

Évolution, biodiversité, taxonomie

La biosynthèse d'exopolysaccharide par des souches de *Pediococcus damnosus* isolées du vin : mise au point d'outils moléculaires de détection

Émilie WALLING, Emmanuel GINDREAU, Aline LONVAUD-FUNEL*

Faculté d'Oenologie, Laboratoire de Biotechnologie et Microbiologie Appliquée,
Unité associée INRA-Université Victor Ségalen Bordeaux 2,
351 cours de la Libération, 33405 Talence, France

Abstract — Exopolysaccharide biosynthesis by *Pediococcus damnosus* strains isolated from wine: elaboration of molecular detection tools. Lactic acid bacteria synthesize exopolysaccharides (EPS). These carbohydrate polymers excreted or produced at the cell membrane can drastically increase viscosity of the medium. In dairy industry, this property is used to improve the texture of yoghurts for example. Other microbial EPS are currently under study for their possible use in food processes or in medicine. However, cider, beer and wine are spoiled by the presence of EPS. In “ropy wines”, particular strains of *Pediococcus damnosus* are responsible for the production of a β -D-glucan. For *P. damnosus* strains isolated from ropy wines, glucan production is linked to a plasmid of approximately 5 500 bp. The ropy phenotype disappears when the plasmid is lost. This plasmid is currently being sequenced and several open reading frames (ORF) have already been revealed. The amino acid sequence of the first ORF has high identity scores with a plasmid mobilization protein of *Lactobacillus casei*. The second ORF contains several motifs characterized on a glucosyltransferase from *Streptococcus pneumoniae* type 37 which produces the same polysaccharide as the *Pediococcus* strains isolated from ropy wines. From the partial sequence of the plasmid, molecular tools for detection of spoiling strains in wine were obtained. They involve PCR, Southern blot and colony hybridization. A new probe called “GT probe” has been isolated, making it possible to differentiate ropy from non-ropy strains. This probe could be used directly in colony hybridization. Two oligonucleotides (PF5 and PF6) were also selected for PCR experiments. A plasmid fragment from the ropy strains was specifically amplified. PCR was performed using whole cells from laboratory cultures and preliminary results obtained with a protocol for direct PCR on wine samples are presented. Wine quality depends on the availability of such detection tools. In fact, wines generally become ropy during storage in tanks, barrels and most of the time in bottles. In the latter case, no further treatment is possible. Therefore, detection of ropy strains before bottling can help the wine-maker predict the risks of spoilage with ropy *P. damnosus* and treat the wine in time.

exopolysaccharide (EPS) / *Pediococcus damnosus* / plasmid / detection / wine

* Correspondance et tirés-à-part
Tél. : (33) 5 56 84 64 66 ; fax : (33) 5 56 84 64 68 ; e-mail : aline.lonvaud@oenologie.u-bordeaux2.fr

Résumé — La production d'exopolysaccharides (EPS) par les bactéries lactiques est un phénomène favorable à de nombreux processus industriels alimentaires. Au contraire, dans le cidre, la bière ou le vin, la synthèse d'EPS provoque une altération grave. Des souches de *Pediococcus damnosus* sont capables de synthétiser un β -D-glucane dans le vin, à l'origine de la « maladie de la graisse » ou des « vins filants ». Chez cette bactérie, la production d'EPS est liée à la présence d'un plasmide de 5 500 pb environ. Le séquençage de ce plasmide est en cours. L'un des cadres ouverts de lecture identifié pourrait coder une protéine dont la séquence contient des motifs conservés de glycosyltransférases. Elle est aussi très similaire à la séquence de la glucosyltransférase de *Streptococcus pneumoniae* type 37, produisant le même glucane que celui des souches de *P. damnosus* isolées du vin. La séquence du plasmide a permis l'élaboration d'outils pour la détection des souches d'altération des vins. Une sonde, ciblant le gène potentiel de la glucosyltransférase permet de différencier les souches de *P. damnosus* productrices de glucane des souches n'en produisant pas. D'autre part, deux amorces nucléotidiques qui amplifient spécifiquement une région du plasmide porté par les souches productrices d'EPS ont été sélectionnées. Elles sont utilisables pour des réactions de PCR réalisées directement sur la microflore présente dans le vin. La maladie de la graisse se déclare le plus souvent lors de la conservation des vins en bouteille, alors qu'il est trop tard pour envisager tout traitement. Les outils de détection utilisés sur des échantillons de vins en cuve permettront de sensibiliser le vinificateur sur les risques que présente son vin quant à l'apparition de souches de *P. damnosus* d'altération et de prévoir les traitements en conséquence.

exopolysaccharide (EPS) / *Pediococcus damnosus* / plasmide / détection / vin

1. INTRODUCTION

Il arrive que le vin devienne visqueux, pendant son stockage en cuves, en barriques ou en bouteilles. Cette altération bactérienne des vins, appelée « maladie de la graisse » ou « maladie des vins filants », a été décrite dès 1866 par Pasteur [19]. Ce phénomène, également observé dans la bière [2] et le cidre [28], provient d'une production importante d'exopolysaccharides (EPS) dans le milieu par différentes espèces de bactéries lactiques. Les EPS augmentent excessivement la viscosité des boissons, ce qui les rend impropres à la commercialisation.

Les EPS sont libérés dans le milieu et forment parfois un réseau serré autour des cellules (capsules) ou libre (mucilage, biofilm). Leur présence assure de nombreuses fonctions : virulence des bactéries pathogènes, interactions plantes-microbes, protection contre la dessiccation ou les attaques phagiques et les composés toxiques [8]. D'un point de vue technologique, les EPS microbiens sont exploités dans de nombreux domaines et sont de plus en plus convoités

pour leurs propriétés physiques particulières [20, 22]. Dans le cas de l'industrie laitière, la capacité des bactéries lactiques à produire des EPS influence directement la texture des produits laitiers fermentés [8]. Les souches de bactéries lactiques utilisées lors des fermentations sont donc en partie sélectionnées en fonction de cette propriété [3].

Certaines bactéries lactiques produisent des hétéropolysaccharides. Les systèmes enzymatiques impliqués sont complexes. Les gènes déterminant les enzymes participant à la synthèse d'EPS et de polysaccharides capsulaires sont organisés en un opéron *eps*, *cps* ou *cap* [23]. Une région centrale occupée par des gènes de glycosyltransférases est encadrée par les gènes nécessaires à la régulation, la polymérisation, et l'export du polysaccharide [5, 14]. Cet opéron peut être soit chromosomique, soit porté par un plasmide. Ainsi, l'opéron *eps* de *Lactococcus lactis* NIZO B40 [25] est localisé sur un plasmide de 40 kb comprenant également quatre réplicons fonctionnels, des gènes de mobilisation et trois origines de transfert [26]. L'opéron *eps* est composé de

14 gènes regroupés à la suite d'une séquence d'insertion iso-IS982 [24]. Chez *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* NCBF2393 [11] ou *Streptococcus pneumoniae* [10], les opérons *eps* et *cap* (ou *cps*) respectivement sont localisés sur le chromosome et sont organisés de manière similaire [8]. À l'inverse, les gènes d'enzymes responsables de la formation d'homopolysaccharides (dextranes, glucanes, fructanes) ne font pas partie d'opérons. Ces enzymes sont extracellulaires ou placées sur la face externe de la membrane cytoplasmique. La synthèse de dextrane par la dextrane sucrase de *Leuconostoc mesenteroides* a été la plus amplement décrite. Elle catalyse, à partir de saccharose, la polymérisation de molécules de glucose en α (1 \rightarrow 6) principalement, avec libération de fructose.

Le polysaccharide produit par *P. damnosus* dans le vin est un homopolymère. Il s'agit de β -glucane composé d'une chaîne principale liée en β -(1 \rightarrow 3) avec des ramifications en β -(1 \rightarrow 2) [15]. Des souches de *P. damnosus* isolées de cidre produisent également ce type glucane [9] ainsi qu'une souche de *Streptococcus pneumoniae* produisant le polysaccharide capsulaire de type 37 [18].

Les seules données génétiques disponibles à ce jour sur la biosynthèse de ce type de glucane concernent *Streptococcus pneumoniae*. L'opéron *cap* du sérotype 37 a récemment été décrit [18], mais il présente la particularité de ne pas être fonctionnel. En revanche, un seul gène (*tts*), localisé en dehors de cette région « silencieuse », détermine la synthèse du polysaccharide de type 37. Lorsque ce gène est utilisé pour transformer des souches de *Streptococcus pneumoniae* sans capsule, celles-ci deviennent capables de synthétiser la capsule de type 37 [18]. Il est possible que l'identité structurale des glucanes produits par *Streptococcus* et *Pediococcus* se reflète au niveau génétique. Ainsi, un gène isolé pourrait déclencher la production de polysaccharides chez les pédiocoques.

Les souches de *P. damnosus* productrices d'EPS isolées du vin possèdent un ou plusieurs plasmides. Elles ont toutes en commun un plasmide d'environ 5 500 pb nommé pF (Fig. 1a). Le repiquage successif des souches

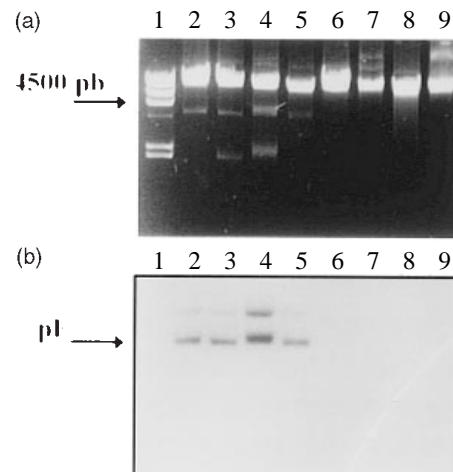


Figure 1. (a) Électrophorèse en gel d'agarose d'extractions d'ADN génomique de souches de *P. damnosus* productrices d'EPS et non productrices. Piste 1 : Marqueur de poids moléculaire λ HindIII (Promega). ADN génomique des souches « filantes » ICEB 8415 (piste 2), ICEB 8514 (piste 3), ICEB 8801 (piste 4), ICEB 9820 (piste 5) et de quatre souches « non-filantes » : ICEB 9820.1 (V1, piste 6), ICEB Ja2 (piste 7), ATCC 25248 (piste 8), ICEB 9816 (piste 9). Les souches productrices d'EPS portent toutes un plasmide de 5 500 pb environ, pF. (b) Résultat d'hybridation de la membrane obtenue par transfert du gel décrit dans la figure 1a, hybridée avec la sonde GT.

Figure 1. (a) Agarose gel electrophoresis of genomic DNA extractions of *P. damnosus* EPS producing and non producing strains. Lane 1: λ HindIII molecular weight marker (Promega). Genomic DNA from ropy strains ICEB 8415 (lane 2), ICEB 8514 (lane 3), ICEB 8801 (lane 4), ICEB 9820 (lane 5) and from four non ropy strains: ICEB 9820.1 (V1, lane 6), ICEB Ja2 (lane 7), ATCC 25248 (lane 8), ICEB 9816 (lane 9). All EPS producing strains have a common plasmid, pF, around 5500 bp. (b) Hybridization results of the membrane obtained after Southern blot of the gel described in figure 1a, using the GT probe.

au phénotype « filant » en milieu synthétique dépourvu d'éthanol entraîne la perte du plasmide pF et la disparition du phénotype filant. La présence d'un déterminant génétique localisé sur le plasmide pF et la production d'EPS semblent donc liées. Cette observation a permis d'obtenir une première sonde nucléique capable de caractériser les souches porteuses du plasmide [17].

Après avoir caractérisé le phénomène de production d'EPS par des mesures de viscosité, nous avons cherché à expliquer le rôle du plasmide dans la production de glucane. Cette étude a permis la mise au point de nouveaux outils moléculaires de détection des souches de contamination dans le vin.

2. DESCRIPTION DES SOUCHES DE *P. DAMNOSUS* PRODUCTRICES D'EPS

Les souches de *P. damnosus* étudiées ont été isolées de vins atteints de la maladie de la graisse. Certaines de ces souches, lorsqu'elles sont cultivées en MRS liquide [7], rendent le milieu extrêmement visqueux. Les mesures de viscosité permettent de quantifier ce phénomène et de caractériser plus précisément les souches de phénotype « filant ».

Les mesures sont effectuées avec un viscosimètre à tube Ubbelohde selon un protocole précédemment décrit [16]. Les 3 souches étudiées pour l'augmentation de viscosité sont *P. damnosus* ICB (Collection de la Faculté d'œnologie) 9820, ICB 9820.1 notée V1 pour plus de clarté et ATCC 25248. ICB 9820 est une souche isolée d'un vin filant en 1998. Elle présente clairement le phénotype filant lors de sa culture en milieu liquide. V1 est un variant de ICB 9820, obtenu par repiquages successifs en milieu dépourvu d'éthanol. La souche *P. damnosus* de référence de l'ATCC (*American Type Culture Collection*) ne présente pas le phénotype filant.

Chaque souche a été ensemencée dans des milieux (MRS) contenant 3 concentrations croissantes de glucose (0, 5 et 20 g·L⁻¹), afin d'observer l'effet de la concentration du glucose sur la viscosité du milieu. Les mesures ont été effectuées au bout de 2 j de culture. Les résultats sont présentés dans la figure 2. La croissance des cultures est suivie grâce à la mesure de densité optique à 600 nm et par dénombrements de colonies sur boîtes. Elle est du même ordre de grandeur pour les 3 souches dans chaque condition de culture. La consommation de glucose est suivie par dosages enzymatiques. Les souches cultivées en présence de glucose à 5 ou 20 g·L⁻¹ de concentration initiale, en ont consommé environ 5 g·L⁻¹.

Les cultures dans le milieu à 5 g·L⁻¹ de glucose permettent de différencier plus clairement les 3 souches. La viscosité du milieu ensemencé avec ICB 9820 est la plus élevée (1.31 cST), alors que V1 génère une viscosité intermédiaire (1.17 cST), supérieure à celle du milieu cultivé avec ATCC 25248 (1.02 cST). Les milieux à 0 et 20 g·L⁻¹ de glucose présentent aussi des viscosités différentes selon les souches utilisées, mais les écarts sont moins flagrants. L'influence de la concentration de glucose sur la production d'EPS ne pourra être clairement expliquée qu'après dosage direct du polysaccharide produit et la détermination du bilan des produits de la fermentation du glucose.

La viscosité intermédiaire de V1 à 5 g·L⁻¹, entre la souche témoin « non-filante » et la souche ICB 9820 est intéressante. Elle peut signifier une capacité moindre, mais non nulle de V1 à produire le polysaccharide. Alors il faut supposer que la perte seule du plasmide n'entraîne peut être pas une éradication totale de la production d'EPS. Des déterminants génétiques fonctionnels et différents de ceux portés par le plasmide pourraient être présents sur le chromosome. Dans ce cas, le plasmide ne contrôlerait pas à lui seul la production de glucane, mais il amplifierait excessivement une production de base commandée par un système de gènes chromosomiques.

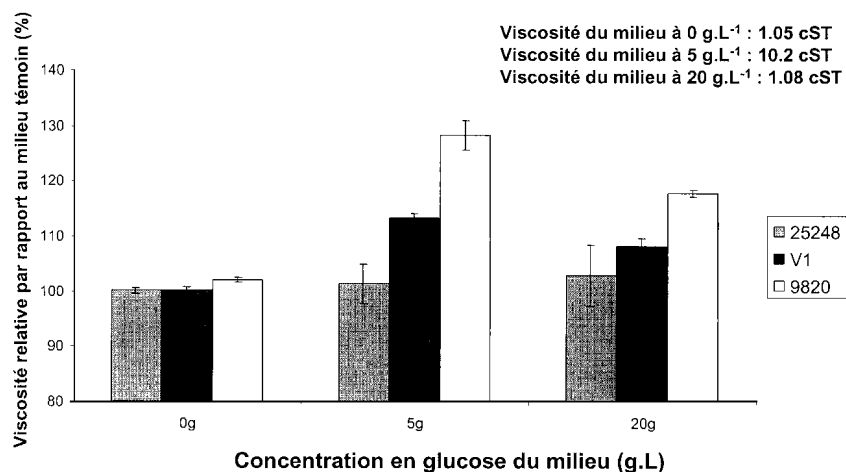


Figure 2. Viscosité relative des cultures de *P. damnosus* ATCC 25248, ICB 9820.1 (V1) et ICB 9820 en milieu nutritif, avec des concentrations croissantes de glucose (0, 5, 20 g·L⁻¹). La viscosité de chaque milieu non ensemencé représente 100 %. Les milieux non ensemencés à 0, 5, et 10 g·L⁻¹ de glucose ont des viscosités respectives de 1,05 cST, 1,02 cST, et 1,08 cST.

Figure 2. Relative viscosity of the strains *P. damnosus* ATCC 25248, ICB 9820.1 (V1) and ICB 9820 cultivated in a rich medium containing increasing concentrations of glucose (0, 5 and 20 g·L⁻¹). The viscosity of each medium before inoculation represents 100%. The viscosity of the non-inoculated media at 0, 5 and 20 g·L⁻¹ are 1.05 cST, 1.02 cST and 1.08 cST respectively.

Outre la viscosité élevée des cultures de souches filantes, les pédiocoques isolés de vins filants porteurs du plasmide pF sont caractérisés par leur meilleure adaptation au milieu extrême qu'est le vin. En effet, il a été observé [16] que les souches filantes résistaient mieux à un pH acide (3,5) et à l'éthanol (10 %) que des souches non filantes. De plus, ces dernières sont détruites sous l'action de 30 mg·L⁻¹ de SO₂ alors que la croissance des souches filantes est légèrement retardée, mais finit par atteindre un niveau normal.

Bien que les souches filantes puissent produire des EPS à partir de nombreux sucres (glucose, fructose, arabinose et xylose), le rendement de la biosynthèse est supérieur lorsque le glucose sert directement de substrat. Cela paraît logique compte tenu de la nature glucosidique du polymère. La production de polysaccharide est également accrue lors de la phase exponentielle

de croissance, et par la présence d'éthanol et d'acide malique dans le milieu. Les conditions optimales sont rassemblées dans les vins n'ayant pas réalisé totalement la fermentation malolactique et dans les vins issus de moûts altérés par *Botrytis cinerea* qui stimule la croissance des bactéries lactiques ou provoque une déviation de leur métabolisme [16].

3. CARACTÉRISATION DU PLASMIDE LIÉ À LA BIOSYNTÈSE DE GLUCANE

3.1. Séquençage

Étant donné les difficultés à extraire et purifier le plasmide pF, d'une part, et à le digérer par des enzymes de restrictions d'autre part, la stratégie de séquençage

consiste en l'amplification par PCR de fragments spécifiques du plasmide. La séquence du fragment du clone SURE 2 n° 14 (1 241 pb) a été utilisée pour sélectionner de nouvelles amorces [17]. L'amplification de régions spécifiques du plasmide s'est révélée difficile car de nombreux fragments sont générés, même dans des conditions de réactions stringentes. Ceci est expliqué par la présence fréquente de séquences directes répétées sur le plasmide. De plus, la souche étudiée dans cette partie, ICEB 8801, contient plusieurs plasmides qui hybrident entre eux, suggérant la présence de séquences similaires sur les différents plasmides. De ce fait, les oligonucléotides destinés à amplifier des régions de pF8801 pourraient également hybrider sur un autre plasmide. En conséquence, les qualités de PCR ont été améliorées en utilisant le plasmide purifié comme matrice. À ce jour, 3 981 pb du plasmide ont été séquencés. Il est possible de proposer une carte préliminaire du plasmide (Fig. 3).

3.2. Fonctions potentielles déterminées par le plasmide

L'analyse de la séquence partielle du plasmide avec les outils de bioinformatique disponibles sur l'Internet (<http://www.infobiogen.fr/services/deambulium/fr/>) révèle la présence de 2 cadres de lectures (ORF). Le premier cadre de lecture (*orf185*) est incomplet, mais sur les 185 acides aminés disponibles, la séquence protéique présente de forts taux d'identité (91 %) avec la partie N-terminale d'une protéine de mobilisation de *Lactobacillus casei* (numéro d'accès : U31333). L'ORF185 présente également des identités élevées avec des protéines de mobilisation d'autres espèces de bactéries lactiques, comme *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactococcus lactis*. La présence éventuelle d'un gène déterminant une protéine de mobilisation sur le plasmide pF8801 peut faire penser que le plasmide est transféré par conjugaison. Un plasmide portant un gène codant pour une

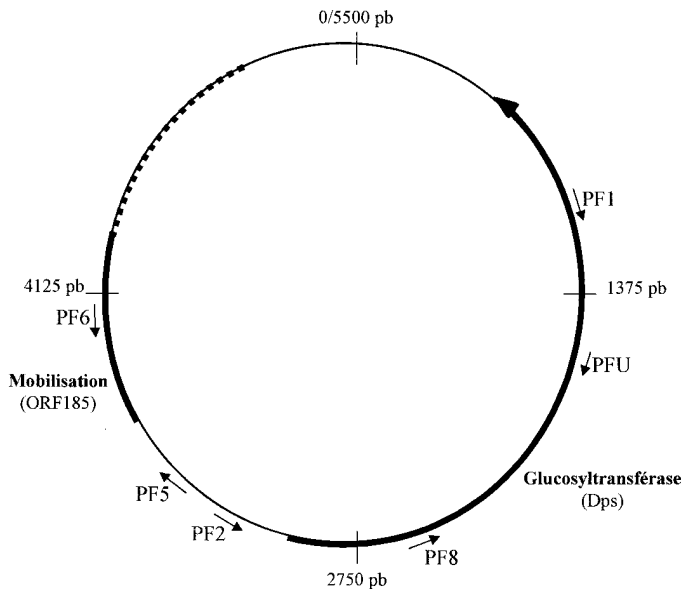


Figure 3. Représentation schématique de l'organisation génomique du plasmide pF8801, localisation des amorces nucléotidiques et des sondes. Les oligonucléotides sont représentés par des flèches. La position et le sens des cadres ouverts de lecture (ORF) sont indiqués. Les pointillés représentent la région restant à séquencer.

Figure 3. Schematic representation of the plasmid (pF8801) genomic organization including PCR primers and nucleic acid probes. Primers are represented with arrows. Open reading frames (ORF) are indicated. Dashes represent the remaining region to be sequenced.

protéine de mobilisation peut être transféré en même temps qu'un plasmide conjugatif. En effet, les protéines de mobilisation ont une activité nucléasique et préparent l'ADN pour le co-transfert du plasmide. Elles agissent au niveau de sites spécifiques dénommés « *bom* » pour « *basis of mobilization* » situés sur le plasmide mobilisable.

Le deuxième cadre de lecture, *dps* détermine une protéine de 567 acides aminés avec un poids moléculaire théorique de 65 kg·mol⁻¹. Lorsque cette séquence est soumise à la comparaison dans les banques de données, elle s'aligne le plus fidèlement avec la polysaccharide synthase (Tts) de *Streptococcus pneumoniae* type 37 qui contient 509 acides aminés [18]. D'après les résultats obtenus avec le programme ALIGN (<http://www.infobiogen.fr/services/analyse/cgi-bin/alignm-in.pl>), les deux séquences sont identiques à 32,2 % et similaires à 34 %. Les alignements suivants de BLAST sélectionnent plusieurs glycosyltransférases procarotes et eucaryotes, dont des cellulose synthases. *Dps* semble donc appartenir à la famille des glycosyltransférases. En effet, le programme ProfileScan (http://www.isrec.isbsib.ch/software/PFSCAN_form.html) détecte une séquence signature des glycosyltransférases située de l'acide aminé 110 à 212 de *Dps*. De plus, l'équipe de Lull [18] a montré, grâce à des expériences de transformation de souches de *Streptococcus pneumoniae* sans capsule que le gène *fts* déterminait la biosynthèse du polysaccharide type 37. Puisque ce polysaccharide et le glucane de *P. damnosus* ont la même structure, il n'est pas étonnant de retrouver des similitudes au niveau des enzymes impliquées dans leur synthèse. Un alignement a été réalisé avec 5 séquences de glycosyltransférases provenant de différents organismes (Fig. 4). Sur les 3 résidus acides aspartiques supposés faire partie du site catalytique des glycosyltransférases [21], seulement 2 sont présents chez *Dps*. D'autre part le motif QXXRW retrouvé dans de nombreuses glycosyltransférases n'est présent ni dans la séquence de Tts, ni dans celle de *Dps*.

La polysaccharide synthase *Dps* de *P. damnosus* est vraisemblablement une protéine membranaire. En effet, elle comporterait 6 domaines transmembranaires A (aa 1 à 36), qui est probablement un peptide signal, B (aa 57 à 82), C (aa 265 à 289), D (aa 386 à 407), E (aa 450 à 468) et F (aa 496 à 518). Une organisation similaire est retrouvée dans la Tts de *Streptococcus pneumoniae*, où, mis à part un peptide signal présent dans la partie N-terminale, les 5 domaines transmembranaires sont plutôt regroupés en C-terminal. Ceci laisse supposer que le site actif se situe au centre de la séquence primaire (Fig. 4).

En résumé, le lien entre le plasmide pF8801 de *P. damnosus* et la synthèse de β -glucane est conforté par la présence du gène *dps* déterminant une glucosyltransférase potentielle. Bien que les glucosyltransférases soient des enzymes très spécifiques qui catalysent généralement la formation d'un seul type de liaison entre les unités de sucres, il existe quelques rares exemples de glycosyltransférases bifonctionnelles chez *Escherichia coli* [12], *Streptococcus pyogenes* [6], et *Streptococcus pneumoniae* type 3 [1]. De plus, il est suspecté que la glucosyltransférase Tts de *S. pneumoniae*, codée par un gène n'appartenant pas à un opéron, soit également une enzyme bifonctionnelle. De même, *dps* ne faisant pas partie d'un opéron, il est envisageable que la biosynthèse de glucane par les pédiocoques du vin soit déterminée par un gène unique.

Il reste à caractériser l'activité enzymatique de *Dps* par transformation chez un hôte hétérologue (*Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus pneumoniae*) car les protocoles de transformations de *Pediococcus damnosus* ne sont pas encore mis au point.

3.3. Détection des souches de *Pediococcus damnosus* porteuses du plasmide pF8801

Deux types d'outils de détection des souches de *P. damnosus* productrices d'EPS

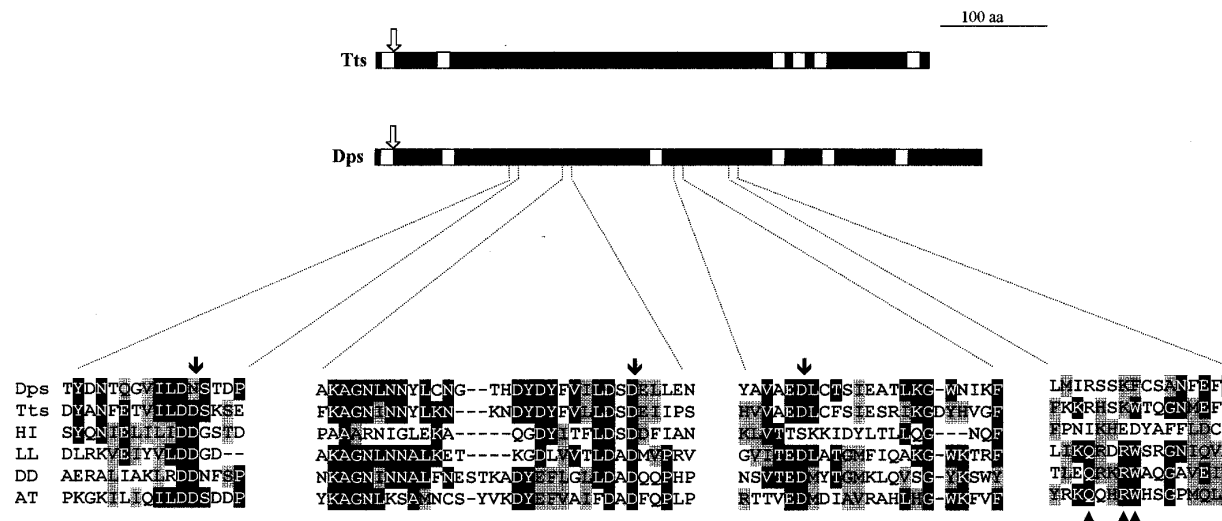


Figure 4. Analyse de la séquence protéique de Dps. La partie supérieure montre la représentation schématique de la structure secondaire de Dps. Les flèches blanches représentent les sites potentiels de coupure du peptide signal. Les régions blanches indiquent les domaines transmembranaires. La structure secondaire de la glucosyltransférase Tts (n° d'accès AJ131985) de *Streptococcus pneumoniae* est montrée pour comparaison. La partie inférieure du schéma montre les alignements de certaines régions des séquences protéiques de Dps, Tts et de glycosyltransférases des espèces *Haemophilus influenzae* (HI, n° d'accès Q57022), *Lactococcus lactis* (LL, AJ000993), *Dictyostelium discoideum* (DD, AF163835) et *Arabidopsis thaliana* (AT, AC006266). Les résidus sur fond noir sont les acides aminés identiques dans au moins 3 des 6 séquences alignées. Les substitutions conservatives sont indiquées sur fond gris. Les flèches noires indiquent les positions des résidus Asp conservés chez les glycosyltransférases. La position du motif QXXRW est montrée par les triangles noirs.

Figure 4. Dps amino acid sequence analysis. The top part shows a schematic representation of the secondary structure of Dps. White arrows are the potential cleavage site for the signal peptide. White areas indicate the transmembrane regions. The secondary structure of *Streptococcus pneumoniae* glycosyltransferase Tts (accession # AJ131985) is shown for comparison. The bottom part of the illustration contains the alignment of several regions from the proteins Dps, Tts and from glycosyltransferases of the species *Haemophilus influenzae* (HI, accession # Q57022), *Lactococcus lactis* (LL, AJ000993), *Dictyostelium discoideum* (DD, AF163835) and *Arabidopsis thaliana* (AT, AC006266). Residues on black boxes indicate amino acid residues identical in at least 3 out of the 6 sequences aligned. Conserved amino acid substitutions are shown in gray. Black arrows indicate the position of conserved Asp residues in glycosyltransferases. Position of motif QXXRW is shown by black triangles.

ont été recherchés. Les séquences du plasmide permettent d'une part d'envisager l'isolement de sondes spécifiques, et d'autre part de choisir des amorces oligonucléotidiques utilisables en PCR pour détecter la présence du plasmide parmi la flore bactérienne du vin.

3.3.1. Utilisation de sondes nucléiques

À partir des séquences présentées dans ce travail, de nouvelles sondes nucléiques ont été obtenues. La sonde appelée GT, davantage centrée sur le gène *dps* a été réalisée en marquant à la digoxygénine le fragment amplifié par PCR avec les amorces PF1 et PF2 (Fig. 3). Cette sonde, longue de 1 500 pb, a été hybridée avec l'ADN total extrait de souches productrices d'EPS, séparé sur gel d'agarose. Elle a permis la détection d'une bande correspondant à pF8801. Aucun signal d'hybridation n'a été observé avec l'ADN extrait de souches non productrices (Fig. 1b).

Après avoir vérifié la spécificité de la sonde GT, celle-ci a été utilisée pour réaliser des hybridations sur colonies. La flore bactérienne issue d'un vin suspecté contenir des souches de *P. damnosus* productrices d'EPS a été étalée sur milieu MRS solide. Après 14 j de culture en anaérobiose, 2 types de colonies se sont développées en proportion équivalente : ce vin contenait une flore lactique atteignant $1,6 \times 10^6$ ufc·mL⁻¹ composée pour moitié de pédiocoques (petites colonies de diamètre ≤ 1 mm) et pour moitié de cellules d'*Enococcus œni* (colonies plus grosses). La sonde GT a permis la détection des colonies productrices de glucane (9 % des colonies de pédiocoques). Les 3 types de populations (cellules d'*Enococcus œni*, pédiocoques n'hybridant pas avec la sonde et pédiocoques hybridant) ont été repiqués en milieu MRS liquide. Seules les colonies ayant hybridé avec la sonde ont provoqué une augmentation de viscosité du milieu de culture, attestant la production d'EPS. La sonde GT est donc utilisable en hybridation sur colonies pour détecter la

présence de souches de *P. damnosus* productrices d'EPS parmi la flore totale du vin. Les colonies de pédiocoques ne produisant pas de glucane n'hybrident pas avec la sonde GT. Ceci signifie qu'il n'existe pas de copie du gène *dps* sur le chromosome des souches non filantes.

La mise en œuvre de la technique d'hybridation sur colonies est intéressante pour la détection et le dénombrement de la population porteuse du plasmide pF8801. La méthode est cependant limitée dans le cas où ces bactéries sont peu représentées dans la flore totale. Un autre inconvénient majeur concerne les délais nécessaires jusqu'à l'obtention du résultat, étant donnée la croissance très lente sur milieu solide des micro-organismes issus du vin.

3.3.2. Détection par PCR

La détection des pédiocoques d'altération par la technique de PCR devait permettre l'obtention plus rapide du résultat de la contamination du vin, l'étape de croissance préalable étant inutile. D'autre part, vue la sensibilité de la technique, on pouvait espérer abaisser le seuil de détection.

Dans un premier temps, ce travail a nécessité la recherche d'un couple d'amorces oligonucléotidiques déduit de la séquence de pF8801, permettant l'amplification spécifique d'un fragment unique du plasmide. Parmi les 8 couples testés, seuls deux (PF8/PFU et PF5/PF6) (Fig. 3) répondaient à ces critères. Les autres couples ne permettaient aucune amplification, ou au contraire, donnaient des amplifications non spécifiques en plus du fragment attendu. Le couple PF5/PF6 a été préféré pour la suite du travail. En effet, la bande amplifiée contient l'extrémité 5' du gène *orf185* et une partie de la région intergénique en amont. À l'inverse, avec le couple PFU/PF8 un fragment interne du gène *dps* codant pour une glycosyltransférase potentielle est amplifié. Les glycosyltransférases sont des enzymes très répandues chez les organismes vivants mais aucun gène correspondant n'a été

caractérisé à ce jour chez les bactéries lactiques du vin. Il paraissait délicat de baser le test PCR sur l'utilisation des amorces PFU/PF8 qui risquaient de ne pas être spécifiques du plasmide pF de *P. damnosus*.

Le couple PF5/PF6 a été testé sur cellules entières en utilisant les souches de pédiocoques de la collection de la Faculté d'Œnologie. Un unique amplifiat de 550 pb environ est observé chez toutes les souches productrices ; au contraire, aucune amplification n'est détectée chez les souches incapables de synthétiser le glucane. Il apparaît donc que le couple d'amorces PF5/PF6 est adapté à la détection des souches de *P. damnosus* productrices d'EPS dans le vin.

L'intérêt majeur de l'utilisation de la PCR est de détecter rapidement la présence de pédiocoques d'altération parmi la flore totale du vin. Le milieu vin est complexe, il contient notamment des composés phénoliques qui sont de puissants inhibiteurs de la réaction de PCR [13]. Cet inconvénient a été détourné dans le cas de la détection par PCR de cellules d'*Æ. œni* porteuses du gène de l'histidine décarboxylase (*hdc*) en effectuant une préculture de 48 h de la flore bactérienne en milieu MRS [4]. Cette étape permettait à la fois un enrichissement de la population et une dilution des composés phénoliques. La PCR effectuée directement sur les culots cellulaires permettait d'affirmer la présence de bactéries *hdc*⁺. Cette technique s'est révélée inefficace dans le cas de la détection de cellules de *P. damnosus* porteuses du plasmide pF8801, peut-être en partie à cause de la présence de polysaccharides pouvant gêner la réaction de PCR. Une étape d'extraction et de purification de l'ADN des cellules présentes dans le vin s'averrait par conséquent nécessaire. Un protocole pour la détection de cellules d'*Æ. œni* dans le vin [29], basé sur l'amplification d'un fragment du gène de l'enzyme malolactique, rapporte l'utilisation de polyvinylpyrrolidone (PVP) pour éliminer les composés phénoliques des préparations d'ADN. D'autres pour la détection par PCR

de microorganismes du sol font intervenir le PVP dans les premières étapes, juste après la lyse des cellules, afin d'éliminer les composés inhibiteurs en même temps que les débris cellulaires [27]. Ce deuxième type de protocole adapté au milieu vin a permis la détection de souches de *P. damnosus* d'altération (Fig. 5).

Les expérimentations ont été réalisées en utilisant un vin contenant des cellules de *P. damnosus* productrices d'EPS. Le dénombrement des microorganismes contenus dans ce vin a donné les résultats suivants : levures : $3,3 \times 10^5$ ufc·mL⁻¹, bactéries acétiques : $1,3 \times 10^4$ ufc·mL⁻¹, bactéries lactiques : $2,4 \times 10^5$ ufc·mL⁻¹ (dont 4×10^4 ufc·mL⁻¹ d'*Æ. œni* et 2×10^5 ufc·mL⁻¹ de *P. damnosus*). Parmi les cellules de *P. damnosus*, 1×10^3 ufc·mL⁻¹ (0,5 %) sont des colonies donnant un signal après hybridation avec la sonde spécifique GT, et se sont révélées être des souches productrices d'EPS. Le protocole de PCR directe sur le vin est appliqué sur 1 mL d'échantillon du même vin. Il a permis l'amplification du fragment attendu. Ainsi, 1×10^3 cellules, représentant moins de 0,2 % de la population totale traitée sont suffisantes pour permettre la détection du plasmide filant. La mesure plus précise du seuil de détection a été recherchée en diluant le vin contaminé dans ce même vin stérilisé par filtration. L'amplification a été obtenue pour les échantillons non dilué et dilué au 1/10^e (Fig. 5). Le seuil de détection des cellules porteuses du plasmide filant est donc de 1×10^2 ufc·mL⁻¹. Ce seuil démontre la sensibilité de la technique qui permettra de prévoir une éventuelle altération d'un vin avant que les populations responsables ne puissent se développer.

4. CONCLUSION

Certaines souches de *P. damnosus* isolées de vins atteints de la maladie de la graisse présentent clairement un phénotype « filant » lorsqu'elles sont cultivées en milieu nutritif de laboratoire. Ceci est dû à

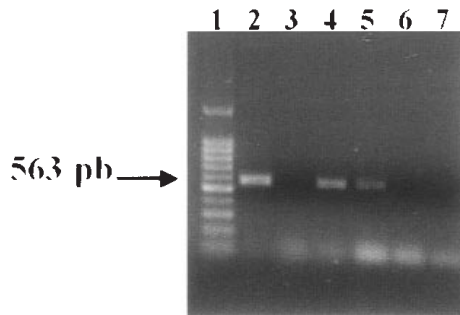


Figure 5. Détection par PCR des souches de *P. damnosus* productrices d'EPS. Piste 1 : marqueur de poids moléculaire 100 pb (Promega). La PCR est réalisée en utilisant comme matrice l'ADN issu d'une extraction plasmidique de la souche IEB 8801 (témoin positif d'amplification, piste 2), les cellules issues du vin après préculture de 48 h en milieu MRS (piste 3) ; l'ADN des cellules présentes dans 1 mL de vin (piste 4), dans 1 mL de vin dilué au 1/10^e (piste 5), dans 1 mL de vin dilué au 1/100^e (piste 6). Piste 7 : témoin négatif d'amplification.

Figure 5. PCR detection of *P. damnosus* strains producing EPS. Lane 1: molecular weight marker 100 bp (Promega). PCR is done using DNA from : a plasmid extraction of strain IEB 8801 (positive control of reaction, lane 2), wine cells cultivated 48 h in MRS medium (lane 3), DNA from the cells in 1 mL of wine (lane 4), in 1 mL of a 1/10 dilution of wine (lane 5), in 1 mL of a 1/100 dilution of wine (lane 6). Lane 7: negative control of the reaction.

une production d'EPS reflétée par la mesure de viscosité. Cette mesure permet de différencier les souches productrices des autres souches isolées d'un même vin. Afin d'étudier les paramètres physiologiques du phénomène, il faut toutefois doser directement la production de polysaccharide dans différentes conditions de culture ; en effet, la valeur de la viscosité dépend d'autres facteurs physico-chimiques pas forcément maîtrisés.

La production d'EPS a été corrélée à la présence du plasmide pF. Le séquençage a montré la présence d'un gène (*dps*) codant pour une glucosyltransférase potentielle. La

séquence protéique de Dps affiche d'importantes similitudes avec la protéine Tts de *Streptococcus pneumoniae*, capable de diriger la synthèse du polysaccharide capsulaire du sérotype 37 chez cette bactérie. Le polysaccharide de type 37 possédant la même structure que le β -glucane de *P. damnosus*, il est probable que Dps permette la synthèse d'EPS chez *P. damnosus*. Il n'est pas exclu que d'autres déterminants génétiques situés en dehors du plasmide pF participent à la biosynthèse du glucane au niveau de la régulation et de l'export, par exemple. L'activité enzymatique de Dps devra être caractérisée. Il reste aussi à déterminer précisément les facteurs déclenchant la production d'EPS dans certains vins.

Enfin, pour prévoir les risques d'altération des vins par des pédiocoques producteurs d'EPS, plusieurs outils de détection sont proposés. Ils sont basés sur les données génétiques décrites dans ce travail et mettent en œuvre des techniques de biologie moléculaire. La PCR est utilisée pour détecter les souches de contamination à un niveau de population très faible et les sondes nucléiques spécifiques permettent de quantifier la proportion de ces souches d'altération parmi la flore totale du vin.

REMERCIEMENTS

E.W. bénéficie d'une bourse MENRT. Une partie de ce travail est financée par le CIVB (Conseil Interprofessionnel des Vins de Bordeaux).

RÉFÉRENCES

- [1] Arrecubieta C., López R., García E., Type 3-specific synthase of *Streptococcus pneumoniae* (Cap3B) directs type 3 polysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli* and in pneumococcal strains of different serotypes, *J. Exp. Med.* 184 (1996) 449-455.
- [2] Beech F.W., Carr J.G., Cider and Perry in: Rose A.H. (Ed.), *Alcoholic Beverages*, Economic Microbiology, Academic Press, London, UK, 1977, pp. 139-313.

- [3] Cerning J., Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques, in: de Roissart H., Luquet F.M. (Eds.), Bactéries Lactiques, Aspects Fondamentaux et Technologiques, Loriga, Paris, France, 1994, pp. 309–329.
- [4] Coton E., Rolland G.C., Bertrand A., Lonvaud-Funel A., Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency and distribution, *Am. J. Enol. Vitic.* 49 (1998) 199–203.
- [5] Daniels C., Vindurampulle C., Morona R., Overexpression and topology of the *Shigella flexneri* O-antigen polymerase (Rfc/Wzy), *Mol. Microbiol.* 28 (1998) 1211–1222.
- [6] de Angelis P.L., Weigel P.H., Immunochemical confirmation of the primary structure of streptococcal hyaluronan synthase and synthesis of high molecular weight product by the recombinant enzyme, *Biochemistry* 33 (1994) 9033–9039.
- [7] de Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E., A medium for the cultivation of Lactobacilli, *J. Appl. Bacteriol.* 23 (1960) 130–135.
- [8] de Vuyst L., Degeest B., Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* 23 (1999) 153–177.
- [9] Dueñas-Chasco M.T., Rodriguez-Carvajal M.A., Tejero Mateo P., Franco-Rodriguez G., Espartero J.L., Irastorza-Iribas A., Gil-Serrano A.M., Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6, *Carbohydr. Res.* 303 (1997) 453–458.
- [10] García E., López R., Molecular biology of the capsular genes of *Streptococcus pneumoniae*, *FEMS Microbiol. Lett.* 149 (1997) 1–10.
- [11] Griffin A.M., Morris V.J., Gasson M.J., The *cpsABCD* genes involved in polysaccharide production in *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* strain NCBF 2393, *Gene* 183 (1996) 23–27.
- [12] Griffiths G., Cook N.J., Gottfridson E., Lind T., Lidholt K., Roberts I.S., Characterization of the glycosyltransferase enzyme from the *Escherichia coli* K5 capsule gene cluster and identification and characterization of the glucuronyl active site, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 11752–11757.
- [13] Ibeas J.I., Lozano I., Perdigonés F., Jimenez J., Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in a sherry by a nested-PCR method, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 998–1003.
- [14] Liu D., Cole R.A., Reeves P.R., An O-antigen processing function for Wzx (RfbX): a promising candidate for O-unit flippase, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 2102–2107.
- [15] Llaubères R.-M., Richard B., Lonvaud-Funel A., Dubourdieu D., Fournet B., Structure of an exocellular beta-D-glucan from *Pediococcus* sp., a wine lactic acid bacteria, *Carbohydr. Res.* 203 (1990) 103–107.
- [16] Lonvaud-Funel A., Joyeux A., Une altération bactérienne des vins : la « maladie des vins filants », *Sci. Aliments* 8 (1988) 33–49.
- [17] Lonvaud-Funel A., Guilloux Y., Joyeux A., Isolation of a DNA probe for identification of glucan-producing *Pediococcus damnosus* in wines, *J. Appl. Bacteriol.* 74 (1993) 41–47.
- [18] Lull D., Muñoz R., López R., García E., A single gene (*itts*) located outside the *cap* locus directs the formation of *Streptococcus pneumoniae* type 37 capsular polysaccharide. Type 37 pneumococci are natural, genetically binary strains, *J. Exp. Med.* 190 (1999) 241–251.
- [19] Pasteur L., Études sur le vin, Imprimerie Impériale, Paris, France, 1866.
- [20] Roberts I.S., Bacterial polysaccharides in sickness and health, *Microbiology* 141 (1995) 2023–2031.
- [21] Stasinopoulos S.J., Fisher P.R., Stone B.A., Stanisch V.A., Detection of two loci involved in (1–3)- β -glucan (curdlan) biosynthesis by *Agrobacterium* sp. ATCC31749, and comparative sequence analysis of the putative curdlan synthase gene, *Glycobiology* 9 (1999) 31–41.
- [22] Sutherland I.W., Novel and established applications of microbial polysaccharides, *Trends Biotechnol.* 16 (1998) 41–46.
- [23] van Kranenburg R., Boels I.C., Kleerebezem M., de Vos W.M., Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides, *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 (1999) 498–504.
- [24] van Kranenburg R., Marugg J.D., van Swam I.I., Willem N.J., de Vos W.M., Molecular characterization of the plasmid-encoded *eps* gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*, *Mol. Microbiol.* 24 (1999) 387–397.
- [25] van Kranenburg R., van Swam I.I., Marugg J.D., Kleerebezem M., de Vos W., Exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis* NIZO B40: functional analysis of the glycosyltransferase genes involved in the synthesis of the polysaccharide backbone, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 338–340.
- [26] van Kranenburg R., Kleerebezem M., de Vos W.M., Nucleotide sequence of the Lactococcal EPS plasmid pNZ4000, *Plasmid* 43 (2000) 130–136.
- [27] Volossiouk T., Robb E.J., Nazar R.N., Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 3972–3976.
- [28] Whiting G.C., Some biochemical and flavour aspects of lactic acid bacteria in ciders and other alcoholic beverages, in: Carr J.G., Cutting C.V., Whiting G.C. (Eds.), Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food, Academic Press, London, UK, 1975.
- [29] Zapparoli G., Torriani S., Pesente P., Dellaglio F., Design and evaluation of malolactic gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine, *Lett. Appl. Microbiol.* 27 (1998) 243–246.