Université de Bourgogne

Institut Universitaire de la Vigne et du Vin Jules Guyot

Laboratoire de Recherche en Vigne et Vin (ReVV)

THESE DE DOCTORAT

Sciences de l'Alimentation

Présentée par

Maryse Bonnin-Jusserand

Pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université de Bourgogne

le 13 Juillet 2011

Etude du métabolisme des amines biogènes chez les bactéries lactiques du vin

Membres du jury

E. Coton	Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Rapporteur
P. Loubière	Directeur de Recherche, INRA Toulouse	Rapporteur
P. Lucas	Maître de Conférences, Université de Bordeaux 2	Examinateur
J-F. Cavin	Professeur, Université de Bourgogne	Examinateur
C. Grandvalet	Maître de Conférences, Université de Bourgogne	Co-encadrante de thèse
H. Alexandre	Professeur, Université de Bourgogne	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée à l'Institut de la Vigne et du Vin Jules Guyot à Dijon, au sein de l'équipe ReVV (Recherche en Vigne et Vin). Elle a été financée par un programme européen FP7 BiamFood (n° 211441).

Je remercie Messieurs Emmanuel Coton et Pascal Loubière qui ont accepté d'être rapporteur de ce travail, ainsi que Messieurs Jean-François Cavin et Patrick Lucas pour avoir examiné ce travail.

Je souhaite remercier Hervé Alexandre et Cosette Grandvalet pour avoir encadré ce travail, ainsi que l'ensemble des Maîtres de Conférences pour m'avoir aiguillé de leurs précieux conseils scientifiques. Je remercie également les partenaires du projet européen avec qui j'ai passé de bons moments lors des réunions BiamFood, toujours enrichissantes.

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont donné un sourire, une part de gentillesse, leur passion, une écoute et un soutien.

Je remercie ceux du labo avec qui j'ai passé de superbes moments : Mathilde et sa famille, Mario, Tazhir, Rémi, Betty, Virginie, Vittorio, Magali, Florian, Florence, Momo, Maxime, Sonia, Said, Charlie (la Normandie, inoubliable !). Sans oublier l'équipe de CESEO : Aurélie et Jessica, ainsi que tous les stagiaires.

Je remercie mes amis du Berry, de Bourgogne, et d'ailleurs, en particulier Floriane et Flavien, Laure, Sebastien, Thibaud, Nadège, Cyrielle, Alicia.

Je remercie tout particulièrement Clément pour sa patience, ses gâteaux et son amour.

J'adresse une pensée spéciale à mes anciens colocataires, surtout Nicole pour ses crêpes et son thé, et aussi Jean-Pierre ! Merci à Marie Thèrèse pour son extrème gentillesse. Un immense merci à tata Lélène et tonton Guy avec qui je récitais mes leçons. Bien sûr je remercie ma famille d'avoir toujours été là pour moi, en particulier mes parents et Paul à qui je dédie mon travail de thèse.

Sommaire

INTRODUCTION 12
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 14
Chapitre I : Les amines biogènes 14
I. Les bactéries lactiques 14
A. Généralités 14
B. Les bactéries lactiques du vin 15
C. *Oenococcus oeni* : principal responsable de la fermentation malolactique 15
II. Les amines biogènes: définition et origine 18
III. Impact des amines biogènes sur la santé 20
A. L'histamine 20
B. Les autres amines biogènes 20
IV. Les différentes voies métaboliques de production des amines biogènes par les bactéries lactiques du vin 21
V. Fonctions des amines biogènes : les amines biogènes impliquées dans la résistance au stress acide et la production d'énergie métabolique 23
VI. Production d'amines biogènes dans le vin 26
A. Les concentrations d'amines biogènes produites par les bactéries lactiques isolées du vin 27
1) L'histamine 27
2) La putrescine 28
3) La tyramine et la 2-phényléthylamine 28
4) La cadavérine et la spermidine 28
B. Discussion sur les valeurs présentées 28
VII. Les amines biogènes dans les autres aliments 29
A. Les autres aliments fermentés 29
1) Le cidre 29
2) Le fromage 30
3) Les produits carnés fermentés 30
4) La bière 31
B. Les aliments non fermentés (exemples) 31

1) Le poisson 31
2) Les épinards 32
VIII. Détection et quantification des amines biogènes 32
A. Détection et quantification des microorganismes producteurs 32
1) Méthodes microbiologiques 32
2) Méthodes de biologie moléculaire 33
B. Quantification des amines biogènes 34
1) Quantification des amines biogènes par TLC 35
2) Quantification des amines biogènes par HPLC 35
IX. Les facteurs influençant la production d'amines biogènes 36
A. Le rôle des précurseurs sur la production d'amines biogènes 36
B. Les amines biogènes sont produites suivant la phase de croissance 37
C. Le pyridoxal-5'-phosphate 37
D. Les produits de décarboxylation, les acides organiques et les sucres 38
E. Le pH 39
X. Les facteurs particuliers liés au vin 39
A. L'éthanol 39
B. Les composés phénoliques du vin 40
C. Les conditions environnementales et les pratiques œnologiques 40
XI. Localisation et organisation génétiques des clusters 41
A. Le cluster de l'histidine décarboxylase 42
B. Le cluster de l'ornithine décarboxylase 43
C. Le cluster de la tyrosine décarboxylase 44
D. Le cluster de l'agmatine déiminase 45
XII. Structure biochimique des décarboxylases 48
A. L'histidine décarboxylase 48
B. L'ornithine décarboxylase 49
C. La tyrosine décarboxylase 50
XIII. Moyens de maîtrise des amines biogènes 52
A. Utilisation de ferments 52
B. Les bactéries dégradants les amines biogènes 52

C. Le sulfitage et les enzymes lytiques utilisées en vinification 53

Chapitre II : Les outils moléculaires pour l'analyse fonctionnelle de gènes 55

I. Les méthodes de transfert génétique 55

A. Les transferts naturels 55

1) La conjugaison 55

2) La transformation 56

3) La transduction 57

B. Les transferts artificiels 57

1) L'électroporation 57

2) La chimiocompétence 58

3) La biolistique 58

II. Les outils génétiques pour l'exploration fonctionnelle de gènes 58

A. Les transposons 58

B. Les plasmides 59

1) Les vecteurs transférés chez les bactéries à Gram positif 59

2) Les vecteurs intégratifs 60

III. Transferts génétiques chez *O. oeni* 62

A. Les plasmides natifs de *O.oeni* 62

B. Le pGID052 de *O. oeni* 63

C. Transferts génétiques chez *O. oeni* 64

MATERIELS ET METHODES 66

Chapitre I 66

I. Souches bactériennes utilisées et milieux de culture 66

II. Criblage des souches productrices d'amines biogènes 67

III. Extraction d'ADN 67

IV. Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) 68

A. Amplification avec la *Taq* Promega 68

B. Amplification avec la *Taq* Haute Fidélité Roche 69

V. Préparation de bactéries compétentes 70

A. *Escherichia coli* électrocompétentes 70

B. *Bacilus subtilis* compétentes 71

C. *Oenococcus oeni* électrocompétentes 71

VI. Clonages 72
A. Construction des vecteurs pGID052-hdcAB et pGID052-hdcPAB 73
1) Construction du vecteur pGID052-hdcAB 73
2) Construction du vecteur pGID052-hdcPAB 73
B. Construction du vecteur pGID052-odcpotE 74
C. Construction des vecteurs pDL-hdcP et pDL-hdcAB 75
D. Construction du vecteur pXT-hisRS 76
E. Intégration du pDL-hdcP et pDL-hdcAB dans le génome de *Bacillus subtilis* 168 ..76
F. Intégration du pXT-hisRS dans le génome de *Bacillus subtilis* 168 et dans *B. subtilis* 168 contenant le pDL-hdcP 77
G. Construction d'un vecteur suicide pour la mutation du gène *odc* 78
VII. Vérification des transformants 78
A. Par PCR sur colonie 78
B. Par PCR puis séquençage 78
VIII. Test et mesure de l'activité des promoteurs 78
A. Sur milieu gélosé 78
B. Mesure de l'activité β-galactosidase 79
IX. Induction de l'expression de hisRS cloné dans le pXT 79
X. Dosage des amines biogènes et acides aminés par HPLC. 80
A. Dérivation au DEEMM 80
B. Analyse HPLC 80
XI. Analyses HPLC MS/MS 81
Chapitre II 84
I. Purification de l'ornithine décarboxylase de *O. oeni* 84
A. Gel SDS-PAGE 85
B. Dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976) 86
II. Mesure de l'activité enzymatique de l'ornithine décarboxylase 86
Chapitre III 87
La PCR quantitative en temps réel 87
A. Définition 87
B. Calcul de l'expression relative des transcrits 88
C. Protocole RT-qPCR 89

RESULTATS....91
I. Validation de la technique de transfert génétique par électroporation....91
II. L'histamine et la putrescine dans la résistance au stress acide chez *O. oeni*....92
A. L'histamine dans la résistance au stress acide chez *O. oeni*....93
1) Clonage de l'histidine décarboxylase *hdcA* et de la perméase associée *hdcP* de *Lactobacillus hilgardii* 0006 chez *O. oeni* ATCC BAA-1163.....93
2) Etudes transcriptionnelles des régions promotrices de *hdcA* et *hdcP* de *Lactobacillus hilgardii* 0006....95
3) Test de l'induction de l'activité β-galactosidase en présence d'acide aminé précurseur (histidine)....96
4) Rôle de *hisRS* dans la voie de biosynthèse de l'histamine....98
B. La putrescine dans la résistance au stress acide chez *O. oeni*....100
Article 1....104
Article 2....123
DISCUSSION-PERSPECTIVES....142
Partie I....142
Partie II....143
Partie III....145
ANNEXES....147
REFERENCES....162
RESUME....193
ABSTRACT....194

Table des figures

Figure 1. Les changements biochimiques intervenant lors de la FML et au niveau métabolique chez *O. oeni* (Bartowsky, 2005). La flèche rouge indique où se situe le sujet d'étude. 17

Figure 2. Conversion de l'acide L-malique en acide L-lactique chez *O. oeni*. MleP intervient dans le transport de l'acide L-malique et l'enzyme malolactique MleA est impliquée dans sa décarboxylation. D'après Loubière *et al* (1992), la sortie de l'acide L-lactique chez *O. oeni*, s'effectue en symport avec un proton. Le transport actif de la forme monoanionique du L-malate génère un potentiel de membrane négatif à l'intérieur. De l'ATP est généré à partir de la force proton-motrice. 18

Figure 3. Réaction d'amination conduisant à la formation d'amines biogènes. 19

Figure 4. Métabolisme de l'arginine dans la formation d'amines biogènes (putrescine, spermidine, spermine). La putrescine peut être formée par la voie de l'agmatine déiminase (AgDI) ou par la voie de l'ornithine décarboxylase (ODC). 22

Figure 5. Décarboxylation de la tyrosine en tyramine chez *Lactobacillus brevis.* 24

Figure 6. Transport électrogénique de l'histidine et de l'histamine (exemple de *Lactobacillus buchneri*, Molenaar *et al*, 1993). La décarboxylation cytoplasmique de l'histidine consomme un proton. 25

Figure 7. Organisation des clusters *hdc* chez diverses bactéries à Gram postif (d'après Satomi *et al*, 2008 et Calles-Enriquez *et al*, 2010). 43

Figure 8. Organisation génétique des clusters *tdc* de trois genres de bactéries à Gram positif (une espèce par genre est représentée). 45

Figure 9. Alignement des clusters *AgDI* de différentes bactéries (d'après Lucas *et al*, 2007 et Landete *et al*, 2010). 47

Figure 10. a) Structure cristallographique de l'histidine décarboxylase de *Lactobacillus* 30a à 3.0 Angstroms (Parks *et al*, 1985 ; Gallagher *et al*, 1989)). b) Structure cristallographique de l'ornithine décarboxylase de *Lactobacillus* 30a à une résolution de 3.0 Angstroms (Momany *et al*, 1995). 49

Figure 11. Alignement des séquences protéiques de la tyrosine décarboxylase de *Carnobacterium divergens* 508, *Lactococcus lactis* IPLA 655, *Enterococcus faecalis* JH2-2 et *Lactobacillus brevis* IOEB 9809. 51

Figure 12 : Première réaction de dégradation de l'histamine, la putrescine et la cadavérine par la diamine oxydase (Tabor, 1951). 53

Figure 13. La conjugaison bactérienne. 1 : les souches donneuse et réceptrice se rapprochent pour le transfert génétique. 2 : les protéines Tra interviennent dans le clivage du plasmide

mobilisable (ou conjugatif) au site oriT. L'ADN transféré est monocaténaire. 3 : après ligation des brins d'ADN, 4 : ils sont répliqués dans chacune des cellules. 56

Figure 14. Stratégie générale d'intégration par double recombinaison homologue (Biswas et al, 1993). Dans une première étape à 37,5°C, le plasmide s'intègre par simple recombinaison homologue. Puis, un changement de température à 28°C, active la réplication du plasmide intégré (Ori Ts), stimulant un second évenement de recombinaison homologue..... 61

Figure 15. Carte du plasmide cryptique pRS2 de *O. oeni* (Mesas *et al*, 2001) 63

Figure 16. *L. hilgardii* 0006 (Lucas *et al*, 2005) producteur d'histamine, dans le milieu de Bover-Cid & Holzapfel (1999) contenant du pourpre de bromocrésol comme indicateur coloré. A gauche: tube ensemencé avec *L. hilgardii* 0006 : le milieu vire au mauve du à l'activité décarboxylase qui induit une alcalinisation du pH. A droite : milieu avant ensemencement. 67

Figure 17. Stratégie de clonage des gènes *hdcP*, *hdcA* et *hdcB*. Les fragments A et B sont d'abord sous-clonés dans le pCR-XL-TOPO, avant d'être clonés dans le pGID052. 74

Figure 18. Stratégie de clonage des gènes *odc* et *potE*. 75

Figure 19. Stratégie de clonage du gène *hisRS* dans le pXT en deux parties. 76

Figure 20. Test de clones de *B. subtilis* pour une intégration au site *amyE*. Les colonies avec un halo n'ont pas intégrées les gènes d'intérêt. 77

Figure 21. Evolution du pourcentage du solvant B au cours de l'analyse. 81

Figure 22. PCR en temps réel en présence de SYBR green (www.ilm.pf/PCRtempsreel) 87

Figure 23. Organisation génétique de la voie de biosynthèse de l'histamine. Les gènes *hdcP*, *hdcA* et *hdcB* ont été clonés dans le pGID052 chez *O. oeni*. Le gène *hisRS* code pour une histidyl-tRNA synthétase 93

Figure 24. Cartes plasmidiques des vecteurs pGID052-hdcAB et pGID052-hdcPAB 94

Figure 25. Clonage des régions promotrices de *hdcP* et *hdcA* dans le pDL. Le nombre de paires de bases entre chaque gène correspond à la taille des régions intergéniques. 96

Figure 26. Carte du pDL-hdcP et du pDL-hdcAB: la région promotrice de *hdcP* et *hdcA* a été clonée en fusion avec le gène codant la β-galactosidase (*bgaB*) 96

Figure 27. Mesure chez *B. subtilis* de l'activité spécifique de la β-galactosidase (Umiller.mg^{-1}), des fusions transcriptionnelles portées par les vecteurs pDL, pDL-hdcAB et pDL-hdcP, en fonction de la croissance bactérienne (t1 : DO_{600nm} = 0,6 ; t2 : DO_{600nm} = 1,2 ; t3 : DO_{600nm} = 2,6) 97

Figure 28. Carte du vecteur pXT-hisRS 98

Figure 29. Mesure de l'activité spécifique de la β-galactosidase (Umiller.mg^{-1}) chez *B. subtilis* contenant les vecteurs pDL et pXT-hisRS, ou les vecteurs pDL-hdcP et pXT-hisRS, en fonction de la croissance bactérienne. A DO_{600nm} = 0,7 ; 20 mM de xylose sont ajoutés pour induire l'expression de *hisRS*, cloné sous le contrôle du promoteur *pxyl* (t1 : DO_{600nm} = 1,0 ; t2 : DO_{600nm} = 1,1 ; t3 : DO_{600nm} = 1,2 ; t4 : DO_{600nm} = 1,5) 99

Figure 30. Carte du vecteur suicide pGID701-odc 101

Figure 31. Organisation génétique de la voie de biosynthèse de la putrescine. Les gènes *odc* et *potE* ont été clonés dans le pGID052 puis transférés dans la souche *O. oeni* ATCC BAA-1163 101

Figure 32. Carte plasmidique du pGID052-odcpotE 102

Tables des tableaux

Tableau 1. Les bactéries lactiques du vin et leurs caractéristiques morphologiques et biochimiques (d'après Bartowsky, 2005 et Tourdot-Maréchal, 1991). 15

Tableau 2. Amines biogènes et acides aminés précurseurs (selon ten Brink *et al*, 1990). L'arginine est le précurseur de l'ornithine. L'agmatine peut être le précurseur de la putrescine (voie AgDI, Cf. paragraphe IV). La spermine et la spermidine, ne figurant pas dans ce tableau, sont formées à partir de la putrescine. 19

Tableau 3. Les bactéries isolées du vin, productrices d'amines biogènes. 26

Tableau 4. Souches bactériennes utilisées. 66

Tableau 5. Récapitulatif du protocole pour la réalisation d'une PCR avec la *Taq* Promega. Les amorces (Eurogentec) sont initialement concentrées à 100 µM. Une dilution au cinquième est effectuée avant utilisation. 69

Tableau 6. Protocole pour la réalisation d'une PCR avec la *Taq* Haute Fidélité Roche. 70

Tableau 7. Séquences des oligonucléotides utilisés au cours de ce travail. 72

Tableau 8. Récapitulatif des plasmides utilisés et construits. Mls^R : résistance aux macrolides (érythromycine et lincomycine à 10 $\mu g.mL^{-1}$ chez les bactéries Gram positives, 250 $\mu g.mL^{-1}$ chez *E. coli*). 77

Tableau 9. Amines biogènes après réaction au DEEMM. La/les fonction(s) amine NH_2 a (ont) subit la dérivatisation. Les ions caractéristiques, qui dérivent de l'ion parent, ont pour la plupart une masse *m/z* = 46 de moins que l'ion moléculaire parent. Par exemple, pour la tyramine : l'ion moléculaire parent a une masse *m/z* = 306, accompagnés d'autres ions caractéristiques de masse *m/z* = 260 (306-46) et 214 (260-46). 82

Tableau 10. Efficacité de transformation de différentes souches de *O. oeni*. 92

Tableau 11. Mutagenèse d'acides aminés (AA) d'intérêt de l'ODC de *O. oeni* à muter. Le choix ces cibles est basé sur les études réalisées chez *Lactobacillus* 30a (Momany *et al*, 1995 ; Vitali *et al*, 1999). Les séquences protéiques de *Lactobacillus* 30a et *O. oeni* sont homologues à 68%. 144

INTRODUCTION

Dans les aliments fermentés, les amines biogènes sont des molécules issues du métabolisme des microorganismes, produites par décarboxylation d'acides aminés précurseurs. L'histamine, la putrescine, la tyramine et la cadavérine sont les principales amines biogènes retrouvées dans les vins. Leurs teneurs sont variables, et généralement elles sont de l'ordre de quelques milligrammes par litre, même si dans certains cas elles peuvent atteindre plusieurs dizaines de milligrammes par litre. Trois conditions doivent être réunies pour permettre l'accumulation d'amines biogènes dans le vin : la disponibilité en précurseurs, la présence de souches bactériennes possédant une activité décarboxylase et des conditions environnementales optimales permettant la production de l'activité enzymatique. Les voies de biosynthèse des amines biogènes sont étudiées en raison des effets indésirables de ces molécules sur la santé. Elles sont entre autres responsables de pseudo-allergies alimentaires et seraient la deuxième cause d'intoxication alimentaire en Europe. Même si les concentrations en amines biogènes sont faibles dans le vin, l'association avec l'alcool ou des inhibiteurs d'enzymes détoxifiantes, peuvent augmenter le caractère allergène. De plus, la putrescine et la cadavérine peuvent altérer la qualité organoleptique du vin, en masquant son caractère fruité. C'est pourquoi la filière viti-vinicole s'intéresse aux techniques permettant de diminuer la teneur en amines biogènes des vins. An niveau législatif, la Suisse avait fixé une valeur seuil à 10 $mg.L^{-1}$ pour l'histamine, mais depuis 2010 aucune limite n'est imposée. Cependant, l'OIVV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin) est en train d'adopter un code de bonnes pratiques viti-vinicoles en vue de limiter les amines biogènes du vin, ce qui souligne l'importance du sujet pour la filière. D'ores et déjà, afin de maîtriser les dérives inhérentes à la vinification, dont la production d'amines biogènes fait partie, l'agence pour la santé du Canada a autorisé, en 2006, l'utilisation d'une levure génétiquement modifiée : *Saccharomyces cerevisiae* ML01. Cette levure est capable de réaliser la fermentation alcoolique, ainsi que la fermentation malolactique. Les bactéries lactiques ne sont donc plus indispensables, ainsi le risque lié à l'accumulation d'amines biogènes est évité, en supposant que la fermentation alcoolique est conduite par cette unique levure, car les levures indigènes peuvent produire également des amines biogènes.

Pour faire face à ce problème sanitaire, il est nécessaire de comprendre comment les amines biogènes sont formées par les bactéries lactiques et le rôle de cette production dans le métabolisme microbien. C'est dans ce cadre que le projet européen FP7 BiamFood a été mis en place. Au sein du projet, le laboratoire ReVV (Recherche en Vigne et Vin) devait (i) développer des vecteurs suicides pour la création de mutants chez *O. oeni*, ciblant les gènes codant les décarboxylases. L'analyse de ces mutants devait permettre de déterminer le rôle des amines biogènes dans la production d'énergie métabolique et la résistance au stress acide. Puis un second axe consistait à (ii) étudier l'impact de la source azotée sur la production d'amines biogènes, et enfin (iii) déterminer l'influence des pratiques œnologiques (présence de lies, ajout de ferments sélectionnés) sur l'accumulation de ces métabolites (travaux en collaboration avec les entreprises Boisset et Chr Hansen). En annexe et suite au projet européen FP5, les transporteurs du L-malate et du citrate de *O. oeni* devaient être produits et caractérisés chez *Lactobacillus plantarum*.

Afin d'atteindre ces objectifs, il était nécessaire de pouvoir transférer de l'ADN chez *O. oeni* et muter de façon ciblée les gènes. Une partie du travail de ma thèse a été consacrée à améliorer la technique de transformation par électroporation et à construire des outils moléculaires pour l'obtention de mutants. Ce travail de thèse s'est articulé autour des objectifs du projet européen. Tout d'abord un vecteur suicide a été développé afin de muter le gène codant l'ornithine décarboxylase chez *O. oeni*. Puis, l'expression hétérologue des clusters, codant les voies de biosynthèse de l'histamine et de la putrescine, a été entreprise chez *O. oeni*. L'ornithine décarboxylase de *O. oeni* a ensuite été caractérisée. Enfin, l'impact de la source azotée sur la production d'amines biogènes a été exploré.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Les amines biogènes

I. Les bactéries lactiques

A. Généralités

Les bactéries lactiques forment un groupe hétérogène de microorganismes aérotolérants à Gram positifs. Elles appartiennent à la division des Firmicutes, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales* et sont regroupées en six familles : *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae*. Ces familles sont divisées en onze genres principaux : *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* (Stiles & Holzapfel, 1997). De plus, de nouveaux genres ont été identifiés (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy): *Aerococcus* et *Facklamia*, les plus représentatifs des *Aerococcaceae*, *Trichococcus* et *Alkalibacterium*, au sein des *Carnobacteriaceae*, et *Fructobacillus* (Endo & Okada, 2008), un nouveau genre parmi les *Leuconostocaceae*, pour ne citer que des exemples.

Le produit principal du métabolisme des bactéries lactiques est l'acide lactique obtenu à partir de la fermentation des sucres. Le glucose est oxydé en pyruvate, qui est réduit en L-lactacte et/ou D-lactate par les L- et D-lactate déshydrogénases. Cette fermentation est dite homolactique ou hétérolactique en fonction des produits finaux formés. Du lactate, mais aussi de l'acétate, de l'éthanol et du dioxyde de carbone sont obtenus *via* la voie hétérolactique. Utilisées en agroalimentaire, les bactéries lactiques permettent de conserver les aliments du fait de leur action acidifiante et de la production de certains métabolites aux propriétés antimicrobiennes : les bactériocines (Jack *et al*, 1995). Par exemple *Lactococcus lactis* produit la nisine, *Lactobacillus plantarum* produit des plantaricines (Maldonado *et al*, 2003) tandis que *Lactobacillus sakei* produit des sakacines (Brurberg *et al*, 1997). Certaines bactéries lactiques sont spécifiques d'un habitat. Ainsi *Lactobacillus sakei* est trouvé dans le milieu carné, *Lactococcus lactis* dans les produits laitiers et *Oenococcus oeni* dans le vin et le cidre. La plupart portent le statut de GRAS « generally recognized as safe » et peuvent donc être

utilisées en biotechnologie pour la production de protéines comme des enzymes. Les bactéries lactiques participent aux qualités organoleptiques des produits par la synthèse de composés aromatiques tels que le diacétyle, responsable du goût beurré (Bartowsky & Henschke, 2005) et sont bénéfiques pour la santé en tant que probiotiques. Les bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, isolées du tractus gastro-intestinal de l'homme, sont largement utilisées comme probiotiques. Récemment une étude révèle la capacité de *O. oeni* à induire une activité immuno-modulatoire et son pouvoir potentiel en tant que nouveau probiotique (Foligné *et al*, 2010).

B. Les bactéries lactiques du vin

Dans le vin, sont retrouvées des bactéries du genre: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Oenococcus*. Le Tableau 1 recense leurs caractéristiques (Bartowsky, 2005).

Tableau 1. Les bactéries lactiques du vin et leurs caractéristiques morphologiques et biochimiques (d'après Bartowsky, 2005 et Tourdot-Maréchal, 1991).

Caractéristiques	*Lactobacillus*	*Leuconostoc*	*Oenococcus*	*Pediococcus*
Morphologie	Bâtonnets, cellules alongées	Cellules sphériques Par paires ou en chaînette	Cellules sphériques Par paires ou en chaînette	Cellules sphériques Par paires ou en tétrades Division en deux plans orthogonaux
Taille (µm)	0,5-1,2 x 1-10	0,5-0,7 x 0,7-1,2	0,5-0,7 x 0,7-1,2	0,4-1,4
Fermentation du glucose	Hétérolactique et homolactique	Hétérolactique	Hétérolactique	Homolactique
Isomère de l'acide lactique produit	D-, L-lactate	D-lactacte	D-lactacte	D-, L-lactate
Formation de gaz à partir du glucose	oui et non	oui	oui	non
Espèces isolées du vin	Fermentation hétérolactique: *Lb. brevis, Lb. cellobiosis, Lb. buchneri, Lb. casei, Lb. curvatus, Lb. delbrueckii, Lb. fermentum, Lb. fructivorans, Lb. hilgardii, Lb. jensenii, Lb. kunkeei, Lb. nagelii, Lb. trichodes, Lb. vermiforme, Lb. sakei* Fermentation homolactique: *Lb. plantarum*	*Lc. mesenteroides*	*O. oeni*	*P. pentosaceus, P. damnosus, P. parvulus*

C. *Oenococcus oeni* : principal responsable de la fermentation malolactique

O. oeni est une bactérie d'intérêt œnologique, anaérobie facultative et hétérofermentaire. Le bilan stœchiométrique de la fermentation d'une molécule de glucose est le suivant pour une culture à pH 5 en anaérobiose : 1 glucose → 1 D-lactate + 0,7 éthanol +

0,18 acétate + 1 CO_2 + 1 ATP (Salou *et al*, 1994). Son habitat naturel est l'environnement viticole, des baies de raisin aux cuves de vinification (Garvie, 1986). Elle se présente sous la forme de coques de 0,5 à 0,7 µm, regroupées en chaînette et se développe à une température de 28°C. Son temps de génération est d'environ 4h sur milieu synthétique FT80 à pH 5,3 (Cavin *et al*, 1989). Elle peut résister à des pH acides (3,5, voir 2,8) (Garvie, 1967) et de fortes teneurs en alcool pouvant aller jusqu'à 14%. Comme la plupart des bactéries lactiques, *O. oeni* présente de fortes exigences nutritionnelles et nécessite un milieu de croissance complexe. Elle est auxotrophe pour de nombreux acides aminés comme l'arginine, la leucine, la valine, le tryptophane, l'isoleucine, l'histidine (Remize *et al*, 2006). Son génome de 1,8 Mpb (Pfeiler & Klaenhammer, 2007) présente un faible pourcentage en bases G+C. Initialement appelée *Leuconostoc oenos* (Garvie, 1967), cette bactérie a été renommée *Oenococcus oeni* par Dicks *et al* (1995) après séquençage des ARN ribosomaux 16S et 23S. A ce jour le genre *Oenococcus* comprend deux espèces: *Oenococcus oeni* et *Oenococcus kitaharae* (Endo & Okada, 2006). Le génome de la souche PSU-1 est entièrement séquencé et accessible sur le site du NCBI (Makarova *et al*, 2006). En collaboration avec l'Université Bordeaux 2 et la société Génomics ®, l'Université de Bourgogne est impliquée dans le projet de séquençage du génome de la souche *O. oeni* ATCC BAA-1163. Ce projet est actuellement terminé mais pas encore en accès libre. L' « Australian Wine Research Institute » séquence actuellement le génome de la souche *O. oeni* AWRIB429 (NZ ACSE00000000) tandis que deux autres souches, *O. oeni* KM334 et *O. oeni* KM383 (project ID : 61985 et 61987) sont également en cours de séquençage par le Parco Tecnologico Padano (Italie).

En vinification cette bactérie est le principal acteur des fermentations malolactiques (FML) qui font généralement suite à la fermentation alcoolique (FA) réalisée par les levures *Saccharomyces cerevisiae*. La FA représente la première phase microbiologique de la vinification où les sucres du moût de raisins sont fermentés en éthanol et en dioxyde de carbone par la voie de la glycolyse. La FML correspond à la deuxième phase fermentaire du vin. Elle se traduit par la transformation du diacide L-malique en monoacide L- lactique et dioxyde de carbone. Cette réaction est réalisée par l'enzyme malolactique qui requiert le NAD^+ et le Mn^{2+} comme cofacteurs (Lonvaud-Funel & Strasser de Saad, 1982). Elle a pour but de diminuer l'acidité du vin et de lui conférer une meilleure stabilité microbiologique. En effet, l'utilisation du malate et des autres sources de carbone restantes empêche le développement des autres bactéries, notamment des bactéries acétiques. La FML joue également un rôle sur la qualité organoleptique du vin et engendre de nombreux changements

biochimiques (Bartowsky, 2005) (Figure 1). Cependant, ces fermentations restent mal maîtrisées lors de la vinification. Le moût de raisin qui présente une forte teneur en alcool (10%, v/v), un pH d'environ 3,5, des sulfites (les bactéries lactiques se développent difficilement à partir de 100 mg.L^{-1} de SO_2 total et 10 mg.L^{-1} de SO_2 libre ; ces valeurs dépendant du pH) et une température basse (20 °C), est un environnement hostile au développement des bactéries (Ribéreau-Gayon *et al*, 1998).

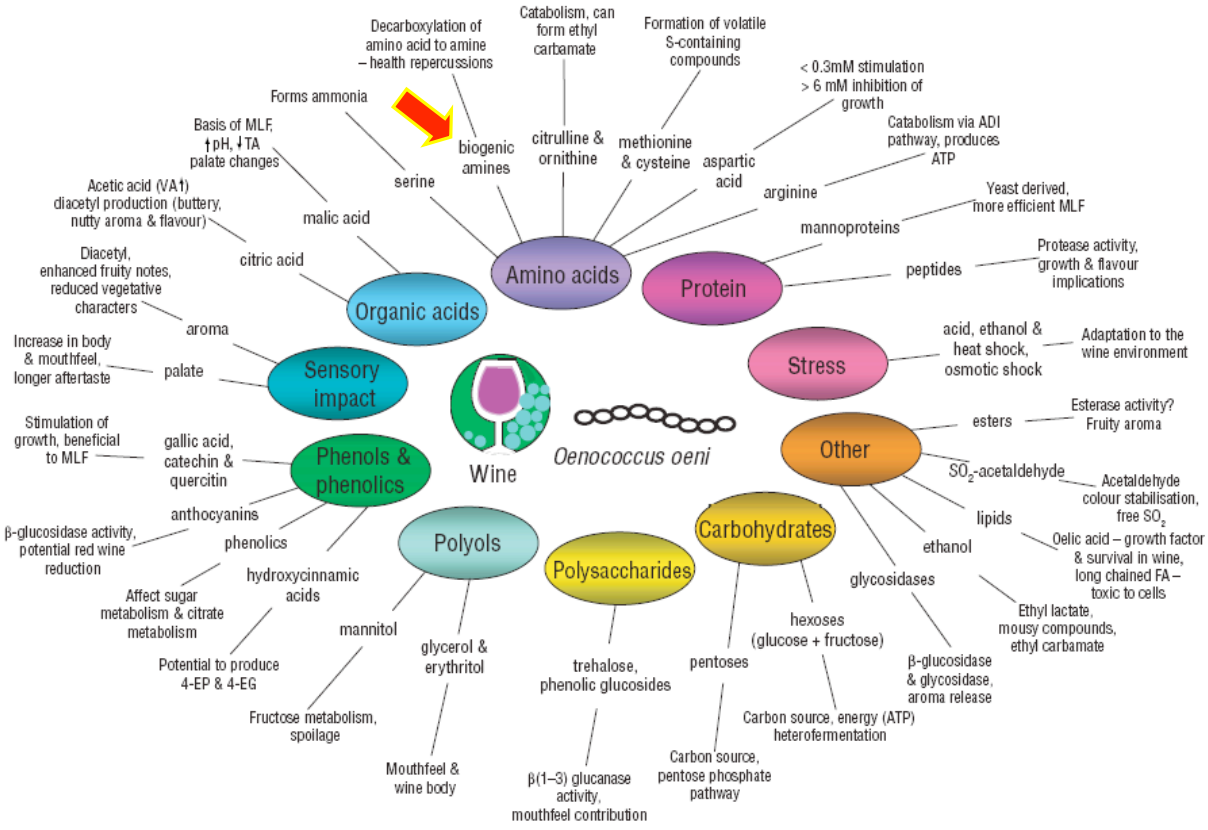


Figure 1. Les changements biochimiques intervenant lors de la FML et au niveau métabolique chez *O. oeni* (Bartowsky, 2005). La flèche rouge indique où se situe le sujet d'étude.

La FML a été très étudiée sur le plan moléculaire (Ansanay *et al*, 1993; Labarre *et al*, 1996 ; Salema *et al*, 1996 ; Sobczak & Lolkema, 2005) car c'est un moyen pour la bactérie de lutter contre l'environnement acide et de se procurer de l'énergie métabolique. Chaque décarboxylation d'une molécule de malate qui entre dans la cellule s'accompagne de la sortie d'une molécule de lactate accompagnée d'un proton. Cette réaction équivaut à la translocation d'un proton vers le milieu extracellulaire créant une force proton- motrice à travers la membrane cytoplasmique. Cette force proton-motrice génère de l'énergie cellulaire sous forme d'ATP *via* une ATPase membranaire (Figure 2).

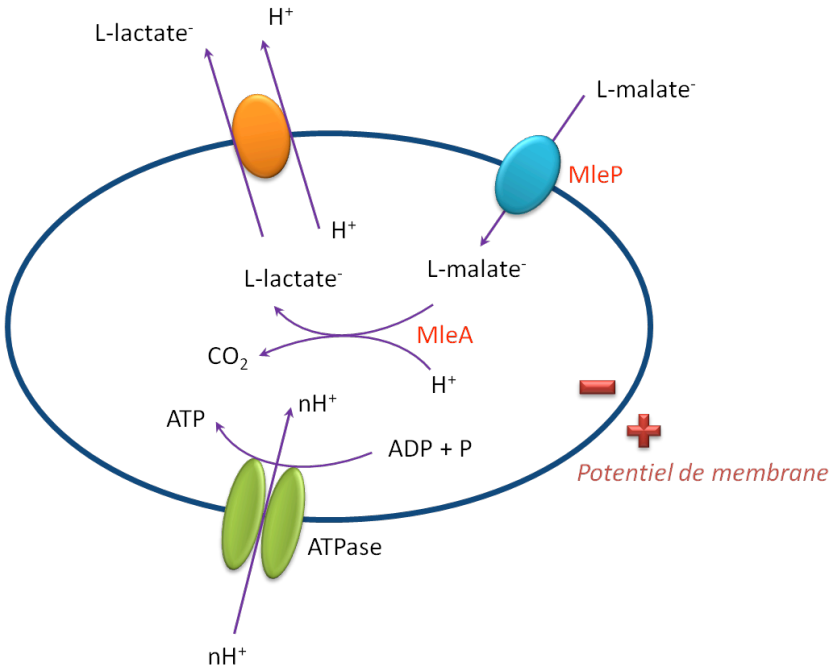


Figure 2. Conversion de l'acide L-malique en acide L-lactique chez *O. oeni*. MleP intervient dans le transport de l'acide L-malique et l'enzyme malolactique MleA est impliquée dans sa décarboxylation. D'après Loubière *et al* (1992), la sortie de l'acide L-lactique chez *O. oeni*, s'effectue en symport avec un proton. Le transport actif de la forme monoanionique du L-malate génère un potentiel de membrane négatif à l'intérieur. De l'ATP est généré à partir de la force proton-motrice.

Pendant la FML, certaines souches de *O. oeni*, ainsi que d'autres bactéries lactiques du vin sont capables de produire des métabolites néfastes pour la santé : les amines biogènes. Tout comme la décarboxylation du malate en lactate, la production de ces molécules apporterait un bénéfice aux souches qui les synthétisent, en les aidant à lutter contre l'environnement acide par la régulation de leur pH intracellulaire.

II. Les amines biogènes: définition et origine

Les amines biogènes sont des composés azotés répandus dans l'environnement chez les animaux et les végétaux. Ces amines sont dites « biogènes » car elles sont formées par l'action d'organismes vivants. Plus particulièrement dans les aliments fermentés, les amines biogènes sont synthétisées majoritairement par les bactéries lactiques pendant la maturation. Elles sont principalement produites par décarboxylation d'acides aminés due à l'action d'enzymes microbiennes. Elles peuvent résulter également de l'hydrolyse de composés azotés ou de l'amination de cétones ou d'aldéhydes (Figure 3). Ces derniers réagissent avec l'ammoniaque et l'hydrogène en présence d'un catalyseur (Ni) pour former des amines

primaires, secondaires ou tertiaires. A noter que d'après Bauza *et al*, (1995), l'amination des cétones et aldéhydes est à l'origine des amines volatiles.

$$R\text{-}CO\text{-}R' + \underset{|}{NH_3} + H_2 \quad \rightarrow \quad R\text{-}CH\text{-}NH_2 + H_2O$$

Figure 3. Réaction d'amination conduisant à la formation d'amines biogènes.

Les amines biogènes principales sont : l'histamine, la putrescine ou la 1,4-diaminobutane, la cadavérine ou la 1,5-diaminopentane, la tyramine, la tryptamine, la 2-phényléthylamine, la spermine et la spermidine. Elles se répartissent en plusieurs groupes suivant leurs structures biochimiques (Tableau 2): les amines aliphatiques (putrescine, cadavérine), aromatiques (tyramine, 2-phényléthylamine) ou hétérocycliques (histamine, tryptamine). Elles peuvent également être classées suivant le nombre de groupements amines (NH_2); on distingue: les monoamines (2-phényléthylamine, tyramine, tryptamine, histamine), les diamines (putrescine, cadavérine, spermidine, spermine) et les polyamines (agmatine). Elles sont étudiées à cause de leurs effets néfastes sur la santé: ces molécules sont responsables d'intoxications alimentaires (Silla Santos, 1996) et sont aussi des précurseurs cancérogènes.

Tableau 2. Amines biogènes et acides aminés précurseurs (selon ten Brink *et al*, 1990). L'arginine est le précurseur de l'ornithine. L'agmatine peut être le précurseur de la putrescine (voie AgDI, Cf. paragraphe IV). La spermine et la spermidine, ne figurant pas dans ce tableau, sont formées à partir de la putrescine.

ACIDES AMINES	DECARBOXYLASES	AMINES BIOGENES
Hétérocycliques		*Hétérocycliques*
Histidine	Histidine décarboxylase	Histamine
Tryptophane	Tryptophane décarboxylase	Tryptamine/ Sérotonine
Aromatiques		*Aromatiques*
Tyrosine	Tyrosine décarboxylase	Tyramine
Phénylalanine	Tyrosine décarboxylase ?	2-Phényléthylamine
Basiques		*Aliphatiques*
Ornithine	Ornithine décarboxylase	Putrescine
Lysine	Lysine décarboxylase	Cadavérine
Arginine	Arginine décarboxylase	Agmatine

III. Impact des amines biogènes sur la santé

A. L'histamine

L'histamine est un neuromédiateur et un médiateur immunitaire. Dans l'organisme humain l'histamine est stockée dans des granules contenues dans les mastocytes, des cellules immunitaires spécialisées. Lorsqu'un allergène se présente, il est reconnu par les immunoglobulines E, ou IgE. Il y a alors pontage de deux IgE et reconnaissance des chaînes lourdes par des récepteurs du mastocyte. Une cascade de réactions est ensuite déclenchée qui induit la dégranulation des mastocytes. La libération dans le sang d'histamine est à l'origine de la réaction inflammatoire. L'histamine peut directement stimuler le cœur, exciter les muscles lisses de l'intestin et du tractus respiratoire par la libération d'adrénaline et de noradrénaline (Shalaby, 1996). Il augmente également les sécrétions gastriques (Bauza *et al*, 1995). Parmi ces symptômes, l'histamine est impliquée dans les « empoisonnements scombridés » (Taylor, 1986). Par exemple, une intoxication a été rapportée par ingestion de poisson contenant 84,1 mg d'histamine pour 100 g de poisson (Hwang *et al*, 1996). Ce type d'intoxication est unique parmi les toxines associées aux fruits de mer, car il découle de mauvaises manipulations du produit, plutôt que par une contamination (Hungerford, 2010).

Mais généralement les quantités d'histamine ingérées sont faibles et l'organisme les élimine grâce à un système de détoxification composé de deux enzymes: la diamine oxydase et l'histamine-N-méthyltransférase (Bauza *et al*, 1995a, Halasz *et al*, 1994). C'est pourquoi les patients placés sous inhibiteurs de monoamine oxydase sont plus sensibles (Izquierdo-Pulido *et al*, 1994) ainsi que les personnes ayant une faible activité diamine oxydase (Bodmer *et al*, 1999). De plus, l'histamine-N-méthyltransférase est inhibée quand il y a trop de substrats (Bauza *et al*, 1995a). La présence d'alcool augmente également la toxicité des amines biogènes, par l'inhibition directe ou indirecte des amines oxydases (Zee *et al*, 1983).

B. Les autres amines biogènes

La putrescine, la cadavérine, la tyramine, la tryptamine et la 2-phényléthylamine sont des agents de potentialisation de l'histamine. En outre, la diamine oxidase, au niveau de la muqueuse intestinale, est inhibée *in vitro* par la tyramine, la cadavérine, la putrescine et la 2-phényléthylamine (Bauza *et al*, 1995a). La tyramine, la tryptamine et la 2-phényléthylamine

sont des amines vasoactives impliquées dans la vasoconstriction des vaisseaux sanguins (Shalaby, 1996). La tyramine accélère la respiration et provoque de l'hypertension artérielle et des migraines.

Enfin, la cadavérine et la putrescine peuvent réagir avec les nitrites pour former des nitrosamines cancérigènes (Halasz *et al*, 1994).

IV. Les différentes voies métaboliques de production des amines biogènes par les bactéries lactiques du vin

En général, l'amine biogène provient directement de la décarboxylation de l'acide aminé précurseur. Ainsi l'histamine provient de l'histidine, la tyramine est formée à partir de la tyrosine, etc… Mais il existe au moins deux voies métaboliques conduisant à la formation de putrescine : la voie de l'ornithine décarboxylase (ODC) et la voie de l'agmatine déiminase (AgDI) (Arena & Manca de Nadra, 2001 ; Lonvaud-Funel, 2001). Dans ce dernier cas, il ne s'agit pas alors d'une décarboxylation, mais d'une déimination qui conduit à la production de putrescine. L'existence de ces deux voies s'explique par le fait que la putrescine peut être synthétisée à partir de deux précurseurs : l'ornithine ou/et l'agmatine qui proviennent tous les deux de l'arginine (Figure 4). Mangani *et al*, (2005) évoquent que la production de putrescine peut se réaliser par association métabolique entre les souches capables de convertir l'arginine en ornithine, mais qui ne possèdent pas l'ornithine décarboxylase et les souches qui décarboxylent l'ornithine en putrescine mais incapables de métaboliser l'arginine. *O. oeni* possède le locus ADI (arginine déiminase) qui comprend les gènes impliqués dans le catabolisme de l'arginine en ornithine (Divol *et al*, 2003 ; Tonon *et al*, 2001). Cette voie entraîne aussi la formation de carbamate d'éthyle (ou uréthane), une molécule cancérigène formée à partir d'éthanol et de citrulline ou de carbamyl phosphate issus de la dégradation de l'arginine (Lonvaud-Funel, 1999). Cependant, la majorité du carbamate d'éthyle dans les vins, provient de la réaction spontanée de l'urée formée par les levures et l'éthanol.

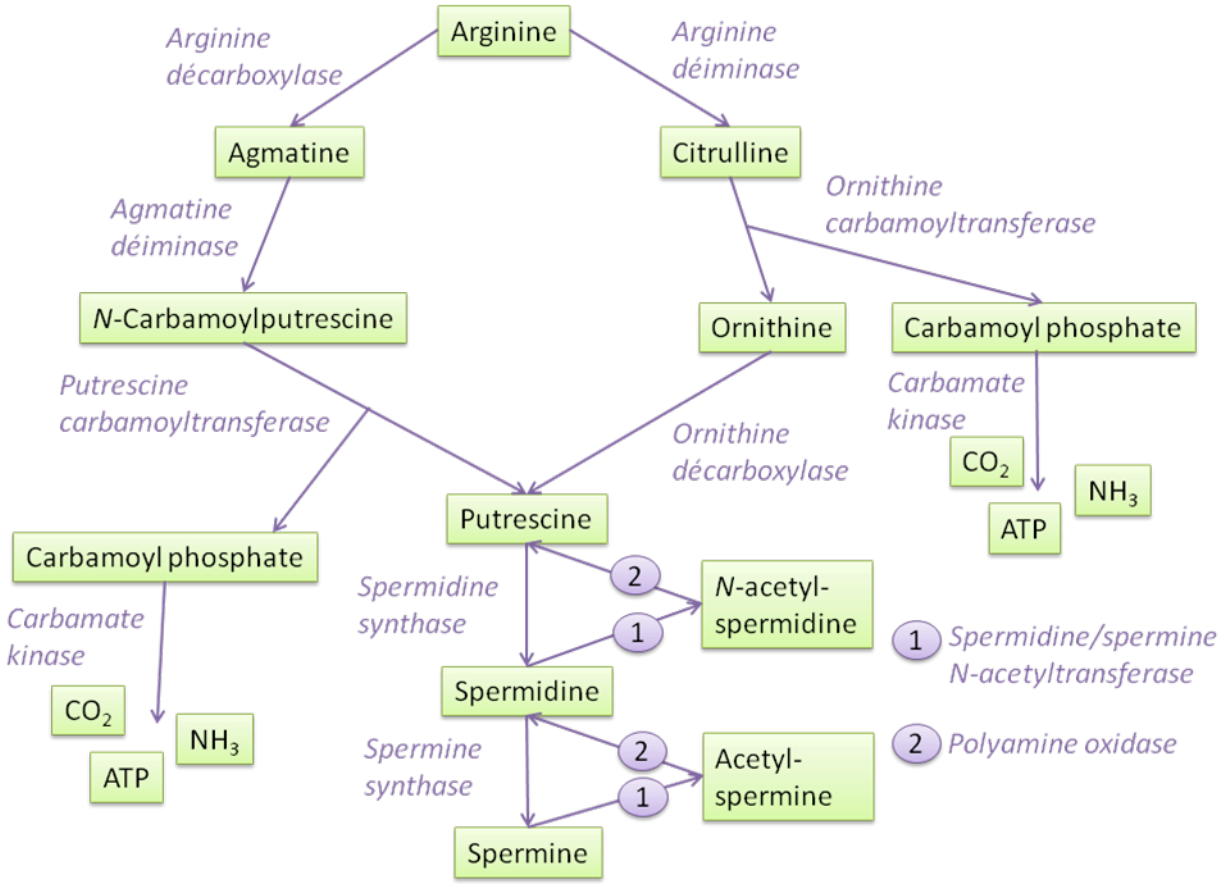


Figure 4. Métabolisme de l'arginine dans la formation d'amines biogènes (putrescine, spermidine, spermine). La putrescine peut être formée par la voie de l'agmatine déiminase (AgDI) ou par la voie de l'ornithine décarboxylase (ODC).

La production de tyramine est souvent associée à la synthèse de 2-phényléthylamine, comme c'est le cas pour des souches de *L. brevis* et *L. hilgardii* (Landete *et al*, 2007a). Ces deux amines biogènes sont produites simultanément par la même souche mais en différente quantité. En effet, la 2-phényléthylamine est environ cinq fois moins produite que la tyramine (Landete *et al*, 2007a). Pessione *et al*, (2009) ont montré que la formation des deux amines chez *E. faecalis*, était catalysée par la même enzyme TDC, qui serait liée à la membrane. La décarboxylation de la phénylalanine avait lieu après totale déplétion de la tyrosine du milieu. La tyrosine décarboxylase serait donc une enzyme aspécifique avec une plus faible affinité pour la phénylalanine.

V. Fonctions des amines biogènes : les amines biogènes impliquées dans la résistance au stress acide et la production d'énergie métabolique

Les bactéries possèdent plusieurs systèmes pour transporter de l'énergie (Konings *et al*, 1997). Les systèmes de transport primaires regroupent les systèmes de transfert d'électrons et les ATPases F_0-F_1. Le gradient électrochimique d'un ion particulier exerce une force sur ces ions qui est appelée force proton-motrice (pmf) ou force sodium-motrice (smf). Les systèmes de transfert d'électrons liés à la membrane sont principalement responsables de la génération de ces forces, chez les bactéries utilisant la lumière ou l'énergie redox.

Mais chez les bactéries lactiques, la force proton-motrice est impliquée dans les processus de transports secondaires. Les systèmes de transports secondaires convertissent les énergies électro-chimiques d'un soluté à l'autre. Ils sont classés en trois groupes : les uniports, les symports et les antiports. Dans le cas de la production d'amines biogènes, un acide aminé pénètre à l'intérieur de la cellule en même temps que l'amine biogène est exclue vers le milieu extracellulaire; il s'agit donc d'un antiport. Outre la production d'amines biogènes, d'autres exemples de décarboxylation et d'échange génèrent de l'énergie métabolique. En effet l'échange malate/lactate lors des fermentations malolactiques a été étudié chez *Lactococcus lactis* (Poolman *et al*, 1991). Ainsi que l'échange citrate/lactate chez *Leuconostoc mesenteroides* (Marty *et al*, 1995, 1996).

Chez *L. brevis* (Wolken *et al*, 2006), le transporteur TyrP, qui intervient dans l'échange tyrosine/ tyramine, a été exprimé chez *L. lactis* et son fonctionnement a été caractérisé soit en cellules entières ou à l'aide de membrane RSO (rignht-side out membrane vesicles). TyrP peut fonctionner comme uniport pour le passage de la tyrosine vers le milieu intracellulaire, mais le transporteur catalyse l'échange tyrosine/ tyramine plus efficacement que le transport unidirectionnel (Figure 5). Les auteurs ont également analysé la spécificité de substrat de TyrP. L'amine et le phényl avec le groupe hydroxyl en *para* sont les sites d'interactions les plus importants avec le transporteur. La génération d'une force proton-motrice ainsi que l'implication de la voie de la tyrosine décarboxylase dans la résistance au stress acide ont également été étudiées chez *Enterococcus faecium* (Pereira *et al*, 2009).

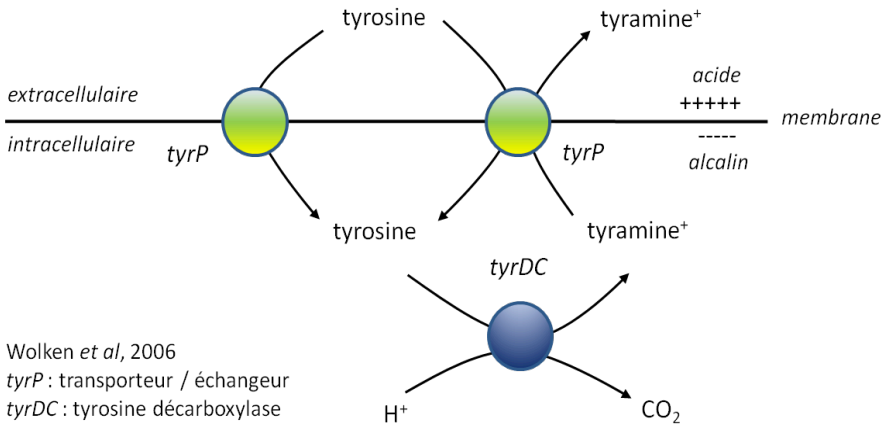


Figure 5. Décarboxylation de la tyrosine en tyramine chez *Lactobacillus brevis.*

Dans le cas de la formation de tyramine, le quatrième gène de l'opéron code pour un échangeur Na^+/H^+ (Cf. paragraphe XI C), qui serait aussi impliqué dans la lutte contre le stress acide. Plus précisément, les ions Na^+ auraient un rôle dans la voie de décarboxylation de la tyrosine. En effet, il a été montré que les cellules de *E. faecalis* E17 (Pereira *et al*, 2009), immergées dans un tampon de phosphate de sodium à pH 4,5, étaient capables de maintenir un pH intracellulaire plus haut (pH 5,7) que les cellules reprises dans un tampon de phosphate de potassium (pH 5,5). La présence de l'échangeur catalyserait l'assimilation d'un ion Na^+ avec la sortie d'un ion H^+. Ainsi, bien qu'électriquement neutre, cet échange pourrait augmenter la capacité à exclure des protons. De plus, au niveau électrogénique, l'entrée de Na^+ compenserait la sortie de tyramine chargée positivement.

L'échange histidine/ histamine a été étudié chez *Lactobacillus buchneri* ST2A (Molenaar *et al*, 1993), isolé du fromage, à partir de vésicules membranaires. Là encore, la décarboxylation de l'histidine en histamine et le transport par un antiport, génèrent un gradient de pH (alcalin à l'intérieur) et un potentiel électrique de membrane (négatif à l'intérieur). L'échange entre l'acide aminé précurseur et l'amine biogène est stimulé par un potentiel électrique positif à l'intérieur (Figure 6).

Contrairement au transport de l'histamine et de la tyramine, il n'existe pas de données sur le transport de la cadavérine chez les bactéries lactiques. Mais le transporteur CadB a été étudié chez *E. coli* (Soksawatmaekhin *et al*, 2004). Le gène *cadB* est en opéron avec *cadA* codant la lysine décarboxylase. A pH neutre, CadB fonctionne comme un symport: la cadavérine ainsi qu'un proton H^+ rentrent dans la cellule pour stimuler la croissance. Alors qu'à pH acide, la lysine présente dans le milieu extracellulaire est consommée et échangée

contre une molécule de cadavérine. Un proton intracellulaire est consommé lors de la réaction de décarboxylation. Ceci génère un gradient de pH et un potentiel électrique de membrane.

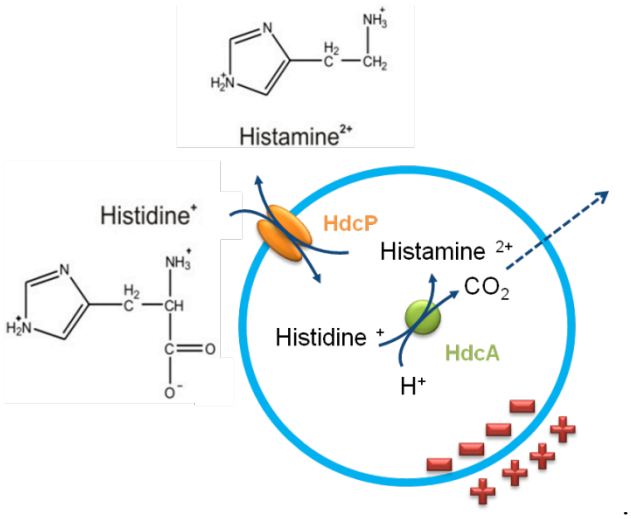


Figure 6. Transport électrogénique de l'histidine et de l'histamine (exemple de *Lactobacillus buchneri*, Molenaar *et al*, 1993). La décarboxylation cytoplasmique de l'histidine consomme un proton.

Outre les avantages concernant la survie cellulaire et la résistance au stress acide, la synthèse d'amines biogènes pourrait avoir un rôle dans la pathogènicité. Les protéines du locus *cad* chez les *Enterobacteriaceae*, pourraient réguler l'expression de gènes associés à la colonisation (Torres, 2008).

En résumé, la production d'amines biogènes aiderait à la survie des bactéries lactiques par la production d'énergie métabolique en générant une force proton-motrice (Konings *et al*, 1997). En effet, l'échange acide aminé/ amines biogènes se traduit par la translocation nette d'une charge à travers la membrane cytoplasmique qui résulte dans la génération d'un potentiel électrique de membrane. De plus, la réaction de décarboxylation intracellulaire consomme un proton ce qui conduit à la création d'un gradient de pH (ΔpH) et à l'alcalinisation du cytoplasme. Aussi la synthèse d'amines biogènes serait impliquée dans la résistance au stress acide. L'étude du transport de l'histidine/histamine chez *Lactobacillus buchneri* (Molenaar *et al*, 1993) ainsi que de la tyrosine/tyramine chez *Lactobacillus brevis* (Wolken *et al*, 2006), confirme que ces mécanismes génèrent une force proton-motrice. Cette source d'énergie métabolique faisant intervenir un système de transport secondaire est particulièrement importante pour les bactéries à caractère fermentaire qui ne possèdent pas de

chaîne respiratoire contrairement aux bactéries aérobies (Konings *et al*, 1994 ; Konings, 2002).

VI. Production d'amines biogènes dans le vin

Les bactéries lactiques du vin (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*) produisent des amines biogènes (Tableau 3), à partir du moment où elles portent les gènes nécessaires à cette synthèse, et que les conditions environnementales sont favorables à l'activité enzymatique. La quantité d'amines biogènes produite est différente suivant le genre bactérien et les conditions de développement.

Tableau 3. Les bactéries isolées du vin, productrices d'amines biogènes.

Amines biogènes	Bactéries productrices du vin	Références
putrescine	*Oenococcus oeni*	Marcobal *et al*, 2004 & 2006 Mangani *et al*, 2005 Guerrini *et al*, 2002 Moreno-Arribas *et al*, 2003 Nannelli *et al*, 2008
	Lactobacillus hilgardii	Arena & Manca de Nadra, 2001 Landete *et al*, 2007c, 2010
	Lactobacillus buchneri	Moreno-Arribas *et al*, 2003
	Lactobacillus 30a	Moreno-Arribas *et al*, 2003
Histamine	*Oenococcus oeni*	Coton *et al*, 1998 Landete *et al*, 2005 Guerrini *et al*, 2002
	Lactobacillus hilgardii	Lucas *et al*, 2005 Landete *et al*, 2005, 2007c
	Lactobacillus 30a	Moreno-Arribas *et al*, 2003
	Lactobacillus rossiae	Costantini *et al*, 2009
	Lactobacillus buchneri	Landete *et al*, 2005 Martin *et al*, 2005
	Lactobacillus mali	Landete *et al*, 2005, 2007c
	Pediococcus parvulus	Landete *et al*, 2005
	Leuconostoc mesenteroides	Landete *et al*, 2005

Amines biogènes	Bactéries productrices du vin	Références
tyramine	*Lactobacillus plantarum* *Lactobacillus brevis* *Pediococcus parvulus* *Enterococcus faecium*	Arena *et al*, 2007 Lucas *et al*, 2003 Landete *et al*, 2007c Nannelli *et al*, 2008 Capozzi *et al*, 2011
tyramine & 2-phényléthylamine	*Lactobacillus hilgardii* *Lactobacillus brevis* *Leuconostoc mesenteroides*	Moreno-Arribas *et al*, 2000 Landete *et al*, 2007a, 2007c Moreno-Arribas *et al*, 2000 Landete *et al*, 2007a Moreno-Arribas *et al*, 2003
cadavérine	*Oenococcus oeni*	Guerrini *et al*, 2002
spermidine	*Oenococcus oeni*	Guerrini *et al*, 2002

A. Les concentrations d'amines biogènes produites par les bactéries lactiques isolées du vin

1) L'histamine

Dans le vin l'histamine est produite par *O. oeni*, *P. parvulus* ainsi que par des lactobacilles. Les souches de *O. oeni* productrices sont fréquentes mais produisent peu d'histamine (Landete *et al*, 2005; Guerrini *et al*, 2002). En effet, quelques mg à 22 $mg.L^{-1}$ sont détectés sur milieu sélectif ensemencé avec des souches isolées du vin (Landete *et al*, 2005). Et, dans des conditions de culture optimales, Guerrini *et al* (2002) mesurent jusqu'à 32,8 $mg.L^{-1}$ d'histamine. Contrairement à *O. oeni*, peu de souches de *Lactobacillus hilgardii*, *L. buchneri*, *L. mali*, *Leuconostoc mesenteroides* et *P. parvulus* sont productrices. Cependant, elles produisent de l'histamine en plus grande concentration. Sur milieu synthétique adapté la production peut atteindre 45 $mg.L^{-1}$ pour *L. mali* et *L. mesenteroides*, 297 $mg.L^{-1}$ pour *L. buchneri* et 325 $mg.L^{-1}$ pour *P. parvulus* sont détectés (Landete *et al*, 2005). A noter que *Lactobacillus* 30a (isolée d'estomac de cheval) produit 1,3 $g.L^{-1}$ d'histamine sur milieu MRS supplémenté en acides aminés précurseurs (Moreno-Arribas *et al*, 2003).

2) La putrescine

La putrescine est l'amine biogène majeure du vin (Marcobal *et al*, 2005; Pramateftaki *et al*, 2006). Elle est produite entre autres par *O. oeni*, *L. buchneri*, *L. hilgardii*. Dans les conditions optimales de culture, *O. oeni* produit jusqu'à 146 $mg.L^{-1}$ de putrescine (Guerrini *et al*, 2002). De plus, dans la littérature on trouve des valeurs de 0,9 $g.L^{-1}$ pour *L. buchneri* (Moreno-Arribas *et al*, 2003), 1,3 $g.L^{-1}$ pour *Lactobacillus* 30a (Moreno-Arribas *et al*, 2003) et plus de 40 $mg.L^{-1}$ pour *L. hilgardii* (Landete *et al*, 2010).

3) La tyramine et la 2-phényléthylamine

Sur milieu enrichi, *L. brevis* et *L. hilgardii* produisent jusqu'à 1, 3 $g.L^{-1}$ et 0,5 $g.L^{-1}$ de tyramine, et 239 $mg.L^{-1}$ ainsi que 151 $mg.L^{-1}$ de 2-phényléthylamine (Landete *et al*, 2007a). Quant à *L. mesenteroides*, 1,1 $g.L^{-1}$ de tyramine a été mesuré (Moreno-Arribas *et al*, 2003).

4) La cadavérine et la spermidine

O. oeni est capable de produire de la cadavérine jusqu'à 34,2 $mg.L^{-1}$ en conditions optimales de croissance, soit en MRS supplémenté avec 0,2 % (p/v) de jus de tomate à pH 4,8. Quelques milligrammes de spermidine (< 2 $mg.L^{-1}$) sont produits dans un milieu test contenant 12% (v/v) d'éthanol à pH 3,2 (Guerrini *et al*, 2002).

B. Discussion sur les valeurs présentées

La corrélation entre amines biogènes d'un vin et la présence des bactéries lactiques est difficile compte tenu des différents taux de production entre espèces et des conditions de croissance en vin. La teneur en amines biogènes des vins est généralement de quelques milligrammes par litre à quelques dizaines de milligrammes par litre (Marcobal *et al*, 2005; Pramateftaki *et al*, 2006). La putrescine cependant peut atteindre 200 $mg.L^{-1}$. Ces valeurs sont donc bien différentes de celles que l'on trouve dans les autres produits fermentés, comme par exemple le fromage, où l'histamine a été quantifiée à titre d'exemple à 220,8 $mg.kg^{-1}$ dans l'Emmental et 734,1 $mg.kg^{-1}$ dans l'Emmental râpé (Ladero *et al*, 2009).

Pour étudier le métabolisme des amines biogènes par les bactéries lactiques, des milieux de culture spécifiques ont été développés et la plupart sont enrichis en acides aminés

précurseurs de l'ordre de 1 à 3 $g.L^{-1}$ (Moreno-Arribas *et al*, 2000 ; Landete *et al*, 2007a) à pH d'environ 5,0 (Landete *et al*, 2004) à 5,5 (Landete *et al*, 2007a). Ainsi les résultats obtenus après croissance des souches isolées sur ces milieux, correspondent à la capacité de production de la bactérie, mais ne sont pas représentatifs de la réelle teneur en amines biogènes retrouvée dans les vins. De plus, rares sont les expériences qui mesurent la production d'amines biogènes d'une souche après inoculation dans un vin ou un vin modèle, car le suivi de la fermentation malolactique est souvent long. Capozzi *et al* (2011) ont isolé une souche de *E. faecium* productrice de tyramine d'un vin rouge, puis ensemencé cette souche dans un vin à 10% (v/v) d'éthanol ainsi que dans un milieu synthétique M17 supplémenté avec 2 $g.L^{-1}$ en tyrosine. Après 24 h en milieu synthétique, *E. faecium* produit plus de 80 $mg.L^{-1}$ de tyramine, alors que 0,3 $mg.L^{-1}$ de tyramine sont mesurés à la fin des fermentations malolactiques, soit au bout de soixante jours. Les valeurs présentées pour les différentes bactéries lactiques sont donc à relativiser.

VII. Les amines biogènes dans les autres aliments

Outre le vin et les autres produits fermentés, les amines biogènes sont susceptibles d'être présentes dans les aliments contenant des précurseurs azotés et des bactéries ayant une activité décarboxylase, quand les conditions physico-chimiques sont favorables. Dans les produits frais comme la viande et le poisson, elles peuvent être des indicateurs d'altération et refléter ainsi la qualité hygiénique de l'aliment. En effet, l'histidine et la tyrosine ne sont décarboxylées que par le système enzymatique des microorganismes endogènes tandis que la putrescine, la cadavérine, la spermine et la spermidine (Suzzi & Gardini, 2003) peuvent être produites à la fois par les enzymes endogènes de l'aliment (viande, poisson…) et celles des microorganismes. En dehors des bactéries lactiques et autres bactéries à Gram positif, elles sont aussi produites par des bactéries à Gram négatif.

A. Les autres aliments fermentés

1) Le cidre

Dans le cidre, l'histamine peut être produite par : *L. higardii*, *L. collinoides*, *L. diolivorans* et *O. oeni* (Garai *et al*, 2007) et est détectée à une concentration maximale de 16 $mg.L^{-1}$ (Ladero *et al*, 2011). La tyramine peut être produite par *L. diolivorans* et *O. oeni* (Garai *et al*, 2007), ainsi que par *L. brevis* et *Sporolactobacillus* sp. (Coton *et al*, 2011) et

atteindre 14 mg.L^{-1} (Ladero *et al*, 2011). *L. collinoides*, *L. brevis*, *L. mali*, *Leuconostoc mesenteroides* et *O. oeni* produisent de la putrescine (Coton *et al*, 2010) dont la concentration maximale est de 34 mg.L^{-1} (Ladero *et al*, 2011). Récemment des souches de *Lactobacillus paracollinoides* productrices d'histamine et de putrescine ont été détectées par qPCR (Ladero *et al*, 2011).

2) Le fromage

Concernant le fromage, l'histamine et la tyramine sont les amines biogènes principales rencontrées (Bonetta *et al*, 2008 ; Ladero *et al*, 2010). En effet, dans des fromages italiens maturés, la concentration en tyramine et en histamine atteint respectivement 2 g.kg^{-1} et 1,8 g.kg^{-1}. Et dans tous les fromages testés aussi bien artisanaux qu'industriels, *E. faecalis* est l'espèce productrice majoritaire de tyramine (Bonetta *et al*, 2008). La teneur en tyramine de différents fromages d'origine espagnole à été également évaluée et peut atteindre 960 mg.kg^{-1} (Ladero *et al,* 2010) et est principalement produite par des entérocoques (*Enterococcus* sp., *E. durans*, *E. faecalis* et *E. faecium*) ainsi que par des lactobacilles (*L. brevis* et *L. curvatus*). La quantité moyenne d'histamine détectée dans l'Emmental est de 220,8 mg.kg^{-1} et la plus forte concentration a été mesurée dans l'Emmental râpé (734,1 mg.kg^{-1}) (Ladero *et al*, 2009). Ceci dépasse largement la dose légale de 100 mg.kg^{-1} pour l'histamine dans les fromages (ten Brink *et al*, 1990). Lors d'une autre étude, d'autres lactobacilles ont été isolés et leur taux de production a été mesuré: *L. curvatus* produit plus de 100 mg.L^{-1} de tyramine et de putrescine, *L. plantarum* et *Lactobacillus casei*/*paracasei* produisent 10 à 100 mg.L^{-1} de tyramine (Bunkova *et al*, 2010). D'autres espèces plus marginales ont également été isolées: *Enterococcus malodoratus* et *Pediococcus acidilactici* (Bonetta *et al*, 2008) ainsi qu'un producteur d'histamine: *Lactobacillus helveticus* et un producteur de tyramine : *Enterococcus casseliflavus* (Burdychova & Komprda, 2007).

3) Les produits carnés fermentés

Pour les produits carnés fermentés tels que le saucisson, le chorizo, le fuet ; la revue de Suzzi et Gardini (2003) dresse la liste des amines biogènes retrouvées ainsi que des bactéries productrices et des conditions favorisant le développement de ces producteurs. La tyramine est l'amine biogène principale et est présente en moyenne à 200 mg.kg^{-1}. Suivent ensuite la putrescine (jusqu'à 450 mg.kg^{-1}, l'histamine (jusqu'à 300 mg.kg^{-1}) et la cadavérine (20

mg.kg[1] en moyenne). La 2-phényléthylamine et la tryptamine sont détectées à de plus faibles concentrations. Parmi les bactéries productrices, les *Enterobacteriaceae* telles que *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* et *Morganella morganii* peuvent former des quantités importantes d'histamine. A noter que les *Enterobacteriaceae* sont capables de libérer leur décarboxylase lors des premières étapes de la fabrication de saucisses. Ainsi, ce sont les enzymes et non les bactéries présentes qui sont responsables de l'accumulation d'amines biogènes. La tyramine quant à elle, semble être produite majoritairement par les bactéries lactiques: *L. buchneri*, *L. alimentarius*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. farciminis*, *L. bavaricus*, *L. homohiochii*, *L. reuteri*, *L. sakei* et *Carnobacterium divergens* (Masson *et al*, 1996). Outre ces deux familles, *Staphylococcus carnosus* et *Staphylococcus piscifermentans* montrent une forte activité décarboxylase et sont capables de synthétiser l'histamine, la putrescine, la cadavérine et la 2-phényléthylamine.

4) La bière

L'histamine (<5 mg.L^{-}), la putrescine et la tyramine (<10 mg.L^{-1}) sont les amines biogènes fréquemment rencontrées dans la bière. La tryptamine, la 2-phényléthylamine ainsi que la spermine et la spermidine sont plus rares et à des concentrations très faibles (< 2 mg.L^{-1}) (Tang *et al*, 2009). Une étude montre que la tyramine de la bière est produite par une bactérie contaminante : *Pediococcus* sp., et que la concentration en tyramine mesurée est directement proportionnelle au nombre de bactéries. Ainsi 1.10^4 à 5.10^4 *Pediococcus* sp. peuvent produire de 5 à 15 mg.L^{-1} de tyramine (Izquierdo-Pulido *et al*, 1997).

B. Les aliments non fermentés (exemples)

1) Le poisson

Dans le poisson, l'histamine atteint des taux élevés et est l'amine biogène d'intérêt car source d'intoxication. Elle est produite par : *Photobacterium damselae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Shewanella* sp., et *Morganella morganii* (Bjornsdottir-Butler *et al*, 2010). Dans le saumon fumé, *Photobacterium phosphoreum* est la seule espèce détectée responsable de la formation d'histamine (Jorgensen *et al*, 2000). Or, lorsque des co-cultures sont réalisées avec des bactéries d'altération, par exemple : *Serratia liquefaciens* ou *Hafnia alvei* avec *Carnobacterium divergens* ou *Lactobacillus sakei* subsp. *carnosus*, le taux de putrescine

augmente de dix à quinze fois. Ceci peut s'expliquer par le phénomène d'association métabolique (Mangani *et al*, 2005).

2) Les épinards

Une étude a été réalisée pour rechercher des bactéries productrices dans les épinards (Lavizzari *et al*, 2010), ainsi que leur capacité à synthétiser des amines biogènes. Plusieurs d'entre elles produisent plus qu'un type d'amine. Ainsi *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* et *Morganella morganii* sont les principales productrices d'histamine, suivies par *Pantoea* spp. et *Hafnia alvei*. *Enterobacter amnigenus* et *Enterobacter cloacae* synthétisent la putrescine. La cadavérine est formée par *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens* et *Stenotrophomonas maltophilia*.

VIII. Détection et quantification des amines biogènes

De nombreux travaux effectués sur les amines biogènes relatent la mise au point de méthodes permettant de détecter les bactéries productrices par des méthodes phénotypiques ou moléculaires en ciblant les gènes responsables de la synthèse d'amines biogènes. La production peut être quantifiée par chimie analytique.

A. Détection et quantification des microorganismes producteurs

Des milieux de culture spécifique ont été développés pour la détection des microorganismes producteurs d'amines biogènes. De plus, les méthodes de biologie moléculaire permettent non seulement de détecter ces producteurs, mais aussi de les quantifier.

1) Méthodes microbiologiques

La détection de la production d'amines biogènes peut se faire sur milieu gélosé contenant un indicateur de pH comme le pourpre de bromocresol. En présence d'une activité décarboxylase, le pH du milieu s'alcalinise et l'indicateur vire au mauve. La composition d'un tel milieu a été améliorée par S. Bover-Cid & W. H. Holzapfel (1999). En se basant sur les milieux précédemment mis au point, les auteurs ont notamment ajouté du pyridoxal-5-

phosphate, un co-facteur enzymatique nécessaire au fonctionnement de la plupart des décarboxylases (ormis pour l'histidine décarboxylase des bactéries lactiques, dont le co-facteur est le pyruvoyl), et ont diminué la concentration en glucose. Ceci permet d'augmenter l'activité décarboxylase (Moreno-Arribas *et al*, 2003 ; Landete *et al*, 2007a). En effet, la fermentation du glucose par les bactéries lactiques diminue le pH, et masque l'alcalinisation liée à la production d'amines biogènes (Maijala, 1993). Des milieux spécifiques permettant de détecter la production d'amines biogènes données ont ensuite été développés, comme le milieu TPM (Tyramine Production Medium), conçu pour la détection des bactéries productrices de tyramine (Landete *et al*, 2007a), ou encore un milieu contenant du bleu de bromothymol pour les bactéries HFB (histamine-forming bacteria) (Tao *et al*, 2009). De même, Bjornsdottir *et al* (2009) utilisent le milieu agar Niven (Niven's agar method) pour détecter les bactéries à Gram négatif productrices d'histamine dans le poisson. Néanmoins, l'utilisation de ces méthodes n'est pas complètement fiable. En effet, les bactéries lactiques peuvent former d'autres produits alcalins ou de l'acide dus à leur activité fermentaire, ce qui fausse les résultats. Des faux positifs (38%) ont également été obtenus sur des bactéries à Gram négatif (Bjornsdottir *et al*, 2009). Aussi, les bactéries faiblement productrices ne sont pas détectables sur de tels milieux (Rosi *et al*, 2008), le changement de couleur de l'indicateur n'étant effectif que pour une production supérieure à 100 $mg.L^{-1}$ (Landete *et al*, 2005).

2) Méthodes de biologie moléculaire

Les méthodes moléculaires, plus rapides et plus spécifiques, que les méthodes phénotypiques décrites précédemment, permettent de détecter facilement la présence du ou des gène(s) impliqué(s) dans la synthèse d'amines biogènes. Parmi ces techniques : la PCR, la PCR multiplexe, la PCR quantitative (qPCR) et la Reverse-Transcriptase quantitative PCR (qRT-PCR), ont été développées. Ces techniques ont différents degrés de performance et quelques variances dans leurs finalités.

La PCR cible un gène particulier d'une espèce ou d'un genre. A ce sujet, des amorces dites dégénérées peuvent être employées. Puis, le séquençage de l'amplicon permet de valider l'identification. De nombreux couples d'amorces ciblant les gènes codant les décarboxylases ont été dessinés (Landete *et al*, 2007b). A titre d'exemple, les bactéries lactiques du vin productrices d'histamine peuvent être détectées par PCR en utilisant le couple CL1/ JV17 (Le Jeune *et al*, 1995).

Des PCR multiplex ont également été mises au point pour détecter aisément en une seule expérience, les producteurs d'amines biogènes potentiellement présents dans une matrice alimentaire complexe (Coton & Coton, 2005 ; De Las Rivas *et al*, 2006). Cette technique consiste à mélanger plusieurs couples d'amorces pour détecter la présence de différents gènes en même temps. Une souche peut produire plusieurs types d'amines biogènes telle que *Lactobacillus* 30a qui produit à la fois l'histamine et la putrescine. La PCR multiplexe représente donc un gain de temps comparé à la PCR classique.

La quantification par qPCR, permet d'estimer le nombre de bactéries productrices. Nannelli *et al* (2008) a développé cette méthode pour énumérer les bactéries lactiques du vin productrices d'histamine, de tyramine et de putrescine. Pour cela des amorces ont été dessinées par rapport à la similitude des séquences nucléotidiques des gènes, codant les décarboxylases identifiés chez différentes bactéries lactiques. Par cette même technique, Ladero *et al* (2010) détectent et quantifient spécifiquement les entérocoques ainsi que *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus curvatus*, producteurs de tyramine dans le fromage. Une méthode similaire a dernièrement été décrite par Ladero *et al* (2011) pour la détection et la quantification des bactéries productrices isolées du cidre.

Enfin la RT-qPCR permet de quantifier l'expression des gènes impliqués dans la production d'amines biogènes. Dans le lait et le fromage, le couple Hdc1/ Hdc2 est employé pour quantifier l'expression du gène *hdcA* (Fernandez *et al*, 2006 ; Ladero *et al*, 2009). Le développement de cette méthode ne s'arrête pas aux souches productrices d'histamine, mais est également appliquée aux bactéries à Gram positif productrices de tyramine (Torriani *et al*, 2008). La présence du gène codant la décarboxylase est corrélée à la production d'amines biogènes.

B. Quantification des amines biogènes

Parallèlement à la détection des microorganismes producteurs d'amines biogènes, il est important de doser ces métabolites. A cette fin, de nombreuses méthodes analytiques ont été développées et des exemples sont décrits dans le paragraphe qui suit.

1) Quantification des amines biogènes par TLC

Les amines biogènes peuvent être détectées et dosées par chromatographie liquide (HPLC : High Pressure Liquid Chromatography) ou sur couche mince (TLC: Thin Layer Chromatography) (Costantini *et al*, 2006). Néanmoins, cette méthode est plus qualitative que quantitative car moins précise que l'HPLC, mais ne requiert pas un matériel sophistiqué. De plus, la TLC est plus rapide et moins couteuse. Elle peut être appliquée à la détection de l'histamine, la putrescine et la cadavérine dans le poisson et les autres produits de la mer (Shakila *et al*, 2001). Une autre méthode a été développée pour l'identification et la semi-quantification de huit amines biogènes produites par différents genres bactériens (Latorre-Moratalla *et al*, 2009). Selon cette nouvelle technique, les bactéries peuvent être classées en faible, modéré, ou fort producteurs. Dans le premier cas, aucun spot n'est détecté ou la production est inférieure à 50 $mg.L^{-1}$. Dans le second cas, la production se situe entre 50 et 500 $mg.L^{-1}$, alors qu'un fort producteur produit plus de 500 $mg.L^{-1}$ d'amines biogènes. Dans un domaine moins appliqué, la TLC a été utilisée pour vérifier la production de putrescine par *Serratia liquefaciens* après clonage du gène codant l'ornithine décarboxylase (De Las Rivas *et al*, 2007).

2) Quantification des amines biogènes par HPLC

Dans la littérature, l'HPLC se révèle être une méthode de choix pour l'identification et la quantification. Due à la nature hydrophobe des amines biogènes, la colonne utilisée est une colonne phase inverse (RP-C18). Une réaction de dérivation souvent pré-colonne, mais quelquefois post-colonne (Sass-Kiss *et al*, 2000), est nécessaire à la détection. Le réactif de dérivatisation le plus couramment utilisé est l'OPA (ophtaldialdéhyde) (Pereira Monteiro & Bertrand, 1994 ; Busto *et al*, 1997 ; Vidal-Carou *et al*, 2003 ; Pereira *et al*, 2008) ou le dansyl-chloride (Moret *et al*, 1992 ; Anli *et al*, 2004 ; Dugo *et al*, 2006). L'OPA réagit avec les amines primaires en quelques minutes pour former des dérivés fluorescents, mais instables. Tandis que le dansyl-chloride est un réactif non-spécifique car il dérive aussi bien les amines primaires et secondaires que les phénols, les alcools aliphatiques et quelques sucres qui sont détectés aux UV. Ainsi, des traitements supplémentaires sont nécessaires avec une dérivatisation au dansyl-chloride afin d'éliminer les composés secondaires. Par exemple, les échantillons peuvent être purifiés sur colonne SPE C18 pour éliminer les composés

phénoliques après dérivation (Zotou *et al*, 2003), ou un traitement au PVP (polyvinylpolypyrolidone) est réalisé lors de la préparation des échantillons (Proestos *et al*, 2007 ; Soufleros *et al*, 2007). Après comparaison des deux agents de dérivatisation, Alberto *et al*, 2002 ont opté pour la dérivation à l'OPA permettant de séparer les amines biogènes et les acides aminés. D'autres agents de dérivatisation plus marginaux sont employés tels que le dabsyl chloride (Romero *et al*, 2000a et 2000b ; Krause *et al*, 1995), le NQS (1,2-naphthoquinone-4-sulfonate) (Garcia-Villar *et al*, 2006), l'AQC (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate) (Busto *et al*, 1996 ; Hernandez-Orte *et al*, 2006) ou encore le 3,5-dinitrobenzoyl chloride (Kirschbaum *et al*, 2000).

Plus généralement, la revue de Armagan Onal (2007) rassemble les méthodes analytiques classiques pour la détermination des amines biogènes dans les produits alimentaires. Au cours de mon travail de thèse, j'ai tout d'abord testé la méthode à l'OPA selon le protocole décrit dans le bulletin de l'OIV par Pereira Monteiro & Bertrand, 1994. La méthode développée par ces auteurs est en effet couramment employée (Moreno-Arribas *et al*, 2000); puis j'ai mis en place au laboratoire la méthode de Gomez- Alonso *et al* (2007) permettant de séparer les amines biogènes et les acides aminés.

IX. Les facteurs influençant la production d'amines biogènes

Les conditions environnementales (pH, T°C, etc…) permettant la croissance optimale des bactéries lactiques et la production de l'activité enzymatique (Mazzoli *et al*, 2007), ainsi que la disponibilité en protéines et acides aminés libres (Lonvaud-Funel & joyeux, 1994 ; Landete *et al*, 2006) sont les facteurs essentiels à la production d'amines biogènes. De nombreux facteurs influencent la synthèse d'amines biogènes. Celle-ci est notamment déclenchée lorsque les conditions environnementales se dégradent pour apporter une source d'énergie supplémentaire à la cellule (Konings *et al*, 1997).

A. Le rôle des précurseurs sur la production d'amines biogènes

La synthèse de l'histidine décarboxylase est induite en présence d'histidine chez *Lactobacillus sp*. (Pessione *et al*, 2005) et *Streptococcus thermophilus* (Calles-Enriquez *et al*, 2010). De même, l'expression de *hisRS* (notée *hisS* chez *L. buchneri*), une enzyme

appartenant au cluster *hdc*, dépendrait de la concentration en histidine dans le milieu (Martin *et al*, 2005).

Le taux de tyramine augmente après ajout de tyrosine chez *Lactobacillus brevis* et *L. hilgardii* (Moreno-Arribas *et al*, 2000). Chez *Sporolactobacillus* sp isolé du cidre, la tyrosine induit l'expression de tous les gènes du cluster *tyrDC*, sauf de *tyrS*, un gène codant une tyrosyl-tRNA synthétase (Coton *et al*, 2011). De même chez *E. durans* isolé de fromage, le taux de messager polycistronique issu de la transcription des gènes codant la décarboxylase TyrDC (appelée *tdcA* ici) et le transporteur TyrP augmente en présence de tyrosine (Lineares *et al*, 2009).

Enfin la production de putrescine est favorisée avec l'ajout d'agmatine chez *L. hilgardii, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus* ou *Enterococcus faecalis* (Landete *et al,* 2008a).

B. Les amines biogènes sont produites suivant la phase de croissance

La synthèse de l'histidine décarboxylase et de l'ornithine décarboxylase est modulée suivant la phase de croissance ; ces enzymes sont davantage produites en phase stationnaire chez deux lactobacilles : *Lactobacillus sp*. 30a (ATCC 33222) et *Lactobacillus sp*. (w53)(Pessione *et al*, 2005). Il en est de même pour l'expression de *hdcA* de *Streptococcus thermophilus* qui augmente au début de la phase stationnaire. L'expression du gène est corrélée à l'augmentation de l'activité enzymatique (Calles-Enriquez *et al*, 2010). Alors que Landete *et al* (2006) ont montré que l'expression de *hdc* chez *P. parvulus*, *O. oeni* et *L. hilgardii* était plus importante lors de la phase exponentielle, lorsque les cellules en pleine division cellulaire nécessitent l'énergie métabolique générée par la décarboxylation de l'histidine (Molenaar *et al*, 1993).

C. Le pyridoxal-5'-phosphate

Le pyridoxal-5'-phosphate, un cofacteur enzymatique bien connu pour stimuler la synthèse d'amines biogènes (Bover-Cid & Holzapfel, 1999), favoriserait la production de tyramine chez *O. oeni* (Gardini *et al*, 2005). Chez *L. hilgardii*, *P. parvulus* et *O. oeni*, l'activité de l'histidine décarboxylase augmente plus de deux fois en présence de 0,5 $g.L^{-1}$ de

pyridoxal-5'-phosphate (Landete *et al*, 2006), bien que l'histidine décarboxylase soit dépendante du pyruvoyl. De même sa présence augmenterait de dix fois la production d'amines chez plusieurs souches de lactobacilles: *Lactobacillus hilgardii* X_1B isolé du vin et *Lactobacillus plantarum* N4 et N8 isolés de jus d'orange (Arena & Manca de Nadra, 2001). L'ajout de pyridoxal-5'-phosphate dans leur milieu réactionnel est appliqué par Moreno-Arribas *et al* (2000) pour mesurer l'activité tyrosine décarboxylase de *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus hilgardii*. Mais d'après Landete *et al* (2008a), il n'a aucun effet sur la production de putrescine à partir d'agmatine chez *L. hilgardii, P. aeruginosa, B. cereus* ou *E. faecalis*.

D. Les produits de décarboxylation, les acides organiques et les sucres

En plus d'agir comme un inhibiteur compétitif de l'enzyme (Coton *et al*, 1998b), le produit de la réaction catalysée par HDC réprimerait l'expression du gène *hdc* de *O. oeni* (Landete *et al*, 2006). De même, chez *E. durans* (Fernandez *et al*, 2007), il a été montré que la présence de tyramine dans le milieu de culture inhibe sa propre production. Quant aux sucres, comprenant le fructose et le glucose, et aux acides organiques : l'acide citrique et l'acide malique, testés en tant que facteurs œnologiques (Landete *et al*, 2008b), ils diminueraient aussi l'expression d'*hdc* chez *O. oeni* (Landete *et al*, 2008b). Lorsque la concentration en sucre diminue, signifiant que les conditions environnementales sont défavorables, les systèmes de transports secondaires, dont la synthèse d'amines biogènes fait partie, sont déclenchés (Konings *et al*, 1997). C'est pourquoi une quantité mineure de glucose ou encore d'arabinose stimule respectivement la biosynthèse de putrescine chez *Lactobacillus curvatus* (Bover-Cid *et al*, 2008) ou la production de tyramine chez *O. oeni* (Gardini *et al*, 2005) et ils inhibent la production de tyramine chez *L. plantarum* (Arena *et al*, 2007). La synthèse de tyramine par *E. durans* (Fernandez *et al*, 2007) n'est affectée par aucune source de sucre (glucose, sucrose, lactose, galactose). Ainsi, le taux d'amines biogènes produits dépendrait de la quantité des sucres présents et non de leur nature. Par ailleurs, le malate ne semble pas avoir d'effet sur la décarboxylation de l'histidine chez *Lactobacillus hilgardii* (Mazzoli *et al*, 2007), alors qu'il inhibe la synthèse de tyramine chez *L. plantarum* (Arena *et al*, 2007).

E. Le pH

Bien qu'il soit admis que la production d'amines biogènes soit déclenchée à des pH faibles, pour justement faire face aux conditions difficiles de croissance, on observe souvent que la synthèse d'amines biogènes est plus importante à des pH élevés (Bover-Cid *et al*, 2008 ; Gardini *et al*, 2005) car l'acidité limite la croissance. De plus, *O. oeni* ne métabolise pas l'arginine au cours de la FML à des pH inférieurs à 3,5 (Terrade & Mira de Orduna, 2006). L'expression du gène de l'histidine décarboxylase chez *S. thermophilus* est légèrement plus élevée à pH 6,8 qu'à pH 5,4 (Calles-Enriquez *et al*, 2010). Par contre, la transcription du gène de la tyrosine décarboxylase chez *Enterococcus durans* (Lineares *et al*, 2009) est induite à pH acide. Une étude basée sur la structure de l'histidine décarboxylase de *Lactobacillus* 30a montre qu'à pH alcalin la poche d'interaction du substrat est détruite du fait de la déstructuration de l'hélice formée par les protéines associées à cette poche. Alors qu'à pH bas certains résidus de cette hélice sont protonés, ce qui stabilise la structure où vient interagir le substrat (Schelp *et al*, 2001). De ce fait, le pH optimum d'activité des décarboxylases bactériennes est bas (Gale, 1946). En fait, l'activité décarboxylase envers les acides aminés est forte à des pH entre 4 et 5,5 (Teodorovic *et al*, 1994) mais diminue à des pH très faible car alors la croissance bactérienne est affectée. C'est le cas pour une souche de *E. durans* qui produit une quantité plus importante de tyramine à pH 5 bien que le taux de croissance commence à diminuer (Fernandez *et al*, 2007).

X. Les facteurs particuliers liés au vin

A. L'éthanol

Les auteurs (Mazzoli *et al*, 2008) ont étudié l'influence de la concentration en éthanol sur la production d'histamine. En présence de 9% (v/v) d'éthanol, la croissance des bactéries ainsi que la synthèse d'histamine ne sont pas affectée. Pour une concentration de 11% (v/v), l'accumulation d'histamine est lente mais se poursuit pendant six jours après le début de la biosynthèse à partir d'histidine. La teneur en histamine peut donc être élevée même pendant la conservation et le vieillissement du vin, en accord avec les observations de Gerbaux *et al*. (1997). Alors qu'une concentration d'éthanol de 13% (v/v) induit une forte mortalité et donc l'absence d'histamine. Cependant la production est possible par les enzymes libérées dans le milieu extracellulaire. L'étude enzymatique de l'HDC de *O. oeni* montre une diminution de

l'activité pour une concentration en éthanol de 12 % (v/v) (Rollan *et al*, 1995). Arena & Manca de Nadra (2005) remarquent aussi que bien que la concentration en éthanol affecte la croissance microbienne, les réactions métaboliques conduisant à la production d'amines biogènes ne sont pas inhibées. En effet, *L. hilgardii* et *O. oeni* sont capables de métaboliser la citrulline en présence d'éthanol. En milieu vin, et pour une concentration en éthanol de 10% (v/v), la survie de *E. faecium* OT23, productrice de tyramine, n'est pas affectée les trente premiers jours. Un déclin de la viabilité est observé à 12% d'éthanol (Capozzi *et al*, 2011). Le développement bactérien est aussi fortement lié au pH. Cette souche résiste moins bien l'alcool à pH 3,80 qu'à pH 3,96. Ainsi, comme dans le cas des pH trop faibles, des concentrations extrêmes en éthanol altèrent la croissance des microorganismes, et indirectement la formation d'amines biogènes.

B. Les composés phénoliques du vin

Les composés phénoliques du vin inhibent la production de putrescine à partir d'agmatine chez *L. hilgardii* (Alberto *et al*, 2007). Les auteurs suggèrent que l'acide protocatéchique pourrait interférer dans la conversion du *N*-carbamoylputrescine en putrescine.

C. Les conditions environnementales et les pratiques œnologiques

Outre les facteurs biologiques et physico-chimiques, les conditions environnementales et certaines pratiques œnologiques peuvent modifier le contenu en amines biogènes des vins. Ainsi les conditions de culture, le climat, les nutriments du sol et l'autolyse des levures lors du vieillissement du vin sur lies sont autant d'agents à prendre en compte (Bover-Cid *et al*, 2006). Certains facteurs jouent un rôle mineur sur la teneur en amines biogènes du vin. En effet l'ajout d'activateurs de fermentation alcoolique ou malolactique (Marques *et al*, 2008), le stress hydrique (Bover-Cid *et al*, 2006) ou le stockage des bouteilles à différentes températures (Gonzalez Marco & Ancin Azpilicueta, 2006) ne semblent pas avoir d'incidence sur l'évolution de la concentration en amines biogènes. La température a pourtant un effet marqué sur le contenu en amines biogènes des poissons et fromages. Et certains auteurs ont montré que la concentration en amines biogènes augmentait avec la température et le temps de stockage (Klausen & Lund, 1986; Diaz-Cinco *et al*, 1992). Ainsi, contrairement aux autres aliments, la température n'est pas un facteur déterminant influençant le taux d'amines

biogènes dans le vin. Par contre le cépage peut influer sur la présence d'amines biogènes (Del Prete *et al*, 2009). C'est le cas du Pinot Noir, pour les vins rouges, et du Chardonnay, concernant les vins blancs, qui présentent un taux plus élevé en amines biogènes par rapport aux autres cépages (Soleas *et al*, 1999). Concernant les vins rouges, l'ajout du vin de presse, longtemps en contact avec le marc, au jus de goutte, augmente le taux d'amines biogènes (Garcia-Marino *et al*, 2010). De plus, d'après une étude récente sur les pratiques œnologiques, les vins dont la fermentation malolactique s'est déroulée naturellement, et qui ont été faiblement sulfités, présentent un taux d'amines biogènes plus élevé que les vins ensemencés ou fortement sulfités (Garcia-Marino *et al*, 2010). Comme les levures produisent également des amines biogènes dont notamment la spermidine (Manfroi *et al*, 2009), le taux final en amines biogènes d'un vin dépendra donc aussi de la levure utilisée pour la fermentation alcoolique (Rosi *et al*, 2008). Mais ce qui influence de manière certaine la production d'amines biogènes est la présence de lies. L'autolyse des levures permet la libération de composés azotés tels que les acides aminés, les protéines et peptides (Charpentier & Feuillat, 1993; Alcaide-Hidalgo *et al*, 2007). Ainsi davantage d'amines biogènes sont produites dues à l'enrichissement en précurseurs (Marques *et al*, 2008). Il en est de même pour l'addition de mannoprotéines de levures dans les vins qui augmentent la concentration en composés azotés (Garcia-Marino *et al*, 2010).

XI. Localisation et organisation génétiques des clusters

Les clusters génétiques impliqués dans la biosynthèse d'amines biogènes comportent a minima un gène codant la décarboxylase et un gène codant le transporteur. Certains loci comportent également des gènes aux fonctions annexes impliqués, entres autres, dans la régulation de l'expression du cluster. Ils sont généralement portés par des éléments génétiques mobiles relativement instables, ce qui explique que le caractère « producteur d'amines biogènes » varie selon les souches. De plus, le fort pourcentage d'identité inter-espèce de ces gènes traduit l'acquisition de ce caractère par transfert horizontal (Fernandez & Zuniga, 2006). Le transfert horizontal de gènes correspond à l'acquisition par un organisme de matériel génétique provenant d'un autre organisme sans parenté. Par opposition, le transfert vertical de gènes correspond au transfert de matériel génétique par descendance.

A. Le cluster de l'histidine décarboxylase

Les clusters *hdc* sont soit portés sur des plasmides, soit localisés au niveau chromosomique. Ainsi chez une souche de *Lactobacillus hilgardii* isolée du vin, Lucas *et al*, (2005) ont montré que l'histidine décarboxylase (*hdcA*) ainsi que le transporteur (*hdcP*) sont portés sur un plasmide instable de 80 kb. Une organisation similaire a été décrite chez *Tetragenococcus halophilus* isolé d'une sauce de poisson pour lequel Satomi *et al*, (2008) ont décrit la présence d'un plasmide de 30 kb portant le cluster *hdc*.

La stabilité du plasmide dépend des conditions de culture. Le plasmide est rapidement curé en conditions optimales de croissance (par exemple en milieu riche décrit par Bover-Cid & Holzapfel, 1999, pH 5,3). Tandis que la croissance des bactéries productrices en milieu pauvre à pH 4,8 et en présence de précurseur (histidine) permet de maintenir le phénotype. Néanmoins, pour certains genres bactériens, comme *Staphylococcus*, ainsi que chez *S. thermophilus* ces gènes sont chromosomiques (Calles-Enriquez *et al*, 2010).

Le locus *hdc* comprend trois à quatre gènes selon les espèces. Ces gènes codent une perméase HdcP qui permet l'entrée de l'histidine et l'export de l'histamine, une décarboxylase HdcA, HdcB impliquée dans la maturation de HdcA et HisRS une histidyl-tRNA synthétase qui aurait un rôle probable dans la régulation (Martin *et al*, 2005) chez *L. buchneri*. Très conservée, la protéine HdcB a été récemment caractérisée. Elle intervient dans le clivage de la proenzyme HdcA et la formation du groupe prosthétique pyruvoyl chez *S. thermophilus* (Trip *et al*, 2011).

Comment s'organise génétiquement le cluster *hdc* des bactéries à Gram positif (Figure 7)?

Chez les Lactobacilles dont *L. hilgardii* (Lucas *et al*, 2005), *L. buchneri* (Martin et al, 2005), *L. reuteri*, *L. saerimneri* et *Lactobacillus* 30a (Vanderslice *et al*, 1986), ainsi que chez *Tetragenococcus muriaticus* (Konagaya *et al*, 2002), *Tetragenococcus halophilus* (Satomi *et al*, 2008) et *O. oeni* (Coton *et al*, 1998), le gène *hdcA* est toujours en amont de *hdcB*. Pour quelques souches, *hdcP* est localisé en amont de *hdcA* et *hdcB*, tandis que *hisRS* est située en aval de ces deux gènes.

Alors que pour *Staphylococcus capitis* (De Las Rivas *et al*, 2008), *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus thermophilus* et *Clostridium perfringens* (van Poelje & Snell, 1990), *hdcA* est en amont de *hdcP*.

La séquence ADN en amont du cluster *hdc* de *S. thermophilus* est homologue à la séquence d'un plasmide impliqué dans la résistance aux phages. De plus, ce gène noté *hdsR* est flanqué de transposases qui sont associées au transfert horizontal de gènes entre souches chez *S. thermophilus* (Calles-Enriquez *et al*, 2010).

Des études transcriptomiques indiquent que *hdcA* et *hdcB* sont co-transcrits chez *Lactobacillus* 30a (Copeland *et al*, 1989) et *L. buchneri* (Martin *et al*, 2005). *hisRS* peut être transcrit seul ou en association avec *hdcA* et *hdcB* (Martin *et al*, 2005). Tandis que le transporteur est toujours monocistronique (Martin *et al*, 2005). Chez *S. thermophilus*, le gène *hdcA* est transcrit seul ou co-transcrit avec *hdcP* et *hdcB* (Calles-Enriquez *et al*, 2010).

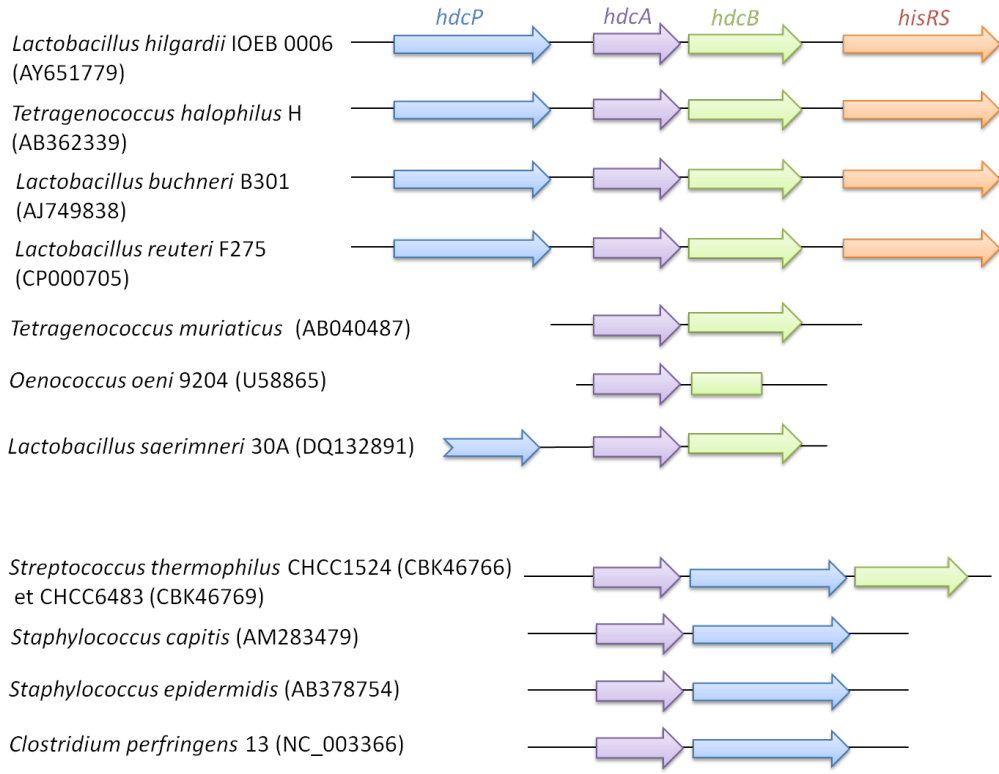


Figure 7. Organisation des clusters *hdc* chez diverses bactéries à Gram postif (d'après Satomi *et al*, 2008 et Calles-Enriquez *et al*, 2010).

B. Le cluster de l'ornithine décarboxylase

Le gène codant l'ornithine décarboxylase de *O. oeni* est localisé au niveau chromosomique et associé en opéron avec le gène *potE* qui code pour le transporteur (Marcobal *et al*, 2006). La présence de part et d'autre de ce locus de gènes codant des

transposases et des protéines phagiques indique que ce locus fait parti d'un îlot génétique (Genetic Island, GI) et que l'acquisition de cette région s'effectue par transfert horizontal.

Comment est régulée l'ornithine décarboxylase ?

Chez les Eucaryotes, les polyamines stimulent la synthèse des acides nucléiques et des protéines (Tabor & Tabor, 1985 ; Soksawatmaekhin et al, 2004). Plus particulièrement l'ornithine décarboxylase exerce une fonction clé dans la formation des polyamines chez les mammifères. La synthèse de cette enzyme est régulée par une antizyme, une protéine spécialisée dans la dégradation. L'antizyme se lie à la forme monomérique de l'ODC en créant un complexe ODC-antizyme. Cette liaison induit un changement de conformation de l'ODC en exposant la région C-terminale qui est reconnue par le protéasome 26S. L'ODC est dégradée en peptides par le protéasome, tandis que l'antizyme est libérée et recyclée pour déstabiliser d'autres enzymes (Hayashi *et al*, 1996). Chez les bactéries, un mécanisme homologue a été caractérisé chez *Selenomonas ruminantium*, une bactérie à Gram négatif strictement anaérobie. Une protéine ribosomale, nommée P22 et appartenant à la sous unité ribosomale 50S de la super famille L10, peut dégrader la lysine décarboxylase qui décarboxyle la L-ornithine ainsi que la L-lysine (Yamaguchi *et al*, 2006). Par homologie de séquence, une protéine présentant 33% d'identité avec la protéine P22 de *S. ruminantium*, a été localisée dans le génome de *O. oeni* PSU-1 et *O. oeni* AWRIB429.

C. Le cluster de la tyrosine décarboxylase

Le gène *tyrDC* codant la tyrosine décarboxylase est localisé au niveau chromosomique chez la plupart des bactéries lactiques, et notamment chez *Enterococcus faecalis* (Connil *et al*, 2002) et *E. faecium* (Pereira *et al*, 2009), *Lactobacillus brevis* (Lucas *et al*, 2003), *Lactococcus lactis* (Fernandez *et al*, 2004) et *Enterococcus hirae* (Coton *et al*, 2004). Récemment une souche de *E. faecium* productrice de tyramine a été isolée de vin rouge et testée lors d'essais en vin (Capozzi *et al*, 2011). L'opéron impliqué dans la production de tyramine est constitué de quatre gènes codant (Figure 8): une tyrosyl-tRNA synthétase *tyrS*, une décarboxylase TyrDC, une tyrosine perméase TyrP (Wolken *et al*, 2006) et, un antiport Na^+/H^+, *nhaC*. Une telle organisation avait précédemment été vérifiée pour *Enterococcus faecalis* (Connil *et al*, 2002) et *L. brevis* (Lucas *et al*, 2003). Coton E. & Coton M. (2008) ont montré une variabilité intersouches de la présence de cet opéron chez *L. brevis*, et chez certaines souches, ils ont identifié un gène de mobilité (*tra*), situé en aval de l'opéron. De

plus, le faible pourcentage en bases C et G de cette région génétique, comparé au pourcentage du chromosome de *L. brevis*, tend à montrer que les gènes de la voie TyrDC font partie d'un îlot génétique acquis par transfert horizontal. Récemment, l'opéron comprenant les quatre gènes de cette voie a été identifié chez une autre espèce : *Sporolactobacillus* sp. P3J isolé du moût de cidre (Coton *et al,* 2011). Cet opéron est flanqué de gènes possédant une forte identité avec des éléments mobiles : un gène codant une protéine de phage est situé en amont et un gène codant une transposase est localisé en aval de l'opéron. Isolée de la bière, la bactérie d'altération *Pediococcus* spp., produit de la tyramine selon les conditions de culture. Une culture prolongée de souches de *Pediococcus* spp., ou le transfert direct de ces microorganismes de la bière vers le milieu de culture synthétique, provoque la perte de la capacité à produire de la tyramine (Izquierdo-Pulido *et al*, 1997). Ces données renforcent l'idée que les gènes responsables de la production de tyramine sont portés sur un élément génétique mobile.

Chez *L. brevis* ATCC 367 et *Sporolactobacillus* sp. P3J, l'analyse des ARN révèle que les messagers *tyrS* et *nhaC* sont monocistroniques, alors que pour *tdc* et *tyrP*, le transcrit est polycistronique. Les transcrits contenant *tdc* et *tyrP* correspondent aux ARNm les plus abondants. Néanmoins, *tyrS, tyrDC, tyrP* et *nhaC* peuvent être co-trancrits chez *L. brevis* IOEB 9809 (Lucas *et al*, 2003) ; et des messagers contenant *tyrS* et *tyrDC* ou *tyrP* et *nhaC* ont également été détectés. Enfin *tyrDC* est co-transcrit avec le gène en amont (*tyrS*) et le gène en aval (*tyrP*) chez *E. faecalis* (Connil *et al*, 2002).

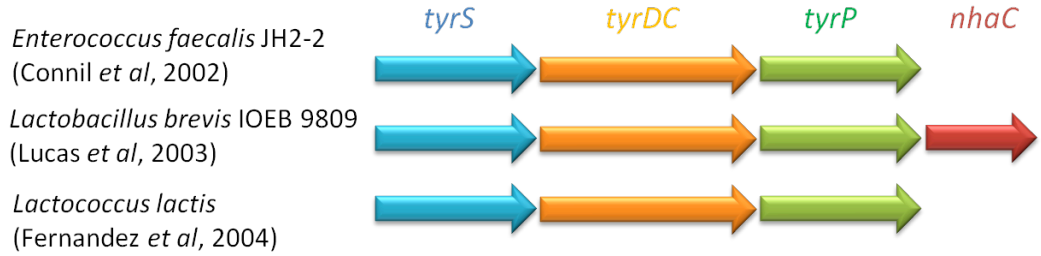


Figure 8. Organisation génétique des clusters *tdc* de trois genres de bactéries à Gram positif (une espèce par genre est représentée).

D. Le cluster de l'agmatine déiminase

La conversion de l'agmatine en putrescine a été initialement étudiée chez deux bactéries lactiques : *Enterococcus faecalis* ATCC 11700 (Driessen *et al*, 1988) et

Streptococcus mutans UA159 (Griswold *et al*, 2004). Depuis, la voie AgDI a été caractérisée chez d'autres espèces appartenant aux genres : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* et *Listeria* (Lucas *et al*, 2007). Ces bactéries lactiques contiennent un ensemble similaire de gènes codant entre autres des protéines impliquées dans la déamination de l'agmatine, le transport agmatine/putrescine et la régulation transcriptionnelle du locus. On distingue néanmoins deux groupes. En effet, le génome de *S. mutans*, *E. faecalis* et *L. lactis* ne comporte qu'un gène codant l'agmatine déiminase et un gène codant un régulateur de la famille LysR, localisé en aval et transcrit séparément (Griswold *et al*, 2006). Alors que les génomes de *L. brevis* IOEB 9809, *L. brevis* ATCC 367, *L. sakei*, *L. hilgardii*, *L. monocytogenes* et *P. pentosaceus* contiennent deux gènes codant AgDI et un régulateur transcriptionnel de la famille RpiR qui est localisé en amont du cluster et dans la même direction que les autres gènes de la voie. Chez *L. brevis* IOEB 9809, Lucas *et al*, (2007), ont mis en évidence la présence d'une copie du gène *agDI* codant une enzyme non fonctionnelle et dont le rôle reste à élucider.

Généralement le cluster se compose de gènes codant : la putrescine carbamoyltransférase qui convertit la N-carbamoylputrescine en putrescine, la perméase permettant l'échange agmatine/ putrescine, l'agmatine déiminase, la carbamate kinase qui transforme le carbamoyl phosphate en CO_2, ATP et ammonium, parfois une seconde agmatine déiminase putative et enfin un régulateur transcriptionnel (Figure 9).

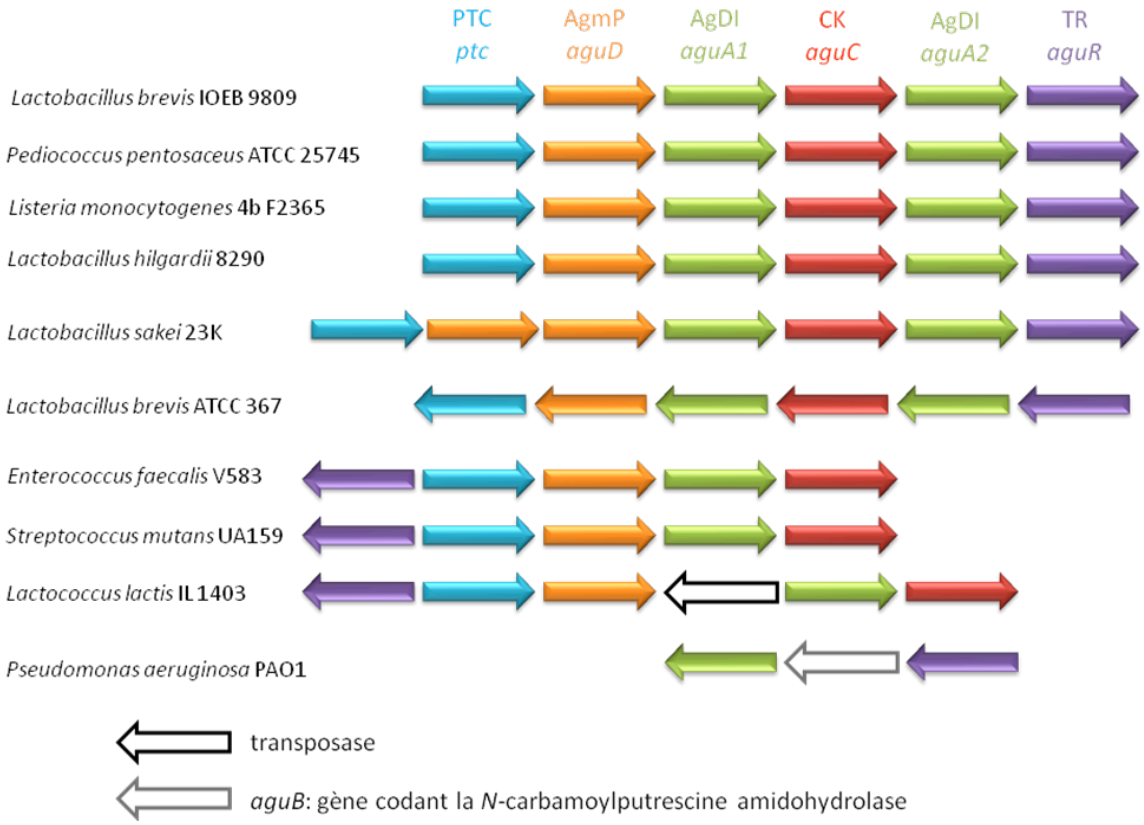


Figure 9. Alignement des clusters *AgDI* de différentes bactéries (d'après Lucas *et al*, 2007 et Landete *et al*, 2010).

Récemment, Landete *et al*, 2010, ont montré l'existence de deux familles d'enzymes impliquées dans la synthèse de putrescine *via* l'agmatine et des différences importantes dans l'organisation des clusters AgDI ainsi que des gènes présents dans différentes bactéries. Le gène *ptcA* codant la putrescine carbamoyltransférase est présent chez les bactéries à Gram positif (*Lactobacillus hilgardii* X_1B, *Enterococcus faecalis* ATCC 11700, *Bacillus cereus* ATCC 14579) alors que le gène *aguB* codant la *N*-carbamoylputrescine amidohydrolase est retrouvé chez les bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1), même si ces deux gènes ont la même fonction de convertion du *N*- carbamoylputrescine en putrescine. Landete *et al,* (2010) affirment que ces deux gènes *ptcA* et *aguB* ne sont pas homologues. De plus, le régulateur transcriptonnel de *P. aeruginosa* appartient à une famille différente des deux familles de régulateurs précédemment citées. L'agmatine déiminase et la *N*-carbamoylputrescine amidohydrolase ont été caractérisées chez *P. aeruginosa* PAO1 (Nakada *et al*, 2003) et se présentent sous forme d'un homodimère pour AgDI avec une sous unité de 43 kDa, alors que la *N*-carbamoylputrescine amidohydrolase est un homohexamère de 33 kDa par sous unité.

Le cluster *agDI* de *L. brevis* IOEB 9809 a la particularité de faire partie du même locus que la voie TyrDC. Le locus contenant les gènes de la voie TyrDC et AgDI a été retrouvé dans six espèces de lactobacilles ainsi que chez *Pediococcus parvulus*, ce qui permet de penser que les gènes de la voie AgDI sont également transférés horizontalement et font partie du même îlot génétique que les gènes de la voie TyrDC.

Chez *L. brevis* ATCC 367 (Makarova *et al*, 2006), les gènes impliqués dans la fermentation malolactique font eux aussi partie du locus. Il est donc possible que ces trois clusters localisés sur une même région chromosomique fassent partie d'un îlot génétique. Le regroupement génétique de ces trois voies cataboliques impliquées dans la résistance au stress acide et/ ou la génération d'énergie métabolique, procure de toute évidence un avantage aux bactéries lactiques.

XII. Structure biochimique des décarboxylases

A. L'histidine décarboxylase

Parmi les décarboxylases étudiées et impliquées dans la formation d'amines biogènes chez les bactéries lactiques, l'histidine décarboxylase est de loin l'enzyme la mieux caractérisée.

La décarboxylation de l'histidine est réalisée par deux types d'HDC utilisant différents groupes prosthétiques au sein de leur site catalytique. On distingue les histidines décarboxylases dépendantes du pyridoxal-5-phosphate chez les bactéries à Gram négatif et les mammifères (Wu *et al*, 2008), et les histidines décarboxylases fonctionnant avec un groupe pyruvoyl chez les bactéries à Gram positif (van Poelje & Snell, 1990). Les protéines HDC de *Lactobacillus* 30a (Parks *et al*, 1985), *L. buchneri* et *Clostridium perfringens* (Recsei *et al*, 1983), ainsi que *O. oeni* (Coton *et al*, 1998b) ont été purifiées. L'analyse cristallographique de ces dernières (Figure 10) révèlent qu'elles présentent toutes la même structure ce qui coincide avec le fort pourcentage d'identité des séquences peptidiques (Landete *et al*, 2008c). L'enzyme fonctionnelle est organisée en un hexamère constitué de six chaînes α et six chaînes β ($\alpha_6\beta_6$). Au préalable, une proenzyme inactive, appelée π_6, est synthétisée. Chaque chaîne π est clivée entre les sérines 81 et 82 avec une perte d'ammonium pour donner une sous unité α,

portant le groupe pyruvoyl en N-terminal, dérivé de la sérine 82, et une sous unité β. Le clivage de l'unité π est catalysé par HdcB (Trip *et al*, 2011).

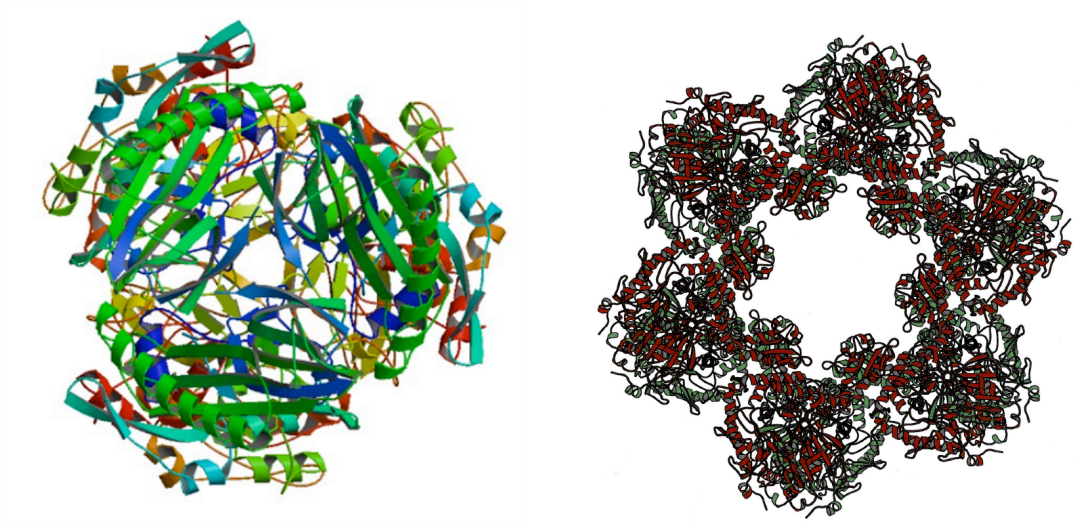


Figure 10. a) Structure cristallographique de l'histidine décarboxylase de *Lactobacillus* 30a à 3.0 Angstroms (Parks *et al*, 1985 ; Gallagher *et al*, 1989)). b) Structure cristallographique de l'ornithine décarboxylase de *Lactobacillus* 30a à une résolution de 3.0 Angstroms (Momany *et al*, 1995).

B. L'ornithine décarboxylase

L'ornithine décarboxylase est une enzyme appartenant à la super famille des Aspartate Aminotransférases (AAT). Une caractéristique de ces enzymes est qu'elle présente un site de liaison au cofacteur PLP. L'ODC est donc une enzyme PLP-dépendante. Tout comme pour l'histidine décarboxylase, la majorité des études sur l'ornithine décarboxylase ont été effectuées chez *Lactobacillus* 30a (Guirard & Snell, 1980). La structure cristallographique de cette enzyme a été réalisée (Momany *et al*, 1995) et révèle que l'enzyme est constituée de six dimères (Figure 10). L'enzyme active est sous forme d'un dodécamère de 10^6 Da. Chaque monomère se compose de cinq domaines :

- Le domaine N-terminal, également appelé « wing domain ». Les deux « wing domain » de chaque dimère se projettent au centre du dodécamère et contribuent à sa stabilisation.

- Le « linker domain » constitue le second domaine.

- Dans le domaine de liaison au cofacteur, le PLP est notamment covalement lié à la lysine 355 par une base de Schiff (Vitali *et al*, 1999).

- Le quatrième domaine ou « small domain » contient des sites spécifiques de liaison au substrat (la L-ornithine) comme l'acide glutamique 532 (Vitali *et al*, 1999).

- Le domaine C-terminal, organisé en hélices α forme un canal aboutissant au domaine de liaison au PLP.

C. La tyrosine décarboxylase

La tyrosine décarboxylase des bactéries lactiques, dont la première a été caractérisée chez *E. faecalis* (Connil *et al*, 2002), est une enzyme dépendante du PLP. Elle contient le motif consensus suivant: S-[LIVMFYW]-X(5)-K-[LIVMFYWGH]-[LIVMFYWG]-X(3)-[LIVMFYW]-X-[CA]-X(2)-[LIVMFYWQ]-X(2)-[RK] (http://www.expasy.ch/cgibin/nicedoc.pl?PDOC00329), et le motif HVDAAY conservé chez les enzymes de ce groupe (Figure 11). La TyrDC de *L. brevis* a aussi été purifiée et caractérisée (Moreno-arribas & Lonvaud-Funel, 1999, 2001 ; Lucas & Lonvaud-Funel, 2002). L'enzyme révèle une structure dimérique avec deux sous unités de 70 kDa, alors que chez *Streptococcus faecalis* leur taille est de 75 kDa (Borresen *et al*, 1989).

```
Cdiv508             ------------MESLSNELNLNALFIGDKAENGQLYKDLLNDLVDEHLGWRQNYMPQDM
LlactisIPLA655      ------------MESLSNDLNLNALLSGTKLRTAKSIKLVN-RFRGRPLGWRQNYMPQDM
EfaecJH2-2          ---------MKNEKLAKGEMNLNALFIGDKAENGQLYKDLLIDLVDEHLGWRQNYMPQDM
LbrevisIOEB9809     MLNLQEVSDMEKSNRSLKDLDLNALFIGDKAENGQLYKDLLNKLVDEHLGWRKNYIPSDP

Cdiv508             PVITPEEQISASFEHTVNKTKDVLSEISARMRTHSVPWHTAGRYWGHMNSETLMPSLLAY
LlactisIPLA655      PIITPEEKSSASFEHTVNRTKDVLSEISARMRTHSVPWHNAGRYWGHMNSETLMPSLLAY
EfaecJH2-2          PVISSQERTSESYEKTVNHMKDVLNEISSRMRTHSVPWHTAGRYWGHMNSETLMPSLLAY
LbrevisIOEB9809     NMIGPEDQNSPAFKKTVGHMKTVLDQLSERIRTESVPWHSAGRYWGHMNSETLMPALLAY

Cdiv508             NFAMLWNGNNVAYESSPATSQMEEEVGLEFAKLMGYKDGWGHIVADGSLANLEGLWYARN
LlactisIPLA655      NFAMLWNGNNVAYESSPATSQMEEEVGLEFAKLMSYKDGWGHIVADGSLANLEGLWYARN
EfaecJH2-2          NFAMLWNGNNVAYESSPATSQMEEEVGHEFAHLMSYKNGWGHIVADGSLANLEGLWYARN
LbrevisIOEB9809     NYAMLWNGNNVAYESSPATSQMEEEVGQEFARLMGYDYGWGHIVADGSLANLEGLWYARN

Cdiv508             IKSLPLAMKEVAPELVSGKSDWELMNMSTKEIMDLLDSVPEKIDDIKAHSARSGKHLQQL
LlactisIPLA655      IKSLPLAMQEVTPELVAGKSDWELMNMSTKEIMDLLDSVPDKIDDIKAHSARSGKNLQKL
EfaecJH2-2          IKSLPFAMKEVKPELVAGKSDWELLNMPTKEIMDLLESAEDEIDEIKAHSARSGKHLQAI
LbrevisIOEB9809     IKSLPFAMKEVNPELVAGKSDWELLNMPTKEIMDLLENAGSQIDEVKKRSARSGKNLQRL

Cdiv508             GKWLVPQTKHYSWLKAADIIGIGLDQVIPVPVDHNYRMDINELEKIVRQLAAEKTPILGV
LlactisIPLA655      GKWLVPQTKHYSWLKAADIIGVGLDQVIPVPVDHNYRMDINELEKIVRGLAAEKTPILGV
EfaecJH2-2          GKWLVPQTKHYSWLKAADIIGIGLDQVIPVPVDHNYRMDINELEKIVRGLAEEQIPVLGV
LbrevisIOEB9809     GKWLVPQTKHYSWMKAADIIGIGLDQVVPVPIDSNYRMDIQALESIIRKYAAEKTPILGV

Cdiv508             VGVVGSTEEGAIDGIDKIVALRRVLEKDGIYFYLHVDAAYGGYGRSIFLDEENNFIPFEE
LlactisIPLA655      VGVVGSTEEGAIDGIDKIVELRRVLEKDGIYFYLHVDAAYGGYGRAIFLDEDNNFIPFEE
EfaecJH2-2          VGVVGSTEEGAVDSIDKIIALRDELMKDGIYYYVHVDAAYGGYGRAIFLDEDNNFIPYED
LbrevisIOEB9809     VGVAGSTEEGAVDGIDKIVALRQKLQKEGIYFYLHVDAAYGGYARALFLDEDDQFIPYKN
                                                    motif HVDAAY
Cdiv508             LKDVHAKHHVFTENKNYILEDVHSAFKAIEEAESVTIDPHKMGYVPYSAGGIVIKDVRMR
LlactisIPLA655      LKDVHFKHNVFTENKNYILEEVHSAYKAIEEAESVTIDPHKMGYVPYSAGGIVIKDVRMR
EfaecJH2-2          LQDVHEEYGVFKEKKEHISREVYDAYKAIELAESVTIDPHKMGYIPYSAGGIVIQDIRMR
LbrevisIOEB9809     LQKVHAENHVFTEDKEYIKPEVYAAYKAFDQAESITIDPHKMGYVPYSAGGIVIQDIRMR
                                                    Site d'attachement du PLP
Cdiv508             DVISYFATYVFEKGADIPALLGAYILEGSKAGATAASVWAAHHVLPLNVTGYGKLMGASI
LlactisIPLA655      DVISYFATYVFEKGADIPALLGAYILEGSKAGATAASVWAAHHVLPLNVTGYGKLMGASI
EfaecJH2-2          DVISYFATYVFEKGADIPALLGAYILEGSKAGATAASVWAAHHVLPLNVAGYGKLIGASI
LbrevisIOEB9809     DTISYFATYVFEKGADIPALLGAYILEGSKAGATAASVWAAHHTLPLNVTGYGKLEGASI

Cdiv508             EGAHRFYNFLQDLSFKVGDKEIEVHPLTYPDFNMVDYVFKEKGNDDLVAMNKLNHDVYDY
LlactisIPLA655      EGAHRFYNFLNNLSFKVGDKEIEVHPLTYPDFNMVDYVFKEKGNDDLVAMNKLNHDVYDY
EfaecJH2-2          EGSHHFYNFLNDLTFKVGDKEIEVHTLTHPDFNMVDYVFKEKGNDDLVAMNKLNHDVYDY
LbrevisIOEB9809     EGAHRYYDFLKNLKFEVAGKRISVHPLISPDFNMVDYVLKEDGNDDLIEMNRLNHAFYEQ

Cdiv508             SSYVKGSIYGNEFLTSHTDFAIPDYGNSPLQFVNQLGFSDEEWNRAGKVTVLRASVMTPY
LlactisIPLA655      SSYVKGSIYGNEFLTSHTDFAIPDYGNSPLQFVNQLGFSDEEWNRAGKVTVLRASVMTPY
EfaecJH2-2          ASYVKGNIYNNEFITSHTDFAIPDYGNSPLKFVNSLGFSDEEWNRAGKVTVLRAAVMTPY
LbrevisIOEB9809     ASYVKGSLYGKEYIVSHTDFAIPDYGDSPLAFAESLGFSEVEWRHAGKVTIIRASVMTPY

Cdiv508             MNKAENFEEYAGKIKAALQEKLEKIYANQLLASEEK
LlactisIPLA655      MNKEEHFEEYAEKIKAALQEKLEKIYADQLLASEAK
EfaecJH2-2          MNDKEEFDVYAPKIQAALQEKLEQIYDVK-------
LbrevisIOEB9809     MNQRENFDYFAPRIKKAIQADLEKVYASVNQKENV-
```

Figure 11. Alignement des séquences protéiques de la tyrosine décarboxylase de *Carnobacterium divergens* 508, *Lactococcus lactis* IPLA 655, *Enterococcus faecalis* JH2-2 et *Lactobacillus brevis* IOEB 9809.

XIII. Moyens de maîtrise des amines biogènes

Afin de parer la formation d'amines biogènes dans les aliments fermentés, quelques solutions sont proposées. Des bactéries sélectionnées ou des microorganismes dégradant les amines biogènes ainsi que certains composés actifs sont employés pour réduire le risque lié aux amines biogènes.

A. Utilisation de ferments

Afin de maîtriser les conditions de fermentation et d'éliminer les dérives organoleptiques ainsi que la formation de composés indésirables, les produits fermentés peuvent être ensemencés avec des bactéries préalablement sélectionnées et testées. Ainsi pour le fromage, des ferments comme *Lactobacillus plantarum* ou *Lactobacillus paracasei* (Nieto-Arribas *et al*, 2009) ont été choisis pour leurs caractéristiques technologiques et leur incapacité à produire des amines biogènes. Il en est de même pour d'autres matrices alimentaires comme le vin, pour lequelles des souches de *O. oeni* sont sélectionnées par typage génotypique (Solieri *et al*, 2010) pour produire des ferments malolactiques. Dans le contexte du projet européen BIAMFOOD une étude a pu être réalisée en collaboration avec les entreprises Boisset (Nuits Saint Georges) et Chr Hansen, afin d'analyser la production d'amines biogènes après fermentation malolactique par la flore indigène par rapport à la souche commerciale de *O. oeni* Viniflora oenos. D'après les trois essais réalisés, l'inoculation avec *O. oeni* Viniflora oenos permet effectivement de diminuer l'accumulation d'amines biogènes dans le vin de Pinot noir (Méroz, 2009 ; Chanoine, 2010 ; Préfontaine, 2011). Dans l'industrie carnée, les bactéries lactiques sont utilisées en tant que ferments et peuvent être co-inoculées avec des micrococci ou des staphylocoques à coagulase négative qui contribuent au développement de flaveurs particulières du à leurs activités protéolytiques et lipolytiques (Suzzi & Gardini, 2003).

B. Les bactéries dégradants les amines biogènes

Des bactéries sont utilisées afin de dégrader les amines biogènes. A titre d'exemple, *Staphylococcus xylosus* a la capacité de dégrader l'histamine et la tyramine dans des anchois fermentés (Mah & Hwang, 2009) et *Lactobacillus sakei* réduit l'accumulation d'amines

biogènes dans la charcuterie à condition que les mesures d'hygiène soient respectées (Bover-Cid *et al*, 2001). Une étude plus large menée par Leuschner *et al*, (1998) a testé différents micoorganismes pour leur capacité à dégrader l'histamine et la tyramine dans des produits alimentaires fermentés. Des bactéries lactiques mais également *Brevibacterium linens* et *Micrococcus* sp. sont de bons candidats. De plus, *Micrococcus varians* présente une activité tyramine oxydase. Lors de la fermentation d'une sauce de poissons, des bactéries ayant une activité amine oxydase (Figure 12) ont été utilisées. Après 120 jours de fermentation, *Staphylococcus carnosus* et *Bacillus amyloliquefaciens* ont réduit la quantité d'histamine de 27,7 % et 15,4 % respectivement, comparé à la condition témoin (Zaman *et al*, 2011). La sélection de nouveaux microorganismes est d'actualité pour la bioconservation des aliments et l'augmentation des qualités organoleptiques. Ainsi, une archée halophile, *Haloarcula marismortui*, dénuée d'activité protéolytique, a été utilisée pour diminuer le taux d'histamine dans la production d'anchois (Aponte *et al*, 2010). Une partie du projet européen BiamFood s'est également focalisée sur l'isolement et l'expérimentation de telles bactéries. Ainsi, l'Institut des Produits Laitiers d'Asturie (IPLA, CSIC) a pu mettre en évidence huit souches de *Lactobacillus casei*/ *paracasei* pour la dégradation d'amines biogènes dans le fromage. Ces souches ont été co-inoculées avec des producteurs d'amines biogènes (*E. faecalis* tdc^+ $AgDI^+$, *E. durans* tdc^+ et *L. buchneri* hdc^+) et le suivi de la teneur en amines biogènes par HPLC et qPCR est en cours.

$$\mathbf{RCH_2NH_2 + O_2 + H_2O \rightarrow RCHO + NH_3 + H_2O_2}$$

Figure 12 : Première réaction de dégradation de l'histamine, la putrescine et la cadavérine par la diamine oxydase (Tabor, 1951).

C. Le sulfitage et les enzymes lytiques utilisées en vinification

Afin d'éliminer les levures et bactéries résiduelles et ainsi obtenir un produit microbiologiquement stable, le vin est sulfité après fermentation malolactique. Mais l'action du SO_2 est diminuée du fait du pH élevé et de la présence de polyphénols qui se combinent au dioxyde de soufre. D'autres moyens ont donc été développés pour contrôler la croissance microbienne. Le lysozyme, extraite du blanc d'œuf, posséde une activité lytique envers les bactéries à Gram positif essentiellement du fait de son action au niveau de peptidoglycane. Cette enzyme permet de contrôler l'activité bactérienne dans les vins à des concentrations de 250 à 500 $mg.L^{-1}$ (Gerbaux *et al*, 1997). Même si le lysozyme peut être inhibé par les

composés phénoliques du vin, son action combinée à celle du SO_2, réduit la quantité d'histamine (Lopez *et al*, 2009). Un cocktail d'enzymes lytiques isolées de *Streptomyces* sp. a également été proposé pour maîtriser le développement des bactéries lactiques dans le vin (Blattel *et al*, 2009).

Néanmoins tous les moyens mis en œuvre pour éliminer la production d'amines biogènes ou les bactéries lactiques productrices ne sont pas totalement efficaces. En effet, l'implantation des ferments commerciaux peut échouer. D'une part, dans l'industrie des produits carnés fermentés, les ferments ne sont parfois pas capables de limiter le développement des producteurs d'amines biogènes. Ceci dépend de la qualité hygiénique de la viande avant inoculation (Suzzi & Gardini, 2003). D'autre part, les ferments peuvent contenir des contaminants. C'est le cas en œnologie pour les préparations commerciales de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) dans lesquelles des lactobacilles producteurs de tyramine et d'histamine ont été retrouvés (Costantini *et al*, 2009). Dans cette étude, il a été montré que ces contaminants jouaient un rôle sur la teneur en tyramine des vins obtenus. Concernant la dégradation d'amines biogènes, la présence de micro-organismes dégradeurs est occasionnelle et leur conditions de croissance ne sont pas toujours optimales, car potentiellement différentes des conditions de développement des souches productrices. Quant au sulfitage et au lysozyme, ils limitent le développement microbien mais pas la synthèse d'amines biogènes.

Chapitre II : Les outils moléculaires pour l'analyse fonctionnelle de gènes

En 1996, Kammerer écrit : « Les organismes vivants dont l'analyse génétique est la plus approfondie sont les mieux connus et le plus aisément modifiables. L'analyse des mutants apporte des informations essentielles sur la fonction des gènes mutés, leur organisation, et leur régulation ». Or, chez certaines bactéries lactiques, et plus particulièrement chez *O. oeni*, il n'existe pas ou peu d'outils génétiques permettant une approche moléculaire pour comprendre le fonctionnement des gènes. De plus, *O. oeni* est particulièrement réfractaire à l'entrée d'ADN exogène. Ainsi, l'étude des gènes de cette bactérie s'est d'abord basée sur une analyse comparative de gènes existants chez d'autres microorganismes, et l'expression en système hétérologue. Puis, des techniques de transfert génétique ainsi que des vecteurs ont été développés.

I. Les méthodes de transfert génétique

Parmi les différents modes de transferts génétiques, on distingue les transferts naturels et les méthodes artificielles développées pour l'exploration fonctionnelle de gènes.

A. Les transferts naturels

1) La conjugaison

La conjugaison est un phénomène naturel de transfert d'ADN entre une souche « donneuse » et une bactérie « receveuse ». Chez *E. coli*, le contact entre les deux souches s'établit par la formation d'un *pilus*. Alors que chez les bactéries à Gram positif, la bactérie receveuse envoie un signal *via* une molécule appelée phéromone, pour déclencher le transfert. Puis, les phéromones activent les régulateurs Tra de la souche donatrice. Les gènes codants ces régulateurs sont chromosomiques ou portés par un vecteur mobilisable ou par un vecteur « helper ». Les protéines Tra forment alors un complexe, nommé relaxosome, qui intervient dans les processus de transfert de gènes. En fait, un seul brin du plasmide mobilisable est transféré. Il est coupé à partir d'une origine de transfert (*oriT*) par le relaxosome. Puis, l'ADN

simple brin est ligué et répliqué dans les deux bactéries (donneuse et receveuse) : le transfert est dit conservatif (Figure 13).

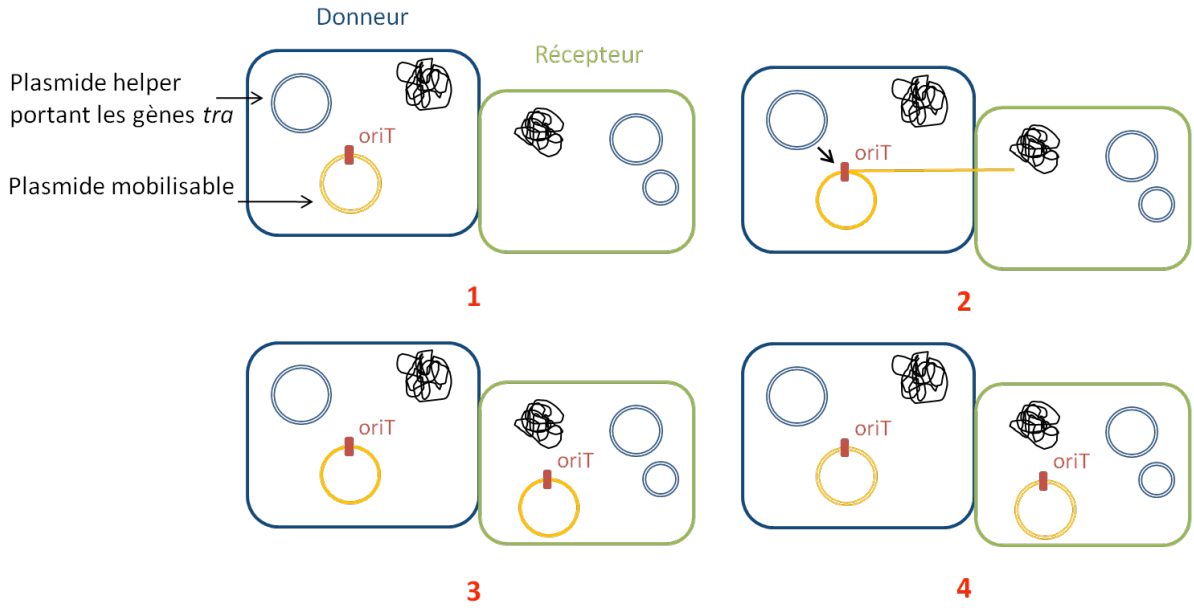


Figure 13. La conjugaison bactérienne. 1 : les souches donneuse et réceptrice se rapprochent pour le transfert génétique. 2 : les protéines Tra interviennent dans le clivage du plasmide mobilisable (ou conjugatif) au site oriT. L'ADN transféré est monocaténaire. 3 : après ligation des brins d'ADN, 4 : ils sont répliqués dans chacune des cellules.

2) La transformation

La transformation naturelle représente la capacité qu'ont certaines bactéries à intégrer dans leur génome de l'ADN exogène présent dans le milieu. Cela se produit lorsque les cellules sont dans un état physiologique particulier, appelé compétence. Cet état a été décrit chez *Streptococcus pneumoniae* (Lee *et al*, 1999), ou encore *Bacillus subtilis* (Dubnau, 1991). Il est sous contrôle d'un régulon de compétence (gènes *com*), composé de gènes précoces et tardifs. L'expression des gènes précoces dépend de la présence de ComE, alors que celle des gènes tardifs dépend de ComX. Récemment, cette compétence naturelle a été mise en évidence chez *Streptococcus thermophilus* (Gardan *et al*, 2009). Chez cette bactérie, un système de transport d'oligopeptides nommé Ami, contrôle le déclenchement de l'état de compétence à travers le contrôle de la transcription de *comX*, codant un facteur sigma. Son expression varie suivant le milieu de culture utilisé (son expression diminue en milieu riche

M17) et la phase de croissance. Un meilleur taux de transformation est obtenu lorsque les cellules sont récoltées au début de la phase exponentielle. Il en est de même chez *Leuconostoc carnosum* (Helmark *et al*, 2004), uniquement compétent lors de la phase exponentielle précoce. Ainsi, le moment de la phase de croissance où sont récoltées les cellules, est un paramètre important qui influence l'efficacité de transformation. La compétence naturelle des bactéries indique que du matériel génétique peut être transféré par transfert horizontal.

3) La transduction

Les bactériophages, qui infectent les bactéries, sont utilisés en tant que vecteurs de clonage pour l'insertion d'ADN. Cette application passe par un contrôle de l'état lysogénique du phage. En effet celui-ci peut infecter une cellule selon le cycle lytique ou lysogénique. Lors du cycle lytique, le phage ou son ADN, pénètre dans la bactérie et se réplique dans le cytoplasme à l'aide de la machinerie enzymatique de la cellule. Puis les nombreuses copies du phage sont libérées dans le milieu après lyse de la bactérie hôte. Dans le cas d'un cycle lysogénique, le génome phagique est intégré sous forme de prophage dans le génome bactérien. Il est alors répliqué et transmis aux cellules filles lors de la division cellulaire. Chez *O. oeni*, des bactériophages ont d'abord été mis en évidence après centrifugation des vins et observation en microscopie électronique (Ribéreau-Gayon *et al*, 1998). Arendt *et al* (1991) ont étudié la lysogénie chez *O. oeni*, et révèlent que 60% des souches examinées contiennent un prophage. De plus, chez *O. oeni* PSU-1, l'analyse de lysogènes, induit à la mitomycine C, montre que l'ADN du phage s'intègre dans le chromosome de l'hôte bactérien en un ou deux sites (Santos *et al*, 1996).

B. Les transferts artificiels

1) L'électroporation

L'électroporation est une technique artificielle pour introduire de l'ADN dans un microorganisme. Cette méthode est privilégiée par rapport à la conjugaison, car moins fastidieuse. L'électroporation se définit par l'application brève d'un courant électrique qui déstabilise la membrane pour permettre l'entrée de macromolécules. L'instabilité des lipides membranaires, due à l'impulsion électrique, engendre la création de nanopores dans la membrane qui reste perméable pendant quelques millisecondes. Ce phénomène est bien sûr

réversible. De nombreux protocoles ont été décrits pour transformer les bactéries à Gram positif. Ils reposent sur une série de lavages, visant à éliminer les sels du milieu, ce qui a pour but de fragiliser l'enveloppe cellulaire, puis les cellules dites compétentes sont resuspendues dans un tampon d'électroporation et mises en contact avec l'ADN (un plasmide) avant d'être électroporées. Des agents tels que la glycine (Turgeon *et al*, 2006), la pénicilline (Wei *et al*, 1995), le lyzozyme ou la thréonine (Rodriguez *et al*, 2007) sont employés chez les bactéries à Gram positif pour fragiliser la paroi.

2) La chimiocompétence

Le traitement des cellules au chlorure de calcium, suivi d'un choc thermique, perméabilise la membrane et permet l'entrée d'ADN.

3) La biolistique

Le principe de la biolistique consiste à délivrer en force de l'ADN sur des cellules par propulsion. La force de propulsion est obtenue par explosion d'une poudre dans une balle, ou par décompression d'un gaz (l'hélium majoritairement utilisé). L'ADN à introduire est d'abord précipité sur des billes de tungstène ou d'or d'environ 1 µm de diamètre. Puis ces billes sont placées dans un canon à particules et projetées sur les cellules à transformer. Cette technique est utilisée pour le transfert direct de gènes dans des explants de plantes, ou dans des tissus animaux *in vivo*. Cette méthode apparaît dans la littérature sous les noms : « the particle gun method », « the gene gun method », « the microprojectile method », « the particle acceleration method », « the bio-blaster method ». Le terme biolistique décrit à la fois le processus et les appareils associés utilisés pour cibler le matériel biologique vivant (Sanford, 1988).

II. Les outils génétiques pour l'exploration fonctionnelle de gènes

A. Les transposons

Les éléments génétiques mobiles jouent un rôle dans l'évolution et l'adaptation bactérienne. Ils sont souvent associés à des gènes conférant un avantage sélectif.

Les transposons sont des éléments d'ADN mobiles et participent à la plasticité du génome. Certains éléments transposables s'insèrent préférentiellement à un locus du génome, tandis que d'autres sont plus généralistes. Différentes catégories de transposons existent.

Les transposons les plus simples chez les bactéries sont les séquences d'insertion (IS). Elles sont composées uniquement d'un gène codant une transposase flanqué de part et d'autre d'une séquence inversée répétée (IR). La transposase est l'enzyme nécessaire à la transposition et a la capacité de reconnaître ces régions IR afin de mobiliser la séquence d'insertion.

Les transposons de taille plus grande comportent des gènes accessoires, notamment ceux conférant une résistance aux antibiotiques. Il existe plusieurs catégories : les transposons composites, les transposons simples et les transposons conjugatifs.

Un transposon composite se définit par un fragment d'ADN bordés par deux copies d'une même séquence d'insertion. La transposase, codée par l'un des deux IS, peut reconnaitre les extrémités IR flanquantes et ainsi mobiliser la région en entier lors d'une transposition. Des exemples de transposons composites sont les transposons : Tn*5*, Tn*9* et Tn*10* qui portent des gènes de résistance aux antibiotiques (Tremblay, 2007).

Les transposons simples sont délimités de part et d'autre par une séquence IR. Ils n'ont pas d'IS mais codent leur propre transposase qui reconnait les séquences IR. Ce type de transposon porte également un gène codant une résolvase qui induit la recombinaison. Tn*3* est la famille la mieux caractérisée des transposons simples (Tremblay, 2007).

Les transposons conjugatifs constituent une dernière famille de transposons et se propagent par conjugaison.

B. Les plasmides

1) Les vecteurs transférés chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif de nombreux transferts ont été réalisés avec des plasmides issus de la même famille. Il s'agit des vecteurs pAMβ1, pIP501 et son dérivé le pVA797. Ces plasmides font parti du groupe d'incompatibilité *inc18* (Brantl *et al*, 1990). Le pAMβ1 et le pIP501 sont des plasmides natifs isolés respectivement de *E. faecalis* et *Streptococcus agalactiae* (Clewell *et al*, 1974; Horodniceanu *et al*, 1976). Ces trois plasmides ont été transférés chez de nombreux genres de bactéries à Gram positif, comme par exemple:

Leuconostoc, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* (Gonzales & Kunka, 1983 ; Romero *et al*, 1987 ; Pucci *et al*, 1988 ; Shrago & Dobrogosk, 1988 ; Thompson & Collins, 1988 ; Langella *et al*, 1993 ; Langella *et al*, 1996 ; Charpentier *et al*, 1999).

2) Les vecteurs intégratifs

Ces outils ont été conçus pour la mutagénèse dirigée. Des exemples sont développés concernant les bactéries à Gram positif.

Un outil permettant de générer des mutations chromosomiques chez les bactéries à Gram positif, utilisant un vecteur nommé pORI, a été développé (Leenhouts *et al*, 1996). Ce plasmide est un vecteur à réplication conditionnelle contenant le gène *lacZ'* de *E. coli*, ce qui permet une sélection des plasmides recombinants selon le principe de l'α-complémentation. Cependant, ce plasmide ne contient pas le gène *repA* codant la protéine d'initiation de la réplication. Il ne peut donc pas se répliquer chez les bactéries à Gram positif à moins que *repA* soit portée en *trans*, comme chez *E. coli* EC101 (Law *et al*, 1995).

Chez la bactérie lactique modèle, *Lactococcus lactis*, Biswas *et al* (1993) ont développé un système d'intégration génomique par simple ou double crossing-over. Il s'agit d'un plasmide thermosensible nommé pG$^+$host5 qui se réplique *via* le mécanisme de cercle roulant. Ce mode de réplication favorise la recombinaison intramoléculaire du fait de la présence d'ADN simple brin. Ce plasmide contient une origine de réplication dérivée du pBR322 permettant sa réplication chez *E. coli*, et une origine de réplication thermosensible Ts pour le maintien du vecteur chez les bactéries à Gram positif. Il s'agit donc d'un vecteur navette à réplication conditionnelle (28°C) chez les bactéries à Gram positif. La stratégie générale pour une intégration par double crossing-over est décrite ci-dessous (Figure 14).

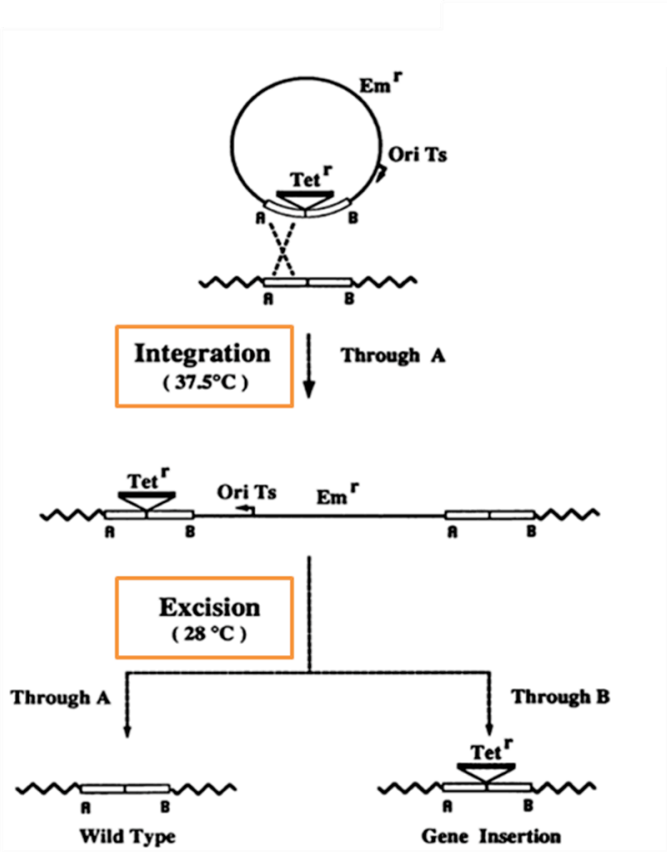


Figure 14. Stratégie générale d'intégration par double recombinaison homologue (Biswas et al, 1993). Dans une première étape à 37,5°C, le plasmide s'intègre par simple recombinaison homologue. Puis, un changement de température à 28°C, active la réplication du plasmide intégré (Ori Ts), stimulant un second évenement de recombinaison homologue.

Un premier évènement de recombinaison homologue a lieu à 37°C, permettant l'intégration du plasmide dans le chromosome à partir de la région A. Les souches ayant intégrées le plasmide sont sélectionnées par leur résistance à l'érythromycine. Une incubation à 28°C permet la réplication du plasmide intégré, qui porte une origine de réplication thermosensible. Un second évènement de recombinaison homologue s'effectue entre les régions A ou B, menant à l'excision du plasmide. Une recombinaison entre les régions A restaure le phénotype parental, alors qu'une excision à partir des régions B donne lieu à une mutation au niveau chromosomique avec insertion entre les régions A et B d'un gène de résistance à un antibiotique, dans ce cas la tétracycline.

Les simples et doubles recombinants sont résistants à la tétracycline. Cependant, les doubles recombinants sont également sensibles à l'érythromycine (Em^r, cassette de résistance portée par le plasmide), ce qui permet de les différencier des simples recombinants.

D'autres vecteurs basés sur la même stratégie de mutation ont été développés pour les bactéries à Gram positif qui ne sont pas transformables naturellement. Ainsi, le pMAD a été utilisé avec succès chez *S. aureus*, *L. monocytogenes* et *B. cereus* (Arnaud *et al*, 2004).

III. Transferts génétiques chez *O. oeni*

A. Les plasmides natifs de *O.oeni*

L'obtention de transformants ou de transconjugants est en partie dépendante des plasmides natifs de la souche réceptrice, car chaque plasmide appartient à un groupe d'incompatibilité. Or, deux plasmides du même groupe ne peuvent co-exister dans une cellule. La connaissance des plasmides natifs d'une bactérie est donc importante avant la transformation, afin d'éviter les transferts caduques. Cependant, ces plasmides cryptiques sont souvent instables et que les souches de laboratoire en sont généralement dénuées.

Brito *et al* (1999) se sont intéressés à l'ADN extrachromosomique de *O. oeni*. Sur trente souches, dix huit contenaient un large plasmide de 40 kpb et cinq autres souches contenaient de plus petits plasmides, de taille variant entre 2,5 et 4,5 kpb. L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE : pulsed-field gel electrophoresis) constitue une première approche pour l'étude de ces plasmides, permettant la résolution de grandes molécules d'ADN, d'identifier leur topologie et ainsi de confirmer leur nature plasmidique. Un grand plasmide, le pOg25 (37 kpb) a pu être isolé. L'étude révèle que les grands plasmides sont fréquents chez *O. oeni* mais difficiles à détecter et à extraire, car présents en faible nombre de copies. De plus, les auteurs supposent un curage rapide et spontané de ces éléments génétiques mobiles.

D'autres petits plasmides ont été décrits chez *O. oeni*, comme le pLo13 (Fremaux *et al*, 1993), le pOg32 (Brito et al, 1996) et le p4028 (Zuniga *et al*, 2006). De plus, une série de plasmide cryptiques nommés pRS1 (2523 pb), pRS2 (2544 pb) (Figure 15) et pRS3 (3948 pb) ont été séquencés (Alegre *et al*, 1998 ; Mesas *et al*, 2001). Ils se répliquent selon le mode en cercle roulant et sont constitués de trois ORF (ORF1, ORF2, ORF3). Les deux premières ORF (Open Reading Frame) codent respectivement une protéine intervenant dans la réplication (Rep) et dans la recombinaison (Pre). La troisième ORF code une protéine de

fonction inconnue. Cependant, l'ORF3 du plasmide pRS3 présente 48% de similarité avec une protéine de la réponse au stress thermique (heat shock protein, Hsp). Cette protéine pourrait être impliquée dans les mécanismes de résistance de la bactérie au stress. Etant donné que pRS2 et pRS3 ont été isolés d'une même souche, ils doivent appartenir à deux familles d'incompatibilités différentes. Mesas *et al* (2001) suggèrent alors de séparer les plasmides cryptiques en deux familles de part leurs ressemblances génétiques. On distingue alors : la famillle regroupant pOg32, pRS1 et pRS2 d'un côté et la famille composée de pLo13 et pRS3 de l'autre.

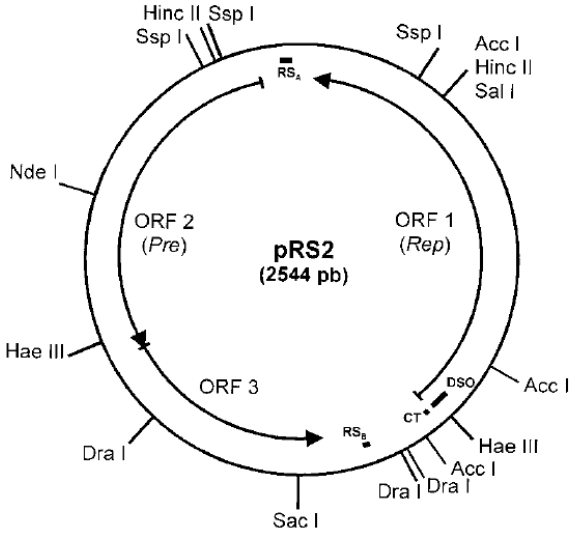


Figure 15. Carte du plasmide cryptique pRS2 de *O. oeni* (Mesas *et al*, 2001)

Les plasmides de *O. oeni* peuvent être facilement curés. En effet, une température subléthale combinée à un traitement à l'acriflavine ou l'acridine orange provoque la perte des plasmides pRS1, pRS2, pRS3 ou seulement de pRS3, qui se révèle être le plus sensible vis-à-vis des agents curatifs (Mesas *et al*, 2004). De même, pRS2 et pRS3 sont spontanément perdus après électroporation. Ceci suggère donc un moyen d'exploration de l'ADN extrachromosomique de *O. oeni*, les larges plasmides pouvant porter des informations génétiques importante. En effet, le cluster *hdc* est porté sur un large plasmide chez *L. hilgardii* (Lucas *et al*, 2005) et chez *Tetragenococcus halophilus* (Satomi *et al*, 2008).

B. Le pGID052 de *O. oeni*

Un vecteur d'expression appelé pGID052 a spécialement été conçu pour *O. oeni* (Oraby, 2002 ; Beltramo *et al*, 2004a). Il s'agit d'un vecteur navette Gram négatives/ Gram

positives de 5,7 kb. Il dérive du vecteur pGID701, non-réplicatif chez les bactéries à Gram positif. Le pGID701 provient lui-même du pORI19, dans lequel a été clonée l'origine de transfert du pIP501 (Oraby, 2002). Une région de 3,38 kpb isolée du vecteur pLC22r de *Leuconostoc citreum*, a ensuite été clonée dans le pGID701. Cette région contient les gènes *orfX*, *repB* et *repA*, nécessaire à la réplication chez les bactéries à Gram positif. Le pGID052 aurait une réplication en cercle roulant (rolling circle) chez *E. coli* et une réplication en mode thêta chez *O. oeni*. La réplication en cercle roulant est unidirectionnelle. Les deux brins nouvellement synthétisés sont répliqués de façon découplée avec la synthèse d'un brin retard. Alors que la réplication thêta peut être unidirectionnelle ou bidirectionnelle. La réplication des deux brins a lieu simultanément avec formation d'un « œil » de réplication observable en microscopie électronique. Les plasmides qui se répliquent suivant le mode thêta sont, en général, structuralement plus stables (Perez-Arellano *et al*, 2001). C'est pourquoi il est possible d'y insérer de larges fragments d'ADN. Les bactéries transformées par ce vecteur sont sélectionnées selon leur résistance à l'érythromycine et à la lincomycine (macrosalides-lincosamides- streptogramines B).

C. Transferts génétiques chez *O. oeni*

Des transposons ont été transférer de *E. faecalis* vers *O. oeni* par conjugaison (Zuniga *et al*, 1996). L'insertion de ces transposons nommés *Tn916* et *Tn925*, ont lieu en différents sites du chromosome. De plus, les conjugants *O. oeni* portant le *Tn916* ont été utilisés comme donneurs lors de conjugaison avec *L. lactis*. Chez *L. lactis*, l'insertion du transposon dans le chromosome est site-spécifique.

Zuniga *et al* (2003) ont utilisé la conjugaison pour transférer le plasmide pIP501 et son dérivé, le pVA797 de *L. lactis* vers *O. oeni*. Une fréquence de conjugaison entre 10^{-6} et 10^{-8} conjugants par cellule réceptrice a été obtenue. Cependant, l'étude de la stabilité des vecteurs après conjugaison révèle qu'ils sont instables chez *O. oeni*. Les plasmides pIlo1 et pIlo8, dérivés du pIP501, ainsi que le plasmide pVlo1, dérivé du pVA797, ont été isolés de *O. oeni* après conjugaison et sont de taille inférieure aux plasmides parents. En effet, des délétions importantes affectent la région *tra*, nécessaire au transfert, et la région *segB*, nécessaire à la stabilité des plasmides. Le nombre de copies plasmidiques a été mesurée et est de 3 chez *O. oeni* pour 16 chez *L. lactis*. Ceci pourrait expliquer les différences dans la stabilité ségrégationnelle des plasmides chez ces hôtes. L'instabilité ségrégationnelle se définit par

l'absence de réplication dans la cellule hôte. Autrement dit, si un plasmide est instable, la proportion de cellules recombinantes portant ce plasmide diminuera au cours des générations.

Au laboratoire, le pGID052 a été transféré chez *O. oeni* par conjugaison (Beltramo *et al*, 2004) en utilisant *L. lactis* comme souche donneuse et le vecteur helper pVA797 contenant les gènes de transfert *tra*. La présence d'une *oriT* permet de mobiliser le pGID052. Comparé aux pIP501 et au pVA797, ce plasmide s'avère stable chez *O. oeni*, ce qui constitue une étape majeure pour pouvoir exprimer des gènes chez cette bactérie.

Le pGID052 a également été utilisé en tant que vecteur d'expression (Assad-Garcia *et al*, 2008). Un gène, codant une protéine tronquée de *O. oeni* a été cloné dans le pGID052. Ce gène code la région amino-terminale de la ClpATPase ClpL2 de *O. oeni* (famille des HSP100). Le vecteur recombinant a été introduit chez *O. oeni* par électroporation. L'expression de ce gène, placé sous le contrôle de son propre promoteur, a été visualisée par immunodétection utilisant des anticorps dirigés contre ClpL2. Bien que l'on dispose d'un vecteur d'expression pour *O. oeni*, il est nécessaire de l'améliorer, notamment en lui attribuant des signaux de transcription optimaux.

coli	EC101	gène *repA* du pWV01 intégré au chromosome	Law *et al*, 1995
ubtilis	168	Néant	souche du laboratoire
oeni	ATCC BAA-1163	Néant	souche du laboratoire
oeni	BR14/97	productrice de putrescine et de cadavérine	Guerrini *et al*, 2002
ilgardii	0006	productrice d'histamine	Lucas *et al*, 2005

MATERIELS ET METHODES

Chapitre I : clonages et méthodes analytiques

I. Souches bactériennes utilisées et milieux de culture

E. coli et *B. subtilis* sont cultivés en milieu Luria Broth (LB) (Bertani, 1951) à 37°C sous agitation. Le milieu LB est composé de : 10 $g.L^{-1}$ de bacto-tryptone, 5 $g.L^{-1}$ d'extrait de levure et de 10 $g.L^{-1}$ de NaCl à pH 7.

O. oeni est cultivé en milieu FT80 (Cavin *et al*, 1989) dont la composition est la suivante : 5 $g.L^{-1}$ d'extrait de viande, 5 $g.L^{-1}$ d'extrait de levure, 5 $g.L^{-1}$ de glucose, 3,5 $g.L^{-1}$ de fructose, 10 $g.L^{-1}$ d'acide D,L-malique, 0,6 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4, 0,45 $g.L^{-1}$ KCl, 0,13 $g.L^{-1}$ $CaCl_2$, $2H_2O$, 3 $mg.L^{-1}$ MnSO4, H_2O, 0,13 $g.L^{-1}$ $MgSO_4$, $7H_2O$ et 1 $mL.L^{-1}$ de tween 80 ; ou en milieu LAC composé de 78 $mL.L^{-1}$ de jus de raisin blanc, 33 $g.L^{-1}$ d'extrait de levures, 0,6 $mL.L^{-1}$ de tween 80, 80 $mg.L^{-1}$ $MnSO_4$, H_2O à 28/30°C, en culture statique.

Lactobacillus hilgardii est cultivé en milieu CarrM (Lucas *et al*, 2005) composé de : 4 $g.L^{-1}$ de casamino acids, 3 $g.L^{-1}$ d'extrait de levures, 5 $g.L^{-1}$ de glucose , 10 $g.L^{-1}$ de D,L-malate, 0,44 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4, 0,34 $g.L^{-1}$ KCl, 0,1 $g.L^{-1}$ $CaCl_2$, 0,002 $g.L^{-1}$ $MnSO_4$, 0,1 $g.L^{-1}$ $MgSO_4$ et 2 $g.L^{-1}$ d'histidine à pH 4,8 pour maintenir une pression de sélection afin de ne pas perdre le plasmide pHDC (Lucas *et al*, 2005) contenant entre autres les gènes codant l'histidine décarboxylase et l'antiport histidine/histamine.

Tableau 4. Souches bactériennes utilisées.

II. Criblage des souches productrices d'amines biogènes

Afin de tester l'aptitude des souches à produire des amines biogènes, le milieu décrit par Bover-Cid & Holzapfel (1999) contenant un indicateur de pH, a été utilisé pour certaines bactéries lactiques (Figure 16).



Figure 16. *L. hilgardii* 0006 (Lucas *et al*, 2005) producteur d'histamine, dans le milieu de Bover-Cid & Holzapfel (1999) contenant du pourpre de bromocrésol comme indicateur coloré. A gauche: tube ensemencé avec *L. hilgardii* 0006 : le milieu vire au mauve du à l'activité décarboxylase qui induit une alcalinisation du pH. A droite : milieu avant ensemencement.

III. Extraction d'ADN

Ce protocole a été appliqué à *Lactobacillus hilgardii* 0006. La bactérie est ensemencée à DO_{600nm} = 0,05 dans 15 mL de milieu CarrM (composition décrite ci-dessus). Au bout de 24 h la culture atteint la phase exponentielle. Les cellules sont récoltées en phase exponentielle (DO_{600nm} = 1). Le culot cellulaire est ensuite lavé avec 500 µL du tampon contenant: 50 mM de Tris-HCl pH8, 50 mM de NaCl, 5 mM EDTA et 25% (p/v) de sucrose. Après une centrifugation de 5 min à 10000 g, le culot est resuspendu dans 200 µL du même tampon contenant 40 $mg.mL^{-1}$ de lysozyme. Après une incubation d'une heure à 37°C, 400 µL d'une solution fraîchement préparée de NaOH à 0,2 M à 1% SDS sont ajoutées. Puis, une seconde incubation d'une heure à 37°C est réalisée. La lyse est stoppée avec 300 µL d'une solution glacée d'acétate de potassium 3M, pH 4,8. Une centrifugation de 5 min à 8000 g est nécessaire pour enlever les débris cellulaires. Le surnageant est transvasé dans un tube propre et une extraction au phénol/ chloroforme est réalisée. 900 µL de phénol/chloroforme/IAA (alcool isoamylique) est ajouté, puis le mélange est vortexé et centrifugé à 4°C pendant 15 min à 15000 g. La phase aqueuse supérieure (environ 600 µL) où se trouve l'ADN est

prélevée délicatement (sans toucher les bords du tube), puis transvasée dans un nouveau tube. Pour éliminer les traces de phénol, deux lavages au chloroforme/IAA (alcool isoamylique) sont effectués volume à volume : autrement dit 600 µL de chloroforme/ IAA sont ajoutés aux 600 µL contenant l'ADN à extraire. La partie supérieure est prélevée et l'ADN est précipité avec 600 µL d'isopropanol froid. Après une centrifugation à 4°C de 20 min à 15000 g, le culot d'ADN est lavé à l'éthanol 70% (200 µL). Le culot est séché à l'air après une centrifugation de 10 min à 15000 g, toujours à 4°C. Enfin, l'ADN est repris dans 50 µL d'eau MilliQ stérile. La concentration d'ADN est déterminée par mesure de la DO à 260nm ($1UDO_{260nm} = 50\mu g.mL^{-1}$ ADN)

IV. Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR permet d'amplifier spécifiquement un fragment d'ADN situé entre deux amorces nucléotidiques, encore appelées oligonucléotides, composées d'une vingtaine de paires de bases. Afin d'optimiser la réaction de PCR, les amorces doivent être spécifiques de la région à amplifier. De plus, elles ne doivent pas s'hybrider entre elles ou sur elles mêmes et ne pas former de structure secondaire. Les amplifications sont réalisées à l'aide d'un thermocycleur (BioRad) et d'une enzyme thermostable, la *Taq* polymérase (Promega) ou une *Taq* haute fidélité (Roche) selon les instructions du fournisseur. La *Taq* haute fidélité est réservée à l'amplification des fragments d'ADN destinés à être séquencés ou à être cloné en vue d'une expression de gène *in vivo*.

A. Amplification avec la *Taq* Promega

Chaque réaction avec la *Taq* (Promega) est réalisée dans un volume final de 25 µL contenant l'ADN matrice (10-100 ng), les désoxyribonucléotides (200 µM de chaque dNTP), les deux amorces (1 µM de chaque), du $MgCl_2$ (1,5 mM) et la *Taq* polymérase (0,5 U). Le programme d'amplification comprend : une étape de dénaturation de 5 min à 94°C, suivie de 30 cycles de trois étapes : i) dénaturation de l'ADN pendant 30 s à 94°C, ii) hybridation pendant 50 s à une température de 5 °C inférieures à la température de fusion des amorces (Tm signifiant « temperature melting »), iii) élongation à 72°C. Le temps d'élongation dépend de la longueur du fragment à amplifier et de la *Taq* employée : pour la *Taq* Proméga une minute est nécessaire par kb amplifié, pour la *Taq* Roche 0,6 min/kb. Le cycle se termine par une élongation finale de 2 min à 72°C. Environ $1/10^{ème}$ des produits d'amplification, soit 5 à

10 µL de réaction PCR, sont analysés sur gel d'agarose à 0,9%. Pour un gel de 7 cm x 5 cm, 0,45 g d'agarose sont dissous dans 50 mL de tampon TAE (Tris-acetate-EDTA) 1X (par chauffage au micro-onde. Puis 1 µL de bromure d'éthydium (BET) (Biosolve) est ajouté avant prise en masse du gel. Les fragments d'ADN migrent à 100 V pendant 1 h. L'ADN étant un polyanion, il migre de la cathode (-) vers l'anode (+). Les produits PCR sont détectés sous UV grâce au BET (Bromure d'éthidium) et à l'aide d'un appareil Gel Doc (BioRad). Les produits d'amplification sont ensuite purifiés sur colonne grâce au kit GenElute PCR Clean-Up(Sigma) ou sur avec le kit GenElute Gel Extraction (Sigma) après avoir découpé sur le gel la bande désirée. Lors d'une extraction sur gel, le morceau de gel contenant l'ADN est excisé à l'aide d'un scalpel et placé dans un tube eppendorf de 2 mL. Les fragments sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Tableau 5. Récapitulatif du protocole pour la réalisation d'une PCR avec la *Taq* Promega. Les amorces (Eurogentec) sont initialement concentrées à 100 µM. Une dilution au cinquième est effectuée avant utilisation.

Constituants	Quantités pour un tube PCR
5X Green GoTaq Flexi Buffer (Promega)	5 µL
MgCl2 25 mM (Promega)	1,5 µL
dNTP Mix 10 mM (Fermentas)	0,5 µL
Amorce Forward 20 µM (Eurogentec)	1,25 µL
Amorce Reverse 20 µM (Eurogentec)	1,25 µL
GoTaq 5U/µL (Promega)	0,1 µL
ADN	10-100 ng
Eau MilliQ	qsp 25 µL

B. Amplification avec la *Taq* Haute Fidélité Roche

Cette enzyme permet d'amplifier des fragments d'ADN de grande taille (jusqu'à 5 kb). Elle possède une activité exonucléasique 3'- 5', appelée activité de correction.

Tableau 6. Protocole pour la réalisation d'une PCR avec la *Taq* Haute Fidélité Roche.

Constituants	Quantités pour un tube PCR
Expand High Fidelity Buffer (10X) with 15 mM MgCl2	5 µL
dNTP Mix 10 mM (Fermentas)	1 µL
Amorce Forward 20 µM (Eurogentec)	1 µL
Amorce Reverse 20 µM (Eurogentec)	1 µL
Expand High Fidelity Enzyme (100 U)	0,75 µL (2,6 U)
ADN	15 ng
Eau MilliQ	qsp 50 µL

Le programme de la réaction d'amplification est le suivant :

Dénaturation initiale : 94°C, 2 min (1X)

{ Dénaturation : 94°C, 15 s

{ Hybridation : 45 à 65°C, 30 s (dépend de la température de fusion des amorces)

{ Elongation : 68 ou 72°C, 45 s à 8 min (pour les fragments PCR jusqu'à 3 kb, la température d'élongation est de 72°C, pour les fragments de taille supérieure, la température est de 68°C). La durée d'élongation dépend de la taille du fragment (ex : 1 min pour 1,5 kb)

Elongation finale : 72°C, 7 min (1X)

Les étapes de dénaturation, d'hybridation et d'élongation sont d'abord répétées dix fois, puis les mêmes étapes sont répétées 20 fois en augmentant le temps d'élongation de 5 s pour chaque cycle successif.

V. Préparation de bactéries compétentes

A. *Escherichia coli* électrocompétentes

Cinq cent mL de milieu LB sont ensemencés à DO_{600nm}=0,05 et incubés à 37°C sous agitation. En phase exponentielle (DO_{600nm}=0,5), les cellules sont centrifugées 10 min à 5000 g et à 4°C puis lavées trois fois en eau stérile froide et enfin, en glycérol (10%). Les cellules sont ensuite resuspendues dans 2 mL de glycérol (10%) et stockées à -80°C en fractions aliquotes de 100 µL. Les cellules sont électroporées dans une cuvette Gene Pulser de 0,2 cm

(BioRad), à l'aide d'un électroporateur Gene Pulser Xcell BioRad selon les paramètres suivants : 2,5kV, 200Ω et 25µF. Après avoir administré la décharge électrique, 1mL de milieu LB est ajouté aux cellules puis la suspension cellulaire est incubée 1h à 37°C sous agitation avant d'être étalée sur milieu sélectif gélosé.

B. *Bacilus subtilis* compétentes

Dix mL de milieu LB sont ensemencés à DO_{600nm}= 0.2 et incubés à 37°C. A DO_{600nm}=1 ; 500 µL de pré-culture sont dilués dans 10 mL de MD medium composé de : 9,2 mL de MN1X (KH_2PO_4 44 mmol, K_2HPO_4 60 mmol et citrate trisodium 3,8 mmol), 0,4 mL de glucose 50%, 0,5 mg de L-tryptophane, 0,1 mg de citrate d'ammonium ferrique et 0,03 mmol de $MgSO_4$. Après 4H d'incubation à 37°C, la culture est centrifugée 10 min à 5000 rpm. 1,2 mL de surnageant est prélevé et mélangé à 0,3 mL de glycérol 85%. Le culot est resuspendu dans 1 mL de cette solution contenant le surnageant glycerolé, puis les cellules sont réparties en fractions aliquotes de 100 µL et congelées à -80°C.
Pour la transformation, les cellules sont resuspendues dans 900 µl de MD medium. Deux cent cinquante µL sont mise en présence d'ADN (1 µg) puis incubée à 37°C pendant 30 min. Après ajout de 100 µL de LB, une seconde incubation de 45 min à 37°C a lieu avant d'étaler 20 à 200 µL sur milieu sélectif gélosé.

C. *Oenococcus oeni* électrocompétentes

O. oeni est ensemencé en milieu FT80 ou en LAC à une DO_{600nm} = 0,025 à 0,05. Les cellules sont récoltées à DO_{600nm} =0,2, centrifugées et lavées trois fois en tampon contenant 0,5M de saccharose et 10% de glycérol à température ambiante. Le culot cellulaire est ensuite repris dans 100 µL de tampon d'électroporation à pH 6,5 (Variot, 2010), composé de 5 mM de KH_2PO_4, 0,2 mM de $MgCl_2$, 10% de glycérol et 15% d'éthanol absolu. Après ajout de 1µg d'ADN, les cellules sont électroporées selon les paramètres suivants : 2,4 kV, 200 Ω, 25 µF. Immédiatement après le choc électrique, 1 mL de milieu FT80 ou LAC contenant 0,5 M de saccharose est ajouté. Après 4 h d'incubation à 28°C, les cellules sont étalées sur milieu sélectifs gélosé (10 $\mu g.mL^{-1}$ d'érythromycine, 10 $\mu g.mL^{-1}$ de lincomycine et 10 $\mu g.mL^{-1}$ de vancomycine). Les transformants apparaissent après 10 jours d'incubation. Pour éviter les contaminations, notamment par les moisissures, du Delvocid (Humeau, France), composé de

50% d'acide lactique et de 50% de natamycine (un antifongique), peut être ajouté au milieu gélosé. Il est utilisé à une concentration finale de 50 $mg.L^{-1}$.

VI. Clonages

L'amplification des fragments ADN est réalisée avec la *Taq* polymérase haute fidélité (Roche). Les réactions de digestion par les enzymes de restriction (Invitrogen) ainsi que les ligations par la ligase T4 (Invitrogen) sont effectuées selon les recommandations du fournisseur. Les plasmides sont purifiés à l'aide du kit GenElute Plasmid Miniprep (Sigma).

La réaction de digestion comprend : 2 à 3 µg d'ADN plasmidique, 5 µL de tampon (Invitrogen, 10X), 2 µL d'enzyme de restriction (Invitrogen), qsp 50 µL d'eau MilliQ stérile. La réaction est incubée 2h à 37°C (ou 25°C pour l'enzyme SmaI). Les réactions de digestion sont purifiées avec le kit GenElute PCR Clean-Up (Sigma).

La ligation s'effectue d'après la recommendation des fournisseurs avec 3-30 fmol de plasmide et 9-90 fmol d'insert (trois fois plus d'insert que de plasmide), 4 µL de 5X tampon ligase (Invitrogen), 1 µL (0,1 U) de T4 DNA ligase, qsp 20 µL d'eau MilliQ stérile. La réaction est incubée 24h à 16°C.

Tableau 7. Séquences des oligonucléotides utilisés au cours de ce travail.

Nom	séquence	Site de restriction créé	Fonction	Localisation
hdcA5'-2	TCC**CCCGGG**AATTCATTACCAATAACTACAAATCAT	SmaI	clonage *hdcA -hdcB* de *L. hilgardii* 0006 dans le pGID052 chez E. coli EC101	pHDC *L. hilgardii* 0006
hdcB3'-2	ACGC**GAGCTC**AACAATTCTCCCTTTCTATAATAAAAG	SacI		pHDC *L. hilgardii* 0006
A3'	CGTCAT**GGTACC**CACAACAGT	KpnI	clonage *hdcP-hdcA-hdcB* de *L. hilgardii* 0006 dans le pGID052 chez E. coli EC101, clonage en 2 parties.	pHDC *L. hilgardii* 0006
A5'	AAGGC**GTCGAC**GACAGTAACCCTGCT	SalI		pHDC *L. hilgardii* 0006
B3'	AAGGC**GAGCTC**AACAATTCTCCCTTTCT	SacI		pHDC *L. hilgardii* 0006
B5'	GTTGTG**GGTACC**ATGACGGT	KpnI		pHDC *L. hilgardii* 0006
ODC1	AAG GC**GGATCC**AATAAGAGTTTACATTGGGGAA	BamHI	clonage *odc-potE* de *O. oeni* BR14/97 dans le pGID052 chez *E. coli* EC101, clonage en 2 parties.	*odc* de *O. oeni* BR14/97
ODC2	AAGGC**GAGCTC**CGTGATGACCGTAAGCTCAA	SacI		*potE* de *O. oeni* BR14/97
ODC3	TGAGTTT**CTGCAG**GTGTCATT	PstI		*odc* de *O. oeni* BR14/97
POTE1	AATGACAC**CTGCAG**AAACTCA	PstI		*odc* de *O. oeni* BR14/97
POTE2	AAGGC**GAGCTC**AACACCATTTGACAAACTTCCA	SacI		*potE* de *O. oeni* BR14/97
hdcP5'	AAGGC**GTCGAC**ATCAGCGCTCCCGGCAT	SalI	clonage région promotrice *hdcP* de *L. hilgardii* 0006	pHDC *L. hilgardii* 0006
hdcP3'	ATAAATA**AATATT**CAGTAATGTCAC	SspI		pHDC *L. hilgardii* 0006
phdcAB5'	ATA**GAATTC**AATTCATTACCAATAACTACAAATC	EcoRI	clonage région promotrice *hdcAB* de *L. hilgardii* 0006	pHDC *L. hilgardii* 0006
phdcAB3Bis	GG**GGATCC**AATTGTTACCTCCATTTTGAAAAA	BamHI		pHDC *L. hilgardii* 0006
hisRSBam	AAGGC**GGATCC**TTTATTATAGAAAGGG	BamHI	clonage *hisRS* de *L. hilgardii* 0006 dans le pXT chez *B. subtilis* 168c	pHDC *L. hilgardii* 0006
hisRSEco	AAGGC**GAATTC**GGTTGAATAGATTAGC	EcoRI		pHDC *L. hilgardii* 0006
hisRSHind1	ATGATCTA**AAGCTT**ACAGTCAAC	HindIII		pHDC *L. hilgardii* 0006
hisRSHind2	GTTGACTGT**AAGCTT**TAGATCAT	HindIII		pHDC *L. hilgardii* 0006
ODCoeni5'N	GGG**CATATG**GATAGCGAAATAAATGATGA	NdeI	clonage *odc* de *O. oeni* BR14/97 dans le pET28a chez *E. coli* BL21 (DE3)	*odc* de *O. oeni* BR14/97
ODCoeni3'N	CCG**GGATCC**TCATCTTTTTTCTTCATCTTTTGA	BamHI		*odc* de *O. oeni* BR14/97
odc1	CGG**GAATTC**CAGTTGATGCTGACAATTC	EcoRI	clonage région interne *odc* dans le pGID701 pour la construction d'un vecteur suicide	*odc* de *O. oeni* BR14/97
odc2	ATC**GGTACC**CAGCCAATCTGAATGGTCTCT	KpnI		*odc* de *O. oeni* BR14/97

A. Construction des vecteurs pGID052-hdcAB et pGID052-hdcPAB

Les vecteurs pGID052-hdcAB et pGID052-hdcPAB contiennent respectivement les gènes *hdcA* et *hdcB* ou les gènes *hdcP*, *hdcA* et *hdcB* de *Lactobacillus hilgardii* 0006, impliqués dans la production d'histamine.

1) Construction du vecteur pGID052-hdcAB

Le fragment *hdcAB* de 2198 pb a été amplifié avec les amorces hdcA5'-2 et hdcB3'-2, à l'aide de la *Taq* haute fidélité (Roche) ; puis cloné dans le pCR2.1-TOPO (Invitrogen), selon les recommandations du fournisseur. Après transformation des bactéries *E. coli* Match 1 (fournies avec le kit), les cellules sont étalées sur milieu LB contenant 100 $\mu g.mL^{-1}$ d'ampicilline, en présence de X-gal (40 $\mu g.mL^{-1}$), ce qui permet une sélection blanc/bleu des clones. Les clones obtenus sont repiqués, puis une minipréparation d'ADN plasmidique est effectuée. Les plasmides sont vérifiés par PCR puis séquençage. Le clone pTOPO-hdcAB obtenu est ensuite digéré par SmaI et SacI, et le fragment hdcAB est excisé sur gel et purifié. Il est ensuite cloné dans le pGID052, digéré préalablement par SacI et SmaI. Les bactéries *E. coli* EC101 électrocompétentes sont électroporées avec $1/5^{ème}$ de la réaction de ligation, puis étalées sur milieu LB contenant 250 $\mu g.mL^{-1}$ d'érythromycine.

2) Construction du vecteur pGID052-hdcPAB

Le clonage du fragment *hdcPAB* contenant 3958 pb, de *L. hilgardii* 0006 dans le pGID052, s'est effectué en deux parties (Figure 17). Dans un premier temps un fragment A de 1446 pb correspondant à *hdcP* a été amplifié à partir de l'ADN de *Lactobacillus hilgardii* 0006 avec les amorces A5' et A3', et un second fragment B de 2512 pb correspondant à *hdcA* et *hdcB* a été amplifié avec les amorces B5' et B3'. Ces deux fragments (A et B) ont ensuite été clonés dans le pCR-XL-TOPO (Invitrogen) suivant les recommandations du fournisseur. Les clones portant les plasmides recombinants pTOPO-hdcP et pTOPO-hdcAB ont été sélectionnés après vérification des inserts par PCR et séquençage (Beckman Coulter Genomics). Puis le vecteur pTOPO-hdcP a été digéré par les enzymes SalI et KpnI tandis que pTOPO-hdcAB a été digéré par KpnI et SacI. Les fragments hdcP et hdcAB ont ensuite été séparés sur gel d'agarose 0,9%, les bandes correspondantes ont été découpées et purifiées

avec le kit Gel Purification (Sigma). Le vecteur pGID052 a été digéré par les enzymes SalI et SacI puis purifié à l'aide du kit PCR Clean up (Sigma). La réaction de ligation s'est ensuite effectuée en présence des trois partenaires : le vecteur et les deux fragments à cloner pendant 24h à 16°C. Après dialyse sur un filtre de 0,025 µm (Whatman), 1/5 de la réaction de ligation, soit 4 µL ont été utilisés pour transformer *E. coli* EC101. Les cellules électroporées (environ 1,1 mL de volume final) sont étalées sur milieu LB agar contenant 250 $\mu g.mL^{-1}$ d'érythromycine. Le vecteur obtenu est appelé pGID052-hdcPAB.

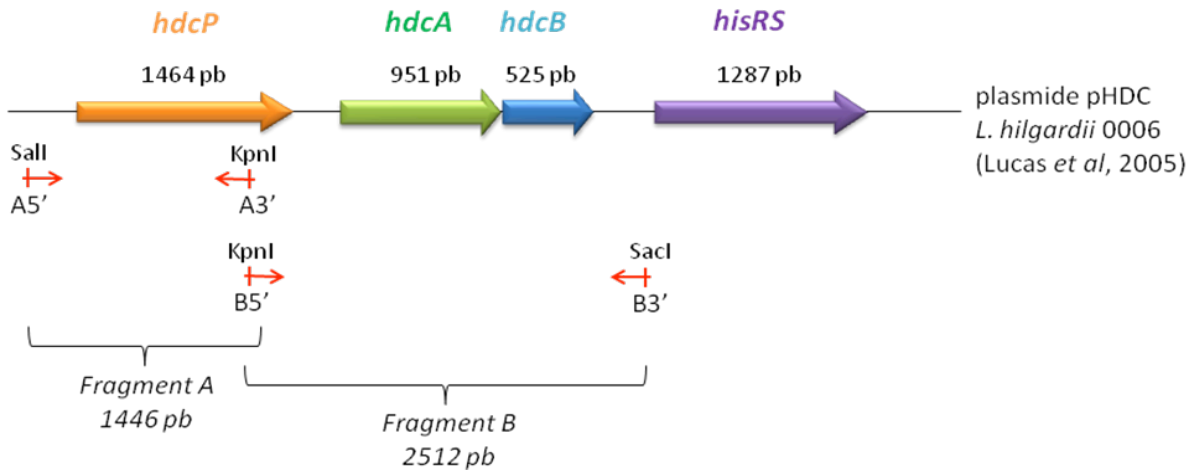


Figure 17. Stratégie de clonage des gènes *hdcP*, *hdcA* et *hdcB*. Les fragments A et B sont d'abord sous-clonés dans le pCR-XL-TOPO, avant d'être clonés dans le pGID052.

B. Construction du vecteur pGID052-odcpotE

Le vecteur pGID052-odcpotE contient les gènes *odc* et *potE* de *O. oeni* BR14/97, impliqué dans la production de putrescine. Il a été obtenu suivant une stratégie similaire à la construction du vecteur pGID052-hdcPAB. Le fragment odc-potE de 4160 pb de *O. oeni* BR14/97 a été cloné en deux parties (Figure 18). Tout d'abord un premier fragment A de 1829 pb correspondant à la région 5' du gène *odc*, et un second fragment B de 2352 pb correspondant à la région 3' du gène *odc* et au gène *potE* ont été clonés dans le pCR-XL-TOPO (Invitrogen). Les amorces ODC1 et ODC3 ont servi à l'amplification du premier fragment (A), tandis que le second fragment (B) à été amplifié en utilisant le couple POTE1 et POTE2. Les amorces ODC3 et POTE1 possèdent le site de restriction PstI présent dans le gène *odc*. Les clones recombinants ont été nommés pTOPO-odc et pTOPO-potE. Le premier a été digéré par BamHI et PstI et le second par PstI et SacI, afin de récupérer les fragments pour le clonage dans le vecteur d'intérêt. Le pGID052 digéré par BamHI et SacI a servi à la

réaction de ligation avec les deux fragments purifiés. Le vecteur ainsi créé est nommé pGID052-odcpotE et propagé dans *E. coli* EC101. Comme précédemment, 1/5ème de la réaction de ligation est utilisée pour électroporer les cellules *E. coli* compétentes. La totalité des cellules électroporées est étalée sur boîtes LB contenant 250 µg.mL^{-1} d'érythromycine.

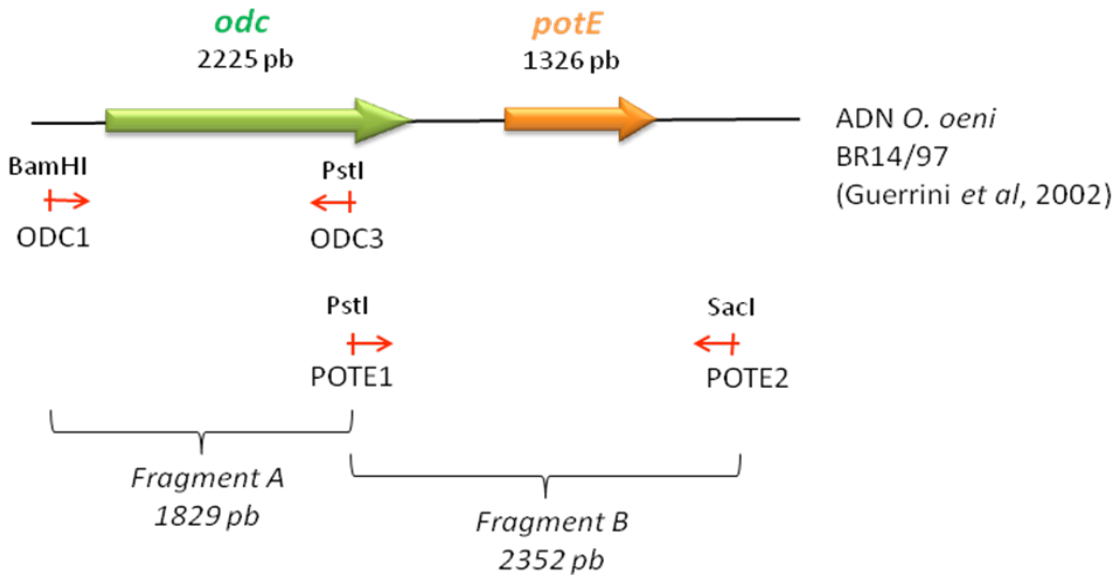


Figure 18. Stratégie de clonage des gènes *odc* et *potE*.

C. Construction des vecteurs pDL-hdcP et pDL-hdcAB

Une région de 315 pb en amont du gène *hdcP* a été amplifiée par PCR avec les amorces hdcP5' et hdcP3'. Le fragment obtenu a ensuite été cloné entre les sites SalI et SspI du vecteur pDL pour donner le pDL-hdcP.

Le pDL-hdcAB a été construit par clonage d'un fragment de 297 pb correspondant à la région promotrice de *hdcA*, située entre le codon stop de *hdcP* et le codon start de *hdcA*. Les amorces utilisées sont phdcAB5' contenant un site EcoRI et phdcAB3Bis contenant un site BamHI.

Les vecteurs pDL-hdcP et pDL-hdcAB sont ensuite transférés chez *E. coli*. Les transformants sont sélectionnés sur milieu LB contenant 100 µg.mL^{-1} d'ampicilline.

D. Construction du vecteur pXT-hisRS

Le clonage du gène *hisRS* dans le pXT, en aval du promoteur p*xyl* inductible en présence de xylose (20 mM), s'est effectué en deux parties (Figure 19). En effet, seuls les sites BamHI, EcoRI et HindIII du polylinker du pXT peuvent ête utilsée. Or le gène *hisRS* comporte les sites de restriction EcoRI et HindIII. La stratégie a été d'amplifier dans un premier temps un fragment de 815 pb avec les amorces hisRSHind1 et hisRSEco qui a été cloné entre les sites HindIII et EcoRI du pXT. Puis la seconde région du gène *hisRS*, correspondant à un fragment de 530 pb a été amplifiée avec les amorces hisRSBam et hisRSHind2, et clonée entre les sites BamHI et HindIII du vecteur recombinant obtenu à la première étape. Le vecteur pXT-hisRS ainsi construit (1 µg) a été transféré chez *E. coli*. Les clones obtenus sont résistants à l'ampicilline (100 µg.mL^{-1}).

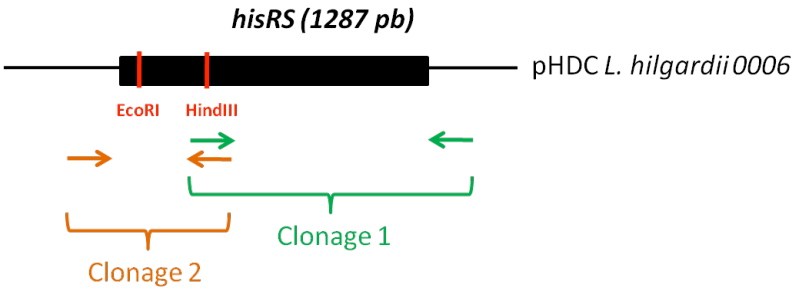


Figure 19. Stratégie de clonage du gène *hisRS* dans le pXT en deux parties.

E. Intégration du pDL-hdcP et pDL-hdcAB dans le génome de *Bacillus subtilis* 168

Le pDL s'intègre au site *amyE* (α-amylase). La vérification de la double intégration s'effectue sur milieu amidon. En effet, la gélose à l'amidon est utilisée pour mettre en évidence l'activité amylase caractéristique de certaines espèces du genre *Bacillus*. Elle est constituée de 15 g.L^{-1} d'agar, 10 g.L^{-1} d'amidon, 5 g.L^{-1} de chlorure de sodium, 2 g.L^{-1} d'extrait de levure, 1 g.L^{-1} d'extrait de viande et 5 g.L^{-1} de peptone.

Après transformation avec 1 µg des vecteurs pDL-hdcP et pDL-hdcA, 20 à 200 µL de cellules transformées sont étalées sur milieu LB contenant 5 µg.mL^{-1} de chloramphénicol. Les clones obtenus sont ensuite repiqués sur un milieu identique et en parallèle sur la gélose à l'amidon préparée la veille. Après 24h d'incubation à 37°C, les géloses à l'amidon sont inondées de lugol. Le lugol colore l'amidon en brun-noir et l'apparition d'un halo décoloré

autour de la colonie est caractéristique de l'activité amylase (Figure 20). Les colonies sans halo sont donc sélectionnées car l'absence de halo signifie qu'il y a bien eu intégration au site *amyE*.

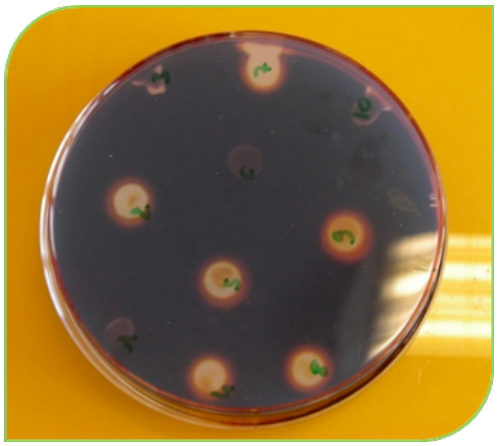


Figure 20. Test de clones de *B. subtilis* pour une intégration au site *amyE*. Les colonies avec un halo n'ont pas intégrées les gènes d'intérêt.

F. Intégration du pXT-hisRS dans le génome de *Bacillus subtilis* 168 et dans *B. subtilis* 168 contenant le pDL-hdcP

Les cellules *B. subtilis* compétentes ont été transformées avec 1 µg de préparation plasmidique contenant le vecteur pXT-hisRS. Ce vecteur est capable de s'intégrer au locus *thrC* (thréonine synthase) de *B. subtilis*. Les doubles recombinants sont résistants à la spectinomycine (100 µg.mL^{-1}) et sensible à l'érythromycine (érythromycine 5 µg.mL^{-1} et lincomycine 10 µg.mL^{-1}).

Tableau 8. Récapitulatif des plasmides utilisés et construits. Mls^{R} : résistance aux macrolides (érythromycine et lincomycine à 10 µg.mL^{-1} chez les bactéries Gram positives, 250 µg.mL^{-1} chez *E. coli*).

Plasmides	Propriétés	Taille (kbp)	Références
pGID052	MlsR, réplicatif et stable chez *O. oeni*	5,6	Beltramo *et al*, 2004
pGID052-hdcAB	MlsR	8,9	ce travail
pGID052-hdcPAB	MlsR	10,6	ce travail
pGID052-odcpotE	MlsR	10,8	ce travail
pDL	CmR (*Bacillus*), AmpR (*E. coli*), integration au site *amyE, bgaB*	10	Yuan & Wong, 1995
pDL-hdcAB	CmR (*Bacillus*), AmpR (*E. coli*), integration au site *amyE, bgaB*	10,3	ce travail
pDL-hdcP	CmR (*Bacillus*), AmpR (*E. coli*), integration au site *amyE, bgaB*	10,3	ce travail
pXT	*E. coli* :AmpR vecteur multicopie, *B. subtilis* : SpecR, ErmR, vecteur intégratif au locus *thrC* (doubles recombinants SpecR, ErmS), vecteur d'expression ; induction de *pxyl* en présence de xylose	6,7	Derré *et al* , 2000
pXT-hisRS	*E. coli* :AmpR vecteur multicopie, *B. subtilis* : SpecR, ErmR, vecteur intégratif au locus *thrC* (doubles recombinants SpecR, ErmS), vecteur d'expression ; induction de *pxyl* en présence de xylose	8,1	ce travail
pCR-XL-TOPO	vecteur de clonage	3,5	Invitrogen
pGID701	MlsR, intégratif	2,3	Oraby, 2002
pGID701-odc	MlsR, intégratif	3,1	ce travail

G. Construction d'un vecteur suicide pour la mutation du gène *odc*

Afin de muter le gène *odc* par simple recombinaison homologue, une séquence interne du gène *odc* de 795 pb a été clonée dans le pGID701, un vecteur non-réplicatif chez les bactéries à Gram positif dénuées du gène *repA*. Les amorces odc1 et odc2 contenant respectivement les sites EcoRI et KpnI ont été utilisées pour le clonage.

VII. Vérification des transformants

A. Par PCR sur colonie

Cette technique concerne la vérification des clones de *O. oeni*. Une colonie est prélevée et resuspendue dans 20 µL de solution GeneReleaser (kit Bioventure) dans un tube PCR. Le tube est vortexé quelques secondes et placé au micro-onde à puissance maximale (900 W) pendant 2 fois 2,5 minutes. Le mélange réactionnel PCR décrit ci-dessus, est délicatement déposé à la surface de la suspension cellulaire ainsi traitée.

B. Par PCR puis séquençage

Les transformants de *E. coli* sont repiqués sur gélose sélective puis ensemencés en milieu LB liquide contenant les antibiotiques appropriés. L'extraction des plasmides est réalisée à l'aide du kit GenElute Plasmid Miniprep (Sigma), puis la construction plasmidique est testée par PCR et/ou digestion par des enzymes de restriction définies. Enfin, le plasmide est envoyé à séquencer à la société Cogenics ®.

Les clones positifs sont conservés en glycérol (750 µL de culture + 250 µL de glycérol à 80%) à -70°C.

VIII. Test et mesure de l'activité des promoteurs

A. Sur milieu gélosé

Les transformants pDL-hdcP et pDL-hdcAB de *E. coli* sont analysés sur milieu LB supplémenté en X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) à 40 µg. mL^{-1},

un substrat de la β-galactosidase. La coloration bleue des colonies témoigne de la dégradation du X-gal par la β-galactosidase, donc de l'activité du promoteur.

B. Mesure de l'activité β-galactosidase

La mesure de l'activité β-galactosidase repose sur l'utilisation d'un substrat synthétique, l'ONPG (Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside) dont l'hydrolyse par la β-galactosidase libère de l'ONP (Ortho Nitro Phényl) absorbant à 420 nm. L'activité enzymatique exprimée en U Miller est déterminée par mesure de la variation de DO_{420nm} en fonction du temps. Afin de comparer l'activité (A) des différents extraits cellulaires, la concentration protéique de ces extraits est mesurée par la méthode de Bradford (BioRad) et l'activité spécifique (AS) des échantillons est calculée.

Des prélèvements de 50 mL de culture à partir de DO_{600nm} = 0,5 sont centrifugés puis resuspendus dans 700 µL de tampon Z (Na_2HPO_4 [0,06 M], NaH_2PO_4 [0,04 M], KCl [0,01 M], $MgSO_4$ [0,001 M], β-mercaptoéthanol [100 mM]). Les cellules sont cassées à l'aide d'un Fastprep (2 cycles de 30 secondes à puissance 6) en présence de 0,4 mg de billes de verre (70 à 100 µm de diamètre). Cent µL d'extrait cellulaire sont ajoutés à 700 µL de tampon Z et préchauffés à 65 °C. La réaction enzymatique est déclenchée par ajout de 200 µL d'ONPG (4 $mg.mL^{-1}$). La réaction est arrêtée par ajout de 500 µL de Na_2CO_3 (1 M). Le temps de réaction est chronométré puis l'absorbance est lue à DO_{420nm}. L'activité enzymatique est calculée selon l'équation suivante :

$A= (1,5 \times 1000 \times DO_{420nm}) / (t \times v)$ en unités de β-galactosidase. mL^{-1}

t : temps de réaction en min, v : volume d'extrait bactérien en mL

L'activité spécifique AS= A/ [protéines] $Umiller.mg^{-1}$

IX. Induction de l'expression de hisRS cloné dans le pXT

Les souches de *B. subtilis* 168 recombinées avec le vecteur pXT-hisRS sont ensemencées en milieu LB en présence de 100 $\mu g.mL^{-1}$ de spectinomycine à DO_{600nm} = 0,05. A DO_{600nm} = 0,7 ; 20 mM de xylose (6 mL d'une solution de xylose à 1M) sont ajoutés pour induire l'expression de *hisRS*. Après induction, 50 mL de culture sont prélevés toutes les demi-heures, pendant environ 3h, et centrifugées pendant 10 min à 2000 g. Les culots sont stockés à -20°C avant de de doser l'activité β-galactosidase.

X. Dosage des amines biogènes et acides aminés par HPLC.

Mis en place de la méthode HPLC décrite par Gomez-Alonso et al, 2007

A. Dérivation au DEEMM

Une étape de dérivatisation est nécessaire, afin de détecter les amines. L'agent dérivant est le DEEMM (diéthyl éthoxyméthylènemalonate). Il réagit avec les fonctions NH_2 pour former des aminoénones. La réaction s'effectue avec : 1,75 mL de tampon borate 1M pH9, 750 µL de méthanol, 1 mL d'échantillon (standard, vin, réaction enzymatique), 40 µL de standard interne, le 2,4,6-trimethylphenethylamine hydrochloride à 2 mg/mL, préparé dans l'HCl à 0,1 N et stocké au froid positif, et 30 µL de DEEMM (Sigma). Le mélange réactionnel s'effectue dans des vials en verre de 4 mL munis d'un bouchon à vis. Le mélange est vigoureusement secoué pour homogénéiser la réaction car le DEEMM est visqueux et forme des bulles. Les solutions sont ensuite placées 30 min dans un bain à ultra sons (les vials sont agités toutes les dix minutes) puis 1h30 à 2h à 70°C pour éliminer le DEEMM en excès.

B. Analyse HPLC

L'appareil utilisé est la chaîne HPLC VWR Hitachi Elite LaChrome. La séparation des molécules s'effectue en HPLC phase inverse. Une colonne HPLC C18 250 x 4,6 mm (Grace, Alltech) avec une granulométrie de 5 µm est utilisée. La colonne est dite HL « High Load », c'est-à-dire qu'elle contient un fort taux de greffage. Elle est munie d'une pré-colonne C18 7,5 x 4,6 mm, 5 µm HL, thermostatée à 16°C. L'analyse s'effectue avec un gradient binaire composé d'un tampon A : 10 mM acétate d'ammonium et 0,02% sodium azide pH 5,8 et d'un tampon B : 80% acétonitrile et 20% méthanol. Le volume d'injection est de 50 µL et le débit de 0,9 $mL.min^{-1}$. La détection s'effectue à 280 nm au DAD (barrette de diode).

Afin d'optimiser la séparation des pics, une seconde colonne a été utilisée : Pursuit XRs (Varian) C18 150 x 4,6 mm- 3 µm, avec un nouveau gradient, mieux adapté (Figure 21).

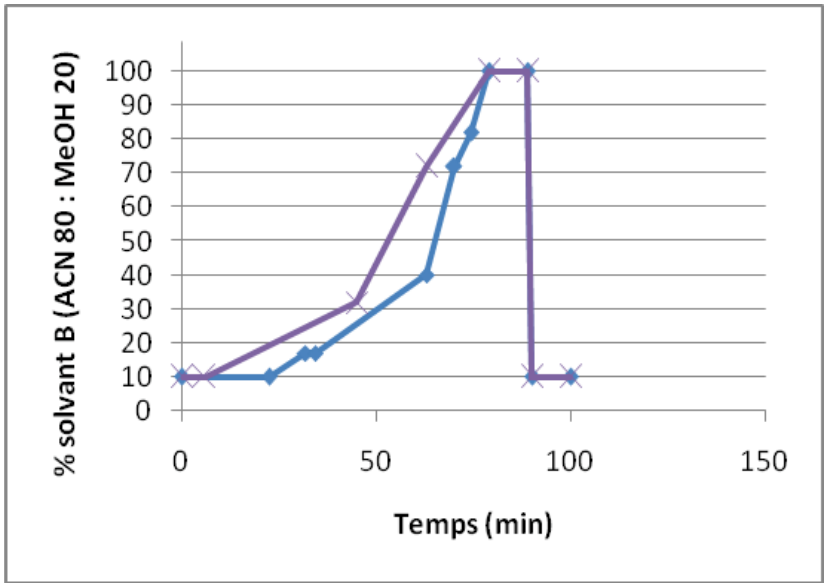


Figure 21. Evolution du pourcentage du solvant B au cours de l'analyse.

♦ : gradient de référence (Gomez-Alonso *et al*, 2007).

X : gradient optimisé pour la colonne Pursuit XRs (Varian).

XI. Analyses HPLC MS/MS

Les analyses HPLC-MS/MS ont été effectuées avec un spectromètre de masse triple quadripole Quantum-UltraTSQ (ThermoFinnigan) équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI) et d'une aiguille H-ESI (id100 µm). L'HPLC a été réalisée en utilisant une pompe Accela™(ThermoFinnigan) et un passeur d'échantillons automatique Accela. Le volume d'injection était de 10µL. La séparation a été effectuée avec les conditions HPLC décrites ci-dessus.

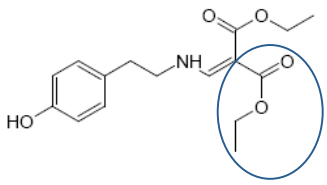
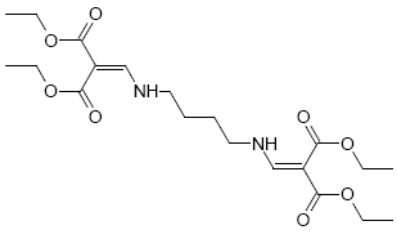
Le débit de solvant était de 900 $\mu L.min^{-1}$ et la colonne a été maintenue à 16° C. Le flux de LC a été scindé en deux en utilisant un diviseur de débit (rapport de division =1:10, en post-colonne) de Scientific Instruments (El Sobrante, CA, USA). Les données ont été traitées en utilisant le logiciel Xcalibur (ThermoFinnigan).

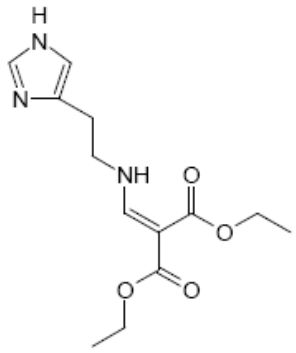
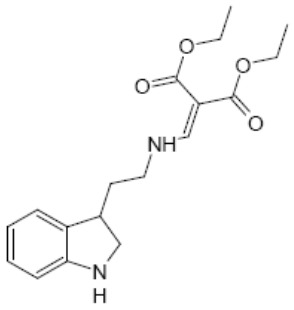
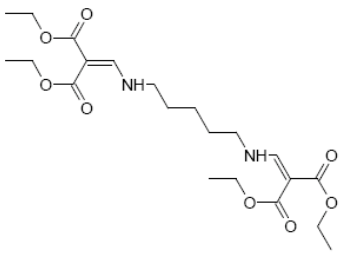
Le spray en sortie de la canule électrospray était orienté selon un angle de 90 °C orthogonal avec le tube de transfert d'ions. Le spectromètre de masse a travaillé en mode full scan négatifs dans la gamme de masse *m/z* = 90-900 avec un temps de balayage de 1 s. L'azote a été utilisé à la fois pour les différents débits de gaz : sheath gas, ion sweep gas et auxiliary gas, à 30, 5 et 30 (unités arbitraires) respectivement. La tension de spray a été réglée à 3kV, le

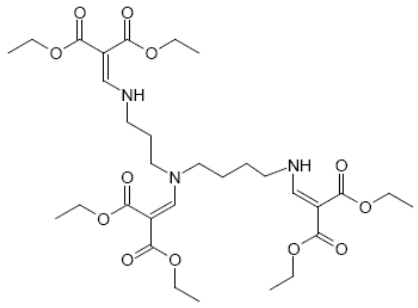
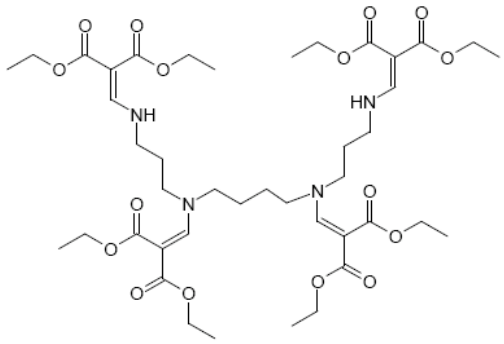
tube lens à -132V et le skimmer offset à 5V. La température de transfert d'ions capillaire et la température du vaporisateur ont été réglées à 250 et 300 °C respectivement. Toutes les amines ont donné un signal masse sur charge (*m/z*) qui correspond à la structure $[M-H]^-$.

La caractérisation des amines a été réalisée par l'injection de chaque amine de1 à 10µg.ml^{-1} (Tableau 9). La fragmentation de l'analyte dans la chambre de collision (CID, Collision-induced dissociation) a été réalisée avec des énergies de collision de 20 à 30 eV sous une pression de 1,5 mTOR d'argon.

Tableau 9. Amines biogènes après réaction au DEEMM. La/les fonction(s) amine NH_2 a (ont) subit la dérivatisation. Les ions caractéristiques, qui dérivent de l'ion parent, ont pour la plupart une masse *m/z* = 46 de moins que l'ion moléculaire parent. Par exemple, pour la tyramine : l'ion moléculaire parent a une masse *m/z* = 306, accompagnés d'autres ions caractéristiques de masse *m/z* = 260 (306-46) et 214 (260-46).

Tyramine	
Putrescine	

Histamine	
Tryptamine	
Cadavérine	

Spermidine	
Spermine	

Chapitre II : étude de l'ODC de *O. oeni*

I. Purification de l'ornithine décarboxylase de *O. oeni*

Les cellules de *E. coli* BL21 contenant le vecteur pET28a-odc sont cultivées en milieu LB avec 50 µg.mL^{-1} de kanamycine. Un litre de LB est ensemencé à DO_{600nm} = 0,05. A DO_{600nm} = 0,7, 50 µM d'IPTG sont ajoutés et la culture est placée à 15°C sous agitation pendant une nuit. La culture est divisée en deux puis centrifugée pendant 5 min à 5000 rpm. Un culot est conservé à -20°C, tandis que l'autre est repris dans 7 mL de tampon NaH_2PO_4 à 50 mM, NaCl 300 mM, pH8. Le culot est ensuite cassé au disrupteur (référence disrupteur, One shot…..) à 1,4 kBars. Les débris cellulaires sont enlevés par centrifugation pendant 10 min à 10 000 g à 4°C. Le surnageant contenant l'enzyme est toujours conservé dans la glace durant le reste de la purification. Dans une colonne de purification, reliée à une pompe péristaltique, est versé 2 mL d'agarose Ni-NTA (Qiagen). Puis, la colonne est équilibrée avec du tampon NaH_2PO_4 (environ 20 mL) décrit précédemment. Le surnageant est ensuite déposé

sur la colonne, le débit est réglé à 0,5 mL.min^{-1}. La colonne est lavée avec 20 mL de tampon NaH_2PO_4 (au moins 10 volumes de colonne) contenant 20 mM d'imidazole (le débit peut être augmenté à 1 mL.min^{-1}). L'enzyme est éluée par palier en augmentant la concentration en imidazole, de 50 mM à 150 mM. On obtient ainsi différentes fractions d'élutions. Elles sont ensuite déposées sur gel SDS-PAGE pour évaluer leur pureté. Les fractions contenant l'enzyme sont regroupées et un dosage de Bradford est effectué pour déterminer la concentration protéique de l'extrait purifié. L'enzyme est conservée en solution glycérol 30% à -20°C en fractions aliquotes de 500 µL.

A. Gel SDS-PAGE

Préparation du gel de séparation à 10% d'acrylamide

Pour 10 mL (nécessaire à la préparation de 2 gels de 8,5 cm x 7 cm, les réactifs sont les suivants : 4,1 mL d'eau MilliQ, 3,3 mL d'acrylamide/bis acrylamide 30:0,8 (40%, v/v) (BioRad), 2,5 mL de tampon 4X, pH 8,8 (composé de 181, 71 g.L^{-1} de Tris-HCl), 100 µL de SDS 10%, 100 µL d'APS (persulfate d'ammonium) 10% et 4,5 µL de TEMED (N-N-N-tétraméthyl éthylènediamine).

Préparation du gel de concentration à 10% d'acrylamide

Pour 5 mL (2 gels), sont mélangés : 3,6 mL d'eau MilliQ, 708 µL d'acrylamide /bis acrylamide 30:0,8 (40%, v/v), 625 µL de tampon 8X, pH 6,8 (composé de 121,14 g.L^{-1} de Tris-HCl), 50 µL de SDS 10%, 50 µL d'APS 10% et 5 µL de TEMED.

Dépôt des échantillons

10 µg de protéines additionnées de tampon de charge (1X final) sont déposés par puits, après dénaturation des échantillons 5 min à 95°C. Le tampon de charge 4X est composé de : 3,2 mL de SDS à 25%, 3,3 mL de glycérol à 100%, 0,8 mL de bleu de bromophénol à 0,5% (p/v), 200 µL de DTT à 100 mM et 2,5 mL de Tris 1M.

Migration des échantillons

Les échantillons migrent dans une cuve d'électrophorèse soumis à 200V pendant environ 1h, dans du tampon d'électrophorèse 1X, préparé à partir de tampon 10 X constitué de : 30,2 g.L^{-1} de Tris base, 188 g.L^{-1} de glycine et 10 g.L^{-1} de SDS.

Révélation du gel

Après migration des échantillons protéiques, le gel est coloré une nuit dans une solution composée de : 50 mg de bleu de Coomassie, 40 mL d'éthanol, 20 mL d'acide acétique qsp 200 mL d'eau. Il est ensuite décoloré pendant environ 3h dans une solution composée de : 50 mL d'éthanol, 16 mL d'acide acétique qsp 100 mL d'eau.

B. Dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976)

La méthode de Bradford permet de mesurer la concentration en protéines par dosage colorimétrique, en mesurant l'absorbance à 595 nm des acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane et phénylalanine). Une gamme d'étalonnage (0 à 15 $mg.mL^{-1}$) est réalisée à partir de BSA (sérum albumine bovine). Les échantillons sont mélangés au réactif de Bradford (BioRad) dilué au 1/3 dans un volume final de 1mL. Après une incubation de 15 min à température ambiante, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre.

II. Mesure de l'activité enzymatique de l'ornithine décarboxylase

L'activité enzymatique est mesurée en tampon phosphate-citrate à différents pH. Deux tampons sont préparés : 1) un tampon Na_2HPO_4 à 0,05 M, EDTA 0,5 mM et DTT 0,5 mM, 2) un tampon citrate à 0,05 M, EDTA 0,5 mM et DTT 0,5 mM. Les deux tampons sont mélangés jusqu'à atteindre le pH souhaité. Une solution de BSA à 1 $g.L^{-1}$ est préparée, ainsi qu'une solution de PLP à 1 mM et une solution d'ornithine à 20 $g.L^{-1}$. Dans un volume réactionnel de 5 mL (un volume réactionnel de 2 mL est nécessaire, sachant que 1 mL d'échantillon sera dérivé pour l'analyse HPLC) sont ajoutés : 25 $mg.L^{-1}$ de BSA, 0,5 µM de PLP, l'enzyme purifiée et le tampon phosphate-citrate qsp 5 mL (sans l'ornithine). Le mélange réactionnel est incubé 1h à 35°C (température optimale de l'enzyme) afin que l'enzyme se stabilise dans sa conformation active. L'ornithine est ensuite ajoutée de 0,1 mM à 5 mM pour tester différentes concentrations en substrat. 1 mL de volume réactionnel est prélevé à 15 min, 30 min, 45 min et 60 min. La réaction enzymatique est arrêtée en ajoutant 1,75 mL de tampon borate 1M, pH 9, et 750 µL de méthanol (dans un vial de 4 mL à bouchon à vis). Tous les prélèvements sont dérivés en même temps en ajoutant 40 µL de standard interne et 30 µL de réactif de dérivation DEEMM (diéthyl éthoxyméthylènemalonate). Les échantillons sont traités 30 min dans un bain à ultra sons puis 1h30 à 2h à 70°C avant d'être analysés en HPLC pour la quantification de putrescine (Cf. protocole de dérivation HPLC chapitre X A).

Chapitre III : transcriptomique

La PCR quantitative en temps réel

A. Définition

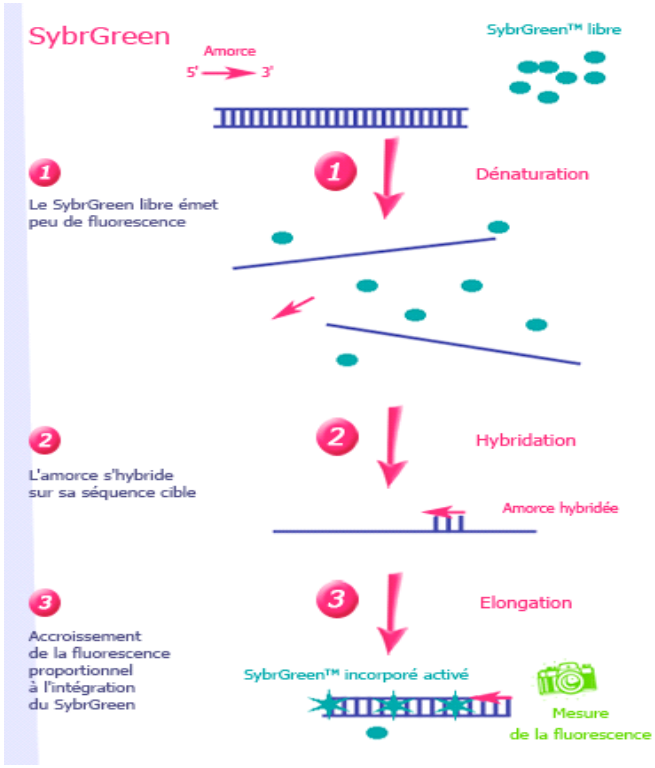


Figure 22. PCR en temps réel en présence de SYBR green (www.ilm.pf/PCRtempsreel)

La PCR quantitative en temps réel a été appliquée pour la mesure relative de l'expression de gènes, c'est-à-dire la quantification des ARN messagers (ARNm) par rapport à un contrôle interne. Cette technique repose sur l'utilisation d'un agent fluorescent qui se fixe à l'ADN et d'un système de détection de fluorescence correspondant. L'augmentation de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés au cours de la PCR. Ceci permet d'établir une relation proportionnelle entre quantité de matrices initiales et quantité d'ADN complémentaires (ADNc) amplifiés après un certain nombre de cycles de PCR. L'analyse de la quantité de produits amplifiés s'effectue pendant la phase exponentielle d'amplification, car c'est pendant cette phase que le taux d'amplification est constant. L'ajout d'un agent fluorescent au mélange de PCR permet une quantification par détection de l'intensité de fluorescence à chaque cycle PCR. A chaque échantillon correspond un cycle seuil, noté C_T (cycle threshold). Il correspond au cycle à partir duquel l'intensité de la

fluorescence est significativement différente du bruit de fond. Ce C_T est inversement proportionnel au nombre initial de copies de matrice. Plus la quantité de matrice est grande, plus le C_T est petit. L'agent fluorescent utilisé au laboratoire est le SYBR Green (BioRad) qui s'intercale dans l'ADN double brin. La mesure de la fluorescence est réalisée à chaque fin d'élongation du cycle PCR, afin de quantifier l'ADN nouvellement synthétisé (Figure 22).

B. Calcul de l'expression relative des transcrits

Pour l'exactitude des calculs, il est nécessaire de :

i) Choisir des amorces spécifiques de la matrice (la formation de dimères d'amorces ou de structures secondaires émet de la fluorescence parasite, ce qui fausse la quantification).

Les amorces sont sélectionnées dans la partie transcrite du gène, de préférence à proximité de la partie 5' car certains ARNm sont instables et ont tendance à se dégrader par la partie 3'. La taille de l'amplicon doit être comprise entre 80 et 120 pb. Ces amorces doivent comprendre environ 20 paires de bases, avec un pourcentage en bases G et C proche de 50%, et une base G ou C à l'extrémité 3'. Leurs températures de fusion doivent de préférence être supérieures à 60°C.

ii) Avoir une efficacité de PCR proche de 100%

Une efficacité de 100% correspond à un doublement du nombre de copies d'ADN à chaque cycle. Si la valeur de l'efficacité est en-dessous de 85% ou au-dessus de 115%, il faut définir de nouvelles amorces.

iii) Définir de bons témoins internes

Le taux de transcrit d'un gène doit être normalisé par un étalon (ou témoin interne). La quantité de messagers de cet étalon doit être stable au cours des conditions expérimentales testées. Pour chaque expérience, il est nécessaire de vérifier le niveau d'expression du gène référant choisi.

La méthode de calcul est basée sur la comparaison des seuils critiques dite des $2^{-\Delta\Delta CT.}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

L'expression du gène d'intérêt est normalisée par rapport à celle du témoin interne :

$\Delta C_T = C_T$ (témoin interne) – C_T (gène d'intérêt)

La quantification de l'expression du gène d'intérêt entre les répétitions est calculée par la méthode comparative des $\Delta\Delta C_T$

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (condition d'intérêt) - ΔC_T (condition témoin)

Puis le taux de transcrit du gène cible normalisé au témoin interne relatif à la condition témoin est calculé : $2^{-\Delta\Delta CT}$.

C. Protocole RT-qPCR

La RT-qPCR a été employée chez *L. plantarum* IR BL0076 (Article 2).

Extraction des ARN

Les cellules (25 mL) sont récoltées à DO_{600nm} = 1,0, 1,6 et 1,8 et centrifugées à 3750 g pendant 10 min à 4°C. Le culot est lavé avec 10 mL de Tris-HCl à 10 mM, pH 8, puis resuspendu avec 1 mL de Tri-Reagent (Sigma). Les cellules sont ensuite transvasées dans un tube à bouchon à vis contenant 200 mg de billes de verre (100 µm), et cassées à l'aide de l'appareil Precellys 24 (Ozyme) programmé comme suit : 6500, 3x 30 s (x2). Les cellules sont centrifugées à 12000 g, pendant 10 min à 4°C, afin d'éliminer le matériel insoluble (billes et débris cellulaires). Le surnageant est transféré dans un tube Eppendorf et 200 µL de chloroforme est ajouté. Les tubes sont vortexés 15 s, suivi d'une incubation de 15 min à température ambiante. Les échantillons sont centrifugés à 12000 g pendant 15 min à 4°C, puis la phase supérieure est transférée dans un nouvel Eppendorf. Cinq cent µL d'isopropanol sont ajoutés, les tubes sont ensuite mélangés par retournement, puis incubés 15 min à température ambiante. Après une centrifugation à 12000 g, pendant 10 min à 4°C, les ARN forment un culot. Le culot est lavé avec 1 mL d'éthanol à 75%, puis séché, avant d'être repris dans 30 à 50 µL d'eau DEPC (Fermentas) (dépourvue de RNAse). Pour éliminer les traces d'ADN, les ARN sont purifiés sur colonnes RNeasy (Qiagen), selon le protocole du fournisseur. Les ARN sont conservés à -80°C. Ils sont dosés au spectrophotomètre à 260 nm (Eppendorf, programme ARN), à l'aide d'une UVette, et dilué au $50^{ème}$ (ex : 4 µL d'ARN qsp 200 µL d'eau DEPC). Après dosage, les ARN sont dilués à 0,5 µg. μL^{-1}, et aliquotés entre 20 et 50 µL.

Traitement des ARN à la DNase

Ce traitement vise à éliminer toutes traces d'ADN. Deux µg d'ARN sont mélangés à 2 µL de DNase (Fermentas) et 2 µL de tampon DNase, qsp 20 µL d'eau DEPC. Le mélange est incubé 30 min à 37°C. La réaction est arrêtée par ajout de 3 µL d'EDTA à 25 mM, suivi d'une incubation de 10 min à 65°C. Le traitement à la DNase est vérifié par une PCR de contrôle : aucune amplification ne doit avoir lieu. Les ARN sont ensuite conservés à -20°C.

Transcription inverse

Cette étape a pour but de synthétiser les ADN complémentaires (ADNc) à partir des ARN purifiés. Elle est réalisée à partir du kit iScript cDNA synthesis (BioRad), suivant les recommandations du fournisseur.

Quantification de l'expression par RT-qPCR

La quantification de l'expression des gènes est réalisée à l'aide de l'appareil BioRad CFX96 Real-Time System. Des dilutions au ¼ des ADNc (1/4, 1/16, 1/64, 1/256) sont réalisées. Chaque puits (25 µL final) de la plaque PCR (contenant 96 puits) est rempli avec : 5 µL de chaque dilution, puis 20 µL d'un mix contenant 12,5 µL de SYBR Green supermix (BioRad), 1 µL de chaque amorce à 7 pmol.µL-1 et 5,5 µL d'eau DEPC (Fermentas). Pour chaque plaque, un contrôle négatif est réalisé avec 5 µL d'eau DEPC, ainsi qu'un contrôle positif avec 5 µL d'ADN.

Le programme d'amplification est constitué d'une dénaturation initiale de 30 s à 98°C, puis de 40 cycles composés de deux étapes : i) une dénaturation de 10 s à 95°C, ii) une hybridation et élongation de 30 s à 60°C. Une courbe de fusion est réalisée en fin de réaction, en mesurant la fluorescence de 90°C à 60°C par palier de 0,05 C.

RESULTATS

Ma thèse s'inscrit dans le cadre du programme de recherche européen FP7 BiamFood n°211441, dont le but est de contrôler les amines biogènes dans les procédés de fermentation traditionnels en Europe. Le projet s'intéresse aux bactéries lactiques productrices d'amines biogènes et aux moyens d'éliminer ces métabolites, afin d'améliorer la qualité sanitaire des produits fermentés comprenant : le fromage, le cidre et le vin. Le travail s'est partagé entre quinze partenaires universitaires et industriels, et en neuf tâches ou Work package. En ce qui concerne l'Université de Bourgogne, les travaux de recherche se sont focalisés sur : i) la création de vecteurs suicides pour mutagénéiser les gènes codant les décarboxylases impliquées dans la synthèse d'amines biogènes, ii) l'étude du rôle physiologique de la voie de production des amines biogènes, notamment son rôle dans la résistance au stress acide par l'analyse phénotypique des mutants et, iii) l'influence de la source azotée sur la production des amines biogènes a été explorée.

I. Validation de la technique de transfert génétique par électroporation

Malgré le protocole d'électroporation décrit par Dicks (1994) et les nombreuses tentatives réalisées au laboratoire (Challan Belval, 2000), *O. oeni* est longtemps resté réfractaire à l'entrée d'ADN exogène. Les traitements appliqués et une mortalité cellulaire élevée expliquent sans doute ces échecs. A l'aide du pGID052 (Beltramo *et al*, 2004), J. S. Assad-Garcia a mis au point une méthode reproductible d'électroporation de la souche *O. oeni* ATCC BAA-1163 (Assad-Garcia, 2008), qui repose sur l'ajout d'éthanol absolu à une concentration de 15% (v/v) dans le tampon d'électroporation, préalablement à l'application du choc électrique. L'éthanol intervient dans la fluidité et la perméabilité membranaire. En effet, chez *O. oeni*, des chocs éthanoliques (10 à 14% v/v) induisent une fluidisation instantanée de la membrane, suivie d'une rigidification (Chu-ky *et al*, 2005). Dans le cas de l'électroporation de cellules d'ovaire de hamster chinois (OHC), Teissié et Rols (1992) ont montré un ralentissement de la réorganisation conformationnelle des phospholipides membranaires en présence d'éthanol. Mon rôle dans ces travaux a été d'optimiser notamment la valeur du pH du tampon d'électroporation à 6,5 (Variot, 2010). Une efficacité de 5,8 10^3 transformants par microgramme d'ADN a été obtenue. Ce protocole a ensuite été expérimenté sur d'autres

souches, notamment des ferments commerciaux tels que *O. oeni* ChH (Chris Hansen, DK) et *O. oeni* OeF (OenoFrance, F), ainsi qu'une souche indigène *O. oeni* JDC1 (Tableau 10). Même si l'efficacité obtenue est inférieure à celle de la souche de laboratoire, le protocole mis en place permet à priori, le transfert de matériel génétique vers n'importe quelle souche de *O. oeni*. De plus, outre le pGID052, d'autres vecteurs tels que le pGID023 (Kok *et al*, 1984) et le pGK13 (Hols *et al*, 1994) ont été propagés avec succès chez *O. oeni* ATCC BAA-1163, avec une efficacité de 2,5 10^2 et 2,3 10^2 transformants par microgramme d'ADN respectivement.

Tableau 10. Efficacité de transformation de différentes souches de *O. oeni*.

Souches testées	Source	Nombre de transformants par µg d'ADN (pGID052)
O. oeni ATCC BAA-1163	Souche de laboratoire	5,80E+03
O. oeni ChH	Chris Hansen, DK	1,90E+02
O. oeni OeF	Oenofrance, F	3,30E+02
O. oeni JDC1	Isolat indigène	1,10E+02

Cette technique de transfert, ainsi que le vecteur d'expression pGID052 ont été mis au service de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse d'amines biogènes.

II. L'histamine et la putrescine dans la résistance au stress acide chez *O. oeni*

Bien que *O. oeni* soit l'acteur fondamental de la fermentation malolactique et responsable des changements biochimique du vin, cette bactérie produit des amines biogènes, entre autres l'histamine et la putrescine. Mais l'intérêt de la synthèse de telles molécules n'est pas encore très bien élucidé chez *O. oeni*. D'après des études réalisées chez *L. buchneri*, isolé du fromage (Molenaar et al, 1993) et *L. brevis* isolé du vin (Wolken et al, 2006), la décarboxylation de l'histidine et de la tyrosine, couplée au transport des amines biogènes correspondantes, permettrait à la cellule de se maintenir dans un environnement acide. Chez *O. oeni* ce rôle est supposé, mais reste à être démontré. Pour ce faire, deux stratégies ont été envisagées : la mutation des gènes codant les décarboxylases dans des souches naturellement productrices, ou l'expression des clusters *hdc* et *odc* dans une souche de laboratoire, incapable de produire naturellement des amines biogènes, afin d'analyser les différences phénotypiques.

A. L'histamine dans la résistance au stress acide chez *O. oeni*

1) Clonage de l'histidine décarboxylase *hdcA* et de la perméase associée *hdcP* de *Lactobacillus hilgardii* 0006 chez *O. oeni* ATCC BAA-1163.

Au commencement de ma thèse, la souchotèque du laboratoire ne contenait pas de bactéries lactiques productrices d'amines biogènes. Sachant que les gènes de ces voies métaboliques sont instables et transmis par transfert horizontal, le criblage de souches, en condition acide et en présence d'acides aminés précurseurs, est nécessaire à l'isolement des bactéries productrices. En partenariat avec l'Université de Bordeaux 2, impliquée dans le projet européen, nous avons acquis la souche *L. hilgardii* 0006 (Lucas *et al*, 2005) productrice d'histamine et dont le transporteur a été caractérisé. Cette souche a donc été utilisée pour le clonage dans le pGID052 du locus portant les gènes codant l'histidine décarboxylase et la perméase associée (Figure 23). Ce vecteur recombinant a été transféré dans la souche *O. oeni* ATCC BAA-1163, déficiente pour la synthèse d'amines biogènes. Maintenu au-delà de cent générations sur milieu non-sélectif (Beltramo, 2004), le pGID052 est un vecteur stable chez *O. oeni*. Le clonage du locus *hdc* placé sous contrôle de son propre promoteur permet donc de stabiliser le phénotype, afin d'étudier l'implication de ces gènes dans la survie de la souche au stress acide. Deux constructions ont été réalisées : d'une part, le clonage des gènes *hdcA* et *hdcB*, le gène codant l'enzyme nécessaire à la maturation de HdcA (Trip *et al*, 2011) ; et d'autre part, le clonage des gènes *hdcA*, *hdcB* et *hdcP* codant le transporteur. Les vecteurs ainsi créés, nommés pGID052-hdcAB et pGID052-hdcPAB (Figure 24) ont été transférés avec succès dans la souche *O. oeni* ATCC BAA-1163.

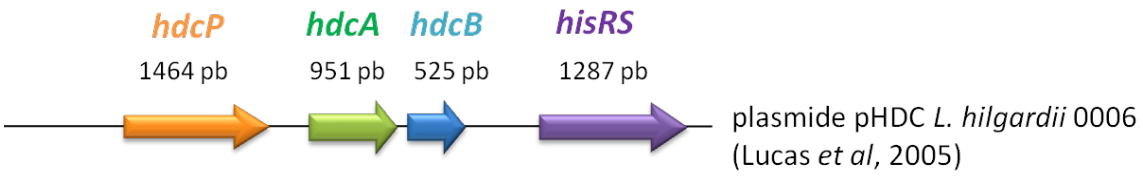


Figure 23. Organisation génétique de la voie de biosynthèse de l'histamine. Les gènes *hdcP*, *hdcA* et *hdcB* ont été clonés dans le pGID052 chez *O. oeni*. Le gène *hisRS* code pour une histidyl-tRNA synthétase

La production d'histamine a d'abord été mesurée dans la souche *E. coli* EC101 qui a servi à la construction du pGID052-hdcAB. Cette souche a été ensemencée en milieu LB à pH 5 contenant 10 $g.L^{-1}$ d'histidine. Aucune production d'histamine n'a été détectée dans le surnageant cellulaire, probablement parce que le gène du transporteur HdcP n'a pas été inclus à la construction. Les cellules ont donc été récoltées en phase stationnaire. Puis l'activité enzymatique de l'histidine décarboxylase a été mesurée sur l'extrait cellulaire, selon le protocole décrit par Landete *et al* (2008). Le protocole utilisé par Marcobal *et al* (2006) a également été testé. L'échantillon a ensuite été analysé à l'HPLC, mais l'histamine n'a pas été détectée. En parallèle, des expériences de RT-PCR ont été effectuées sur les ARN de *E. coli* EC101 contenant le pGID052-hdcAB, mais *hdcA* ne semble pas s'exprimer. Ces résultats peuvent certainement s'expliquer par un problème d'expression des gènes issus d'une bactérie à Gram positif chez un hôte à Gram négatif.

Suite à cette première construction, le vecteur pGID052-hdcPAB, comportant le gène *hdcP*, a été construit et transféré chez *O. oeni*. Le séquençage du vecteur confirme la qualité de la construction. Les expériences se sont donc focalisées sur ces nouveaux transformants portant les principaux gènes de la voie HDC.

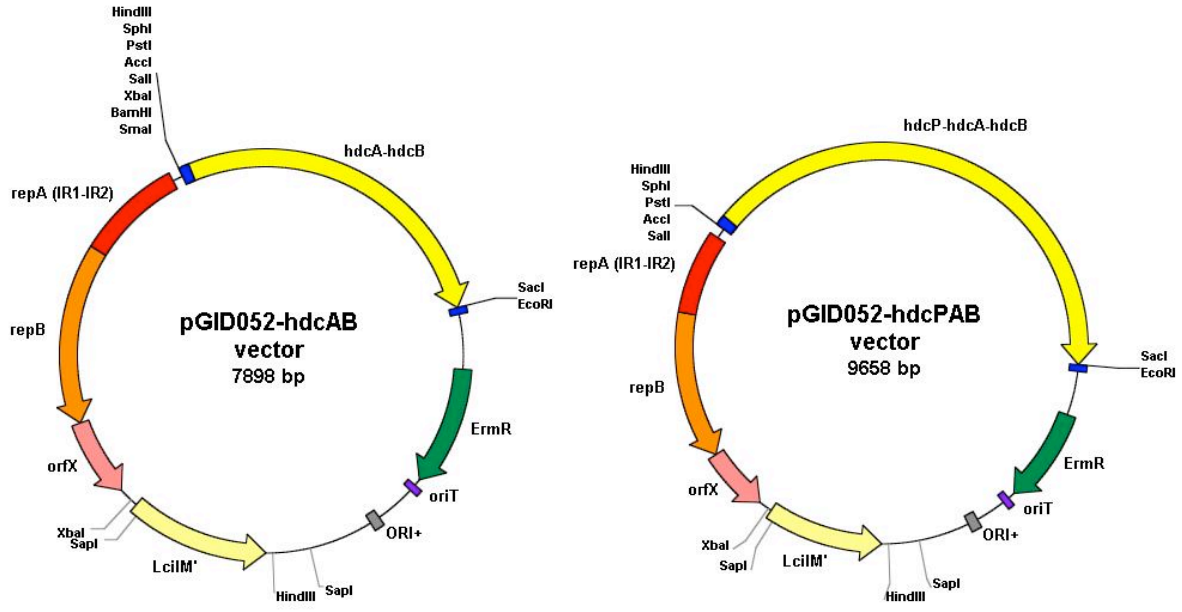


Figure 24. Cartes plasmidiques des vecteurs pGID052-hdcAB et pGID052-hdcPAB

Les clones de *O. oeni* ont été ensemencés en milieu CarrM acide à pH 4,8 (Lucas *et al*, 2005) et en présence de 10 $g.L^{-1}$ d'histidine. Puis, les surnageants de culture ont été analysés par HPLC. Cependant, aucune détection d'histamine n'a été obtenue. La même expérience a

été répétée en milieu LAC à base de jus de raisins à pH 5, sans succès. Les profils chromatographiques des surnageants de la souche ATCC BAA-1163 contenant le pGID052 (témoin) et de la souche portant le pGID052-hdcPAB se sont avérés strictement identiques.

Ces résultats peuvent être dus à un problème d'expression des gènes de *L. hilgardii* chez *O. oeni*. Afin de vérifier la présence de transcrits, des expériences de RT-PCR ont été réalisées à partir de l'ARN extrait des clones de *O. oeni* contenant le pGID052-hdcPAB. Les bactéries ont été cultivées en milieu FT80 à pH 4,8 avec 10 $g.L^{-1}$ d'histidine. Les transcrits *hdcA* et *hdcP* ont été détectés pour *L. hilgardii* 0006, cultivé dans les mêmes conditions, alors qu'aucun transcrit n'a été détecté pour les clones de *O. oeni*.

Dans le but de comprendre l'absence de production d'histamine, des hypothèses ont été émises concernant la transcription des gènes clonés, à savoir les régions promotrices de *hdcA* et *hdcP* sont-elles fonctionnelles ? En effet, peu d'études transcriptionnelles existent concernant ces locus. Chez *L. buchneri* (Martin *et al*, 2005), producteur d'histamine, des expériences par la technique de Northern blot ont été réalisées en employant des sondes complémentaires de *hdcA, hdcB* ou *hisRS*, pour définir la nature des transcrits (monocistronique ou polycistronique). Les résultats ont été confirmés par RT-PCR. Puis des promoteurs putatifs ont été identifiés, basé sur l'observation de séquence. Mais ils n'ont pas été clairement définis. Nous nous sommes donc intéressés aux régions promotrices de l'histidine décarboxylase et du transporteur, dans le but d'étudier leur fonctionnalité.

2) Etudes transcriptionnelles des régions promotrices de *hdcA* et *hdcP* de *Lactobacillus hilgardii* 0006

Des études de fusions transcriptionnelles ont été réalisées. A l'aide du pDL (Derré *et al*, 2000), des fusions transcriptionnelles ont été construite entre les régions promotrices des gènes *hdcP* ou *hdcA* (Figure 25) et le gène codant une β-galactosidase de *Bacillus thermophilus*. Les vecteurs pDL-hdcP et pDL-hdcAB ainsi construits (Figure 26), ont été transférés chez *E. coli*. En présence de X-gal, les transformants apparaissent sous forme de colonies bleues traduisant donc la fonctionnalité de ces deux promoteurs chez *E. coli*. Mais quand est-il de l'activité de ces promoteurs chez une bactérie à Gram positif ?

Afin d'apporter un élément de réponse, les vecteurs recombinants ont été transférés chez *Bacillus subtilis.*

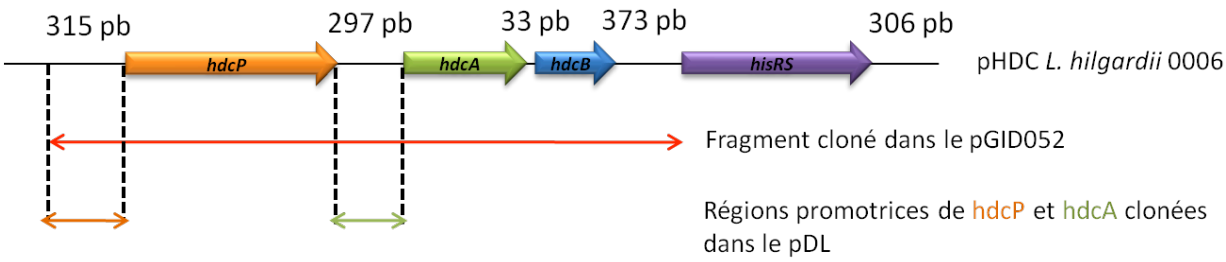


Figure 25. Clonage des régions promotrices de *hdcP* et *hdcA* dans le pDL. Le nombre de paires de bases entre chaque gène correspond à la taille des régions intergéniques.

Le pDL est un vecteur navette *E. coli-B. subtilis* intégratif chez *B. subtilis*. L'intégration est site spécifique grâce à la présence de deux régions du gène *amyE* codant pour l' α-amylase. L'intégration du vecteur peut aisément être lue sur une boite enrichie en amidon en présence de lugol. Après intégration au chromosome l'activité β-galactosidase a été dosée en présence d'ONPG (Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside). La mesure de l'activité permet d'être plus précis, comparé à une simple lecture sur boîte (criblage blanc/bleu). Les résultats montrent que les régions promotrices de *hdcP* et *hdcA-hdcB* sont fonctionnelles chez *B. subtilis* 168 (Figure 27).

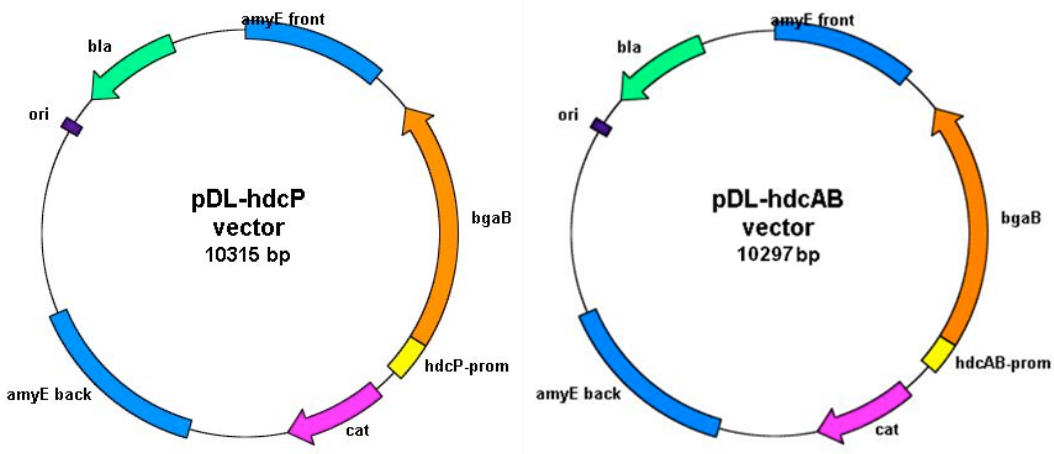


Figure 26. Carte du pDL-hdcP et du pDL-hdcAB: la région promotrice de *hdcP* et *hdcA* a été clonée en fusion avec le gène codant la β-galactosidase (*bgaB*)

3) Test de l'induction de l'activité β-galactosidase en présence d'acide aminé précurseur (histidine)

Afin de détecter une éventuelle induction de l'activité de ces promoteurs en présence d'histidine, le dosage de l'activité β-galactosidase a été réalisé sur des cellules cultivées en

présence de 25 mM d'histidine (Landete *et al*, 2008). La souche témoin portant le vecteur pDL cultivé en présence ou en absence d'histidine, est dénué d'activité. La présence d'histidine dans le milieu de culture n'induit pas de différence significative sur l'activité enzymatique mesurée sur les souches portant le pDL-hdcAB (Figure 27). Un résultat similaire est observé en ce qui concerne la fusion *hdcP'bgaB*. Ainsi, l'histidine ne semble pas influencer l'expression de *hdcA* et de *hdcP*. Cependant, d'après la littérature, la production d'amines biogènes, telles que l'histamine, la tyramine et la putrescine, est favorisée en présence de précurseurs (Pessione *et al*, 2005 ; Moreno-Arribas *et al*, 2000 ; Landete *et al*, 2008). En particulier, l'expression de *hdcA* de *L. hilgardii*, *P. parvulus* et *O. oeni*, augmente en présence de 2 $g.L^{-1}$ d'histidine dans un milieu optimal (Landete *et al*, 2004) à pH 5 (Landete *et al*, 2006), par rapport au milieu dépourvu d'histidine. Les expériences réalisées sur le rôle des précurseurs dans la synthèse d'amines biogènes ont été réalisées sur cellules entières (Landete *et al*, 2006, 2008 ; Moreno-Arribas *et al*, 2000), et non chez un hôte hétérologue. *B. subtilis* est peut être dépourvu du système de régulation propre aux bactéries lactiques productrices d'amines biogènes.

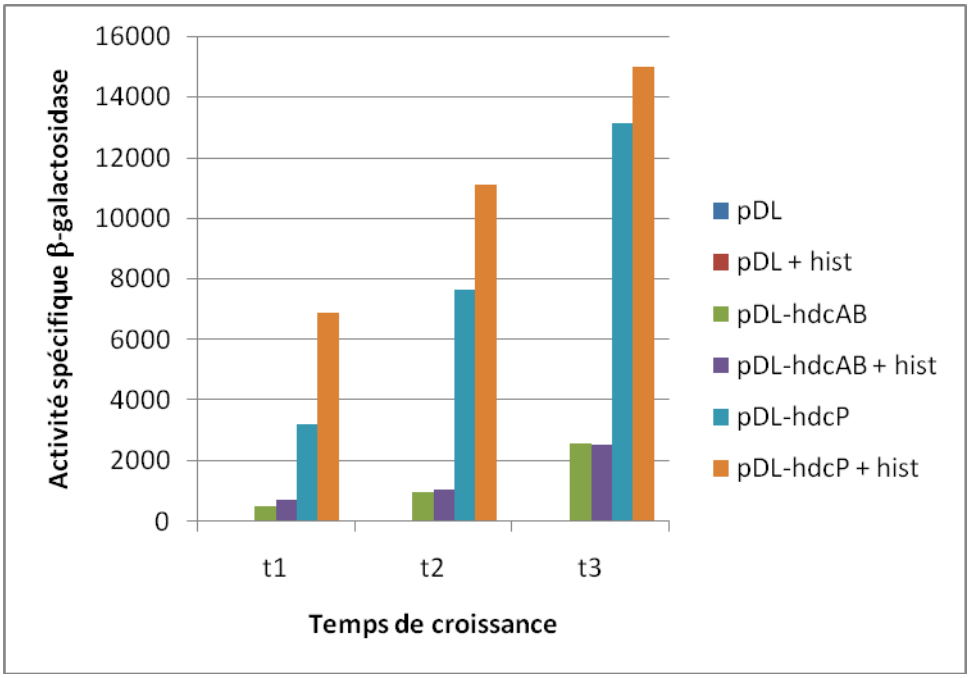


Figure 27. Mesure chez *B. subtilis* de l'activité spécifique de la β-galactosidase (Umiller.mg^{-1}), des fusions transcriptionnelles portées par les vecteurs pDL, pDL-hdcAB et pDL-hdcP, en fonction de la croissance bactérienne (t1 : DO_{600nm} = 0,6 ; t2 : DO_{600nm} = 1,2 ; t3 : DO_{600nm} = 2,6)

4) Rôle de *hisRS* dans la voie de biosynthèse de l'histamine

Une dernière hypothèse a donc été soulevée : celle du rôle du gène *hisRS*, le quatrième gène de l'opéron impliqué dans la synthèse d'histamine. En effet, trois gènes sur quatre ont été clonés dans le pGID052. Et si le rôle de *hisRS* était essentiel dans la voie de biosynthèse ? Ce gène code une histidyl t-RNA synthétase. Sa fonction est imprécise, certains auteurs suggèrent cependant son implication dans le mécanisme de régulation de l'expression du cluster *hdc* (Martin *et al*, 2005).

Afin de déterminer si *hisRS* joue un rôle sur l'expression de *hdcP*, ce gène a été cloné dans le vecteur intégratif pXT sous le contrôle d'un promoteur inductible par le xylose (P_{xyl}) (Figure 28). Les souches de *B. subtilis* contenant le pDL seul (contrôle) ou le pDL-hdcP ont été transformées avec le vecteur pXT-hisRS. Seules ont été sélectionnées les bactéries qui ont intégrés au site chromosomique *thrC* le pXT-hisRS. Son expression est induite par ajout de 20 mM de xylose. L'activité β-galactosidase a été mesurée chez *B. subtilis* contenant les vecteurs pDL-hdcP et pXT-hisRS intégrés (Figure 29). Aucune différence d'activité n'est observée avec ou sans xylose. Ainsi *hisRS* ne semble pas avoir d'effet sur l'expression de *hdcP*. Néanmoins, le rôle de *hisRS* sur l'expression de *hdcA* n'a pas été testé, car les expériences avaient pour but principal de définir la région promotrice de *hdcP*. Il n'est donc pas exclu que *hisRS* puisse réguler l'expression du gène de l'histidine décarboxylase.

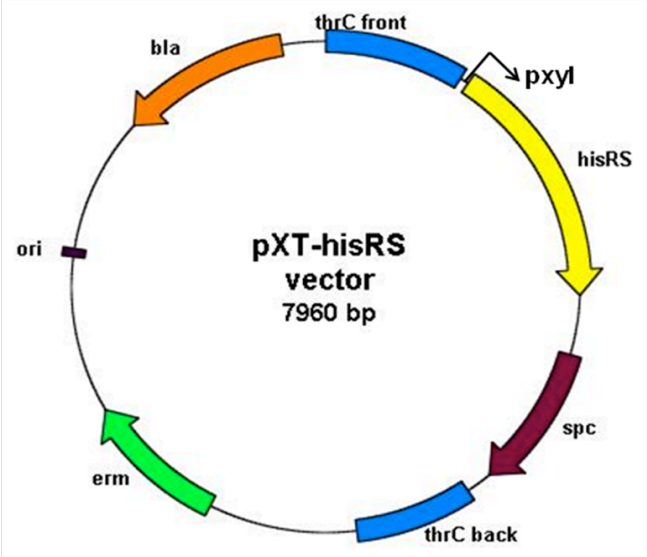


Figure 28. Carte du vecteur pXT-hisRS

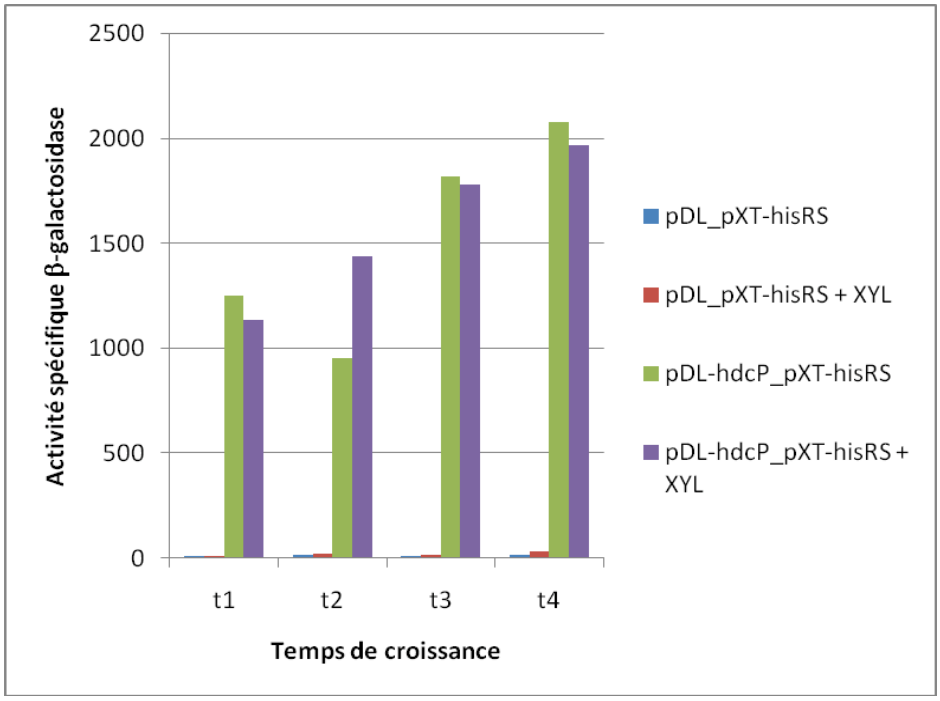


Figure 29. Mesure de l'activité spécifique de la β-galactosidase (Umiller.mg^{-1}) chez *B. subtilis* contenant les vecteurs pDL et pXT-hisRS, ou les vecteurs pDL-hdcP et pXT-hisRS, en fonction de la croissance bactérienne. A DO_{600nm} = 0,7 ; 20 mM de xylose sont ajoutés pour induire l'expression de *hisRS*, cloné sous le contrôle du promoteur *pxyl* (t1 : DO_{600nm} = 1,0 ; t2 : DO_{600nm} = 1,1 ; t3 : DO_{600nm} = 1,2 ; t4 : DO_{600nm} = 1,5)

Chez les bactéries à Gram positif, le gène *hisRS* n'est pas systématique présent au sein du locus *hdc*. C'est le cas par exemple de *Clostridium perfringens*, chez qui il n'existe pas de gène similaire à *hdcB* et à *hisRS*. De plus les gènes *hdcA* et *hdcP* sont arrangés en divergon, comparé à l'organisation génétique de la voie HDC des bactéries lactiques. Landete *et al* (2008) proposent que l'absence de ces deux gènes indique qu'ils ne sont pas essentiels à la formation d'histamine et qu'ils codent des fonctions accessoires. Cependant, Trip *et al* (2011) ont récemment montré le rôle crucial de la protéine HdcB dans la maturation de la forme active de l'histidine décarboxylase. Connaître le rôle de *hisRS* peut donc apporter des informations importantes sur le métabolisme de l'histamine.

Cette partie du projet européen devait compléter l'étude entreprise par l'Université de Bordeaux 2, visant à comparer les phénotypes d'une souche de *L. hilgardii* porteuse du plasmide pHDC, avec une souche curée du plasmide. Devant l'échec à élucider le rôle de l'histidine décarboxylase, nous avons focalisé nos recherches sur le rôle de l'ornithine décarboxylase de *O. oeni*. Le cluster *odc* présente une organisation génétique moins complexe que le cluster *hdc*, en effet, le cluster *odc* chromosomique contient deux gènes, au lieu de

quatre pour le cluster *hdc* porté par un plasmide. De plus, la putrescine est l'amine biogène majoritaire du vin (Marcobal *et al*, 2005 ; Mangani *et al*, 2005).

B. La putrescine dans la résistance au stress acide chez *O. oeni*

De même que pour l'étude du rôle de l'histamine dans l'hypothèse de la lutte contre le stress acide chez *O. oeni*, la fonction de la synthèse de putrescine à également été explorée.

Contrairement aux gènes de la voie HDC portés par un plasmide, les gènes de la voie ODC de *O. oeni* sont localisés au niveau chromosomiques (Marcobal *et al*, 2004, 2006). La stratégie d'interrompre le gène *odc* par simple recombinaison homologue a d'abord été tentée. Pour cela le vecteur pGID701 (Oraby, 2002), dérivé du pORI19 a été utilisé. Une région interne de *odc* a été clonée dans ce vecteur et le pGID701-odc ainsi obtenu (Figure 30) a été transféré dans la souche *O. oeni* BR14/97 (Guerrini *et al*, 2002) portant les gènes *odc* et *potE*. Des transformants ont été obtenus mais aucun mutants. Cela peut s'expliquer par plusieurs raisons. Tout d'abord, le premier frein à l'obtention de mutants est l'efficacité de transformation qui n'est pas suffisamment élevée par rapport à cette stratégie. Ensuite, la stratégie de mutation par simple recombinaison homologue n'est peut être pas bien adaptée. En effet, lors d'une étude sur l'interruption de gènes par recombinaison homologue chez *Thermococcus kodakaraensis*, une archée hyperthermophile, Sato *et al* (2003) n'obtiennent aucune mutation par simple crossing-over. Cependant, une interruption du gène ciblé a été obtenue par double recombinaison. L'échec dans l'obtention de mutant par une approche en simple recombinaison serait dû au clivage par le système de restriction/ modification (RM) de l'ADN circulaire. Les systèmes de RM sont avant tout un moyen de défense des bactéries contre l'ADN hétérologue. Ils regroupent des méthylases et des enzymes de restriction. Chaque souche bactérienne possède un profil de méthylation propre de son ADN, et l'ADN exogène, qui possède un profil de méthylation différent, est dégradé par les enzymes de restriction. Aussi, la méthylation *in vitro* de plasmides est envisagée pour augmenter l'efficacité de transformation. Ce moyen a permis de transformer *Helicobacter pylori* (Donahue *et al*, 2000) ainsi que *Bacillus cereus* (Groot *et al*, 2008). Il serait peut être possible d'envisager cette stratégie chez *O. oeni*.

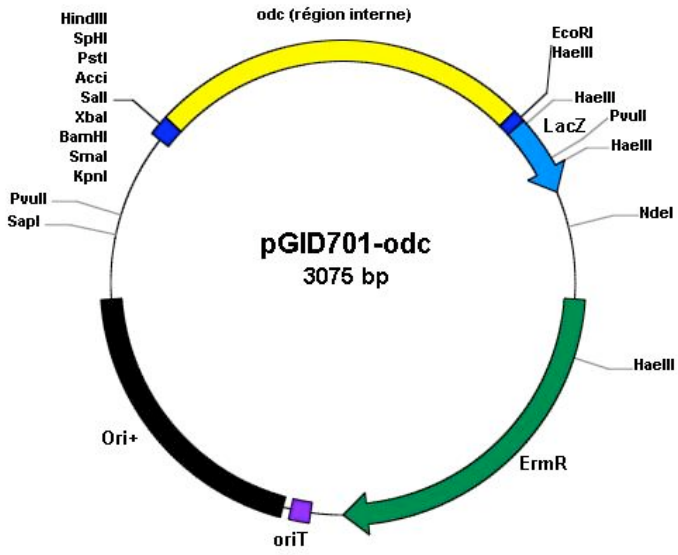


Figure 30. Carte du vecteur suicide pGID701-odc

Face à l'échec dans l'obtention de mutants *odc*, la stratégie déjà utilisée pour exprimer les gènes de la voie HDC de *L. hilgardii* chez *O.oeni*, a été entreprise. Comparé à l'étude précédente, il s'agit d'exprimer les gènes *odc* et *potE* d'une souche de *O. oeni* isolée du vin (Figure 31), dans la souche de laboratoire, dépourvu d'activité ornithine décarboxylase. Ainsi, il ne devrait pas y avoir d'incompatibilité dans la reconnaissance des signaux d'expression. Les gènes *odc* et *potE* ont donc été amplifiés à partir de *O. oeni* BR14/97 (Guerrini *et al*, 2002) et clonés dans le pGID052 (Figure 32), puis transférés chez *O. oeni* ATCC BAA-1163.

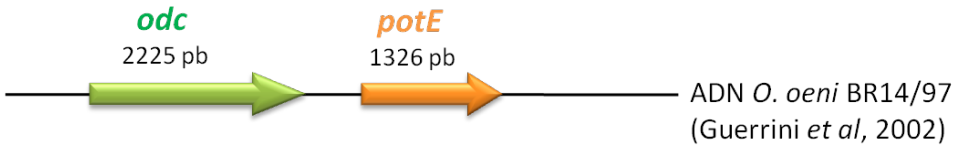


Figure 31. Organisation génétique de la voie de biosynthèse de la putrescine. Les gènes *odc* et *potE* ont été clonés dans le pGID052 puis transférés dans la souche *O. oeni* ATCC BAA-1163

Ensemencée en milieu LAC, la souche témoin *O. oeni* BR14/97 *odc*$^+$ produit de la putrescine, alors que le clone *O. oeni* ATCC BAA-1163 contenant le vecteur pGID052-odcpotE n'en produit pas.

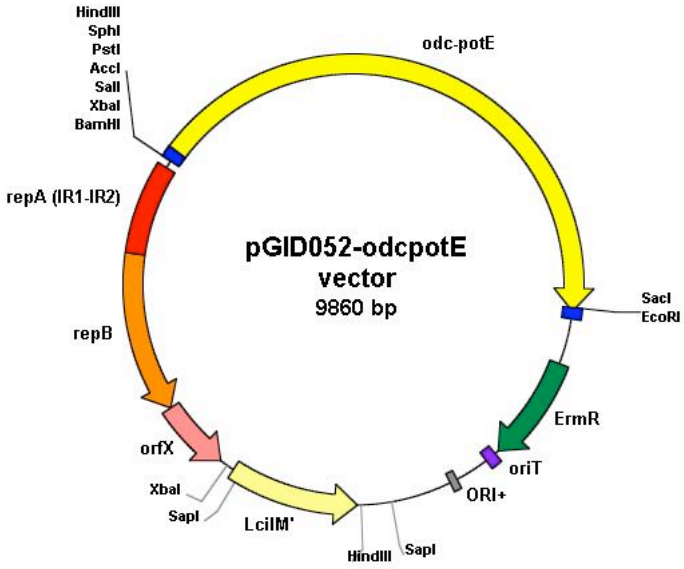


Figure 32. Carte plasmidique du pGID052-odcpotE

Les constructions réalisées dans le pGID052 ne semblent pas s'exprimer, bien que ce vecteur est déjà été utilisé et validé en tant que vecteur d'expression chez *O. oeni* (Assad-Garcia et al, 2008). Un facteur de régulation est peut être manquant, ou les transcrits sont sans doute instables et dégradés. De plus les gènes issus de *L. hilgardii* sont peut être reconnus par le système de restriction/ modification de *O. oeni*, le plasmide serait alors dégradé. Mais cette hypothèse est caduque au regard du clonage de l'ornithine décarboxylase et du transporteur associé provenant d'une souche de *O. oeni*. Le problème majeur se situe au niveau de la transcription, et plus précisément dans la reconnaissance des promoteurs. Sachant qu'une seule copie du pGID052 est présente par cellule, l'utilisation d'autres promoteurs, comme par exemple des promoteurs inductibles et forts, ou des promoteurs constitutifs reconnus par la machinerie de *O. oeni*, permettrait peut être d'obtenir une meilleure expression. Pour pallier justement à ce problème, la construction d'un vecteur d'expression dérivé du pGID052 est en cours au laboratoire.

Dans le cadre du projet européen, l'équipe de recherche dirigée par J. Lolkema a clonée l'ornithine décarboxylase *odc* et le transporteur *potE* de *O. oeni* chez *L. lactis*, sous contrôle du promoteur inductible à la nisine dans le pNZ8048. Mais aucune production de putrescine n'a été observée. Alors que le clonage du transporteur seul est fonctionnel. Des questions restent donc en suspens concernant l'expression des gènes de *O. oeni* en système d'expression hétérologue.

Suite aux différents échecs relatifs à la mutation et à l'expression du gène de l'ornithine décarboxylase chez *O. oeni*, la caractérisation du produit de ce gène a été menée par production de l'enzyme chez *E. coli* et caractérisation *in vitro* après purification. La partie codante du gène a été cloné sous contrôle du promoteur T7 fort et inductible en présence d'IPTG, ce qui explique en partie la réussite dans l'expression de l'ODC de *O. oeni* chez *E. coli*.

Article 1

Molecular cloning, heterologous expression, and characterization of ornithine decarboxylase from *Oenococcus oeni*

La putrescine est l'amine biogène principale du vin. Elle est synthétisée à partir de deux voies métaboliques : la voie de l'agmatine déiminase (AgDI) et la voie de l'ornithine décarboxylase (ODC).

A ce jour, le cluster de l'agmatine déiminase n'a pas été décrit chez *O. oeni*. Par contre, cette bactérie lactique possède le locus ADI (arginine déiminase), impliqué dans le catabolisme de l'arginine. Les gènes de la voie ont été caractérisés (Tonon *et al*, 2001) et le cluster se compose du gène *arcA* codant l'arginine déiminase, *arcB* codant l'ornithine transcarboxylase et *arcC* codant la carbamate kinase. Deux gènes *arcD1* et *arcD2* codent pour des protéines de l'antiport arginine/ornithine (Divol *et al*, 2003). Enfin, le gène *arcR*, situé en amont du cluster, coderait un régulateur transcriptionnel de l'opéron (Nehme *et al*, 2006). La dégradation de l'arginine produit de l'ATP et conduit à la synthèse d'ornithine. Cependant, peu de souches sont capables de produire de la putrescine à partir de l'ornithine *via* l'ornithine décarboxylase (Guerrini *et al*, 2002). En effet ce caractère dépend de la souche : il semble transmis par transfert horizontal (Marcobal *et al*, 2006) et est assez rare chez *O. oeni*. Il est supposé apporté un avantage sélectif, en particulier en ce qui concerne la survie en milieu acide.

Dans le cadre du projet européen BiamFood, le rôle du métabolisme des amines biogènes chez *O. oeni*, et notamment la synthèse de putrescine, devait être élucidé. Pour cela différentes stratégies ont été développées. Tout d'abord, nous avons cherché à muter le gène *odc* par simple recombinaison homologue. Mais cette approche risquée, compte tenu des verrous technologiques et génétiques de *O. oeni*, n'a pas abouti. Le vecteur pGID052, développé au laboratoire, a ensuite été employé afin d'exprimer les gènes codants l'ornithine décarboxylase et le transporteur *potE* de *O. oeni* BR14/97 (Guerrini *et al*, 2002) chez *O. oeni* ATCC BAA-1163. Une fois de plus, nous avons été confrontés à un échec. Afin de s'affranchir des problèmes d'expression rencontrés chez *O. oeni*, la caractérisation de l'ODC a été entreprise chez *E. coli*, à l'aide du système d'expression pET, sous contrôle d'un promoteur inductible et fort.

Molecular cloning, heterologous expression and characterization of ornithine decarboxylase from *Oenococcus oeni*

Maryse Bonnin-Jusserand, Cosette Grandvalet, Vanessa David, Hervé Alexandre*

Institut Universitaire de la Vigne et du Vin Jules Guyot, Université de Bourgogne, rue Claude Ladrey, BP 27877-21078 Dijon Cedex, France.

Correspondence to:
H. Alexandre: Tel 33.(0)3.80.39.63.93 Fax 33.(0)3.39.62.65 Email rvalex@u-bourgogne.fr

Running title: Characterization of ornithine decarboxylase from *Oenococcus oeni*.
Keywords: *odc* gene, ornithine decarboxylase, biogenic amine, *Oenococcus oe*ni

Journal of Food Protection, Vol.74, No.8, 2011, Pages 1309-1314, doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-466.
(IF 2009: 1,960)

Abstract

Ornithine decarboxylase (ODC) is responsible for the production of putrescine, the major biogenic amine found in wine. *Oenococcus oeni* is the most important lactic acid bacterium (LAB) in the winemaking process and is involved in malolactic fermentation. We report here the characterization of ODC from an *O. oeni* strain isolated from wine. Screening of 263 strains isolated from wine and cider from all over the world, revealed that the presence of the *odc* gene appears to be strain-specific in *O. oeni*. After cloning, heterologous expression in *E. coli* and characterization, the enzyme showed a MW of 85kDa and a pI of 6.2 and revealed maximal activity at pH 5.5 and an optimum temperature of 35°C. Kinetic studies showed that *O. oeni* ODC is specific for L-ornithine with a K_m value of 1 mM and a V_{max} of 0.57 U.mg $^{-1}$. The hypothesis that cadaverine, which results from lysine decarboxylation, may be linked to putrescine production does not stand up since *O. oeni* ODC cannot decarboxylate L-lysine. As no lysine decarboxylase was detected in any of the *O. oeni* genomes sequenced, cadaverine synthesis may result from another metabolic pathway. This work is the first characterization of an ODC from a LAB isolated from a fermented product.

All fermented foods (dairy products, beer, wine, cider, soybean sauces, fermented sausages, *etc.*) carry the risk of biogenic amine contamination (*18, 17*). High amounts of these molecules can cause undesirable physiological effects and can negatively alter the organoleptic properties of contaminated products (*4*). Indeed, the aromatic amines, histamine and tyramine, are regarded as undesirable compounds because of the potential toxic effects derived from their vasoactive and psychoactive properties (*21*).

There are two types of amino acid catabolic pathways that lead to biogenic amine formation. The decarboxylation pathways involve only two proteins, a decarboxylase and a transporter protein. The former converts the amino acid in the cytoplasm into the biogenic amine and carbon dioxide; the latter is responsible for the uptake of the amino acid from the medium and the excretion of the amine in an exchange process.
The physiological role of amino acid decarboxylative pathways in microorganisms is still uncertain: amine accumulation is generally considered a defense mechanism used by bacteria to counter an acidic environment (*14, 1*) but also a means to obtain metabolic energy through an electrogenic amino acid/amine antiport system leading to the generation of proton motive force (*14*). The latter function is particularly important in microorganisms that lack a respiratory chain to generate high ATP yields, such as lactic acid bacteria (LAB) (*9*).

Among the predominant LAB associated with wine fermentation, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Pediococcus* genera have been shown to produce biogenic amines (*16*). *Oenococcus oeni*, the bacterial species most commonly found in wines and most frequently associated with malolactic fermentation (MLF), has been reported to produce histamine (*3*).
Regarding putrescine production, *in silico* analysis of the three *Oenococcus oeni* genomes available did not reveal the presence of any *odc* homologs. Consistent with this, Granchi *et al*. (*6*) did not detect any putrescine producer among the 42 *Oenococcus oeni* strains tested. In contrast, Guerrini *et al*. (*7*) and Marcobal *et al.* (*12*) isolated *Oenococcus oeni* strains that did produce putrescine. Moreover, Marcobal *et al*. (*12*) identified an *odc* gene encoding a 745-amino-acid putative decarboxylase (ODC) (EC 4.1.1.17).
The biochemical characterization of ornithine decarboxylase has been poorly studied in bacteria and especially in lactic acid bacteria (*8*). Despite the importance of biogenic amines in fermented products, no studies have been conducted on lactic acid bacteria isolated from this environment. Only one study has reported the biochemical properties of ODC in a laboratory lactic acid bacterium, the collection strain *Lactobacillus* sp 30a previously isolated

from a horse stomach (*8*). In some bacteria like *Selenomonas ruminantium* (*19*), *Vibrio vulnificus* (*10*) and recently *Staphylococcus epidermidis* (*2*) it has been shown that ODC was also responsible for cadaverine production by lysine decarboxylation. Like putrescine, cadaverine is another diamine found in wine. These two molecules also called respectively diaminobutane and diaminopentane are chemically closed and could be produced *vi*a the same pathway. However in *Oenococcus oeni*, the origin of cadaverine is unknown and might be synthesized by ODC from lysine like in *Staphylococcus epidermidis*. Indeed Guerrini *et al*. (*7*), in a study of *O. oeni* producers, reported that putrescine and cadaverine are jointly produced. The purpose of the present work was to gain deeper insights into putrescine production by *O. oeni* given that the production of putrescine is a relevant property in food quality and safety.

Materials and methods

Bacterial Strains, Plasmids, Media, and Chemicals

A collection of 263 *Oenococcus oeni* isolates obtained from wines or cider from all over the world was used in this work (Fig 1).

O. oeni odc+ strains were tested for putrescine and cadaverine production in LAC medium composed of 78 mL. L^{-1} white grape juice, 33 g. L^{-1} yeast extract, 0,6 mL. L^{-1} tween 80 and 0,8 g. L^{-1} $MnSO_4$, H_2O, pH 5.

*Escherichia col*i strain ER2738 was used as the host for gene cloning and strain BL21 (DE3) for plasmid propagation. pCR-XL-TOPO vector (Invitrogen) was used for sub-cloning, while pET-28a (Novagen) was used as the cloning and expression vector. BamHI and NdeI were purchased from Invitrogen and Ni-NTA resin from QIAGEN.

Screening for the presence of the odc *gene*

Screening for the ornithine decarboxylase gene was performed by polymerase chain reaction (PCR). Genomic DNA was extracted from bacterial cultures grown to the stationary phase with the DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, France). The primers ODC V1 (5' AATAAGAGTTTAC ATTGGGGAA3') and ODC V3 (5'TGAGTTTCTGCAGGTGTCATT3) were used to amplify a fragment of 1900 bp from the *odc* gene. The 25µl reaction mix contained 5 µl of 5X Green GoTaq Flexi buffer (Promega,

Madison WI USA), 1.5 µl $MgCl_2$ 25 mM (Promega, Madison WI USA), 0.5 µl of dNTP mix 10 mM each (Fermentas), 1.25 µl of each primer at 20 µM, 0.1 µl Taq polymerase (5U μl^{-1}) (Promega, Madison WI USA) and 1µl of DNA template. PCR amplification was performed using the following protocol: initial cycle of 95°C for 5 minutes, 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 2 minutes. The PCR products were observed by electrophoresis on a 1% agarose gel using Tris-acetate EDTA buffer and ethidium bromide. The identity of the amplified products was confirmed by sequencing the amplicon of the positive strains.

Cloning of odc

The ornithine decarboxylase gene from *O. oeni* was amplified with primers (5'-GGGCATATGGATAGCGAAATAAATGATGA-3') and (5'-CCGGGATCCTCATCTTTTTTCTTCATCTTTTGA-'3') containing a restriction site for NdeI and BamHI (restriction sites are underlined). The primers were designed from the sequence of the *odc* gene published (*13*) (GenBank accession number CAG34069.1). Amplification reactions were performed in a final volume of 50 µl containing 5 µl Expand High Fidelity buffer (10X) with 15 mM MgCl2 (Roche), 1 µl of 10 mM dNTP mix (Fermentas), 1 µl of each primer at 20 µM, 2.6 U Expand High Fidelity enzyme mix (Roche) and 1µl of template DNA. Amplifications were carried out in a thermocycler (Biorad,) with the following program: initial denaturation at 94°C for 2 min; followed by 10 cycles at 94°C for 15 seconds, 55°C for 30 seconds, 72°C for 1.5 min; then 20 cycles with the same conditions but with an additional prolongation of 5 seconds for each successive cycle; and a final prolongation of 7 min at 72°C. The DNA fragment obtained (2238 bp) was cloned into a pCR-XL-TOPO vector using the TOPO XL PCR cloning kit (Invitrogen) with One Shot Mach1-T1 chemically competent *E. coli* (Invitrogen). The positive clone obtained was named pTOPO-odc.

Construction of the pET Expression Vector

The *odc* gene was removed from pTOPO-odc by digestion with NdeI and BamHI, excised from the agarose gel and purified with GenElute PCR Clean up Kit (Sigma). The purified *odc* fragment was then ligated with T4 DNA ligase (Invitrogen) into the pET-28a vector previously digested with the same enzymes and dephosphorylated with the Antartic

Phosphatase (New England BioLabs). *E. coli* ER2738 competent cells were transformed by electroporation with the ligation product. Positive transformants were selected on LB agar plates containing 50 µg ml^{-1} kanamycine. Insertion of the *odc* gene was confirmed by restriction analysis with NdeI and BamHI and sequencing. The recombinant plasmid was named pET-odc and propagated in *E. coli* BL21 (DE3). The expressed protein carried an N-terminal His6-Tag encoded by the expression vector.

Production and Purification of the Recombinant protein

E. coli BL21 (DE3) harboring the pET-odc vector was inoculated into 10 ml LB broth supplemented with 50 µg ml^{-1} kanamycine. Overnight cultures were transferred to 500 ml of the same medium and cultivated at 37°C until an OD_{600nm} of 0.7 was obtained. IPTG was added to a final concentration of 50 µM, and the following conditions were applied for protein expression: 15°C for 20 h. After induction, the cells were harvested by centrifugation (3,000 g, 15 min, 4°C), and the pellet was washed once with 50 mM NaH_2PO4, pH 8.0. The cells were resuspended in buffer A (50 mM NaH_2PO4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0), and disrupted with 1.4 kbar using the one shot cell disrupter (Constant Systems LTD). Cell debris was separated from the supernatant by centrifugation (10,000 g, 20 min, 4°C) to obtain the crude extract. The crude extract containing the recombinant ornithine decarboxylase was purified under native conditions by Ni-NTA (QIAGEN) resin previously equilibrated with buffer A according to the manufacturer's recommendations. Recombinant protein was eluted with 80 mM imidazole. The purity and apparent molecular mass of the eluted protein were determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. SDS-PAGE was carried out in gels containing 10% (w/v) polyacrylamide according to standard protocols using Bio-Rad Mini-PROTEAN equipment. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 and destained with methanol/ acetic-acid/water (5/1/4, v/v/v). Isoelectric focusing PAGE was performed using the Protean IEF Cell (BioRad). An 18 cm linear pH 3-10 IPG strip (BioRad) was used as an isoelectric point marker. Protein concentration was determined using a Bio-Rad protein assay kit with BSA as the standard.

Enzyme Activity Assay

Assays were conducted in 2mL reaction volume containing 50mM citrate-phosphate buffer pH 5.5, 2 mM ornithine, 25 mg L^{-1} BSA, 0.5 µM PLP, 0.5mM EDTA and 0.5mM DTT. The

reaction was started by adding 50µL ornithine decarboxylase (1mg mL^{-1} protein) and the mixture was incubated for 1h at 35°C. The reaction was stopped by adding 1mL of the reaction sample to 1.75mL borate buffer (1 M, pH 9) and 750 µL methanol. The samples were derivatized for HPLC analysis. One unit corresponds to 1 µmol putrescine min^{-1} mg^{-1} proteins.

The activity of the ornithine decarboxylase from *O. oeni* was tested towards, L-citrulline, L-2,4-diaminobutyric acid, D-ornithine, L-arginine, L-glutamine, L-histidine, 6-aminocaproic acid, 2,6-diaminopimelic acid and L-lysine at 2 mM concentration using the assay conditions described above.

Reaction of Derivatization and HPLC Analysis.

Aminoenone derivatives were obtained by adding 40 µl of internal standard (2,4,6-trimethylphenethylamine hydrochloride 2 mg mL^{-1}), and 30 µL of DEEMM (diethyl ethoxymethylenemalonate) to the sample containing borate buffer and methanol. After 30 min in an ultrasound bath, the sample was then heated to 70°C for 2 h to allow complete degradation of excess DEEMM and reagent byproducts.

The analyses were performed according to Gomez-Alonso *et al*. (*5*) on a Varian HPLC (Varian Inc., Walnut Creek, CA) using an Alltech (Grace) HPLC column (C18-HL) particle size 5 µm (250 mm X 4.6 mm) thermostatized at 16°C through the binary gradient (phase A, 25 mM acetate buffer pH 5.8 with 0.02% sodium azide; phase B, 80:20 mixture of acetonitrile and methanol) and a flow rate 0.9 mL min^{-1}. For detection, a photodiode array detector monitored at 280 nm was used. The target compounds were identified according to the retention times and UV-vis spectral characteristics of the derivatives of the corresponding standards and were quantified using the internal standard method.

Results and Discussion

Screening for the ornithine decarboxylase gene

PCR amplification was used to screen for the ornithine decarboxylase (*odc*) gene among 263 *O. oeni* strains collected from wine and cider all over the world (Fig 1). Five of the 263 strains gave the expected size amplicon (1,900 bp) which reflected the presence of the *odc* gene (Fig. 2). Among these five strains, three were isolated from wine and came from South Africa

(SA.BO 34), Italy (BR14/97) and the Languedoc Roussillon region (DIV7 A.3) located in the south of France. The two other strains (DBA and DIV 5.74) were isolated from cider in the Normandie region of France (Coton M. & Coton E.). So these strains are well representative of the biodiversity of the *O. oeni* specie. Our results support the view of Marcobal *et al*. (*13*) that the presence of the *odc* gene is a rare event in *O. oeni*. We confirm this point by our large screening of *O. oeni* strains. Futhermore, according to these authors, the *odc* gene is acquired *via* horizontal gene transfer and was found in a genetic environment containing several transposases and phage-related proteins. In order to verify that the PCR products obtained corresponded to the expected *odc* gene, the fragments were sequenced. Analysis of the nucleotide sequences obtained revealed 97% identity within the sequence of the *odc* gene from the strain *O. oeni* RM83 (GI 54260934), while ODC proteins sequences are 100% identical to the RM83 ODC except for the two strains isolated from cider (Fig 3). Indeed we can distinguish, from the proteins alignment, two kind of ODC depending on the habitat (wine or cider) of *O. oeni*. Differences in sequence involved the two *O. oeni* strains isolated from cider. Amino acid H31 is replaced by R and V448 is replaced by I in DBA and DIV 5.74 strains. D620 is replaced by N only in DBA. These changes don't affect the catalytic domain and the PLP binding domain of the enzyme as these changes are located in the N-terminal, C-terminal domain and at the end of the "small" domain.

The *odc* gene was first identified in the strain RM83 and sequenced (*13*). Also this is the only *odc* sequence from an *O. oeni* strain available since none of the sequenced genome carries this gene.

Among the five odc^+ strains, the BR14/97 strain was chosen to clone and characterize the *odc* gene because of its high capacity to produce a large amount of both putrescine and cadaverine (*7*). This was confirmed by measuring biogenic amines in LAC medium by HPLC. *O. oeni* BR14/97 strain produced 6,5 mg. L^{-1} putrescine and 4,6 mg. L^{-1} cadaverine, while SABO 34 produced 12,5 mg. L^{-1} putrescine and 6,0 mg. L^{-1} cadaverine and DIV7 A.3 produced 9,8 mg.L^{-1} putrescine and 4,3 mg.L^{-1} cadaverine. Futhermore BR14/97 is representative of the five isolated since their *odc* sequences are highly similar (Fig 3). Indeed *odc* gene was sequenced for all these strains. Corresponding accession numbers are as follow: FR751075 for DIV7A.3, FR751076 for DBA, FR751077 for DIV5.74, FR751078 for SA.BO 34 and FR751079 for BR14/97.

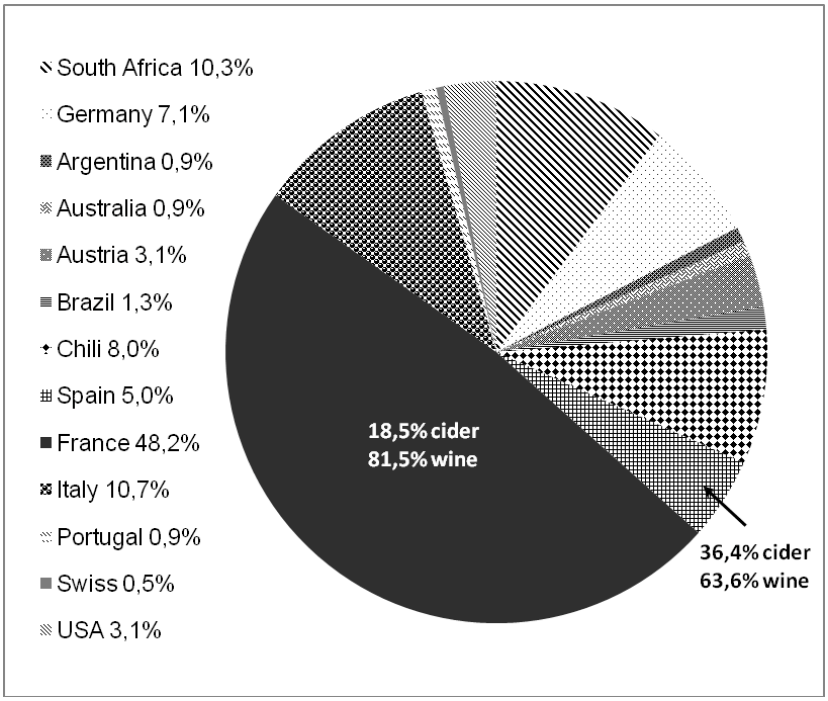


Figure 1: Geographical distribution of the 263 *O. oeni* strains isolated from wine and cider.

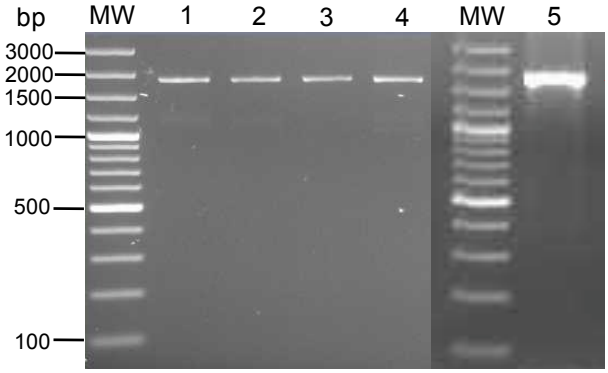
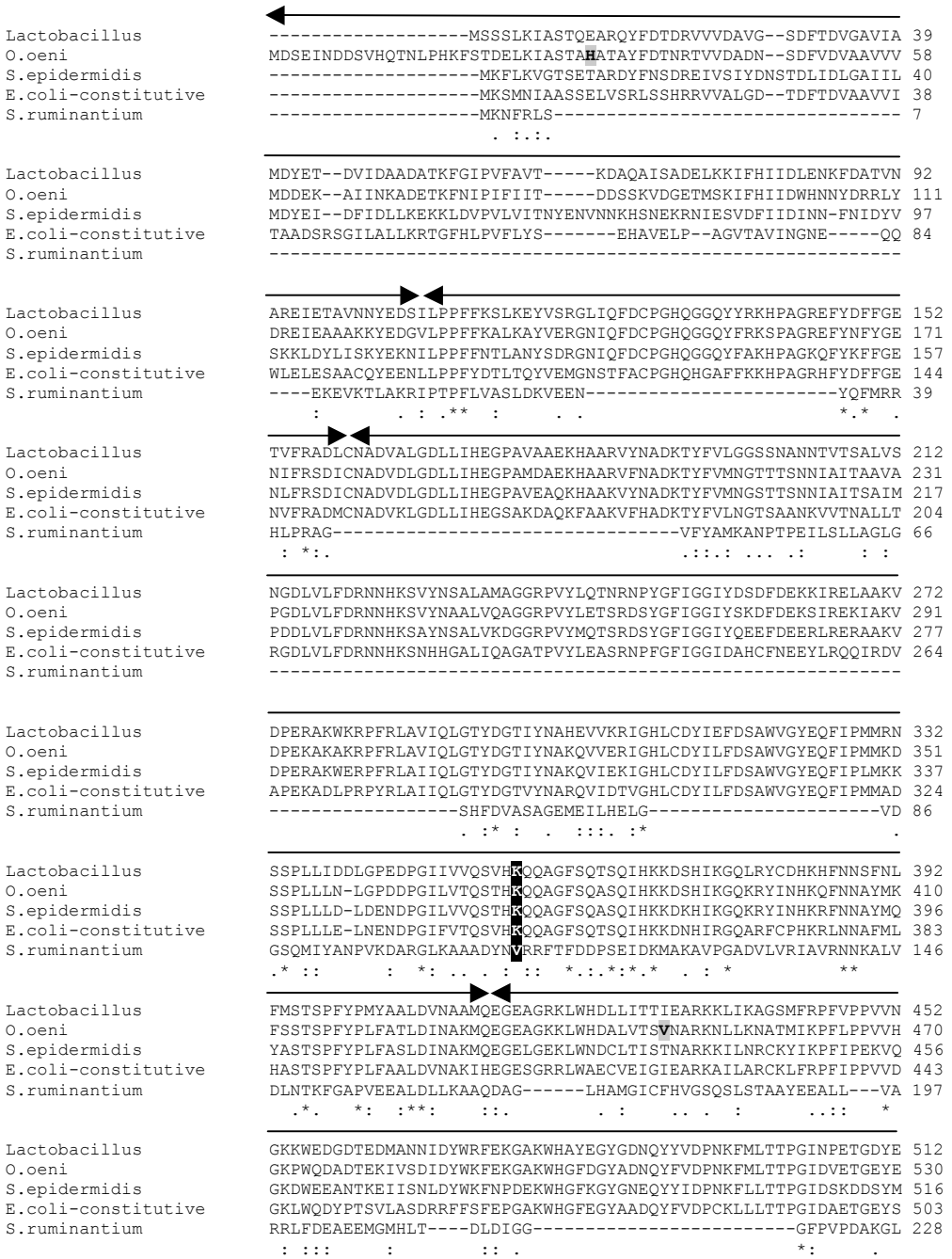


Figure 2: Screening of *odc* gene by PCR amplification in different *Oenococcus oeni* strains. MW: Molecular Weight marker, wells 1 to 5: *O. oeni* DBA, DIV 5.74, DIV 7.A3, SA.BO 34 and BR14/97. The amplification of *odc* reveals a single band of 1900 bp.

Cloning of the O. oeni *decarboxylase gene into* E. coli.

Genomic DNA extracted from the *O. oeni* BR14/97 strain was amplified and a fragment with approximately 2,200 bp was obtained. As this fragment comprised the complete *odc* gene it was directly cloned into pET-28a. The recombinant plasmid obtained named pET-odc was

propagated in *E. coli* ER2738 and then introduced into *E. coli* BL21 (DE3) to produce the His6-tagged recombinant ODC protein. The presence of the insert in the recombinant plasmid was verified by digestion with NdeI and BamHI and identity was confirmed by sequencing, which showed that the *odc* gene was successfully inserted in frame with the sequence encoding the His6-tag. The deduced amino acid sequence of the recombinant protein presented 745 residues with a theoretical molecular mass of 85 kDa and showed an identity of 67% and 55%with the ornithine decarboxylase of *Lactobacillus* 30a and *E. coli* K12 substr. W3110 respectively (Fig. 3).



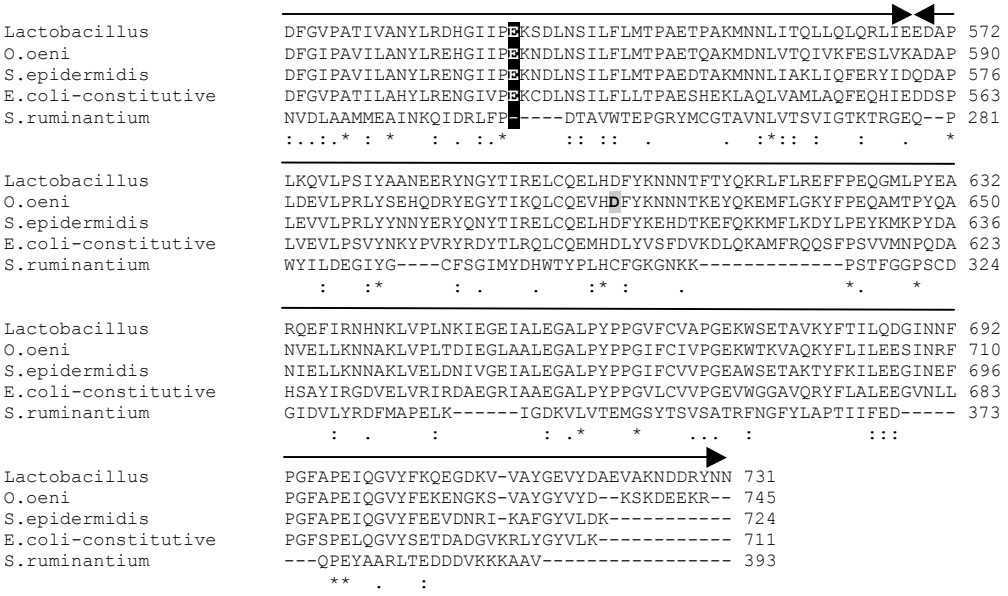


Figure 3: Alignment of ODC from *Lactobacillus* sp 30a, *O. oeni* RM83, *S. epidermidis* 2015B, *E. coli* K12 substr. W3110 (constitutive enzyme) and LDC of *S. ruminantium*. Highlighted in black are the conserved residues of *Lactobacillus* 30a involved 1) in PLP binding (Lysine 355) and 2) in substrate binding (Glutamic acid 532) (*16, 23*). Both residues are conserved among ODC bacteria specific of L-ornithine which were biochemically studied. The *Lactobacillus* 30a sequence is divided into five domains: the amino-terminal domain (1), the linker domain (2), the PLP-binding domain (3), the small domain (4) and the carboxy-terminal domain (5).
Highlighted in grey are the residues which change between the ODC sequences of the five *O. oeni odc*+ strains.

Expression and Purification of the Recombinant Decarboxylase

After the gene sequence was confirmed, the *E.coli* BL21 (DE3) cells containing the plasmid pET-odc were induced. Different induction periods (12 and 20 h), IPTG concentrations (50 µM and 100 µM) and temperatures (15°C and 25°C), were applied for expression of recombinant *odc*. Recombinant *odc* was expressed after 20 h of induction with 50 µM IPTG at 15°C and the protein was purified to homogeneity from cell lysates by metal-affinity chromatography on nickel nitriloacetate resin. His6-tagged protein was eluted with 90 mM imidazole, which migrated as a single band with an apparent molecular mass of about 85 kDa

in SDS-PAGE (Fig 4). Such electrophoretic mobility was consistent with the theoretical molecular mass (85 kDa) predicted for the full-length recombinant protein.

IEF–PAGE analysis revealed one protein band with a pI value of 6.2 which is rather different from the pI value of 4.55 of *Lactobacillus* 30a (*8*) and the pI value of 4.7 of *Selenomonas ruminantium* (*20*).

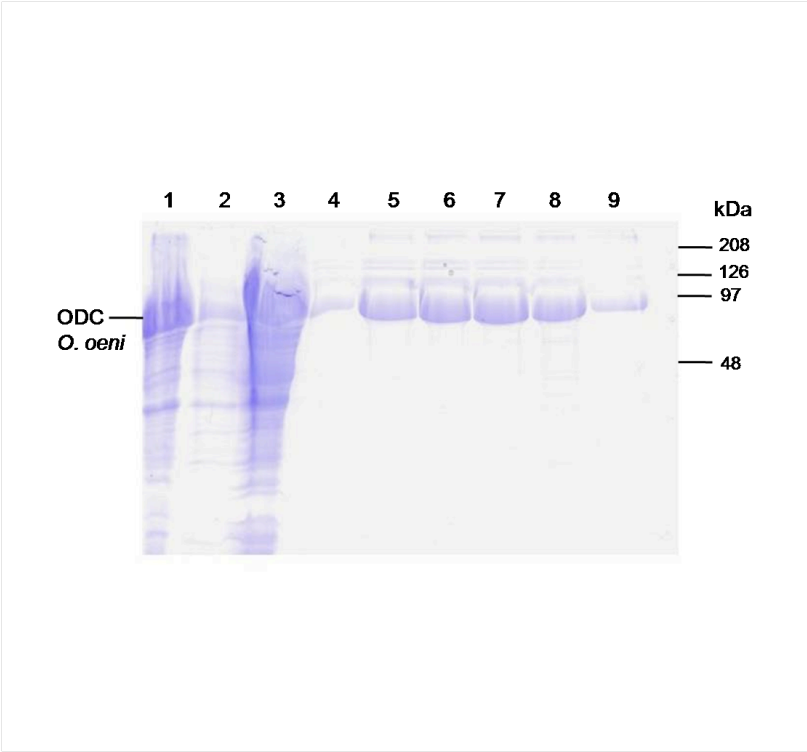


Figure 4: Different steps of the ODC purification on SDS-Page gel. Wells: 1- crude extract, 2- sample not retained on the Ni NTA resin, 3- wash of the resin, 4- elution with 50 mM imidazole, 5- elution with 60 mM imidazole, 6- elution with 70 mM imidazole, 7- elution with 80 mM imidazole, 8- elution with 90 mM imidazole, 9-elution with 100 mM imidazole.

Biochemical Characterization of ornithine decarboxylase

Optimal temperature, pH and kinetic parameters of the enzyme were determined from recombinant ornithine decarboxylase. The enzyme displayed a temperature optimum at 35°C and showed 20% of relative activity at 25°C. The optimal pH for ornithine decarboxylase was found to be 5.5 (Fig. 5).

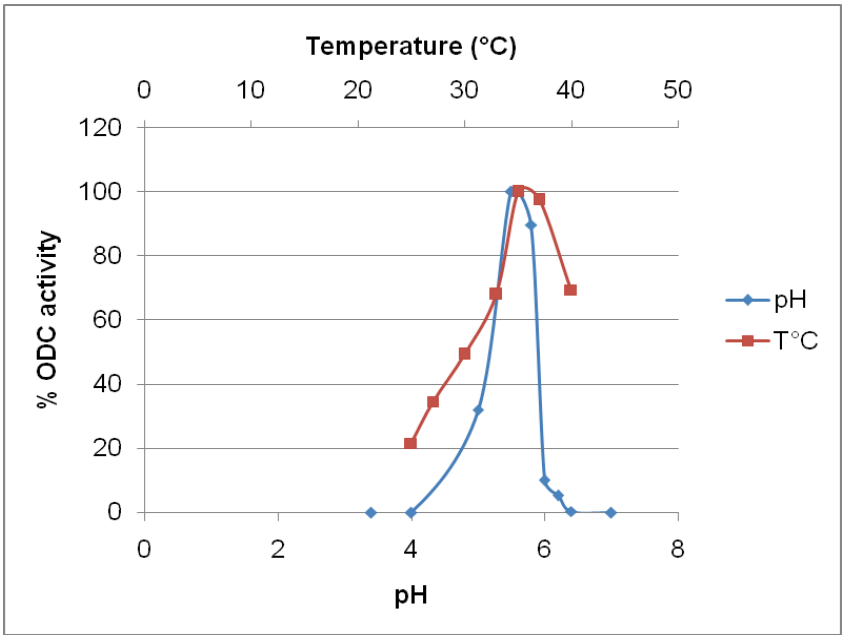


Figure 5: Effect of pH (3.4-7) and temperature (25-40°C) on recombinant ornithine decarboxylase activity. Data are the means ±SD of three independent experiments.

The behavior presented by this enzyme is rather different from that of *E. coli* constitutive ODC, whose optimal pH is 8.1. Also the optimal pH of the lysine decarboxylase (LDC) of *S. ruminantium* (GI 2897824) is 6.0 and pH stability for enzymatic activity ranges between 5.5 and 8.0 (*19*).

K_m and V_{max} values for the ornithine decarboxylase were calculated from the plot initial velocity vs. substrate concentration (Fig. 6). The K_m and V_{max} values were respectively 1 mM and 0.57 U mg^{-1} proteins. V_{max} and K_m for ornithine decarboxylase are the lowest reported compared to the kinetic constants of *Lactobacillus* 30a which are respectively 200 U mg^{-1} proteins and 1.7 mM (*8*) and *S. ruminantium* showing a V_{max} for L-ornithine of 6.71 U mg^{-1} and a K_m of 1.2 mM (*19*), while K_m of *E. coli* constitutive ODC is 5.6 mM.

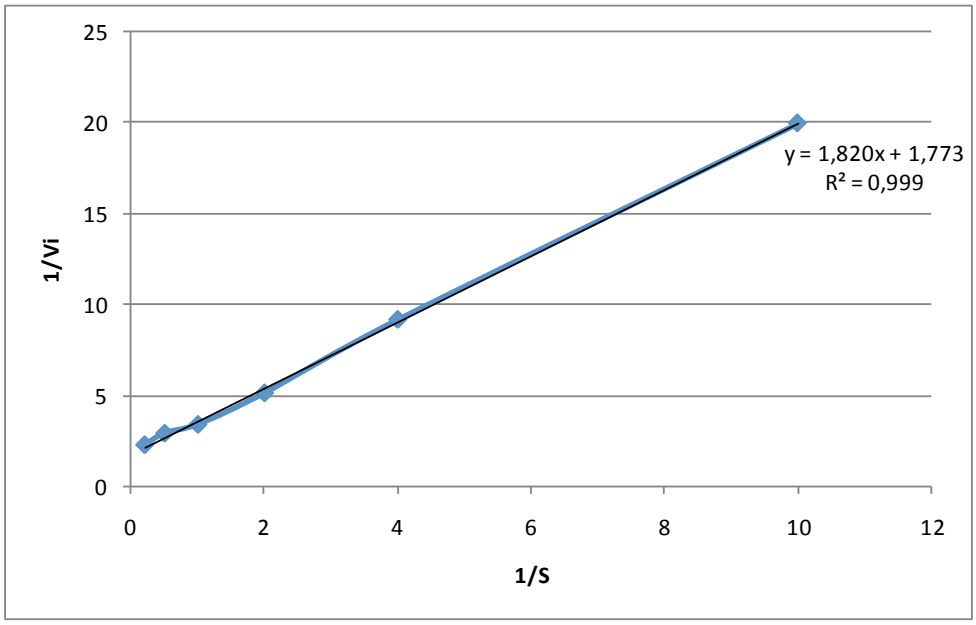


Figure 6: Lineweaver-Burk plots of ornithine decarboxylase (representative of three experiments). Vi (µg min^{-1} mg^{-1} enzyme), S ([L-ornithine] mM).

It can be seen that recombinant decarboxylase is more selective for ornithine, despite presenting a lower V_{max} for this substrate. The low affinity constant could reflect the low abundance of ornithine in wine (*7*), the natural habitat of *O. oeni*.

The substrate specificity of ornithine decarboxylase was investigated using various synthetic substrates which are other diaminocarboxylic acids with $NH_2(CH_2)_nCH(NH_2)COOH$ as the general chemical structure: D-ornithine, L-arginine, L-glutamine, L-histidine, L-citrulline, L-lysine, L-2,4-diaminobutyric acid, 6-aminocaproic acid and 2,6-diaminopimelic acid. However, the enzyme has no activity towards any of the substrates tested. In contrast to other bacteria such as *S. ruminantium* (*11*), ODC from *O.oeni* has absolute specificity as a decarboxylase for L-ornithine.

LDC of *S. ruminatium* shows very low identity (about 10%) with ODC of *O. oeni*. This protein is different in size. Indeed ODC from this bacterium is shorter: 393 amino acids. Moreover *S. ruminantium* LDC was reported to be closer to eukaryotic ornithine decarboxylase than to prokaryotic ODC (*20*). Regarding *S. epidermidis* ODC, this enzyme shows better identity (24%) with the lysine/arginine/ornithine decarboxylase of *Sinorhizobium meliloti* (GI 193782595) than with the lysine/ornithine decarboxylase of *S. ruminantium* (17%). This point can be explained by the fact that *S. epidermidis* and *S. meliloti*

enzymes are carried on a plasmid compared to the other ODC. These observations suggest a different evolution for *S. ruminantium*, *S. epidermidis* and *O. oeni*.

ODC of the *O. oeni* BR14/97 strain cannot decarboxylate L-lysine, suggesting that another metabolic pathway is used to produce cadaverine. Indeed, no lysine decarboxylases are present in the three *O. oeni* genomes sequenced indicating that the genes responsible for cadaverine synthesis could be carried on a mobile genetic element like a plasmid, for example, or could come from horizontal gene transfer. In addition, nothing is known about ODC regulation. However Yamaguchi *et al.* (*23*) characterized an antizyme in *S. ruminantium*: the P22 protein, a constituent of the ribosomal 50S subunit from the ribosomal L10 superfamily. A 50S ribosomal protein L10 was found by screening the *O. oeni* PSU-1 genome (NC008528), as well as the *O. oeni* AWRIB429 genome (NZ ACSE00000000) with the BLAST tool (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Both *O. oeni* proteins exhibit 33% identity with the P22 protein of *S. ruminantium*. Degradation of ODC by an antizyme in *O. oeni* could be a way to regulate ODC expression.

Acknowledgements

We are grateful to Lisa Granchi for the kind gift of the *O. oeni odc*+ strain BR14/97.

This work was supported by the European Community's Seventh Framework Program, grant agreement no. 211441-BIAMFOOD.

References

1-Bearson, S, B. Bearson, and J. W. Foster. 1997. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 147: 173-80.

2-Coton, E., N. Mulder, M. Coton, S. Pochet, H. Trip H and J. S. Lolkema. 2010. Origin of the putrescine-producing ability of the coagulase-negative bacterium *Staphylococcus epidermidis* 2015B. *Appl Environ Microbiol.* 76: 5570-5576.

3-Coton, E., G. C. Rollan, and A. Lonvaud-Funel. 1998. Histidine carboxylase of *Leuconostoc oenos* 9204: purification, kinetic properties, cloning and nucleotide sequence of the *hdc* gene. *J Appl Microbiol.* 84: 143-51.

4-Garcia-Villar, N., S. Hernandez-Cassou and J. Saurina. 2007. Characterization of wines through the biogenic amine contents using chromatographic techniques and chemometric data analysis. *J Agric Food Chem.* 55: 7453-61.

5-Gomez-Alonso. S., I. Hermosian-Gutearrez, and E. Garcia-Romero. 2007. Simultaneous HPLC Analysis of Biogenic Amines, Amino Acids, and Ammonium Ion as Aminoenone Derivatives in Wine and Beer Samples. *J Agric Food Chem.* 55: 608-613.

6-Granchi, L.G., D. Talini, S. Rigacci, S. Guerrini, A. Berti, and M. Vincenzini. 2006. Detection of putrescine-producer *Oenococcus oeni* strains by PCR. 8th Symposium On Lactic Acid Bacteria, The Netherlands.

7-Guerrini, S., S. Mangani, L. Granchi, and M Vincenzini. 2002. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Curr Microbiol.* 44: 374-8.

8-Guirard, B. M., and E. E. Snell. 1980. Purification and properties of ornithine decarboxylase from *Lactobacillus sp*. 30a. *J Biol Chem.* 255: 5960-4.

9-Konings, W. N. 2002. The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 82: 3-27.

10-Lee, J., A. J. Michael, D. Martynowski, E. J. Goldsmith and M. A. Phillips. 2007. Phylogenetic diversity and the structural basis of substrate specificity in the b/a-barrel fold basic amino acid decarboxylases. *J Biol Chem.* 282: 27115-25.

11-Liao, S., P. Poonpairoj, K. C. Ko, Y akatuska, Y. Yamaguchi, N. Abe, J. Kaneko and Y. Kamio. 2008. Occurrence of agmatine pathway for putrescine synthesis in *Selenomonas ruminatium*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72: 445-55.

12-Marcobal, A., B. de las Rivas, M. V. Moreno-Arribas and R. Munoz. 2004. Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiol Lett.* 239: 213–220.

13-Marcobal, A., B. de las Rivas, M. V. Moreno-Arribas and R. Munoz. 2006. Evidence for horizontal gene transfer as origin of putrescine production in *Oenococcus oeni* RM83. *Appl Environ Microbiol* 72: 7954-8.

14-Molenaar, D., J. S. Bosscher, B. ten Brink, A. J. Driessen, and W. N. Konings. 1993. Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *J Bacteriol.* 175: 2864-70.

15-Momany, C., S. Ernst, R. Ghosh, N.L. Chang, and M. L. Hackert. 1995. Crystallographic structure of a PLP-dependent ornithine decarboxylase from *Lactobacillus* 30a to 3.0 A resolution. *J Mol Biol.* 252: 643-55.

16-Nannelli, F., O. Claisse, E. Gindreau, G. de Revel, A. Lonvaud-Funel and P. M. Lucas. 2008. Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *Lett Appl Microbiol.* 47: 594-9.

17-Novella-Rodriguez, S., M. T. Veciana-Nogues, A. X. Roig-Sagues, A. J. Trujillo-Mesa and M. C. Vidal-Carou. 2004. Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat cheeses from pasteurized and raw milk. *J Dairy Res.* 71: 245-52.

18-Suzzi, G., and F. Gardini. 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int J Food Microbiol.* 88: 41-54.

19-Takatsuka, Y., M. Onoda, T. Sugiyama, K. Muramoto, T. Tomita and Y. Kamio. 1999a. Novel characteristics of *Selenomonas ruminantium* lysine decarboxylase capable of decarboxylating both L-lysine and L-ornithine. *Biosci Biotechnol Biochem.* 63: 1063-9.

20-Takatsuka, Y., T. Tomita, and Y. Kamio. 1999b. Identification of the amino acid residues conferring substrate specificity upon *Selenomonas ruminantium* lysine decarboxylase. *Biosci Biotechnol Biochem.* 63: 1843-6.

21-Vidal-Carou, M.C., M.L. Latorre-Moratalla, M.T. Veciana-Nogue´s, S. Bover-Cid, F. Todra`, Y.H. Hui, I. Astiasara´n, Nip. Wai-Kit, J.G. Sebranek, E.T.F. Silveira, L.H. Stahnke

and R. Talon. 2007. Biogenic amines: risks and control, p. 455-468. *In* Poultry Blackwell Publishing (ed.), Handbook of Fermented Meat, Oxford UK.

22-Vitali, J., D. Carroll, R. G. Chaudhry, and M. L. Hackert. 1999. Three-dimensional structure of the Gly121Tyr dimeric form of ornithine decarboxylase from *Lactobacillus* 30a. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 55: 1978-85.

23-Yamaguchi, Y., Y. Takatsuka, S. Matsufuji, Y. Murakami and Y. Kamio. 2006. Characterization of a counterpart to mammalian ornithine decarboxylase antizyme in prokaryotes. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 3995-4001.

Article 2

Tyrosine-containing peptides are precursors of tyramine produced by *Lactobacillus plantarum* IR BL0076 strain isolated from wine

La production d'amines biogènes dans le vin dépend de facteurs environnementaux. Un pH bas (Lonvaud-Funel & Joyeux, 1994), de fortes teneurs en éthanol et peu de PLP (Gardini *et al*, 2005), un cofacteur enzymatique, permet de réduire la formation d'amines biogènes. Un des facteurs majeurs est la concentration en azote, et plus précisément en acides aminé libres, directement liée à la production d'amines biogènes. En effet, la synthèse de décarboxylases, telles que l'histidine décarboxylase ou la tyrosine décarboxylase, est induite respectivement en présence d'histidine (Pessione *et al*, 2005) et de tyrosine (Moreno-Arribas *et al*, 2000) pour différentes espèces de Lactobacilles. L'accumulation d'amines biogènes augmente également lors du stockage des vins sur lies de levures (Marques *et al*, 2008), avec la libération de composés azotés du à l'autolyse des levures.

Bien que les acides aminés soient connus en tant que précurseurs directs des amines biogènes, aucune étude n'a été effectuée sur la capacité des peptides à être utilisés par les bactéries lactiques pour la synthèse d'amines biogènes. Cependant, les bactéries lactiques, actrices des fermentations malolactiques, possèdent un système protéolytique. C'est le cas de *Oenococcus oeni* qui possède une protéase extracellulaire EprA (Folio *et al*, 2008). De plus une protéase assimilée à PrtP a été identifiée chez un isolat de *Lactobacillus plantarum* (Strahinic *et al*, 2009). Plus généralement, le génome de *L. plantarum* code pour des transporteurs de peptides ainsi qu'un certain nombre de peptidases intracellulaires (Kleerebezem *et al*, 2003). Le but de cette étude est de tester, dans un premier temps, la capacité d'une souche de *L. plantarum*, isolée de vin et productrice de tyramine, à produire cette amine biogène à partir de peptides contenant la tyrosine. Puis l'hydrolyse intra- ou extra-celullaire des peptides sera étudiée.

Tyrosine-containing peptides are precursors of tyramine produced by *Lactobacillus plantarum* IR BL0076 strain isolated from wine

Maryse Bonnin-Jusserand, Cosette Grandvalet, Hervé Alexandre*

Institut Universitaire de la Vigne et du Vin Jules Guyot, Université de Bourgogne, rue Claude Ladrey, BP 27877-21078 Dijon Cedex, France.

Correspondence to:
H. Alexandre: Tel 33.(0)3.80.39.63.93 Fax 33.(0)3.39.62.65 Email rvalex@u-bourgogne.fr

Key words: tyramine, peptides, *Lactobacillus plantarum*, wine.
Running title: Tyramine production by *L. plantarum* from synthetic peptides.

Soumission prevue dans Applied Microbiology and Biotechnology

Abstract

Biogenic amines are molecules with allergenic properties, found in fermented products and synthesized through the decarboxylation of amino acids present in the food matrix by lactic acid bacteria. The concentration of biogenic amines is influenced by many environmental factors. Among them, the quantity of precursors is directly involved in biogenic amines accumulation. Moreover there is a correlation between biogenic amines production in wine, and oenological practices which lead to an enrichment in nitrogen compounds. Up to date free amino acids are the only precursors known for the formation of biogenic amines, and no direct link has been shown between the use of peptides by lactic acid bacteria and biogenic amines synthesis. Therefore the aim of this study was to check the ability of a *Lactobacillus plantarum* strain isolated from a red wine, to hydrolyze peptides and to determine if the peptides are degraded, in the extracellular medium or inside the cell.

Introduction

Biogenic amines (BA) are molecules found in a wide range of fermented foods and present physiological effects on health due to food poisoning (Silla Santos, 1996; Bauza *et al*, 1995). Among BA, histamine and tyramine in particular induces hypertension and headaches (Hannington, 1967). BA are mainly produced through the decarboxylation of amino acids (AA) precursors by lactic acid bacteria (LAB) (Marques et al, 2008). Histamine (Lonvaud-Funel & Joyeux, 1994), putrescine (Marcobal *et al*, 2004), tyramine (Moreno-Arribas *et al*, 2000) and cadaverine (Guerrini *et al*, 2002) are the main BA found in wine and are produced, during malolactic fermentation and storage, by LAB belonging to different genera: *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus*. Regarding tyramine, the main producers are species from the *Lactobacillus* genus (Moreno-Arribas *et al*, 2000).

Several studies have been made to determine factors influencing BA production in wine. Low pH (Lonvaud-Funel & Joyeux, 1994), high ethanol concentration and low concentration of pyridoxal-5-phosphate (Gardini *et al*, 2005), an enzymatic cofactor, allow for the reduction of BA accumulation. The viticulture region, grape varieties (Marques *et al*, 2008; Hernandez-Orte *et al*, 2006) and vintage (Herbert *et al*, 2005) also affect BA content. To avoid BA accumulation, commercially selected malolactic starters are added (Marques *et al*, 2008; Lonvaud-Funel, 2001). One of the major factors is the concentration in amino acids or more broadly in nitrogen, directly related to BA production (Silla Santos, 1996). On one hand, free amino acids precursors induce BA formation: the histidine and tyrosine decarboxylases are both enzymes respectively induced by histidine in *Lactobacillus* sp. (Pessione *et al*, 2005) and by the addition of tyrosine in *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus hilgardii* (Moreno-Arribas *et al*, 2000). Also wine composition in AA and biogenic amines has been analyzed by HPLC in order to correlate amounts of both molecules (Soufleros *et al*, 2007; Pereira *et al*, 2008). On the other hand Bach *et al*, (2010) have shown recently that the final concentration in BA increases with the addition of nitrogen during alcoholic fermentation. Furthermore, it has been shown that storage on lees (Marques *et al*, 2008) allows an increase in BA production due to nitrogen compounds released by yeasts after autolysis. This reaction occurs by the breakdown of yeasts cell membranes and hydrolytic enzymes are released to degrade components of the medium (Babayan & Bezrukov, 1985). Therefore, the medium is enriched in protein, peptides and free amino acids.

Although free AA are precursors of BA, one can wonder whether peptides could be directly BA precursors too, as peptides are also present in wine and participate at the enrichment in nitrogen. Moreover, LAB performing MLF have a proteolytic system and could degrade peptides in the extracellular or intracellular medium and then decarboxylate AA to produce BA. Indeed, *O. oeni* exhibits a proteolytic activity against peptides from white and red wine (Manca de Nadra *et al*, 1997, Manca de Nadra *et al*, 1999). Furthermore an extracellular protein with protease activity EprA has been characterized (Folio *et al*, 2008). Nevertheless, it seems that *O. oeni* proteolytic activity is dependent on medium composition and bacterial growth phase (Leitao *et al*, 2000). Also regarding *Lactobacillus plantarum*, a proteinase named PrtP was identified for one isolate (Strahinic *et al*, 2009). The aim of this study was to test the ability of *L. plantarum* to produce tyramine from synthetic peptides containing tyrosine, and to investigate if peptides are metabolised, that is to say either inside the cell or in the extracellular medium.

Materials and methods

Strain

Lactobacillus plantarum IR BL0076 (provided by B. Bach, Inter-Rhône, France) was isolated from wines of the Rhône Valley during aging. This strain produces tyramine and was chosen to conduct the experiments.

L. plantarum *identification*

L. plantarum DNA was extracted using the Wizard Genomic Kit (Promega). Then a PCR with the 16S rRNA universal primers BSF8 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) and BSR1541 (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA) (Edwards *et al*, 1989) was performed with the following amplification program: 95°C, 5 min; 30 cycles of 95°C, 30s; 52°C, 30s; 72°C, 1 min 30s with a final extension at 72°C during 10 min. The amplification fragment was then sequenced after analysis of the PCR sample on agarose gel 1% in TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH8) buffer.

Culture conditions

L. plantarum IR BL0076 was inoculated at OD_{600nm} = 0.025 in a synthetic medium containing the following components without nitrogen: 5 $g.L^{-1}$ glucose, 3.5 $g.L^{-1}$ fructose, 10 $g.L^{-1}$ D,L-

malic acid, 0.6 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4, 0.45 $g.L^{-1}$ KCl, 0.13 $g.L^{-1}$ $CaCl_2$, $2H_2O$, 0.13 $g.L^{-1}$ $MgSO_4$, $7H_2O$, 3 $mg.L^{-1}$ $MnSO_4$, H_2O, 1 $mL.L^{-1}$ Tween 80.

Amino acids were added one by one as nitrogen source according to Terrade et al, 2009. This medium corresponds to the first culture condition where amino acids are free and contains 400 $mg.L^{-1}$ of tyrosine. Otherwise, in a second condition, tyrosine was replaced by 300 $mg.L^{-1}$ of a mix of synthetic peptides containing tyrosine: Gly-Gly-Tyr-Arg, Tyr-Ala and Gly-Leu-Tyr purchased from Sigma-Aldrich.

At different times of the growth, 50 mL of culture were harvest and centrifuged 10 min at 6,000 rpm. The pellets were stocked at -20°C waiting for RNA extraction and 1 mL of the supernatant was derivatized and analyzed by HPLC to measure biogenic amines production and amino acids. The rest of the supernatant was kept at -20°C.

Amino acid and biogenic amine analysis by HPLC

Free AA and BA were analyzed by HPLC using the method described by Gomez-Alonso *et al*, 2007. Derivatization reaction was performed by adding 1.75 mL of borate buffer pH 9, 1 mL of methanol, 40 µL of internal standard (2,4,6-trimethylphenethylamine hydrochloride 2 $mg.mL^{-1}$), and 30 µL of DEEMM (diethyl ethoxymethylenemalonate) to 1 mL of target sample. After 30 min in an ultrasound bath, the sample was then heated to 70°C for 2 h to allow complete degradation of excess DEEMM and reagent byproducts. The analyses were performed on a Varian HPLC (Varian Inc., Walnut Creek, CA) using an Alltech (Grace) HPLC column (C18-HL) particle size 5 µm (250 mm X 4.6 mm) thermostatized at 16°C through a binary gradient. Phase A was modified as follow: 10 mM ammonium acetate pH 5.8 to allow the identification of AA and BA by mass spectrometry. The composition of the mobile phase B, 80:20 mixture of acetonitrile and methanol and the flow rate 0.9 $mL.min^{-1}$ did not change.

HPLC-MS conditions

Further LC-MS/MS analyses were performed on a ThermoFinnigan TSQ Quantum triple quadrupole mass spectrometer equipped with a standard electrospray ionization source outfitted with a 100µm i.d. H-ESI needle. HPLC was performed using an Accela™ LC pump from ThermoFinnigan, (San Jose, CA, USA) equipped with an Accela autosampler (for HPLC conditions, see paragraph above). The flow from LC was split using an analytical fixed flow

splitter (split ratio = 1:10, post-column) from Analytical Scientific Instruments (El Sobrante, CA, USA). The data were processed using the Xcalibur software (ThermoFinnigan).
The source spray head was oriented at an angle of 90°C orthogonal to the ion-transfer tube. The mass spectrometer was operated in the negative ion mode in the range of *m/z* 90–900 with a scan time of 1 s. Nitrogen was used for both the sheath gas, ion sweep gas and the auxiliary gas, at 30, 5 and 30 (arbitrary units) respectively. The spray voltage was 3kV, the tube lens offset −132V and the skimmer offset 5 V. The ion transfer capillary temperature and vaporizer temperature were 250 and 300°C respectively. All the amines give a*m/z* signal that corresponds to the structure $[M\text{-H}]^-$.
Mass characterization of amines was performed by injecting each amine at 1 to 10 $\mu g.mL^{-1}$. Collision-induced dissociation (CID) was performed from 20 to 30eV under 1.5 mTor of argon.

RNA extraction

L. plantarum RNA was extracted at various time periods of the growth at OD_{600nm}= 1.1; 1.6 and 1.8 in the synthetic medium containing all the amino acids or in the medium with synthetic peptides. 25 mL of culture were pelleted and washed with 10 mL of Tris HCl 10 mM pH 8. Cells were then broken in 1 mL of Tri-Reagent (Sigma) in a screw cap tube containing 200 mg of beads (100 µm) by using Precellys 24 (Ozyme) programmed as follows: 6,500, 3 X 30 sec, two times. Cellular fragments were removed by centrifugation (12,000 X *g*, 10 min, 4°C). The supernatant was transferred in an Eppendorf tube and 200 µL of chloroform was added. The tubes were then vortexed for 15 sec followed by incubation at room temperature during 15 min. The samples were centrifuged 12,000 X *g* for 15 min at 4°C. The upper layer was transferred in a new Eppendorf tube and 500 µL of isopropanol was added. The samples were mixed gently, incubated at room temperature for 15 min and centrifued at 12,000 X *g*, 10 min at 4°C. The supernatant was removed and the pellet was washed with ethanol 75%. The tubes were centrifued 12,000 X *g*, 10 min at 4°C. Then RNA pellets were dried and resuspended in 30 µL of RNase-free water (Fermentas). RNA samples were then purified with the RNeasy MiniKit (Qiagen). The RNA samples were checked for yield and quality by measuring the OD ratio at 260, 280 and 320 nm by using a BioPhotometer (Eppendorf).

2 µg of RNA were treated with 1 U of DNase I (Fermentas) to eliminate residual DNA. A control PCR with primers BSF8 and BSR1541 was made on RNA to check the absence of any amplification. cDNA were then synthesized by using iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad) following the manufacturer recommendations.

RT-PCR

RT-PCR experiments were performed on cDNA with primers tdcf (CAAATGGAAGAAGAAGTTGG) (Nannelli *et al*, 2008) and tyrPLpR by using the High Fidelity Taq polymerase (Roche).

Gene expression quantification by RT-qPCR

Gene expression analysis was carried out by reverse transcription-quantitative real-time PCR (RT q-PCR), by using iQ SYBR green supermix (BioRad) and the BioRad CFX96 Real-Time System.

First, primers specificity and efficiency were checked by using 10-fold serial dilutions of *L. plantarum* IR BL0076 DNA. The obtained melting curves showed the absence of primers dimers, and the calibration curves, for each couple of primers, showed a slope between 86,8 % and 96,2%, and a regression coefficient between 0,997 and 1. After 4-fold serial dilutions of total cDNA, 5 µL was added, by well, to 20 µL of a mix containing 12.5 µL of SYBR green supermix, 1 µL of each primer at 7 pmol. μL^{-1} and 5.5 µL of RNase free water. Specific cDNA were amplified with specific primers (Table 1). *ldhD* and *gyrA* are housekeeping genes to normalize RNA expression. For each run, a negative control with 5 µL of RNase free water instead of cDNA was made, together with a positive control using *L. plantarum* IR BL0076 DNA. The amplification program was as follow: 98°C, 30s and 40 cycles of 95°C, 10s; 60°C, 30s. For each experiment, the condition "culture medium with free tyrosine, OD_{600nm} = 1.0" was used to calibrate the expression. The analyses were performed on RNA extracted and purified from three independent cultures for each grown condition.

Table 1: Oligonucleotides used in this study for RT-qPCR analyses.

Primer name	Gene function	Primer sequence	Product size (bp)	Source
tyrPLpF	tyrosine/ tyramine transporter	TATGATTGCCACCGTTCGTTC	128	This work
tyrPLpR		TAGTTCCCAACTCACCAGAAA		
ldhD (Forward primer)	dehydrogenase	ATCGGTACTGGTCGGATTGG	123	Duary *et al*, 2010
ldhD (Reverse primer)		GGTGTCAACGTACATGCCTTC		
gyrA (Forward primer)	gyrase	GTTCGTCTCATGCGGTTAGG	85	Duary *et al*, 2010
gyrA (Reverse primer)		AACTGGTGCCTCAGTCGTTG		

Results and discussion

The growth of *Lactobacillus plantarum* IR BL0076 was monitored in medium with free tyrosine or in medium with synthetic peptides containing tyrosine, along with the measure of tyramine production.

A lactic acid bacteria strain was isolated from wine and its ability to produce tyramine was determined by HPLC. This strain, identified as *L. plantarum* after sequencing of 16S DNA, was named *L. plantarum* IR BL0076.

Peptides of different sizes were used: a dipeptide Tyr-Ala containing the tyrosine residue at the N-terminus, a tripeptide Gly-Leu-Tyr with the tyrosine at the C-terminus, and a peptide of four amino acids Gly-Gly-Tyr-Arg, where the tyrosine was put inside. Peptides transporters and intracellular peptidases have preferences in peptides size (for both) and the place of residues (regarding only peptidases). Indeed, on one hand, studies on the model LAB *Lactococcus lactis*, showed different examples of peptides transport. This bacteria harbor a well characterized transport system Opp, from the ABC transpoters family, which can transported peptides containing 4 to 35 residues (Kunji *et al*, 1993). Furthermore proteins named DtpT and DppP are specialized in dipeptides (Fang *et al*, 2000) and tripeptides (Sanz *et al*, 2003) transport respectively. Therefore the choice of several sizes for peptides was determined, as *L. plantarum* has also an essential system for peptides uptake (Kleerebezem *et al*, 2003). On the other hand, a lot of bacteria species hold specific intracellular peptidases able to hydrolyze peptide bonds. For example, PepN aminopeptidase, characterized in a wide range of LAB like *Lactobacillus helveticus* (Varmanen *et al*, 1994), *Lactobacillus delbrueckii* (Tsakalidou *et al*, 1993) and *Lactococcus. lactis* (Tan *et al*, 1992), hydrolyze the residue

located at the N-terminus. Di- and tri-peptidases, such as PepV, isolated from *Lactococcus. lactis* (Hwang *et al*, 1981) and several Lactobacilli, are able to breakdown dipeptides containing a Gly redisue at the N-terminus. Also Gly-Leu-Tyr and Gly-Gly-Tyr-Arg contain effectively a Gly amino acid at the N-terminus.

The growth was monitored by measuring the OD at 600 nm. *L. plantarum* IR BL0076 was able to grow in the synthetic medium either with free amino acids or synthetic peptides containing tyrosine. Moreover the growth curve was the same whatever the source of tyrosine (Fig 1). *L. plantarum* is known to be auxotroph for the L-tyrosine (Teusink *et al*, 2005). Indeed *L. plantarum* IR BL0076 could not grow in the synthetic medium used in this study without tyrosine. Therefore the proteolysis of the synthetic peptides has to be done in the early stages of the development to release tyrosine and to allow the growth. This has been demonstrated for two *Lactobacillus* strains: *Lactobacillus homohiochii* and *Lactobacillus curvatus* isolated from sausages, which were positive for tyrosine and ornithine decarboxylase activities (Pereira *et al*, 2001). These both strains display a extracellular proteolytic activity which reach a maximum in the early exponential growth. Furthermore this activity was higher when cells were grown in a peptide-rich medium. However we could not exclude the possibility of a peptides transport and a subsequent intracellular hydrolysis. Although LAB proteinases have a broad specificity and release oligopeptides in the range of 4 to 8 AA, intracellular peptidases are required for the complete degradation of peptides (Kunji *et al*, 1996).

Tyramine production by *Lactobacillus plantarum* IR BL0076

At different stages of the growth, the culture supernatant was analyzed by HPLC to determine tyramine production (Fig 1). Tyramine was identified by HPLC-MS (Table 2). At OD_{600nm} = 0.2, no tyramine is detected in any case. But tyramine is measured in both culture media from OD_{600nm} = 1.0; and no difference in production is observed between both media. Therefore *L. plantarum* was able to synthesize tyramine in the same quantity with either 400 $mg.L^{-1}$ of free tyrosine or 300 $mg.L^{-1}$ of peptides.

Table 2: Identification of amines by HPLC-MS.

Amine	Derivated mass	Molecular ion	Caracteristic ions
Histamine	281	280	280, 234
Tyramine	307	306	306,260,214,186
Cadaverine	442	441	441, 395, 349, 303
Putrescine	428	427	427, 381, 335, 289
Tryptamine	330	329	329, 283, 237
Spermine	882	881	881, 789
Spermidine	655	654	654, 562, 516
2-phényléthylamine	291	290	290
histidine	326	325	325,324,280
arginine	514	343	343,299
tyrosine	351	350	350,306,260
phenylalanine	335	334	334,290,244
ornithine	472	471	471,427,381
lysine	486	485	485,441,395

This BA is produced during the exponential growth phase but the higher concentrations are reached during the stationary growth phase. Indeed BA are supposed to be produced when environmental conditions are difficult, for example when there is a depletion of nutrients, for the survival of lactic acid bacteria, because the synthesis of BA brings metabolic energy through the decarboxylation coupled to the transport (Konings *et al*, 1997). In *Streptococcus thermophilus*, the level of histamine in the culture medium increase at the beginning of the stationary phase, that is correlated with the induction of the histidine decarboxylase expression (Calles-Enriquez *et al*, 2010). Pessione *et al* (2005), which studied the factors influencing the production of the histidine decarboxylase and ornithine decarboxylase enzymes, of two *Lactobacillus* sp. strains, made a remark which is of interest regarding our study. Indeed authors showed that the stationary phase and high amounts of free AA strongly induced the biosynthesis of an oligopeptides transport protein, a Opp ATP-binding cassette transpoter, belonging to the proteolytic system of LAB. As tyramine is mainly produced at the end of the cell development, samples were collected at the end of the exponential and during the stationary growth phase, in order to investigate firstly the expression of the genes involved in tyramine production: the tyrosine decarboxylase *tdc* and the transporter *tyrP* which catalize the uptake of tyrosine and the release of tyramine. Secondly the place where peptides are hydrolyzed will be determined.

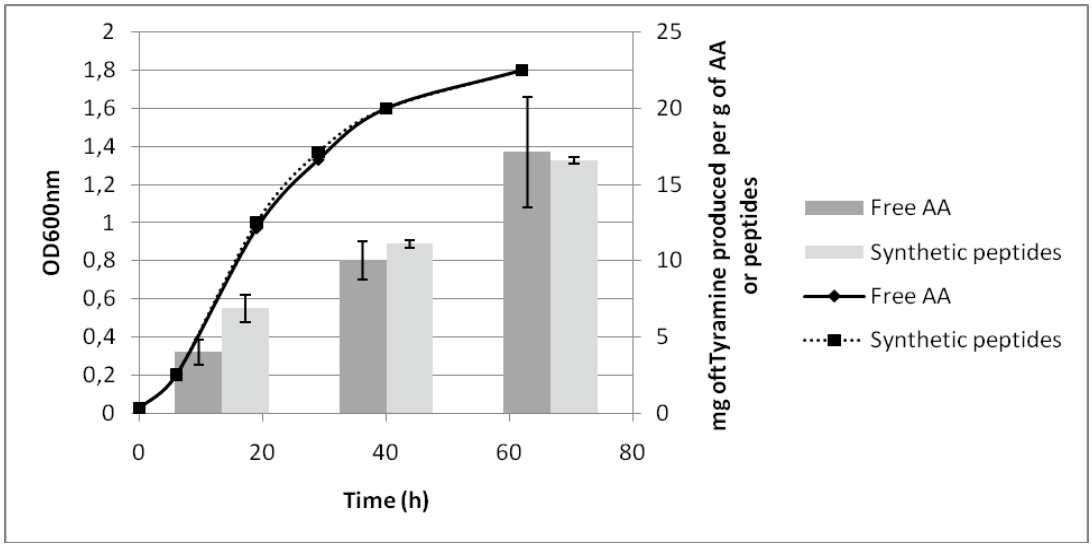


Figure 1: Growth of *Lactobacillus plantarum* IR BL0076 in medium with free tyrosine or in medium containing synthetic peptides. The tyramine measured by HPLC is produced by *L. plantarum* IR BL0076 at different stages of the growth (OD_{600nm} = 1.0; 1.6; 1.8), in both culture media: free tyrosine *versus* tyrosine containing peptides.

tyrP transcription

In order to compare and correlate *tdc* and *tyrP* expression, transcripts of both genes were first analyzed. RT-PCR experiments on cDNA obtained from RNA extracted from both culture conditions, gave an amplicon of approximately 1700 bp, with primers located inside *tdc* and *tyrP* genes. The length of the RT-PCR product means that *tyrP* is part of a polycistronic mRNA together with *tdc*. Tyramine-producing bacteria carry the *tdc* cluster composed of four genes: a tyrosil-tRNA synthetase *tyrS*, the decarboxylase *tyrDC*, the transporter *tyrP* and finally a gene *nhaC* encoding an antiporter Na^+/H^+. This genetic organization exists in *Enterococcus faecalis* (Connil *et al*, 2002), *Lactococcus lactis* (Fernandez *et al*, 2004) and *Lactobacillus brevis* (Lucas *et al*, 2003). Moreover the co-transcription of *tdc* and *tyrP* was always shown for *E. faecalis* (Connil *et al*, 2002), *L. brevis* (Lucas *et al*, 2003) and recently for *Sporolactobacillus sp*. (Coton *et al*, 2011). However other transcripts have been detected. In *L. brevis*, the four genes can be co-transcribed or *tyrS* together with *tyrDC*, or *tyrP* and *nhaC*. Actually the four genes of the tyrosine decarboxylase pathway operon are disseminated through lactic acid bacteria *via* a horizontal gene transfer. Therefore it is expected that they are regulated by the same way among lactobacilli including *L. plantarum*. The *tdc* trait is strain-specific, and the *L. plantarum* genomes sequenced, like WCFS1 and ATCC 14917

strains, do not carry the genes of the *tdc* pathway. However a partial sequence of 333 bp, from the *tdc* gene of a *L. plantarum* strain isolated from wine, was cloned and sequenced by Arena et al (2007). But nothing is known about the genetic organization of these genes in this LAB.

tyrP expression

In order to study the transport of the L-tyrosine either with free tyrosine or in the presence of peptides, *tyrP* expression was measured by RT-qPCR. In both cases, the influence of the growth phase was evaluated. The expression of *tyrP* was observed at low levels until the stationary growth phase was reached. Then there was an increase of about three times of the expression in both culture conditions, with a maximum at OD_{600nm} = 1.8 (Fig 2). We observed that the expression of *tyrP* is in accordance with the accumulation of tyramine in both media. It is actually the case for other bacteria producing biogenic amines like *Streptococcus thermophilus* (Calles-Enriquez *et al*, 2010), which produces histamine at the end of its growth, with an increase in the expression of the decarboxylase *hdcA*. But to our knowledge, the expression of a biogenic amines transporter has never been studied neither correlated to BA production in LAB isolated from wine. Therefore, this experiment clearly showed the link between the increase in tyramine production and *tyrP* expression in *L. plantarum* IR BL0076, and that this expression is induced at the stationary growth phase whatever the source of nitrogen studied.

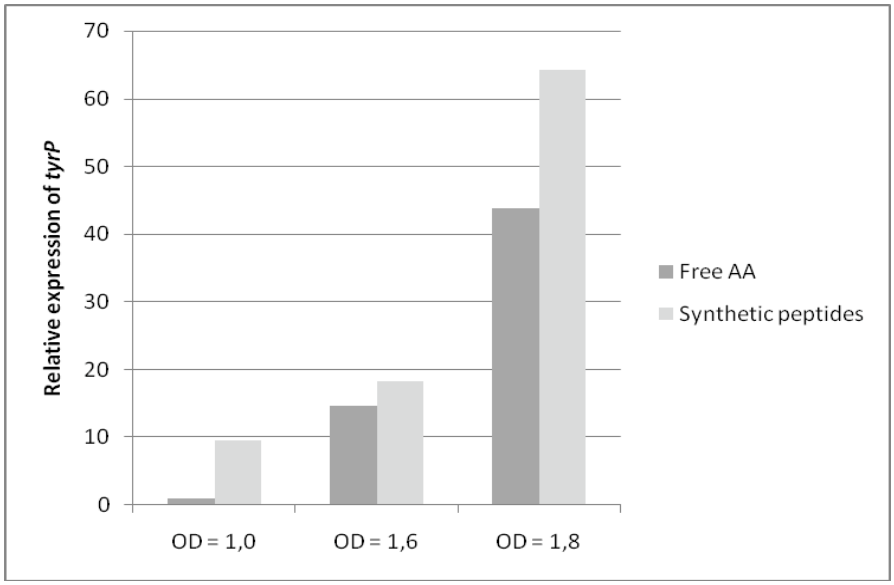


Figure 2: Relative expression of the tyramine transporter *tyrP* of *L. plantarum* IR BL0076 grown with free tyrosine or tyrosine containing peptides. Expression was measured at three different OD_{600nm}.

Proteolysis of peptides

Tyramine could be produced from peptides via two different ways. Peptides could be hydrolyzed in the extracellular medium by peptidases or could be transported inside the cell by peptide transporter. Inside the cells, peptides could be hydrolyzed by intracellular peptidases, the released tyrosine could then be decarboxylated in tyramine which could be released by the tdc permease. However, this last hypothesis is unlikely, since the tdc transporter catalyses the exchange of tyrosine and tyramine. To verify that the peptides were hydrolyzed in the extracellular medium, tyrosine in the extracellular medium was determined during the growth of *L. plantarum* (Figure 3).

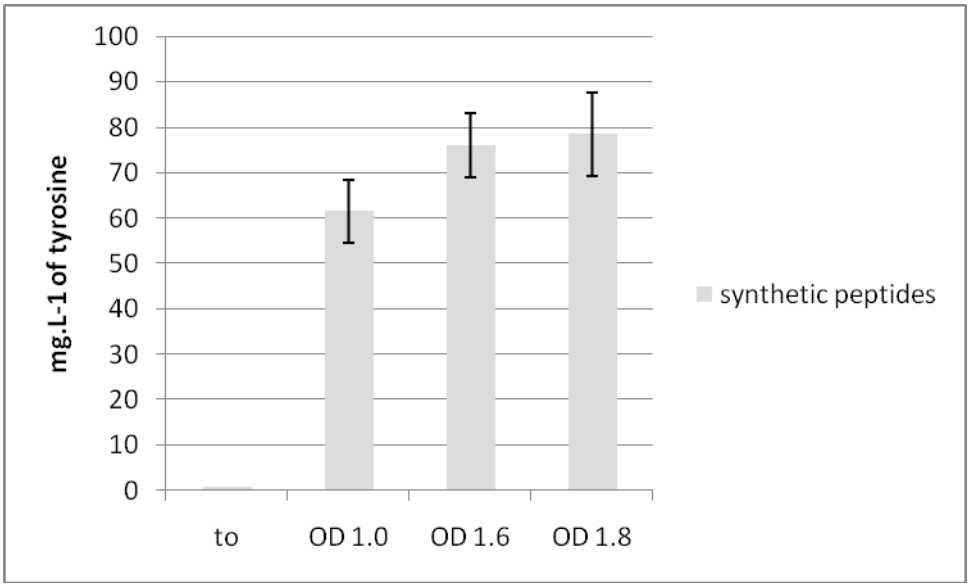


Figure 3: Tyrosine measured in the supernatants of the culture media containing synthetic peptides. To: tyrosine measured in fresh media, before inoculation with *L. plantarum* IR BL0076.

In the peptide medium, a high concentration in tyrosine is detected when cells are in the exponential growth phase. Therefore synthetic peptides are hydrolyzed in the extracellular medium, and tyrosine is mainly released at the beginning of the growth. So tyramine measured is formed from peptides containing tyrosine hydrolyzed in the extracellular medium. Regarding the proteolytic system, the sequenced strain *L. plantarum* WCFS1 has uptake systems for peptides, like oligopeptide transport system Opp. Once internalized, peptides can be degraded by peptidases Indeed, *L. plantarum* WCFS1 has nineteen genes encoding intracellular peptidases of different specificity (Kleerebezem *et al*, 2003). But it has been shown, for one isolate, that *L. plantarum* can harbor an extracellular proteinase PrtP

(Strahinic *et al*, 2009), and that proteolytically active strains can have another kind of extracellular proteinase(s). Our result supports the view that peptides are hydrolyzed in the extracellular medium and the released tyrosine is then transformed in tyramine via the tyrosine permease and tyrosine decarboxylase system. However, it could not be excluded that peptides are hydrolyzed inside or outside the cell. One can imagine that tyrosine obtained from extracellular peptidases could be exchanged with tyramine that has been formed inside the cell after decarboxylation of tyrosine derived from intracellular peptide hydrolysis. However this mechanism has never been shown before whatever the bacteria.

Conclusion

This study demonstrates for the first time that peptide containing precursors of biogenic amines could be used by bacteria to produce BA. In fact, peptides are another source of BA precursors which are breakdown in AA in the extracellular medium. The hydrolysis outside the cell is a simple way to obtain free AA for the metabolic needs. Indeed peptides transport has an important energetic cost for the cell and required the hydrolysis of ATP (Kunji *et al*, 1996).

This study is of technological interest, since most of oenological practices aimed to enrich wine in nutrients to allow the best performance of yeasts and lactic acid bacteria, and to improve wine quality. That is why the influence of nitrogen sources on biogenic amines production has been largely reported on the literature. Indeed the presence of fine yeasts lees increase BA production, because of the released of a wide range of nitrogen precursors (Marques *et al*, 2008). Moreover musts are sometimes nitrogen-supplemented to ensure a good alcoholic fermentation by yeasts because nitrogen, and especially yeast assimilable nitrogen, is the limited factor for yeasts development (Bely *et al*, 1991; Bach *et al*, 2010). Nutritive supplements, like yeast autolysates composed of amino acids and proteins among others, are added to must in order to activate alcoholic fermentation. It has been shown that after malolactic fermentation in the wine from the supplemented must, a greater concentration of biogenic amines was found (Gonzales Marco *et al*, 2006). Therefore since LAB are able to produce biogenic amines from amino acids and directly from peptides, oenological practices to ensure good development of alcoholic fermentation and malolactic fermentation, have to be carefully monitored.

Acknowledgements

We are grateful to Benoît Bach from Inter-Rhône for the gift of the *Lactobacillus plantarum* strain IR BL0076. Mass spectrometry analyses were performed by the Lipides-Arômes platform, UMR FLAVIC, INRA Dijon.

This work was supported by the European Community's Seventh Framework Program, grant agreement no. 211441-BIAMFOOD.

References

Babayan TL & Bezrukov MG (1985) Autolysis in yeasts. *Acta Biotechnol* **2**: 129-136.

Bach B, Colas S, Massini L, Barnavon L & Vuchot P (2010) Effect of nitrogen addition during alcoholic fermentation on the final content of biogenic amines in wine. *Annals of Microbiology* **61**: 185-190.

Bauza T, Blaise A, Teissedre PL, Cabanis JC, Kanny G, Moneret-Vautrin DA & Daumas F (1995) Les amines biogènes du vin: metabolism et toxicité. *Bulletin de l'OIV n°767-68* **68**: 42-67.

Bely M, Sablayrolles JM & Barre P (1990) Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **70**:246–252.

Calles-Enriquez M, Hjort Eriksen B, Skov Andersen P, Rattray FP, Johansen AH, Fernandez M, Ladero V & Alvarez MA (2010) Sequencing and transcriptional analysis of the *Streptococcus thermophilus* histamine biosynthesis gene cluster: factors that affect differential *hdcA* expression. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 6231-6238.

Coton E & Coton M (2005) Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **63**: 296-304.

Coton M, Fernandez M, Trip H, Ladero V, Mulder NL, Lolkema JS, Alvarez MA & Coton E (2011) Characterization of the tyramine-producing pathway in *Sporolactobacillus* sp P3J, *Microbiology*, DOI 10.1099/mic.0.046367-0.

Duary RK, Batish VK & Grover S (2010) Expression of the atpD gene in probiotic *Lactobacillus plantarum* strains under in vitro acidic conditions using RT-qPCR. *Research in Microbiology* **161**: 399-405.

Folio P, Ritt JF, Alexandre H & Remize F (2008) Characterization of EprA, a major extracellular protein of *Oenococcus oeni* with protease activity. *International Journal of Food Microbiology* **127**: 26-31.

Gardini F, Zaccarelli A, Belletti N, Faustini F, Cavazza A, Martuscelli M, Mastrocola D & Suzzi G (2005) Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenoccocus oeni* in a model system. *Food Control* **16**: 609-616.

Gomez-Alonso S, Hermosian-Gutearrez I &Garcia-Romero E (2007) Simultaneous HPLC Analysis of Biogenic Amines, Amino Acids, and Ammonium Ion as Aminoenone Derivatives in Wine and Beer Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 608-613.

Gonzales Marco A, Moreno NJ & Ancin Azpilicueta C (2006) Influence of addition of yeast autolysate on the formation of amines in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**:2221–2227.

Guerrini S, Mangani S, Granchi L & Vincenzini M (2002) Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology* **44**: 374-8.

Hannington E (1967) Preliminary report on tyramine headache. *British Medical Journal* **2**: 550-551.

Herbert P, Cabrita MJ, Ratola N, Laureano O & Alves A (2005) Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage. *Journal of Food Engineering* **66**: 315-322.

Hernandez-Orte P, Pena-Gallego A, Ibarz MJ, Cacho J & Ferreira V (2006) Determination of the biogenic amines in musts and wines before and after malolactic fermentation using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate as the derivatizing agent. *Journal of chromatography A* **1129**: 160-164.

Kleerebezem M, Boekhorst J, Van Kranenburg R, et al (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *PNAS* **100**: 1990-1995.

Leitao MC, Teixeira HC, Barreto Crespo MT & San Romao MV (2000) Biogenic amines occurrence in wine. Amino acid decarboxylase and proteolytic activities expression by *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 2780-2784.

Lonvaud-Funel A & Joyeux A (1994) Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *Journal of Applied Microbiology* **77**: 401-407.

Lonvaud-Funel A (2001) Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *Fems Microbiology Letters* **199**: 9-13.

Lucas P, Landete J, Coton M, Coton E & Lonvaud-Funel A (2003) The tyrosine decarboxylase operon of Lactobacillus brevis IOEB 9809: characterization and conservation in tyramine-producing bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **229**: 65-71.

Manca de Nadra MC, Farias ME, Moreno-Arribas MV, Pueyo E & Polo MC (1997) Proteolytic activity of *Leuconostoc oenos*. Effect on proteins and polypeptides from white wine. *FEMS Microbiology Letters* **150**: 135-139.

Manca de Nadra MC, Farias ME, Moreno-Arribas MV, Pueyo E & Polo MC (1999) A proteolytic effect of *Oenococcus oeni* on the nitrogenous macromolecular fraction of red wine. *FEMS Microbiology Letters* **174**: 41-47.

Marcobal AB, De Las Rivas MV, Moreno-Arribas & Munoz R (2004) Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiology Letters* **239**: 213–220.

Marques AP, Leitao MC, San Romao MV (2008) Biogenic amines in wines: influence of oenological factors. *Food Chemistry* **107**: 853-860.

Moreno-Arribas V, Torlois S, Joyeux A, Bertrand A & Lonvaud-funel A (2000) Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. *Journal of Applied Microbiology* **88**: 584-593.

Nannelli F, Claisse O, Gindreau E, De Revel G, Lonvaud-Funel A & Lucas PM (2008) Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *Letters in Applied Microbiology* **47**: 594-599.

Pereira V, Pontes M, Camara JS & Marques JC (2008) Simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in honey and wine samples using in loop orthophthalaldeyde derivatization procedure. *Journal of Chromatography A* **1189**: 435-443.

Pessione E, Mazzoli R, Giuffrida MG, Lamberti C, Garcia-Moruno E, Barello C, Conti A & Giunta C (2005) A proteomic approach to studying biogenic amine producing lactic acid bacteria. *Proteomics* **5**:687–689.

Silla Santos MH (1996) Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of food Microbiology* **29**: 213-231.

Soufleros EH, Bouloumpasi E, Zotou A & Loukou Z (2007) Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. *Food Chemistry* **101**: 704-716.

Strahinic I, Kojic M, Tolinacki M, Fira D & Topisirovic L (2009) The presence of *prtP* proteinase gene in natural isolate *Lactobacillus plantarum* BGSJ3-18. *Letters in Applied Microbiology* **50**: 43-49.

Terrade N, Noel R, Couillaud R & Mira de Orduna R (2009) A new chemically defined medium for wine lactic acid bacteria. *Food Research International* **42**: 363-367.

Teusink B, Van Enckevort FHJ, Francke C, Wiersma A, Wegkamp A, Smid EJ & Siezen RJ (2005) In Silico Reconstruction of the Metabolic Pathways of *Lactobacillus plantarum*: Comparing Predictions of Nutrient Requirements with Those from Growth Experiments. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7253-7262.

Wilmotte A, Van der Auwera G & De Wachter R (1993) Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cynobacterium Chlorogloeopsis HTF (dMastigocladus laminosus HTFT) strain PCC7518, and phylogenetic analysis. *FEBS Letters* **317**: 96– 100.

DISCUSSION-PERSPECTIVES

Partie I

Dans le cadre de mes travaux de thèse, nous avons tenté de développer des outils moléculaires chez *O. oeni*. Malgré tous nos efforts, nous n'avons pas réussi à exprimer les clusters *hdc* de *L. hilgardii* et *odc* de *O. oeni*, chez cette bactérie d'intérêt œnologique. Aucun mutant pour le gène codant l'ornithine décarboxylase n'a été isolé. Cependant, au regard des différentes expérimentations conduites, il apparaît que d'autres stratégies peuvent être mise en œuvre.

Un point clé dans l'obtention de mutants est l'amélioration de l'efficacité de transformation. Celle-ci est fortement corrélée au niveau de perméabilité de la paroi cellulaire. En s'inspirant des protocoles décrits chez d'autres microorganismes, différents traitements visant à déstabiliser la paroi ont déjà été employés. Mais il reste encore des agents à tester, par exemple l'acétate de lithium et le dithiothreitol. En effet, l'électroporation des cellules de *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, pré-traitées à ces agents, permet d'augmenter le nombre de transformants par microgramme d'ADN de 10^5 à 10^7 (Papagianni *et al*, 2007). De plus, il faudrait diminuer la taille du vecteur à transformer, car l'efficacité de transformation est inversement proportionnelle à la taille du plasmide. L'utilisation d'un vecteur à réplication thermosensible est également une approche envisagée pour la création de mutant chez *O. oeni*, par simple ou double recombinaison homologue. Cependant l'efficacité de transfert obtenue chez *O. oeni* est néanmoins suffisante pour effectuer de l'expression hétérologue. C'est donc cette approche vers laquelle nous nous sommes tournés.

L'échec dans l'expression des clusters *hdc* et *odc* est sans doute lié aux gènes eux-mêmes. En effet, des gènes ont déjà été exprimés chez *O. oeni* à l'aide du pGID052 (Assad-Garcia *et al*, 2008). Dans ce cas précis, il s'agissait d'un gène codant une protéine tronquée, issu d'un gène codant une protéine native de *O. oeni*, et non de gènes provenant d'une autre souche ou de genre différent comme *L. hilgardii*. L'absence de facteurs de régulation spécifiques, la non reconnaissance des promoteurs, l'instabilité des transcrits, sont peut être les raisons empêchant l'expression hétérologue chez *O. oeni*. Cependant, l'ornithine

décarboxylase de *O. oeni* a été produite chez *E. coli*, soulignant la nécessité d'avoir un système d'expression puissant et performant.

Concernant l'expression de gènes des transporteurs d'acides organiques de *O. oeni* chez *E. coli*, *L. lactis* ou encore *L. plantarum*, l'adressage, la conformation et l'insertion des protéines à la membrane sont autant de barrières supplémentaires à l'expression hétérologue de ces gènes. Au regard de tous ces essais, une tout autre approche est à envisager. Il s'agit de muter ces gènes d'intérêt chez *O. oeni*. Des stratégies par simple et double recombinaisons homologues ont été testées ou envisagées. Mais là encore nous sommes toujours confrontés au problème de l'efficacité de transformation qui reste insuffisante. Il faut donc : soit trouver un moyen d'augmenter le nombre de transformants, soit employer une autre technique de transfert d'ADN, et pourquoi pas à l'aide de bactériophages ? Des souches lysogéniques de *O. oeni* contenant des prophages, ont été isolées du vin (Arendt *et al*, 1991). Ainsi, il est donc possible d'explorer cette voie pour transférer de l'ADN chez cette bactérie. Les bactériophages ont déjà été utilisés en tant que vecteurs. Chez *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, le phage mv4 s'intègre dans le chromosome, *via* une recombinaison entre sites spécifiques (Dupont *et al*, 1994). Un vecteur a ensuite été construit contenant le site *attP* et une intégrase du phage mv4, puis transféré chez *L. plantarum*, un hôte hétérologue. La recombinaison s'effectue entre les sites *attP* et *attB* du génome bactérien, au gène codant le $tRNA^{Ser}$. L'étude du fonctionnement de l'intégration des phages chez *O. oeni* pourrait amener à la construction de vecteurs intégratifs.

Partie II

La putrescine, issue en partie de la décarboxylation de l'ornithine, est l'amine biogène majoritaire du vin. Plusieurs stratégies ont été mises en œuvre afin d'approfondir les connaissances sur l'ornithine décarboxylase de *O. oeni*. Finalement, après les tentatives de mutation et d'expression de cette enzyme chez *O. oeni*, la protéine a été caractérisée chez *E. coli*, et les constantes cinétiques relatives à l'activité enzymatique ont été déterminées. L'ODC de *O. oeni* BR14/97 est spécifique de la L-ornithine et ne peut pas décarboxyler la L-lysine en cadavérine. De plus, le séquençage de cinq gènes *odc*, issus de souches isolées de vin et de cidre à travers le monde, a été obtenu. Les différences inter-séquences concernent uniquement les souches provenant du cidre, et impliquent les acides aminés en position : 31, 448 et 620. L'histidine 31 est remplacée par l'arginine. La valine 448 est remplacée par l'isoleucine (un carbone supplémentaire) à chaine latérale apolaire. Enfin l'acide aspartique

en position 620 fait place à un résidu polaire, l'asparagine. Mis à part le dernier cas, ces changements n'affectent pas la nature de l'acide aminé. En outre, ces résidus ne semblent pas intervenir dans la fonctionnalité de l'enzyme.

Le travail de caractérisation *in vitro* a été poursuivi au laboratoire, afin de définir les acides aminés ayant un rôle clé dans la reconnaissance et la liaison au substrat, ainsi que dans le site catalytique. En s'appuyant sur les études cristallographiques réalisées chez *Lactobacillus* 30a (Momany *et al*, 1995 ; Vitali *et al*, 1999), nous avons donc identifiés plusieurs résidus d'intérêt : la glycine 141, impliquée dans l'association de dimères en dodécamères, la lysine 374 auquel le pyridoxal-5'-phosphate est lié covalemment *via* une base de Schiff, et l'acide glutamique 551 qui interagit avec la L-ornithine dans le site actif (Tableau 11).

Tableau 11. Mutagenèse d'acides aminés (AA) d'intérêt de l'ODC de *O. oeni* à muter. Le choix ces cibles est basé sur les études réalisées chez *Lactobacillus* 30a (Momany *et al*, 1995 ; Vitali *et al*, 1999). Les séquences protéiques de *Lactobacillus* 30a et *O. oeni* sont homologues à 68%.

AA ODC *O. oeni*	Mutation envisagée	Choix de la mutation
Gly 141	Tyr 141	Relatif au mutant G121Y de *Lactobacillus* 30a (Vitali *et al*, 1999)
Lys 374	Glu 374	Inversion des charges (+ → -)
Glu 551	Lys 551 et Ala 551	Inversion des charges (- → +) (Lys) ou remplacement par un AA apolaire (Ala)

La mutation du résidu Lys 374 en Glu 374 a été réalisée, par mutagénèse dirigée, à partir du vecteur pET28a-odc. Le principe de cette technique repose sur la modification d'un codon par amplification par PCR avec des amorces contenant des substitutions ou modifications de nucléotides. La caractérisation de ce mutant est en cours, et la construction des autres se poursuit. Peu de protéines ont été caractérisées chez *O. oeni*, hormis l'histidine décarboxylase (Coton *et al*, 1998), et Hsp18 (Coucheney, 2005), une protéine de stress. La

plupart du temps ce sont les gènes qui sont caractérisés, comme ceux liés au catabolisme de l'arginine (Tonon *et al*, 2001 ; Divol *et al*, 2003), *mlA* codant l'enzyme malolactique (Labarre *et al*, 1996), et d'autres gènes codants des protéines de stress tels que *clpL*, *clpX*, *omrA*, *trxA* (Beltramo *et al*, 2004b ; Jobin *et al*, 1999a ; Bourdineaud *et al*, 2004 ; Jobin *et al*, 1999b). Ainsi, la caractérisation de l'ODC vient compléter les connaissances sur le métabolisme de ce microorganisme.

Partie III

Les amines biogènes peuvent être produites par les bactéries lactiques à partir de différentes sources azotées. Les expériences issues de mon travail de thèse montrent en effet que les acides aminés libres ne sont pas les seuls précurseurs, mais que *L. plantarum* est capable d'utiliser des peptides synthétiques contenant la tyrosine, afin de synthétiser la tyramine. De plus, ces peptides sont dégradés dans le milieu extracellulaire. Cependant, l'étude concernant le rôle des peptides dans la production d'amines biogènes n'est pas terminée. En effet, d'une part, il faudrait déterminer l'expression de la tyrosine décarboxylase, afin de la comparer à l'expression du transporteur, dans les deux conditions testées (en présence de peptides ou de tyrosine libre). Bien que les gènes *tdc* et *tyrP* semblent être co-transcrits, leurs profils d'expression n'est pas forcément identique. D'autre part, le produit de RT-PCR correspondant à l'amplification des deux gènes devrait être séquencé. Il y a actuellement peu de données chez *L. plantarum* concernant le métabolisme de la tyramine, alors qu'il s'agit d'un fort producteur. Seulement une étude relate le clonage partiel de la tyrosine décarboxylase (Arena *et al*, 2007). De plus, il n'y a pas de séquence disponible pour le gène codant le transporteur dans les banques de données génomiques. A propos des autres Lactobacilles, le gène de la *tdc* a été entièrement séquencé chez *Lactobacillus brevis* (Lucas *et al*, 2002) et *Lactobacillus curvatus*, et ces deux séquences présentent un pourcentage de similarité de 73% (Cf. alignement, Annexe 2). Le séquençage de la tyrosine décarboxylase de *L. plantarum* et de son transporteur, permettrait ensuite le développement d'outils moléculaires pour la détection des souches de *L. plantarum* productrices de tyramine.

Outre *L. plantarum*, ce type d'expérience pourrait être conduit sur d'autres genres bactériens producteurs de tyramine. Egalement la synthèse d'histamine et de putrescine pourrait être testée, en utilisant des peptides contenant de l'histidine ou de l'arginine, avec des souches hdc^+ ou $AgDI^+$. Dans les expériences réalisées, j'ai utilisé un mélange de trois peptides, avec une place déterminée pour la tyrosine (en N-terminal, en C-terminal ou au

centre). Il serait intéressant de déterminer s'il existe des différences de production suivant le type de peptide présent, ou au contraire s'il n'y a pas de préférence dans la dégradation de ces peptides. Cependant cette dernière hypothèse est davantage probable, car les protéases extracellulaires ont un spectre large de spécificité. Enfin, des peptides isolés du vin par ultrafiltration pourraient également être utilisés, afin de tester la production d'amines biogènes dans des conditions œnologiques.

ANNEXES

Annexe 1

INTRODUCTION

Une partie de ma thèse s'est focalisée sur la suite des travaux de thèse de Yoann Augagneur qui a participé au précédent programme européen FP5 n° QLKI-CT-2002-02388, visant à étudier le métabolisme du L-malate et du L-citrate chez *Oenococcus oeni* et *Lactococcus lactis*. Les travaux de cette partie du programme européen ont été supervisés par Dominique Garmyn, en tant que responsable scientifique. Les recherches concernant *O. oeni* étaient à poursuivre dans le projet FP7 BiamFood.

Chez *O. oeni* et *L. lactis*, la fermentation de l'acide malique génère à la fois un gradient transmembranaire de pH, alcalin à l'intérieur, et un gradient de potentiel électrique, négatif à l'intérieur (Salema *et al*, 1996 ; Poolman *et al*, 1991). Concernant le métabolisme du citrate, il a été montré que le transporteur CitP de *Leuconostoc mesenteroides* est également impliqué dans la génération d'un potentiel de membrane *via* l'échange citrate/lactate (Marty-Teysset et *al*, 1995 ; Bandell *et al*, 1997).

A partir de la séquence du gène *mleP* de *O. oeni*, codant un transporteur de L-malate de la famille des auxines, deux autres gènes putatifs codant des transporteurs du L-malate et du L-citrate ont été identifiés : *maeP* et *yaeP*. L'expression de ces trois gènes a été étudiée en système hétérologue, d'une part, chez *E. coli* et, d'autre part, chez *L. lactis*. Ces deux microorganismes sont largement employés pour l'étude fonctionnelle de protéines. En particulier depuis la mise au point d'un système d'expression régulé par ajout de nisine chez *L. lactis* (Kuipers *et al*, 1995 ; De Ruyter *et al*, 1996 ; Mierau & Kleerebezem, 2005) (cf schéma), des transporteurs procaryotes et eucaryotes ont pu être exprimés et caractérisés (Kunji *et al*, 2003). Mais dans le cas des gènes de *O. oeni* , l'expression hétérologue chez *E. coli* avec induction à l'arabinose ou chez *L. lactis* avec induction à la nisine n'a pas permis de déterminer la fonctionnalité des transporteurs. Pourtant, la protéine MleP a été détectée par Western blot chez *E. coli*, mais ce transporteur n'exhibait pas une activité suffisante. En fait, les conditions de production et d'insertion de la protéine dans la membrane n'étaient pas optimales (Augagneur, 2007). En conclusion de ces travaux, l'hypothèse de tester l'expression chez un hôte, phylogénétiquement proche de *O. oeni*, a été soulevée. En effet, le système NICE (NIsin-Controlled gene Expression) (Figure 1), décrit ci-dessus, peut être utilisé chez *L. plantarum* suite aux travaux de Pavan *et al* (2000) qui ont intégré les gènes de régulation *nisRK* de *L. lactis* dans le chromosome de *L. plantarum* NCIMB8826. Le fait

d'utiliser cet hôte pourrait optimiser l'expression et l'insertion du produit de cette expression dans la membrane bactérienne, car *L. plantarum* est proche de *O. oeni* au niveau phylogénique.

Lors de l'étude de l'expression des gènes de *O. oeni* chez *L. lactis* NZ9000, Yoann Augagneur avait crée dans le pNZ8048 une fusion traductionnelle entre la phase codante des gènes *mleP*, *maeP* ou *yaeP* de *O. oeni* et 6 codons histidine. Ces constructions plaçaient les gènes de *O. oeni* sous le contrôle du promoteur PnisA permettant la synthèse d'une protéine étiquetée par des résidus histidine dans sa région amino-terminale. Les trois plasmides ainsi construits ont été nommés : pNZmleP, pNZmaeP et pNZyaeP.

Dans un premier temps, ces trois plasmides ont été transférés chez *L. plantarum* NCIMB8826, afin de caractériser les transporteurs.

Dans une deuxième partie, une stratégie de mutation par double recombinaison homologue a été développée pour muter ces transporteurs, afin de compléter l'étude sur la fonctionnalité des transporteurs du malate et du citrate chez *O. oeni.*

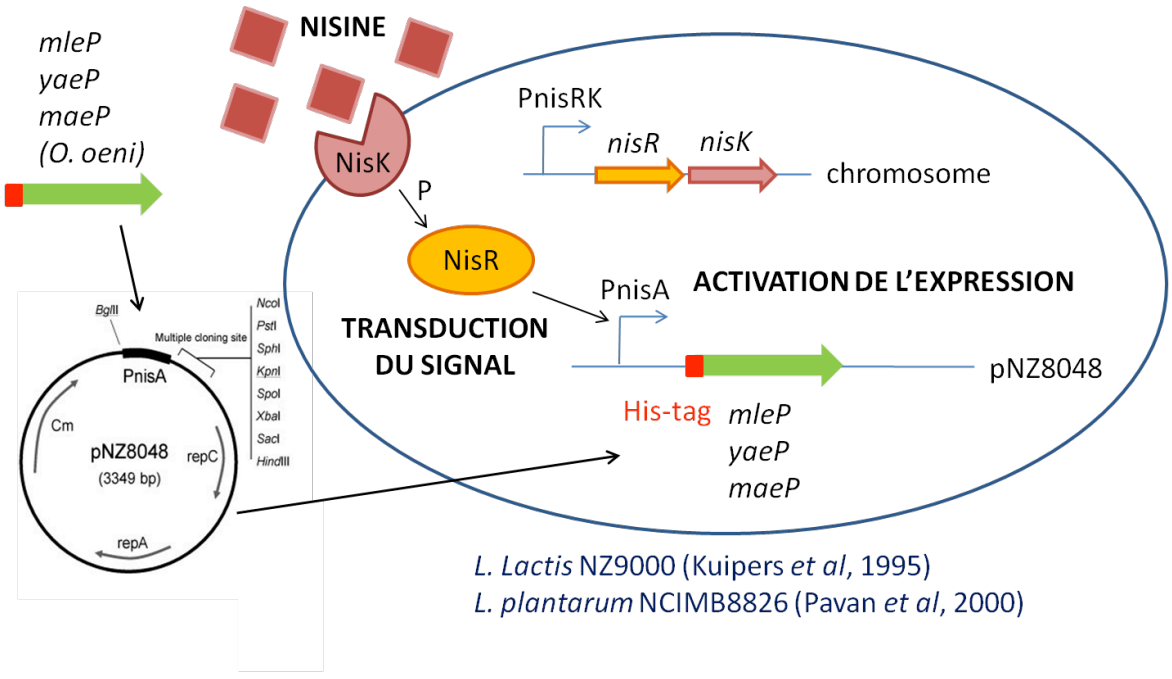


Figure 1. Schéma d'activation de l'expression de gènes par le système NICE

RESULTATS

Les transporteurs impliqués dans le transport des acides organiques chez les bactéries lactiques, sont des transporteurs secondaires qui utilisent l'énergie libre stockée sous forme de gradient ionique et/ou de solutés à travers la membrane. Chez *L. lactis* et *Leuconostoc mesenteroides*, les transporteurs d'acides organiques appartiennent à la famille des 2-hydroxycarboxylate (2-HCT). Tandis que le transporteur du L-malate *mleP* de *O. oeni* appartient à la famille des auxines (Sobczak & Lolkema, 2005). Des études ont montré de fortes ressemblances dans le transport du L-malate et du citrate chez *O. oeni*. En effet, le transport de ces deux acides organiques est inhibé par le potentiel de membrane et favorisé par le gradient de pH (Salema *et al*, 1994). Ainsi, MleP serait à la fois le transporteur du L-malate et du citrate chez *O. oeni*. A partir de la séquence de MleP de *O. oeni* et à l'aide des génomes séquencés, d'autres séquences codants des transporteurs putatifs d'acides organiques ont été identifiées. Ce travail vise donc à explorer la fonctionnalité de ces transporteurs. Deux stratégies ont été employées : la surexpression chez *L. plantarum* et la mutagénèse dirigée. Cette dernière approche a nécessité le développement d'un vecteur suicide.

Induction de l'expression des transporteurs *mleP*, *maeP* et *yaeP* de *O. oeni* à la nisine

Afin de surproduire les transporteurs du malate et du citrate de *O. oeni* chez *L. plantarum*, des mises au point ont tout d'abord été effectuées. Le vecteur pNZ-mleP de *L. lactis*, contenant le transporteur *mleP* de *L. lactis*, a servi de vecteur témoin pour le développement des conditions d'expression. Différentes gammes de concentration en nisine ont été testées : de 0 à 500 $ng.mL^{-1}$ et de 0,1 à 15 $ng.mL^{-1}$ et l'induction de l'expression a été réalisée à différent moment de la croissance (DO_{600nm} : de 0,2 à 0,5). L'expression du transporteur *mleP* de *L. lactis* dans la souche *L. plantarum* NCIMB8826 est détectée par Western Blot lorsque l'induction est réalisée en présence de 50 $ng.mL^{-1}$ de nisine à DO_{600nm} = 0,35. L'analyse par immuno-détection permet de visualiser la protéine MleP de *L. lactis* qui a une masse moléculaire de 46,7 kDa (Figure 2). En ce qui concerne les transporteurs de *O. oeni* : *mleP*, *maeP* et *yaeP* aucune bande n'est visible dans les mêmes conditions de culture.

Ce travail montre la difficulté à exprimer des protéines, en particulier des transporteurs de *O. oeni* en système hétérologue. Les tentatives d'expression chez *L. lactis* et *L. plantarum* ont échouées. Tandis que chez *E. coli*, la production de MleP est toxique, car sa présence à la

surface des vésicules perturbe l'intégrité membranaire. Une autre approche doit donc être développée pour l'étude fonctionnelle des gènes de *O. oeni*.

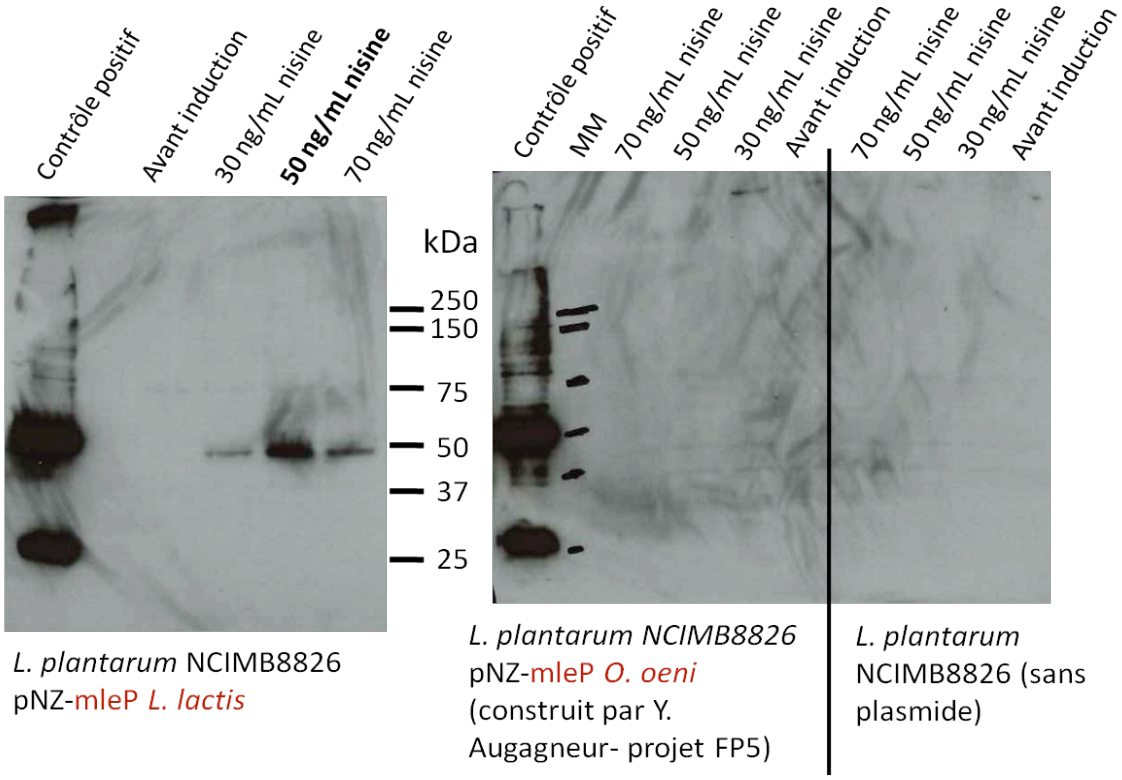


Figure 2. Détection par immuno–détection des transporteurs d'acide organique surproduits chez *L. plantarum* via le système NICE. Les souches de *L. plantarum* sont cultivées en milieu MRS (sans antibiotiques pour la souche sauvage NCIMB8826) ou en MRS supplémenté avec 10 µg.mL^{-1} en chloramphénicol. La nisine est ajouté à DO_{600nm} = 0,35. L'expression des transporteurs *mleP* de *L. lactis* et *O. oeni*, est induite par ajout de 30, 50 et 70 ng.mL^{-1} de nisine. MleP de *L. lactis* est surexprimé lorsque 50 ng.mL^{-1} de nisine sont ajoutés dans le milieu de culture. Aucune détection n'est obtenue pour le transporteur MleP de *O. oeni*, induit dans les mêmes conditions. Le contrôle positif est une protéine contenant un HisTag et sert de témoin pour la détection par Western blot.

Création d'un vecteur suicide pour muter le gène *mleP* de *O. oeni*

La création de vecteurs suicide adaptés à la mutagénèse chez *O. oeni* était un des objectifs à atteindre du projet européen. Cette stratégie permettrait d'éviter les problèmes rencontrés lors de la surexpression (et même de l'expression) de gènes chez *O. oeni*, à savoir entre autres la toxicité, la reconnaissance des régions promotrices, etc… Après l'échec obtenu dans l'obtention de mutants, pour le gène de l'ornithine décarboxylase chez *O. oeni*, par

simple recombinaison homologue (cf. Résultats), une stratégie de mutation par double recombinaison homologue a été envisagée. En effet, Sato *et al* (2003) obtiennent des mutants de *Thermococcus kodakaraensis* par double recombinaison homologue et non par simple stratégie, ce qui permet de contrer le système de restriction/modification. Cette technique a donc été employée chez *O. oeni*.

La stratégie adoptée pour construire un vecteur suicide a consisté à cloner une cassette de résistance à l'érythromycine dans le pUC18 et d'entourer cette cassette des régions flanquant du gène *mleP* (Figure 3). Le gène *mleP* de *O. oeni* est entouré des gènes *mleA* et *mleR* en aval et des gènes *dacA3* et *luxS* en amont. Les gènes *mleA* et *mleR* codent respectivement l'enzyme malolactique et un régulateur transcriptionnel Le gène *luxS* code une S-ribosylhomocystéinase et *dacA3* code une D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase. Les régions flanquantes le gène *mleP* ont été amplifiées et clonées de part et d'autre de la cassette *ery*. Le vecteur obtenu, nommé pmlePERY, dérivé du pUC18 ne peut se répliquer chez les bactéries à Gram positif. Ces travaux se poursuivent afin de transférer le vecteur pmlePERY chez *O. oeni*.

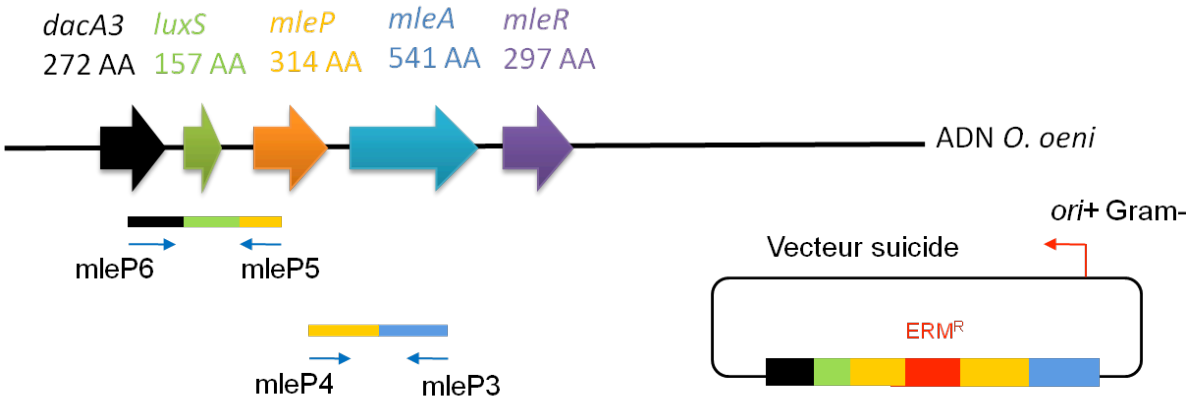


Figure 3. Construction du vecteur suicide pmlePery pour l'interruption du gène *mleP* par double recombinaison homologue pour la construction du vecteur suicide pmlePERY

CONCLUSION

Le rôle principal du métabolisme du L-malate et du citrate chez *O. oeni* est la production d'une force proton-motrice qui génère de l'énergie. Cette énergie vient s'ajouter au pool d'ATP intracellulaire. Le transport d'acides organiques est donc de première importance pour la cellule, d'où l'intérêt dans l'amélioration des connaissances pour ces

mécanismes, en particulier ceux relatifs à la famille des auxines. Mais l'étude fonctionnelle des gènes de *O. oeni*, passe par une maîtrise de la manipulation génétique de cette bactérie. D'une part, nous ne disposons pas d'outils permettant de muter cette bactérie, d'autre part, l'expression des gènes de *O. oeni* en système hétérologue est difficile à mettre en place, au regard des échecs obtenus. En ce qui concerne l'expression de transporteurs, cela peut s'expliquer par exemple, par un mauvais adressage et repliement des protéines dans la membrane.

MATERIELS ET METHODES

Obtention des plasmides pNZmleP, pNZmaeP et pNZyaeP à partir de L. lactis NZ9000

Des précultures sont réalisées à partir du stock glycérol de *L. lactis* NZ9000 contenant les vecteurs pNZmleP, pNZmaeP ou pNZyaeP en M17 et chloramphénicol 10 µg. μL^{-1}. Afin d'extraire les plasmides, 2 mL de culture sont centrifugés pendant 1 min à 12.000 rpm. 200 µL de tampon 1 (kit GeneElute Plasmid Miniprep, Sigma) sont ajoutés ainsi que 10 $mg.mL^{-1}$ de lysozyme. La réaction est incubée 15 min à 50°C, puis l'extraction est poursuivie selon les recommandations du fournisseur (Sigma).

Préparation de cellules compétentes pour L. plantarum

Cinq cent mL de milieu MRS préchauffé à 37°C sont inoculé à DO_{600nm}= 0,15 à partir d'une préculture réalisée 24h avant l'ensemencement. La culture est incubée statiquement à 37°C. A partir de DO_{600nm}= 0,65, la culture est centrifugée à 6.000 g pendant 10 min à 4°C puis le culot est resuspendu dans 500 mL d'eau MilliQ stérile à 4°C. Le lavage est répété une fois. Puis les celllules sont resuspendues dans 1,5 mL de PEG 1500 (300 $g.L^{-1}$).

Electroporation de L. plantarum

Cent µL de cellules compétentes sont électroporées en présence de 1 µg de plasmide. Les paramètres électriques sont les suivants : 2200 V, 100Ω, 25 µF. Après le pulse, les cellules sont conservées 20 min dans la glace, puis 500 µL de MRS sont ajoutés. Après incubation à 37°C pendant 3h, une partie des cellules (10 à 100 µL) est étalée sur milieu sélectif contenant du chloramphénicol à 10 µg. μL^{-1}.

Outre les trois vecteurs d'étude contenant les gènes *mleP*, *maeP* et *yaeP* de *O. oeni*, le vecteur pNZ8048 dans lequel a été cloné le gène *mleP* de *L. lactis* est également introduit

chez *L. plantarum* NCIMB 8826. Ce dernier sert de témoin pour mettre en place les conditions d'induction.

Vérification des transformants

Les clones obtenus sont testés dans un premier temps par PCR sur colonies en utilisant le kit GeneReleaser (BioVenture) selon les recommandations du fournisseur. Dans un second temps, le plasmide est extrait par Miniprep (Sigma) et la présence de l'insert est vérifiée par PCR. Les amorces pYAD5' (GATTTCGTTCGAAGGAACTA) et pYAD3' (TCAAAGCAACACGTGCTGTA) dessinées sur le vecteur pNZ8048 et bordant l'insert ont été utilisées pour tester tous les clones quel que soit le vecteur qui a servi à la transformation. Les produits de PCR ont ensuite été séquençés.

Induction de l'expression de mleP, maeP et yaeP à la nisine (protocole suivant Cruz Martin et al, 2004)

Une préculture est réalisée par inoculation d'une colonie en MRS, chloramphénicol 10 µg. μL^{-1} à 37°C pendant 16h. Puis cette culture est diluée au 1 /50 dans du milieu frais et la croissance est suivie par mesure de la DO_{600nm}. La nisine est ajoutée à différentes DO_{600nm} après dilution. Différentes concentrations en nisine ont été testées. Les cellules sont récoltées 5h après induction de manière à obtenir une DO_{600nm} = 1 pour 1 mL. Après centrifugation à 10000 rpm pendant 2 min, le culot est conservé à -20°C.

Le culot est repris dans 100 µL de tampon Tris HCl 10 mM à pH 8,8. Quanrante mg de billes de verre (100 µm de diamètre) sont ajoutés et les cellules sont cassées au broyeur FastPrep 3X 30 s, puissance 6. Les protéines du surnageant sont dosées par la méthode de Bradford, puis 15 µg d'extrait cellulaire sont déposés sur gel SDS-PAGE. Sous l'application d'un courant électrique de 100 à 150 V, les protéines chargées négativement après dénaturation, migrent selon leur poids moléculaire.

Western Blotting

<u>Transfert de protéines</u>

Le gel et la membrane de nitrocellulose sont équilibrés dans du tampon de transfert (Tris 25 mM, glycine 190 mM, méthanol 20% v/v) puis soumis à un courant électrique à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec (trans-blot SD-Dry Transfert cell, Bio-Rad). Celui-ci est réalisé pendant 45 min à un ampérage de 5,5 $mA.cm^{-2}$ de membrane, sans dépasser 20 V.

Afin de vérifier l'efficacité du transfert, le gel est coloré au Bleu de Coomassie et la membrane est colorée au rouge Ponceau.

Hybridation avec les anticorps

Les sites non-spécifiques de la membrane sont saturés dans du tampon PBS –lait (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4, pH 7,2 ; 5% lait écrémé p/v) pendant 30 min. Ensuite, la membrane est lavée trois fois avec du PBS-Triton 100 (0,2% v/v) pour éliminer l'excès de caséine. La membrane est ensuite incubée dans du tampon PBS-lait-Triton (lait 5% v/v, Triton 0,2% v/v) pendant une heure avec l'anticorps monoclonal anti-polyHistidine de souris (Sigma-Aldrich) dilué au 1/2000 et directement couplé à la péroxidase (horseradish). Après trois lavages de la membrane dans du PBS-triton, la révélation est effectuée.

Révélation du blot avec le kit ECL (Enhanced Chemiluminescence detection)

La révélation est basée sur l'émission de lumière pendant la réaction produite lors de l'ajout des deux réactifs du kit ECL (GE Healthcare) avec la péroxidase. Le kit contient deux produits : le luminol et une solution de péroxide. Les solutions sont mélangées à température ambiante (v/v) puis versés sur la membrane. Après 1 min d'incubation, la membrane est égoutée puis emballée dans un film alimentaire. La lumière émise est ensuite capturée sur un film autoradiographique en chambre noire.

Construction d'un vecteur suicide pour la mutation du gène mleP de O. oeni

Un vecteur suicide nommé pmlePERY a été construit afin de muter le gène *mleP* de *O. oeni* par double recombinaison homologue. Les régions en amont et en aval de *mleP* ont été clonées dans le pUC18, de part et d'autre d'une casette conférant la résistance à l'érythromycine. Le pUC18 est un vecteur de clonage à haut nombre de copies chez *E. coli*, contenant une origine de réplication reconnue uniquement chez les bactéries à Gram négatif. Il ne peut donc pas se répliquer chez les bactéries à Gram positif. Une région de 1012 pb en amont de *mleP* a été amplifiée avec les amorces mleP3 et mleP4, puis clonée dans le pUC18 entre les sites KpnI et EcoRI. Puis une région de 1031 pb en aval de *mleP* a été amplifiée avec les amorces mleP5 et mleP6 et cloné dans le pUC18 entre les sites HindIII et BamHI. Ensuite, le pUC18 a été digéré par SmaI, un site du polylinker situé entre les deux régions amont et aval de *mleP*. Enfin, la casette erm^R, digérée aux extrémités par PvuII a été clonée au site

SmaI (les sites SmaI et PvuII coupent l'ADN en laissant des extrémités franches). Après ligation SmaI/PvuII, 5 µL de la réaction de ligation à été utilisée pour transformer *E. coli*. Les clones positifs ont été sélectionnés sur milieu LB contenant 50 $\mu g.mL^{-1}$ d'ampicilline et 150 $\mu g.mL^{-1}$ d'érythromycine.

Tableau 1. Oligonucléotides utilisés pour la construction du vecteur suicide pmlePERY

Nom	Séquence	Site de restriction	Localisation
mleP3	CCGT**GAATTC**TTGCATTGGGAAGATTTTGGCC	EcoRI	mleP *O. oeni*
mleP4	GCCA**GGTACC**GATCTCCTTAAAACATAACCTAA	KpnI	mleP *O. oeni*
mleP5	GATC**GGATCC**GACAAAATCATGGTGACGTTG	BamHI	mleP *O. oeni*
mleP6	GGCT**AAGCTT**GTGCATCAAGGGCATCCTTGA	HindIII	mleP *O. oeni*

REFERENCES

Augagneur Y., 2007, Métabolisme du L-malate et du citrate chez *Oenococcue oeni* et *Lactococcus lactis*, Thèse de doctorat, Université de Bourgogne.

Bandell M., Ansanay V., Rachidi N., Dequin S., Lolkema J.S., Membrane potential-generating malate (MleP) and citrate (CitP) transporters of lactic acid bacteria are homologous proteins, 1997, The Journal of Biological Chemistry, 272: 18140-18146.

Cruz Martin M., Fernandez M., Martin-Alonso J. M., Parra F., Boga J. A., Alvarez M. A., Nisin-controlled expression of Norwalk virus VP60 protein in *Lactobacillus casei*, 2004, FEMS Microbiology Letters, 237 : 385-391.

De Ruyter P. G. G. A., Kuipers O. P., De Vos W. M., Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin, 1996, Applied and Environmental Microbiology, 62: 3662-3667.

Kuipers O. P., Beerthuyzen M. M., De Ruyter P. G. G. A., Luesink E. J., de Vos W. M., Autoregulation of nisin biosynthesis in Lactococcus lactis by signal transduction, 1995, The Journal of Biological Chemistry, 270: 27299-27304.

Kunji E.R.S., Slotboom D-J., Poolman B., *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins, 2003, Biochimica et Biophysica Acta, 1610: 97-108.

Marty-Teysset C., Lolkema J. S., Schmitt P., Divies C., Konings W. N., Membrane potential-generating transport of citrate and malate catalyzed by CitP of *Leuconostoc mesenteroides*, 1995, The Journal of Biological Chemistry, 270: 25370-25376.

Mierau I., Kleerebezem M., 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*, 2005, Applied Microbiology and Biotechnology, 68: 705-717.

Pavan S., Hols P., Delcour J., Geoffroy M-C., Grangette C., Kleerebezem M., Mercenier A., Adaptation of the nisin-controlled expression system in *Lactobacillus plantarum* : a tool to study in vivo biological effects, 2000, Applied and Environmental Microbiology, 66 : 4427-4432.

Poolman B., Molenaar D., Smid E.J., Ubbink T., Abee T., Renault P.P., Konings W. N., Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy, 1991, Journal of Bacteriology, 173: 6030-6037.

Salema M., Lolkema J.S., San Romao M.V., Loureiro Dias M. C., The proton motive force generated in *Leuconostoc oenos* by L-malate fermentation, 1996, Journal of Bacteriology,178: 3127-3132.

Salema M., Poolman B., Lolkema J. S., Dias M. C., Konings W. N., Uniport of monoanionic L-malate in membrane vesicles from *Leuconostoc oenos*, 1994, European Journal of Biochemistry, 225: 289-295.

Sobczak I., Lolkema J. S., The 2-hydroxycarboxylate transporter family: physiology, structure, and mechanism, 2005, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 69: 665-695.

Annexe 2

Alignement de la séquence nucléotidique de la tyrosine décarboxylase de *L. brevis* IOEB 9809 (AF 446085.5), *L. curvatus* HSCC1737 (AB 086652.1) et *L. plantarum* (EF 178285.1).

```
brevis          ATGGAAAAAAGTAATCGCTCACTTAAAGATTTGGATCTAAATGCGTTGTTTATTGGCGAT 60
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        ATGAGTAACACTAGTTTTAGTGCAAAAGATACAGATTTATCTGCTCTATTTATCGGTGAT 60


brevis          AAGGCCGAAAATGGACAACTCTACAAGGATTTACTTAATAAATTAGTGGATGAACATTTA 120
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        AAAGCTGAGAATGGTCAACTGTATAAGGATTTGTTAGGTAAGTTGGTTGACGAACATCTT 120


brevis          GGGTGGCGTAAGAACTACATACCTTCGGATCCAAATATGATTGGTCCAGAAGATCAAAAC 180
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        GGATGGCGTCAAAACTATATGCCACAAGACAAACCAATGATTTCAGCTGAACAACAAACA 180


brevis          TCGCCTGAGTTTAAAAAGACTGTTGGGCATATGAAGACAGTCTTAGATCAGTTGTCAGAA 240
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        TCACCTGAGTTCCGAGGAACAGTCAACAATATGAAAGACGTTTTAGATGAACTTTCATCA 240


brevis          CGGATCCGAACAGAGTCTGTTCCATGGCATTCAGCTGGTCGCTATTGGGGTCATATGAAT 300
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        CGTTTACGTTCACAATCAGTTCCTTGGCATAATGCTGGCCGTTACTGGGGACATATGAAC 300


brevis          TCAGAGACCTTAATGCCTGCTCTATTGGCGTATAGCTATGCCATGTTATGGAATGGTAAT 360
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        TCAGAAACGTTAATGCCAGCTATTTTGGCATATAACTATGCAATGTTATGGAATGGTAAT 360


brevis          AACGTGGCTTATGAATCTTCGCCAGCAACGTCGCAAATGGAAGAAGAAGTTGGCCAAGAA 420
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        AACGTTGCTTATGAATCATCACCCGCAACTTCACAAATGGAAGAAGAAGTTGGTTTGGAA 420


brevis          TTTGCTCGGTTAATGGGTTATGACTATGGGTGGGGCCACATTGTCGCAGATGGTTCCTTG 480
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        TTTGCAACATTGATGGGTTACAAAAATGGCTGGGGCCACATTGTGGCTGATGGCTCATTA 480


brevis          GCTAACCTTGAAGGACTCTGGTATGCCCGAAATATTAAATCACTCCCGTTTGCCATGAAA 540
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        GCTAACTTGGAAGGGTTATGGTATGCACGTAATATCAAATCACTTCCATTTGCAATGAAG 540
```

```
brevis          GAAGTTAATCAAGAATTAGTTGCCGGCAAGTCCGATTGGGAGCTTCTTAATATGCCGACT 600
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        GCTGTTGATCCAACGATTGTCGCTGGTAAGACAGACTGGGAATTATCAAATATGTCAACT 600

brevis          AAAGAAATTATGGATCTTTTGGAGAATGCGGGTTCTCAGATCGATGAAGTCAAGAAGCGT 660
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        AAAGAAATTATGGATTTAGTTGAAGCTAACGGCGACAAGATCGATGAAATCAAAGCTAAA 660

brevis          TCAGCTCGAAGTGGTAAGAATCTACAACGTCTTGGGAAATGGCTAGTACCACAAACAAAG 720
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        TCAGCTCGTGGTGGTAAAGACCTTGACAAATTAGGCAAATGGTTAGTACCACAAACAAAA 720

brevis          CATTATTCTTGGATGAAGGCCGCTGATATCATTGGTATTGGTTTGGATCAGGTTGTTCCC 780
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        CATTATTCATGGTTAAAAGCCGCTGATATTATCGGTATCGGTTTGGATCAAGTTATTCCT 780

brevis          GTTCCAATTGATAGTAATTATCGGATGGATATTCAGGCCTTAGAACGCATTATTCGTAAA 840
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        GTACCAGTTGATTCAAACTACCGGATGGATATTAATGAATTAGAAAAGATTATTCGTGAA 840

brevis          TATGCGGCTGAAAAGACACCAATATTAGGTGTAGTTGGTGTGGCCGGATCAACTGAAGAA 900
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        TTAGCAAGCACAGAAACACCAATTCTTGGGGTTGTCGGCGTTGTTGGCTCAACTGAAGAA 900

brevis          GGTGCCGTTGACGGCATTGATAAGATTGTCGCGTTACGTCAAAAGCTGCAAAAGGAAGGG 960
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        GGTGCTGTTGATGGCATCAACGAAATTGCTGAATTACGTAACAAACTTGTTAAAGAAGGC 960

brevis          ATTTATTTCTATCTACACGTAGATGCTGCATATGGTGGATATGCTCGGGCATTGTTCTTG 1020
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        ATCTATTTCTACTTCCATATTGATGCTGCTTACGGTGGTTATGGTCGTGCTATCTTACTT 1020

brevis          GACGAGGACGATCAGTTTATTCCATACAAAAATTTACAAAAAGTACATGCGGAAAATCAT 1080
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        GATGAAGATAACAAATTAATTCCATACAAAGACCTACAAAGCAAATTTGCTGAATACAAT 1080

brevis          GTCTTCACGGAAGATAAAGAATACATCAAACCAGAAGTCTATGCGGCATATAAAGCTTTC 1140
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        GTCTTCACTGAAGAAGAAAACCTTGTTTCAGAACATACTTACAATGCATATGCTGCATTC 1140

brevis          GATCAAGCAGAGTCCATTACAATTGATCCCCATAAGATGGGATATGTACCATACTCGGCT 1200
```

```
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        CCAGAAGCAGAATCAGTTACAATTGATCCACATAAGATGGGTTACATTCCTTATTCAGCT 1200

brevis          GGGGGCATTGTCATTCAAGATATTCGGATGCGTGACACGATTTCCTATTTTGCAACATAT 1260
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        GGTGGGATTGCCATCCAAGATATTCGCATGCGCGACGTGATTTCATACTTCGCGACATAC 1260

brevis          GTATTTGAGAAGGGTGCCGATATTCCGGCATTGCTAGGTGCTTATATTCTGGAGGGCTCC 1320
plantarum       ------------------------------------------------------------
curvatus        GTCTTTGAAAAAGGTGCAGATATTCCTGCATTATTGGGTGCATATATTCTTGAAGGTTCA 1320

brevis          AAAGCGGGTGCCACTGCTGCATCTGTTTGGGCAGCACACCACACATTGCCATTGAACGTG 1380
plantarum       ------------ACCGCGGCGAGCGTGTGGGCGGCGCATAAAACCCTGCCGCTGAACGTG 48
curvatus        AAAGCTGGCGCAACTGCTGCATCAGTATGGGCTGCTCATAAGACATTACCACTGAACGTT 1380
                            ** ** **    ** ***** ** **  * **  * **  *******

brevis          ACAGGATATGGGAAGTTGGAAGGTGCCTCAATTGAAGGGGCTCACCGTTACTATGATTTC 1440
plantarum       ACCGGCTATGGCAAACTGG---GCGCGAGCATTGAAGGCGCGCATCGCTTTTATAACTTT 105
curvatus        ACTGGCTATGGTAAGTTAGTCGGGGCTTCAATCGAAGGTGCTCGTCGTTTCTACAACTTC 1440
                ** ** ***** **  * *   * **    ** ***** ** *  ** *  **  * **

brevis          TTGAAGAATTTAAAGTTTGAAGTGGCTGGTAAACGGATTTCAGTTCATCCGTTAATCTCA 1500
plantarum       CTGAGCGGCCTGAAATTTAAAGTGGGCGATAAAACCATTGAAGTGCATCCGCTGACCGAT 165
curvatus        TTAAGTGGTCTAGAATTTAAAGTTGGCGACAAGACAATTGAAGTTCATCCTTTAACAGAT 1500
                 * *      *  * *** **** *  *  **    ***  *** *****  * *

brevis          CCTGACTTCAATATGG------TTGACTATGTTTTAAAAGAAGATGGCAATGATGACTTA 1554
plantarum       CCGGATTTTAACATGGAAACCGTGGATTATGTGTTTCAGGAAAAAGGCAACGATGATCTG 225
curvatus        CCTGACTTCAACATGG------TTGACTATGTCTTCCAAGAAAAGGGCAATAACAACCTT 1554
                ** ** ** ** ****      * ** ***** **  * *** * *****  *  *  *

brevis          ATTGAAATGAATCGATTGAATCATGCCTTCTATGAACAAGCATCTTATGTTAAAGGGTC- 1613
plantarum       GTGGAAATGGA-------AACCA--------ACGAAC-------------TGAA------ 251
curvatus        GTGGAAATGAACGAATTAAACCATGAATTCTACAACCAAGCTTCATATG-TAACTGGTAG 1613
                 * ****** *       ** **        *  * *            * *

brevis          CTTGTATGGTAAAGAATATATCGTATCACATACGGACTTTGCTATCCCAGATTATGGTGA 1673
plantarum       ----------------------------------------------CCA----------- 254
curvatus        CATCTATGGTAACGAATACCTAACATCACATACTGACTTTGCTATTCCAGATTATGGTAA 1673
                                                             ***

brevis          TAGTCCATTGGCATTTGTTGAAAGTCTAGGCTTTAGCGAAGCTGAA-----T-GGCGACA 1727
plantarum       ------------------TGAA--------TTTTA-------TGAA-----CAGGCGA-- 274
curvatus        CAGCCCATTCAAGTTTGTTAATAACTTAGGCGTTA------CTGAAGAAGGTTGGAAAGA 1727
                               * *           ***       ****       **  *

brevis          TGCCGGAAAGGTTACAATCATTCGCGCTTCGGTTATGACGCCGTATATGAATCAACGAGA 1787
plantarum       -GCGTGAAAGG------------------CAGCTATGGCCTGGAATAT------------ 303
```

```
curvatus        AGCTGGTAAAGTAACGGTTCTTCGGGCCGCTGTTATGACACCATATATGAACAAAGCAGA 1787
                 **  * ** *                 * * **** *     ****

brevis          AAACTTTGACTACTTTGCACCACGAATCAAAAAAGCAATTCAAGCAGACCTTGAAAAAGT 1847
plantarum       --------------CTGCGCCAT----------------------CCGACCTT-------- 320
curvatus        AAACTTTGATTACTTTGCTCCTAAGATCAAA-------------CAAGCTATGCAAGAAA 1834
                              *** **                       *   *  *

brevis          CTAT-GCTTCGGTTAATCAAAAG-GAAAATGTTTAA 1881
plantarum       ---T-GCGCCGGATTAT------------------- 333
curvatus        AATTAGAAGCAATTTACGAAGATCGTAAATAA---- 1866
                   * *   *   * *
```

REFERENCES

A

Alberto M.R., Arena M.E., Manca de Nadra M.C., A comparative survey of two analytical methods for identification and quantification of biogenic amines, 2002, Food Control, 13: 125–129.

Alberto M.R., Arena M.E., Manca de Nadra M.C., Putrescine production from agmatine by *Lactobacillus hilgardii* : effect of phenolic compounds, 2007, Food Control, 18: 898-903.

Alcaide-Hidalgo J. M., Moreno-Arribas M. V., Martin-Alvarez P. J., Polo M. C., Influence of malolactic fermentation, postfermentative treatmentsand ageing with lees on nitrogen compounds of red wines, 2007, Food Chemistry, 103: 572-581.

Alegre M.T., Rodriguez M.C., Mesas J.M., Nucleotide sequence analysis of pRS1, a cryptic plasmid from *Oenococcus oeni*, 1999, Plasmid, 41: 128-134.

Andiç S., Gençcelep H., Tunçtürk Y., Köse S., The effect of storage temperatures and packaging methods on properties of Motal cheese, 2010, Journal of Dairy Science, 93: 849-859.

Anli R.E., Vural N., Yilmaz S., Vural Y.H., The determination of biogenic amines in Turkish red wines, 2004, Journal of Food Composition and Analysis, 17: 53-62.

Ansanay V., Dequin S., Blondin B., Barre P., Cloning, sequence and expression of the gene encoding the malolactic enzyme from *Lactococcus lactis*, 1993, FEBS Letters, 332: 74-80.

Aponte M., Blaiotta G., Francesca N., Moschetti G., Could halophilic archaea improve the traditional salted anchovies (*Engraulis encrasicholus* L.) safety and quality?, 2010, Letters in Applied Microbiology, 51: 697-703.

Arena M. E., Manca de Nadra M.C., Biogenic amine production by *Lactobacillus*, 2001, Journal of Applied microbiology, 90: 158-162.

Arena M.E., Manca de Nadra M.C., Influence of ethanol and low pH on arginine and citrulline metabolism in lactic acid bacteria from wine, 2005, Research in Microbiology, 156: 858-864.

Arena M.E., Fiocco D., Manca de Nadra M. C., Pardo I., Spano G., Characterization of a *Lactobacillus plantarum* strain able to produce tyramine and partial cloning of a putative tyrosine decarboxylase gene, 2007, Current Microbiology, 55: 205-210.

Arendt E.K., Lonvaud A., Hammes W.P., Lysogeny in *Leuconostoc oenos*, 1991, Journal of general Microbiology, 137: 2135-2139.

Armagan Onal, A review: current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods, 2007, Food Chemistry, 103: 1475-1486.

Arnaud M., Chastanet A., Débarbouillé M., New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, Gram-positive bacteria, 2004, Applied and Environmental Microbiology, 70: 6887-6891.

Assad-Garcia J.S., 2008, Développement d'outils moléculaires pour l'exploration fonctionnelle de *Oenococcus oeni* ; une bactérie d'intérêt œnologique, thèse de doctorat Université de Bourgogne.

Assad-Garcia J.S., Bonnin-Jusserand M., Garmyn D., Guzzo J., Alexandre H. and Grandvalet C., An improved protocol for electroporation of *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 using ethanol as immediate membrane fluidizing agent, 2008, Letters in Applied Microbiology, 47: 333-338.

B

Bartowsky E.J., *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation- moving into the molecular arena, 2005, Australian Journal of Grape and Wine research, 2: 174-187.

Bartowsky E.J., Henschke P., Le gout beurré du vin- le diacétyle, 2005, Revue des Oenologues, 116 : 16-18.

Bauza T., Blaise A., Teissedre P.L., Cabanis J.C., Kanny G., Moneret-Vautrin D.A., Daumas F., Les amines biogènes du vin: metabolism et toxicité, 1995a, Bulletin de l'OIV ISSN 0029-7127, 68: 42-67.

Bauza T., Blaise P.L., Mestres J.P., Daumas F., Cabanis J.C., Evolutions des teneurs en amines biogènes des moûts et des vins au cours de la vinification, 1995b, Sciences des Aliments, 15: 559-570.

Beltramo C., 2004, La réponse aux stress chez *Oenococcus oeni*, une bacterie de la fermentation malolactique des vins: expression differentielle de genes et mise en oeuvre d'une technique de transfert génétique, thèse de doctorat, Université de Bourgogne.

Beltramo C., Oraby M., Bourel G., Garmayn D., Guzzo J., A new vector, pGID052, for genetic transfer in *Oenococcus oeni*, 2004a, FEMS Microbiology Letters, 236: 53-60.

Beltramo C., Grandvalet C., Guzzo, J., Expression of *Oenococcus oeni* clpP-clpL locus in response to environmental conditions, 2004b, Lait, 84: 97–93.

Biswas I., Gruss A., Ehrlich S.D., Maguin E., High-efficiency gene inactivation and replacement system for Gram-positive bacteria, 1993, Journal of Bacteriology, 175: 3628-3635.

Bjornsdottir-Butler K., Jones J.L., Benner R., Burkhardt W., Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for detection of Gram-negative histamine-producing bacteria in fish, 2009, Food Microbiology, 28: 356-363.

Blattel V., Wirth K., Claus H., Schlott B., Pfeiffer P., Konig H., A lytic enzyme cocktail from *Streptomyces* sp. B578 for the control of lactic and acetic acid bacteria in wine, 2009, Applied Microbiology and Biotechnology, 83: 839-848.

Bodmer S., Imark C., Kneubuhl M., Biogenic amines in foods: histamine and food processing, 1999, Inflammation Research, 48: 296-300.

Bonetta S., Carraro E., Coasson J.D., Travaglia F., Arlorio M., Detection of biogenic amine producer bacteria in a typical Italian goat cheese, 2008, Journal of Food Protection, 71: 205-209.

Børresen T., Klausen N.K., Larsen L.M., Sørensen H., Purification and characterisation of tyrosine decarboxylase and aromatic-l-amino-acid decarboxylase, 1989, Biochimica and Biophysica Acta, 993: 108-113.

Bourdineaud J.-P., Nehme B., Tesse S., Lonvaud-Funel A., A bacterial gene homologous to ABC transporters protect *Oenococcus oeni* from ethanol and other stress factors in wine, 2004, International Journal of Food Microbiology, 92: 1–14.

Bover-Cid S., Holzapfel W. H., Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria, 1999, International Journal of Food microbiology, 53: 33-41.

Bover-Cid S., Izquierdo-Pulido M., Vidal-Carou M.C., Effectiveness of a *Lactobacillus sakei* starter culture in the rediction of biogenic amine accumulation as a function of the raw material quality, 2001, Journal of Food Protection, 64: 367-373.

Bover-Cid S., Iquierdo-Pulido M., Mariné-Font A., Vidal-Carou M.C., Biogenic mono-, di- and polyamine contents in Spanish wines and influence of a limited irrigation, 2006, Food Chemistry, 96: 43-47.

Bover-Cid S., Miguelez-Arrizado M.J., Becker B., Holzapfel W.H., Vidal-Carou M.C., Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability, 2008, Food Microbiology, 25: 269-277.

Bradford M. M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, 1976, Analytical Biochemistry, 72:248-254.

Brantl S., Behnke D., Alonso J.C., Molecular analysis of the replication region of the conjugative *Streptococcus agalactiae* plasmid pIP501 in *Bacillus subtilis*. Comparaison with plasmids pAM beta 1 and pSM19035, 1990, Nuceic Acids Research, 18: 4783-4790.

Brito L., Vieira G., Santos M.A., Paveia H., Nucleotide sequence analysis of pOg32, a cryptic plasmid from *Leuconostoc oenos*, 1996, Plasmid, 36: 49-54.

Brito L., Paveia H., Presence and analysis of large plasmids in *Oenococcus oeni*, 1999, Plasmid, 41: 260-267.

Brurberg M.B., Nes I.F., Eijsink V.G.F., Pheromone-induced production of antimicrobial peptides in *Lactobacillus*, 1997, Molecular Microbiology, 26: 347-360.

Bunková L., Bunka F., Mantlová G., Cablová A., Sedlácek I., Svec P., Pachlová V., Krácmar S., The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese, 2010, Food Microbiology, 27: 880-888.

Burdychova R., Komprda T., Biogenic amine-forming microbial communities in cheese, 2007, FEMS Microbiology Letters, 276: 149-155.

Busto O., Guasch J., Borrull F., Determination of biogenic amines in wine after precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, 1996, Journal of Chromatography A, 737: 205-213.

Busto O., Miracle M., Guasch J., Borrull F., Determination of biogenic amines in wines by high-performance liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization, 1997, Journal of Chromatography A, 757: 311-318.

C

Calles-Enriquez M., Hjort Eriksen B., Skov Andersen P., Rattray F.P., Johansen A.H., Fernandez M., Ladero V., Alvarez M.A., Sequencing and transcriptional analysis of the *Streptococcus thermophilus* histamine biosynthesis gene cluster: factors that affect differential *hdcA* expression, 2010, Applied and Environmental Microbiology, 76: 6231-6238.

Capozzi V., Ladero V., Beneduce L., Fernández M., Alvarez M.A., Bach B., Barnavon L., Grieco F., Spano G., Isolation and characterization of tyramine-producing *Enterococcus faecium* strains from red wine, 2011, Food Microbiology, 28: 434-439.

Cavin J. F., Prevost H., Lin J., Schmitt P., Divies C., Medium for screening *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation, 1989, Applied Environmental Microbiology, 55: 751-753.

Challan-Belval S., 2000, Mise en place d'une méthode de transfert génétique chez *Oenococcus oeni*, Thèse de doctorat ENSBANA-Université de Bourgogne.

Chanoine A.S., Les amines biogènes dans les vins : Impact d'une souche de bactérie lactique sélectionnée en comparaison de flores indigènes lors de la FML avec et sans lie sur un vin de Pinot Noir, Mémoire DNO, Dijon.

Charpentier C. & Feuillat M., Yeast autolysis, 1993, Wine Microbiology and Biotechnology (Fleet GH, ed), pp. 225-242. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.

Charpentier E., Gerbaud G., Courvalin P., Conjugative mobilization of the rolling-circle plasmid pIP823 from *Listeria monocytogenes* BM4293 among gram-positive and gram-negative bacteria, 1999, Journal of Bacteriology, 181: 3368-3374.

Chu-Ky S., Tourdot-Marechal R., Marechal P.A., Guzzo J., Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: effects on membrane fluidity and cell viability, 2005, Biochimica and Biophysica Acta, 1717: 118-124.

Clewell D.B., Yagi Y., Dunny G.M., Schultz S.K., Characterization of three plasmid deoxyribonucleic acid molecules in a strain of *Streptococcus faecalis*: identification of a plasmid determining erythromycin resistance, 1974, Journal of Bacteriology, 117: 283-289.

Connil N., Le Breton Y., Dousset X., Auffray Y., Rincé A., Prévost H., Identification of the *Enterococcus faecalis* tyrosine decarboxylase operon involved in tyramine production, 2002, Applied and Environmental Microbiology, 68: 3537-3544.

Copeland W.C., Domena J.D., Robertus J.D., The molecular cloning, sequence and expression of the *hdcB* gene from *Lactobacillus* 30a, 1989, Gene, 85: 259-265.

Costantini A., Cersosimo M., Del Prete V., Garcia-Moruno E., Production of Biogenic Amines by Lactic Acid Bacteria: Screening by PCR, Thin-Layer Chromatography, and High-Performance Liquid Chromatography of Strains Isolated from Wine and Must, 2006, Journal of Food Protection, 69: 391-396.

Costantini A., Vaudano E., Del Prete V., Danei M., Garcia-Moruno E., Biogenic amine production by contaminating bacteria found in starter preparations used in winemaking, 2009, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 10664-10669.

Coton E., Rollan G., Bertrand A., Lonvaud-Funel A., Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency, and distribution, American Journal Enology Viticulture, 1998a, 49: 199-204.

Coton E., Rollan G.C., Lonvaud-Funel A., Histidine decarboxylase of *Leuconostoc oenos* 9204: purification, kinetic properties, cloning and nucleotide sequence of the hdc gene, 1998b, Journal of Applied Microbiology, 84: 143-151.

Coton M., Coton E., Lucas P., Lonvaud A., Identification of the gene encoding a putative tyrosine decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria, 2004, Food Microbiology, 21: 125-130.

Coton E., Coton M., Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine- producing bacteria, Journal of Microbiological Methods, 2005, 63: 296-304.

Coton E., Coton M., Evidence of horizontal transfer as origin of strain to strain variation of the tyramine production trait in *Lactobacillus brevis*, 2009, Food Microbiology, 26: 52-57.

Coton M., Romano A., Spano G., Ziegler K., Vetrana C., Desmarais C., Lonvaud-Funel A., Lucas P., Coton E., Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider, 2010, Food Microbiology, 27: 1078-1085.

Coton M., Fernandez M., Trip H., Ladero V., Mulder N.L., Lolkema J.S., Alvarez M.A., Coton E., Characterization of the tyramine-producing pathway in *Sporolactobacillus* sp P3J, Microbiology, 2011, DOI 10.1099/mic.0.046367-0.

Coucheney, F., 2005, La protéine Lo18, "small HSP" de la bactérie *Oenococcus oeni* impliquée dans la fermentation malolactique des vins. Régulation, structure oligomérique et rôle de lipochaperon, Thèse de doctorat, Université de Bourgogne.

D

De Las Rivas B., Marcobal A., Carrascosa A.V., Munoz R., PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine, 2006, Journal of Food Protection, 69 : 2509-2514.

De Las Rivas B., Carrascosa A.V., Munoz R., Gene cloning, expression, and functional characterization of an ornithine decarboxylase protein from *Serratia liquefaciens* BIFI65, 2007, Journal of Microbiology and Biotechnology, 17: 408-413.

De las Rivas B., Rodriguez H., Carrascosa A.V., Munoz R., Molecular cloning and functional characterization of a histidine decarboxylase from *Staphylococcus capitis*, 2008, Journal of Applied Microbiology, 104: 194–203.

Del Prete V., Costantini A., Cecchini F., Morassut M., Garcia-Moruno E., Occurrence of biogenic amines in wine : the role of grapes, 2009, Food Chemistry, 112: 474-481.

Derré I., Rapoport G., Msadek T., The CtsR regulator of stress response is active as a dimer and specifically degraded *in vivo* at 37°C, 2000, Molecular Microbiology, 38: 335-347.

Diaz-Cinco M.E., Fraijo G., Grajeda P., Lozano-Taylor J., Gonzalezde Meja E., Microbial and chemical analysis of Chihuahua cheese and relationships to histamine, 1992, Journal of Food Science 57: 355–365.

Dicks L.M., Transformation of *Leuconostoc oenos* by electroporation, 1994, Biotechnology Techniques, 8: 901-904.

Dicks L. M. T., Dellaglio F., Collins M. D., Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov, 1995, International Journal of Systematic Bacteriology, 45: 395-397.

Divol B., T. Tonon, S. Morichon, E. Gindreau & A. Lonvaud-Funel. Molecular characterization of *Oenococcus oeni* genes encoding proteins involved in arginine transport, 2003, Journal of Applied microbiology, 94: 738-746.

Donahue J.P., Israel D.A., Peek R.M., Blaser M.J., Miller G.G., Overcoming the restriction barrier to plasmid transformation of *Helicobacter pylori*, 2000, Molecular Microbiology, 37: 1066-1074.

Driessen A.J., Smid E.J., Konings W.N., Transport of diamines by *Enterococcus faecalis* is mediated by an agmatine-putrescine antiporter, 1988, Journal of Bacteriology, 170: 4522-4527.

Dubnau D., Genetic competence in *Bacillus subtilis*, 1991, Microbiology Review, 55: 395-424.

Dugo G. mo, Vilasi F., La Torre G.L., Pellicano T.M., Reverse phase HPLC/DAD determination of biogenic amines as dansyl derivatives in experimental red wines, Food Chemistry, 2006, 95: 672-676.

Dupont L., Boizet-Bonhoure B., Le Coddeville M., Auvray F., Ritzenthaler P., Characterization of genetic elements required for site-specific integration of *Lactobacillus delbrueckii* subsp.*bulgaricus* bacteriophage mv4 and construction of an integration- proficient vector for *Lactobacillus plantarum*, 1995, Journal of Bacteriology, 177: 586-595.

E

Endo A., Okada S., *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue, 2006, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56: 2345-2348.

Endo, A., Okada, S., Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. Nov, 2008, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58: 2195-2205.

F

Fernández M., Linares D.M., Alvarez M.A., Sequencing of the Tyrosine Decarboxylase Cluster of *Lactococcus lactis* IPLA 655 and the Development of a PCR Method for Detecting Tyrosine Decarboxylating Lactic Acid Bacteria, 2004, Journal of food protection, 67: 2521-2529.

Fernandez M., Del Rio B., Linares D.M., Martin M.C., Alvarez M.A., Real-time polymerase chain reaction for quantitative detection of histamine-producing bacteria: use in cheese production, 2006, Journal Dairy Science, 89: 3763-3769.

Fernandez M., Zuniga M., Amino acid catabolic pathways in lactic acid bacteria, 2006, Critical Reviews in Microbiology, 32: 155-183.

Fernández M., Linares D.M., Rodríguez A., Alvarez M.A., Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655, 2007, Applied Microbiology and Biotechnology, 73: 1400-1406.

Foligné B., Dewulf J., Breton J., Claisse O., Lonvaud-Funel A., Pot B., Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria : immunomodulation by *Oenococcus oeni*, 2010, International Journal of Food Microbiology, 140: 136-145.

Fremaux C., Aigle M., Lonvaud-Funel A., Sequence analysis of *Leuconostoc oenos* DNA: organization of pLo13, a cryptic plasmid, Plasmid, 30: 212-223.

G

Gale E. F., The bacterial amino acid decarboxylases, 1946, Advances in Enzymology, 6:1-32.

Gallagher T., Snell E.E., Hackert M.L., Pyruvoyl-dependent histidine decarboxylase: active site structure and mechanistic analysis, 1989, Journal of Biological Chemistry, 264: 12737.

Garai G., Duenas M.T., Irastorza A., Moreno-Arribas M.V., Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider, 2007, Letters in Applied Microbiology, 45: 473-478.

Garcia-Marino M., Trigueros A., Escribano-Bailon T., Influence of oenological practices on the formation of biogenic amines in quality red wines, 2010, Journal of Food Composition and Analysis, 23: 455-462.

Garcia-Villar N., Saurina J., Hernandez-Cassou S., High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in wines with an experimental design optimization procedure, Analytica Chimica Acta, 2006, 575: 97-105.

Gardan R., Besset C., Guillot A., Gitton G., Monnet V., The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* strain LMD-9, 2009, Journal of Bacteriology, 191: 4647-4655.

Gardini F., Martuscelli M., Caruso M.C., Galgano F.,Crudele M.A., Favati F. , Guerzoni M.E., Suzzi G., Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*, 2001, International Journal of Food Microbiology, 64: 105-117.

Gardini F., Zaccarelli A., Belletti N., Faustini F., Cavazza A., Martuscelli M., Mastrocola D., Suzzi G., Factors influencing biogenic amines production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system, 2005, Food Control, 16: 609-616.

Garvie E. I., *Leuconostoc oenos* sp. nov., 1967, Journal of general Microbiology., 48: 431-438

Garvie E. I., Genus *Leuconostoc*, 1986, In Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins. 1071-1075.

Gerbaux V., Villa A., Monamy C., Bertrand A., Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation, 1997, American Journal Enology Viticulture, 48: 49 54.

Gomez-Alonso S., Hermosin-Gutierrez I., Garcia-Romero E., Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples, 2007, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 608-613.

Gonzalez C.F., Kunka B.S., Plasmid transfer in *Pediococcus* spp.: intergeneric and intrageneric transfer of pIP501, 1983, Applied Environmental Microbiology, 46: 81-89.

Gonzalez Marco A., Ancin Azpilicueta C., Amine concentrations in wine stored in bottles at different temperatures, 2006, Food Chemistry, 99: 680-685.

Griswold A.R., Chen Y.Y.M., Burne R.A., Analysis of an agmatine deiminase gene cluster in *Streptococcus mutans* UA159, 2004, Journal of Bacteriology, 186: 1902-1904.

Griswold A.R., Chen Y.Y.M., Burne R.A., Regulation and physiological significance of the agmatine deiminase system of *Streptococcus mutans* UA159, 2006, Journal of Bacteriology, 188: 834-841.

Groot M.N., Nieboer F., Abee T., Enhanced transformation efficiency of recalcitrant *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* isolates upon in vitro methylation of plasmid DNA, 2008, Applied Environmental Microbiology, 74: 7817-7820.

Guirard B., Snell E., Purification and properties of ornithine decarboxylase from *Lactobacillus* sp. 30a, 1980, Journal of Biological Chemistry, 255: 5960-5964.

H

Halasz A., Barath A., Simon-Sarkadi L, Holzapfel W, Biogenic amines and their production by microorganisms in food, 1994, Trends in Food Science & Technology, 5: 42-49.

Hayashi S., Murakami Y., Matsufuji S., Ornithine decarboxylase antizyme: a novel type of regulatory protein, 1996, Trends in Biochemical Sciences, 21: 27-30.

Helmark S., Hansen M.E., Jelle B., Sorensen K.I., Jensen P.R., Transformation of *Leuconostoc carnosum* 4010 and evidence for natural competence of the organism, 2004, Applied and Environmental Microbiology, 70: 3695-3699.

Hernandez-Orte P., Pena-Gallego A., Ibarz M.J., Cacho J., Ferreira V., Determination of the biogenic amines in musts and wines before and after malolactic fermentation using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate as the derivatizing agent, 2006, Journal of Chromatography A, 1129: 160–164.

Horodniceanu T., Bouanchaud D.H., Bieth G., Chabbert Y.A., R plasmids in *Streptococcus agalactiae* (group B), 1976, Antimicrob Agents Chemother, 10 : 795-801.

Hungerford J.M., Scombroid poisoning: a review, 2010, Toxicon, 56: 231-243.

Hwang D.F., Chang S.H., Shiua C.Y., Chai T.J., High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning, 1997, Journal of Chromatography B, 693: 23-30.

I

Izquierdo-Pulido M., Hernandez-Jover T., Marine-Font A., Vidal-Carou M.C., Biogenic amines contents in European beers, 1994, Proc. Int. Eur. Food Tox. IV Conf., pp 65-71.

Izquierdo-Pulido M., Carceller-Rosa J.M., Mariné-Font A., Vidal-Carou M.C., Tyramine Formation by *Pediococcus* spp. during Beer Fermentation, 1997, Journal of Food Protection, 60: 831-836.

J

Jack R.W., Tagg J.R., Ray B., Bacteriocins of Gram-positive bacteria, 1995, Microbiological Reviews, 59: 171-200.

Jobin M.-P., Garmyn D., Divies C., Guzzo, J., The *Oenococcus oeni* clpX homologue is a heat shock gene preferentially expressed in exponential growth phase, 1999a, Journal of Bacteriology, 181: 6634–6641.

Jobin M.-P., Garmyn D., Divies C., Guzzo, J., Expression of the *Oenococcus oeni* trxA gene is induced by hydrogen peroxide and heat shock, 1999b, Microbiology, 145: 1245 1251.

Jorgensen L.V., Huss H.H., Dalgaard P., The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon, 2000, Journal of Applied Microbiology, 89: 920-934.

K

Kammerer B., La génétique des lactobacilles, leuconostocs et pédiocoques : criblage, sélection et construction de mutants, 1996, Lait, 76 : 51-66.

Kirschbaum J., Rebscher K., Bruckner H., Liquid chromatographic determination of biogenic amines in fermented foods after derivatization with 3,5-dinitrobenzoyl chloride, 2000, Journal of Chromatography A, 881: 517–530.

Klausen N.K., Lund E., Formation of biogenic amines in herring and mackerel, 1986, Zeitschrift fur Lebensmittel untersuchung und -Forschung 182: 459–463.

Konagaya Y., Kimura B., Ishida M., Fujii T., Purification and properties of a histidine decarboxylase from *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium, 2002, Journal of Applied Microbiology, 92: 1136–1142.

Konings W.N., Poolman B., van Veen H.W., Solute transport and energy transduction in bacteria, 1994, Antonie van Leeuwenhoek, 65: 369-380.

Konings W.N., J.S. Lolkema, H. Bolhuis, H.W. van Veen, B. Poolman and A.J.M. Driessen. The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria, 1997, Antonie van Leeuwenhoek, 71: 117-128.

Konings W.N., The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria, 2002, Antonie van Leeuwenhoek , 71: 117-128.

Krause I., Bockhardt A., Neckermann H., Henle T., Klostermeyer H., Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dabsyl derivatives, 1995, Journal of Chromatography A, 715: 67-79.

L

Labarre C., Divies C., Guzzo J., Genetic organization of the mle locus and identification of a mle-like gene from *Leuconostoc oenos*, 1996, Applied Environmental Microbiology, 62: 4493-4498.

Ladero V., Fernandez M., Alvarez M.A., Effect of post-ripening processing on the histamine and histamine-producing bacteria contents of different cheeses, 2009, International Dairy Journal, 19: 759-762.

Ladero V., Martínez N., Cruz Martín M., Fernández M., Alvarez M.A., qPCR for quantitative detection of tyramine-producing bacteria in dairy products, 2010, Food Research International, 43: 289-295.

Ladero V., Coton M., Fernández M., Buron N., Cruz Martín M., Guichard H., Coton E., Alvarez M.A., Biogenic amines content in Spanish and French natural ciders: Application of qPCR for quantitative detection of biogenic amine-producers, 2011, Food Microbiology, 28: 554-561.

Landete J.M., Ferrer S., Pardo, I., Improved enzymatic method for the rapid determination of histamine in wine, 2004, Food Additives and Contaminants, 21: 1149–1154.

Landete J. M., Ferrer S., Pardo I., Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine?, 2005, Journal of Applied Microbiology, 99: 580-586.

Landete J.M., Pardo I., Ferrer S., Histamine, histidine, and growth-phase mediated regulation of the histidine decarboxylase gene in lactic acid bacteria isolated from wine, 2006, FEMS Microbiology Letter, 260: 84-90.

Landete J. M., Pardo I., Ferrer S., Tyramine and phenylethylamine production among lactic acid bacteria isolated from wine, International Journal of Food Microbiology, 2007a, 115: 364-368.

Landete J. M., De Las Rivas B., Marcobal A., Munoz R., Molecular methods for the dectection of biogenic amine-producing bacteria on foods, 2007b, International Journal of Food Microbiology, 117: 258-269.

Landete J. M., Ferrer S., Pardo I., Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine, 2007c, Food Control, 18: 1569-1574.

Landete J.M., Arena M.E., Pardo I., Manca de Nadra M.C., Ferrer S., Comparative survey of putrescine production from agmatine deamination in different bacteria, 2008a, Food Microbiology, 25: 882-887.

Landete J. M., Pardo I., Ferrer S., Regulation of *hdc* expression and HDC activity by enological factors in lactic acid bacteria, 2008b, Journal of Applied Microbiology, 105: 1544-1551.

Landete J. M., De Las Rivas B., Marcobal A., Munoz R., Updated molecular knowledge about histamine biosynthesis by bacteria, 2008c, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48: 697-714.

Landete J.M., Arena M.E., Pardo I., Manca de Nadra M.C., Ferrer S., The role of two families of bacterial enzymes in putrescine synthesis from agmatine via agmatine deiminase, 2010, International Microbiology, 13: 169-177.

Langella P., Le Loir Y., Ehrlich S.D., Gruss A., Efficient plasmid mobilization by pIP501 in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 1993, J Bacteriol, 175 : 5806-5813.

Langella P., Zagorec M., Ehrlich S.D., Morel-Deville F., Intergeneric and intrageneric conjugal transfer of plasmids pAM beta 1 , pIL205 and pIP501 in *Lactobacillus sake*, 1996, FEMS Microbiology Letters, 139: 51-56.

Latorre-Moratalla M.L., Bover-Cid S., Veciana-Nogues T., Vidal-Carou M.C., Thin-layer chromatography for the identification and semi-quantification of biogenic amines produced by bacteria, 2009, Journal of Chromatography A, 18: 4128-4132.

Lavizzari T., Breccia M., Bover-Cid S., Vidal-Carou M.C., Veciana-Noguas M.T., Histamine, cadaverine, and putrescine produced *in vitro* by *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae* isolated from spinach, 2010, Journal of Food Protection, 73: 385-389.

Le Jeune C., Lonvaud-Funel A., ten Brink B., Hofstra H., Van der Vossen JM., Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activity test, 1995, Journal of Applied Bacteriology, 78: 316-326.

Leuschner R.G., Heidel M., Hammes W.P., Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms, 1998, International Journal of Food Microbiology, 39: 1-10.

Lee M.S., Morrison D.A., Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation, 1999, Journal of Bacteriology, 181: 5004-5016.

Leenhouts K. Buist G., Bolhuis A., ten Berge A., Kiel J., Mierau I., Dabrowska M., Venema G., Kok J., A general system for generating unlabelled gene replacement in bacterial chromosomes, 1996, Molecular and General Genetics, 253: 217-224.

Lineares D.M., Fernandez M., Martin M.C., Alvarez M.A., Tyramine biosynthesis is transcriptionally regulated by pH and tyrosine concentration in *Enterococcus durans* IPLA655, 2009, Microbiology Biotechnology, 2: 625-633.

Livak K.J., Schmittgen T.D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, 2001, Methods, 25: 402-408.

Lonvaud-Funel A., Strasser de Saad A.M., Purification and properties of a malolactic enzyme from a strain of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from grapes, 1982, Applied and Environmental Microbiology, 43: 357-361.

Lonvaud-Funel A. & Joyeux A., Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*, 1994, Journal of Applied Bacteriology, 77: 401-407.

Lonvaud-Funel A., Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine, 1999, Antonie van Leeuwenhoek, 76: 317-331.

Lonvaud-Funel A, Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters, 2001, 199: 9–13.

Lopez I., Santamaria P., Tenorio C., Garijo P., Gutierrez A.R., Lopez R., Evaluation of lysozyme to control vinification process and histamine production in Rioja wines, 2009, Journal of Microbiology and Biotechnology, 19: 1005-1012.

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

Lucas P., Lonvaud-Funel A., Purification and partial gene sequence of the tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809, 2002, FEMS Microbiology Letters, 211: 85-89.

Lucas P., Landete J., Coton M., Coton E., Lonvaud-Funel A., The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809: characterization and conservation in tyramine-producing bacteria, 2003, FEMS Microbiology Letters, 229: 65-71.

Lucas P.M., Wolken W.A.M., Claisse O., Lolkema J.S., Lonvaud-Funel A., Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006, 2005, Applied and environmental Microbiology, 71: 1417-1424.

Lucas P.M., Blancato V.S., Claisse O., Magni C., Lolkema J.S., Lonvaud-Funel A., Agmatine deiminase pathway genes in *Lactobacillus brevis* are linked to the tyrosine decarboxylation operon in a putative acid resistance locus, 2007, Microbiology, 153: 2221-2230.

M

Mah J-H., Hwang H-J., Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture, 2009, Food Control, 20: 796-801.

Maijala R., Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS broth and modified decarboxylation agar, 1993, Letters in Applied Microbiology, 17: 40-43.

Makarova K., Slesarev A., Wolf Y., Sorokin A., Mirkin B., Koonin E., Pavlov A., Pavlova N., Karamychev V. & autres auteurs, Comparative genomics of the lactic acid bacteria, 2006, PNAS USA, 103: 15611-15616.

Maldonado A., Ruiz-Barba J.L., Jimenez-Díaz R., Purification and genetic characterization of plantaricin NC8,a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8, 2003, Applied and Environmental Microbiology, 69: 383-389.

Manfroi L., Silva P. H. A., Rizzon L. A., Sabaini P. S., Gloria M. B. A., Influence of alcoholic and malolactic starter cultures on bioactive amines in Merlot wines, 2009, Food Chemistry, 116: 208-213.

Mangani S., Guerrini S., Granchi L., Vincenzini M., Putrescine Accumulation in Wine: Role of *Oenococcus oeni*, 2005, Current Microbiology, 51 : 6-10.

Mangani S., Guerrini S., Granchi L., Vincenzini M., Putrescine accumulation in wine: role of *Oenococcus oeni*, 2005, Current Microbiology, 51: 6-10.

Marcobal A., De Las Rivas B., Moreno-Arribas M.V., Munoz R., Evidence for horizontal gene transfer as origin of putrescine production in *Oenococcus oeni* RM83, 2006, Applied and environmental Microbiology, 72: 7954-7958.

Marcobal A., Polo M.C., Martin-Alvarez P.J., Moreno-Arribas M.V., Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines, 2005, Food Research International, 38: 387-394.

Marques A. P., Leitao M. C., San Romao M. V., Biogenic amines in wines: influence of oenological factors, 2008, Food Chemistry, 107: 853-860.

Martın M.C., Fernandez M., Linares D.M., Alvarez M.A., Sequencing, characterization and transcriptional analysis of the histidine decarboxylase operon of *Lactobacillus buchneri*, 2005, Microbiology, 151: 1219-1228.

Marty-Teysset C., Lolkema J. S., Schmitt P., Divies C., Konings W. N., Membrane potential-generating transport of citrate and malate catalyzed by CitP of *Leuconostoc mesenteroides*, 1995, The Journal of Biological Chemistry, 270: 25370-25376.

Marty-Teysset C., Posthuma C., Lolkema J.S., Schmitt P., Divies C., Konings W.N., Proton motive force generation by citrolactic fermentation in *Leuconostoc mesenteroides*, 1996, Journal of Bacteriology, 178: 2178-2185.

Masson F., Talon R., Montel M.C., Histamine and tyramine production by bacteria from meat products, 1996, International Journal of Food Microbiology, 32: 199-207.

Mazzoli R., Lamberti C., Coisson J.D., Purrotti M., Arlorio M., Giuffrida M.G., Giunta C., Pessione E., Influence of ethanol, malate and arginine on histamine production of *Lactobacillus hilgardii* isolated from an Italian red wine, 2008, Amino Acids, 36: 81-89.

Mbarki R., Ben Miloud N., Selmi S., Dhib S., Sadok S., Effect of vacuum packaging and low-dose irradiation on the microbial,chemical and sensory characteristics of chub mackerel (*Scomber japonicus*), 2009, Food Microbiology, 26: 821-826.

Meroz A., 2009, Les amines biogènes dans les vins: impact d'une souche de bactérie lactique sélectionnée et de l'élevage sur lies, sur la production d'amines biogènes lors de la FML de vin de Pinot Noir, Mémoire DNO, Dijon.

Mesas J.M., Rodriguez M.C., Alegre M.T., Nucleotide sequence analysis of pRS2 and pRS3, two small cryptic plasmids from *Oenococcus oeni*, 2001, Plasmid, 46: 149-151.

Mesas J.M., Rodriguez M.C., Alegre M.T., Plasmid curing of *Oenococcus oeni*, 2004, Plasmid, 51: 37-40.

Molenaar D., Bosscher J.S., Brink B.T., Driessen A.J.M., Konings W.N., Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*, 1993, Journal of Bacteriology, 175: 2864-2870.

Momany C., Ernst S., Ghosh R., Chang N.L., Hackert M.L., Crystallographic structure of a PLP-dependent ornithine decarboxylase from *Lactobacillus* 30a to 3.0 A resolution, 1995, Journal of Molecular Biology, 252: 643-55.

Moreno-Arribas V., Lonvaud-Funel A., Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367, 1999, FEMS Microbiology Letters, 180: 55-60.

Moreno-Arribas V., Torlois S., Joyeux A., Bertrand A., Lonvaud-Funel A., Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine, 2000, Journal of Applied Microbiology, 88: 584-593.

Moreno-Arribas V., Lonvaud-Funel A., Purification and characterization of tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine, 2001, FEMS Microbiology Letters, 195: 103-107.

Moreno-Arribas M.V., Polo M.C., Jorganes F., Munoz R., Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine, 2003, International Journal of Food Microbiology, 84: 117-123.

Moret S., Bortolomeazzi R., Lercker G., Improvement of extraction procedure for biogenic amines in foods and their high-performance liquid chromatographic determination, Journal of chromatography, 1992, 591: 175-180.

N

Nakada Y., Itoh Y., Identification of the putrescine biosynthetic genes in *Pseudomonas aeruginosa* and characterization of agmatine deiminase and N-carbamoylputrescine amidohydrolase of the arginine decarboxylase pathway, 2003, Microbiology, 149: 707-714.

Nannelli F., Claisse O., Gindreau E., De Revel G., Lonvaud-Funel A., Lucas P.M., Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods, 2008, Letters in Applied Microbiology, 47: 594-599.

Nehme B., Ganga M.A., Lonvaud-Funel A., The arginine deiminase locus of *Oenococcus oeni* includes a putative arginyl-tRNA synthetase ArgS2 at its 3'-end, 2006, Applied Microbiology Biotechnology, 70: 590-597.

Nieto-Arribas P., Poveda J.M., Sesena S., Palop L., Cabezas L., Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures, 2009, Food Control, 20: 1092-1098.

O

Oraby M., 2002, Caractérisation du plasmide pLC22R de *Leuconostoc citreum* et développement d'outils génétiques spécifiques aux bactéries du genre *Leuconostoc*, Thèse de doctorat, Université de Bourgogne.

P-Q

Papagianni M., Avramidis N., Filioussis G., High efficiency electrotransformation of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* cells pretreated with lithium acetate and dithiothreitol, 2007, BMC Biotechnologie, 7 :15.

Parks E.H., Ernst S.R., Hamlin R., Xuong N.H., Hackert M.L., Structure determination of histidine decarboxylase from *Lactobacillus* 30a at 3.0 A resolution, 1985, Journal of Molecular Biology, 182: 455–465.

Pereira C.I., Matos D., San Romao M.V., Barreto Crespo M.T., Dual role for the tyrosine decarboxylation pathway in *Enterococcus faecium* E17: response to an acid challenge and generation of a proton motive force, 2009, Applied and Environmental Microbiology, 75: 345-352.

Pereira Monteiro M.J., Bertrand A., Validation d'une méthode de dosage. Application à l'analyse des amines biogènes du vin. Validation of a dosing method. Application to the analysis of biogenic amines in wine, 1994, Bulletin de l'OIV, 67: 916-962.

Pereira V., Pontes M., Câmara J.S., Marques J.C., Simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in honey and wine samples using in loop orthophthalaldeyde derivatization procedure, 2008, Journal of Chromatography A, 1189: 435-443.

Pérez-Arellano I., Zúñiga M., Pérez-Martínez G., Construction of compatible wide-host-range shuttle vectors for lactic acid bacteria and *Escherichia coli*, 2001, Plasmid 46: 106–116.

Pessione E., Mazzoli R., Giuffrida M.G., Lamberti C., Garcia-Moruno E., Barello C., Conti A., Giunta C, A proteomic approach to studying biogenic amine producing lactic acid bacteria, 2005, Proteomics, 5: 687–689.

Pessione E., Pessione A., Lamberti C., Coisson D.J., Riedel K., Mazzoli R., Bonetta S., Eberl L., Giunta C., First evidence of a membrane-bound, tyramine and beta-phenylethylamine producing, tyrosine decarboxylase in *Enterococcus faecalis*: a two-dimensional electrophoresis proteomic study, 2009, Proteomics, 10: 2695-2710.

Pfeiler E.A., Klaenhammer T.R., The genomics of lactic acid bacteria, 2007, Trends in Microbiology, 15: 546-553.

Poolman B., Molenaar D., Smid E.J., Ubbink T., Abee T., Renault P.P., Konings W. N., Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy, 1991, Journal of Bacteriology, 173: 6030-6037.

Pramateftaki P.V., Metafa M., Kallithraka S., Lanaridis P., Evolution of malolactic bacteria and biogenic amines during spontaneous malolactic fermentations in a Greek winery, 2006, Letters in Applied Microbiology, 43: 155-160.

Prefontaine G., Efficacité de bactéries lactiques sélectionnées et impact de pratiques œnologiques sur la formation d'amines biogènes dans un vin de Pinot noir, Mémoire DNO, Dijon.

Proestos C., Loukatos P., Komaitis M., Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection, Food Chemistry , 2008, 106: 1218–1224.

Pucci M.J., Monteschio M.E., Kemker C.L., Intergeneric and intrageneric conjugal transfer of plasmid-encoded antibiotic resistance determinants in *Leuconostoc* spp., 1988, Applied Environmental Microbiology, 54: 281-287.

R

Recsei P.A., Moore W.M., Snell E.E., Pyruvoyl-dependant histidine decarboxylase from *Clostridium perfringens* and *Lactobacillus buchneri*, 1983, Journal of Biological Chemistry, 258: 439-444.

Remize F., Gaudin A., Kong Y., Guzzo J., Alexandre H., Krieger S., Guilloux-Benatier M., *Oenococcus oeni* preference for peptides: qualitative and quantitative analysis of nitrogen assimilation, 2006, Arch Microbiology, 185: 459-469.

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A., 1998, Traité d'œnologie-Tome 1 : Microbiologie du vin-Vinifications, Dunod.

Rodriguez M.C., Alegre M.T., Mesas J.M., Optimization of technical conditions for the transformation of *Pediococcus acidilactici* P60 by electroporation, 2007, Plasmid, 58: 44-50.

Rollan G. C., Coton E., Lonvaud-Funel A., Histidine decarboxylase activity of *Leuconostoc oenos* 9204, 1995, Food microbiology, 12: 455-461.

Romero D.A., Slos P., Robert C., Castellino I., Mercenier A., Conjugative mobilization as an alternative vector delivery system for lactic streptococci, 1987, Applied Environmental Microbiology, 53: 2405-2413.

Romero R., Bagur M.G., Sanchez-Vinas M., Gazquez D., Optimization of experimental variables in the dabsyl chloride derivatization of biogenic amines for their determination by RP-HPLC, 2000, Chromatographia, 51: 404-410.

Romero R., Gazquez D., Bagur M.G., Sanchez-Vinas M., Optimization of chromatographic parameters for the determination of biogenic amines in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography, 2000, Journal of Chromatography A, 871: 75-83.

Rosi I., Nannelli F., Giovani G., Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation of wines obtained using different strains of *Saccharomyces cerevisiae,* 2008, Food Science and Technology, 42: 525-530.

S

Salema M., Lolkema J.S., San Romao M.V., Loureiro Dias M. C., The proton motive force generated in *Leuconostoc oenos* by L-malate fermentation, 1996, Journal of Bacteriology,178: 3127-3132.

Salou P., Loubiere P., Pareilleux A., Growth and energetics of *Leuconostoc oenos* during cometabolism of glucose with citrate or fructose, 1994, Applied Environmental Microbiology, 60: 1459-1466.

Sanford J.C., The biolistic process, 1988, Trends in Biotechnology, 6: 299-302.

Santos R., Vieira G., Santos M.A., Paveia H., Characterization of temperate bacteriophages of *Leuconostoc oenos* and evidence for two prophage attachment sites in the genome of starter strain PSU-1, 1996, Journal of Applied Microbiology, 81: 383-392.

Sass-Kiss A., Szerdahelyi E., Hajos G., Study of biologically active amines in grapes and wines by HPLC, 2000, Chromatographia Supplement, 51: 316-320.

Sato T., Fukui T., Atomi H., Imanaka T., Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1, 2003, Journal of Bacteriology, 185: 210-220.

Satomi M., Furushita M., Oikawa H., Yoshikawa- Takahashi M., YanoY. Analysis of a 30 kbp plasmid encoding histidine decarboxylase gene in *Tetragenococcus halophilus* isolated from fish sauce, 2008, International Journal of Food Microbiology, 126: 202-209.

Schelp E., Worley S., Monzingo A.F., Ernst S., Robertus J.D., pH-induced structural changes regulate histidine decarboxylase activity in *Lactobacillus* 30a, 2001, Journal of Molecular Biology, 306: 727-732.

Shakila R.J., Vasundhara T.S., Kumudavally K.V., A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products, 2001, Food Chemistry, 75: 255-259.

Shalaby A.R., Significance of biogenic amines to food safety and human health, 1996, Food Research International, 29: 675-690.

Shrago A.W., Dobrogosz W.J., Conjugal transfer of group B streptococcal plasmids and comobilization of *Escherichia coli-Streptococcus* shuttle plasmids to *Lactobacillus plantarum*, 1988, Applied Environmental Microbiology, 54: 824-826.

Silla Santos M.H., Biogenic amines: their importance in foods, 1996, International Journal of Food Microbiology, 29: 213-231.

Sobczak I., Lolkema J.S., The 2-hydroxycarboxylate transporter family, 2005, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 69: 665-695.

Soksawatmaekhin W., Kuraishi A., Sakata K., Kashiwagi K., Igarashi K., Excretion and uptake of cadaverine by CadB and its physiological functions in *Escherichia coli*, 2004, Molecular Microbiology, 51: 1401-1412.

Soleas G.J., Carey M., Goldberg D.M., Method development and cultivar-related differences of nine biogenic amines in Ontario wines, 1999, Food Chemistry, 64: 49-58.

Solieri L., Genova F., De Paola M., Giudici P., Characterization and technological properties of *Oenococcus oeni* strains from wine spontaneous malolactic fermentations: a framework for selection of new starter cultures, 2010, Journal of Applied Microbiology, 108: 285-298.

Soufleros E.H., Bouloumpasi E., Zotou A., Loukou Z., Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration, Food Chemistry, 2007, 101: 704-716.

Stiles, M. E., Holzapfel W. H., Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, 1997, International Journal of Food Microbiology, 36: 1-29.

Suzzy G., Gardini F., Biogenic amines in dry fermented sausages: a review, 2003, International Journal of Food Microbiology, 88: 41-54.

T-U

Tabor H., Diamine oxidase, 1951, The Journal of Biological Chemistry, 188: 125-136.

Tabor C.W., Tabor H., Polyamines in microorganisms, 1985, Microbiological Reviews, 49: 81-99.

Tang T., Shi T., Qian K., Li P., Li J., Cao Y., Determination of biogenic amines in beer with pre-column derivatization by high performance liquid chromatography, 2009, Journal of Chromatography B., 877: 507-512.

Tao Z., Sato M., Abe N., Yamaguchi T. Nakano T., Simple and rapid detection of histamine-forming bacteria by differential agar medium, Food Control, 2009, 20: 903-906.

Taylor S.L., Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects, 1986, Critical Reviews in Toxicology, 17: 91-128.

Teissie J., Rols M.P., Interfacial membrane alteration associated with electropermeabilization and electrofusion, 1992, Guide to Electroporation and Electrofusion, 9:139-151.

ten Brink B., Damink C., Joosten H. M. L. J., Huis in't Veld J. H. J., Occurrence and formation of biologically active amines in foods, 1990, International Journal of Food Microbiology, 11: 73–84.

Teodorovic V., Buncic S., Smiljanic D., A study of factors influencing histamine production in meat,1994, Fleischwirtschaft, 74: 181-183.

Terrade N., Mira de Orduna R., Impact of winemaking practices on arginine and citrulline metabolism during and after malolactic fermentation, 2006, Journal of Applied Microbiology, 101: 406-411.

Thakur M., Azmi W., Biotransformation L-tyrosine to tyramine by the growing cells of *Lactococcus lactis*, 2009, Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 56: 101-114.

Thompson J.K., Collins M.A., Evidence for the conjugal transfer of the broad host range plasmid pIP501 into strains of *Lactobacillus helveticus*, 1988, Journal of Applied Bacteriology, 65: 309-319.

Tonon T., Bourdineaud J.P., Lonvaud-Funel A., Catabolisme de l'arginine par *Oenococcus oeni* : aspect énergétiques et génétiques, 2001, Lait, 81 : 139-150.

Torres A.G., The cad locus of *Enterobacteriaceae*: more than just lysine decarboxylation, 2009, Anaerobe, 15: 1-6.

Torriani S., Gatto V., Sembeni S., Tofalo R., Suzzi G., Belletti N., Gardini F., Bover-Cid S., Rapid detection and quantification of tyrosine decarboxylase gene (*tdc*) and its expression in gram-positive bacteria associated with fermented foods using PCR-based methods, 2008, Journal of Food Protection, 71: 93-101.

Tourdot-maréchal R., 1991, Etude du métabolisme de l'acide malique chez *Leuconostoc oenos*, Thèse de doctorat Université de Bourgogne.

Tremblay S., 2007, Mémoire de Maîtrise: Etude moléculaire du recrutement des gènes de résistance aux antibiotiques, Université de Laval.

Trip H., Mulder N.L., Rattray F.P., Lolkema J.S., HdcB, a novel enzyme catalyzing maturation of pyruvoyl-dependant histidine decarboxylase, 2011, Molecular Microbiology, 79: 861-871.

Turgeon N., Laflamme C., Ho J., Duchaine C., Elaboration of an electroporation protocol for *Bacillus cereus* ATCC 14579, 2006, Journal of Microbiological Methods, 67: 543-548.

V

Van Poelje P.D., Snell E. E., Cloning, sequencing, expression, and site-directed mutagenesis of the gene from *Clostridium perfringens* encoding pyruvoyl-dependent histidine decarboxylase, 1990, Biochemistry, 29: 132–139.

Van Poelje P.D., Snell E.E., Pyruvoyl-dependent enzymes, 1990, Annual Review of Biochemistry, 59: 29–59.

Vanderslice P., Copeland W.C., Robertus J.D., Cloning and nucleotide sequence of wild type and a mutant histidine decarboxylase from *Lactobacillus* 30a, 1986, Journal of Biological Chemistry, 261: 15186–15191.

Variot A., 2010, Optimisation de la technique d'électroporation de *Oenococcus oeni*, Stage IUT, Dijon.

Vidal-Carou M.C., Lahoz-Portoles F., Bover-Cid S., Mariné-Font A., Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines and polyamines in wine and other alcoholic beverages, 2003, Journal of Chromatography A, 998: 235-241.

Vitali J., Carroll D., Chaudhry R.G., Hackert M.L., Three-dimensional structure of the Gly121Tyr dimeric form of ornithine decarboxylase from *Lactobacillus* 30a, 1999, Acta Crystallographica D Biological Crystallography. 55: 1978-85.

W-X

Wei M.Q., Rush C.M., Norman J.M., Hafner L.M., Epping R.J., Timms P., An improved method for the transformation of *Lactobacillus* strains using electroporation, 1995, Journal of Microbiological Methods, 21: 97-109.

Wolken W.A.M., Lucas P.M., Lonvaud-Funel A., Lolkema J.S., The mechanism of the tyrosine transporter TyrP supports a proton motive tyrosine decarboxylation pathway in *Lactobacillus brevis*, 2006, Journal of Bacteriology, 188: 2198-2206.

Wu F., Yu J., Gehring, H., Inhibitory and structural studies of novel coenzyme-substrate analogs of human histidine decarboxylase, 2008, FASEB J, 22: 890–897.

Y

Yamaguchi Y., Takatsuka Y., Matsufuji S., Murakami Y., Kamio Y., Characterization of a counterpart to mammalian ornithine decarboxylase antizyme in prokaryotes, 2006, The Journal of Biological Chemistry, 281: 3995-4001.

Yuan G., Wong S.L., Regulation of groE expression in *Bacillus subtilis*: the involvement of the sigma A-like promoter and the roles of the inverted repeat sequence (CIRCE), 1995, Journal of Bacteriology, 177: 5427-5433.

Z

Zaman M.Z., Bakar F.A., Jinap S., Bakar J., Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation, 2011, International Journal of Food Microbiology, 145: 84-91.

Zee J.A., Simard R.E.L., l'Heureux L., Tremblay J., Biogenic amines in wine, 1983, American Journal of Enology and Viticulture 34, 6-9.

Zotou A., Loukou Z., Soufleros E., Stratis I., Determination of biogenic amines in wines and beers by high-performance liquid chromatography with pre-column dansylation and ultraviolet detection, 2003, Chromatographia, 57: 429-439.

Zuniga M., Pardo I., Ferrer S., Nucleotide sequence of plasmid p4028, a cryptic plasmid from *Leuconostoc oenos*, 1996, Plasmid, 36: 67-74.

Zuniga M., Pardo I., Ferrer S., Conjugative plasmid pIP501 undergoes specific deletions after transfer from *Lactococcus lactis* to *Oenococcus oeni*, 2003, Archives of Microbiology, 180: 367-373.

RESUME

Les amines biogènes sont des composés allergènes, notamment rencontrés dans les produits fermentés tel que le vin. Les bactéries lactiques du vin, dont *Oenococcus oeni*, le principal acteur de la fermentation malolactique, sont capables de produire ces molécules, à partir de précurseurs azotés. Afin de réduire la teneur en amines biogènes, il est nécessaire de comprendre le rôle de cette production, chez les souches impliquées dans la synthèse de ces métabolites. Le projet européen BiamFood FP7 (n°211441) a été mis en place pour répondre à cette problématique.

Au cours de mon travail de thèse, des outils moléculaires ont été développés afin de muter de manière ciblée les gènes de *O. oeni* et d'exprimer des gènes d'intérêt. Ainsi, les clusters *hdc* de *Lactobacillus hilgardii* et *odc* de *O. oeni*, responsables respectivement de la synthèse de l'histamine et de la putrescine, ont été clonés dans le vecteur pGID052 et transférés dans la souche de laboratoire *O. oeni* ATCC BAA-1163, déficiente pour la production d'amines biogènes. Cette stratégie n'ayant pas donnée lieu à la production d'amine biogène, mon travail de recherche s'est orienté vers la caractérisation biochimique de l'ornithine décarboxylase de *O. oeni*. L'ornithine décarboxylase de *O. oeni* BR14/97 a été sur-produite chez *E. coli via* le système pET. Après purification de l'enzyme, le pH optimal et la température optimale de fonctionnement, 5,5 et 35°C respectivement, ont été caractérisés. Les constantes cinétiques K_m = 1 mM et V_{max} = 0,57 U. mg^{-1} ont également été déterminées en mesurant la putrescine produite par HPLC (Gomez-Alonso *et al*, 2007). De plus, l'ODC de *O. oeni* BR14/97 est spécifique de la L-ornithine et ne peut pas dégrader la L-lysine en cadavérine, ce qui implique la présence d'une voie métabolique propre à la production de cadavérine chez cette souche. Dans un second axe du projet, l'influence de la source azotée et notamment des peptides *versus* acides aminés libres, a été étudiée chez une souche de *Lactobacillus plantarum*, isolée du vin et productrice de tyramine. Les peptides contenant de la tyrosine, sont utilisés par cette souche pour former de la tyramine. La production augmente en phase stationnaire de croissance, et est corrélée à l'expression du transporteur *tyrP*. L'analyse de la tyrosine présente dans le milieu de culture montre que ces peptides seraient dégradés dans le milieu extracellulaire chez *L. plantarum*.

Mots clés : amines biogènes, vin, bactéries lactiques, *Oenococcus oeni*, expression hétérologue, vecteurs suicides, peptides.

ABSTRACT

Biogenic amines are indesirable compounds found in fermented products like wine. Lactic acid bacteria from wine, including *Oenococcus oeni*, the main actor of malolactic fermentation, are able to produce these molecules from nitrogenous precursors. In order to limited biogenic amines accumulation, it is necessary to understand the role of this production by strains responsible for the synthesis of these metabolites in food. That is why the European BiamFood project was put in place.

Along my thesis, molecular tools were developed in order to mutate *O. oeni* genes (encoding decarboxylases), and to express genes of interest. Genetic clusters *hdc* from *L. higardii* and *odc* from *O. oeni*, responsible for histamine and putrescine synthesis respectively, were cloned into the pGID052 vector and transferred into the laboratory strain *O. oeni* ATCC BAA-1163, which is not able to produce any biogenic amines. However no biogenic amines production was observed. My work thesis was then redirected in the *in vitro* biochemical characterization of the ODC from *O. oeni*. The *odc* from *O. oeni* BR14/97 was overproduced in *E. coli* BL21 *via* the pET system. Optima pH and temperature were determined with the purified enzyme obtained. Kinetic constants K_m = 1 mM and V_{max} = 0,57 $U.mg^{-1}$ were also determined by measuring putrescine production by HPLC (Gomez-Alonso *et al*, 2007). Furthermore, ODC from *O. oeni* BR14/97 is specific for the L-ornithine and can not decarboxylated the L-lysine into cadaverine. In a second part of the BiamFood project, the impact of nitrogen sources, especially peptides compared to free amino acids, was studied in a *Lactobacillus plantarum* strain, isolated from wine and able to produce tyramine. Peptides containing tyrosine residues are used by this strain to produce tyramine. Tyramine production increases during the growth and reaches a maximum at stationary phase. The production is correlated with *tyrP* expression. The tyrosine measured in culture media shows that peptides may be hydrolyzed in the extracellular medium in *L. plantarum*.

Key words: biogenic amines, wine, lactic acid bacteria, *Oenococcus oeni*, heterologous expression, suicide vectors, peptides.