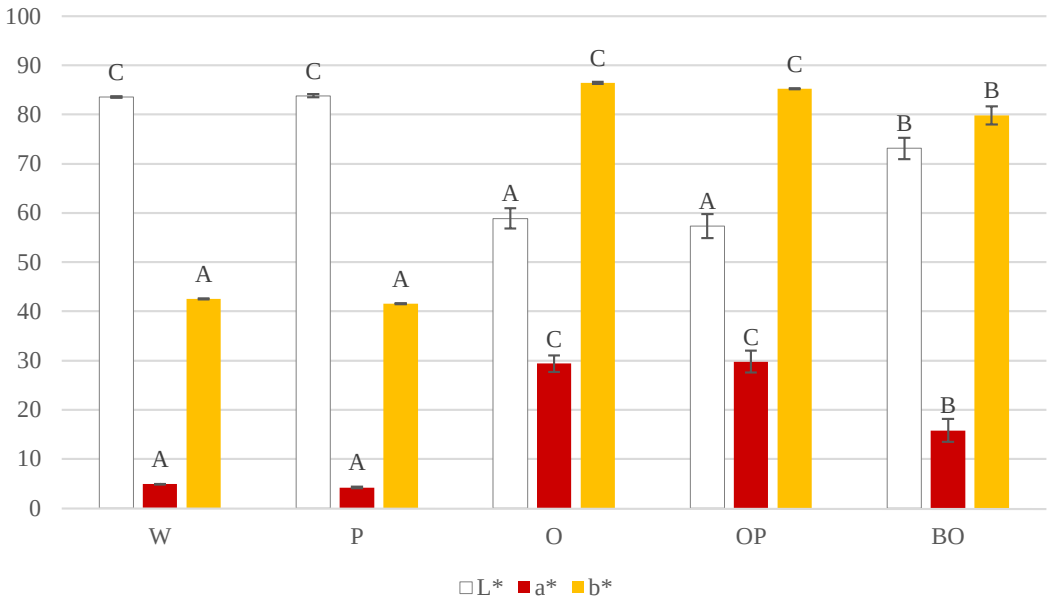


*Figure 8: L*a*b parameters of the five wine conditions after one month aging. W : Wine ; P : planktonic MLF ; O : Oak ; OP : Oak + planktonic MLF ; BO : MLF by Biofilm on Oak (Table 2). The error bars represent the standard deviation of three biological and three technical replicates.*

Discussion

In this study, we investigated the biofilm development of *O. oeni* linked to its ability to perform malolactic fermentation, a key step of winemaking. The study focused on: (i) the capacity of biofilm cells to withstand the stress found in wine, (ii) on the capacity of *O. oeni* biofilm to perform MLF, and (iii) on the modulation of the organoleptic quality of wine by *O. oeni* biofilms developed on oak.

Investigation of O. oeni biofilm development and involvement in resistance to drastic environmental conditions

First, we highlighted *O. oeni* bacteria adhering to the vine material, which suggested the presence of potential biofilm. For the first time, *O. oeni* biofilm was developed on various materials including stainless steel and oak, which are used in winemaking, with pumps, pipes, tanks, and barrels. Biofilm biomass is higher on oak than steel under the same growth conditions. This was expected, since stainless steel is frequently used in food processing to limit the adhesion of microorganisms (Hilbert *et al.*, 2003), while wood has a marked relief and chemical structures that enhance bacteria adhesion (Mariani *et al.*, 2007).

O. oeni biofilm biovolume assessed with CLSM was 4.10^5 μm^3 from 20-hours growth and stayed the same until 40 hours. This biovolume was close to those obtained from other LAB such as *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, which are around 2.10^5 μm^3 at 48 h (Rieu *et al.*, 2014), although *O. oeni* has a slower growth rate (μ_{max}=0.11 to 0.17 h^{-1}) compared to these LAB *e.g.* 0.6-0.11 h^{-1} for *L. casei* and *L. plantarum*. Therefore, under these confocal microscopy conditions, *O. oeni* biofilm growth reached a size similar to other LAB species known to form biofilms.

Biofilm lifestyle is well known to protect bacteria from harsh environmental conditions. In our model, cells from *O. oeni* biofilms were much more resistant than planktonic ones, in agreement with findings on sessile cells of *L. plantarum* that exhibit improved resistance to ethanol (Kubota *et al.*, 2008, 2009).

In order to understand how biofilm allows cells to withstand environmental stresses, the expression of genes encoding proteins involved in the stress response of *O. oeni*

i.e. Lo18, GroEL and ClpL1 and CFA synthase was investigated (Guzzo *et al.*, 1997; Beltramo *et al.*, 2004, 2006; Grandvalet *et al.*, 2008; Maitre *et al.*, 2014). Studies revealed that stress-related genes are often overexpressed in sessile *E. coli* populations compared with planktonic cultures, even in the absence of environmental stress (Schembri *et al.*, 2003; Domka *et al.*, 2007). Under our culture conditions, the stress-gene expression observed was lower in biofilm than in planktonic cells. This could be due to the kinetics of these genes' expression as a function of growth stage in the biofilm. Indeed, stress proteins might have been produced already and fulfilled their protective role. Consequently, the biofilm could preserve its resources and energy (Beloin and Ghigo, 2005). Another explanation is related to the fact that gene expression analysis is generally global, considering the biofilm as a whole. But biofilms are described as heterogeneous populations with local spatiotemporal patterns of gene expression. This overall measure gives us an average picture of the actual gene expressions, which likely smooths out differences between cells (Coenye, 2010; Mielich-Süss and Lopez, 2015). Cells in different metabolic states within the biofilm characterize this heterogeneity. Indeed, a study on *Bacillus subtilis* biofilm cells showed that cells multiply on the surface layer, whereas in the middle of the biofilm cells produce an extracellular matrix to reinforce the biofilm structure (Vlamakis *et al.*, 2008; Mielich-Süss and Lopez, 2015). Despite this low stress gene expression observed, the *O. oeni* cells in biofilm exhibited increasing resistance to stress, suggesting that one or more other mechanisms contribute to this tolerance. We can conclude that this observation favors the involvement of the biofilm EPS matrix, even if *O. oeni* cells in biofilm remain reactive to stress by inducing stress gene expression.

The EPS matrix: a dark matter involved in stress protection

The EPS matrix has often been described as a protective shield against the aggressions of the surrounding environment (Mah and O'Toole, 2001; Colvin *et al.*, 2011). Thus the expression of genes encoding the EPS was analyzed in order to evaluate the production of the matrix between the two modes of life and function under stress conditions: loci of glycoside-hydrolases *levO* (levansucrase) and *dsrO* (dextransucrase), *wobB* (rhamnosyltransferase) and *wobO*. The genes tested were more expressed under planktonic than under biofilm conditions, suggesting that the

biofilm was mature and the matrix was well established. Indeed, we could be in the situation where few nutrients remain, the biofilm is in a stationary phase, and the cells no longer grow but renew themselves (Beloin and Ghigo, 2005; Anderson and O'Toole, 2008). Moreover, the EPS matrix is often produced earlier in order to favor the adhesion step and biofilm development (Beloin and Ghigo, 2005). It is, however, noteworthy that these tested genes are overexpressed when biofilm cells are struggling against stress, suggesting a need to reinforce the matrix.

Due to its protective effect, the biofilm matrix enables cells to survive direct inoculation in wine. Thereafter, they could develop an adaptive response with HSP synthesis in order to survive wine stress while performing MLF.

O. oeni biofilm is able to perform MLF and modulate the organoleptic properties of wine: an alternative to adapt MLF starters

Our study shows that *O. oeni* cultivated in biofilm kept its malic acid conversion ability under drastic conditions without any prior adaptation, due to the greater survival of biofilm cells and the diffusion of malic acid through the EPS matrix. A previous study using adapted planktonic cells demonstrated the consumption of malic acid in 16 days (Beltramo *et al.*, 2006). However, comparison between different studies is extremely difficult since their conditions also differ. Indeed, a slight change of ethanol concentration (0.5%), of pH (0.1 unit), or temperature (5°C) can change the outcome of the study. *O. oeni* biofilm cell resistance and activity seem to be close to those of immobilized cells which are the subject of intense research. Indeed, several experiments have performed MLF with *O. oeni* immobilized on various surfaces: fibrous cellulose sponge, corn cobs, grape skins and grape stems (Genisheva *et al.*, 2014a), resulting in varying degrees of success. The common trait between these studies is increased *O. oeni* cell resistance when immobilized, compared to the planktonic reference (Genisheva *et al.*, 2014a). However, immobilized cells cannot be considered as a proper biofilm since cell growth, cell-cell interaction, and multifunction matrix are highly specific to the biofilm phenotype (Davey and O'toole, 2000; Hojo *et al.*, 2009; Flemming and Wingender, 2010; Coenye, 2010).

Subsequently our study focused on the modulation of wine organoleptic qualities by biofilm grown on oak. *O. oeni* glycosidase activity has been shown to release aromas from oak (Bloem *et al.*, 2008), including vanillin (Bloem *et al.*, 2006). Although oak aroma compounds are sought for increasing wine sensory properties, it is interesting to be able to modulate their concentration in wine (Duval *et al.*, 2013). In our study, white wine whose MLF was carried out by biofilm on oak also exhibited these same differentiations in the aromatic profile, marked by a decrease of oak aromatic compounds (cis-whisky lactone, vanillin, eugenol, guaiacol, furfural). Interestingly, in the same wine, trans-whisky lactone was present at higher concentrations, suggesting that wood/wine interactions under the action of *O. oeni* biofilm could modulate the aromatic complexity of wine. This could be explained by the matrix covering the oak surface and acting like a filter (Dunne, 2002). These compounds may be bound with the EPS or even be converted by biofilm enzymes. Since the sensory contribution of trans-whisky lactone is slight (perception threshold of 110 µg/l), such aroma analyses clearly highlight the potential interest of *O. oeni* biofilms for monitoring the oak ageing of wines to obtain fine tuned extraction of wood aromas. In the same way, wine color obtained during aging is modulated by the presence of biofilm on oak. As the biofilm modulates the organoleptic profile of wine, we suggest a retention effect of the matrix with possible interaction between EPS and wine molecules such as macromolecules classified as anthocyanins and tannins (polyphenols).

In conclusion, *O. oeni* biofilm could be considered as a novel approach for performing MLF, and as an alternative way of adapting MLF starters to wine stress. Moreover, biofilm can modulate the organoleptic profile of the wine. These results were obtained only with unheated wood, and more in-depth investigations are needed to account for the general use of oak ageing by winemakers.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the *Conseil Régional de Bourgogne* for its financial support. We would like to thank Marie-Laure Léonard (ESIREM, Dijon, France), Aline Bonnotte (INRA, Dijon, France) and Frédéric Herbst (ICB, Dijon, France) for their technical assistance on microscopy observations; Jean-Marie Herry (INRA, Jouy-en-Josas, France) for the homemade biovolume calculation java script; Pierre-Jean Meausoone (ENSTIB/LERMAB, Epinal, France) for cutting the oak chips; and Karine Gourrat (INRA Chemosens, Dijon) for help in aroma analysis. We thank the winemakers from four Burgundian wine estates who allowed us to sample barrels: Mélanie Sire (Maison Joseph Drouhin), Anne-Laure Hernette (Maison Antonin Rodet), Pierre Vincent (Domaine de la Vougeraie) and Cyrille Jacquelin (Maison Albert Bichot).

References

Anderson, G. G., and O'Toole, G. A. (2008). "Innate and Induced Resistance Mechanisms of Bacterial Biofilms," in *Bacterial Biofilms* Current Topics in Microbiology and Immunology., ed. T. Romeo (Springer Berlin Heidelberg), 85–105.

Ansanay, V., Dequin, S., Camarasa, C., Schaeffer, V., Grivet, J.-P., Blondin, B., Salmon, J.-M., and Barre, P. (1996). Malolactic fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* as compared with engineered *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 12, 215–225.

Bauer, R., and Dicks, L. M. T. (2004). Control of malolactic fermentation in wine. A review. *Afr J Enol Vitic* 25, 74–88.

Beloin, C., and Ghigo, J.-M. (2005). Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends Microbiol.* 13, 16–19. doi:10.1016/j.tim.2004.11.008.

Beltramo, C., Desroche, N., Tourdot-Maréchal, R., Grandvalet, C., and Guzzo, J. (2006). Real-time PCR for characterizing the stress response of *Oenococcus oeni* in a wine-like medium. *Res. Microbiol* 157, 267–274. doi:10.1016/j.resmic.2005.07.006.

Beltramo, C., Grandvalet, C., Pierre, F., and Guzzo, J. (2004). Evidence for multiple levels of regulation of *Oenococcus oeni* clpP-clpL locus expression in response to stress. *J. Bacteriol.* 186, 2200–2205. doi:10.1128/JB.186.7.2200-2205.2003.

Bloem, A., Lonvaud, A., Bertrand, A., and de Revel, G. (2006). Ability of *Oenococcus oeni* to influence vanillin levels. *Dev. Food Sci.*, 137–140.

589 Bloem, A., Lonvaud-Funel, A., and de Revel, G. (2008). Hydrolysis of
590 glycosidically bound flavour compounds from oak wood by Oenococcus
591 oeni. *Food Microbiol.* 25, 99–104. doi:10.1016/j.fm.2007.07.009.

592 Brányik, T., Vicente, A. A., Dostálek, P., and Teixeira, J. A. (2005). Continuous
593 beer fermentation using immobilized yeast cell bioreactor systems.
594 *Biotechnol. Prog.* 21, 653–663.

595 Coenye, T. (2010). Response of sessile cells to stress: from changes in gene
596 expression to phenotypic adaptation: Phenotypic adaptation to stress in
597 biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* doi:10.1111/j.1574-
598 695X.2010.00682.x.

599 Colvin, K. M., Gordon, V. D., Murakami, K., Borlee, B. R., Wozniak, D. J.,
600 Wong, G. C. L., and Parsek, M. R. (2011). The Pel Polysaccharide Can
601 Serve a Structural and Protective Role in the Biofilm Matrix of
602 *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* 7, e1001264.
603 doi:10.1371/journal.ppat.1001264.

604 Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., and Lappin-
605 Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–
606 745. doi:10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.

607 Coucheney, F., Desroche, N., Bou, M., Tourdot-Maréchal, R., Dulau, L., and
608 Guzzo, J. (2005). A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains
609 in order to produce malolactic starters. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 463–
610 470. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.023.

611 Davey, M. E., and O'toole, G. A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to
612 Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 847–867.
613 doi:10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000.

614 Desroche, N., Beltramo, C., and Guzzo, J. (2005). Determination of an internal
615 control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress
616 response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *J. Microbiol.*
617 *Methods* 60, 325–333. doi:10.1016/j.mimet.2004.10.010.

618 Dimopoulou, M., Bardeau, T., Ramonet, P.-Y., Miot-Certier, C., Claisse, O.,
619 Doco, T., Petrel, M., Lucas, P., and Dols-Lafargue, M. (2015).
620 Exopolysaccharides produced by *Oenococcus oeni*: from genomic and
621 phenotypic analysis to technological valorization. *Food Microbiol.*
622 doi:10.1016/j.fm.2015.07.011.

623 Domka, J., Lee, J., Bansal, T., and Wood, T. K. (2007). Temporal gene-
624 expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ. Microbiol.* 9, 332–
625 346.

626 Dunne, W. M. J. (2002). Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?
627 *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 155–166. doi:10.1128/CMR.15.2.155-166.2002.

628 Duval, C. J., Gourrat, K., Perre, P., Prida, A., and Gougeon, R. D. (2013). A HS–
629 SPME–GC–MS analysis of IR heated wood: Impact of the water content
630 on the depth profile of oak wood aromas extractability. *Food Res. Int.* 54,
631 277–284. doi:10.1016/j.foodres.2013.07.008.

632 Flemming, H.-C., and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat. Rev.*
633 *Microbiol.* 8, 623–633. doi:10.1038/nrmicro2415.

634 Genisheva, Z. A., Teixeira, J. A., and Oliveira, J. M. (2014a). Immobilized cell
635 systems for batch and continuous winemaking. *Trends Food Sci. Technol.*
636 40, 33–47. doi:10.1016/j.tifs.2014.07.009.

637 Genisheva, Z., Mota, A., Mussatto, S. I., Oliveira, J. M., and Teixeira, J. A.
638 (2014b). Integrated Continuous Winemaking Process Involving Sequential
639 Alcoholic and Malolactic Fermentations with Immobilized cells. *Process*
640 *Biochem.* 49, 1–9. doi:10.1016/j.procbio.2013.10.005.

641 Grandvalet, C., Assad-Garcia, J. S., Chu-Ky, S., Tollot, M., Guzzo, J., Gresti, J.,
642 and Tourdot-Maréchal, R. (2008). Changes in membrane lipid
643 composition in ethanol- and acid-adapted *Oenococcus oeni* cells:
644 characterization of the *cfa* gene by heterologous complementation.
645 *Microbiology* 154, 2611–2619. doi:10.1099/mic.0.2007/016238-0.

646 Guzzo, J., Delmas, F., Pierre, F., Jobin, M. P., Samyn, B., Van Beeumen, J.,
647 Cavin, J. F., and Diviès, C. (1997). A small heat shock protein from
648 *Leuconostoc oenos* induced by multiple stresses and during stationary
649 growth phase. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 393–396.

650 Guzzo, J., Jobin, M. P., Delmas, F., Fortier, L. C., Garmyn, D., Tourdot-Maréchal,
651 R., Lee, B., and Diviès, C. (2000). Regulation of stress response in
652 *Oenococcus oeni* as a function of environmental changes and growth
653 phase. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 27–31.

654 Hilbert, L. R., Bagge-Ravn, D., Kold, J., and Gram, L. (2003). Influence of
655 surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion
656 resistance. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 52, 175–185. doi:10.1016/S0964-
657 8305(03)00104-5.

658 Hojo, K., Nagaoka, S., Ohshima, T., and Maeda, N. (2009). Bacterial Interactions
659 in Dental Biofilm Development. *J. Dent. Res.* 88, 982–990.
660 doi:10.1177/0022034509346811.

661 Jobin, M.-P., Delmas, F., Garmyn, D., Divies, C., and Guzzo, J. (1997). Molecular
662 characterization of the gene encoding an 18-kilodalton small heat shock
663 protein associated with the membrane of *Leuconostoc oenos*. *Appl.*
664 *Environ. Microbiol.* 63, 609–614.

665 Katharios-Lanwermeyer, S., Xi, C., Jakubovics, N. S., and Rickard, A. H. (2014).
666 Mini-review: Microbial coaggregation: ubiquity and implications for
667 biofilm development. *Biofouling* 30, 1235–1251.
668 doi:10.1080/08927014.2014.976206.

669 Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. M., Marchant, R., and Koutinas, A. A.
670 (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in
671 alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol.* 21, 377–397.
672 doi:10.1016/j.fm.2003.10.005.

673 Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., and Uchiyama, H. (2008).
674 Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Resistance to
675 Environmental Stress. *J. Biosci. Bioeng.* 106, 381–386.
676 doi:10.1263/jbb.106.381.

677 Kubota, H., Senda, S., Tokuda, H., Uchiyama, H., and Nomura, N. (2009). Stress
678 resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp.
679 *plantarum* JCM 1149. *Food Microbiol.* 26, 592–597.
680 doi:10.1016/j.fm.2009.04.001.

681 Lafon-Lafourcade, S. (1970). Etude de la degradation de l'acide L-malique par les
682 bacteries lactiques non proliferantes isolees des vins. *Ann Technol Agr*.

683 Li, E., Liu, C., and Liu, Y. (2012). Evaluation of yeast diversity during wine
684 fermentations with direct inoculation and *pied de cuve* method at an
685 industrial scale. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 960–966.

686 Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and
687 depreciation of wine. *Lact. Acid Bact. Genet. Metab. Appl.* 76, 317–331.
688 doi:10.1023/A:1002088931106.

689 Lonvaud-Funel, A. (1995). Microbiology of the malolactic fermentation:
690 Molecular aspects. *FEMS Microbiol. Lett.* 126, 209–214.

691 Lonvaud-Funel, A., and Strasser de Saad, A. M. (1982). Purification and
692 Properties of a Malolactic Enzyme from a Strain of *Leuconostoc*
693 *mesenteroides* Isolated from Grapes. *Appl. Environ. Microbiol*. 43, 357–
694 361.

695 Mah, T.-F. C., and O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to
696 antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9, 34–39. doi:10.1016/S0966-
697 842X(00)01913-2.

698 Maitre, M., Weidmann, S., Dubois-Brissonnet, F., David, V., Covès, J., and
699 Guzzo, J. (2014). Adaptation of the wine bacterium *Oenococcus oeni* to
700 ethanol stress: role of the small Heat Shock Protein Lo18 in membrane
701 integrity. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.04178–13.
702 doi:10.1128/AEM.04178-13.

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

708 Maksimova, Y. G. (2014). Microbial biofilms in biotechnological processes. *Appl.*
709 *Biochem. Microbiol.* 50, 750–760. doi:10.1134/S0003683814080043.

710 Mariani, C., Briandet, R., Chamba, J.-F., Notz, E., Carnet-Pantiez, A., Eyoug, R.
711 N., and Oulahal, N. (2007). Biofilm Ecology of Wooden Shelves Used in
712 Ripening the French Raw Milk Smear Cheese *Reblochon de Savoie*. *J.*
713 *Dairy Sci*. 90, 1653–1661. doi:10.3168/jds.2006-190.

714 Mielich-Süss, B., and Lopez, D. (2015). Molecular mechanisms involved in
715 *Bacillus subtilis* biofilm formation. *Environ. Microbiol*. 17, 555–565.
716 doi:10.1111/1462-2920.12527.

717 Nedovic, V. A., Durieuxb, A., Van Nedervelde, L., Rosseels, P., Vandegans, J.,
718 Plaisant, A.-M., and Simon, J.-P. (2000). Continuous cider fermentation
719 with co-immobilized yeast and *Leuconostoc oenos* cells. *Enzyme Microb.*
720 *Technol.* 26, 834–839. doi:10.1016/S0141-0229(00)00179-4.

721 Nedović, V., Gibson, B., Mantzouridou, T. F., Bugarski, B., Djordjević, V.,
722 Kalušević, A., Paraskevopoulou, A., Sandell, M., Šmogrovičová, D., and
723 Yilmaztekin, M. (2015). Aroma formation by immobilized yeast cells in
724 fermentation processes. *Yeast* 32, 173–216. doi:10.1002/yea.3042.

725 Nel, H. A., Bauer, R., Wolfaardt, G. M., and Dicks, L. M. T. (2002). Effect of
726 Bacteriocins Pediocin PD-1, Plantaricin 423, and Nisin on Biofilms of
727 *Oenococcus oeni* on a Stainless Steel Surface. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 191–
728 196.

729 de Revel, G., Bloem, A., Augustin, M., Lonvaud-Funel, A., and Bertrand, A.
730 (2005). Interaction of *Œnococcus œni* and oak wood compounds. *Food*
731 *Microbiol.* 22, 569–575. doi:10.1016/j.fm.2004.11.006.

732 Rieu, A., Aoudia, N., Jego, G., Chluba, J., Yousfi, N., Briandet, R., Deschamps,
733 J., Gasquet, B., Monedero, V., Garrido, C., et al. (2014). The biofilm mode
734 of life boosts the anti-inflammatory properties of *Lactobacillus*. *Cell.*
735 *Microbiol*. 16, 1836–1853. doi:10.1111/cmi.12331.

736 Salou, P., Loubiere, P., and Pareilleux, A. (1994). Growth and energetics of
737 *Leuconostoc oenos* during cometabolism of glucose with citrate or
738 fructose. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1459–1466.

739 Sanchez-Vizuete, P., Coq, D. L., Bridier, A., Herry, J.-M., Aymerich, S., and
740 Briandet, R. (2015). Identification of ypqP as a New *Bacillus subtilis*
741 Biofilm Determinant That Mediates the Protection of *Staphylococcus*
742 *aureus* against Antimicrobial Agents in Mixed-Species Communities.
743 *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 109–118. doi:10.1128/AEM.02473-14.

744 Schembri, M. A., Kjærgaard, K., and Klemm, P. (2003). Global gene expression
745 in *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* 48, 253–267.
746 doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03432.x.

747 Schümann, C., Michlmayr, H., Eder, R., del Hierro, A. M., Kulbe, K. D.,
748 Mathiesen, G., and Nguyen, T.-H. (2012). Heterologous expression of
749 *Oenococcus oeni* malolactic enzyme in *Lactobacillus plantarum* for
750 improved malolactic fermentation. *AMB Express* 2, 19. doi:10.1186/2191-
751 0855-2-19.

752 Versari, A., Parpinello, G. P., and Cattaneo, M. (1999). *Leuconostoc oenos* and
753 malolactic fermentation in wine: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*
754 23, 447–455. doi:10.1038/sj.jim.2900733.

755 Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., and Kolter, R. (2008). Control of cell fate
756 by the formation of an architecturally complex bacterial community.
757 *Genes Dev.* 22, 945–953. doi:10.1101/gad.1645008.

758 Vuuren, H. J. J. V., and Dicks, L. M. T. (1993). Leuconostoc oenos: A Review.
759 *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 99–112.

III.1.3. Résultats complémentaires

III.1.3 a Persistance de *O. oeni* sur le matériel vinicole

Afin d'évaluer la persistance des micro-organismes adhérés sur le bois à la fin de l'élevage du vin, des fûts de chêne ont été vidés, rincés et ouverts. Les frottis réalisés sur fût (*Figure 15*) ont été incubés dans du MRSm afin de permettre la croissance de microorganismes. Des observations microscopiques ont permis de distinguer des levures et des bactéries. Le séquençage de la région variable de l'ADN 16S (Rousseaux *et al.*, 2001) a permis d'identifier les bactéries présentes comme étant majoritairement de l'espèce *O. oeni*, à l'exception d'un échantillon appartenant à l'espèce *Pediococcus damnosus*.

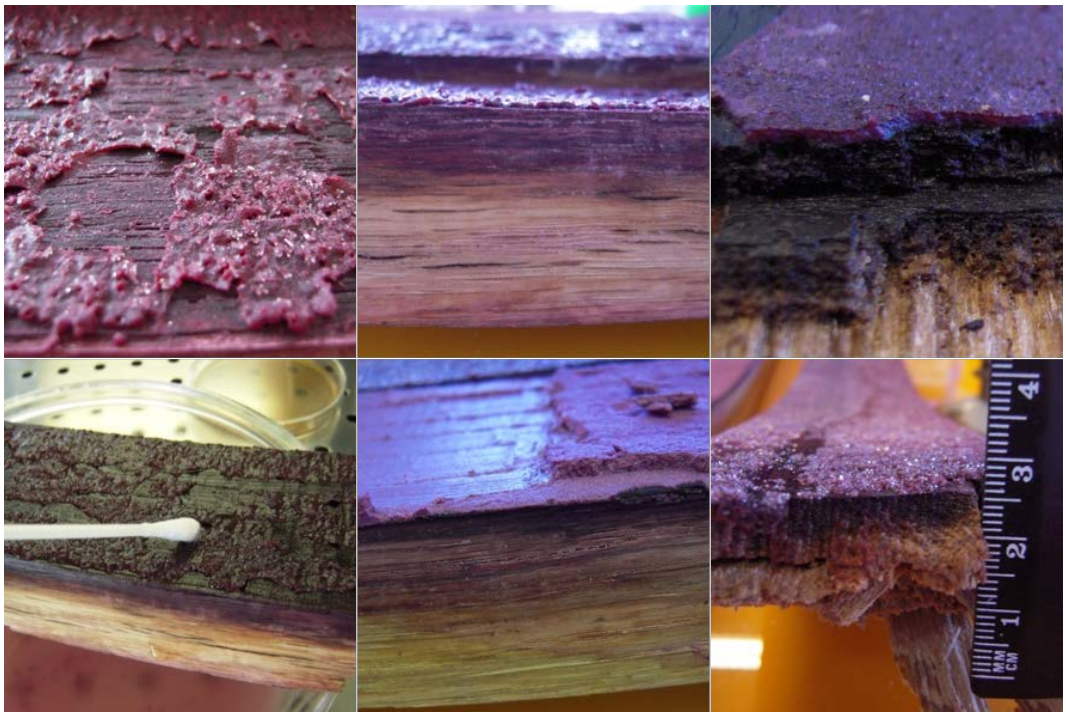


Figure 15 : Photographies des douelles sur lesquelles les prélèvements ont été effectués

III.1.3 b Caractérisation du phénotype biofilm en fonction des souches de *O. oeni*

Etant donné que *O. oeni* est capable de persister sur le bois, nous nous sommes intéressés à la capacité de trente souches de *O. oeni* à adhérer à un support en polystyrène (microplaque) en milieu MRSm et à se développer en biofilm. La biomasse au moment de l'adhésion des cellules (4h) et de 2 étapes de croissance

(3 et 15 jours) est évaluée par la méthode de coloration au cristal violet (*Figure 16*). Bien que l'adhésion soit variable entre les souches, il n'y a pas de corrélation entre celle-ci et la phase de croissance. Par exemple, Blo1 a la même biomasse au temps 4h que Psu-1 (env. 0,4 UA), mais la croissance en biofilm (3 jours) est plus limitée pour BLo1 (0,2 UA) que pour Psu-1 (0,6 UA). La biomasse du biofilm entre 3 jours et 15 jours de croissance a, selon les souches :

- augmenté (souches Ma2 à 5.23 sur la gauche de la *Figure 16*)
- stagné (souches lo107 à Rz81 au centre de la *Figure 16*)
- ou diminué (souches lo103 à lo101 à droite de la *Figure 16*).

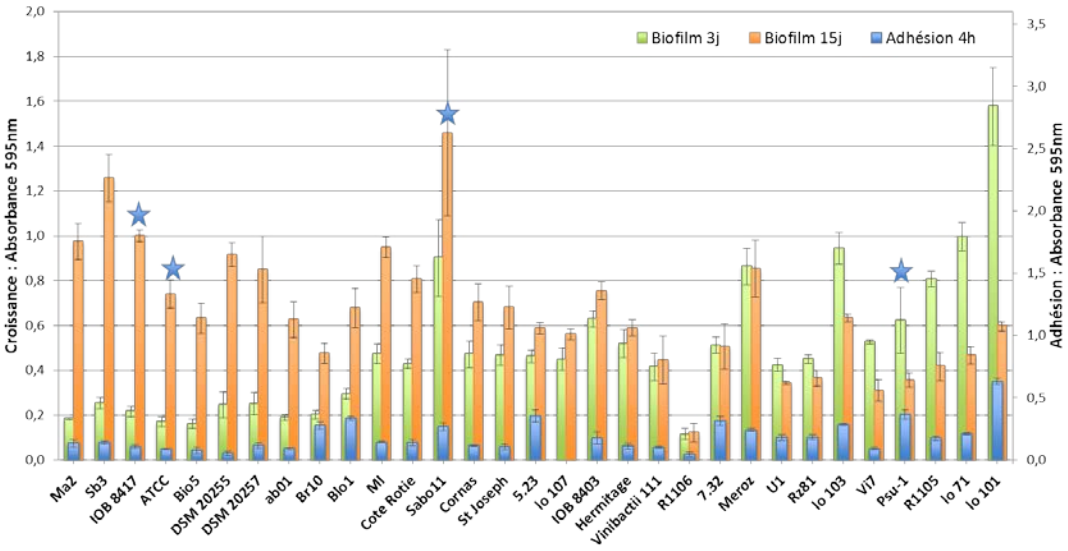


Figure 16 : Ensemble des résultats d'adhésion et de croissance de O. oeni obtenus sur microplaque de polystyrène. Axe gauche : croissance, barres vertes pour le temps 3 jours, oranges pour 15 jours (Cristal Violet 0,5%) ; Axe droit et barres bleues : adhésion au temps 4h (CV 1%). Les souches sélectionnées sont marquées d'une étoile. Les barres d'erreur représentent l'écart-type des 3 répétitions biologiques.

Quatre souches ont été sélectionnées, deux avec une forte croissance, ATCC BAA-1163 et IOB 8417, une avec une croissance plus faible, Sabo11, et une dernière avec une diminution de la biomasse, Psu-1. Le fait que les génomes de ATCC BAA1163 et de Psu-1 soient disponibles dans les bases de données a été pris en compte.

Pour analyser l'effet du support sur le développement en biofilm de *O. oeni*, les 4 souches sélectionnées ont été cultivées dans 20 ml de MRSm en présence d'un

coupon d'acier, pendant 4 heures, 3 jours et 15 jours, puis les biofilms ont été décrochés et dénombrés sur géloses (*Figure 17*).

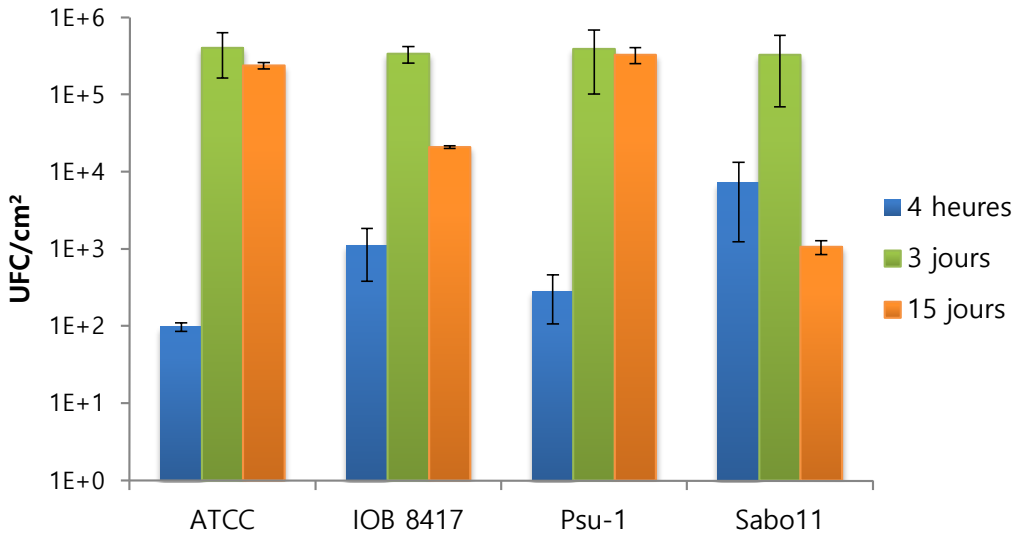


Figure 17 : Dénombrements des cultures en biofilm des 4 souches sélectionnées aux temps 4 heures, 3 jours et 15 jours. La biomasse est exprimée en UFC/cm² d'acier. Les barres d'erreur représentent l'écart-type des 3 répétitions biologiques.

Les souches ont un comportement différent de ce qui a été observé sur le support en polystyrène, tant au niveau de l'adhésion que du développement en biofilm. En effet, la biomasse maximale est atteinte plus rapidement sur acier puisque pour les 4 souches, aucune croissance n'est observée entre 3 et 15 jours de croissance. Ainsi un « effet support » est mis en évidence pour la formation du biofilm de *O. oeni*.

III.1.3 c Optimisation de la production de biofilm

Dans le but d'une production industrielle des cellules en biofilm, il est important de pouvoir réduire le temps et le coût de production des biofilms. Nous avons donc essayé d'optimiser les conditions de formation des biofilms en modifiant notamment l'ensemencement de départ et le temps de culture. Les résultats des dénombrements présentés en Figure 18 ne montrent pas de différence significative entre les conditions.

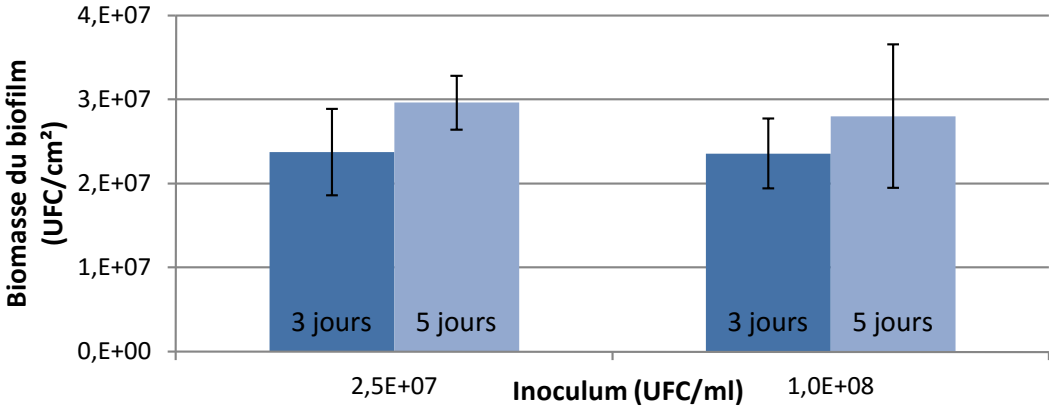


Figure 18 : Comparaison de la biomasse du biofilm de O. oeni Sabo11 sur bois en fonction de l'inoculum (2,5.10^7-10^8 UFC/ml) et du temps de culture (3-5 jours). Le test statistique ANOVA suivi du test post hoc de Tukey HSD n'a pas déterminé de condition significativement différente des autres (P=0,05).

III.1.3 d Influence de la chauffe du bois sur la formation de biofilm

La chauffe du bois est un procédé de tonnellerie visant à la fois à rendre flexible ce matériau pour le travailler et à moduler la libération des arômes par la dégradation progressive des polymères du bois. Le bois peut donc changer de propriété de surface selon la chauffe. Pour analyser l'impact de ces changements sur l'adhésion et le développement en biofilm de *O. oeni*, des cultures et dénombrements ont été réalisés sur des coupons de bois ayant subi différentes chauffes (Figure 19). Les gammes de deux producteurs ont été testées. Arobois propose trois chauffes de chêne français : légère, moyenne, forte. Seguin Moreau propose deux chauffes, moyenne et moyenne +, ainsi que deux espèces de chêne, français et américain. Les dénombrements des biofilms (1 semaine de culture) sur ces supports ne sont pas significativement différents. Quels que soient la variété de chêne étudiée ou ses niveaux de chauffe, aucune différence significative n'est observée pour l'adhésion et le développement en biofilm de *O. oeni*. En effet, sur chaque type de support testé, les 2 souches de *O. oeni* ATCC et SABO11 atteignent une population d'environ 5.10^7 UFC/cm².

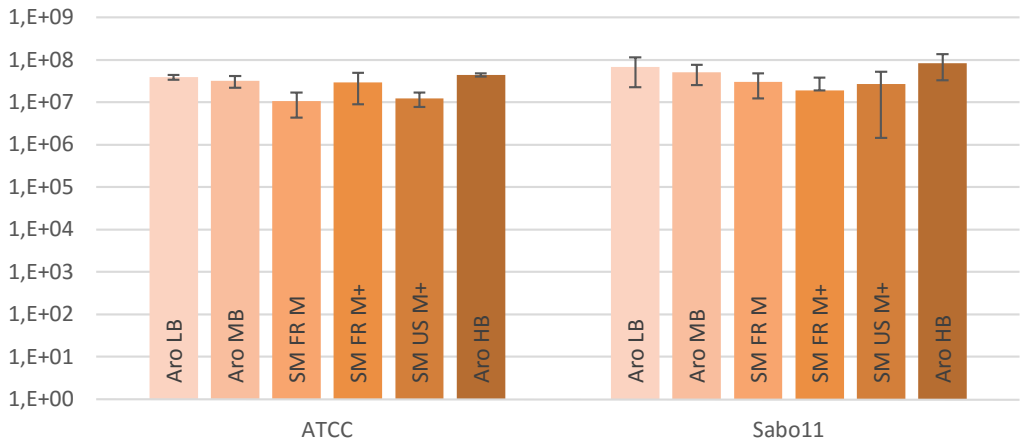


Figure 19 : Comparaison de la biomasse des biofilms de O. oeni ATCC BAA-1163 et Sabo11 sur différentes types de bois de chêne. Pour le fournisseur Arobois (Aro), il faut distinguer trois chauffes : légère (LB), moyenne (MB) et forte (HB). Pour le fournisseur Seguin Moreau (SM), il faut distinguer deux espèces de chêne : français (FR) et américain (US) ; deux chauffes : moyenne (M) et moyenne plus (M+). Le test statistique ANOVA suivi du test post hoc de Tukey HSD n'a pas déterminé de condition significativement différente des autres (P=0,05).

III.2. "*Oenococcus oeni* planktonic and biofilm life-styles differentiation by their Exopolymeric Substances"

III.2.1. Introduction

Le bois de chêne utilisé pour l'élevage du vin est le support d'adhésion de la bactérie lactique *Oenococcus oeni* qui est capable de former des biofilms. Au cours du développement du biofilm, des substances exopolymériques (EPS) sont excrétées par les cellules pour dans un premier temps renforcer l'adhésion à la surface et dans un second temps, former la matrice du biofilm. Notre approche a d'abord consisté à observer l'adhésion et la formation de biofilm de *O. oeni* sur le chêne par microscopie électronique à balayage. Ensuite, les EPS ont été extraits des cultures planctoniques et des cultures en biofilm à trois temps de formation : 3, 7 et 10 jours. Ces EPS ont été analysées par spectroscopie infra-rouge FTIR-ATR (Fourier Transformed Infrared spectroscopy by Attenuated Total Reflectance) pour en identifier les principales fonctions chimiques. L'analyse de la composition macromoléculaire et de la distribution des masses a été effectuée par chromatographie d'exclusion stérique (Size Exclusion Chromatography). Nos observations suggèrent que la structure chimique et la composition macromoléculaire des substances exopolymériques produites par *O. oeni* sous forme planctonique sont proches des substances produites par son biofilm. Cependant, des variations ont été remarquées. La masse des EPS produites est globalement supérieure pour le biofilm. Il y a également de fines variations du spectre infrarouge des deux EPS. Enfin, il y aurait des changements de la composition en protéines des EPS.

Ces résultats préliminaires sont présentés sous forme de publication, ils offrent des perspectives intéressantes mais nécessitent davantage de données pour être réellement exploités. Sous réserve de poursuites de l'étude, ils permettront de mieux connaitre la matrice du biofilm de *O. oeni* et son éventuel rôle dans la vinification.

III.2.2. Article 2

ŒNOCOCCUS OENI PLANKTONIC AND BIOFILM LIFE-STYLES DIFFERENTIATION BY THEIR EXOPOLYMERIC SUBSTANCES

Oenococcus oeni Planktonic and Biofilm Life-Styles Differentiation by their Exopolymeric Substances

Alexandre Bastard [a,b], Christian Coelho [b,*], Clément Lesniak [b], Régis D. Gougeon [b], Stéphanie Weidmann [a], Jean Guzzo [a]

[a] UMR A 02.102 PAM AgroSup Dijon, Université de Bourgogne, Equipe Valmis, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, rue Claude Ladrey, 21078 Dijon, France.

[b] UMR A 02.102 PAM AgroSup Dijon, Université de Bourgogne, Equipe PAPC, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, rue Claude Ladrey, 21078 Dijon, France.

KEYWORDS: *Oenococcus oeni*, biofilm, EPS, matrix, oak, planktonic

Abstract

Oak wood is the host of *Oenococcus oeni* adhesion and most likely biofilm formation. All along the biofilm development, exopolymeric substances are excreted by cells, in order to strengthen the surface adhesion and forming the matrix. Our approach involved a prior observation of *O. oeni* adhesion to oak surface by Scanning Electron Microscopy. Then, exopolymeric substances (EPS) from cell culture supernatant were extracted. They were analyzed by Infra-Red spectroscopy via Fourier Transformed Infrared spectroscopy by Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR) at three distinct times of the biofilm formation. A macromolecular composition and distribution analysis was performed by size exclusion chromatography equipped with a photodiode array detector. All our observations tend to confirm that chemical structure and macromolecular composition of exopolymeric matrices evolves mutually with the biofilm development, traducing a biological activity intra-biofilm of *O. oeni* producing preferentially amino linkages with the surface when the biofilm is well solidified. Peptidoglycan binding proteins appeared to be potential candidates, present in exopolymeric substances that differentiate *O. oeni* physiological lifestyles.

Introduction

Malolactic fermentation occurs in wine after the alcoholic fermentation. This second fermentation is mostly due to the bacteria *Oenococcus oeni* in a planktonic life-style. *O. oeni* cells initially possess genetic information organized in operons which enable them to grow under wine conditions: notably the malate and the citrate operons (Mills *et al.*, 2005). The first one enable the decarboxylation of malic acid into lactic acid in the presence of Mn^{2+} and NAD^{+}, reducing wine acidity, accompanied by a production of carbon dioxide. The second one leads to the accumulation of diacetyl, acetic acid, acetoin and 2,3-butanediol contributing to organoleptic changes (Alexandre *et al.*, 2008).

Generally across wine regions and especially in Burgundy, malolactic fermentation occurs during wine aging in oak barrels. This technique confers a chemical stabilization and increases the organoleptic quality of the final product (Sauvageot and Vivier, 1997; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012b). In particular, *O. oeni* liberates enzymes, notably glycosidases, that hydrolyze glycosylated compounds in oak wood such as vanillin, participating to the woody and toasted aroma of wine (Bloem *et al.*, 2008). Other enzymes like esterases or proteases can be liberated, all of them generating volatile compounds. A recent review has described the high variability between *O. oeni* strains and their potential to impact on wine sensory attributes (Bartowsky and Borneman, 2011).

In a context of MLF driven in oak barrels, *O. oeni* cells can potentially adhere to the surface of oak, forming a biofilm (Bastard *et al.*, submitted). Biofilms are microbial communities sheltered in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS). Biofilm formation represents a protective mode of growth that allows microorganisms to survive in hostile environments and disperse seeding cells to colonize new niches under desirable conditions. These sessile microbial communities are physiologically distinct from free-living planktonic counterparts (Monroe, 2007; Coenye, 2010). In wine environment, biofilm is considered to act as a protective barrier for cells against external stresses such as a low pH (between 3 and 3.5) and a low temperature in the case of wine, so that malolactic fermentation successfully completes (Bastard *et al.*, submitted).

Biofilm growth starts first with a reversible then irreversible cells attachment on the surface, followed by a maturation phase and the end of life of the biofilm lasts with a dispersion phase (Walker and Marsh, 2004; Monroe, 2007). During the attachment phase, the bacterial metabolism changes, cells reorients on the surface and secrete exopolymeric substances (EPS). Such EPS are used as building blocks for the auto-organization of bacteria in the biofilm structure. They are made of exopolysaccharides, proteins, extracellular DNA and signaling molecules (Sutherland, 2001; Whitchurch *et al.*, 2002). The composition of these exopolymeric substances from *O. oeni* biofilm life-style is unknown. However, a characterization of the planktonic exopolysaccharides was established by Dimopoulou *et al.* (Dimopoulou *et al.*, 2012, 2014, 2015). The mechanism of biosynthesis of these exopolymeric substances have been recently reviewed and regrouped in four different pathways (Schmid *et al.*, 2015) : (i) the Wzx/Wzy-dependant pathway, (ii) the ATP-binding cassette (ABC) transporter dependent pathway, (iii) the synthase-dependent pathway or (iv) the extracellular synthesis by use of a single sucrose protein. These pathways are involved in the production of homopolymers (iii and iv) or heteropolymers (i and ii). Only few studies focus on exopolysaccharides produced by *O. oeni* and only in a planktonic state, which means without a substrate material for bacteria to adhere (Dimopoulou *et al.*, 2012, 2014, 2015). Genetic studies covering 20 species of *O. oeni* bacteria showed that several potential genes or operons could be involved in the expression and production of exopolysaccharides: two dextransucrase genes, one levansucrase gene, one glycotransferase gene and two heteropolysaccharide (heP) operons (Dimopoulou *et al.*, 2014).

Techniques for visualizing bacterial biofilm on the surface of a solid material (polystyrene, steel, wood) are mostly based on microscopic, tomographic and spectroscopic techniques (Nivens *et al.*, 1993; Whitchurch *et al.*, 2002; Ghigo, 2003; Monroe, 2007; Ibarburu *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2011; Bales *et al.*, 2013; Gloaga *et al.*, 2013). Thanks to SEM, we could observe at micrometric scale EPS connections between bacteria, within a biofilm adhered to a solid surface. With ATR-FTIR technique, we were able to identify EPS chemical functions, especially those present in polysaccharides, and proteins (Nivens *et al.*, 1993; Gué *et al.*, 2001; Delille *et al.*, 2007).

To our knowledge, no study evaluated the impact of the mode of life on the production of EPS in *O. oeni*. That is why, the purpose of our study is to investigate EPS composition of four strains of *O. oeni* in biofilm, with a focus on the proteins content.

Materials & Methods

Bacterial Strains. This study was conducted using four *O. oeni* strains: ATCC BAA-1163 (Red wine, France), IOB 8417 (Bordeaux wine, France), Sabo11 (Red wine South Africa), PSU-1 (Pennsylvania red table wine). Bacteria were grown in MRS modified medium (MRSm) which contained: MRS Broth conda® 50 $g.l^{-1}$; fructose 10 $g.l^{-1}$; L-malic acid 4 $g.^{l-1}$. The pH was adjusted to 4.8.

EPS-Producing Strains and Culture Conditions. In planktonic cultures, *O. oeni* grew in MRSm during three days, inoculated at 2.10^7 $CFU.ml^{-1}$. In biofilm life-style, oak chips were immersed in MRS medium inoculated at 2.10^7 $CFU.ml^{-1}$. This medium was renewed every 3 days during the biofilm formation (3, 7 and 10 days).

Biofilm observation by Scanning Electron Microscopy. The cells were fixed on the oak chip by a solution of 1% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer pH 7.5 for 3 hours at 4°C. Then, they were washed three times with a 0.1 M phosphate buffer pH 7.5 for 20 minutes at room temperature. The cells were dehydrated by successive baths in increasing ethanol content (70, 90, 100%) and three times for 10 minutes in successive baths of 10 minutes of an acetone/ethanol mixture (70/30, 50/50, 30/70, 100). Then the sample was dried and coated with gold in an Edwards HHV Scancoat Six. The samples were then observed at an accelerating voltage of 10 kV using a Hitachi SU1510 scanning electron microscope.

EPS Isolation. Cells were removed from the 500 ml culture medium by centrifugation (8,000×g, 20 min). The exopolymeric substances (EPS) from both planktonic and biofilm cultures were extracted by ethanol precipitation (Ibarburu *et al.*, 2007). The supernatant was dehydrated by a rotary evaporator (30°C; 4 hours). Three volumes of cold ethanol were added to the supernatant in order to precipitate

the EPS. The solutions were let to stand for 24 hours at 4°C. Then, they were centrifuged (18,000×g, 30 min, 4°C) to eliminate insoluble material and the pellet was washed with ethanol (80% vol), centrifuged again, and then air-dried. Crude EPS produced by *O. oeni* were freeze-dried and weighted.
EPS were recovered and monitored for carbohydrates and proteins using the phenol sulfuric acid method and the Folin method, respectively.

Chemical Characterization of EPS.

Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR). FTIR experiments were performed in the attenuated total reflection (ATR) mode using a Thermo Scientific Nicolet iS5 and a diamond crystal. Each freeze-dried EPS was gently placed on the surface of the diamond and pressed with a constant force with a torque screwdriver. Each spectrum is acquired at a 4 cm^{-1} resolution and represents the accumulation of 32 scans.

Size Exclusion Chromatography (SEC). Two mg of each freeze-dried EPS was dissolved in 1 ml of ultrapure water. Separation was carried out in a HPLC system (VWR hitachi) using one TSK-Gel G3000 PW_{XL} column at 25 °C and a 0.1 M $NaNO_3$ mobile phase at constant flow rate 0.5 $ml.min^{-1}$. After separation, a photodiode array (PDA) set at 280 nm was used for detection. Apparent average molecular weight of EPS eluted peaks was determined using a calibration curve obtained with commercial standards (dextran and protein standards).

nanoLC-MS-MS analysis of EPS. Each EPS were digested with trypsin (Promega) during one night. Protein extraction was realized ultrasonically in a solution of acetonitrile/water/formic acid (80/19.5/0.5). The supernatant was dried during 15 minutes in a speed vacuum before being injected in a nano-LC (Ultimate 3000, Dionex). The flow rate through the C18 separation column (length 25 cm, diameter 75 µm) was set at 0.4 µL/min using the following gradient: acetonitrile/water/formic acid (80/19.5/0.5) from 0 to 55% in 50 minutes. The chromatographic system is coupled to an Ion Trap (LTQ velos, Thermoelectron). Each MS analysis is followed by 10 successive MS-MS analysis of most abundant

MS peaks. Protein identification was performed with the ProteinScape softwarer (Bruker) using the Mascot protein database search algorithm.

Results and Discussion:

EPS production by *Oenococcus oeni* is function of its lifestyle

To evaluate the importance of the EPS production in both culture conditions, the quantity of EPS produced was evaluated. Four strains were studied: ATCC BAA-1163 (Red wine, France), IOB 8417 (Bordeaux wine, France), Sabo11 (Red wine South Africa), PSU-1 (Pennsylvania red table wine). Masses of extracted EPS from these strains under planktonic (PL) and biofilm (BF) culture are shown in Figure 1. Generally the planktonic EPS mass is comprised between 170 and 380 mg for the planktonic lifestyle for all strains. These amounts are comprised within the range of values obtained for five strains but with two different media (Dimopoulou *et al.*, 2012). Biofilm EPS mass tends to be higher, with a range from 140 to 990 mg. Due to the extraction protocol, EPS masses have variable values. It is difficult to obtain significant differences between groups, only trends could be observed.

This observed increase of EPS production at different incubation times from one strain to another suggest that the four *O. oeni* strains behave differently in contact to the wood substrate during adhesion and maturation phases of the biofilm formation. We can assume that these EPS amounts may be linked with development and maturation of the biofilm. For further interpretation, cell counts on each development step are required for each strains, as it was done for ATCC (Bastard *et al.*, submitted).

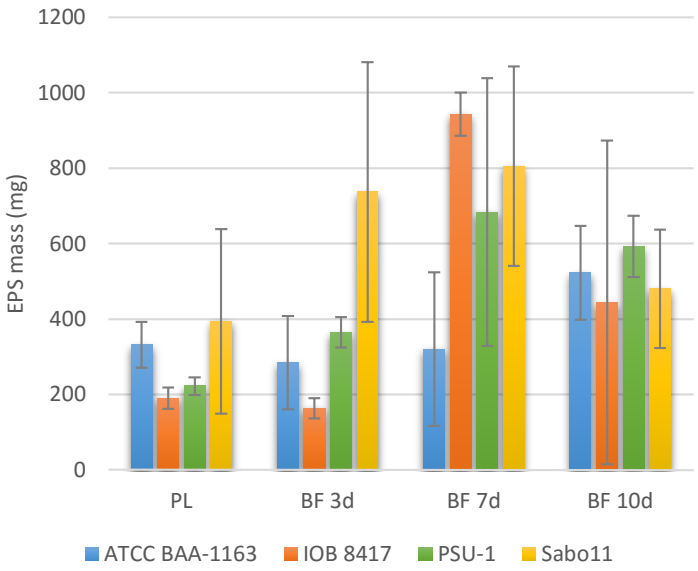


Figure 1: EPS mass obtained for the four studied strains in function of its growing conditions: planktonic (PL) or biofilm (BF) after 3, 7 and 10 days of incubation

EPS contain chemical information which can be assessed by global characterization in terms of protein and polysaccharide contents quantification. In our experiments, EPS contain between 25% and 35% of proteins and ranged from 5 to 20 % of polysaccharides. The other components could be nucleic acid substances and maybe water in case of an ineffective dry. Though, these ratios are similar to those obtained in other matrices (*i.e.* ≈50% protein, ≈20% polysaccharides) (Frølund *et al.*, 1996; Jahn *et al.*, 1999; Sutherland, 2001).

EPS microscopic and spectral signatures

The presence of biofilm population on oak consisting of cells in the EPS matrix is confirmed by scanning electron microscopy (SEM) observation. Moreover, ATR-FTIR spectra of biofilm on wood surface were recorded. Figure 2B shows cell attachment of PSU-1 strain and its biofilm organization on wood fibers and inside visible cracks. *O. oeni* cells are approximately 0.5 µm long and they are present in colonies on wood fibers providing clear evidence of *in situ* cell proliferation. In our culture conditions, the bacterial biofilm recovers almost the entire surface of oak chips after 10 days under the growing conditions. Interestingly, a 10-days biofilm spectra reveal a very close biofilm structure to the one of EPS released by the biofilm at the end of 10 days-growth (Figure 2C). This suggest that EPS constituting

the matrix surrounding and attaching cells on oak are chemically close to EPS released by the biofilm at 10 days growth. ATR-FTIR spectra exhibit major bands at 3200 cm^{-1} (O-H stretch), 2900 cm^{-1} (C-H stretch), 1650 cm^{-1} and 1575 cm^{-1} (amide I and amide II, respectively, N-H bend), 1400 cm^{-1} (carboxylic acid stretch) and 1000 cm^{-1} (C-O and C-N stretches). These observations indicate that the main bio-macromolecules that can be associated with these bands are proteins (due to the presence of amide functions) and polysaccharides (due to the O-H and C-O stretches). Unfortunately some regions of the spectra cannot be exploited due to overlaps between EPS and MRSm bands (1550 cm^{-1} associated with amide N-H bending) or EPS bands with wood (region comprised between 1750 and 1650 cm^{-1} associated with esters and amides C=O stretch).

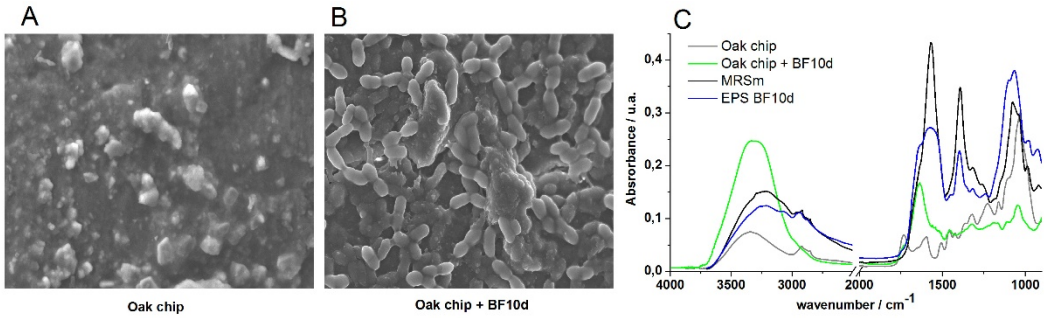


Figure 2: SEM observations of the surface of oak chip before ATCC BAA-1163 incubation (A x10000) and after 10 days of biofilm growth (B x10000) and ATR-FTIR spectra of the same samples with additional MRSm culture media and the freeze-dried EPS harvested after 10 days of biofilm growth (C).

EPS – markers of bacterial physiology

All extracted EPS from the four strains of *O. oeni* that were produced under planktonic and sessile conditions, were analyzed with their ATR-FTIR spectra. In order to visualize chemical changes and evolution inside EPS composition, a partial least squares (PLS) was carried out and results are presented in Figure 3.

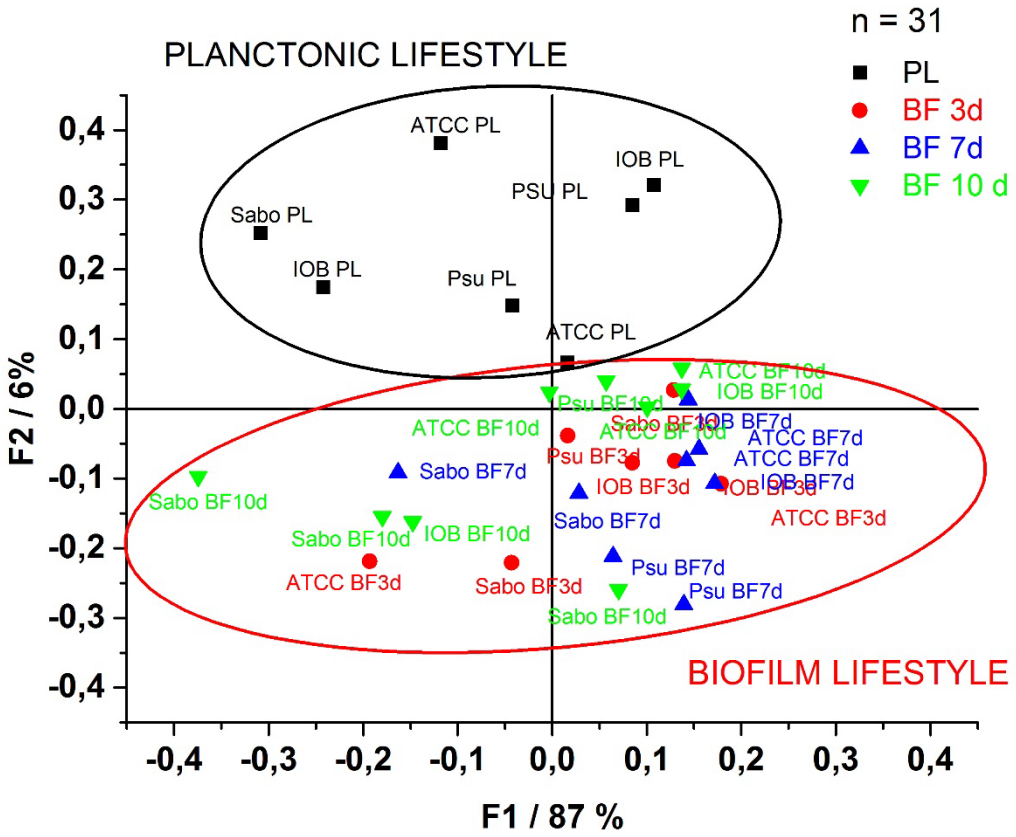


Figure 3: Partial least squares analysis of ATR-FTIR spectra of EPS from the four O. oeni strains, depending on their growing conditions: planktonic (PL) and biofilm (BF) lifestyles at 3, 7 and 10 days of incubation.

PLS results explain 93% of the variability of the entire spectra acquired on 31 different EPS. The main component F1 explains 87% of the variability of the spectra of the 4 strains without clear differentiation among strains and their growing conditions. However a slight discrimination between planktonic lifestyle and their biofilm lifestyle is observed along F2. This result suggests that EPS contain spectroscopic evidence of bacterial physiological state. However this information is not sufficient to differentiate the various stages of biofilm growth during 10 days, suggesting that no chemical change was observed in our experimental procedure. Likewise, spectral information collected by ATR-FTIR do not discriminate EPS obtained from different strains of *O. oeni*, meaning that EPS is not specific to an individual strain but rather to a physiological state of the bacteria. Such conclusions are in accordance with the study of the FTIR spectra evolution of a biofilm formation from *Pseudomonas fluorescens* (Delille *et al.*, 2007).

Protein composition of bacterial EPS

As no information are available on EPS protein composition, we pinpoint this fraction of the total extract. EPS protein composition was determined by size exclusion chromatography, with a UV detection set at 280 nm adapted to protein detection. Figure 4 illustrates chromatograms obtained with biofilm EPS at three growth times *vs.* planktonic EPS. A peak eluted between 10 and 12 minutes (200 kDa) is common for all samples included the growth medium. It reveals that a possible contamination occurred on the extracted EPS.

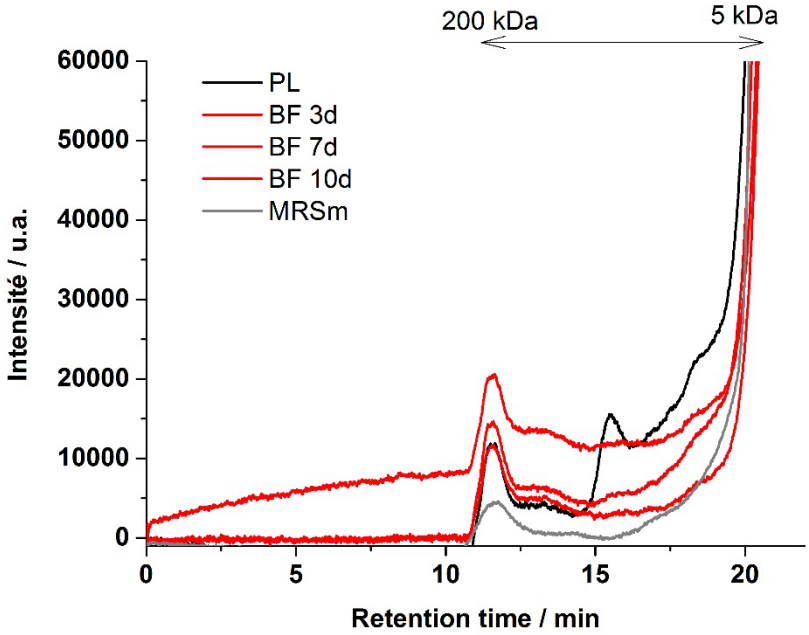


Figure 4: Chromatographic profiles of extracted EPS from planktonic (PL) and biofilm (BF) lifestyles after 3, 7 and 10 days of growing conditions. Detection is set at 280 nm. O. oeni ATCC BAA-1163 representative of the four strains is shown.

Interestingly a molecular weight distribution comprised between 30 and 40 kDa (eluted between 15 and 16 minutes) is only visible on EPS produced under a planktonic lifestyle. Such observation has also been validated for other studied strains of *O. oeni* (results not shown). Size exclusion chromatography highlighted differences between EPS produced by biofilms and those produced by planktonic cells. Yet, biofilm culture time does not seem to impact EPS composition.

Complementary results to be confirmed

The proteomic analysis carried on EPS produced under a planktonic lifestyle and a biofilm lifestyle is presented in Table 1. In planktonic lifestyle, EPS contain five proteins whereas there are only two in the biofilm.

Table 1: Proteins from planktonic EPS and biofilm EPS growth condition

Protein name	**MW (kDa)**	**Number of peptides matched**	**Sequence coverage (%)**	**Phenotype**
Peptidoglycan-binding protein	34.4 36.5 *10.2*	2 4 *1*	11.7 13.0 *14.1*	Planktonic Biofilm *Biofilm*
Secreted antigen SagA	42.1 "	2 *1*	9.2 *3.5*	Planktonic *Biofilm*
Cold-shock DNA-binding protein	7.4 "	2 2	28.4 41.8	Planktonic Biofilm
Cell wall hydrolase	36.4	5	19.2	Planktonic
Hypothetical protein	18.7	2	14.9	Planktonic

Proteins with only one identified peptide are shown in italic in Table 1 since they cannot be ascertained by the Mascot validation criteria. Cold-shock DNA-binding protein is present in both bacterial physiology. Biofilm and planktonic lifestyle are also characterized by EPS production containing different peptidoglycan-binding proteins with molecular weight of 36.5 and 34.4 kDa, respectively. Such proteins appear to be good candidates as building block units for cells attachment in the three dimensional structure of the biofilm. However, this study is still in progress, the analysis of all strains and repetitions are required.

Conclusion

EPS from *Oenococcus oeni* extracted from two different lifestyles (planktonic and sessile) show different profiles of production within the four studied strains (ATCC BAA-1163, IOB 8417, Sabo11, PSU-1). ATR-FTIR spectra confirm that these EPS are present at the surface of oak chip once *Oenococcus oeni* cells develop a biofilm structure. They can be considered as good markers of bacterial physiology due to composition difference between planktonic EPS *vs*. biofilm. A proteomic analysis performed on EPS suggest a possible involvement of different peptidoglycan binding proteins excreted, this could explain the behavior difference of *O. oeni* depending on its growth condition These are promising results for winemaking, since *O. oeni* is largely used for MLF that are carried out in oak barrels. All these results are yet to consider carefully since additional analyzes are required.

Acknowledgement

We gratefully acknowledge the *Conseil Régional de Bourgogne* for its financial support. We would like to thank Marie-Laure Léonard (ESIREM, Dijon, France), Aline Bonnotte 479 (INRA, Dijon, France) and Frédéric Herbst (ICB, Dijon, France) for their technical assistance on FTIR-ATR analysis and microscopy observations.

Abbreviations

SEM: Scanning Electronic Microscopy

FTIR-ATR: Fourier Transform Infra-Red – Attenuated Total Reflectance

EPS: Exopolymeric substances

PLS: Partial Least Squares

References

Alexandre, H., Grandvalet, C., Guilloux-Benatier, M., Remize-Barnavon, F., and Tourdot-Maréchal, R. (2008). Les bactéries lactiques en œnologie. Lavoisier.

Bales, P. M., Renke, E. M., May, S. L., Shen, Y., and Nelson, D. C. (2013). Purification and characterization of biofilm-associated EPS

exopolysaccharides from ESKAPE organisms and other pathogens. PloS One 8, e67950.

Bartowsky, E. J., and Borneman, A. R. (2011). Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. Appl. Microbiol. Biotechnol. 92, 441–447. doi:10.1007/s00253-011-3546-2.

Bastard, A., Coelho, C., Gougeon, R. D., Alexandre, H., Briandet, R., Cannette, A., Weidmann, S., and Guzzo, J. (submitted). Induction of malolactic fermentation by the biofilm of *Oenococcus oeni*, a new solution to trigger the fermentation process and ensure the organoleptic qualities of wine. Front. Microbiol.

Bloem, A., Lonvaud-Funel, A., and de Revel, G. (2008). Hydrolysis of glycosidically bound flavour compounds from oak wood by *Oenococcus oeni*. Food Microbiol. 25, 99–104. doi:10.1016/j.fm.2007.07.009.

Coenye, T. (2010). Response of sessile cells to stress: from changes in gene expression to phenotypic adaptation: Phenotypic adaptation to stress in biofilms. FEMS Immunol. Med. Microbiol., no–no. doi:10.1111/j.1574-695X.2010.00682.x.

Delille, A., Quilès, F., and Humbert, F. (2007). *In situ* Monitoring of the Nascent Pseudomonas fluorescens Biofilm Response to Variations in the Dissolved Organic Carbon Level in Low-Nutrient Water by Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Appl. Environ. Microbiol. 73, 5782–5788. doi:10.1128/AEM.00838-07.

Dimopoulou, M., Bardeau, T., Ramonet, P.-Y., Miot-Certier, C., Claisse, O., Doco, T., Petrel, M., Lucas, P., and Dols-Lafargue, M. (2015). Exopolysaccharides produced by *Oenococcus oeni*: from genomic and phenotypic analysis to technological valorization. Food Microbiol. doi:10.1016/j.fm.2015.07.011.

Dimopoulou, M., Hazo, L., and Dols-Lafargue, M. (2012). Exploration of phenomena contributing to the diversity of *Oenococcus oeni* exopolysaccharides. Int. J. Food Microbiol. 153, 114–122. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.024.

Dimopoulou, M., Vuillemin, M., Campbell-Sills, H., Lucas, P. M., Ballestra, P., Miot-Sertier, C., Favier, M., Coulon, J., Moine, V., Doco, T., *et al.* (2014). Exopolysaccharide (EPS) Synthesis by *Oenococcus oeni*: From Genes to Phenotypes. PLoS ONE 9, e98898. doi:10.1371/journal.pone.0098898.

Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., and Nielsen, P. H. er (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. Water Res. 30, 1749–1758.

Ghigo, J. M. (2003). Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? Res. Microbiol. 154, 1–8. doi:10.1016/S0923-2508(02)00012-8.

Gloaga, E. S., Turnbulla, L., Huangb, A., Vallottonc, P., Wangd, H., Nolana, L. M., Milillie, L., Hunte, C., Lua, J., Osvatha, S. R., *et al.* (2013). Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. FEMS

Microbiol. Rev. 36, 149–164. doi:10.1073/pnas.1218898110/-/DCSupplemental.

Gué, M., Dupont, V., Dufour, A., and Sire, O. (2001). Bacterial swarming: a biochemical time-resolved FTIR-ATR study of Proteus mirabilis swarm-cell differentiation. Biochemistry (Mosc.) 40, 11938–11945.

Ibarburu, I., Soria-Díaz, M. E., Rodríguez-Carvajal, M. A., Velasco, S. E., Tejero-Mateo, P., Gil-Serrano, A. M., Irastorza, A., and Dueñas, M. T. (2007). Growth and exopolysaccharide (EPS) production by *Oenococcus oeni* I4 and structural characterization of their EPSs. J. Appl. Microbiol. 103, 477–486. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03266.x.

Jahn, A., Griebe, T., and Nielsen, P. H. (1999). Composition of pseudomonas putida biofilms: Accumulation of protein in the biofilm matrix. Biofouling 14, 49–57. doi:10.1080/08927019909378396.

Jiang, P., Li, J., Han, F., Duan, G., Lu, X., Gu, Y., and Yu, W. (2011). Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium Vibrio sp. QY101. PLoS One 6, e18514.

Mills, D. A., Rawsthorne, H., Parker, C., Tamir, D., and Makarova, K. (2005). Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking. FEMS Microbiol. Rev. 29, 465–475. doi:10.1016/j.femsre.2005.04.011.

Monroe, D. (2007). Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. PLoS Biol. 5, e307. doi:10.1371/journal.pbio.0050307.

Nivens, D. E., Chambers, J. Q., Anderson, T. R., Tunlid, A., Smit, J., and White, D. C. (1993). Monitoring microbiol adhesion and biofilm formation by attenuated total reflection/Fourier transform infrared spectroscopy. J. Microbiol. Methods 17, 199–213. doi:10.1016/0167-7012(93)90047-L.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., and Dubourdieu, D. (2012b). Traité d'oenologie-Tome 2-6e éd.-Chimie du vin. Stabilisation et traitements. Dunod.

Sauvageot, F., and Vivier, P. (1997). Effects of malolactic fermentation on sensory properties of four Burgundy wines. Am. J. Enol. Vitic. 48, 187–192.

Schmid, J., Sieber, V., and Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: Biosynthesis pathways and engineering strategies.

Sutherland, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology 147, 3–9.

Walker, J. T., and Marsh, P. D. (2004). A review of biofilms and their role in microbial contamination of dental unit water systems (DUWS). Int. Biodeterior. Biodegrad. 54, 87–98. doi:10.1016/j.ibiod.2004.03.012.

Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., and Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. Science 295, 1487. doi:10.1126/science.295.5559.1487.

IV) Discussion et perspectives

La fermentation malolactique est une étape essentielle de la vinification pour un grand nombre de vins afin de les désacidifier, de les stabiliser et dans certains cas d'en accroître la qualité organoleptique. Cette fermentation est généralement réalisée par l'espèce *Oenococcus oeni*. Lorsque cette seconde fermentation est réalisée en fût de chêne, elle permet au vin de gagner des arômes boisés. Mais le vin est un milieu particulièrement hostile à la croissance et à la survie des microorganismes. Pour persister dans ces conditions, *O. oeni* actionne des mécanismes de résistance au stress. L'un d'entre eux pourrait être la formation de biofilms.

Dans les chais, le biofilm joue un grand rôle, qu'il soit positif ou négatif, car ce mode de vie permet aux micro-organismes de subsister. En particulier, le nettoyage et la décontamination du matériel de cave (tuyau, pompes) et des contenants (cuves en acier, en béton et fût en bois) est une problématique récurrente. Cela permet d'éviter le développement de « flores d'altération » telles que des *Brettanomyces* ou des bactéries acétiques, qui sont connues pour former des biofilms (Crueger and Crueger, 2006; Joseph *et al.*, 2007). En revanche, le biofilm pourrait être également impliqué dans la persistance d'une année à l'autre des microorganismes fermentaires, appelés « flore de cave ». Celle-ci présente un grand intérêt car elle joue un rôle important dans la fermentation spontanée du moût (Santamaría *et al.*, 2005; Grangeteau *et al.*, 2015). De plus, en colonisant une surface, le biofilm pourrait jouer un rôle protecteur en évitant de laisser une place libre aux microorganismes indésirables (Roth and James, 1989).

Un des premiers objectifs de cette thèse était de caractériser le biofilm de *O. oeni*, pour en analyser les propriétés technologiques et enfin évaluer l'impact de ce biofilm à l'interface des échanges entre le fût de chêne et le vin.

Caractérisation des biofilms de *O. oeni*

Une fois le processus de vinification achevé, des prélèvements sur des fûts ont été réalisés et ont permis de mettre en évidence la persistance de plusieurs microorganismes (levures et bactéries) dont *O. oeni*. Ainsi, cette espèce bactérienne est capable de persister dans cet environnement. Il nous est donc apparu primordial de montrer que *O. oeni* était capable d'adhérer sur différents supports : polystyrène, acier et bois, et de se développer en biofilm. Il est cependant difficile de comparer l'adhésion sur le support en polystyrène avec les deux autres à cause de divergences de protocole. Le support polystyrène est une microplaque de 96 puits qui a été utilisée pour réaliser un *screening* de 30 souches de *O. oeni* avec la méthode du cristal violet et les observations en microscopie confocale. En revanche, la méthodologie utilisée pour les supports acier et bois est comparable puisque la taille des coupons et le protocole utilisé pour l'obtention de la biomasse ont été standardisés. Sur acier, le biofilm semble être mature à partir de 1 semaine de culture avec 10^6 UFC/cm^2. En revanche, sur bois le biofilm continue légèrement à se développer jusqu'à deux semaines. La biomasse obtenue sur bois est nettement supérieure à celle obtenue sur acier : près de 100 fois plus. Ce résultat n'est pas étonnant puisque l'acier est un support couramment utilisé dans l'industrie agro-alimentaire qui présente des propriétés de surface limitant l'adhésion des microorganismes. Au contraire, le bois est un matériau biologique qui présente à sa surface de nombreuses fonctions chimiques qui portent des charges et ont des propriétés hydrophobes et hydrophiles. De plus, l'aspect rugueux, le relief important à l'échelle microscopique et la présence de cavités (anciens vaisseaux de la matière végétale) font que le bois est idéal pour l'adhésion de micro-organismes (structure microporeuse).

Les observations au MEB ont confirmé le développement d'un biofilm sur le bois. Les cellules sont logées dans les interstices du bois et sont solidement attachées au support. La matrice est nettement visible, avec des EPS qui englobent les cellules. Par certains endroits, elle les recouvre complètement, si bien que les cellules ne peuvent plus être distinguées les unes des autres. Le suivi de la croissance du biofilm par microscopie confocale en *time-lapse* a permis de mesurer le biovolume sur 40 heures. Après une phase de latence de 12 heures, le biovolume a fortement augmenté, en passant de 10^5 µm^3 à 4.10^5 µm^3 en 8 heures. Puis il est resté à ce

niveau pendant 20 heures. Cette croissance en biofilm est très rapide comparée à celle obtenue sur le bois, quasiment 15 fois plus, même si les conditions de cultures sont difficiles à comparer (volumes de culture et inoculum différents). Le biovolume du biofilm de *O. oeni* est comparable à celui d'autres bactéries lactiques comme *L. casei, L. plantarum, L. fermentum* qui ont le même ordre de grandeur de biovolume à 24h (Rieu *et al.*, 2014).

La microscopie confocale à balayage laser permet de multiples applications pour l'étude des biofilms. Le marquage des EPS par des lectines spécifiques (FLBA) de monomères osidiques permettrait ainsi de mieux connaitre la composition de la matrice (Lawrence *et al.*, 2007; Neu and Lawrence, 2014). Il pourrait également être envisagé d'explorer les zones métaboliquement actives au sein du biofilm, c'est-à-dire les cellules réalisant la FML, par un fluorochrome sensible au pH intracellulaire ou extracellulaire (Marcotte and Brouwer, 2005; Han and Burgess, 2010; Chen *et al.*, 2013; Bouix and Ghorbal, 2015). Toutefois, pour l'étude du biofilm sur bois, il faut résoudre la problématique du marquage de ce dernier par les fluorochromes. Ce phénomène a été constaté lors d'études au laboratoire, il est sans doute dû à la grande variabilité des fonctions chimiques du bois qui est un matériau biologique. Une fois cette difficulté surmontée, l'observation du biofilm *in situ* pourrait être envisagée par une découpe du fût. Cependant, les vibrations occasionnées par une scie sont susceptibles de décrocher le biofilm ou d'en altérer la structure. Il faudrait donc trouver un moyen de découper une douelle avec un procédé non destructif.

Le biofilm de *O. oeni* est capable de résister aux stress du vin

Les biofilms sont une forme de vie des bactéries qui leur permet de mieux résister aux conditions environnementales défavorables (Kubota *et al.*, 2008; Anderson and O'Toole, 2008; Coenye, 2010). Nous nous sommes donc intéressés à la résistance au stress du biofilm de *O. oeni*. En effet, des cellules décrochées de biofilms sont résistantes au stress du vin alors que les cellules planctoniques, dans les mêmes conditions, meurent en quelques heures. La résistance au stress de *O. oeni* a été largement étudiée, notamment en ce qui concerne l'expression des HSP et sHSP ainsi que la régulation de la fluidité de la membrane (Chu-Ky *et al.*, 2005;

Grandvalet *et al.*, 2008; Guzzo, 2011; Maitre *et al.*, 2014). Ainsi nous avons voulu savoir si des gènes marqueurs de l'état de stress (Beltramo *et al.*, 2006) étaient exprimés chez *O. oeni* en biofilm. Certaines études de l'expression de gènes de stress par les cellules de *P. aeruginosa* ont montré que ceux-ci ont une plus forte expression lorsque les cellules sont organisées en biofilm (Coenye, 2010). D'après notre analyse, aucune surexpression des gènes marqueurs du stress (*cfa, clpL1, groESL, hsp18*) n'a été mesurée. Pour expliquer ces résultats, deux hypothèses peuvent être avancées :

- Le biofilm a été cultivé pendant 14 jours et le milieu de culture n'a pas été renouvelé depuis 3 jours. Il se trouve donc dans une situation relativement peu stressante et avec un métabolisme probablement ralenti. Il est possible que les gènes de stress aient déjà été exprimés et que le contingent de protéines soit déjà présent. Une faible expression de ces gènes permettrait ainsi d'économiser des ressources. Le biofilm pourrait être considéré comme une phase de latence avancée (Abdallah *et al.*, 2014).
- L'analyse des gènes de stress est globale, cela donne une vision moyennée de l'expression de toutes les cellules. Le biofilm étant constitué de strates de cellules, il est connu pour être hétérogène (Costerton *et al.*, 1994). Il est donc possible que les cellules des couches externes expriment plus fortement des gènes de stress que les cellules au cœur du biofilm. Cependant lorsque les cellules en biofilm sont soumises à un environnement stressant comme le vin (≥12% éthanol et pH≤3.5), elles sont capables de mettre en place une réponse adaptative par le biais de l'expression de gènes de stress tels que *clpL* et *hsp18*, des marqueurs de stress avérés de *O. oeni* (Beltramo *et al.*, 2006).

Nous avons donc montré que les gènes marqueurs du stress sont exprimés lorsque le biofilm est plongé dans le vin. En revanche sans stress, les cellules en biofilm n'expriment pas à un degré important ces gènes de stress. Nous pouvons donc suggérer que la matrice extracellulaire peut assurer un effet protecteur permettant aux cellules de survivre dans les premiers temps suite à un ensemencement direct dans le vin. Puis dans un deuxième temps, les bactéries en biofilm développent une réponse adaptative au stress qui optimise leur survie dans le temps.

La matrice d'EPS est largement décrite comme jouant un rôle prépondérant dans la survie des cellules en biofilm dans les environnements défavorables (Flemming and Wingender, 2010). Pour connaitre le rôle de la matrice exopolysaccharidique, nous avons analysé l'expression des gènes impliqués dans la synthèse d'EPS de nature polysaccharidique : *levO* (levansucrase), *dsrO* (dextransucrase), *wobB* (rhamnosyltransférase) et *wobO*. Leur faible expression dans un biofilm de 14 jours de culture nous suggère que le biofilm est mature après ce temps d'incubation et de développement. En revanche, lorsque le biofilm est plongé dans le vin, celui-ci exprime davantage ces gènes, ce qui indiquerait un renforcement de la structure de la matrice assurant ainsi une meilleure protection des cellules.

Le biofilm de *O. oeni* est capable d'effectuer la FML

Le biofilm étant résistant au stress du vin, nous nous sommes intéressés à son activité fermentaire en comparaison aux cellules planctoniques.

Après 14 jours de culture, les cellules du biofilm expriment peu l'enzyme malolactique (*mleA*). En effet, dans ces conditions, le milieu de culture n'a pas été renouvelé depuis 3 jours et il ne reste donc plus d'acide malique depuis plusieurs heures. Lorsque ce biofilm est plongé dans le vin (contenant de l'acide malique), le niveau d'expression du gène *mleA* est identique à celui des cellules planctoniques en croissance. Cela met donc en évidence la capacité du biofilm à percevoir les changements de son environnement et sa réactivité métabolique. Ainsi, la synthèse de l'enzyme malolactique est corrélée avec la présence d'acide malique. Un gène *mleR* codant pour un régulateur transcriptionnel a été mis en évidence en amont de *mleA* (Labarre *et al.*, 1996) chez *O. oeni* et pourrait intervenir dans ce phénomène d'induction.

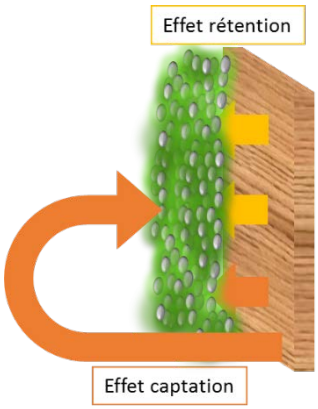
La FML a été réalisée en 5 jours environ par les cellules du biofilm, avec un inoculum représentant l'équivalent de 5.10^7 UFC/ml, ce qui est performant dans un vin à pH 3,5 et 12% d'éthanol. Un inoculum moindre (5.10^6-10^7 UFC/ml) permettrait une FML d'une plus longue durée, ce qui serait en accord avec les temps observés dans les chais (environ 2 semaines).

Dans nos conditions, des cellules du biofilm se détachent lorsque celui-ci est plongé dans le vin. Elles ont atteint des concentrations importantes : un biofilm inoculé à 5.10^7 UFC/ml libère 10^7 UFC/ml en 3 jours. Les cellules décrochées du biofilm

semblent également résistantes aux stress, ce qui indiquerait la conservation du phénotype biofilm, phénomène qui a déjà été décrit chez *P. aeruginosa* (Rollet *et al.*, 2008).

Modulation de l'extraction des composés du bois par les biofilms

Les observations en microscopie électronique à balayage, ont montré que le biofilm cultivé pendant 2 semaines couvre la majorité de la surface du bois. Nous avons observé une diffusion plus réduite de composés du bois comme les molécules aromatiques : furfural, guaiacol et vanilline. Ce phénomène serait d'autant plus important pour les pigments qui sont sans doute retenus par la matrice du fait de leur masse moléculaire et de leur encombrement stérique. Cela expliquerait le fait que le vin blanc soit moins teinté par le bois lors de la FML avec un biofilm sur bois qu'avec des cellules planctoniques. Nos résultats sont en faveur d'un rôle de filtre pour le biofilm, la matrice pouvant jouer la fonction de barrière physique et chimique. Cet effet de rétention peut être amplifié par la captation des molécules par les EPS de la matrice. Par exemple, les anthocyanes (pigments) sont connues pour se complexer avec de nombreuses molécules du vin (polyphénols, polysaccharides, protéines …) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012a). La matrice étant constituée de composés de nature chimique variée, il est probable que les anthocyanes se lient avec elle. Cette captation ne concernerait pas uniquement les molécules du bois à l'interface avec le biofilm, mais aussi les molécules qui ont été libérées dans le vin. Celles-ci peuvent se lier avec la matrice sur la surface externe du biofilm. En effet, il a déjà été montré que les lies captaient les molécules aromatiques du bois, comme l'eugénol et le furfural (Jiménez Moreno and Ancín Azpilicueta, 2007). Les lies sont principalement des levures en décomposition qui libèrent de leur paroi des polysaccharides et des mannoprotéines. De plus, il est connu que les polyphénols du vin rouge se lient à la paroi cellulaire (Morata *et al.*, 2005). Dans le cas d'une FML dans un vin rouge, la matrice du biofilm pourrait capter davantage de polyphénols.



Bien que l'activité glycosidase de *O. oeni* soit susceptible de libérer des précurseurs glycosylés, telle la vanilline (Bloem *et al.*, 2006, 2008), nos résultats montrent que le biofilm ne semble pas participer à la libération de précurseurs glycosylés. Cependant, nous ne pouvons pas exclure qu'un contact prolongé entre des composés aromatiques du bois et le biofilm favorise leur conversion en d'autres composés.

Les FML réalisées en présence de bois par des cellules planctoniques (OP) ou par le biofilm (BO) ont des concentrations d'arômes statistiquement différentes pour les arômes dosés : furfural, guaiacol, whiskylactones, eugénol et vanilline. Cependant, pour évaluer l'impact sensoriel, il faut prendre en compte d'autres paramètres. La reconstitution de la FML en fût a dû se faire avec une quantité de bois plus importante (120 g/l) que ce qui est habituellement observé dans les chais (une dizaine de g/l). Ce protocole nous a permis de réduire le temps d'élevage en fût à 1 mois, contre plusieurs mois habituellement, tout en étant au-dessus du seuil de quantification de la chromatographie (HS-SPME-GC-MS). Enfin, il faut prendre en compte le seuil de perception de chaque arôme. Il est à noter que ceux-ci diffèrent entre les individus et peuvent être modulés par le milieu utilisé (eau, solution hydro-alcoolique, vin) et les arômes environnants (bouquet aromatique). Entre les conditions de FML testées, les différences les plus notables sont pour le furfural et la vanilline où tous deux passent en dessous de leur seuil de perception respectif. Pour les quatre autres aromes, les concentrations, bien que significativement différentes, sont du même ordre de grandeur. Il est donc difficile de déterminer la différence perçue. Pour poursuivre ce travail, une étude faisant appel à un jury de dégustateurs, pourrait être développée avec pour but par exemple, de déterminer à l'aveugle si les deux vins sont différents (test triangulaire).

Plusieurs chauffes du bois sont proposées par les tonneliers pour moduler les arômes libérés dans le vin. Dans cette étude, nous avons choisi un bois non chauffé. Néanmoins, l'impact aromatique de la formation d'un biofilm sur du bois toasté est une perspective intéressante qui pourrait présenter des différences plus marquées.

Le biofilm comme moyen de pré-adapter les ferments commerciaux

Le biofilm présente l'avantage d'être résistant aux stress du vin, sans adaptation au préalable. Cette propriété est d'un grand intérêt technologique et pourrait être intégrée dans une valorisation industrielle. Pour cela certaines questions nécessitent d'être explorées.

- La première question est d'augmenter la biomasse du biofilm ou de réduire le temps de sa formation. Pour cela, il sera nécessaire de mettre au point un dispositif de production du biofilm à une échelle pilote mais aussi de faire varier les paramètres du milieu de culture : pH, température, nutriments (Shemesh *et al.*, 2014; Katharios-Lanwermeyer *et al.*, 2014; Furukawa, 2015).
- Certaines activités métaboliques sont étudiées lors de la sélection de souches pour produire des ferments commerciaux (Nielsen *et al.*, 1996; Nielsen and Richelieu, 1999). Les métabolites produits par les cellules en biofilm sont-ils les mêmes que ceux des cellules planctoniques ? La question se pose notamment pour la production d'amines biogènes, qui présentent des risques allergiques (Guerrini *et al.*, 2002; Lucas *et al.*, 2008) ainsi que pour l'acide acétique, le diacétyle et l'acétoïne dont les proportions respectives sont liées à la rapidité de la FML (Lonvaud-Funel, 1999).
- A l'instar de certaines souches de *Pediococcus* produisant des EPS rendant le vin visqueux (Walling *et al.*, 2001; Ciezack *et al.*, 2010), les EPS du biofilm sont-ils libérées dans le vin et le rendent-ils « filant » ? La plupart du temps, la viscosité du milieu n'est pas affectée par la synthèse des EPS, exception étant faite de certaines souches qui peuvent produire du β-glucane (Dimopoulou *et al.*, 2014). La nature protéique d'une partie des EPS influence-t-elle la clarification du vin par collage (floculation) ?

Conclusion

Il a été montré que dans le cas où la FML se réalise en fût, des biofilms de *O. oeni* peuvent être mis en évidence suite à la vinification, par prélèvements à l'intérieur du fût. Nous avons montré en laboratoire que *O. oeni* forme des biofilms sur différents supports dont le bois et peut moduler l'extraction des composés aromatiques du chêne. La comparaison de l'activité malolactique de souches cultivées en biofilm et en condition planctonique, a démontré que le biofilm bénéficie d'une résistance au stress et d'une activité métabolique amplifiée. Le travail réalisé durant cette thèse suggère donc que la croissance en biofilm de *O. oeni* puisse être prise en compte pour optimiser ou mieux maitriser le procédé de vinification quand le déclenchement de la FML peut être difficile.

Un des résultats majeur de cette thèse est la mise en évidence d'un effet modulateur du biofilm sur les qualités organoleptiques du vin. Ainsi, la diffusion du furfural (arôme d'amande grillée) du bois dans le vin, est particulièrement réduite en présence d'un biofilm. L'association bois-biofilm pourrait donc être considérée comme une des composantes impliquées dans la formation du bouquet aromatique du vin et permettre ainsi une meilleure maitrise de ce bouquet en fonction du type de bois, de la souche de *O. oeni* et du vin utilisés. En effet, les biofilms pourraient avoir un effet de rétention de certaines molécules du bois et limiter ainsi le transfert d'arômes boisés vers le vin.

V) Références bibliographiques

Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., and Chihib, N.-E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch. Microbiol.* 196, 453–472. doi:10.1007/s00203-014-0983-1.

Abee, T., Kovács, Á. T., Kuipers, O. P., and van der Veen, S. (2011). Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 22, 172–179. doi:10.1016/j.copbio.2010.10.016.

Afonso, V. L. G. (2003). Sensory descriptive analysis of red wines undergoing malolactic fermentation with oak chips. *Journal of Food Science* 68, 1075–1079. doi:10.1111/j.1365-2621.2003.tb08291.x.

Agouridis, N., Kopsahelis, N., Plessas, S., Koutinas, A. A., and Kanellaki, M. (2008). *Oenococcus oeni* cells immobilized on delignified cellulosic material for malolactic fermentation of wine. *Bioresource Technology* 99, 9017–9020. doi:10.1016/j.biortech.2008.04.026.

Alexandre, H., Costello, P. J., Remize, F., Guzzo, J., and Guilloux-Benatier, M. (2004). *Saccharomyces cerevisiae–Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *International Journal of Food Microbiology* 93, 141–154. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.013.

Alexandre, H., Grandvalet, C., Guilloux-Benatier, M., Remize-Barnavon, F., and Tourdot-Maréchal, R. (2008). *Les bactéries lactiques en œnologie*. Lavoisier.

Alhede, M., Qvortrup, K., Liebrechts, R., Høiby, N., Givskov, M., and Bjarnsholt, T. (2012). Combination of microscopic techniques reveals a comprehensive visual impression of biofilm structure and composition. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65, 335–342. doi:10.1111/j.1574-695X.2012.00956.x.

Anderson, G. G., and O'Toole, G. A. (2008). "Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms," in *Bacterial biofilms current topics in microbiology and immunology*., ed. T. Romeo (Springer Berlin Heidelberg), 85–105.

Andrews, J. S., Mason, V. P., Thompson, I. P., Stephens, G. M., and Markx, G. H. (2006). Construction of artificially structured microbial consortia (ASMC) using dielectrophoresis: examining bacterial interactions via metabolic intermediates within environmental biofilms. *Journal of Microbiological Methods* 64, 96–106. doi:10.1016/j.mimet.2005.04.025.

Ansanay, V., Dequin, S., Camarasa, C., Schaeffer, V., Grivet, J.-P., Blondin, B., Salmon, J.-M., and Barre, P. (1996). Malolactic fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* as compared with engineered *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 12, 215–225.

Badotti, F., Moreira, A. P. B., Tonon, L. A. C., Lucena, B. T. L. de, Gomes, F. de C. O., Kruger, R., Thompson, C. C., Jr, M. A. de M., Rosa, C. A., and Thompson, F. L. (2014). *Oenococcus alcoholitolerans* sp. nov., a lactic acid

bacteria isolated from cachaça and ethanol fermentation processes. *Antonie van Leeuwenhoek* 106, 1259–1267. doi:10.1007/s10482-014-0296-z.

Bales, P. M., Renke, E. M., May, S. L., Shen, Y., and Nelson, D. C. (2013). Purification and characterization of biofilm-associated EPS exopolysaccharides from ESKAPE organisms and other pathogens. *PloS one* 8, e67950.

Barbagallo, R. N., Spagna, G., Palmeri, R., and Torriani, S. (2004). Assessment of β-glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 34, 292–296. doi:10.1016/j.enzmictec.2003.11.013.

Bartowsky, E. J. (2005). *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation – moving into the molecular arena. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 174–187. doi:10.1111/j.1755-0238.2005.tb00286.x.

Bartowsky, E. J., and Borneman, A. R. (2011). Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Appl Microbiol Biotechnol* 92, 441–447. doi:10.1007/s00253-011-3546-2.

Bartowsky, E. J., and Henschke, P. A. (2004). The "buttery" attribute of wine—diacetyl—desirability, spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology* 96, 235–252. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.013.

Bastard, A., Coelho, C., Gougeon, R. D., Alexandre, H., Briandet, R., Cannette, A., Weidmann, S., and Guzzo, J. (*submitted*). Induction of malolactic fermentation by the biofilm of *Oenococcus oeni*, a new solution to trigger the fermentation process and ensure the organoleptic qualities of wine. *Frontiers in Microbiology*.

Bauer, R., and Dicks, L. M. T. (2004). Control of malolactic fermentation in wine. A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic* 25, 74–88.

Baumes, R. (2009). "Wine aroma precursors," in *Wine chemistry and biochemistry* (Springer), 251–274.

de Beer, D., and Stoodley, P. (1995). Relation between the structure of an aerobic biofilm and transport phenomena. *Water Science and Technology* 32, 11–18. doi:10.1016/0273-1223(96)00002-9.

de Beer, D., Stoodley, P., Roe, F., and Lewandowski, Z. (1994). Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 1131–1138. doi:10.1002/bit.260431118.

Bellin, C. A., and Rao, P. S. C. (1993). Impact of bacterial biomass on contaminant sorption and transport in a subsurface soil. *Applied and environmental microbiology* 59, 1813–1820.

Beloin, C., and Ghigo, J.-M. (2005). Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends in Microbiology* 13, 16–19. doi:10.1016/j.tim.2004.11.008.

Beltramo, C., Desroche, N., Tourdot-Maréchal, R., Grandvalet, C., and Guzzo, J. (2006). Real-time PCR for characterizing the stress response of *Oenococcus oeni* in a wine-like medium. *Research in Microbiology* 157, 267–274. doi:10.1016/j.resmic.2005.07.006.

Beyenal, H., and Lewandowski, Z. (2002). Internal and external mass transfer in biofilms grown at various flow velocities. *Biotechnol Progress* 18, 55–61. doi:10.1021/bp010129s.

Bland, R. R., Chen, H. C., Jewell, W. J., Bellamy, W. D., and Zall, R. R. (1982). Continuous high rate production of ethanol by *Zymomonas mobilis* in an attached film expanded bed fermentor. *Biotechnol Lett* 4, 323–328. doi:10.1007/BF00132834.

Bloem, A., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A., and de Revel, G. (2007). Vanillin production from simple phenols by wine-associated lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 62–67. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02037.x.

Bloem, A., Lonvaud, A., Bertrand, A., and de Revel, G. (2006). Ability of *Oenococcus oeni* to influence vanillin levels. *Developments in Food Science*, 137–140.

Bloem, A., Lonvaud-Funel, A., and de Revel, G. (2008). Hydrolysis of glycosidically bound flavour compounds from oak wood by *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol.* 25, 99–104. doi:10.1016/j.fm.2007.07.009.

Boido, E., Lloret, A., Medina, K., Carrau, F., and Dellacassa, E. (2002). Effect of β-glycosidase activity of *Oenococcus oeni* on the glycosylated flavor precursors of tannat wine during malolactic fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2344–2349. doi:10.1021/jf0109367.

Boido, E., Medina, K., Fariña, L., Carrau, F., Versini, G., and Dellacassa, E. (2009). The effect of bacterial strain and aging on the secondary volatile metabolites produced during malolactic fermentation of tannat red wine. *J. Agric. Food Chem.* 57, 6271–6278. doi:10.1021/jf900941y.

Bon, E., Delaherche, A., Bilhère, E., De Daruvar, A., Lonvaud-Funel, A., and Le Marrec, C. (2009). *Oenococcus oeni* genome plasticity is associated with fitness. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2079–2090. doi:10.1128/AEM.02194-08.

Bonnin-Jusserand, M., Grandvalet, C., David, V., and Alexandre, H. (2011). Molecular cloning, heterologous expression, and characterization of Ornithine decarboxylase from *Oenococcus oeni*. *J Food Prot* 74, 1309–1314. doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-466.

Borneman, A. R., McCarthy, J. M., Chambers, P. J., and Bartowsky, E. J. (2012). Functional divergence in the Genus *Oenococcus* as predicted by genome sequencing of the newly-described species, *Oenococcus* kitaharae. *PloS one* 7, e29626. doi:10.1371/journal.pone.0029626.t004.

Bouix, M., and Ghorbal, S. (2015). Rapid assessment of *Oenococcus oeni* activity by measuring intracellular pH and membrane potential by flow cytometry, and its application to the more effective control of malolactic fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 193, 139–146. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.019.

Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *Am. J. Enol. Vitic.* 52, 67–87.

Branda, S. S., Chu, F., Kearns, D. B., Losick, R., and Kolter, R. (2006). A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular microbiology* 59, 1229–1238.

Brányik, T., Vicente, A. A., Dostálek, P., and Teixeira, J. A. (2005). Continuous beer fermentation using immobilized yeast cell bioreactor systems. *Biotechnology progress* 21, 653–663.

Brányik, T., Vicente, A. A., Oliveira, R., and Teixeira, J. A. (2004). Physicochemical surface properties of brewing yeast influencing their immobilization onto spent grains in a continuous reactor.

Briandet, R., Fechner, L., Naïtali, M., and Dreanno, C. (2012). *Biofilms, quand les microbes s'organisent*. Editions Quae.

Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Boubetra, A., Thomas, V., and Briandet, R. (2010a). The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *Journal of Microbiological Methods* 82, 64–70. doi:10.1016/j.mimet.2010.04.006.

Bridier, A., Meylheuc, T., and Briandet, R. (2013). Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM). *Micron* 48, 65–69. doi:10.1016/j.micron.2013.02.013.

Bridier, A., Sanchez-Vizuete, P., Guilbaud, M., Piard, J.-C., Naïtali, M., and Briandet, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology* 45, Part B, 167–178. doi:10.1016/j.fm.2014.04.015.

Bridier, J. (2011). Étude de la diversité intraspécifique de l'espèce *Oenococcus oeni*, relation entre variabilité phénotypique et diversité génétique (Thèse de doctorat).

Bridier, J., Claisse, O., Coton, M., Coton, E., and Lonvaud-Funel, A. (2010b). Evidence of distinct populations and specific subpopulations within the species *Oenococcus oeni*. *Appl Environ Microbiol* 76, 7754–7764. doi:10.1128/AEM.01544-10.

Brown, M. J., and Lester, J. N. (1980). Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods. *Applied and Environmental Microbiology* 40, 179–185.

Caboulet, D. (2002). *La maîtrise du sulfitage des moûts et des vins.*

Cafaro, C., Bonomo, M. g., and Salzano, G. (2014). Adaptive changes in geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene expression level under ethanol stress conditions in *Oenococcus oeni*. *J Appl Microbiol* 116, 71–80. doi:10.1111/jam.12351.

Caldwell, D. E. (1995). "Cultivation and study of biofilm communities," in *Microbial Biofilms Biotechnology Research*. (Cambridge University Press).

Cao, N., Du, J., Gong, C. S., and Tsao, G. T. (1996). Simultaneous production and recovery of fumaric acid from immobilized *Rhizopus oryzae* with a rotary biofilm contactor and an adsorption column. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2926–2931.

Carrau, F. M., Medina, K., Boido, E., Farina, L., Gaggero, C., Dellacassa, E., Versini, G., and Henschke, P. A. (2005). *De novo* synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 243, 107–115. doi:10.1016/j.femsle.2004.11.050.

Casassa, L. F., and Harbertson, J. F. (2014). Extraction, evolution, and sensory impact of phenolic compounds during red wine maceration. *Annu Rev Food Sci Technol* 5, 83–109. doi:10.1146/annurev-food-030713-092438.

Cavin, J. F., Andioc, V., Etievant, P. X., and Divies, C. (1993). Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids. *American Journal of Enology and Viticulture* 44, 76–80.

Cecconi, D., Milli, A., Rinalducci, S., Zolla, L., and Zapparoli, G. (2009). Proteomic analysis of *Oenococcus oeni* freeze-dried culture to assess the importance of cell acclimation to conduct malolactic fermentation in wine. *Electrophoresis* 30, 2988–2995. doi:10.1002/elps.200900228.

Charbonneau, A., Novakowski, K., and Ross, N. (2006). The effect of a biofilm on solute diffusion in fractured porous media. *J. Contam. Hydrol.* 85, 212–228. doi:10.1016/j.jconhyd.2006.02.001.

Chassagne, D., Barrera Garcia Daniela, V., and Gougeon, R. (2007). Echanges entre le bois et le vin : cas des composés volatils. *Revue Française d'œnologie* 2007-04-01.

Chastanet, A., and Msadek, T. (2003). ClpP of *Streptococcus salivarius* is a novel member of the dually regulated class of stress response genes in gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology* 185, 683–687.

Chatonnet, P. (1995). *Influence des procédés de tonnellerie et des conditions d'élevage sur la composition et la qualité des vins élevés en fûts de chêne*.

Chatonnet, P., Boiron, J. N., and Pons, M. (1989). Incidence du traitement thermique du bois de chêne sur sa composition chimique 2e partie : évolution de certains composés en fonction de l'intensité de brûlage. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 23, 223–250.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., and Boidron, J. N. (1995). The influence of *Brettanomyces*/*Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 46, 463–468.

Chen, C.-L. (1970). Constituents of Quercus alba. *Phytochemistry* 9, 1149. doi:10.1016/S0031-9422(00)85244-9.

Chen, S., Hong, Y., Liu, Y., Liu, J., Leung, C. W. T., Li, M., Kwok, R. T. K., Zhao, E., Lam, J. W. Y., Yu, Y., *et al.* (2013). Full-range intracellular pH sensing by an aggregation-induced emission-active two-channel ratiometric fluorogen. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 4926–4929. doi:10.1021/ja400337p.

Chescheir, S., Philbin, D., and Osborne, J. P. (2015). Impact of *Oenococcus oeni* on wine hydroxycinnamic acids and volatile phenol production by *Brettanomyces bruxellensis*. *Am. J. Enol. Vitic.*, ajev.2015.14108. doi:10.5344/ajev.2015.14108.

Chu-Ky, S., Tourdot-Maréchal, R., Marechal, P.-A., and Guzzo, J. (2005). Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochim. Biophys. Acta* 1717, 118–124. doi:10.1016/j.bbamem.2005.09.015.

Ciezack, G., Hazo, L., Chambat, G., Heyraud, A., Lonvaud-Funel, A., and Dols-Lafargue, M. (2010). Evidence for exopolysaccharide production by *Oenococcus oeni* strains isolated from non-ropy wines. *J. Appl. Microbiol.* 108, 499–509. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04449.x.

Coenye, T. (2010). Response of sessile cells to stress: from changes in gene expression to phenotypic adaptation: Phenotypic adaptation to stress in biofilms. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, no–no. doi:10.1111/j.1574-695X.2010.00682.x.

Colagrande, O., Silva, A., and Fumi, M. D. (1994). Recent applications of biotechnology in wine production. *Biotechnol. Prog.* 10, 2–18. doi:10.1021/bp00025a001.

Costerton, J. W. (1995). Overview of microbial biofilms. *Journal of industrial microbiology* 15, 137–140.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., and Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745. doi:10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., and James, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 176, 2137–2142.

Coucheney, F., Desroche, N., Bou, M., Tourdot-Maréchal, R., Dulau, L., and Guzzo, J. (2005a). A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. *International Journal of Food Microbiology* 105, 463–470. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.023.

Coucheney, F., Gal, L., Beney, L., Lherminier, J., Gervais, P., and Guzzo, J. (2005b). A small HSP, Lo18, interacts with the cell membrane and modulates lipid physical state under heat shock conditions in a lactic acid bacterium. *Biochim. Biophys. Acta* 1720, 92–98. doi:10.1016/j.bbamem.2005.11.017.

Couto, J. A., Campos, F. M., Figueiredo, A. R., and Hogg, T. A. (2006). Ability of lactic acid bacteria to produce volatile phenols. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 166–171.

Crapisi, A., Spettoli, P., Nuti, M. P., and Zamorani, A. (1987). Comparative traits of *Lactobacillus brevis, Lact. fructivorans* and *Leuconostoc oenos* immobilized cells for the control of malo-lactic fermentation in wine. *Journal of Applied Bacteriology* 63, 513–521. doi:10.1111/j.1365-2672.1987.tb02721.x.

Crueger, W., and Crueger, A. (2006). Biotechnology: a textbook of industrial microbiology.

Cutzach, I., Chatonnet, P., Henry, R., and Dubourdieu, D. (1999). Identifying new volatile compounds in toasted oak. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1663–1667.

Davey, M. E., and O'toole, G. A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 847–867. doi:10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000.

Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., and Greenberg, E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295–298.

Davies, J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264, 375–382.

Davis, C. R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T. H., and Fleet, G. H. (1985). Practical implications of malolactic fermentation: a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 36, 290–301.

Davis, C. R., Wibowo, D. J., Lee, T. H., and Fleet, G. H. (1986). Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. *Applied and environmental microbiology* 51, 539–545.

De Boer, W., Gunnewiek, P. K., Veenhuis, M., Bock, E., and Laanbroek, H. J. (1991). Nitrification at low pH by aggregated chemolithotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 3600–3604.

Decho, A. W. (1990). Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role (s) in food webs and marine processes. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev* 28, 73–153.

Delille, A., Quilès, F., and Humbert, F. (2007). *In situ* monitoring of the nascent *Pseudomonas fluorescens* biofilm response to variations in the dissolved organic carbon level in low-nutrient water by Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5782–5788. doi:10.1128/AEM.00838-07.

Delmas, F., Pierre, F., Coucheney, F., Diviès, C., and Guzzo, J. (2001). Biochemical and physiological studies of the small heat shock protein Lo18 from the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 601–610.

De Man, J. C., Rogosa, M., and Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology* 23, 130–135. doi:10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x.

Demirci, A., Iii, A. L. P., and Ho, K.-L. G. (1997). Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactors. *J Ind Microbiol Biotech* 19, 299–304. doi:10.1038/sj.jim.2900464.

Demirci, A., Iii, A. L. P., and Johnson, K. E. (1993). Evaluation of biofilm reactor solid support for mixed-culture lactic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol* 38, 728–733. doi:10.1007/BF00167135.

Denich, T. J., Beaudette, L. A., Lee, H., and Trevors, J. T. (2003). Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods* 52, 149–182.

Desroche, N. (2005). Caractérisation physiologique et moléculaire de préparations malolactiques de *Oenococcus oeni* destinées à l'ensemencement direct des vins (Thèse de doctorat).

Desroche, N., Beltramo, C., and Guzzo, J. (2005). Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Journal of Microbiological Methods* 60, 325–333. doi:10.1016/j.mimet.2004.10.010.

Dewanti, R., and Wong, A. C. (1995). Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157: H7. *International journal of food microbiology* 26, 147–164.

Dicks, L., Dellaglio, F., and Collins, M. D. (1995). Proposal To Reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 395–397.

Diggle, S. P., Stacey, R. E., Dodd, C., Cámara, M., Williams, P., and Winzer, K. (2006). The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental microbiology* 8, 1095–1104.

Dimopoulou, M., Bardeau, T., Ramonet, P.-Y., Miot-Certier, C., Claisse, O., Doco, T., Petrel, M., Lucas, P., and Dols-Lafargue, M. (2015). Exopolysaccharides produced by *Oenococcus oeni*: from genomic and phenotypic analysis to technological valorization. *Food Microbiology*. doi:10.1016/j.fm.2015.07.011.

Dimopoulou, M., Hazo, L., and Dols-Lafargue, M. (2012). Exploration of phenomena contributing to the diversity of *Oenococcus oeni* exopolysaccharides. *International Journal of Food Microbiology* 153, 114–122. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.024.

Dimopoulou, M., Vuillemin, M., Campbell-Sills, H., Lucas, P. M., Ballestra, P., Miot-Sertier, C., Favier, M., Coulon, J., Moine, V., Doco, T., *et al.* (2014). Exopolysaccharide (EPS) Synthesis by *Oenococcus oeni*: From Genes to Phenotypes. *PLoS ONE* 9, e98898. doi:10.1371/journal.pone.0098898.

D'Incecco, N., Bartowsky, E., Kassara, S., Lante, A., Spettoli, P., and Henschke, P. (2004). Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Microbiology* 21, 257–265. doi:10.1016/j.fm.2003.09.003.

Domka, J., Lee, J., Bansal, T., and Wood, T. K. (2007). Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environmental microbiology* 9, 332–346.

Doussot, F., De Jéso, B., Quideau, S., and Pardon, P. (2002). Extractives content in cooperage oak wood during natural seasoning and toasting; influence of tree species, geographic location, and single-tree effects. *Journal of Agricultural and food chemistry* 50, 5955–5961.

Doyle, S. M., and Wickner, S. (2009). Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. *Trends in Biochemical Sciences* 34, 40–48. doi:10.1016/j.tibs.2008.09.010.

Dubourdieu, D., Tominaga, T., Masneuf, I., Gachons, C. P. des, and Murat, M. L. (2006). The role of yeasts in grape flavor development during fermentation: the example of Sauvignon blanc. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 81–88.

Dufour, C., and Bayonove, C. L. (1999a). Influence of wine structurally different polysaccharides on the volatility of aroma substances in a model system. *J. Agric. Food Chem.* 47, 671–677. doi:10.1021/jf9801062.

Dufour, C., and Bayonove, C. L. (1999b). Interactions between wine polyphenols and aroma substances. an insight at the molecular level. *J. Agric. Food Chem.* 47, 678–684. doi:10.1021/jf980314u.

Dunne, W. M. J. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews* 15, 155–166. doi:10.1128/CMR.15.2.155-166.2002.

Duval, C. J., Gourrat, K., Perre, P., Prida, A., and Gougeon, R. D. (2013). A HS–SPME–GC–MS analysis of IR heated wood: Impact of the water content on the depth profile of oak wood aromas extractability. *Food Research International* 54, 277–284. doi:10.1016/j.foodres.2013.07.008.

Edwards, C. G., and Jensen, K. A. (1992). Occurrence and characterization of lactic acid bacteria from Washington State wines: Pediococcus spp. *American journal of enology and viticulture* 43, 233–238.

Erasmus, D. J., Cliff, M., and Vuuren, H. J. J. van (2004). Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of icewine. *Am. J. Enol. Vitic.* 55, 371–378.

Espinazo-Romeu, M., Cantoral, J. M., Matallana, E., and Aranda, A. (2008). Btn2p is involved in ethanol tolerance and biofilm formation in flor yeast. *FEMS Yeast Research* 8, 1127–1136. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00397.x.

Estévez, P., Gil, M. L., and Falqué, E. (2004). Effects of seven yeast strains on the volatile composition of Palomino wines. *International Journal of Food Science & Technology* 39, 61–69. doi:10.1046/j.0950-5423.2003.00755.x.

Fengel, D., and Wegener, G. (1983). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*.

Ferreira, V., López, R., and Aznar, M. (2002). "Olfactometry and aroma extract dilution analysis of wines," in *Analysis of Taste and Aroma Molecular Methods of Plant Analysis*. eds. P. J. F. Jackson and P. H. F. Linskens (Springer Berlin Heidelberg), 89–122.

Figueiredo, A. R., Campos, F., de Freitas, V., Hogg, T., and Couto, J. A. (2008). Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus* hilgardii. *Food Microbiology* 25, 105–112. doi:10.1016/j.fm.2007.07.004.

Fiocco, D., Capozzi, V., Collins, M., Gallone, A., Hols, P., Guzzo, J., Weidmann, S., Rieu, A., Msadek, T., and Spano, G. (2010). Characterization of the CtsR stress response regulon in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology* 192, 896–900. doi:10.1128/JB.01122-09.

Fleet, G. H., Lafon-Lafourcade, S., and Ribéreau-Gayon, P. (1984). Evolution of Yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1034–1038.

Flemming, H.-C. (1993). Biofilms and environmental protection. *Water Science & Technology* 27, 1–10.

Flemming, H.-C., Neu, T. R., and Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: the "house of biofilm cells." *J. Bacteriol.* 189, 7945–7947. doi:10.1128/JB.00858-07.

Flemming, H.-C., and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Micro* 8, 623–633. doi:10.1038/nrmicro2415.

Fortier, L. C., Tourdot-Maréchal, R., Divies, C., Lee, B. H., and Guzzo, J. (2003). Induction of *Oenococcus oeni* H+-ATPase activity and mRNA transcription under acidic conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 222, 165–169.

Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., and Nielsen, P. H. er (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water research* 30, 1749–1758.

Furukawa, S. (2015). Studies on formation, control and application of biofilm formed by food related microorganisms. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 0, 1–7. doi:10.1080/09168451.2015.1018126.

Gagné, S., Lucas, P. M., Perello, M. C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., and de Revel, G. (2011). Variety and variability of glycosidase activities in an *Oenococcus oeni* strain collection tested with synthetic and natural substrates. *J. Appl. Microbiol.* 110, 218–228. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04878.x.

Gammacurta, M., Marchand, S., Albertin, W., Moine, V., and de Revel, G. (2014). Impact of yeast strain on ester levels and fruity aroma persistence during aging of Bordeaux red wines. *J. Agric. Food Chem.* doi:10.1021/jf500707e.

Garde-Cerdán, T., Mozaz, S. R., and Azpilicueta, C. A. (2002). Volatile composition of aged wine in used barrels of French oak and of American oak. *Food Research International* 35, 603–610.

Garvie, E. I. (1967). *Leuconostoc oenos* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* 48, 431–438. doi:10.1099/00221287-48-3-431.

Genisheva, Z. A., Mussatto, S. I., Oliveira, J. M., and Teixeira, J. A. (2013). Malolactic fermentation of wines with immobilised lactic acid bacteria – Influence of concentration, type of support material and storage conditions. *Food Chemistry* 138, 1510–1514. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.058.

Genisheva, Z. A., Teixeira, J. A., and Oliveira, J. M. (2014a). Immobilized cell systems for batch and continuous winemaking. *Trends in Food Science & Technology* 40, 33–47. doi:10.1016/j.tifs.2014.07.009.

Genisheva, Z., Mota, A., Mussatto, S. I., Oliveira, J. M., and Teixeira, J. A. (2014b). Integrated continuous winemaking process involving sequential alcoholic and malolactic fermentations with immobilized cells. *Process Biochemistry* 49, 1–9. doi:10.1016/j.procbio.2013.10.005.

Germec, M., Turhan, I., Karhan, M., and Demirci, A. (2015). Ethanol production via repeated-batch fermentation from carob pod extract by using *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactor. *Fuel*. doi:10.1016/j.fuel.2015.08.060.

Ghigo, J. M. (2003). Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? *Research in Microbiology* 154, 1–8. doi:10.1016/S0923-2508(02)00012-8.

Ghigo, J. M. (2001). Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 412, 442–445. doi:10.1038/35086581.

Giaouris, E., Chapot-Chartier, M.-P., and Briandet, R. (2009). Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *International Journal of Food Microbiology* 131, 2–9. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.006.

Gloaga, E. S., Turnbulla, L., Huangb, A., Vallottonc, P., Wangd, H., Nolana, L. M., Milillie, L., Hunte, C., Lua, J., Osvatha, S. R., *et al.* (2013). Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *FEMS Microbiology Reviews* 36, 149–164. doi:10.1073/pnas.1218898110/-/DCSupplemental.

Gomez Garcia-Carpintero, E., Gomez Gallego, M. A., Sanchez-Palomo, E., and Gonzalez Vinas, M. A. (2012). Impact of alternative technique to ageing using oak chips in alcoholic or in malolactic fermentation on volatile and sensory composition of red wines. *Food Chemistry* 134, 851–863. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.194.

Grandvalet, C., Assad-Garcia, J. S., Chu-Ky, S., Tollot, M., Guzzo, J., Gresti, J., and 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., and Guzzo, J. (2005). CtsR is the master regulator of stress response gene expression in *Oenococcus oeni*. *Journal of Bacteriology* 187, 5614–5623. doi:10.1128/JB.187.16.5614-5623.2005.

Grangeteau, C., Gerhards, D., Rousseaux, S., von Wallbrunn, C., Alexandre, H., and Guilloux-Benatier, M. (2015). Diversity of yeast strains of the genus *Hanseniaspora* in the winery environment: What is their involvement in grape must fermentation? *Food Microbiology* 50, 70–77. doi:10.1016/j.fm.2015.03.009.

Grimaldi, A., Bartowsky, E., and Jiranek, V. (2005). A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology* 105, 233–244. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.011.

Grimaldi, A., McLean, H., and Jiranek, V. (2000). Identification and partial characterization of glycosidic activities of commercial strains of the lactic acid bacterium, *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 362–369.

Gross, R., Hauer, B., Otto, K., and Schmid, A. (2007). Microbial biofilms: New catalysts for maximizing productivity of long-term biotransformations. *Biotechnology and bioengineering* 98, 1123–1134.

Guchu, E., Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S., González-Viñas, M. A., and Ibáñez, M. C. (2006). Volatile composition and sensory characteristics of Chardonnay wines treated with American and Hungarian oak chips. *Food Chemistry* 99, 350–359.

Gué, M., Dupont, V., Dufour, A., and Sire, O. (2001). Bacterial swarming: a biochemical time-resolved FTIR-ATR study of *Proteus mirabilis* swarm-cell differentiation. *Biochemistry* 40, 11938–11945.

Guerrini, S., Mangani, S., Granchi, L., and Vincenzini, M. (2002). Biogenic Amine Production by *Oenococcus oeni*. *Curr Microbiol* 44, 374–378. doi:10.1007/s00284-001-0021-9.

Guilbaud, M., Piveteau, P., Desvaux, M., Brisse, S., and Briandet, R. (2015). Exploring the diversity of *Listeria monocytogenes* biofilm architecture by high-throughput confocal laser scanning microscopy and the predominance of the honeycomb-like morphotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1813–1819. doi:10.1128/AEM.03173-14.

Guilloux-Benatier, M., Bouhier, S., and Feuillat, M. (1993). Activités enzymatiques: glycosidases et peptidase chez *Leuconostoc oenos* au cours de la croissance bactérienne. Influence des macromolécules de levures. *Vitis* 32, 51–57.

Gury, J., Barthelmebs, L., Tran, N. P., Divies, C., and Cavin, J.-F. (2004). Cloning, deletion, and characterization of PadR, the transcriptional repressor of the phenolic acid decarboxylase-encoding *padA* gene of *Lactobacillus plantarum*. *Applied and environmental microbiology* 70, 2146–2153.

Guzzo, J. (2011). "Chapter 15 Stress Responses of *Oenococcus oeni*," in *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria Food Microbiology and Food Safety*., eds. E. Tsakalidou and K. Papadimitriou (Springer US), 349–365.

Guzzo, J., and Desroche, N. (2009). "Physical and chemical stress factors in lactic acid bacteria.," in *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, eds. H. König, G. Unden, and J. Fröhlich (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 295–308.

Guzzo, J., Jobin, M. P., Delmas, F., Fortier, L. C., Garmyn, D., Tourdot-Maréchal, R., Lee, B., and Diviès, C. (2000). Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as a function of environmental changes and growth phase. *International Journal of Food Microbiology* 55, 27–31.

Guzzon, R., Carturan, G., Krieger-Weber, S., and Cavazza, A. (2012). Use of organo-silica immobilized bacteria produced in a pilot scale plant to induce malolactic fermentation in wines that contain lysozyme. *Ann Microbiol* 62, 381–390. doi:10.1007/s13213-011-0272-z.

Hale, M. D., Mccafferty, K., Larmie, E., Newton, J., and Swan, J. S. (1999). The influence of oak seasoning and toasting parameters on the composition and quality of wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 50, 495–502.

Han, J., and Burgess, K. (2010). Fluorescent indicators for intracellular pH. *Chem. Rev.* 110, 2709–2728. doi:10.1021/cr900249z.

He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M. J., and Duan, C.-Q. (2012). Anthocyanins and their variation in red wines i. monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules* 17, 1571–1601. doi:10.3390/molecules17021571.

Hendrick, J. P., and Hartl, F.-U. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual Review of Biochemistry* 62, 349–384. doi:10.1146/annurev.bi.62.070193.002025.

Hernandez-Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E., and Ferreira, V. (2009). Aroma development from non-floral grape precursors by wine lactic acid bacteria. *Food Research International* 42, 773–781. doi:10.1016/j.foodres.2009.02.023.

Herrero, M., Laca, A., García, L. A., and Díaz, M. (2001). Controlled malolactic fermentation in cider using *Oenococcus oeni* immobilized in alginate beads and comparison with free cell fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 28, 35–41. doi:10.1016/S0141-0229(00)00265-9.

Hilbert, L. R., Bagge-Ravn, D., Kold, J., and Gram, L. (2003). Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *International Biodeterioration & Biodegradation* 52, 175–185. doi:10.1016/S0964-8305(03)00104-5.

Hjelmeland, A. K., and Ebeler, S. E. (2014). Glycosidically bound volatile aroma compounds in grapes and wine: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.*, ajev.2014.14104. doi:10.5344/ajev.2014.14104.

Hojo, K., Nagaoka, S., Ohshima, T., and Maeda, N. (2009). Bacterial interactions in dental biofilm development. *J DENT RES* 88, 982–990. doi:10.1177/0022034509346811.

Horwitz, J. (1992). Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *PNAS* 89, 10449–10453.

Husnik, J. I., Delaquis, P. J., Cliff, M. A., and van Vuuren, H. J. (2007). Functional analyses of the malolactic wine yeast ML01. *American journal of enology and viticulture* 58, 42–52.

Husnik, J. I., Volschenk, H., Bauer, J., Colavizza, D., Luo, Z., and van Vuuren, H. J. J. (2006). Metabolic engineering of malolactic wine yeast. *Metabolic Engineering* 8, 315–323. doi:10.1016/j.ymben.2006.02.003.

Ibarburu, I., Soria-Díaz, M. E., Rodríguez-Carvajal, M. A., Velasco, S. E., Tejero-Mateo, P., Gil-Serrano, A. M., Irastorza, A., and Dueñas, M. T. (2007). Growth and exopolysaccharide (EPS) production by *Oenococcus oeni* I4 and structural characterization of their EPSs. *Journal of Applied Microbiology* 103, 477–486. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03266.x.

IFV L'élevage des vins en fûts ou barriques de chêne (Fiche pratique)

Izquierdo Cañas, P. M., García Romero, E., Gómez Alonso, S., and Palop Herreros, M. L. L. (2008). Changes in the aromatic composition of Tempranillo wines during spontaneous malolactic fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis* 21, 724–730. doi:10.1016/j.jfca.2007.12.005.

Jackowetz, J. N., and Mira de Orduña, R. (2012). Metabolism of SO2 binding compounds by *Oenococcus oeni* during and after malolactic fermentation in white wine. *International Journal of Food Microbiology* 155, 153–157. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.025.

Jahn, A., Griebe, T., and Nielsen, P. H. (1999). Composition of *Pseudomonas putida* biofilms: Accumulation of protein in the biofilm matrix. *Biofouling* 14, 49–57. doi:10.1080/08927019909378396.

Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., and Buchner, J. (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *Journal of Biological Chemistry* 268, 1517–1520.

Janssen, D. E. (Industrial R. L., Maddox, I. S. (Massey U., and Mawson, A. J. (Massey U. (1993). An immobilized cell bioreactor for the malolactic fermentation of wine. *Australian & New Zealand wine industry journal* 8, 161–161.

Jefferson, K. K. (2009). Bacterial polysaccharides. *Current Innovations and Future Trends*, 175–186.

Jiang, P., Li, J., Han, F., Duan, G., Lu, X., Gu, Y., and Yu, W. (2011). Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101. *PLoS One* 6, e18514.

Jiménez Moreno, N., and Ancín Azpilicueta, C. (2007). Binding of oak volatile compounds by wine lees during simulation of wine ageing. *LWT - Food Science and Technology* 40, 619–624. doi:10.1016/j.lwt.2006.02.027.

Jobin, M. P. (1999). Approches physiologique et moléculaire de la réponse au stress chez *Oenococcus oeni*- Identification de marqueurs spécifiques utilisables dans l'étude de la préparation des levains malolactiques pour l'ensemencement direct des vins (Thèse de doctorat).

Jobin, M.-P., Delmas, F., Garmyn, D., Divies, C., and Guzzo, J. (1997). Molecular characterization of the gene encoding an 18-kilodalton small heat shock protein associated with the membrane of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 609–614.

Joseph, C. M. L., Kumar, G., Su, E., and Bisson, L. F. (2007). Adhesion and Biofilm Production by Wine Isolates of *Brettanomyces bruxellensis*. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 373–378.

Karbowiak, T., Gougeon, R. D., Alinc, J.-B., Brachais, L., Debeaufort, F., Voilley, A., and Chassagne, D. (2009). Wine oxidation and the role of cork. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50, 20–52. doi:10.1080/10408390802248585.

Katharios-Lanwermeyer, S., Xi, C., Jakubovics, N. S., and Rickard, A. H. (2014). Mini-review: Microbial coaggregation: ubiquity and implications for biofilm development. *Biofouling* 30, 1235–1251. doi:10.1080/08927014.2014.976206.

Kawarai, T., Furukawa, S., Ogihara, H., and Yamasaki, M. (2007). Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4673–4676. doi:10.1128/AEM.02891-06.

Kollmann, F., and Fengel, D. (1965). Änderungen der chemischen Zusammensetzung von Holz durch thermische Behandlung. *Holz als Roh- und Werkstoff* 23, 461–468.

Kosseva, M., Beschkov, V., Kennedy, J. F., and Lloyd, L. L. (1998). Malolactic fermentation in chardonnay wine by immobilised *Lactobacillus casei* cells. *Process Biochemistry* 33, 793–797. doi:10.1016/S0032-9592(98)00049-1.

Kosseva, M. R. (2010). Immobilization of microbial cells in food fermentation processes. *Food Bioprocess Technol* 4, 1089–1118. doi:10.1007/s11947-010-0435-0.

Kosseva, M. R., and Kennedy, J. F. (2004). Encapsulated lactic acid bacteria for control of malolactic fermentation in wine. *Artificial cells, blood substitutes, and biotechnology* 32, 55–65.

Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. M., Marchant, R., and Koutinas, A. A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology* 21, 377–397. doi:10.1016/j.fm.2003.10.005.

Kregiel, D. (2014). Advances in biofilm control for food and beverage industry using organo-silane technology: A review. *Food Control* 40, 32–40. doi:10.1016/j.foodcont.2013.11.014.

Kress, W., Maglica, Ž., and Weber-Ban, E. (2009). Clp chaperone–proteases: structure and function. *Research in microbiology* 160, 618–628.

Krstgens, V., Flemming, H., Wingender, J., and Borchard, W. (2001). Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Science & Technology* 43, 49–57.

Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., and Uchiyama, H. (2008). Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106, 381–386. doi:10.1263/jbb.106.381.

Kubota, H., Senda, S., Tokuda, H., Uchiyama, H., and Nomura, N. (2009). Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149. *Food Microbiology* 26, 592–597. doi:10.1016/j.fm.2009.04.001.

Kunduru, M. R., and Pometto, A. (1996). Continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactors. *Journal of Industrial Microbiology* 16, 249–256. doi:10.1007/BF01570029.

Laaboudi, I., Sauvageot, F., and Gerbaux, V. (1995). Influence de la fermentation malolactique sur la qualité organoleptique de vins jeunes. *Sciences des aliments* 15, 251–260.

Labarre, C., Divies, C., and Guzzo, J. (1996). Genetic organization of the *mle* locus and identification of a *mleR*-like gene from *Leuconostoc oenos*. *Applied and environmental microbiology* 62, 4493–4498.

Lafon-Lafourcade, S. (1970). Etude de la degradation de l'acide L-malique par les bacteries lactiques non proliferantes isolees des vins. *Ann Technol Agr*.

Lafon-Lafourcade, S., Lonvaud-Funel, A., and Carre, E. (1983). Lactic acid bacteria of wines: stimulation of growth and malolactic fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 49, 349–352. doi:10.1007/BF00399509.

Lasa, I., and Penadés, J. R. (2006). Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in microbiology* 157, 99–107.

Lasik, M. (2013). The application of malolactic fermentation process to create good-quality grape wine produced in cool-climate countries: a review. *Eur Food Res Technol* 237, 843–850. doi:10.1007/s00217-013-2083-x.

Laurent, M.-H., Henick-Kling, T., and Acree, T. E. (1994). Changes in the aroma and odor of Chardonnay wine due to malolactic fermentation. *Wein-Wissenschaft* 49, 3–10.

Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W., and Caldwell, D. E. (1991). Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of bacteriology* 173, 6558–6567.

Lawrence, J. R., Swerhone, G. D. W., Kuhlicke, U., and Neu, T. R. (2007). *In situ* evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies. *Canadian journal of microbiology* 53, 450–458.

Lerm, E., Engelbrecht, L., and Toit, M. du (2011). Selection and characterisation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as malolactic fermentation starter cultures. *South African Journal of Enology and Viticulture* 32, 280–295.

Li, E., Liu, C., and Liu, Y. (2012). Evaluation of yeast diversity during wine fermentations with direct inoculation and pied de cuve method at an industrial scale. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 960–966.

Li, X. Z., Webb, J. S., Kjelleberg, S., and Rosche, B. (2006). Enhanced benzaldehyde tolerance in *Zymomonas mobilis* biofilms and the potential of biofilm applications in fine-chemical production. *Applied and environmental microbiology* 72, 1639–1644.

Lloret, A., Boido, E., Lorenzo, D., Medina, K., Carrau, F., Dellacassa, E., and Versini, G. (2002). Aroma variation in tannat wines: Effect of malolactic fermentation on ethyl lactate level and its enantiomeric distribution. *Italian journal of food science* 14, 175–180.

Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* 76, 317–331. doi:10.1023/A:1002088931106.

Lonvaud-Funel, A. (1995). Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects. *FEMS Microbiology Letters* 126, 209–214.

Lonvaud-Funel, A., and Strasser de Saad, A. M. (1982). Purification and properties of a malolactic enzyme from a strain of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from grapes. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 357–361.

López, I., López, R., Santamaría, P., Torres, C., and Ruiz-Larrea, F. (2008). Performance of malolactic fermentation by inoculation of selected *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains isolated from Rioja red wines. *VITIS - Journal of Grapevine Research* 47, 123.

Loubiere, P., Salou, P., Leroy, M. J., Lindley, N. D., and Pareilleux, A. (1992). Electrogenic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* grown on glucose-malate mixtures. *Journal of bacteriology* 174, 5302–5308.

Lucas, P. M., Claisse, O., and Lonvaud-Funel, A. (2008). High frequency of histamine-producing bacteria in the enological environment and instability of the histidine decarboxylase production phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 811–817. doi:10.1128/AEM.01496-07.

Lynch, J. M., and Hobbie, J. E. (1988). *Micro-Organisms in Action*. Wiley-Blackwell

Maddox, I. S., Qureshi, N., and McQueen, J. M. (1988). Continuous production of 2, 3-butanediol from whey permeate using cells of *Klebsiella pneumoniae* immobilized on to bonechar. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 23, 127–132.

Maicas, S. (2001). The use of alternative technologies to develop malolactic fermentation in wine. *Appl Microbiol Biotechnol* 56, 35–39. doi:10.1007/s002530100662.

Maicas, S., Gil, J.-V., Pardo, I., and Ferrer, S. (1999). Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Research International* 32, 491–496. doi:10.1016/S0963-9969(99)00122-2.

Maicas, S., Pardo, I., and Ferrer, S. (2001). The potential of positively-charged cellulose sponge for malolactic fermentation of wine, using *Oenococcus oeni*. *Enzyme and Microbial Technology* 28, 415–419. doi:10.1016/S0141-0229(00)00339-2.

Maitre, M. (2012). Le chaperon moléculaire Lo18 de *Oenococcus oeni* : caractérisation de ses activités en lien avec sa plasticité oligomérique (Thèse de doctorat).

Maitre, M., Weidmann, S., Dubois-Brissonnet, F., David, V., Covès, J., and Guzzo, J. (2014). Adaptation of the wine bacterium *Oenococcus oeni* to ethanol stress: role of the small Heat Shock Protein Lo18 in membrane integrity. *Appl. Environ. Microbiol.*, AEM.04178–13. doi:10.1128/AEM.04178-13.

Maitre, M., Weidmann, S., Rieu, A., Fenel, D., Schoehn, G., Ebel, C., Coves, J., and 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. *Biochemical Journal* 444, 97–104. doi:10.1042/BJ20120066.

Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., *et al.* (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 15611–15616.

Maksimova, Y. G. (2014). Microbial biofilms in biotechnological processes. *Appl Biochem Microbiol* 50, 750–760. doi:10.1134/S0003683814080043.

Mansfield, A. K., Zoecklein, B. W., and Whiton, R. S. (2002). Quantification of glycosidase activity in selected strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 303–307.

Marcobal, A. M., Sela, D. A., Wolf, Y. I., Makarova, K. S., and Mills, D. A. (2008). Role of hypermutability in the evolution of the genus *Oenococcus*. *Journal of bacteriology* 190, 564–570.

Marcotte, N., and Brouwer, A. M. (2005). Carboxy SNARF-4F as a fluorescent ph probe for ensemble and fluorescence correlation spectroscopies. *J. Phys. Chem. B* 109, 11819–11828. doi:10.1021/jp0510138.

Margaritis, A., and Kilonzo, P. M. (2005). "Production of ethanol using immobilised cell bioreactor systems," in *Applications of Cell Immobilisation Biotechnology* (Springer), 375–405.

Mariani, C., Briandet, R., Chamba, J.-F., Notz, E., Carnet-Pantiez, A., Eyoug, R. N., and Oulahal, N. (2007). Biofilm ecology of wooden shelves used in ripening the french raw milk smear cheese reblochon de savoie. *Journal of Dairy Science* 90, 1653–1661. doi:10.3168/jds.2006-190.

Martineau, B., and Henick-Kling, T. (1995). Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine. *Journal of applied bacteriology* 78, 526–536.

Martinez-Murcia, A. J., Harland, N. M., and Collins, M. D. (1993). Phylogenetic analysis of some leuconostocs and related organisms as determined from large-subunit rRNA gene sequences: assessment of congruence of small- and large-subunit rRNA derived trees. *The Journal of applied bacteriology* 74, 532–541.

Massol-Deya, A. A., Whallon, J., Hickey, R. F., and Tiedje, J. M. (1995). Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 769–777.

Masson, G., Puech, J. L., and Moutounet, M. (1996). Composition chimique du bois de chêne de tonnellerie. *Bulletin de l'OIV* 69, 634–657.

Mateo, J. J., Gentilini, N., Huerta, T., Jime´nez, M., and Di Stefano, R. (1997). Fractionation of glycoside precursors of aroma in grapes and wine. *Journal of Chromatography A* 778, 219–224. doi:10.1016/S0021-9673(97)00566-9.

Mielich-Süss, B., and Lopez, D. (2015). Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation. *Environ Microbiol* 17, 555–565. doi:10.1111/1462-2920.12527.

Mills, D. A., Rawsthorne, H., Parker, C., Tamir, D., and Makarova, K. (2005). Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 465–475. doi:10.1016/j.femsre.2005.04.011.

Mirabel, M., Saucier, C., Guerra, C., and Glories, Y. (1999). Copigmentation in model wine solutions: occurrence and relation to wine aging. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 211–218.

Monroe, D. (2007). Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol.* 5, e307. doi:10.1371/journal.pbio.0050307.

Monties, B. (1987). Composition chimique des bois de chêne: composés phénoliques, relations avec quelques propriétés physiques et chimiques susceptibles d'influencer la qualité des vins et des eaux-de-vie. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 21, 169–190.

Morata, A., Gomez-Cordoves, M. C., Colomo, B., and Suarez, J. A. (2005). Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes. *European Food Research and Technology* 220, 341–346. doi:10.1007/s00217-004-1053-8.

Moreno-Arribas, M. V., and Polo, M. C. (2005). Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45, 265–286.

Morse, R., Collins, M. D., O'Hanlon, K., Wallbanks, S., and Richardson, P. T. (1996). Analysis of the beta' subunit of DNA-dependent RNA polymerase does not support the hypothesis inferred from 16S rRNA analysis that *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) is a tachytelic (fast-evolving) bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 1004–1009.

Moutounet, M., Rabier, P., Puech, J. L., Varette, E., and Barillère, J. M. (1989). Analyse CLHP d'extractibles du bois de chêne. Application à un vin de Chardonnay. *Sci. Aliments* 9, 35–51.

Naouri, P., Chagnaud, P., Arnaud, A., and Galzy, P. (1990). Purification and properties of a malolactic enzyme from *Leuconostoc oenos* ATCC 23278. *J. Basic Microbiol.* 30, 577–585. doi:10.1002/jobm.3620300813.

Narberhaus, F. (2002). α-Crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 64–93. doi:10.1128/MMBR.66.1.64-93.2002.

Navarre, C., and Langlade, F. (2010). *L'oenologie*. 7e édition. Paris: Ed. Tec & Doc.

Navarro, M. J. M. (2006). Potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L. cv. Petit Manseng et Gros Manseng. Contribution à l'arôme des vins de pays Côtes de Gascogne (Thèse de doctorat).

Nedovic, V. A., Durieuxb, A., Van Nedervelde, L., Rosseels, P., Vandegans, J., Plaisant, A.-M., and Simon, J.-P. (2000). Continuous cider fermentation with co-immobilized yeast and *Leuconostoc oenos* cells. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 834–839. doi:10.1016/S0141-0229(00)00179-4.

Nedović, V., Gibson, B., Mantzouridou, T. F., Bugarski, B., Djordjević, V., Kalušević, A., Paraskevopoulou, A., Sandell, M., Šmogrovičová, D., and Yilmaztekin, M. (2015). Aroma formation by immobilized yeast cells in fermentation processes. *Yeast* 32, 173–216. doi:10.1002/yea.3042.

Nel, H. A., Bauer, R., Wolfaardt, G. M., and Dicks, L. M. T. (2002). Effect of bacteriocins pediocin pd-1, plantaricin 423, and nisin on biofilms of *Oenococcus oeni* on a stainless steel surface. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 191–196.

Neu, T. R., and Lawrence, J. R. (2014). Advanced techniques for *in situ* analysis of the biofilm matrix (structure, composition, dynamics) by means of laser scanning microscopy. *Methods Mol. Biol.* 1147, 43–64. doi:10.1007/978-1-4939-0467-9_4.

Nielsen, J. C., Prahl, C., and Lonvaud-Funel, A. (1996). Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze-dried *Leuconostoc oenos* cultures. *American Journal of Enology and Viticulture* 47, 42–48.

Nielsen, J. C., and Richelieu, M. (1999). Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 740–745.

Nivens, D. E., Chambers, J. Q., Anderson, T. R., Tunlid, A., Smit, J., and White, D. C. (1993). Monitoring microbiol adhesion and biofilm formation by attenuated total reflection/Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods* 17, 199–213. doi:10.1016/0167-7012(93)90047-L.

Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V., and Silva, A. M. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International* 44, 1115–1126.

Oliveira, N. M., Martinez-Garcia, E., Xavier, J., Durham, W. M., Kolter, R., Kim, W., and Foster, K. R. (2015). Biofilm formation as a response to ecological competition. *PLoS Biol* 13, e1002191. doi:10.1371/journal.pbio.1002191.

Ophir, T., and Gutnick, D. L. (1994). A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 740–745.

de Ory, I., Romero, L. E., and Cantero, D. (2004). Optimization of immobilization conditions for vinegar production. Siran, wood chips and polyurethane foam as carriers for Acetobacter aceti. *Process Biochemistry* 39, 547–555.

Osborne, J. p., Dubé Morneau, A., and Mira de Orduña, R. (2006). Degradation of free and sulfur-dioxide-bound acetaldehyde by malolactic lactic acid bacteria in white wine. *Journal of Applied Microbiology* 101, 474–479. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02947.x.

Osborne, J. P., Orduña, R. M. de, Pilone, G. J., and Liu, S.-Q. (2000). Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 191, 51–55. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09318.x.

O'Toole, G. A., and Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular microbiology* 30, 295–304.

O'Toole, G., Kaplan, H. B., and Kolter, R. (2000). Biofilm Formation as Microbial Development. *Annual Review of Microbiology* 54, 49–79. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.49.

Otzen, D., and Nielsen, P. H. (2007). We find them here, we find them there: Functional bacterial amyloid. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 910–927. doi:10.1007/s00018-007-7404-4.

Parsek, M. R., and Greenberg, E. P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology* 13, 27–33. doi:10.1016/j.tim.2004.11.007.

Pérez-Coello, M. S., González-Viñas, M. A., García-Romero, E., Cabezudo, M. D., and Sanz, J. (2000). Chemical and sensory changes in white wines fermented in the presence of oak chips. *International journal of food science & technology* 35, 23–32.

Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., and Spring, J.-L. (2004). Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65, 297–303. doi:10.1016/j.pmpp.2005.03.002.

Pringle, J. H., and Fletcher, M. (1986). Influence of substratum hydration and adsorbed macromolecules on bacterial attachment to surfaces. *Applied and environmental microbiology* 51, 1321–1325.

Qureshi, N., Annous, B. A., Ezeji, T. C., Karcher, P., and Maddox, I. S. (2005). Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. *Microbial Cell Factories* 4, 24. doi:10.1186/1475-2859-4-24.

Qureshi, N., and Maddox, I. S. (1988). Reactor design for the ABE fermentation using cells of *Clostridium acetobutylicum* immobilized by adsorption onto bonechar. *Bioprocess Eng.* 3, 69–72. doi:10.1007/BF00369330.

Qureshi, N., Schripsema, J., Lienhardt, J., and Blaschek, H. P. (2000). Continuous solvent production by *Clostridium beijerinckii* BA101 immobilized by adsorption onto brick. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16, 377–382. doi:10.1023/A:1008984509404.

Ramos, A., Lolkema, J. S., Konings, W. N., and Santos, H. (1995). Enzyme basis for pH regulation of citrate and pyruvate metabolism by *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1303–1310.

Rankine, B. C., Fornachon, J. C. M., and Bridson, D. A. (1969). Diacetyl in Australian dry red wines and its significance in wine quality. *Vitis* 8, 129–134.

Redzepovic, S., Orlic, S., Majdak, A., Kozina, B., Volschenk, H., and Viljoen-Bloom, M. (2003). Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 83, 49–61.

Renouf, V. (2006). Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : Interactions et équilibres – Relation avec la qualité du Vin (Thèse de doctorat).

Renouf, V., Claisse, O., and Lonvaud-Funel, A. (2005). Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 316–327. doi:10.1111/j.1755-0238.2005.tb00031.x.

de Revel, G., and Bertrand, A. (1994). Dicarbonyl compounds and their reduction products in wine. Identification of wine aldehydes. *Developments in food science*.

de Revel, G., Bertrand, A., and Lonvaud-Funel, A. (1989). Synthese des substances acétoiniques par *Leuconostoc oenos*. Réduction du diacétyle. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 23, 39–45.

de Revel, G., Bloem, A., Augustin, M., Lonvaud-Funel, A., and Bertrand, A. (2005). Interaction of *Œnococcus œni* and oak wood compounds. *Food Microbiology* 22, 569–575. doi:10.1016/j.fm.2004.11.006.

de Revel, G., Martin, N., Pripis-Nicolau, L., Lonvaud-Funel, A., and Bertrand, A. (1999). Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4003–4008. doi:10.1021/jf981383b.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., and Lonvaud, A. (2012a). *Traité d'oenologie-Tome 1-6e éd.-Microbiologie du vin. Vinifications*. Dunod

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Lonvaud, A., and others (2006). *Handbook of Enology, The microbiology of wine and vinifications*. John Wiley & Sons

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., and Dubourdieu, D. (2012b). *Traité d'oenologie-Tome 2-6e éd.-Chimie du vin. Stabilisation et traitements.* Dunod

Richter, H., Vlad, D., and Unden, G. (2001). Significance of pantothenate for glucose fermentation by *Oenococcus oeni* and for suppression of the erythritol and acetate production. *Archives of microbiology* 175, 26–31.

Rieu, A., Aoudia, N., Jego, G., Chluba, J., Yousfi, N., Briandet, R., Deschamps, J., Gasquet, B., Monedero, V., Garrido, C., *et al.* (2014). The biofilm mode of life boosts the anti-inflammatory properties of *Lactobacillus*. *Cell Microbiol* 16, 1836–1853. doi:10.1111/cmi.12331.

Rieu, A., Briandet, R., Habimana, O., Garmyn, D., Guzzo, J., and Piveteau, P. (2008). *Listeria monocytogenes* EGD-e biofilms: no mushrooms but a network of knitted chains. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4491–4497. doi:10.1128/AEM.00255-08.

Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila. *Experientia* 18, 571–573.

Ritt, J.-F., Guilloux-Benatier, M., Guzzo, J., Alexandre, H., and Remize, F. (2008). Oligopeptide assimilation and transport by *Oenococcus oeni*. *Journal of applied microbiology* 104, 573–580.

Ritt, J.-F., Remize, F., Grandvalet, C., Guzzo, J., Atlan, D., and Alexandre, H. (2009). Peptidases specific for proline-containing peptides and their unusual

peptide-dependent regulation in *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology* 106, 801–813. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04032.x.

Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Zarazaga, M., Torres, C., and Ruiz-Larrea, F. (2007). Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 116, 32–36. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.020.

Roland, A. (2010). Influence des phénomènes d'oxydation lors de l'élaboration des moûts sur la qualité aromatique des vins de Melon B. et de Sauvignon Blanc en Val de Loire (Thèse de doctorat).

Rollet, C., Gal, L., and Guzzo, J. (2008). Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 290, 135–142. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01415.x.

Romano, A., Trip, H., Lonvaud-Funel, A., Lolkema, J. S., and Lucas, P. M. (2012). Evidence of two functionally distinct ornithine decarboxylation systems in lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1953–1961. doi:10.1128/AEM.07161-11.

Römling, U. (2002). Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Research in microbiology* 153, 205–212.

Rosche, B., Li, X. Z., Hauer, B., Schmid, A., and Buehler, K. (2009). Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis? *Trends Biotechnol.* 27, 636–643. doi:10.1016/j.tibtech.2009.08.001.

Rossi, J., and Clementi, F. (1984). L-malic acid catabolism by polyacrylamide gel entrapped *Leuconostoc oenos*. *Am. J. Enol. Vitic.* 35, 100–102.

Rossouw, D., Bagheri, B., Setati, M. E., and Bauer, F. F. (2015). Co-flocculation of yeast species, a new mechanism to govern population dynamics in microbial ecosystems. *PLoS ONE* 10, e0136249. doi:10.1371/journal.pone.0136249.

Roth, R. R., and James, W. D. (1989). Microbiology of the skin: Resident flora, ecology, infection. *Journal of the American Academy of Dermatology* 20, 367–390. doi:10.1016/S0190-9622(89)70048-7.

Rous, C., and Alderson, B. (1983). Phenolic extraction curves for white wine aged in French and American oak barrels. *American Journal of Enology and Viticulture* 34, 211–215.

Rousseaux, S., Hartmann, A., and Soulas, G. (2001). Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36, 211–222. doi:10.1111/j.1574-6941.2001.tb00842.x.

Salema, M., Poolman, B., Lolkema, J. S., Dias, M. C., and Konings, W. N. (1994). Uniport of monoanionic L-malate in membrane vesicles from *Leuconostoc oenos*. *Eur. J. Biochem.* 225, 289–295.

Salou, P., Loubiere, P., and Pareilleux, A. (1994). Growth and energetics of *Leuconostoc oenos* during cometabolism of glucose with citrate or fructose. *Applied and environmental microbiology* 60, 1459–1466.

Santamaría, P., Garijo, P., López, R., Tenorio, C., and Rosa Gutiérrez, A. (2005). Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: Effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. *International Journal of Food Microbiology* 103, 49–56. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.024.

Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., and Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology* 184, 1140–1154.

Sauvageot, F., and Vivier, P. (1997). Effects of malolactic fermentation on sensory properties of four Burgundy wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 48, 187–192.

Savage, D. C., and Fletcher, M. (1985). *Bacterial adhesion: mechanisms and physiological significance*. Plenum Press.

Schembri, M. A., Kjærgaard, K., and Klemm, P. (2003). Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiology* 48, 253–267. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03432.x.

Schmid, J., Sieber, V., and Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: Biosynthesis pathways and engineering strategies.

Schuller, D., and Casal, M. (2005). The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Applied microbiology and biotechnology* 68, 292–304.

Schümann, C., Michlmayr, H., Eder, R., del Hierro, A. M., Kulbe, K. D., Mathiesen, G., and Nguyen, T.-H. (2012). Heterologous expression of *Oenococcus oeni* malolactic enzyme in *Lactobacillus plantarum* for improved malolactic fermentation. *AMB Express* 2, 19. doi:10.1186/2191-0855-2-19.

Servetas, I., Berbegal, C., Camacho, N., Bekatorou, A., Ferrer, S., Nigam, P., Drouza, C., and Koutinas, A. A. (2013). *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* immobilized in different layers of a cellulose/starch gel composite for simultaneous alcoholic and malolactic wine fermentations. *Process Biochemistry* 48, 1279–1284. doi:10.1016/j.procbio.2013.06.020.

Shemesh, M., Pasvolsky, R., and Zakin, V. (2014). External pH is a cue for the behavioral switch that determines surface motility and biofilm formation of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *J. Food Prot.* 77, 1418–1423. doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-425.

Singh, R., Paul, D., and Jain, R. K. (2006). Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology* 14, 389–397. doi:10.1016/j.tim.2006.07.001.

Singleton, V. L. (1995). Maturation of wines and spirits: comparisons, facts, and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture* 46, 98–115.

Smukalla, S., Caldara, M., Pochet, N., Beauvais, A., Guadagnini, S., Yan, C., Vinces, M. D., Jansen, A., Prevost, M. C., Latgé, J.-P., *et al.* (2008). FLO1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell* 135, 726–737. doi:10.1016/j.cell.2008.09.037.

Spettoli, P., Bottacin, A., Nuti, M. P., and Zamorani, A. (1982). Immobilization of *Leuconostoc oenos* ml 34 in calcium alginate gels and its application to wine technology. *Am. J. Enol. Vitic.* 33, 1–5.

Spillman, P. J., Pollnitz, A. P., Liacopoulos, D., Pardon, K. H., and Sefton, M. A. (1998). Formation and degradation of furfuryl alcohol, 5-methylfurfuryl alcohol, vanillyl alcohol, and their ethyl ethers in barrel-aged wines. *J. Agric. Food Chem.* 46, 657–663. doi:10.1021/jf970559r.

Stewart, P. S. (2012). Mini-review: Convection around biofilms. *Biofouling* 28, 187–198. doi:10.1080/08927014.2012.662641.

Stoodley, P., Boyle, J. D., Dodds, I., and Lappin-Scott, H. M. (1997). Consensus model of biofilm structure.

Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J. D., and Lappin-Scott, H. M. (1999). Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *Journal of applied microbiology* 85, 19S–28S.

Stoodley, P., Lewandowski, Z., and others (1994). Liquid flow in biofilm systems. *Applied and environmental microbiology* 60, 2711–2716.

Sugimoto, S., Abdullah-Al-Mahin, and Sonomoto, K. (2008). Molecular Chaperones in Lactic Acid Bacteria: Physiological Consequences and Biochemical Properties. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106, 324–336. doi:10.1263/jbb.106.324.

Su, J., Wang, T., Wang, Y., Li, Y.-Y., and Li, H. (2014). The use of lactic acid-producing, malic acid-producing, or malic acid-degrading yeast strains for acidity adjustment in the wine industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 2395–2413. doi:10.1007/s00253-014-5508-y.

Sumby, K. M., Grbin, P. R., and Jiranek, V. (2014). Implications of new research and technologies for malolactic fermentation in wine. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 8111–8132. doi:10.1007/s00253-014-5976-0.

Sumby, K. M., Grbin, P. R., and Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry* 121, 1–16. doi:10.1016/j.foodchem.2009.12.004.

Sutherland, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147, 3–9.

Swiegers, J. h., Bartowsky, E. j., Henschke, P. a., and Pretorius, I. s. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 139–173. doi:10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x.

Tapia, J., Munoz, J., Gonzalez, F., Blazquez, M., Malki, M., and Ballester, A. (2009). Extraction of extracellular polymeric substances from the acidophilic bacterium *Acidiphilium* 3.2 Sup (5).

Tarascou, I. (2005). Synthèse et caractérisation de procyanidines oligomères pour l'identification de tanins du raisin et du vin (Thèse de doctorat).

Tay, A., and Yang, S.-T. (2002). Production of L(+)-lactic acid from glucose and starch by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 80, 1–12. doi:10.1002/bit.10340.

Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F., and Jaeger, K.-E. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* 151, 1313–1323.

Tissiéres, A., Mitchell, H. K., and Tracy, U. M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: Relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology* 84, 389–398. doi:10.1016/0022-2836(74)90447-1.

du Toit, M., Engelbrecht, L., Lerm, E., and Krieger-Weber, S. (2011). *Lactobacillus*: the Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures—an Overview. *Food Bioprocess Technol* 4, 876–906. doi:10.1007/s11947-010-0448-8.

Tourdot-Maréchal, R., Cavin, J.-F., Drici-Cachon, Z., and Diviès, C. (1993). Transport of malic acid in *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation: a model to evaluate the kinetic parameters. *Appl Microbiol Biotechnol* 39, 499–505. doi:10.1007/BF00205040.

Towey, J. P., and Waterhouse, A. L. (1996). The extraction of volatile compounds from French and American oak barrels in Chardonnay during three successive vintages. *American Journal of Enology and Viticulture* 47, 163–172.

Tyagi, R. D., and Ghose, T. K. (1982). Studies on immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. I. Analysis of continuous rapid ethanol fermentation in immobilized cell reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 781–795. doi:10.1002/bit.260240403.

Ugliano, M., Bartowsky, E. J., McCarthy, J., Moio, L., and Henschke, P. A. (2006). Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile

compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6322–6331. doi:10.1021/jf0607718.

Ugliano, M., Genovese, A., and Moio, L. (2003). Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5073–5078. doi:10.1021/jf0342019.

Ugliano, M., and Moio, L. (2006). The influence of malolactic fermentation and *Oenococcus oeni* strain on glycosidic aroma precursors and related volatile compounds of red wine. *J. Sci. Food Agric.* 86, 2468–2476. doi:10.1002/jsfa.2650.

Valdés La Hens, D., Bravo-Ferrada, B. m., Delfederico, L., Caballero, A. c., and Semorile, L. c. (2014). Prevalence of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* during spontaneous malolactic fermentation in Patagonian red wines revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis with two targeted genes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 21, 49–56. doi:10.1111/ajgw.12110.

Vaningelgem, F., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Vancanneyt, M., Swings, J., and De Vuyst, L. (2004). Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Applied and environmental microbiology* 70, 900–912.

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

Verstrepen, K. J., and Klis, F. M. (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology* 60, 5–15. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05072.x.

Viriot, C., Scalbert, A., Lapierre, C., and Moutounet, M. (1993). Ellagitannins and lignins in aging of spirits in oak barrels. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1872–1879. doi:10.1021/jf00035a013.

Vivas, N. (2002). *Manuel de tonnellerie à l'usage des utilisateurs de futaille*, 2ème édition.

Vivas, N., and Glories, Y. (1996). Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging. *American Journal of Enology and Viticulture* 47, 103–107.

Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., and Kolter, R. (2008). Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev.* 22, 945–953. doi:10.1101/gad.1645008.

Volschenk, H., Viljoen-Bloom, M., Subden, R. E., and van Vuuren, H. J. J. (2001). Malo-ethanolic fermentation in grape must by recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 18, 963–970. doi:10.1002/yea.743.

Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J., and Ivanova, E. P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 14, 2535–2554. doi:10.3390/molecules14072535.

Vuuren, H. J. J. V., and Dicks, L. M. T. (1993). *Leuconostoc oenos*: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 99–112.

Walker, J. T., and Marsh, P. D. (2004). A review of biofilms and their role in microbial contamination of dental unit water systems (DUWS). *International biodeterioration & biodegradation* 54, 87–98. doi:10.1016/j.ibiod.2004.03.012.

Walling, E., Gindreau, E., and Lonvaud Funel, A. (2001). Exopolysaccharide biosynthesis by *Pediococcus damnosus* strains isolated from wine: elaboration of molecular detection tools. in *Lait* (France).

Waterhouse, A. L., and Laurie, V. F. (2006). Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture* 57, 306–313.

Waterhouse, A. L., and Towey, J. P. (1994). Oak lactone isomer ratio distinguishes between wine fermented in american and french oak barrels. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1971–1974. doi:10.1021/jf00045a026.

Weber, K., Delben, J., Bromage, T. G., and Duarte, S. (2014). Comparison of SEM and VPSEM imaging techniques with respect to *Streptococcus mutans* biofilm topography. *FEMS Microbiology Letters* 350, 175–179. doi:10.1111/1574-6968.12334.

Weuster-Botz, D., Aivasidis, A., and Wandrey, C. (1993). Continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis* in a fluidized bed reactor. Part II: Process development for the fermentation of hydrolysed B-starch without sterilization. *Appl Microbiol Biotechnol* 39, 685–690. doi:10.1007/BF00164450.

Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., and Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295, 1487. doi:10.1126/science.295.5559.1487.

Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C. R., Fleet, G. H., and Lee, T. H. (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 302–313.

Wingender, J., Neu, T. R., and Flemming, H.-C. (1999). “What are bacterial extracellular polymeric substances?” in *Microbial extracellular polymeric substances* (Springer), 1–19.

Wingender, J., Strathmann, M., Rode, A., Leis, A., and Flemming, H.-C. (2001). Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods in enzymology*, 302–14.

Wolfaardt, G. M., Lawrence, J. R., Robarts, R. D., and Caldwell, D. E. (1998). *In situ* characterization of biofilm exopolymers involved in the accumulation of chlorinated organics. *Microbial ecology* 35, 213–223.

Yurdugül, S., and Bozoglu, F. (2002). Studies on an inhibitor produced by lactic acid bacteria of wines on the control of malolactic fermentation. *Eur Food Res Technol* 215, 38–41. doi:10.1007/s00217-002-0543-9.

Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., and Römling, U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular microbiology* 39, 1452–1463.

Résumé

La fermentation malolactique permet une désacidification et une amélioration de la qualité du vin. Elle est réalisée par des bactéries lactiques principalement de l'espèce *Oenococcus oeni* : cette espèce est privilégiée pour son efficacité et ses intérêts organoleptiques. La capacité de *O. oeni* à résister au stress du vin et à garder son activité fermentaire est un sujet d'intérêt majeur.

Les prélèvements des fûts de chêne ont montré que *O. oeni* adhère au bois et est capable de persister plusieurs mois dans le vin. Or, dans la majorité des habitats naturels, les microorganismes se développent attachés à un support, au sein d'un écosystème structuré appelé biofilm. Sous cette forme de vie, les cellules bénéficient d'une résistance accrue au stress.

Ces deux propriétés que sont l'adhésion à une surface ainsi que la résistance au stress ont donc été étudiées pour *O. oeni*. Des observations par microscopie électronique à balayage ont ainsi permis de mettre en évidence la formation de biofilms par *O. oeni*. Puis, nous avons évalué la capacité de résistance au stress du vin de *O. oeni* sous forme de biofilm.

L'intérêt pour le biofilm est croissant dans les industries agroalimentaires et biotechnologiques, en raison de la conservation de son activité métabolique en milieu stressant. C'est pourquoi la fermentation malolactique avec un biofilm de *O. oeni* a été suivie dans le vin. Enfin, l'influence du biofilm de *O. oeni* sur les transferts de composés aromatiques entre le bois et le vin a été étudiée.

Cette étude est la première caractérisation du biofilm de *O. oeni*, de sa résistance au stress du vin et de son potentiel fermentaire.