



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE
FRANCHE-COMTE**

PREPAREE A L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Ecole doctorale n°554

Environnement-santé

Doctorat en Biochimie et biologie moléculaire

Spécialité Biotechnologies agro-alimentaires

Par

Bellanger Tiffany

Mécanismes de résistance au stress chez les bactéries lactiques impliquant des sHSPs:
investigation du mécanisme mis en jeu dans l'activité lipochaperon de la protéine
Lo18 chez *O. oeni*.

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 22 février 2024

Composition du Jury :

Pr. Loupiac, Camille

Pr. Lucas, Patrick

Dr. Chapot-Chartier, Marie-Pierre

Dr. Garrido, Carmen

Dr. Borges, Frédéric

Dr. Weidmann, Stéphanie

Professeure à l'Université de Bourgogne, Dijon

Professeur à l'Université de Bordeaux, Bordeaux

Directrice de Recherche INRA, Jouy-en-Josas

Directrice de Recherche INSERM, Dijon

Maitre de conférences à l'Université de Lorraine, Nancy

Maitre de conférences à l'Université de Bourgogne, Dijon

Présidente

Rapporteur

Rapporteuse

Examinatrice

Examinateur

Directrice de thèse

A ma grand-mère,

*« Sans la curiosité de l'esprit, que serions-nous ?
Telle est bien la beauté et la noblesse de la science :
désir sans fin de repousser les frontières du savoir, de
traquer les secrets de la matière et de la vie sans idée
préconçue des conséquences éventuelles. »*

Marie Curie

REMERCIEMENTS



Une thèse représente une aventure scientifique empreinte de passion, où se mêlent la curiosité, le savoir et la fascination pour le monde qui nous entoure. Bien que cette quête de soi soit motivée par des enjeux personnels, une thèse constitue également une aventure humaine qui se partage. Ma thèse n'aurait pas été possible sans l'aide, le soutien et l'amitié de chacun d'entre vous.

Tout d'abord je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury constitué du Pr. Patrick Lucas (rapporteur), du Dr. Marie-Pierre Chapot-Chartier (rapporteur), du Pr. Carmen Garrido (examineur), du Pr. Camille Loupiac (examineur) et du Dr. Frédéric Borges (examineur), pour avoir accepté d'examiner mon travail de thèse. Je remercie également, le Pr. Jean Guzzo et le Pr. Florence Dubois-Brissonet pour leur expertise tout au long de mes comités de pilotage.

Je souhaiterais également remercier l'ensemble de l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (PAM) dirigée par le Pr. Laurent Beney et plus particulièrement l'équipe Vin Aliment Microbiologie et Stress (VALMiS) dirigée par le Pr. Hervé Alexandre, et hébergée à l'Institut Universitaire de la Vigne et du Vin (IUVV) de m'avoir accueillie dans leurs locaux.

Je tiens à remercier infiniment ma directrice de thèse le Dr. Stéphanie Weidmann. Aucun mot de remerciement ne pourrait réellement traduire l'impact significatif ¹ que tu as eu dans cette thèse et plus généralement ma vie. Tout d'abord, merci d'avoir éveillé en moi un amour inconditionnel pour la microbiologie, les mécanismes de réponses au stress et la recherche fondamentale dès la licence. Merci également d'avoir, à l'époque, cru en mes capacités pour que l'idée de faire une thèse puisse germer dans ma tête. Finalement avant même que cela ait commencé, l'aboutissement de cette thèse c'était déjà un peu grâce à toi. Je tiens également à te remercier profondément pour ces trois années de thèse. Travailler ensemble a été très formateur, inspirant et agréable, surtout au cœur de nos nuits studieuses, illuminées par le SOLEIL de nos manips ! Et tout cela a été rendu possible grâce à ta patience, ta bienveillance, ta présence de chaque instant mais surtout à ta confiance sans faille.

¹ P-value < 0.001

L'achèvement de mon travail te doit beaucoup ! Je n'aurais pas pu imaginer une autre thèse et un autre encadrement que le tien. Merci pour tout Stéphanie !

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont participé techniquement au bon déroulement de cette thèse. Ainsi que toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer. J'ai pu durant cette thèse côtoyer des personnes d'horizons scientifiques différents, cela m'a été personnellement très enrichissant. Mes remerciements vont au Pr. Patrick Senet et au Dr. Patrice Delarue de l'Institut Carnot Bourgogne (ICB) pour leur implication dans la modélisation des interactions membrane/Lo18. Un grand merci au Dr. Pascale Winckler et à Elodie Noirod de la plateforme DImaCell pour leur assistance lors de mes mesures d'anisotropie et de microscopie. Merci également au Dr. Jean-Paul Pais de Barros de la plateforme de lipidomique à Dijon pour ses analyses lipidomiques sur différentes membranes d'*O. oeni*. Merci au Dr. Sophie Combet et au Dr. Paloma Fernandez-Varela du CEA de Paris Saclay, ainsi qu'au Dr. Frank Wien du Synchrotron SOLEIL, pour m'avoir accueillie quelques jours dans vos laboratoires afin d'étudier la structure de Lo18 et les interactions lipides/Lo18. Merci au Pr. Fabrice Neiers de l'Inrae Dijon pour toute votre aide et vos conseils précieux pour la purification de Lo18. Je tiens également à remercier le Dr. Daniela Fiocco et le Dr. Maria-Teresa Rocchetti de l'Université de Foggia (Italie) de nous avoir fait confiance pour l'analyse de l'activité lipochaperon de vos sHSP. La semaine passée avec Maria-Teresa a été particulièrement enrichissante, c'était très agréable de discuter avec d'autres personnes qui travaillent également sur des sHSPs

Je voudrais aussi remercier Amélie, Louis et Camille que j'ai eu le plaisir de superviser pendant leur stage. Merci pour votre travail et votre implication sur ce projet, travailler avec vous trois a été très formateur !

Je tiens également à adresser mille mercis à mes collègues et amis de Dijon ou d'ailleurs. La thèse est un long chemin et il est bien plus simple de le traverser à plusieurs ! Merci au Pr. Aurélie Rieu et à Julie Laurent, pour nos nombreuses discussions, vos conseils, votre soutien et votre aide (même si maintenant j'ai une grosse dette en chocolat auprès de Julie). Merci également à tous les doctorants, qu'ils soient passés ou présents. Bien que vous ayez tous eu un impact très positif durant ces trois belles années je tiens à remercier tout spécialement Marie-Sarah, Charlotte, Chloé et l'ENSEMBLE des utilisateurs du labo 123.

Aux utilisateurs du 123, merci pour toute votre bonne humeur. Peut-être que notre labo n'était pas toujours le mieux rangé, mais assurément il était le plus vivant et joyeux de tout l'IUVV ! Mention spéciale à Amaury et à Camille pour toutes les folies que nous avons pu partager. Merci également à Camille d'avoir été une compagne très présente avec qui je pouvais partager mes déboires et mon amour d'*O. oeni*. A Marie-Sarah, avec qui je partage des papotages « Mignon-Mignon » et une passion pour la soupe, merci pour toute ta gentillesse. A Charlotte, qui était toujours là tard le soir pour qu'on ne soit pas seules, merci pour toute nos discussions éclairées au lampadaire de ton parking, c'était toujours très réconfortant ! A Chloé, dont le sacrifice aux réglisses marquera ma mémoire, merci d'avoir su me comprendre, me guider et me rassurer ! Et bien sûr, sinon cela ne serait pas des remerciements dignes de ce nom, un immense merci à Eléonore, mon binôme de toujours. Merci d'avoir toujours été là, d'avoir toujours compris et supporté mes crises existentielles. Merci pour toutes ces longues discussions, qui se voulaient scientifique à la base mais qui rapidement dérivait sur des sujets bien perchés et à mourir de rire ! Il est certain que sans vous tous, cette thèse aurait été assurément moins amusante.

Je voudrais également remercier chaleureusement ma famille. Merci à mes parents pour avoir contribué à faire de moi la personne que je suis aujourd'hui. Je suis consciente que comprendre ce que cette thèse et ce que la science représente pour moi n'a pas toujours été évident, mais vous avez accepté mes choix sans jugement apparent et avec une grande tolérance. Un merci tout particulier à ma sœur jumelle pour son soutien et son optimisme parfois légendaire, promis ma thèse n'est pas barbant ! Mais surtout merci à Sébastien (Marie-Louise pour les plus intimes) de m'avoir fait découvrir, il y a plus de 20 ans, la magie de la science durant nos longs trajets en voiture. Merci également pour nos séances de psy sauvage ! Je voudrais adresser également une tendre pensée à ma grand-mère, qui aurait sûrement été très fière de lire ce manuscrit, ce manuscrit t'est dédié.

Enfin, je souhaite exprimer ma reconnaissance à mes anciens collègues, maîtres de stage et enseignants du supérieur et du secondaire qui à leur manière et par leur implication m'ont portée jusqu'à la thèse. Un merci tout particulier à Stéphane, Mélanie, Boris et Madame Molimard.

Listes des travaux

Communications orales :

T. Bellanger et al., Four highly conserved residues in sHSPs, a keystone in the structure and the functions of Lo18 from *O. oeni*, 14th LAB, Egmond aan zee, (2023).

T. Bellanger et al., Prédiction du rôle de lipochaperon moléculaire des sHSP produites chez les bactéries lactiques, au 23eme colloque des bactéries lactiques, Rennes (2022).

T. Bellanger et al., Can predict the molecular lipochaperon activity of bacterial small heat shock proteins? Forum des jeunes chercheurs, Dijon (2022).

T. Bellanger et al., The lipochaperon activity of the Lo18 protein: a structural story ?, Journée des doctorants, Dijon, (2022).

T. Bellanger et al., Highly conserved residues of sHSP can impact the lipochaperon activity of Lo18 protein ?, Weblactic 2, Online, (2022).

Communications affichées :

T. Bellanger et al., Lien entre la structure tertiaire de la protéine de stress Lo18 et son rôle de lipochaperon moléculaire, 17eme congrès national de la SFM, Montpellier (2022).

T. Bellanger et al., Lien entre la structure tertiaire de la protéine de stress Lo18 et son rôle de lipochaperon moléculaire, Journée des doctorants, Dijon (2022)

T. Bellanger et al., Impact de la présence de Lo18 sur la structure et la formation de biofilms, Forum des Jeunes chercheurs, Online, (2021). *1^{er} prix*

T. Bellanger et al., Interaction entre la membrane cellulaire de *Oenococcus oeni* et la protéine Lo18. 16eme congrès National de la SFM, Nantes, (2021).

Listes des abréviations

ACD : Domaine α -cristallin

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adénosine Triphosphate

BSA : Albumine de Sérum Bovine

cFDA : Carboxyfluorescein Diacetate

Clp : Protéase caséinolytique

DOPA : Dihydroxyphenylalanine

DOPC : Dioleoylphosphatidylcholine

DOPE : Dioleoylphosphatidylethanolamine

DOPG : Dioleoylphosphatidylglycerol

DPH : 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene

DPPC : Dipalmitoylphosphatidylcholine

DPPE : Dipalmitoylphosphatidylethanolamine

DPPG : Dipalmitoylphosphatidylglycerol

EPS : Exopolysaccharides

FML : Fermentation malolactique

G3P : Glyceraldehyde-3-Phosphate

GAPDH : Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

HSP : Heat Shock Protein

IPTG : Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside

LPO : Lipid protein overlay assay

MleA : Malolactic enzyme

MutSL : Protéines de réparation des mésappariements d'ADN

NADH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Réduit)

NAD⁺ : Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Oxydé)

POPC : 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

ROS : espèce réactive à l'oxygène

sHSP : Small Heat Shock Protein

SRCD : Dichroïsme circulaire du rayonnement synchrotron

MVs : Vésicules membranaires

Sommaire

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	1
A. PARTIE 1 : <i>OENOCOCCUS OENI</i> , UNE BACTÉRIE DU VIN	3
1. <i>Le vin un milieu complexe</i>	3
a. Fermentations du jus de raisins en vin.	4
b. Caractéristiques du milieu vin	6
2. <i>La bactérie lactique Oenococcus oeni</i>	6
a. Informations générales sur <i>O. oeni</i>	7
b. Son rôle dans la fermentation malolactique	8
B. PARTIE 2 : IMPACT DE L'ACIDITÉ ET L'ALCOOL DU VIN SUR LA PHYSIOLOGIE DES MICRO-ORGANISMES; FOCUS SUR LES PROTEINES CELLULAIRES ET LES MEMBRANES.	9
1. <i>Influence du vin sur la physiologie des micro-organismes</i>	9
2. <i>Influence sur les protéines cellulaires</i>	10
a. Rappel sur l'organisation structurale des protéines	10
b. Modifications des interactions au sein des protéines induites par l'environnement	20
3. <i>Influence sur la membrane cellulaire</i>	23
a. Rappel sur les membranes cellulaires.	24
b. Modification de la fluidité membranaire en réponse au stress	29
C. PARTIE 3 : PRINCIPAUX MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AU STRESS CHEZ <i>O. OENI</i> .	33
1. <i>Stratégie de réponse au stress au niveau de la population</i>	33
2. <i>Stratégie de réponse au stress au niveau cellulaire</i>	36
a. Génération de la force proton motrice grâce à la fermentation malolactique	37
b. Modification de la composition membranaire	39
c. Synthèse de protéines de stress	41
3. <i>Zoom sur les sHSPs ; revue sur l'activité lipochaperon des sHSPs</i>	47
II. OBJECTIFS DE THESE	69
III. MATÉRIELS ET MÉTHODES	73
A. CONDITIONS DE CULTURES	75
B. OBTENTION DE TRANSFORMANTS MUTÉS SUR LE GÈNE <i>HSP18</i>	75
1. <i>Intégration du gène hsp18 au plasmide pET28a</i>	76
2. <i>Transformation des souches E. coli DH5a</i>	78
3. <i>Mutation ponctuelle du gène hsp18</i>	79
C. PRODUCTION DES PROTEINES LO18 ET LO18 MODIFIÉES	80
1. <i>Induction</i>	80
2. <i>Purification</i>	81
D. ANALYSES DE LA STRUCTURE DES PROTEINES LO18 ET LO18 MODIFIÉES	83
1. <i>Alignements multiples de structures primaires entre les sHSP</i>	83
2. <i>Quantification des types de structures secondaires</i>	86
a. Dichroïsme circulaire	86
b. Prédiction bio-informatique	87
3. <i>Prédiction des structures tertiaires de Lo18 par analyse bio-informatique</i>	88
a. Création et analyse d'un modèle de structure tertiaire de la protéine Lo18 par Alfold 2.	88
b. Modification de la structure protéique de Lo18 observée par modélisation	89
4. <i>Evaluation de la modification de la structure quaternaire de Lo18 lors de l'interaction avec la membrane par « cross-linking »</i>	90
E. ANALYSES DE L'ACTIVITÉ CHAPERON ET LIPOCHAPERON DES PROTEINES LO18 ET LO18 MODIFIÉES	93
1. <i>Mesure de l'activité chaperon par thermostabilisation de protéines cellulaires</i>	93
2. <i>Production de liposomes avec des lipides membranaires purifiés de O. oeni et L. plantarum</i>	93
3. <i>Détermination de la composition en acides gras membranaires</i>	95
4. <i>Mesure de l'activité lipochaperon par spectrofluorimétrie</i>	97
5. <i>Caractérisation de l'interaction Lo18/ lipides membranaires</i>	99

a.	Immunomarquage des phospholipides préférentiels	99
b.	Dynamique d'interaction lipides/protéines par Switch-SENSE®	100
c.	Charge de Lo18, mesure du potentiel zêta	101
F.	CARACTERISATION DES BIOFILMS FORMES EN PRESENCE DE LO18	101
1.	<i>Formation de biofilm sur microplaque de polystyrène</i>	102
2.	<i>Mesure de l'épaisseur des biofilms par microscopie confocale</i>	102
3.	<i>Résistance aux stress thermique et alcool des cellules en biofilm d'<i>O. oeni</i>.</i>	102
G.	ANALYSES STATISTIQUES	103
IV.	RESULTATS	105
A.	ACTIVITE LIPOCHAPERON DES SHSPS, UNE HISTOIRE DE STRUCTURE ?	108
1.	<i>Introduction</i>	108
2.	<i>Article de recherche 1 :</i>	111
3.	<i>Résultats complémentaires</i>	137
a.	Résidus impliqués dans l'activité lipochaperon des SHSPs de <i>L. plantarum</i> :	137
b.	Rôle de la structure secondaire dans l'activité lipochaperon de Lo18 :	139
c.	Cas de la protéine modifiée R99D :	142
B.	L'ENVIRONNEMENT LIPIDIQUE INDUIT-IL UNE MODIFICATION DE STRUCTURE DE LA PROTEINE LO18 NECESSAIRE A L'ACTIVITE LIPOCHAPERON DES SHSPS?	145
1.	<i>Introduction</i>	145
2.	<i>Article de recherche 2 :</i>	147
3.	<i>Résultats complémentaires</i>	166
a.	Forces physico-chimiques impliquées dans l'interaction entre Lo18 et la membrane :	166
b.	Cinétique d'interaction entre la protéine Lo18 et la membrane :	168
C.	CARACTERISATION DE L'IMPACT DE LO18 DANS LA REPONSE AU STRESS A L'ECHELLE DE LA POPULATION BACTERIENNE.	170
1.	<i>Introduction</i>	170
2.	<i>Matériels et méthodes</i>	171
3.	<i>Resultats/Discussion</i>	171
a.	Impact de Lo18 sur la structure du biofilm	172
b.	Résistance aux stress physique et chimique	175
c.	L'augmentation de la cohésion des cellules en biofilm ; une nouvelle fonction de Lo18 ?	176
V.	DISCUSSION/PERSPECTIVES	181
A.	A L'ECHELLE DE L'INDIVIDU : ANALYSE DE L'ACTIVITE LIPOCHAPERON DES SHSPS PAR L'ETUDE STRUCTURE FONCTION DE LA PROTEINE LO18	184
B.	A L'ECHELLE DE LA POPULATION : IMPACT DES FONCTIONS DES SHSPS LORS DE LA FORMATION DE BIOFILM	189
C.	CONCLUSION	192
VI.	REFERENCES	195
VII.	ANNEXES	243

Liste des figures

Figure 1 : Processus simplifié de vinification.	4
Figure 2: Fermentation alcoolique par <i>S. cerevisiae</i> .	5
Figure 3 : Fermentation malolactique par <i>O. oeni</i> .	5
Figure 4 : Chainette d' <i>O. oeni</i> observée en microscopie électronique à balayage.	7
Figure 5 : Organisation structurale des protéines : de la séquence en acides aminés jusqu'à l'oligomère.	11
Figure 6 : Diagramme de Venn permettant de classer les acides aminés.	13
Figure 7 : Classification hiérarchique des structures de domaines protéiques.	16
Figure 8 : Forces d'interactions et liaisons impliquées dans la structuration des protéines.	18
Figure 9 : Classifications des lipides.	24
Figure 10 : Structure des phospholipides majoritaires composant la membrane bactérienne.	27
Figure 11 : Structure de la membrane plasmique bactérienne.	29
Figure 12 : Processus d'adaptation de la fluidité membranaire en réponse aux stress environnementaux.	30
Figure 13 : Etapes de formation et de dispersion d'un biofilm bactérien.	35
Figure 14 : Mécanismes de réponse aux stress de <i>Oenococcus oeni</i> .	37
Figure 15 : Synthèse de l'ATP par la F1F0 ATPase.	39
Figure 16 : Mécanisme d'action du complexe ClpL/P (HSP100).	43
Figure 17 : Mécanisme d'action du système DnaJ-DnaK-GrpE.	45
Figure 18 : Mécanisme d'action du complexe GroEL/GroES.	46
Figure 19 : Predicted structure of model.	53
Figure 20 : Oligomerization process of sHsp.	56
Figure 21 : Mechanism of interaction described between sHSP and the membrane.	60
Figure 22 : sHSP primary sequence alignment.	64
Figure 23 : Amino acid interaction distances in <i>O. oeni</i> sHsp Lo18.	66
Figure 24 : Carte de restriction des sites DPN1 du plasmide pET28a-hsp18-HIS..	76
Figure 25 : Stratégie utilisée pour induire les mutations ponctuelles E60K, G82V, T79V et R99D.	80
Figure 26 : Mécanisme d'induction du gène hsp18 par l'inducteur IPTG.	81
Figure 27 : Principe de purification de la protéine Lo18 sur colonne His-Trap.	82
Figure 28 : Déviation de la lumière polarisée circulaire.	86
Figure 29 : Immunomarquage de la protéine Lo18.	92
Figure 30 : Mesure d'anisotropie de fluorescence.	97
Figure 31 : Immunomarquage des interactions entre la protéine Lo18 et différents phospholipides.	100
Figure 32 : Mesure par Switch-SENSE du dynamisme d'interaction entre la protéine Lo18 et les liposomes.	101
Figure 33 : Lipochaperon activity of Lo18 or modified proteins.	117
Figure 34 : Thermostabilization of proteins from <i>E. coli</i> cellular lysates.	118
Figure 35 : Protein structure modifications induced by point mutation.	119
Figure 36 : Measuring the impact of point modifications on the structure of proteins.	122
Figure 37 : Impact of Lo18/ liposomes interaction on protein secondary structure.	124
Figure 38 : Supplementary data, SRCD spectra of Lo18 WT, E60K, T79V, G82V and R99D.	135
Figure 39 : Supplementary data, verification of the induction of Lo18 and modified proteins.	136
Figure 40 : Alignement multiple des séquences des trois sHSPs de <i>L. plantarum</i> et de Lo18.	138
Figure 41 : Effet de HSP1, HSP2 ou HSP3 sur la fluidité membranaire de vésicules lipidiques dérivées de <i>L. plantarum</i> .	139

Figure 42 : Prédiction de l'impact des modifications sur la structure secondaire et l'accessibilité au solvant, aux protéines et aux macromolécules (ADN et ARN) réalisée par le logiciel PredictProtein..	140
Figure 43 : Impact de la température sur la structure de Lo18.	142
Figure 44 : Mesure d'anisotropie de fluorescence <i>in vivo</i> .	144
Figure 45 : Lipidic composition of the liposomes used.	154
Figure 46 : Lipochaperone activity of Lo18 according to the lipidic substrate.	155
Figure 47 : Lipid affinity test of Lo18. Immunolabeling measurements were performed between Lo18 and several common phospholipids.	157
Figure 48 : Structure modification of Lo18 protein according to its membrane interaction.	159
Figure 49 : Supplementary data, lipids staining of Nile Red.	165
Figure 50 : Modélisation de l'interaction Lo18/membrane.	167
Figure 51 : Répartition des charges sur la protéine Lo18.	168
Figure 52 : Cinétique d'association et de dissociation.	169
Figure 53 : Caractérisation de biofilm d' <i>O. oeni</i> cultivé en présence de Lo18.	174
Figure 54 : Résistance aux stress physiques et chimiques des cellules en biofilm.	176
Figure 55 : Biomasse des cellules en biofilm cultivées en absence ou présence de la protéine Lo18 sauvage ou modifiée (A123S, Y107A et Δ Cter).	177
Figure 56 : Recherche de la protéine Lo18 par immunomarquage .	178
Figure 57 : Formation de vésicules membranaires par <i>O. oeni</i> .	179
Figure 58 : Modèle chronologique de l'interaction entre Lo18 et la membrane d' <i>O. oeni</i> .	189

Liste des tableaux

Tableau 1 : Valeurs de pKa des acides aminés.....	22
Tableau 2 : Principales caractéristiques des protéines de stress thermique synthétisées par la bactérie <i>O. oeni</i>	42
Tableau 3 : sHSPs described for their lipochaperon activity in model organisms.	63
Tableau 4 : Souches, plasmides et amorces utilisés pour induire les mutations du gène hsp18	77
Tableau 5 : Séquences des 50 sHSP utilisées lors de l’alignement des structures primaires (1).....	84
Tableau 6 : Séquences des 50 sHSP utilisées lors de l’alignement des structures primaires (2).....	85
Tableau 7 : SRCD measurement of secondary structure).....	121
Tableau 8 : The table summarises the chaperone and lipochaperone activities of Lo18 or modified proteins according to their secondary structure modifications	125
Tableau 9: Supplementary data, measurement of fluorescence anisotropy.....	134
Tableau 10 : Supplementary data, anisotropy measurement of liposomes.....	164
Tableau 11: Supplementary data, anisotropy measurement of liposomes.....	164

I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



A. Partie 1 : *Oenococcus oeni*, une bactérie du vin

De tous temps et dans toutes les civilisations, le vin a eu un impact économique et culturel important. Dès le Néolithique (5400 – 5000 avant J.C.), de l'actuelle Géorgie jusqu'au Moyen Orient, on retrouve des traces de boissons issues de la fermentation spontanée de petites baies (raisins et aubépines) (McGovern *et al.*, 2017, 2013, 1997 et 1996). Cependant, ce n'est qu'entre le IV^e et le III^e millénaires avant J.C., au niveau des plaines transcaucasiennes, que la vigne aurait été domestiquée pour la première fois. En France, l'introduction de la vigne remonte au XIII^e siècle avant notre ère, au niveau du bassin méditerranéen. Au fil des siècles, la culture de la vigne s'est étendue pour coloniser divers territoires jusqu'à atteindre sa localisation actuelle (McGovern *et al.*, 2013). Bien que la production et la consommation de vin soient anciennes, la science du vin et la compréhension des principes de la vinification n'ont été étudiés de manière approfondie que dans la seconde moitié du XIX^e siècle.

1. Le vin un milieu complexe

Le vin est défini par l'Organisation Internationale de la Vigne et du vin (OIV) comme une boisson alcoolisée ($\geq 8,5\%$ vol.) résultant de la fermentation alcoolique partielle ou complète de raisins (frais, foulés ou non) ou du moût de raisins. L'ensemble des étapes permettant de passer de la baie de raisin au vin est la vinification et est composée majoritairement d'une dizaine d'étapes allant de la vendange à la mise en bouteille (Figure 1). Au cours de ces processus de vinification, la grande majorité des vins connaît deux étapes de fermentation. La première, universelle, est la fermentation alcoolique, effectuée par les levures. La seconde, facultative, la fermentation malolactique, est réalisée par des bactéries lactiques.

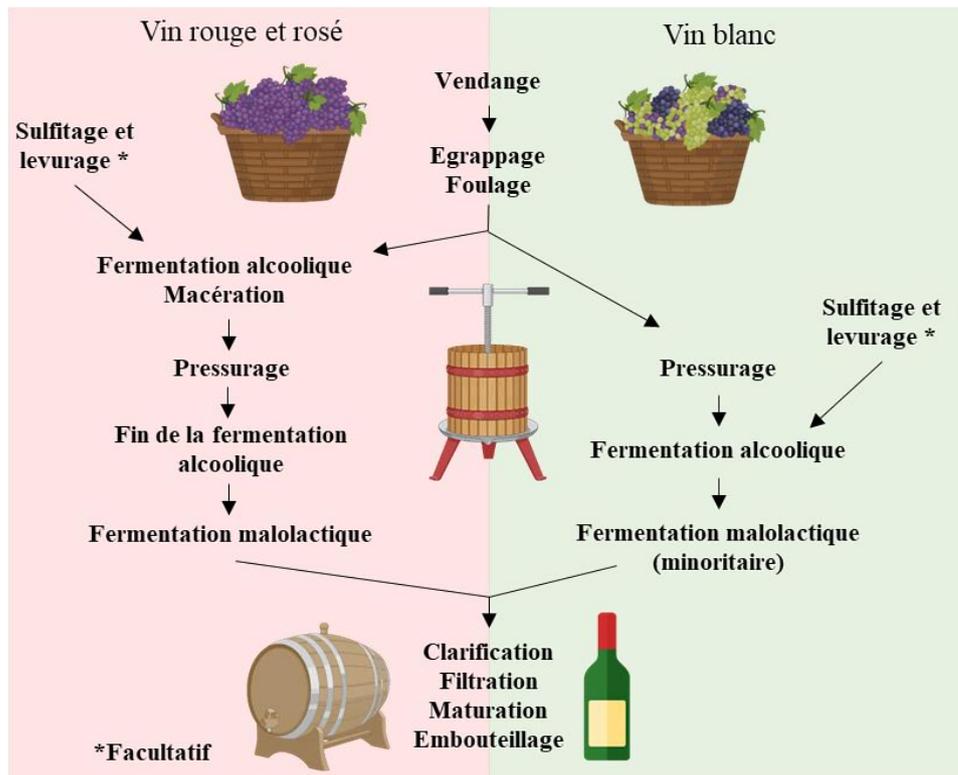


Figure 1 : Processus simplifié de vinification, d'après Gil-Serna *et al.* (2018). Réalisée avec Biorender

a. Fermentations du jus de raisins en vin.

Tout d'abord, la fermentation alcoolique réalisée par les levures, principalement par *Saccharomyces cerevisiae*, permet de dégrader les sucres en alcool. En effet, le glucose et le fructose contenus dans la baie de raisin vont être phosphorylés puis réduits en pyruvate sous l'action de kinases et d'aldolases. Le pyruvate formé sera ensuite décarboxylé et réduit en alcool sous l'action de déshydrogénase (Figure 2). A la fin de cette réaction catabolique, d'autres composés sont également produits comme le glycérol ou le dioxyde de carbone (CO₂) et peuvent impacter les caractéristiques organoleptiques du produit fini, particulièrement en présence de sulfites (Amerine & Berg, 1980). Ensuite dans la très grande majorité des vins rouges, les bactéries lactiques, principalement *Oenococcus oeni* (Bartowsky & Borneman, 2011), vont dégrader l'acide malique en acide lactique. Lors de cette fermentation, le L-malate est décarboxylé en L-lactate par l'enzyme malolactique en présence de ses cofacteurs (NAD⁺ et manganèse) (Figure 3). Les différentes étapes de la FML et son impact sur les qualités organoleptiques du vin seront respectivement détaillés dans le paragraphe II.C.2.a et II.A.2.b de ce manuscrit.

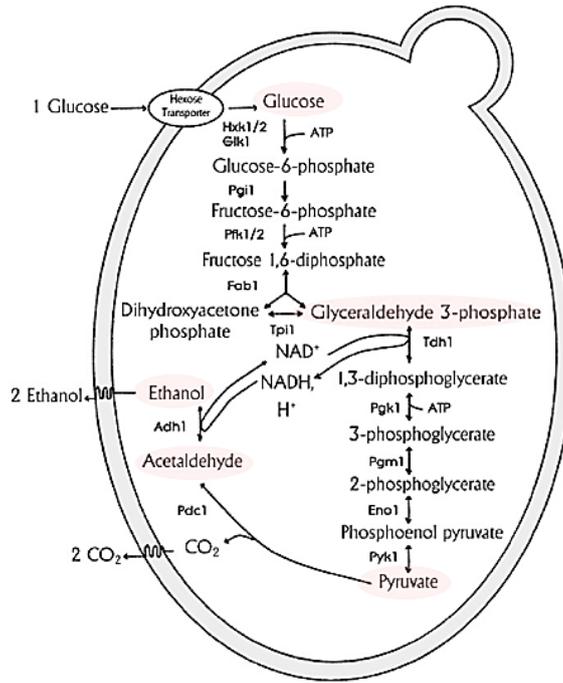


Figure 2: Fermentation alcoolique par *S. cerevisiae* issue de Faria-Oliveira *et al.* (2013)

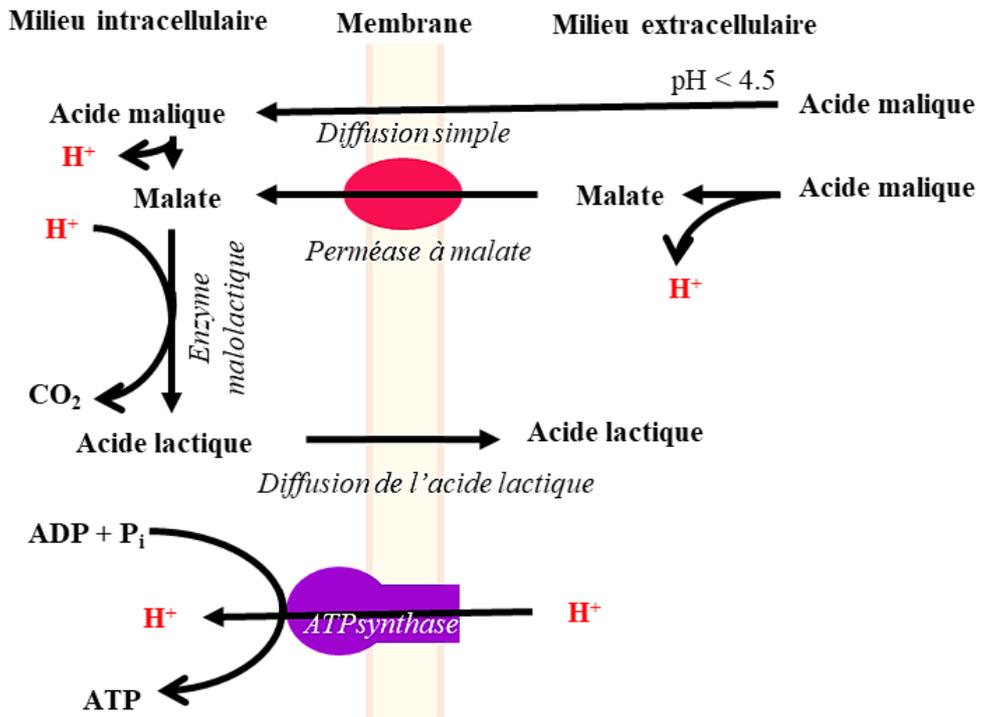


Figure 3 : Fermentation malolactique par *O. oeni*

b. Caractéristiques du milieu vin

L'ensemble du processus de vinification est à l'origine des caractéristiques sensorielles et physico-chimiques du vin (Cortez *et al.*, 2009) ; ces dernières pouvant affecter la croissance des micro-organismes. En effet, les acides fixes et volatils, le dioxyde de soufre, les sulfates et l'alcool, ainsi que la déplétion en sucres rendent le vin particulièrement hostile et stressant pour le développement des organismes.

Les différents acides organiques ou volatils (tartrique, malique, citrique, acétique, succinique ou lactique) présents dans le raisin ou produits lors des étapes de fermentations (Vilela-Moura *et al.*, 2011, Sarkar *et al.*, 2018), sont à l'origine **du pH bas** mesuré dans le vin (**entre 2,7 et 4**) (Bartowsky, 2005; Cortez *et al.*, 2009; Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983). Également, la dégradation des sucres en alcool durant la fermentation alcoolique a pour conséquence de (i) diminuer la **quantité de sucre (2,5 g/L à 6,4 g/L)** et (ii) d'augmenter le taux en **éthanol (de 8% à 15%)** du produit fini (Cortez *et al.*, 2009). Enfin, il n'est pas rare (selon la volonté du vigneron) de retrouver du dioxyde de soufre sous forme libre ou fixé (aux sucres, aldéhydes ou cétones) en quantités variables (Roullier-Gall *et al.*, 2017).

2. La bactérie lactique *Oenococcus oeni*

Dès le XIX^{ème} siècle Pasteur et Müller-Thurgau ont suggéré que l'acide lactique présent dans le vin est produit par des bactéries à partir de l'acide malique, durant les procédés de vinification. Ces travaux ont posé les bases de la fermentation malolactique (Bartowsky, 2005; Pasteur, 1875, Müller-Thurgau *et al.*, 1891). Plusieurs décennies plus tard, au milieu des années 1960, l'espèce bactérienne majoritairement responsable de la fermentation malolactique a été isolée à partir de vins californiens, français et australiens puis caractérisée (Garvie, 1967). Cette espèce a d'abord été nommée *Leuconostoc oenos* pour ses similarités phénotypiques avec le genre *Leuconostoc*. Puis, en 1995, elle a été reclassée dans un nouveau genre, le genre *Oenococcus*, et rebaptisée *Oenococcus oeni* (Bartowsky, 2005; Dicks *et al.*, 1995).

a. Informations générales sur *O. oeni*

O. oeni est une bactérie à Gram positif, retrouvée sous forme de diplocoques parfois arrangés en chainettes plus ou moins longues (Figure 4). Au niveau de son métabolisme, c'est une bactérie catalase positive, micro aérophile (développement optimal en présence de faible concentration en oxygène) et hétéro-fermentaire capable de produire du CO₂, de l'éthanol, de l'acide acétique, de l'acétaldéhyde et de l'acide lactique à partir du catabolisme des sucres (Bartowsky, 2005; Dicks *et al.*, 1995). Cependant, en se spécialisant à son environnement, *O. oeni* a perdu de nombreuses voies de biosynthèses devenant auxotrophe pour de nombreux acides aminés, vitamines ou cofacteurs. Du point de vue génétique, c'est une bactérie possédant un petit génome (environ 1,8 Mb) avec un nombre faible de copies de l'opéron ARNr, en comparaison aux autres bactéries lactiques. Ceci pourrait éventuellement expliquer la croissance lente d'*O. oeni*, dans son environnement naturel (surface des fruits comme le raisin, les baies, les pommes ou les poires) (Lorentzen & Lucas, 2019).

Cependant si sa présence est limitée sur les fruits, elle devient l'espèce majoritaire après la fermentation alcoolique grâce à sa forte tolérance à l'alcool (10-15%), à l'acidité (pH 2,8-3,8) aux températures basses (16-18°C) et aux intrants chimiques comme les sulfites (50-100 mg/L) (Davis *et al.*, 1985; Dicks *et al.*, 1995; Spano & Massa, 2006). De plus, elle peut consommer les nutriments produits par l'autolyse des levures (Lonvaud-Funel, 1999).

Cette espèce bactérienne est donc parfaitement adaptée au vin ou aux boissons fermentées comme le cidre, la kombucha, où elle est également retrouvée (Lorentzen & Lucas, 2019; Zanirati *et al.*, 2015).

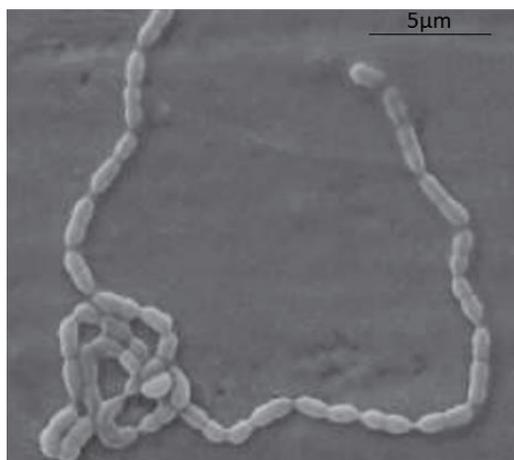


Figure 4 : Chainette d'*O. oeni* observée en microscopie électronique à balayage (Plateforme DimaCell).

b. Son rôle dans la fermentation malolactique

Considérée comme la reine de la cave, *O. oeni* est un microorganisme clé dans la FML (Grandvalet, 2017). Du point de vue du vin, la fermentation malolactique permet la **désacidification** des vins rouges et de certains vins blancs, ayant un faible pH. Ces vins acides sont principalement produits dans les régions à climats froids (Gardoni *et al.*, 2021; Liu, 2002). L'acide malique est un diacide pouvant libérer deux protons durant la fermentation. En revanche, l'acide lactique issu de la décarboxylation de l'acide malique, libère un unique proton (Figure 3). Le passage de ce diacide en monoacide permet de diminuer l'acidité totale du vin d'environ 0,3 g/L (d'équivalent en acide tartrique) par gramme d'acide malique métabolisé (Vicente *et al.*, 2022) ce qui a pour effet d'augmenter le pH du vin de 0,1-0,2 unités (Salema *et al.*, 1996).

Outre la diminution de l'acidité, la fermentation malolactique permet également de **stabiliser microbiologiquement** le vin (Kunkee, 1991). La compétition exercée par *O. oeni* sur la disponibilité en nutriments (acides organiques, sucres, acides aminés, etc...) limite le développement des micro-organismes nuisibles et la refermentation du vin en fût ou en bouteille (Vicente *et al.*, 2022).

Enfin, en raison de l'activité enzymatique diversifiée d'*O. oeni*, des précurseurs d'arômes sont métabolisés durant la fermentation malolactique, permettant alors d'augmenter la **complexité aromatique** des vins (Amerine & Berg, 1980; Bartowsky, 2005; Bartowsky & Borneman, 2011; Kunkee, 1991; Lorentzen & Lucas, 2019). Par exemple dans le Chardonnay, le Pinot Noir ou le Cabernet Sauvignon, différents composés aromatiques sont produits. Parmi ces composés, les composés volatils dérivés des proesters (l'octanoate ou l'hexanoate d'éthyle) sont ceux contribuant le plus à l'aromaticité des vins, en apportant une note fruitée (baies/ fruits rouges) (Capozzi *et al.*, 2021; Costello *et al.*, 2013). Les thiols volatils, issus du métabolisme de la méthionine, des activités glycosidases ou des estérases apportent également d'autres notes fruités (fruits exotiques/ agrumes). La dégradation de l'acide citrique en diacétyle (2,3-butanedione) permet quant à elle d'apporter des arômes de beurre et de noix, lorsqu'ils sont présents en faible concentration (Capozzi *et al.*, 2021; Gil-Sánchez *et al.*, 2019; Nielsen & Richelieu, 1999; Vicente *et al.*, 2022). Enfin, des notes de chocolat ou de torréfaction peuvent également être retrouvés lors du métabolisme des acides aminés soufrés (Pripis-Nicolau *et al.*, 2004).

B. Partie 2 : Impact de l'acidité et l'alcool du vin sur la physiologie des micro-organismes; focus sur les protéines cellulaires et les membranes.

1. Influence du vin sur la physiologie des micro-organismes

L'ensemble des caractéristiques physicochimiques du vin influence le développement des micro-organismes. Le vin est un milieu hostile dû à l'augmentation de composés toxiques produits par le métabolisme de *S. cerevisiae* tels que des acides faibles, des toxines, ou de l'éthanol. La disponibilité en oxygène et en nutriments (sucres, azotes, vitamines) diminue également, notamment dû à la concurrence entre les micro-organismes et à leur consommation en début de fermentation alcoolique. Par ailleurs, la présence éventuelle d'oxyde de soufre actif (SO₂) peut limiter la croissance des micro-organismes (Holm Hansen *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2016; Nissen & Arneborg, 2003; Pérez-Nevaldo *et al.*, 2006).

Concernant *O. oeni*, la présence d'éthanol, l'acidité et la température relativement basse (20°C) entraînent des dommages à différents niveaux de la cellule. La membrane plasmique et certaines protéines cellulaires, dont celles impliquées dans le métabolisme, peuvent être altérées. Par exemple, à basse température (< 20°C) la membrane se rigidifie (Beney & Gervais, 2001; Chu-Ky *et al.*, 2005; Tourdot-Maréchal *et al.*, 2000), à l'inverse une augmentation de la fluidité membranaire est observée en présence d'alcool (Chu-Ky *et al.*, 2005). Ces modifications de fluidité membranaire ont pour effet de perturber le flux membranaire de nutriments/déchets, tout en dissipant la force proton motrice (D'Amico *et al.*, 2006; Olgún *et al.*, 2009). Cela induit un ralentissement du métabolisme cellulaire. Par exemple, le manque de nutriments ou la présence de sulfites qui peuvent se lier avec différents métabolites (pyruvate, glucose, acétaldéhyde notamment), limitent la quantité de substrats disponibles dans les voies métaboliques. De même, le SO₂, présent dans le vin, peut inhiber l'action de certaines enzymes, comme la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), l'ATPase, l'alcool déshydrogénase ou la NAD-glutamate déshydrogénase, impliquées respectivement dans la glycolyse ou le métabolisme de l'ATP (Hinze & Holzer, 1986; Rankine & Pocock, 1969; Schimz & Holzer, 1979), ralentissant là encore le métabolisme cellulaire, et compromettant fortement la viabilité des cellules (Cisilotto *et al.*, 2021; Gonzalez & Morales, 2022). Enfin, les protéines cytoplasmiques peuvent également être dénaturées, affectant leur fonction et la survie de la cellule (D'Amico *et al.*, 2006).

L'ensemble de ces modifications physiologiques sont également décrites pour les autres micro-organismes (levure ou bactérie) présents dans le vin (Cisilotto *et al.*, 2021; Gonzalez & Morales, 2022; Park & Hwang, 2008; Piper, 1995; Swan & Watson, 1997).

2. Influence sur les protéines cellulaires

Les protéines, grâce à leurs diverses fonctions (structurelles, biochimiques, communication, chaperonne, etc...), sont des molécules clés dans le vivant. Afin d'être fonctionnelles, ces protéines doivent conserver une structure et un arrangement optimal. Dans le vin, la température, la présence d'alcool ou encore le pH bas influent sur la structure des protéines, en modifiant les interactions physiques entre leurs atomes.

a. Rappel sur l'organisation structurelle des protéines

i. Niveaux de structures des protéines

La description des différents niveaux structurels qu'adopte une chaîne polypeptidique a été introduite dès le milieu du XX^{ème} siècle par Kaj Ulrik Linderstrøm-Lang (Linderstrom-Lang, 1952). La séquence en acides aminés de la chaîne polypeptidique (structure primaire), et plus particulièrement les propriétés physico-chimiques de chaque acide aminé permettent son repliement en une structure tridimensionnelle à l'origine des fonctions de la protéine. D'abord, les interactions entre les groupes aminés (-NH₂) et carboxyles (-COOH) induisent un repliement de la chaîne polypeptidique en structures secondaires caractéristiques, telles que les hélices α ou les feuillets β . Ces structures secondaires interagissent ensuite entre elles pour former une structure tridimensionnelle complexe définissant la structure tertiaire des protéines. Enfin, différentes chaînes polypeptidiques peuvent s'associer ensemble pour former des complexes protéiques définis comme la structure quaternaire des protéines (Figure 5).

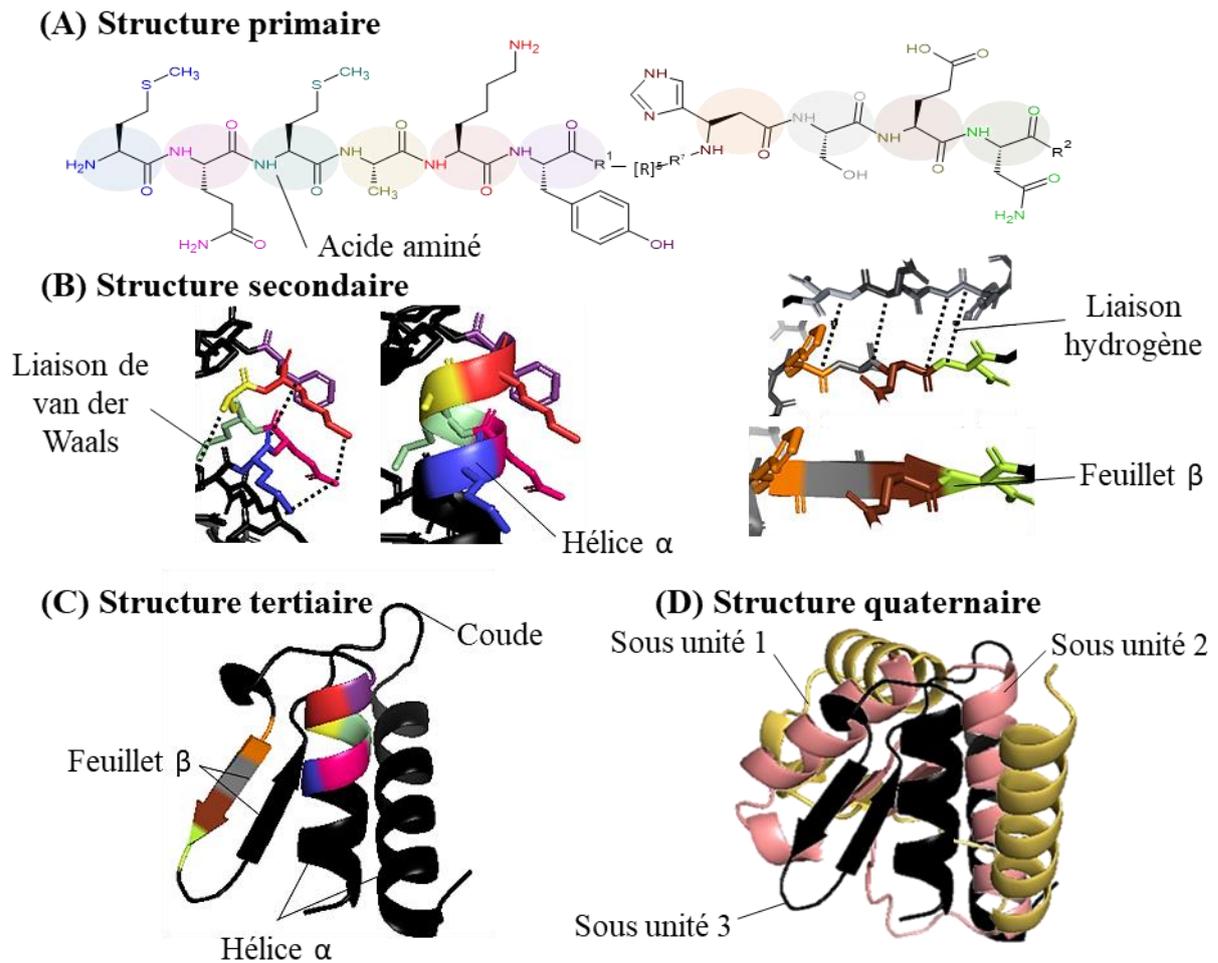


Figure 5 : Organisation structurale des protéines : de la séquence en acides aminés jusqu'à l'oligomère.

La structure primaire des protéines : se définit comme la séquence linéaire d'acides aminés qui compose la chaîne polypeptidique. Les vingt acides aminés composant l'ensemble des protéines, sont liés, un à un dans un ordre précis, pour former une longue chaîne peptidique, capable de se replier et d'assurer une fonction biologique précise, grâce aux caractéristiques physico-chimiques particulières de chaque acide aminé. (Figure 6).

L'une des caractéristiques les plus communes se trouve au niveau de leur chaîne carbonée latérale, qui peut ou non former des liaisons hydrogènes. Tous les acides aminés capables de former des liaisons hydrogènes au niveau de leur chaîne latérale sont dits **polaires** (cystéine, serine, thréonine, asparagine, glutamine, tyrosine, histidine, arginine, lysine, acide aspartique et acide glutamique), les autres, incapables, sont alors dits **apolaires** (Fisher, 1964; Volkenstein,

1965). Les larges résidus apolaires sont majoritairement retrouvés à l'intérieur de la structure tridimensionnelle de la protéine (Azad, 2107; Fisher, 1964; Schulz & Schirmer, 2013).

Les variations de structure sur la chaîne latérale (nombre de carbones et ramification) affectent la flexibilité des résidus. Plus la taille de la chaîne latérale est courte plus le résidu est flexible.

A l'inverse, la présence de ramifications augmente la rigidité des résidus (Schulz & Schirmer, 2013). Le taux de rigidité de la chaîne latérale est crucial dans le repliement des protéines. Plus la structure sera rigide, plus facilement la chaîne carbonée se repliera dans une position donnée (Ellington & Cherry, 1996; Najmanovich *et al.*, 2000).

Certains acides aminés peuvent également porter des groupements méthylènes (**acides aminés aromatiques**) ou soufrés. Les résidus aromatiques comme la phénylalanine, le tryptophane ou la tyrosine, ont un encombrement stérique et une rigidité importante (Poorten *et al.*, 2016; Schulz & Schirmer, 2013). Les résidus soufrés, comme la méthionine ou la cystéine peuvent localement soit modifier la charge du résidu (méthionine) soit induire l'interaction entre les molécules de soufre libres pour former des ponts disulfures (cystéine). Dans les deux cas cela impact la forme et influence le repliement de la protéine (Schulz & Schirmer, 2013).

La charge portée par les acides aminés joue également un rôle dans la structuration des protéines. Si à pH physiologique, la majorité des résidus sont neutres, certains affichent une charge nette **positive**, comme la lysine, l'arginine ou l'histidine. A l'inverse, l'acide aspartique ou l'acide glutamique ont une charge **négative**. Il est intéressant de noter que la chaîne latérale de la tyrosine (neutre) se comporte comme si elle était chargée positivement. La plupart de ces résidus sont retrouvés à la surface de la protéine et participent grandement à la liaison entre les acides aminés. (Azad, 2017; Larsen, 1980; Schulz & Schirmer, 2013).

Enfin, chaque acide aminé a une affinité plus ou moins marquée pour les molécules d'eau. Les résidus **hydrophobes**, comme l'alanine, la glycine, la cystéine, la valine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine ou les acides aminés aromatiques repoussent les molécules d'eau et sont majoritairement trouvés au centre des protéines (Ellington & Cherry, 1996).

L'ensemble des propriétés chimiques des acides aminés contribue à former des segments protéiques de structures différentes, de manière intra ou inter-protéique. Cela étant respectivement essentiel à la formation des structures secondaire, tertiaire puis quaternaire des protéines.

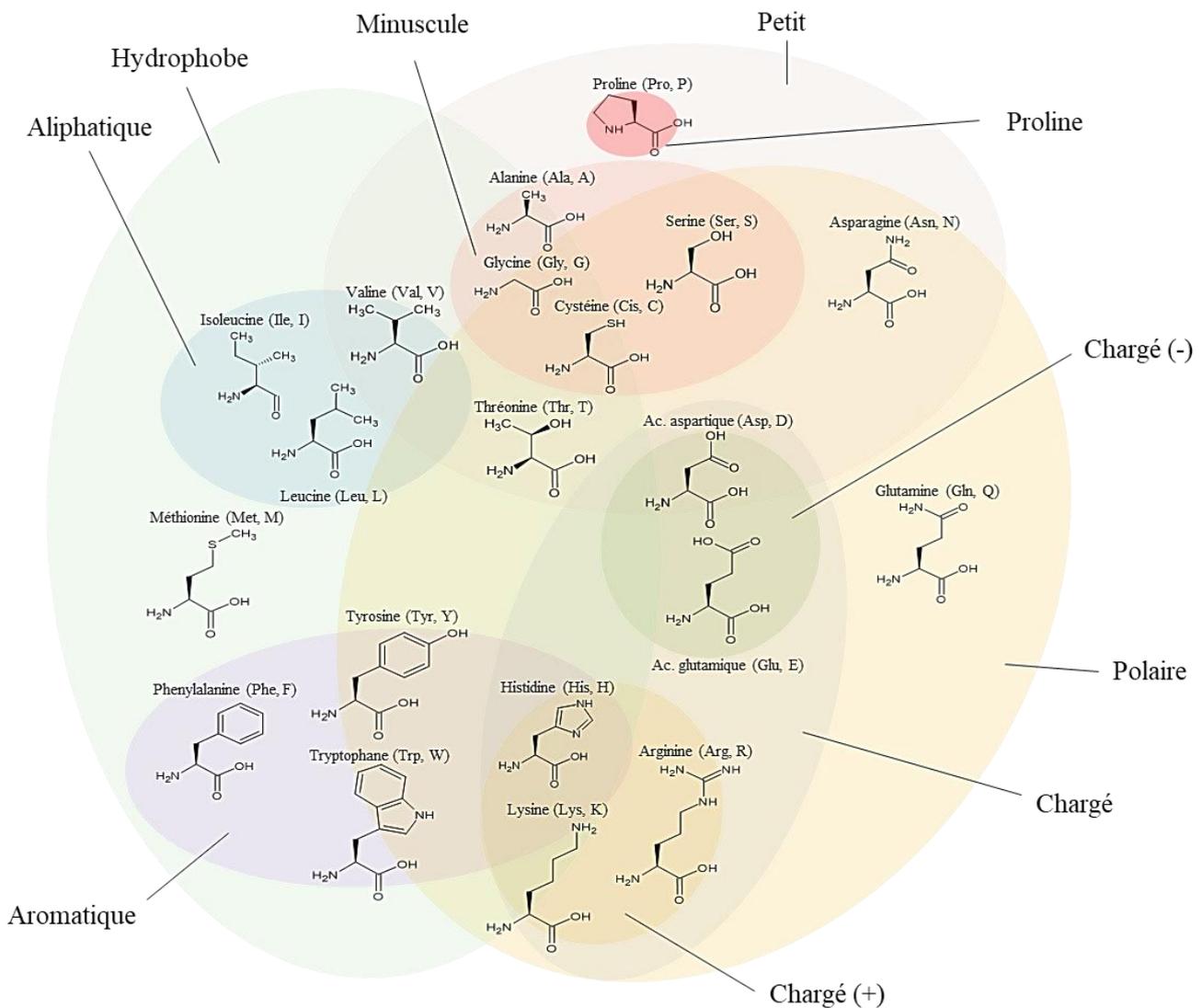


Figure 6 : Diagramme de Venn permettant de classer les acides aminés selon leurs caractéristiques chimiques de charge, d'hydrophobicité et leur chaîne carbonée latérale. Certains acides aminés possèdent plusieurs caractéristiques

La structure secondaire des protéines : est définie comme l'arrangement de la chaîne polypeptidique grâce aux interactions entre les acides aminés. Chaque structure secondaire est liée au couple de valeurs Φ et Ψ (Φ pour l'angle de rotation N(azote)-C(carbone) α , Ψ pour l'angle de rotation C α -C) des angles formés dans l'interaction entre deux résidus. Par la nature physique et chimique des résidus (répulsion, encombrement stérique) toutes les valeurs de Φ et Ψ ne sont pas possibles, favorisant alors l'apparition de structures secondaires caractéristiques (Schulz & Schirmer, 2013) .

Si tous les angles formés entre les résidus sont identiques, la chaîne polypeptidique est décrite comme linéaire. Elle forme une boucle nommée **hélice** (Edsall, 1952; Eisenberg, 2003; Pauling *et al.*, 1951; Schulz & Schirmer, 2013). Les hélices α , les plus abondantes dans les protéines, sont favorisées grâce à leur très grande stabilité. Cette stabilité résulte en partie des interactions de Van der Waals permises par les faibles énergies géométriques (énergie potentielle) et le rayon (2,3 Å, 3,6 résidus/ 13 atomes par tour) de ces hélices. D'autres hélices, plus fines comme les hélices 3_{10} (1,9 Å, 3 résidus/ 10 atomes par tour) ou plus larges comme les hélices π (2,8 Å, 4,4 résidus/ 16 atomes par tour), sont également théoriquement observables. Mais leur géométrie défavorable (énergie potentielle) les rendent moins stables et donc plus rares ou quasiment inexistantes dans les protéines (Schulz & Schirmer, 2013) .

Les chaînes polypeptidiques linéaires peuvent également s'associer entre elles, grâce à des liaisons hydrogènes, pour former une structure rigide en accordéon nommée **feuille** (Edsall, 1952; Eisenberg, 2003). Selon leur nature, les feuillets peuvent être soit parallèles (le groupement amide d'un brin est lié au groupement carbonyle de l'autre), antiparallèles (le groupement amide d'un brin est lié au groupement amide de l'autre ; il en est de même pour le groupement carbonyle) ou mixtes. Ces structures (notamment les feuillets β) légèrement moins rigides et stables que les hélices α sont également fortement répandues dans les protéines (Pauling & Corey, 1951, 1953; Schulz & Schirmer, 2013).

Des liaisons hydrogènes entre des résidus voisins peuvent également former un « virage » prononcé au niveau de la chaîne polypeptidique nommé **coude**. Ces coudes, majoritairement présents à la surface des protéines sont également très répandus dans les protéines, bien qu'ils soient moins stables que les hélices et les feuillets (Schulz & Schirmer, 2013).

Enfin, sur certains segments de la chaîne polypeptidiques, peu d'interactions entre les résidus sont observés. Ces segments, plutôt flexibles, sont alors classés comme **non structurés**.

La structure tertiaire des protéines : se définit comme l'arrangement global que prend la chaîne polypeptidique dans l'espace. Elle est la résultante des interactions des structures secondaires (i) entre elles ou (ii) avec des segments non structurés (Bajaj & Blundell, 1984; Daggett & Fersht, 2003; Eisenhaber *et al.*, 1995; Frauenfelder, 2010). Ces interactions, d'ordres ioniques, hydrophobes, hydrogènes, de Van der Waals ou formant des ponts disulfures permettent d'obtenir une structure tridimensionnelle compacte et très stable (Eisenhaber *et al.*, 1995).

Comme c'est le cas pour la structure secondaire, certains réarrangements spatiaux sont plus probables que d'autres (Figure 7) et répondent généralement à des contraintes similaires induites par la nature des résidus. La principale contrainte est que l'ensemble des tensions appliqué sur la structure doit être minimal et localement compensé par les autres interactions dans le reste de la structure (Bajaj & Blundell, 1984). Par exemple, le centre de la quasi-totalité des protéines est composé de résidus apolaires et hydrophobes. L'organisation dans l'espace de la chaîne carbonée crée alors des zones particulières (site actif) comme des sillons hydrophobes, des domaines chargés ou autres qui peuvent être à l'origine du rôle biologique de la protéine (Frauenfelder, 2010; Orengo *et al.*, 1997). C'est pour cela, que les protéines ayant une homologie non apparentée de structures primaires ont un rôle biologique similaire. Il est intéressant de noter que de mêmes contraintes peuvent être induites par des résidus différents mais similaires. Par exemple la phénylalanine et la tyrosine ou la lysine et l'arginine, respectivement de même nature physico-chimique, ont un impact similaire sur la structure de la protéine. Ceci explique que des protéines ayant une forte hétérogénéité de séquence peuvent également partager une structure tertiaire similaire et donc une activité semblable. C'est notamment le cas pour les protéines de stress thermique (Daggett & Fersht, 2003; Eisenhaber *et al.*, 1995; Frauenfelder, 2010).

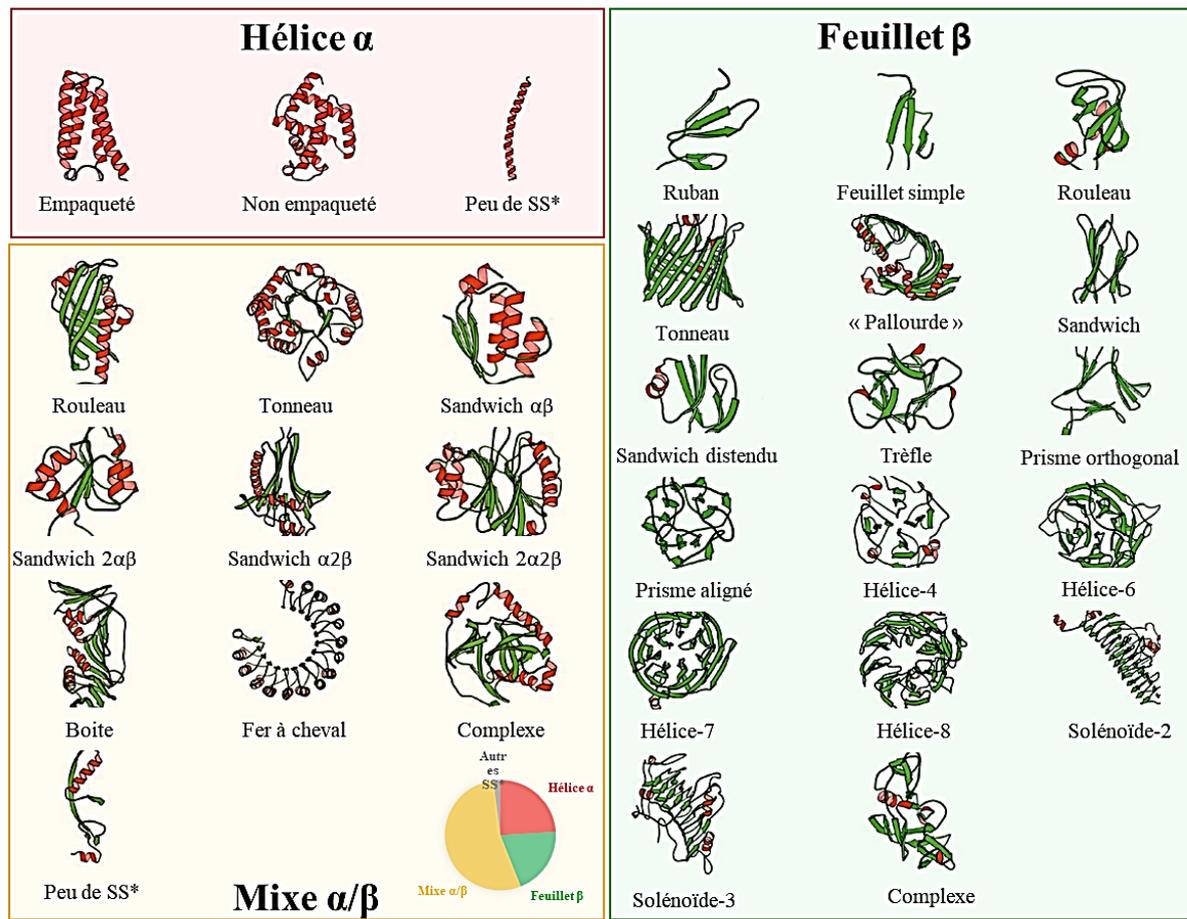


Figure 7 : Classification hiérarchique des structures de domaines protéiques (SS*: Structure secondaire), issue de Orengo *et al.*, 1997.

La structure quaternaire des protéines : est définie comme l'association d'au moins deux chaînes peptidiques (sous unités de structure tertiaire) entre elles par des interactions de nature non-covalente au niveau de domaines complémentaires (Klotz *et al.*, 1970; Sund & Weber, 1966; Yu *et al.*, 2006). L'association des chaînes polypeptidiques (formant des protéines oligomériques) est très fréquente dans la nature. Ces protéines oligomériques se divisent en deux groupes. Les protéines homo-oligomériques si l'ensemble des sous unités sont identiques ou les protéines hétéro-oligomériques si elles sont faites de différentes sous unités (Yu *et al.*, 2006). L'ensemble des protéines oligomériques peuvent former une large diversité de complexes oligomériques, du dimère (2 sous unités) au très large oligomères (Janin *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2006). Cela permet de former des molécules ayant une conformation stable. De plus, la majorité des protéines oligomériques sont dynamiques et peuvent se dissocier et s'associer en complexes oligomériques de différentes tailles (Janin *et al.*, 2008).

La disposition des sous unités peut se faire de différentes façons selon le nombre de sous unités. Pour la très grande majorité des protéines oligomériques, trois types d'arrangements géométriques sont possibles : cyclique, diédrique ou cubique.

L'arrangement cyclique est le plus courant et le plus simple. Les sous unités sont disposées tête-bêche autour d'un cercle, formant un polygone régulier. Grâce à cela, elles peuvent être formées d'un nombre impair ou de seulement deux sous unités. A l'inverse l'arrangement diédrique (organisation sur deux plan perpendiculaires) et l'arrangement cubique ne sont possibles que si le nombre de sous unités est pair. Cependant pour former un cube, il faut un minimum (ou un multiple) de 12 sous unités. Cet arrangement est par conséquent relativement rare (Klotz *et al.*, 1970).

L'organisation spatiale adoptée par les protéines oligomériques permet la formation de domaines (comme c'est le cas pour les structures tertiaires) avec lesquels d'autres protéines ou molécules (ADN, ARN, phospholipides, etc.) peuvent interagir. La structure quaternaire des protéines est donc étroitement liée aux diverses fonctions biologiques (métabolismes, transduction des signaux, systèmes de régulations, etc.) que les protéines peuvent avoir (Yu *et al.*, 2006).

ii. Forces et liaisons impliquées dans la cohésion protéique

L'organisation spatiale des protéines est le résultat de la somme des forces d'interactions qui s'opèrent entre les résidus. Lorsqu'elles se produisent entre les atomes ou les molécules et ne nécessitent ni réaction chimique ni partage d'électron, elles sont alors dites **non covalentes**. Il est toutefois important de noter que ces interactions impliquent des interactions de nature électromagnétique. Plusieurs types d'interactions interviennent dans la structuration des protéines : les interactions de Van der Waals, les liaisons hydrogènes, les interactions électrostatiques et les liaisons hydrophobes (Karshikoff, 2021) (Figure 8).

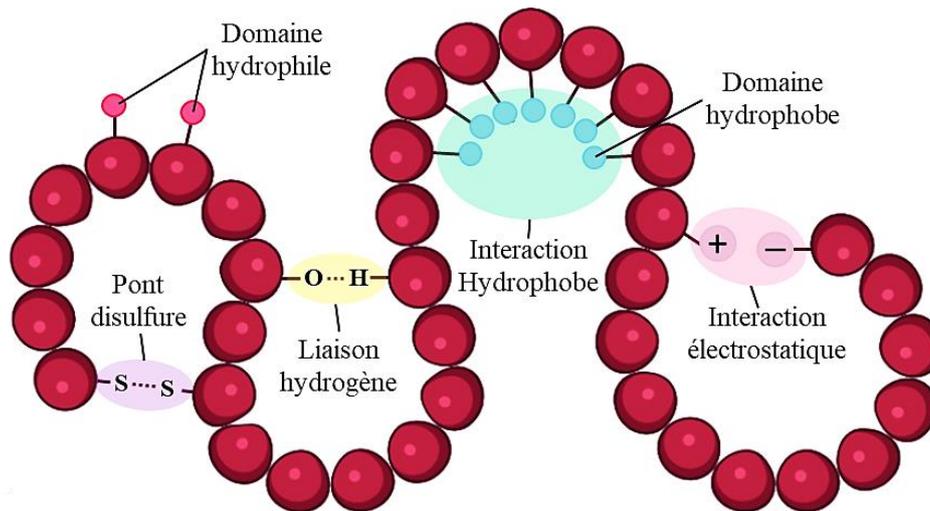


Figure 8 : Forces d'interactions et liaisons impliquées dans la structuration des protéines, adaptée de Férey *et al.*, (2009). Réalisée avec Biorender.

Les interactions de **Van der Waals** sont caractérisées par le contact à courte distance d'atomes proches. Dans cette catégorie d'interaction se trouvent les forces de dispersions, de répulsions et électrostatiques (Frauenfelder, 2010). Les atomes pris dans ces interactions se comportent, à faible distance, comme des dipôles oscillants qui permettent, en se polarisant, leur attraction mutuelle. La charge positive d'un des dipôles attire les électrons vers elle (acide de Lewis), alors que la charge négative de l'autre dipôle les repousse (base de Lewis), créant une liaison de faible intensité (Bhagavan, 2002; Frauenfelder, 2010). Bien que de nature très faible ces interactions sont nombreuses dans les protéines, particulièrement au niveau des structures non polaires. De plus, si les dipôles sont alignés, les interactions de Van der Waals peuvent s'additionner ce qui renforce les forces de l'interaction. Par exemple, dans les hélices, les dipôles tendent à s'aligner et à favoriser la formation de structures antiparallèles (Schulz & Schirmer, 2013). Les forces de dispersion, moins sensibles aux caractères polaires du résidu, se produisent également naturellement entre deux atomes. Enfin, des liaisons électrostatiques et ioniques peuvent également se former entre deux atomes (groupes d'atomes) de charge opposée. Ces liaisons sont principalement retrouvées entre les résidus chargés positivement de la chaîne latérale (comme la lysine l'arginine ou l'histidine) et chargés négativement (comme l'acide aspartique ou glutamique) (Bhagavan, 2002). Selon les conditions environnementales dans lesquelles se trouvent les protéines, les interactions ioniques peuvent être fortes et stabiliser l'ensemble de la protéine (Frauenfelder, 2010).

Les **liaisons hydrogènes** sont importantes dans la structuration des protéines, principalement dans la formation des structures secondaires. Elles sont principalement de nature électrostatique et permettent la liaison des atomes les plus électronégatifs (Frauenfelder, 2010). Elles se forment exclusivement entre les électrons d'un atome électronégatifs et un hydrogène par des liaisons électrostatiques. L'atome et l'hydrogène sont généralement proches et sur le même plan. Par exemple, l'hydrogène présent sur le groupement l'amide (atome donneur de liaison hydrogène) et les électrons de l'atome d'oxygène du groupement carbonyle (atome accepteur de liaison hydrogène) de deux chaînes carbonées différentes s'attirent mutuellement. Les liaisons hydrogènes peuvent également se produire avec d'autres groupement présent sur les résidus, notamment avec les cycles phénols (tyrosine, phénylalanine), les résidus soufrés (méthionine, cystéine), les groupements alcool (serine, thréonine, tyrosine) ou les esters (Bhagavan, 2002). Ces liaisons, comme les liaisons électrostatiques, ont tendance à être alignées mais ont une force d'interaction bien plus forte. Cette force d'interaction tend, d'ailleurs, à diminuer lorsque les liaisons sont désalignées. A cause des contraintes géométriques existant entre les résidus, ce type de liaison est assez commun dans les protéines, particulièrement entre les amides et les groupes hydroxyles présent sur la chaîne latérale des résidus (Bhagavan, 2002; Frauenfelder, 2010; Schulz & Schirmer, 2013).

Bien qu'il ne s'agisse pas de liaisons à proprement parler (aucun partage d'électron), des **interactions hydrophobes** sont largement décrites dans la structuration des protéines. Ces interactions se font au niveau des résidus apolaires des chaînes latérales (résidus aromatiques) lorsque les résidus sont dans un environnement aqueux. Les résidus s'agrègent ensemble pour limiter leur contact avec l'eau (Bhagavan, 2002). Les protéines formeront alors une structure globulaire relativement stable (Frauenfelder, 2010).

En plus de ces interactions non-covalentes, d'autres types de liaisons sont possibles. Par exemple, pour atteindre une configuration électronique plus stable, deux atomes peuvent partager des électrons créant une liaison dite **covalente**. Dans les protéines, on retrouve majoritairement ces interactions dans les liaisons créant des ponts disulfures (Figure 8).

Les **ponts disulfures** se forment entre deux résidus cystéine, principalement quand les conditions sont oxydantes.

Ces liaisons, majoritairement à l'intérieur de la chaîne polypeptidique, permettent d'apporter une stabilité supplémentaire aux protéines déjà bien repliées. Il est cependant intéressant de noter que toutes les protéines ne possèdent pas de ponts disulfures (Schulz & Schirmer, 2013).

b. Modifications des interactions au sein des protéines induites par l'environnement

Les protéines se trouvent dans un environnement dont les propriétés sont variables (composition ionique, température, pH, osmolarité, présence d'éthanol, etc.). Alors que la séquence en acides aminés détermine la structure native d'une protéine, les variations de l'environnement affectent significativement leur structure. Lors de la modification de l'environnement, l'intensité et les forces d'interaction stabilisant les protéines peuvent varier (Di Stasio & De Cristofaro, 2010; Zhou & Pang, 2018) affectant alors la structure des protéines. La structure des protéines étant clé dans leurs fonctions biologiques (interaction avec d'autres molécules : protéines, lipides, ADN, ARN, ect.) les modifications structurelles induites par l'environnement impactent leurs fonctions (Di Stasio & De Cristofaro, 2010; Karshikoff *et al.*, 2015; Naowarojna *et al.*, 2021; Schulz & Schirmer, 2013). Il est intéressant de noter que certaines modifications post-traductionnelles, telles que la méthylation, la sulfatation, la phosphorylation ou la glycosylation, ont un impact similaire (Naowarojna *et al.*, 2021; Zhou & Pang, 2018).

Les modifications de l'environnement entraînent une multitude de changements et compromettent progressivement les liaisons des plus faibles aux plus fortes (Karshikoff *et al.*, 2015). Les résidus chargés, polaires ou soufrés (l'asparagine, la glutamine, l'histidine, la lysine, l'arginine, la serine, la thréonine, la cystéine ou la méthionine) y sont particulièrement sensibles. La majorité de ces résidus est impliquée dans les interactions hydrophobes et hydrogènes (Zhou & Pang, 2018). Notons que la contribution des interactions hydrophobes représente jusqu'à 30% des forces d'interaction impliquées dans la structure des protéines, le reste étant majoritairement couvert par les liaisons hydrogène. De surcroît, ces résidus se trouvent principalement au niveau des sites fonctionnels de la protéine. De ce fait, les modifications physico-chimiques de ces résidus sont directement liées à une dénaturation ou une modulation des fonctions de la protéine. (Baldwin & Rose, 2016; Ferenczy & Kellermayer, 2022; Pace *et al.*, 2014)

Pour illustrer l'ensemble des changements physico-chimiques induit par l'environnement vin sur la structure des protéines, prenons l'exemple des effets des stress oxydatif, acide et thermique.

Lors d'un stress oxydatif, des espèces réactives à l'oxygène (ROS) et au chlore (RCS) sont produites. Les ROS et RCS peuvent déprotoner l'atome de soufre, particulièrement riche en électrons, que l'on retrouve sur les résidus soufrés (méthionine et cystéine). Cette déprotonation entraîne la formation d'un thionate (-S-) qui ne permet plus aux groupements thiols (-SH) d'interagir ensemble et donc de former des ponts disulfures. Etant absent, les liens entre différents segments intra ou inter-protéiques ne sont plus possible, conduisant alors à une modification de structure de la protéine (Di Stasio & De Cristofaro, 2010). D'autres résidus, comme l'arginine, la lysine, la proline, la thréonine, l'histidine ou la tyrosine, en interagissant avec les espèces réactives, modifient leur profil électrostatique (Van De Weert *et al.*, 2001). Ceci conduit à la diminution des liaisons hydrogène induisant une perte de la stabilité de la protéine au niveau des structures secondaires, principalement des feuilletts β (Edsall, 1952; Eisenberg, 2003; Muley *et al.*, 2010; Zhou & Pang, 2018).

Un changement du pH interne, même de l'ordre de 0,2 unités pH, modifie les interactions de Van der Waals, hydrogène et hydrophobes. Lorsque le pH s'approche d'une des valeurs de pKa d'un résidu, la proportion de ce résidu sous forme zwitterion (charge neutre) diminue, au profit des formes chargées positivement (pH acide) ou négativement (pH basique). Par conséquent la proportion, respectivement, d'acide ou de base de Lewis augmente également (Bhagavan, 2002; Frauenfelder, 2010). De nouvelles interactions peuvent alors se créer sur et entre les chaînes polypeptidiques. Dans le même temps, certains résidus chargés vont tendre à devenir neutres, entraînant l'abolition de certaines liaisons existantes. La création et/ou l'abolition d'interactions entre les résidus modifient la structure secondaire (en favorisant ou non la formation d'hélices α) et la conformation tertiaire et quaternaire de la protéine (Naowarajna *et al.*, 2021). Là encore, la cystéine, les acides glutamique et aspartique et plus particulièrement l'histidine sont particulièrement sensibles à ces modifications de pH, avec des valeurs de pKa pour leur chaîne latérale proche du pH physiologique des micro-organismes (Tableau 1).

Tableau 1 : Valeurs de pKa des acides aminés.

Acides aminés	Valeur de pKa		
	Groupement carboxylique (-COOH)	Groupement amide (-NH ₂)	Chaîne latérale
Glycine	2,4	9,8	
Alanine	2,4	9,9	
Valine	2,3	9,7	
Leucine	2,3	9,7	
Isoleucine	2,3	9,8	
Méthionine	2,1	9,3	
Proline	2,0	10,6	
Phénylalanine	2,2	9,3	
Tryptophane	2,5	9,4	
Serine	2,2	9,2	
Thréonine	2,1	9,1	
Cystéine	1,9	10,7	8,4
Tyrosine	2,2	9,2	10,5
Asparagine	2,1	8,7	
Glutamine	2,2	9,1	
Acide aspartique	2,0	9,9	3,9
Acide glutamique	2,1	9,5	4,1
Lysine	2,2	9,1	10,5
Arginine	1,8	9,0	12,5
Histidine	1,8	9,3	6,0

Dans le cas des stress thermiques, les paramètres thermodynamiques des interactions entre les molécules et les résidus sont modifiés. L'énergie des différentes liaisons, précédemment décrites, entrent en concurrence avec l'entropie (le désordre) de la chaîne polypeptidique. (Schulz & Schirmer, 2013). Ceci se traduit, en cas d'augmentation de la température, par une augmentation de la vitesse de réaction de repliement des protéines (Oliveberg *et al.*, 1995). A cause de la diminution des interactions hydrogènes, initialement observée, les interactions hydrophobes diminuent également. Les résidus hydrophobes se retrouvent alors exposés à l'eau et se polarisent. Cela modifie les interactions locales au centre de la protéine. (Karshikoff *et al.*, 2015; Muley *et al.*, 2010; Oliveberg *et al.*, 1995; Zhou & Pang, 2018). Il est néanmoins intéressant de noter que malgré la modification de la température, il est possible (bien que rare) d'observer des liaisons fortes se former à haute température (Karshikoff *et al.*, 2015). Lors d'une diminution de la température, un ralentissement des réactions thermodynamiques de la protéine est observé. Ce ralentissement peut se traduire par une difficulté à obtenir une protéine correctement repliée et stable.

Enfin, bien que la majorité de la littérature décrive ces phénomènes de modifications structurales dans le cadre de la perte d'activité des protéines, certaines protéines ont besoin de modification post-traductionnelle impactant les acides aminés pour être actives (Deng *et al.*, 2020; Gerasimavicius *et al.*, 2022; Sotomayor-Vivas *et al.*, 2022; Zhu & Qian, 2020). Par exemple, les protéines impliquées dans la régulation de la transcription ou la maintenance de l'ADN (respectivement, HypT, HprS et RecA) chez *Escherichia coli* deviennent actives dès lors que leurs méthionines sont oxydées (Vincent & Ezraty, 2023).

3. Influence sur la membrane cellulaire

La membrane est également un élément biologique indispensable au vivant. Elle est formée, entre autres, de lipides qui, en interagissant entre eux, forment une bicouche lipidique. Cette bicouche a pour fonction majoritaire de séparer le milieu intérieur des cellules de l'environnement extérieur. La diversité de structure induite par les différentes classes de lipides et de protéines qui la compose est à l'origine de ses fonctions (échanges intra et extracellulaire, métabolisme cellulaire et communication cellulaire) (Bretscher, 1985; de Kruijff, 1987; O'Brien, 1967). Cependant par sa localisation, la membrane est l'un des premiers composants à être impacté par le stress environnemental.

Les modifications de la fluidité et de la perméabilité membranaire peuvent mener jusqu'à la mort de la cellule si les mécanismes de réponses aux stress mis en place ne sont pas suffisants (Bretscher, 1985; Dowhan & Bogdanov, 2002).

a. Rappel sur les membranes cellulaires.

i. Éléments constituant la membrane plasmique des bactéries

Les lipides composant la membrane bactérienne sont décrits comme des molécules possédant une partie hydrophile et une partie hydrophobe, qui sont non miscibles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques (alcools, éthers, cétones) (Bretscher, 1985; Fahy *et al.*, 2011). Il existe une large quantité de molécules répondant à cette description. Ces molécules sont classées en trois groupes majeurs (Figure 9) : les lipides simples, complexes ou dérivés. Les lipides simples, dont l'hydrolyse donne du glycérol, des stérols ou des acides gras (lipides dérivés), sont représentés par les triglycérides, les esters d'acides gras ou les cires. Ce sont des lipides rares dans les membranes bactériennes. Les lipides complexes, constitués d'esters d'acides gras ou d'alcools et d'acides gras, comprennent les glycolipides, les sphingolipides et les phospholipides (Fahy *et al.*, 2011; Shaw, 1974).

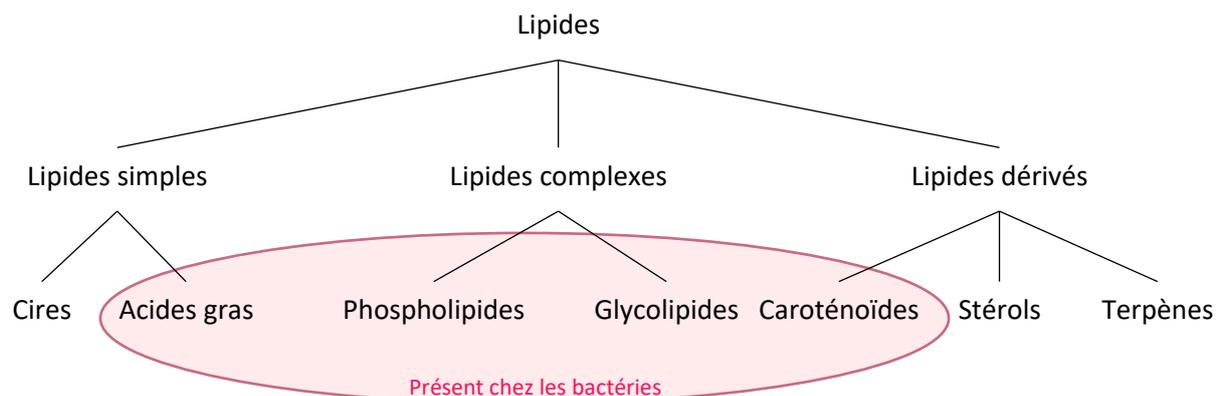


Figure 9 : Classifications des lipides d'après Milesi (2018)

Les phospholipides (ou glycérophospholipides) sont les lipides les plus couramment retrouvés dans les membranes.

Ils sont formés d'une molécule de glycérol-3-phosphate estérifiée par des deux chaînes hydrocarbonées d'acides gras (hydrophobe) et d'une molécule d'acide phosphorique (hydrophile) définissant la nature du phospholipide sur lequel un radical variable (éthanolamine, serine, glycérol ou choline entre autres) peut se fixer (Bretscher, 1985; Voet & Voet, 2016) (Figure 10).

Au niveau de la tête polaire : l'**acide phosphatidique (PA)** est le groupement le plus simple pour un phospholipide. Il est composé d'un squelette glycérol, sur lequel sont fixés d'une part deux acides gras grâce à des groupements ester et d'autre part un groupement phosphate. En tant que tel, il est rarement retrouvé dans les membranes bactériennes. Cependant, au niveau du groupement phosphate divers radicaux (éthanolamine, choline, glycérol ou serine) peuvent se lier via liaison phosphodiester, permettant de former l'ensemble des phospholipides (Shaw, 1974; Zhang & Rock, 2016) (Figure 10).

Chez les bactéries, le groupement supplémentaire le plus abondant est l'éthanolamine formant la **phosphatidyléthanolamine (PE)**. La taille de sa tête polaire, relativement petite, lui donne une forme de cône. De ce fait, ce phospholipide joue un rôle majeur dans la courbure de la membrane. De plus, c'est un phospholipide qui malgré sa charge nette globale neutre (dans l'intervalle de pH 2-7) peut se lier avec la chaîne latérale des acides aminés chargés positivement (Alberts, 1989; Ansell & Spanner, 1982; Shaw, 1974; Zhang & Rock, 2016). Le glycérol est la seconde tête polaire la plus abondante formant la **phosphatidylglycérol (PG)**. Plus large que l'éthanolamine, la tête polaire du phosphatidylglycérol lui donne une forme cylindrique impliquée dans la formation de la bicouche lipidique. Elle interagit également avec les acides aminés chargés positivement grâce à sa charge nette négative. La serine, l'inositol ou la choline respectivement les têtes polaires de la **phosphatidylserine (PS)**, **phosphatidylinositol (PI)** et **phosphatidylcholine (PC)** sont moins abondantes chez les bactéries. Cependant, elles sont nécessaires à la structure de la membrane. La phosphatidylserine, chargée négativement permet l'interaction avec les protéines environnantes et influence le transport moléculaire entre les milieux intérieur et extérieur. De même que la phosphatidylcholine, par sa forme cylindrique, permet de fluidifier la membrane (Cronan, 2002; Shaw, 1974).

Au niveau des chaînes d'acides gras : leurs structures et leurs géométries déterminent la forme du phospholipide (Fonseca *et al.*, 2019). La longueur de la chaîne la plus répandue, chez les bactéries, va de 10 à 20 carbones, mais peut comprendre jusqu'à 90 carbones chez certaines mycobactéries. Les acides gras peuvent être ramifiés, droits, saturés, insaturés et/ou cycliques (Figure 10). Les **acides gras ramifiés** ont un groupement méthyle au niveau de l'avant dernier ou de l'avant-avant dernier carbone en position *iso*. À l'inverse les **acides gras droits** n'en possèdent pas (O'Leary, 1962; Shaw, 1974). Les chaînes d'acides gras peuvent également avoir une mono-insaturation (**acide gras insaturé**), se caractérisant par une double liaison, généralement, au niveau du 11^{ème} et 12^{ème} carbone. La poly-insaturation largement présente chez les eucaryotes n'est pas retrouvée chez les bactéries, à l'inverse des **acides gras cycliques**. Les acides gras cycliques possèdent un cycle cyclopropane, le plus connu étant l'acide lactobacillique (Grogan & Cronan, 1997; Moss *et al.*, 1974; Shaw, 1974).

Les glycolipides, dont les **diglycérides diglycosylés** et les **sucres acylés**, sont répandus chez les bactéries. Ce sont des phospholipides dérivés d'acides gras et de sucres. Ils sont généralement retrouvés à la surface externe de la bicouche lipidique (Fonseca *et al.*, 2019). Des traces de sphingolipides, de glycérides sont également retrouvées chez les bactéries, principalement sous forme de mono et diglycérides (Fahy *et al.*, 2011; Shaw, 1974). Enfin certains lipides, comme les stérols, sont complètement absents des membranes bactériennes, bien que leurs précurseurs (dont les squalènes) soient présents.

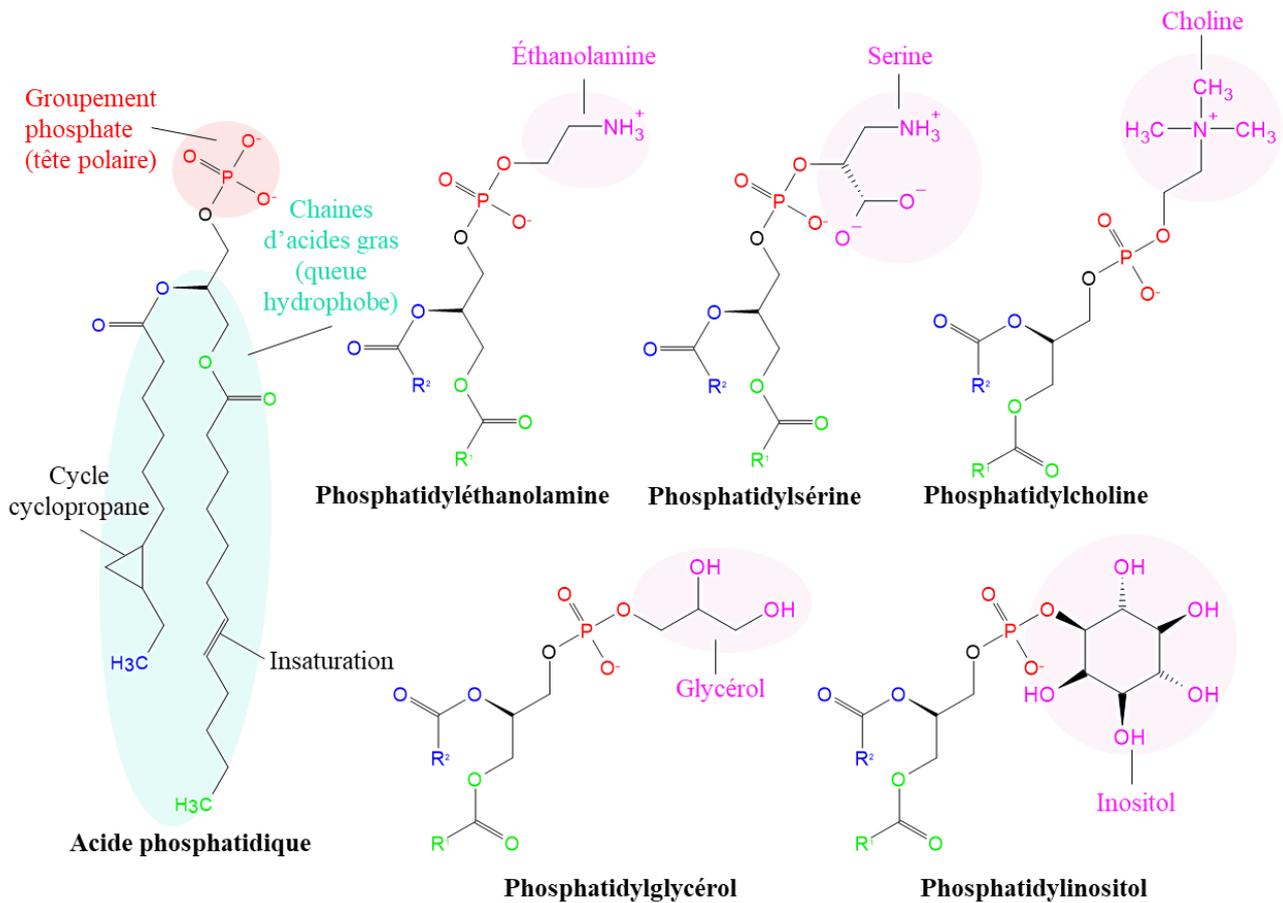


Figure 10 : Structure des phospholipides majoritaires composant la membrane bactérienne

ii. Structure et organisation des membranes plasmiques

L'architecture des cellules bactériennes est régie par la forme de la membrane et cette architecture est cruciale dans l'établissement de ses fonctions. La surface membranaire bactérienne est une bicouche d'environ 7.5 nm d'épaisseur non homogène. Elle est constituée de deux feuilletés formés d'une mosaïque de microdomaines phospholipidiques soutenus par certaines protéines membranaires. (Matsumoto *et al.*, 2006; Strahl & Errington, 2017; Zhukovsky *et al.*, 2019). Chaque phospholipide qui la compose a des caractéristiques physiques spécifiques et différentes, telles que sa forme ou sa charge, impactant la structure finale de la membrane (Figure 11).

Lorsque la tête polaire est plus petite que la queue d'acide gras, comme c'est le cas pour le PE ou le PA, la forme du phospholipide est un cône. A l'inverse, si la queue d'acides gras est moins large que la tête, le phospholipide a la forme d'un cône inversé.

Enfin si la queue d'acides gras est aussi large que la tête polaire, le phospholipide a la forme d'un cylindre. (Zhukovski *et al.* 2019). Cette forme de cylindre, adoptée par le PS, PI, PC et PG, est la plus répandue et permet la formation d'une bicouche lipidique plate. Les phospholipides de différentes formes interagissent entre eux, par des liaisons (i) hydrogène au niveau des têtes polaires et (ii) de Van der Waals au niveau des chaînes d'acides gras (Matsumoto *et al.*, 2006). Lorsque les phospholipides de forme conique s'insèrent avec ceux de forme cylindrique la courbure de la membrane se modifie. La modification est dite positive (concave) en présence de cônes inversés et négative (convexe) en présence de cônes (Cronan, 1978) (Figure 11).

La charge de la tête lipidique joue également un rôle dans la structure de la membrane. Les lipides ayant une charge anionique sont préférentiellement retrouvés au niveau du feuillet intracellulaire. A l'inverse, du feuillet extracellulaire où les lipides neutres sont plus souvent présents (Zhukovsky *et al.*, 2019). Cette différence de charge crée une asymétrie électrostatique au niveau de la membrane. Cela impacte l'interaction covalente avec les protéines membranaires (Strahl & Errington, 2017), qui modulent et soutiennent la structure de la membrane (Strahl & Errington, 2017).

Enfin, la structure des acides gras est également clé dans la structure et la fluidité de la membrane. Le degré d'insaturation des chaînes d'acides gras impacte la fluidité de la membrane. Les acides gras saturés, possédant une structure droite et régulière, forment un empilement dense et plutôt rigide. A l'inverse, les acides gras insaturés en conformation *cis* limitent l'empilement des lipides dans la bicouche. Par conséquent, la fluidité de la membrane augmente. Le même phénomène est observé en présence d'acides gras à courtes chaînes (Fonseca *et al.*, 2019; Russell, 1989).

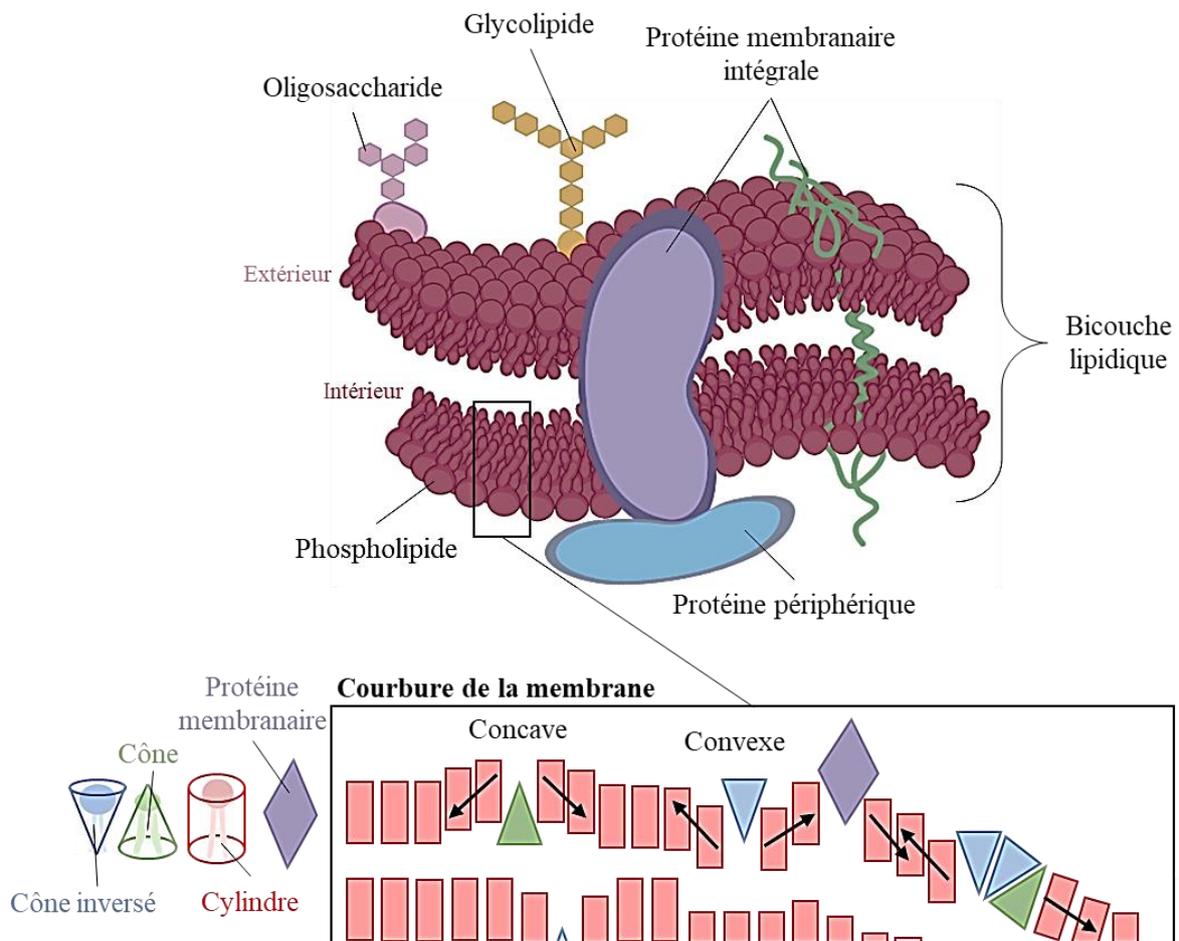


Figure 11 : Structure de la membrane plasmique bactérienne adaptée de Chabanon *et al.*, (2017) et Toyofuku *et al.* (2015). Réalisée avec Biorender

b. Modification de la fluidité membranaire en réponse au stress

La membrane plasmique est le premier composant cellulaire à être impacté par l'environnement. Dans le vin, la température basse, l'acidité et la composition du milieu (alcool, nutriment, intrant chimique, oxygène) sont les principaux facteurs impactant la fluidité membranaire (Chu-Ky *et al.*, 2005). Afin d'assurer les fonctions principales de la membrane et de maintenir l'intégrité membranaire, une fluidité optimale doit être assurée. Cette fluidité optimale, d'une viscosité de l'ordre de 0,1 Pa.s, traduit la dynamique idéale des lipides au sein de la bicouche (Denich *et al.*, 2003). En conditions physiologiques, la bicouche est retrouvée en phase cristalline liquide ($L\alpha$).

Dans cette phase, relativement fluide, les lipides ont une liberté de mouvements considérable (rotation, basculement et diffusion latérale) et permettent la correcte insertion des protéines membranaires. Lorsque la structure est plus rigide et que les lipides ont moins de mouvement, la membrane adopte une structure en phase de gel stable et ordonnée ($L\beta$) (Fonseca *et al.*, 2019). La nature des acides gras (taille et insaturation) composant la membrane détermine la température permettant la transition entre la phase cristalline liquide et la phase gel (Fonseca *et al.*, 2019).

Selon l'intensité et la durée du stress, la fluidité membranaire sera plus ou moins affectée. Afin que la fluidité optimale soit maintenue, différentes réponses (active ou passive) sont mises en place par les cellules (Beney & Gervais, 2001; Bouix & Ghorbal, 2017; Denich *et al.*, 2003; Fonseca *et al.*, 2019) (Figure 12).

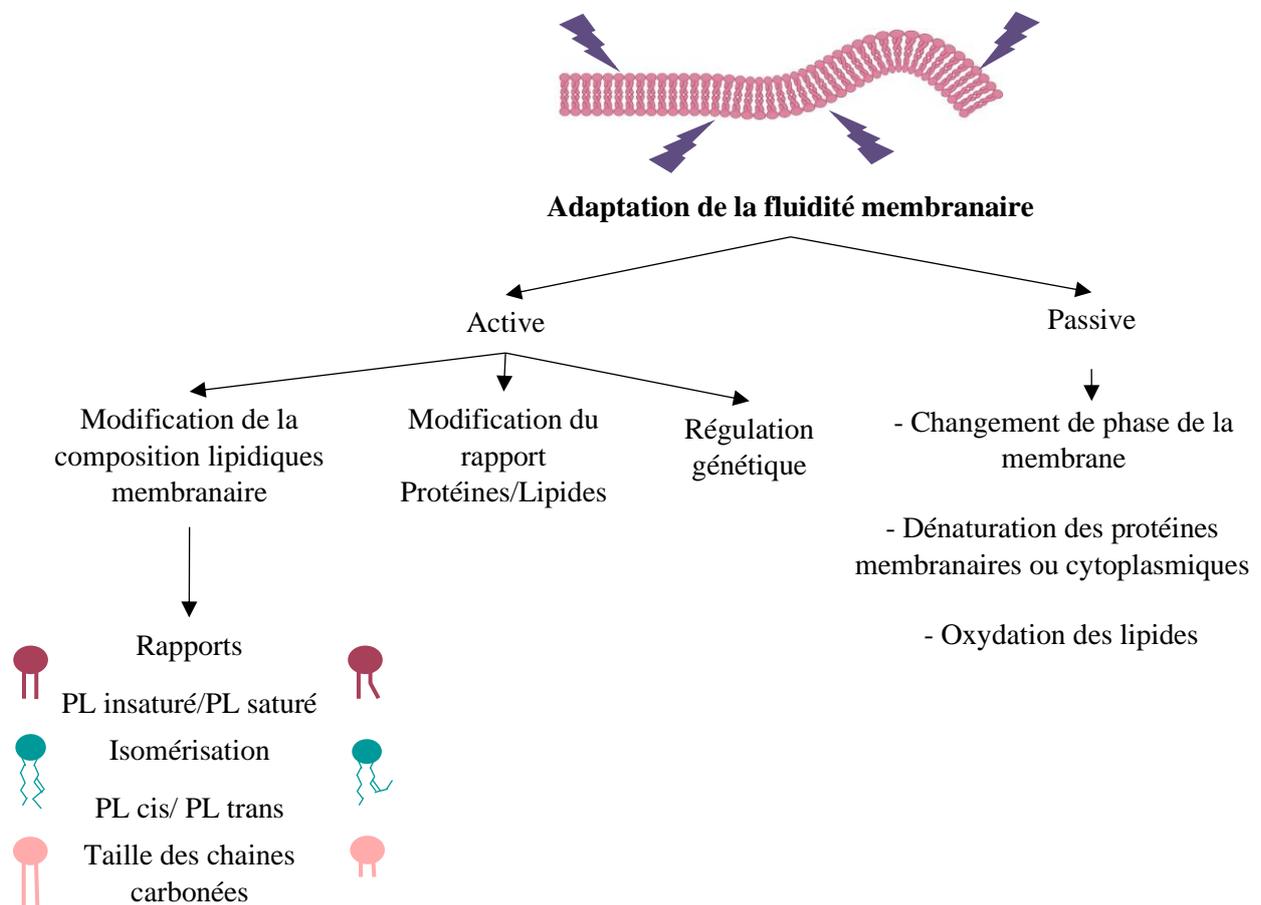


Figure 12 : Processus d'adaptation de la fluidité membranaire en réponse aux stress environnementaux. Réalisée avec Biorender.

La **réponse active** se caractérise, chez les bactéries, par (i) une modification de la composition en lipides membranaires (longueur des chaînes d'acides gras, cyclisation entre autres), (ii) une modification du rapport protéines/lipides dans la membrane et (iii) la régulation de certains gènes codant notamment pour des isomérases (Fonseca *et al.*, 2019).

Il existe plusieurs processus différents (qui peuvent avoir lieu simultanément) pouvant modifier la composition lipidique des membranes. Une adaptation du **rapport acides gras insaturés/saturés** est couramment observée (Bouix & Ghorbal, 2017; Denich *et al.*, 2003; Grogan & Cronan, 1997). Selon l'état de fluidité de la membrane, le taux d'acides gras insaturés par rapport à celui des acides gras saturés et cycliques, va soit augmenter (fluidification de la membrane) ou diminuer (rigidification de la membrane) (Beney & Gervais, 2001; Fonseca *et al.*, 2019). Par exemple, lors de la rigidification de la membrane induite par la température basse du vin, le ratio acides gras insaturés/saturés augmente pour fluidifier la membrane. A l'inverse, en réponse au pH bas et ou à l'alcool, le ratio acides gras insaturés/saturés diminue (Fonseca *et al.*, 2019; Los & Murata, 2004). En plus de la modification de ce ratio, la **nature de l'insaturation** peut également être modifiée. La conversion rapide des acides gras insaturés en conformation *cis* à une conformation *trans* (isomérisation) permet de diminuer la température de fusion de la membrane. Cette diminution de la température de transition de phase (gel à liquide cristallin) induit une augmentation de la fluidité de la membrane (Beney & Gervais, 2001; Bouix & Ghorbal, 2017; Denich *et al.*, 2003; Grogan & Cronan, 1997). Enfin, **la taille de la chaîne carbonée des acides gras** modifie également la fluidité membranaire. Plus les chaînes sont longues plus la bicouche est ordonnée et rigide (Bouix & Ghorbal, 2017; Denich *et al.*, 2003; Grogan & Cronan, 1997). A long terme, en plus de la modification des chaînes d'acides gras, un changement des têtes polaires est observable. Cela permet d'augmenter le point de fusion des lipides impliqués dans la formation de la membrane ainsi que sa charge de surface. Les cellules bactériennes peuvent également moduler le rapport entre les lipides de forme cylindrique formant la bicouche plate et ceux en forme de cônes courbant la bicouche. Par exemple, la diminution du nombre de phospholipides ayant une tête polaire de PE fluidifie la membrane, le PE étant un phospholipide clé dans la cohésion entre les phospholipides (Beney & Gervais, 2001).

Lors d'un changement rapide de l'environnement, les bactéries ne peuvent pas nécessairement modifier la composition lipidique de leurs membranes.

Les **protéines membranaires** ou cytoplasmiques (comme les protéines de stress thermique) en interagissant avec les lipides contribuent à la stabilité de la membrane. Ces protéines imitent le mouvement et la flexibilité des chaînes d'acides gras. Leur insertion dans la membrane augmente la température de transition de phase et ordonne les chaînes d'acides gras, ce qui limite la fluidification induite par le stress (Beney & Gervais, 2001; Fonseca *et al.*, 2019; Török *et al.*, 1997).

La modification de la courbure de la membrane et son état de fluidité sont également des signaux déclenchant la **régulation de l'expression de certains gènes** impliqués dans le maintien de la fluidité membranaire, par le biais d'une activation transcriptionnelle (Martínez *et al.*, 2020). Par exemple, chez certains organismes, il existe une boucle rétroactive entre l'état de fluidité de la membrane et l'expression de gènes impliqué dans la formation d'insaturation sur la chaîne d'acide gras (Bouix & Ghorbal, 2017). Chez les bactéries psychotrophes (croissance à basse température), une induction de la synthèse de molécules lipidiques s'intercalant dans la membrane, comme les caroténoïdes polaires, sont rapportées. En s'insérant dans la membrane, ces lipides permettent de moduler la fluidité membranaire (Chattopadhyay & Jagannadham, 2001). Pour d'autres bactéries, comme *Escherichia coli*, lorsque la membrane commence à se fluidifier des petits ARN (sRNA) vont détecter les changements environnementaux et induire la traduction du gène *rpoS*, codant pour le facteur σ_{38} . Cette augmentation du facteur σ_{38} va stimuler la transcription du gène *cfa*, codant pour la CFA synthase. Cette synthèse facilite la transformation des acides gras insaturés en conformation cis, qui sont relativement fluides, en acides gras cycliques (CFA) plus rigides. L'augmentation de la proportion de CFA va rigidifier la membrane, compensant ainsi la fluidification induite par l'environnement (Chang *et al.*, 2000). Enfin, l'induction de certaines protéines de stress (notamment des sHSPs) est induite par la fluidification de la membrane (Maitre *et al.*, 2012)

En complément aux réponses actives, l'ensemble des modifications physicochimiques de la membrane produites durant le stress induisent une **réponse passive**. Cette réponse, influencée par la réponse active, inclut le changement de phase de la membrane, l'oxydation des lipides ou la dénaturation des protéines membranaires ou cytoplasmiques (Fonseca *et al.*, 2019).

C. Partie 3 : Principaux mécanismes de résistance au stress chez *O. oeni*.

Malgré les conditions de culture difficiles dans le vin, *O. oeni* a su s'adapter pour devenir l'espèce dominante à la fin de la fermentation alcoolique dans la grande majorité des vins rouges (Davis *et al.*, 1985; Dicks *et al.*, 1995; Spano & Massa, 2006). Sa capacité à surmonter les stress a fait de cette espèce un modèle bactérien intéressant dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la réponse au stress, en témoigne la littérature importante sur ce sujet (Bartowsky, 2005; Grandvalet, 2017; Guzzo, 2011; Lorentzen & Lucas, 2019). Sur les 20 dernières années (2003-2023), 17,5% des articles publiés (sur les 502 articles référencés sur PubMed) sur *O. oeni* portaient également sur un mécanisme de réponse au stress.

En effet, à cause de l'absence de système de réparation des mésappariements de l'ADN (système MutSL), *O. oeni* est une bactérie présentant un taux de mutation important, contribuant certainement à l'adaptation rapide du genre *Oenococcus* au vin (Marcobal *et al.*, 2008). Elle a pu, au cours de son évolution, mettre place divers mécanismes de réponses aux stress, aussi bien au niveau de la cellule unique qu'au niveau de la population. Au niveau cellulaire, la régulation du pH intracellulaire (Salema *et al.*, 1996), le maintien de la force promotrice (Drici-Cachon *et al.*, 1996), la modification de la composition membranaire (Da Silveira *et al.*, 2003; Tourdot-Maréchal *et al.*, 2000) ou la synthèse de protéines de stress (Bartowsky, 2005; Bonomo *et al.*, 2018) ont notamment été observés. A l'échelle de la population, les cellules d'*O. oeni* sont capables de former des biofilms (Bastard *et al.*, 2016; Kubota *et al.*, 2008) ou de réaliser des transferts de gènes horizontaux (Marcobal *et al.*, 2006).

1. Stratégie de réponse au stress au niveau de la population

Collectivement les cellules peuvent contribuer à une réponse au stress globale, visant à favoriser la survie au niveau de la population. Parmi ces mécanismes, le transfert horizontal de gènes ou la formation de biofilm sont les plus décrits chez *O. oeni* (Marcobal *et al.*, 2006), néanmoins seule la notion de biofilm sera traitée dans ce paragraphe.

Un biofilm est défini comme une communauté de micro-organismes vivants, issus d'une ou plusieurs espèces microbiennes, adhérents à une surface et enrobés dans une matrice polymérique autoproduite (Tremblay *et al.*, 2014).

La matrice polymérique est constituée d'eau, de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, d'agents tensioactifs, de lipides, de glycolipides et d'ions en proportions variables selon les espèces bactériennes et les conditions de croissance (Mirghani *et al.*, 2022; Tremblay *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2019). La formation des biofilms est variable entre les espèces mais partage un certain nombre de caractéristiques communes. C'est un processus rapide, dynamique, complexe, où la communication entre les cellules (de type quorum sensing) est primordiale. Dans un premier temps, lorsque les cellules libres dans l'environnement (dites planctoniques) sont suffisamment proches d'une surface (biotique ou abiotique), elles s'y attachent de manière réversible (interactions de Van der Waals), puis de manière irréversible grâce à des interactions de nature hydrophile/hydrophobe. Une fois fixées, elles sont dites sessiles et colonisent l'espace pour former des micro-colonies (agrégats de cellules). Cette adhésion est permise grâce à différentes molécules et structures présentes sur les micro-organismes tels que les flagelles, les pili, la production de lipopolysaccharides, d'exopolysaccharides (EPS) ou de protéines adhésives (Mirghani *et al.*, 2022; O'Toole, 2003). Les cellules prolifèrent, s'accumulent et commencent à synthétiser des EPS qui structurent le biofilm dans l'espace. Elles produisent également l'ensemble des molécules utiles à la survie et au maintien de la communauté bactérienne (nutriments, molécules de signalisation, eADN). Enfin, les cellules du biofilm, en raison de facteurs intrinsèques ou extrinsèques, se détachent et se dispersent dans l'environnement. Les cellules détachées conservent leurs caractéristiques phénotypiques et ont la capacité d'adhérer à de nouvelles surfaces et former à nouveau un biofilm (Mirghani *et al.*, 2022; O'Toole, 2003; Tremblay *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2019) (Figure 13).

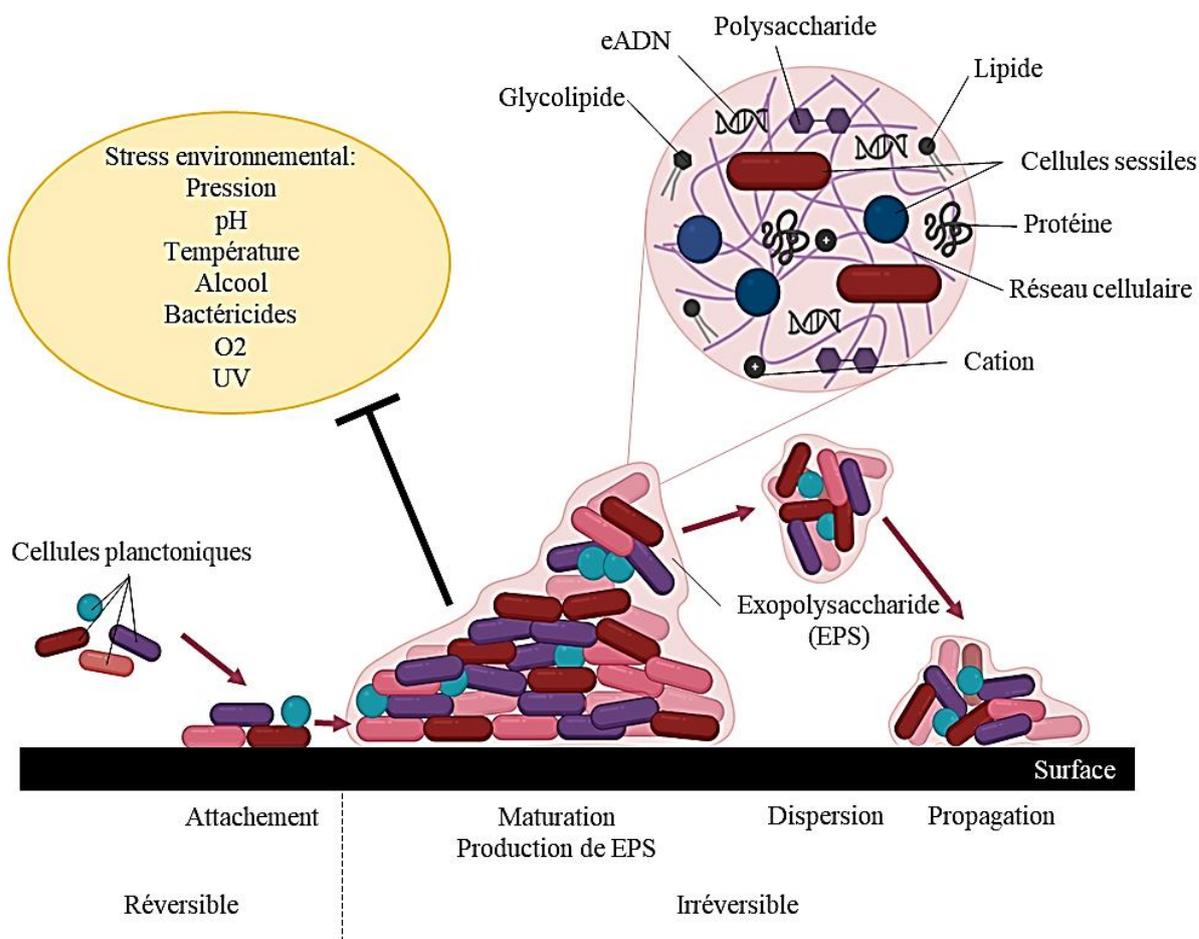


Figure 13 : Etapes de formation et de dispersion d'un biofilm bactérien, d'après (Yin *et al.*, 2019).

Grace aux réseaux formés entre les cellules et à la présence de la matrice polymérique, le mode de vie en biofilm permet l'adaptation et la survie des cellules lors de conditions environnementales défavorables (faible ressource en nutriments, température non optimale, forte acidité ou présence de produits bactéricides) (Landini, 2009; Mirghani *et al.*, 2022). Ces conditions stressantes (notamment retrouvées dans le vin) déclenchent la formation du biofilm. Par exemple, chez *E. coli*, une forte température ou osmolarité cause des dommages à l'ADN et mène à une accumulation de protéines mal repliées, qui vont induire une cascade d'évènements à l'origine de la formation de biofilm par les cellules. (Landini, 2009).

A l'instar d'autres bactéries lactiques (Kubota *et al.*, 2008), *O. oeni* peut former un biofilm pour résister aux conditions difficiles du vin (Bastard *et al.*, 2016). En effet, Bastard et collaborateur (2016) ont montré que les cellules sous forme de biofilm ou détachées de biofilm ont une résistance accrue au pH bas (3,2) et à l'éthanol (12%) (Bastard *et al.*, 2016).

Cette tolérance au stress est principalement dûe à la composition de la matrice polymérique. Toutefois, la nature du stress influence également la formation de biofilm, par exemple lors d'un stress oxydatif l'adhésion des cellules d'*O. oeni* à un support est favorisée (Bonomo *et al.*, 2018; Devi & Anu-Appaiah, 2018). De même, l'expression de gènes codant pour des protéines de stress et du quorum sensing induite par les conditions défavorables déclenchent la formation du biofilm (Yang *et al.*, 2018).

Il est également intéressant de noter que les cellules en biofilm de *O. oeni* conservent leur capacité individuelle à lutter contre le stress. Par exemple, l'expression de gènes codant pour des protéines de stress (*hsp18*, *clpLI* et *cfa*) est toujours induite par les stress acides et l'alcool sur les cellules du biofilm (Bastard *et al.*, 2016). La capacité de ces cellules à réaliser la FML est également conservée et améliorée, la FML étant elle-même un élément indispensables dans la résistance au stress chez *O. oeni* (Bastard *et al.*, 2016; Coelho *et al.*, 2019; Tofalo *et al.*, 2021).

2. Stratégie de réponse au stress au niveau cellulaire

Plusieurs mécanismes permettent également à *O. oeni* de résister aux conditions de stress au niveau cellulaire (Figure 14): telles que la génération d'une force proton motrice (Salema *et al.*, 1996), l'activation des H⁺-ATPase membranaires (Drici-Cachon *et al.*, 1996), la modification de la fluidité membranaire (Da Silveira *et al.*, 2003; Maitre *et al.*, 2014; Tourdot-Maréchal *et al.*, 2000) et la synthèse de protéines de stress (Beltramo *et al.*, 2004; Grandvalet, 2017; Guzzo *et al.*, 1997; Jobin *et al.*, 1997). Cette dernière classe de protéines fonctionne comme des chaperons moléculaires ou des protéases et participe aux processus de repliement ou de dégradation des protéines dénaturées dans la cellule (Camberg *et al.*, 2013).

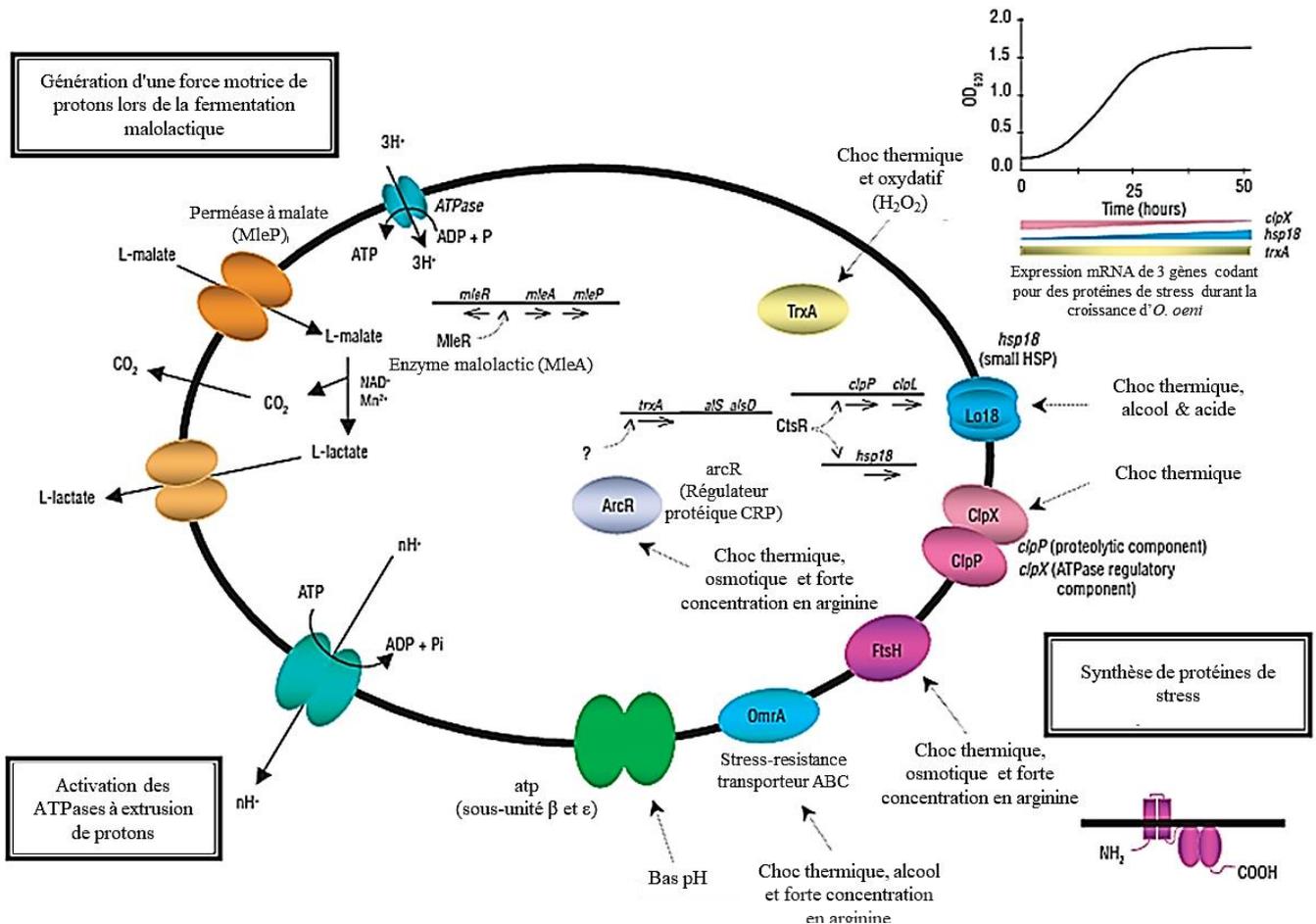


Figure 14 : Mécanismes de réponse aux stress de *Oenococcus oeni* (traduit de Bartowsky, 2005)

a. Génération de la force proton motrice grâce à la fermentation malolactique

La fermentation malolactique, et plus particulièrement le métabolisme du malate, est largement étudié pour son intérêt lors de la vinification. Néanmoins, elle est mise en œuvre par les bactéries dans le but de lutter contre l'acidité présente dans le vin. A très bas pH, sans la fermentation malolactique, les fonctions cellulaires d'*O. oeni* ne seraient plus correctement assurées. La production d'énergie (synthèse de l'ATP par phosphorylation) étant inhibée, l'ensemble des réactions métaboliques seraient fortement ralenties (Drici-Cachon *et al.*, 1996), ce qui conduirait à l'arrêt de la croissance de la bactérie.

Lorsque le pH du milieu est inférieur à 5,1 (pK_{a2} de l'acide malique) le malate sous forme déprotonée (MH^-) peut entrer dans la cellule via un uniport (MleP) (Bech-Terkilsen *et al.*, 2020; Poolman *et al.*, 1991).

Cependant, dès lors que le pH du milieu extérieur est inférieur à 3,5 (pK_{a1} de l'acide malique) l'acide malique (MH) pénètre dans la cellule par diffusion simple (Paramithiotis *et al.*, 2022). Il est intéressant de noter qu'entre ces deux valeurs de pH, la protonation (passage de la forme MH⁻ à MH) est progressive, permettant l'utilisation simultanée de ces deux modes de transport (Tourdot-Maréchal *et al.*, 1993). A l'intérieur de la cellule, le L-malate est décarboxylé en L-lactate et CO₂ par l'enzyme malolactique (MleA) en présence de NAD⁺, son cofacteur. Le lactate produit (sous forme LH⁻) est ensuite excrété dans le milieu extracellulaire grâce à un transporteur actif secondaire encore inconnu. Il peut également sortir de la cellule par diffusion passive sous forme LH, lorsque le pH est inférieur à 3,9. (Figure 3) (Paramithiotis *et al.*, 2022; Poolman *et al.*, 1991). La perte de protons engendrée lors de la décarboxylation du malate induit une différence de pH entre le milieu intracellulaire et extracellulaire, à l'origine d'un gradient de pH (Poolman *et al.*, 1991). En complément du gradient de pH, l'entrée de malate sous forme déprotonée induit un gradient de charge entre le milieu intracellulaire et extracellulaire. Ensemble, les gradients de pH et de charge, sont à l'origine de la force proton motrice qui influence l'entrée de protons au niveau de la F₁F₀ATPase (Poolman *et al.*, 1991; Wen-ying & Zhen-kui, 2013). Dans les faits, la force proton motrice produit un flux de protons de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. En traversant la sous unité F₀ de l'ATPase synthase, le proton entraîne la rotation (dans le sens des aiguilles d'une montre) de la tige de la tête F₁. Cette rotation fournit l'énergie suffisante pour synthétiser de l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate (Figure 15) (Bartowsky, 2005). Ce système F₁ F₀ ATPase, induit par la fermentation malolactique, est crucial dans la tolérance à l'acidité chez *O. oeni*. Par exemple, une mutation ou une inhibition (notamment en présence de sulfites) de cette ATPase entraîne une très forte sensibilité à l'acidité (Wen-ying & Zhen-kui, 2013). Par conséquent, la fermentation malolactique permet une meilleure tolérance à l'acidité grâce à (i) la consommation de protons lors de la décarboxylation, (ii) la régulation du pH interne, (iii) la génération d'une force proton motrice à l'origine de la synthèse d'énergie via la F₁F₀-ATPases (Bartowsky, 2005; Poolman *et al.*, 1991; Salema *et al.*, 1996; Wen-ying & Zhen-kui, 2013).

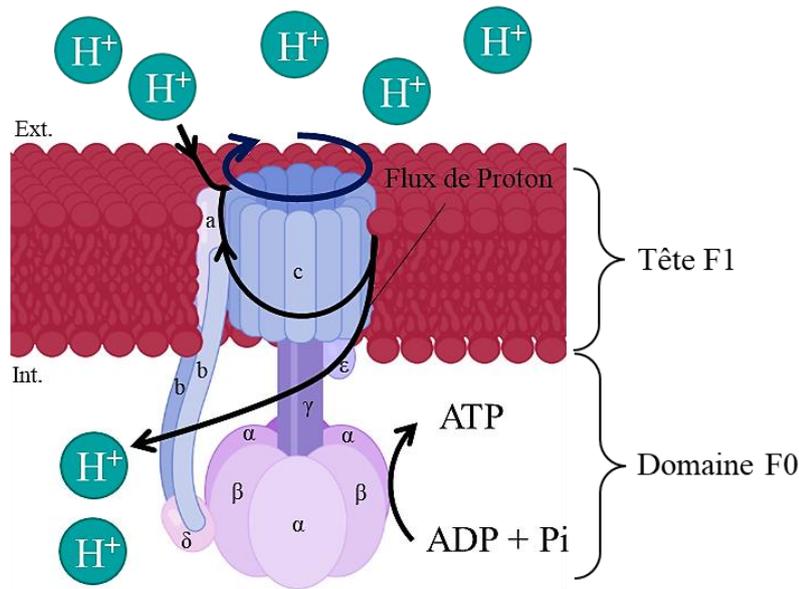


Figure 15 : Synthèse de l'ATP par la F1F0 ATPase, adaptée de (Watanabe, 2013). Réalisée avec Biorender.

b. Modification de la composition membranaire

Les modifications des propriétés physiques et de la fluidité de la membrane induites par l'environnement doivent être constamment régulées pour permettre la survie des cellules. Une perte du maintien de l'intégrité membranaire entraîne des conséquences dramatiques sur la physiologie de la cellule. Les échanges en solutés, entre le milieu extra et intracellulaire, n'étant plus assurés correctement, le flux de protons et la force proton motrice se dissipent. L'homéostasie du pH interne, la production d'énergie métabolique et la croissance des cellules ne sont donc plus correctement assurées (Booth, 2007; Contreras *et al.*, 2018; Grandvalet *et al.*, 2008; Wen-ying & Zhen-kui, 2013). Comme présenté dans le paragraphe II.B.3.b, l'intégrité membranaire des bactéries est préservée grâce à des adaptations au niveau des composants de la membrane. Dans le cas d'*O. oeni*, les principaux mécanismes mis en place sont (i) une augmentation du nombre d'acides gras saturés et cycliques, (ii) l'isomérisation des acides gras insaturés, (iii) la modification du ratio lipides/protéines et (iv) la synthèse de lipides polycycliques comme les hopanoïdes et les caroténoïdes (Bech-Terkilsen *et al.*, 2020; Da Silveira *et al.*, 2003; Grandvalet *et al.*, 2008; Wen-ying & Zhen-kui, 2013).

Afin d'illustrer ces mécanismes, prenons pour exemple les réponses adaptatives mises en place lors des stress acide et alcool qui sont les principales causes de dommages membranaires retrouvées chez les cellules dans le vin. Les groupements -OH présents dans les molécules d'éthanol ayant une forte affinité pour les molécules polaires entrent en compétition avec les molécules d'eau pour se lier de manière covalente au niveau des têtes polaires des phospholipides et de certains domaines des protéines membranaires. Ces interactions perturbent l'organisation et la structure de la membrane, ce qui impacte la perméabilité et la fluidité membranaire (Da Silveira *et al.*, 2003; Wen-ying & Zhen-kui, 2013). La baisse de pH causée par l'acidité du vin induit des modifications d'ordres physico-chimiques des composants membranaires, ce qui affecte également la perméabilité et la fluidité de la membrane (Angelova *et al.*, 2008).

En condition optimale de croissance, les acides gras majoritaires de la membrane de *O. oeni* sont l'acide myristique (C14 :0), l'acide stéarique (C18 :0) et l'acide oléique (C18 :1 n-9 cis). En présence de 8% d'éthanol, la composition en acides gras subit des modifications importantes. Bien que l'adaptation puisse être souche dépendante, de manière générale la proportion d'acides gras saturés augmente. Par exemple pour la souche ATCC-1163, une augmentation d'environ 50% des acides gras saturés est observée. Cela se traduit par la diminution de l'acide palmitoléique (C16 :1) et de l'acide oléique (C18 :1 n-9 cis) au profit de l'acide palmitique (C16 :0) (Grandvalet *et al.*, 2008; Maitre *et al.*, 2014). Une diminution de la taille des chaînes carbonées est également observée et se manifeste par une proportion plus importante d'acides palmitoléiques (C16 :1) que d'acides oléiques (18 :1). De même, une diminution de la proportion d'acides gras de taille moyenne est observée (Grandvalet *et al.*, 2008; To *et al.*, 2011). Enfin, on note une augmentation importante des acides gras cyclopropanes. La formation de ces acides gras est la principale réponse adaptative de *O. oeni* pour maintenir son intégrité membranaire dans le vin. La présence du cycle propane, issue du transfert d'un groupe méthylène de la S-adénosyl-1-méthione (coenzyme dans les réactions de transfert de groupes méthyles) à une double liaison d'acide gras insaturé par le biais de la Cfa synthase, permet d'augmenter le point de transition de phase de la membrane et de modifier la courbure de la bicouche lipidique (To *et al.*, 2011). L'augmentation des acides gras cyclopropanes se traduit par une augmentation de l'acide dihydrostérulique (cycC19 :0 n-9) et lactobacillique (cycC19 :0 n-7) respectivement convertis à partir de l'acide oléique (C18 :1 n-9) et vaccénique (C18 :1 n-7) (Grandvalet *et al.*, 2008; Maitre *et al.*, 2014; To *et al.*, 2011).

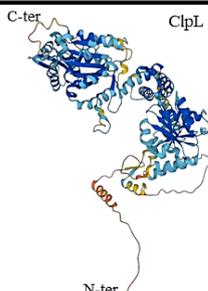
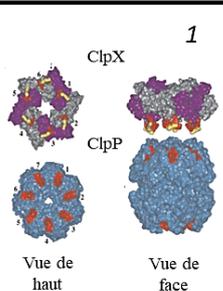
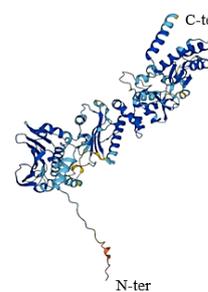
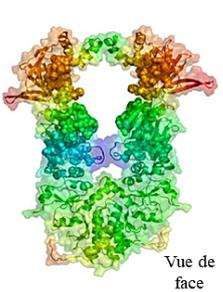
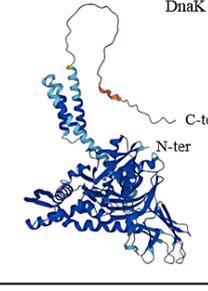
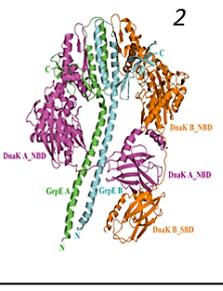
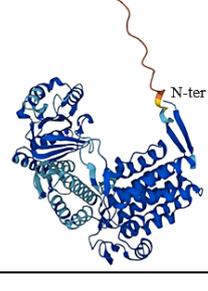
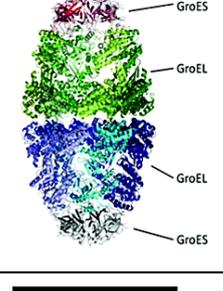
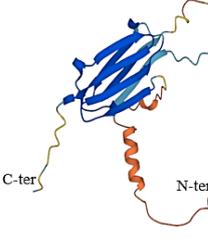
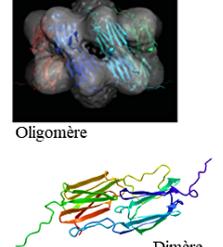
Des modifications de composition membranaire comparables sont également observées lorsque les cellules sont cultivées à pH 2,9. (Wen-ying & Zhen-kui, 2013).

c. Synthèse de protéines de stress

Les conditions stressantes du vin impactent également le métabolisme d'*O. oeni*. Afin de garantir sa survie, la régulation de l'expression de plusieurs gènes est modifiée. Par exemple, la protéine FtsH, induite après un choc thermique, osmotique ou en présence d'arginine, permet le contrôle de la qualité des protéines membranaires intégrales, en dégradant les protéines membranaires mal repliées et assemblées (Bartowsky, 2005). Néanmoins, ce sont les protéines de choc thermique (HSP) qui sont majoritairement produites pour réguler l'agrégation protéique (Bartowsky, 2005; Guzzo, 2011).

Les HSPs sont des protéines universelles retrouvées chez tous les organismes (Carra *et al.*, 2017, 2019; Ponomarenko *et al.*, 2013). Leur production est induite par différents types de stress tels que les stress thermiques, oxydatifs, osmotiques ou nutritifs (Ponomarenko *et al.*, 2013) afin qu'elles puissent exercer leur rôle de chaperon moléculaire. Ce rôle est défini comme une activité prévenant des interactions inappropriées entre des molécules conduisant à leur agrégation, en défaisant les liaisons impropres qui pourraient se produire (Ellis, 1990). En plus d'être présentes dans tous les domaines du vivant, ces protéines chaperons ont un fort degré d'homologie entre elles et sont trouvées de manière ubiquitaire dans les cellules. Elles peuvent être regroupées en six familles principales basées sur leur masse moléculaire, HSP 110, 90, 70, 47 et inférieure à 30 kDa (Marcion *et al.*, 2015; Ponomarenko *et al.*, 2013). A l'exception de HSP47, impliquée dans la formation de procollagène chez les eucaryotes, les cinq autres familles de HSPs sont présentes chez *O. oeni* et contrôlées par le répresseur CtsR (hormis HSP110) (Tableau 2) (Grandvalet *et al.*, 2005; Wen-ying & Zhen-kui, 2013). En l'absence de stress, la protéine CtsR interagit avec une séquence de sept nucléotides séparés par trois nucléotides [A/GGTCCAAA NAN A/GGTCAAAA] en amont des gènes codant pour les protéines de stress DnaK, GroEL ou Lo18, réprimant alors leur expression (Darsonval *et al.*, 2016; Derré *et al.*, 1999; Grandvalet *et al.*, 2005).

Tableau 2 : Principales caractéristiques des protéines de stress thermique synthétisées par la bactérie *O. oeni*. * Structure monomérique obtenue par la modélisation des structures primaires de ClpL, HtpG, DnaK, GroEL et Lo18 par AlphaFold2. Structure cristallographiée (1) du complexe Clp (Joshi *et al.*, 2004), (2) du complexe DnaK/GrpE (Wu *et al.*, 2012), (3) du complexe GroEL/GroES (W. Jaworek *et al.*, 2020) de *E. coli*. (4) Superposition d'un dimère modèle de Lo18 dans la structure oligomérique cristallographiée de HSP16.3 de *M. janashii*

Protéine	Structure* (monomère)	Structure (Oligomère)	Localisation	Fonction
HSP 100 Complexe Clp			Cytoplasmique	Activité chaperon et dégradation des protéines ATP-dépendant
HSP 90 HtpG			Cytoplasmique	Activité chaperon ATP-dépendant
Hsp70 Complexe DnaK/DnaJ/GrpE			Cytoplasmique	Activité chaperon ATP-dépendant
HSP 60 Complexe GroEL/GroES			Cytoplasmique et à la membrane lors de fluidification	Activité chaperon et lipochaperon ATP-dépendant
Small HSP Lo18			Cytoplasmique et à la membrane lors de fluidification	Activité chaperon et lipochaperon ATP-indépendant

Les protéines **HSP110**, aussi connues sous le nom de complexe **Clp-ATPases**, sont les protéines ATP-dépendantes les plus répandues chez les bactéries. Elles jouent un rôle dans le contrôle qualité des protéines et la dégradation sélective des protéines dénaturées à la suite de stress thermique. Elles sont généralement composées d'une sous-unité ATPasique régulatrice (ClpA/B/C/E/L/X/Y) qui interagit avec les protéines dénaturées et de deux sous-unités protéolytiques (ClpP/O) qui dégradent les protéines endommagées (Jenal, 1998) (Figure 16). En l'absence de sous unité protéolytique, les sous-unités régulatrices peuvent également agir comme des chaperons moléculaires (Beltramo *et al.*, 2004). Lors du stress, *O. oeni* synthétise quatre sous-unités, les protéines régulatrices ClpL, ClpC et ClpX et la protéine protéolytique ClpP. Ces protéines vont s'arranger en un empilement d'anneaux, ayant au centre une cavité protéasique formée des sous-unités ClpP (Darsonval, 2015). Il est intéressant de noter que la protéine ClpP conserve son activité protéolytique même en absence d'ATP. Dans ce cas, seules les protéines de petits poids moléculaires, pouvant facilement entrer dans la cavité protéasique sont lentement dégradées (Beltramo *et al.*, 2004; Molière & Turgay, 2014).

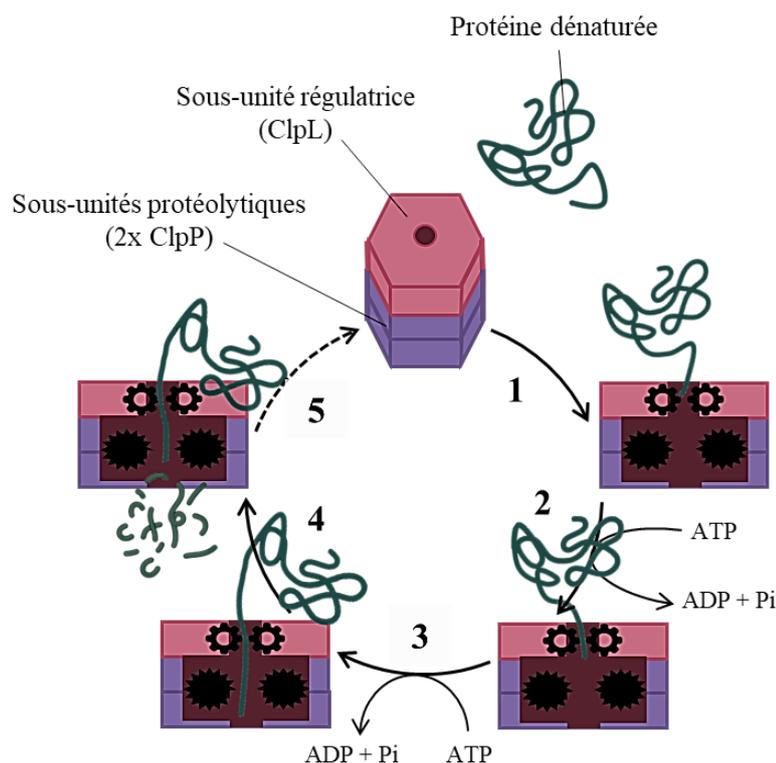


Figure 16 : Mécanisme d'action du complexe ClpL/P (HSP100). (1) Reconnaissance du substrat, (2) Dépliement de la protéine dénaturée par la sous-unité régulatrice, (3) Translocation de la protéine de la sous-unité régulatrice à la sous-unité protéolytique, (4) Dégradation de la protéine par la sous-unité protéolytique, (5) Libération du complexe ATP-ases et de la protéine, permettant un nouveau cycle, adaptée de (Sauer *et al.*, 2004).

Les protéines **HSP90**, ou protéine G à haute température (**HtpG**), sont des protéines impliquées dans divers processus cellulaires, dont le repliement et la réparation des protéines cytoplasmiques de manière ATP dépendante lorsqu'elles sont en interaction avec HSP70 (Camberg *et al.*, 2013; Garcie *et al.*, 2016; Picard, 2002).

Les protéines **HSP70**, connues sous le nom de **DnaK** chez les bactéries, sont des protéines chaperon ATP-dépendante. Elles permettent de stabiliser les protéines dénaturées par le stress en évitant les interactions avec des zones hydrophobes inappropriées, lorsqu'elles forment le complexe DnaK/DnaJ/GrpE, DnaJ et GrpE étant ses cochaperons (Schröder *et al.*, 1993) (Figure 17). La protéine DnaJ, possédant un domaine de liaison aux protéines dénaturées, se lie avec les régions mal repliées d'une protéine cellulaire. **DnaJ** est ensuite recrutée par la protéine DnaK. Lors de ce recrutement DnaK hydrolyse l'ATP présent sur le complexe DnaK, ce qui permet la liaison des protéines dénaturées avec son domaine C-terminal. La protéine dénaturée est ensuite transloquée et repliée au niveau d'un canal formé par deux hélices de DnaK. Dès que la protéine dénaturée a été correctement repliée, la protéine **GrpE** se lie à DnaK pour favoriser la régénération d'ATP et la libération de la protéine nouvellement repliée. Une fois que l'ATP est régénéré, la protéine DnaK peut à nouveau recruter la protéine DnaJ et entamer un nouveau cycle avec une nouvelle protéine dénaturée (Reissmann, 2023). Enfin, il est intéressant de noter que la protéine DnaK peut également coopérer avec les protéines HSP100 et HSP90 pour soutenir leurs activités chaperon (Camberg *et al.*, 2013).

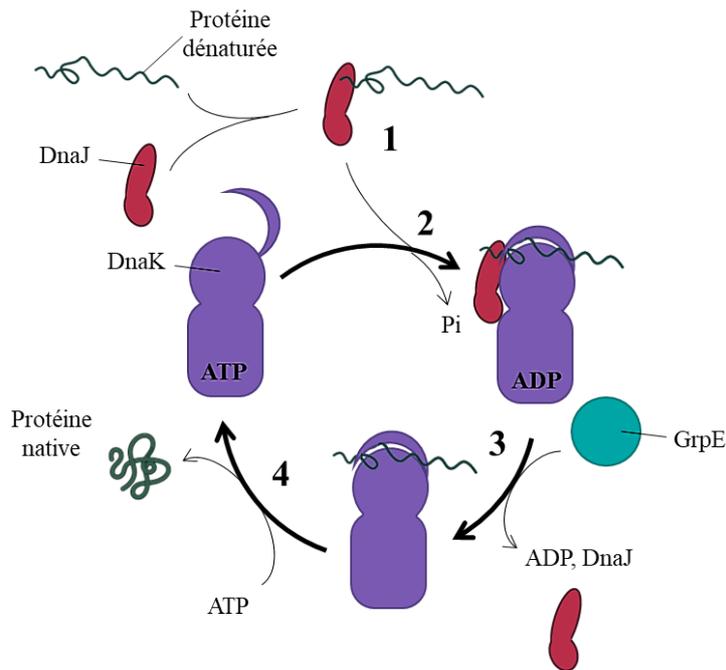


Figure 17 : Mécanisme d'action du système DnaJ-DnaK-GrpE. (1) Interaction entre DnaJ et la protéine dénaturée cible, (2) Interaction entre le complexe DnaJ/protéine et la protéine DnaK, à la suite de l'hydrolyse de l'ATP (3) Détachement de la protéine DnaJ par l'intermédiaire de la protéine GrpE, (4) Fixation de DnaK avec de l'ATP, permettant la libération de la protéine correctement repliée, reproduite à partir de Frydman (Frydman, 2001)

Les protéines **Hsp60**, aussi connues sous le nom de **GroEL** chez les bactéries, jouent également un rôle de chaperon moléculaire ATP dépendant en association avec la protéine **GroES** (Figure 18). La protéine GroEL adopte une structure oligomérique constituée de deux anneaux de sept sous-unités, formant un cylindre. La protéine GroES, plus petite, est essentielle au bon fonctionnement du complexe GroEL/GroES. Elle forme un capuchon au niveau des deux extrémités du cylindre formé par GroEL, favorisant l'interaction entre les protéines dénaturées et régulant leur entrée et leur sortie dans la cavité de GroEL. Dans les faits, les protéines dénaturées sont reconnues par la protéine GroEL et pénètrent dans la cavité du cylindre. La protéine GroES se fixe à GroEL, fermant ainsi la cavité. La protéine dénaturée présente dans la cavité se retrouve ainsi dans un environnement hydrophile indispensable à son correct repliement. Lors de l'association entre GroEL et GroES sept ATP sont hydrolysés, permettant le repliement de la protéine dénaturée. Une fois que la protéine est correctement repliée, GroES se détache de GroEL, libérant la protéine correctement repliée. (Bracher & Hartl, 2013; Hayer-Hartl *et al.*, 2016). Enfin, il a été montré chez *E. coli* que le complexe GroEL/GroES a également un rôle de lipochaperon moléculaire en stabilisation les membranes (Camberg *et al.*, 2013; Török *et al.*, 2001).

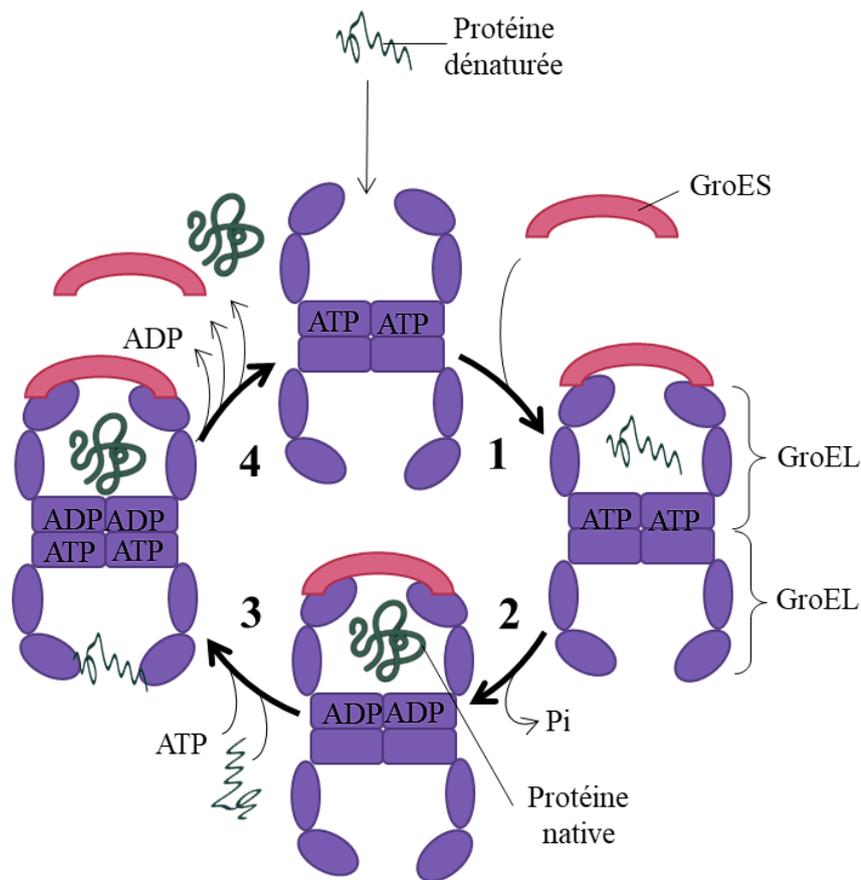


Figure 18 : Mécanisme d'action du complexe GroEL/GroES. (1) Internalisation de la protéine dénaturée dans la cavité d'une des sous unités de GroEL, suite à la fermeture de la cavité par la protéine GroES, (2) Restructuration de la protéine dénaturée, suite à l'hydrolyse de l'ATP, (3) Interaction de la protéine dénaturée avec la seconde sous unité de GroEL, (4) Libération de la protéine restructurée et de la protéine GroES. Le complexe GroEL est ensuite retourné à 180° pour effectuer un nouveau cycle, adaptée de Fei, Hayer Hart et Hart (Fei *et al.*, 2014; Hartl, 1996; Hayer-Hartl *et al.*, 2016).

Enfin, les **HSP de petit poids moléculaire** (entre 12 à 43 kDa), connues sous l'appellation de **small HSP (sHSP)**, sont présentes dans la quasi-totalité des organismes. Elles exercent un rôle de chaperon moléculaire ATP indépendante. En prenant en charge les protéines dénaturées, elles sont impliquées dans divers voies de signalisation et mécanismes de réponses au stress, tels que la formation de spores, de biofilm, la régulation du système immunitaire ou la régulation du cycle cellulaire (Henriques *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2011; Longo *et al.*, 2021; Yeh *et al.*, 1997). Elles peuvent pour certaines agir également au niveau de la membrane comme lipochaperon moléculaire (Bellanger & Weidmann, 2023; De Maio *et al.*, 2019; Glatz *et al.*, 2016; Guzzo *et al.*, 1997; Jobin *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2011; Nitta *et al.*, 2005; Obuchowski & Liberek, 2020; Rocchetti *et al.*, 2023; Török *et al.*, 2001).

O. oeni possède une unique sHSP, nommée **Lo18** (Coucheney, 2005; Guzzo *et al.*, 1997; Jobin *et al.*, 1997; Maitre *et al.*, 2012, 2014; Weidmann *et al.*, 2010, 2017). C'est une protéine de 16,938 kDa, codée par le gène *hsp18* et synthétisée après un choc thermique (supérieur à 42°C), acide (inférieur à pH 3) ou alcool (supérieur à 12%) et lors de la phase stationnaire de croissance (Jobin *et al.*, 1997). Lo18 est retrouvée sous forme de dimère au niveau de la membrane (Maitre *et al.*, 2014) ou de multimères dans le cytoplasme (Coucheney *et al.*, 2005, Jobin *et al.*, 1997) où elle exerce un rôle de lipochaperon et chaperon moléculaire respectivement (Coucheney *et al.*, 2005, Zapparoli *et al.*, 2014). L'ensemble des caractéristiques des sHSP et de Lo18 seront traitées en détail dans le paragraphe I.C.3 de ce manuscrit.

3. Zoom sur les sHSPs ; revue sur l'activité lipochaperon des sHSPs

Les sHSPs sont des protéines de stress présentes dans la quasi-totalité des organismes. Bien qu'elles présentent une grande hétérogénéité de séquence, la plupart des structures et des fonctions des sHSP sont similaires. L'évolution des sHSP à travers le temps, l'analyse de leurs structures et de leur fonction et plus particulièrement de leur fonction lipochaperon seront traitées dans ce manuscrit sous la forme d'une mini revue publiée en 2023 dans le journal *Cell Stress and Chaperones*.

Titre: Is the lipochaperon activity of sHsp a key to the stress response encoded in its primary sequence?

Auteurs : Tiffany Bellanger¹, Stéphanie Weidmann^{1*}.

¹ Procédés Alimentaires et Microbiologiques (PAM), AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, Laboratoire VALMiS-IUVV, Dijon, France.

* Correspondence: stephanie.desroche@u-bourgogne.fr

Keywords: Small heat shock protein · Lipochaperone activity · Stress response · Protein structure

Publié à Cell Stress and Chaperones (IF :3,82)

Abstract

Several strategies have been put in place by organisms to adapt to their environment. One of these strategies is the production of stress proteins such as sHSPs, which have been widely described over the last 30 years for their role as molecular chaperones. Some sHSPs have, in addition, the particularity to exert a lipochaperone role by interacting with membrane lipids to maintain an optimal membrane fluidity. However, the mechanisms involved in this sHSP-lipid interaction remain poorly understood and described rather sporadically in the literature. This review gathers the information concerning the structure and function of these proteins available in the literature in order to highlight the mechanism involved in this interaction. In addition, analysis of primary sequence data of sHSPs available in database shows that sHSPs can interact with lipids via certain amino acid residues present on some β sheets of these proteins. These residues could have a key role in the structure and/or oligomerization dynamics of sHSPs, which is certainly essential for interaction with membrane lipids and consequently for maintaining optimal cell membrane fluidity.

Introduction:

A weak modification of the internal cell environment in response to external stress conditions (e.g., heat, nutritional, oxidative, alcohol stresses) is enough to lead to protein misfolding and a subsequent loss of biological function (Booth 1999; Berger *et al.*, 1996; Lim *et al.*, 2000). To maintain protein homeostasis, several stress mechanisms are involved in cells, leading to the production of a group of stress proteins called heat shock proteins (HSP). These proteins act as molecular chaperones which bind and sequester denatured proteins (Ellis *et al.*, 1989; Ellis *et al.*, 1990; Hartl *et al.*, 1996; Beissinger *et al.*, 1998; Tyedmers *et al.*, 2010). Some of them are able to refold the denatured protein in an ATP-dependent manner. HSP are universal stress proteins found in almost all organisms including eukaryotes (plants, metazoan, yeast), bacteria, Archae and viruses (Wirth *et al.*, 2003; Ponomarenko *et al.*, 2013; Cara *et al.*, 2017). Besides being present in all kingdoms (Narberhaus, 2002; Horwitz *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2005; Haslbeck *et al.*, 2005), these proteins have a high degree of homology to each other and are found ubiquitously in cells. They can be grouped into six main families according to their molecular mass, HSP 110/100, 90, 70, 60, 47 and less than 35 kDa (Wirth *et al.*, 2003; Bukau *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2007; Marcion *et al.*, 2014).

However, each family has high specificity concerning notably its mechanisms of action, intracellular localization, substrate specificity and ATP requirement.

The stress proteins under 35 kDa, called small heat shock protein (sHSP), act mainly as holding chaperones (ATP-independent holdase pathways) (Baneyx *et al.*, 2004). For some of them, a lipochaperon activity, i.e. cell membrane protection activity, is described from the outset of stress conditions. However, this lipochaperon activity is still poorly described and understood (Mogk *et al.*, 2019). It is found in very different model organisms that diverged quite early in the evolution of sHsp. It is quite possible that this role is more common than currently described. Although highly heterogeneous in their primary sequence, the secondary structures and activities are well-conserved among sHSPs (Jong *et al.*, 1998; Poulain *et al.*, 2010). Thus, the question is Is it possible to predict the potential molecular lipochaperon role of an sHsp on the basis of its primary sequence. Indeed, bioinformatics work on the primary sequences of 50 sHSPs has shown that certain protein domains are better conserved in sHSPs known for their role as molecular lipochaperons.

I) sHSP, a key stress fighter

a) sHsp through the ages

Since the discovery of the first sHSP by Craig and Ingola in 1982 (Ingola and Craig, 1982), the number of identified sHSPs has exploded. These proteins are present in every kingdom of life in which they act primarily as molecular chaperons to control and protect the quality of the protein network (Obuchowsk *et al.*, 2020). The number of sHSP per organism may vary; however, higher organisms (plants, human, animals ...) generally have a large number of sHSP (Haslbeck *et al.*, 2005). For example, there are nineteen sHSP in the plant *Arabidopsis thaliana* (Siddique *et al.*, 2008), one in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* (Guzzo *et al.* 1997). Although sHsp are widespread, small genomes such as *Helicobacter pylori* 26695 (1.66 Mb), *Mycoplasma pneumoniae* M129 (0.81 Mb) or *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* II1403 (2.37 Mb) are devoid of this type of protein (Narberhaus, 2002; Han *et al.*, 2008).

All sHsps derive from a common ancestor of the vertebrate lens protein (Mörner 1894; Ingolia and Craig, 1982) and now form a superfamily of small heat stress proteins of about 20 kDa (Horwitz *et al.*, 1993; Jakob *et al.*, 1993; de Jong *et al.*, 1993), characterized by the presence of a central domain named the α -crystallin domain (Boelens *et al.*, 2014 ; Carra *et al.*, 2017 ; Casper *et al.*, 1995 ; Jong *et al.*, 1998). Although the α -crystallin domain has been under significant evolutionary pressure, certain amino acids are still conserved among sHsp (De Maio *et al.*, 2019). The analysis of the sHSP evolutionary tree by Vogel and colleagues showed that terminal domain specialization occurred later, several times and concomitantly during evolution, in parallel with and independently of the α -crystalline domain (Vogel *et al.*, 2004; Kriehuber *et al.*, 2010). This is reflected in rather high sequence heterogeneity between sHSPs (Mogk *et al.*, 2019) that may be linked to the acquirement of multiple activities (De Jong *et al.*, 1993; Carra *et al.*, 2017; Obuchowski *et al.*, 2020). Understanding this common ancestor and the evolutionary process are important to predict this diversity of activities (Waters *et al.*, 1996; Kappe *et al.*, 2002).

The first trace of sHSP in the history is probably from cyanobacteria such as *Synechococcus* sp. and *Prochlorococcus* sp. that lived on Earth two billion years ago (Fu *et al.*, 2006). Indeed, sHSPs, which share some structural characteristics of the bacterial class A sHSP (corresponding to proteins with characteristics similar to those of *Escherichia coli* IbpA and IbpB) (Münchbach *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2006) have been identified in cyanophages (Fu *et al.*, 2006) able to infect them (Schopf *et al.*, 2006; Maaroufi *et al.*, 2013). Animal sHSPs therefore evolved from bacterial class A sHSP via the lateral transfer gene either by the endosymbiotic mitochondria or by bacterial pathogen infections. Using the same mechanism of evolution, plant sHSP might have been evolved from plant bacterial sHSPs of class B, like those found in *Rhizobia* (Fu *et al.*, 2006). Because sHSPs are the least conserved family of chaperone proteins, the hypothesis of very early evolutionary divergence is reasonable (Kappe *et al.*, 2002). However, according to the literature, 2 hypotheses have been put forward to explain the evolution of sHsp: one proposes divergence from a common ancestor and the other convergence from several ancestral genes (Fu *et al.*, 2006).

b) Structure of sHsp

Contrary to sequence homology, the structure of sHSP is well conserved in all organisms (Poulain *et al.*, 2010; Klevit *et al.*, 2020). Lots of sHSP adopt an IgG-type sandwich structure and are organized in large spherical oligomeric assemblies ranging 10 nm to 18 nm in diameter (Haslbeck *et al.*, 2005; Augusteyn *et al.*, 2004). Nevertheless others may adopt smaller forms (monomers or dimers) (Weeks *et al.*, 2014; Boelens *et al.*, 2020). Each protein monomer has a low molecular weight (12-35 kDa) (Ingolia and Craig 1982; Kim *et al.*, 1998; van Montfort *et al.*, 2001; Kriehuber *et al.*, 2010) and is mainly composed of β -strands (60 to 70 percent). Indeed, only few or no α -helices are present (Augusteyn *et al.*, 2004). All sHSPs are composed of three domains, the two less conserved termini domains and the well-preserved α -crystallin domain (ACD) (van Montfort *et al.* 2001; Kriehuber *et al.*, 2010; Junprung *et al.*, 2021; Klevit *et al.*, 2020). The structure of these three regions plays an important role in sHSP oligomerization and activities (Mainz *et al.*, 2015; Carra *et al.*, 2017; van Montfort *et al.*, 2001).

i) α -crystallin domain

The term α -crystallin refers to the different polydisperse ensembles of homo- and hetero-oligomeric species able to act as protein quality controllers (Haslbeck *et al.*, 2016; de Jong *et al.*, 1998; Narberhaus *et al.*, 2002). This domain is composed of more or less 90 amino acid residues and is crucial for the oligomerization of sHSP and consequently their activities (Augusteyn, 2004; Bozaykut *et al.*, 2014; MacRae, 2000; Sun *et al.*, 2002).

The structure of the ACD can be split into two types of monomer (Figure 19). The "bacterial" structure where the β 5 sheet is connected to β 7 by a long loop containing a short β 6 strand (Kim *et al.*, 1998). The "metazoan" structure presents the same type of organization, except that the β 6 and β 7 strands are fused (Delbecq *et al.*, 2013). In both structures the ACD is composed of seven or eight anti-parallel β -strands that form a β -sandwich (Tikhomirova *et al.*, 2017): one with β 4, β 5, β 6/7 strands and the second with β 2, β 3, β 8 and β 9 strands (Kim *et al.*, 1998; Haslbeck *et al.*, 2005; Kriehuber *et al.* 2010; Poulain *et al.*, 2010; Basha *et al.*, 2012).

This domain contains a low amount of polar and aromatic residues and is enriched in charged residues such as glutamic acid, lysine, aspartic acid, arginine (Kriehuber *et al.*, 2010).

However, it is noteworthy that a highly conserved amino-acid sequence GVLTL, located in the α -crystallin domain (between the β 8 and β 9 sheet), is the signature of sHsp (Lentze *et al.*, 2004a and b; Sun *et al.*, 2005).

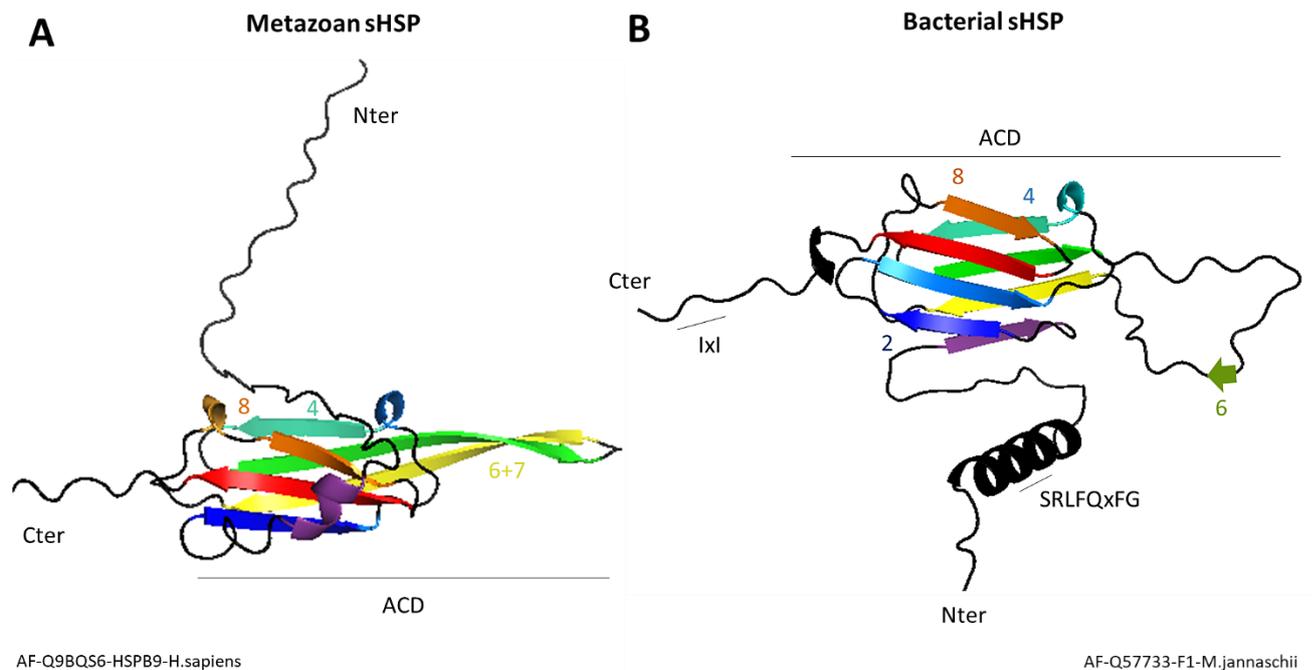


Figure 19 : Predicted structure of model (A) metazoan shsp (alphafold2 HSPB9 of *H. sapiens*) and (B) bacterial sHSP (alphafold2 sHSP of *M. jannaschii*). The numbers correspond to the sheets allowing interactions between the sHsp. The amino acid sequences SRLFQxFG and IXI correspond to highly conserved sequences in the N- and C-terminal domain in bacteria.

ii) Termini domain

Contrary to the ACD, the N-ter domain is variable in length and amino acid compositions (Chen *et al.*, 2010; Lelj-Garolla and Mauk, 2012), with 90 residues on average from 40 in bacteria to 100 in animals (Kriehuber *et al.*, 2010). In all kingdoms of life, the N-ter domains are enriched in proline and aromatic residues (Kim *et al.*, 1998; van Monfort *et al.*, 2001). Although they have low sequence identity, some motifs such as SRLFQxFG are highly conserved (Tikhomirova *et al.*, 2017; Shatov *et al.* 2018).

The N-ter domain, composed of α -helices, could interact with the hydrophobic groove formed by the association of the $\beta 2$ and $\beta 7$ sheets of each monomer within a dimer. This groove creates an opening in which the N-ter domain can engage to stabilise the dimer. This conformation is then said to be open because it facilitates the interaction of the sHsp with its substrate (Sudnitsyna *et al.*, 2012; Tikhomirova *et al.*, 2017, Boelens *et al.*, 2020).

The C-ter domain is a short domain composed of approximately 20 amino acids enriched in proline, polar and negatively charged residues. Like the N-ter domain, its primary sequence is highly variable. Nevertheless, it contains the highly conserved I/L-X-I/L motif which acts as an “anchor” at the ACD and thus participates in oligomer formation (Saji *et al.*, 2008; Poulain *et al.*, 2010; Sudnitsyna *et al.*, 2012; Delbecq *et al.*, 2013; Hilton *et al.*, 2012 and 2013).

While these two domains have considerable heterogeneity, they participate in stabilizing the oligomers and opening the accessibility of the oligomer to their clients (Carra *et al.*, 2017), a key factor for sHSP activities.

c) Oligomerization of sHsp

As soon as they are produced, monomers are organized into dimers which are therefore the basic building block and the first level of the structural order (Delbecq *et al.*, 2013). Common oligomerization mechanisms have been described between the sHps of different organisms, but due to the difference in structure between the monomers there are two types of dimeric structure. First, there is an interaction between the $\beta 6$ on one monomer with the $\beta 2$ of the second monomer (monomers from bacterial sHsp), which results in the so-called “bacterial” dimer (Figure 20 A). Second, the interaction occurs between the $\beta 6$ and $\beta 7$ strands of two different metazoan sHsp monomers to produce the "metazoan" type dimer (van Montfort *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2005; Delbecq *et al.*, 2013 ; Hilton *et al.*, 2013). Then sHSPs dimers can interact to form a higher oligomeric structure absolutely necessary to act as chaperon molecules. For most of sHsp, the palindromic I/V-x-I/V motif in the C-ter domain on the first dimer interacts with the patches of the hydrophobic groove formed by $\beta 4$ and $\beta 8$ on one edge of the ACD of an adjacent dimer (Jong *et al.*, 1993; van Montfort *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2005; Basha *et al.*, 2012; Santhanagopalan *et al.*, 2015; Mainz *et al.*, 2015; Tikhomirova *et al.*, 2017; Mogk *et al.*, 2019) (Figure 20 B). Due to its palindromic nature, the C-ter domain can connect to the adjacent dimer along two different axes (Studer *et al.*, 2002; Baldwin *et al.*, 2011; Boelens *et al.*, 2020).

This ability to fix the dimer in two different positions leads to the variety of structures observed during the assembly of oligomers that play an important role in their activities (Dubin *et al.*, 1989; Delbecq *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2016). The dimer assemblies will then interact with each other to form disks via the interaction between the still free C-ter domain and the $\beta 9$ strand located at the end of the ACD domain, thus forming large oligomers (van Monfort et al 2001) (Figure 20 C). However, for many mammalian sHsp formation of large oligomers may be different, depending on N-terminal domain (Delbecq *et al.*, 2015).

These sHsp are linked to the quality control of cellular proteins via the considerable dynamic dissociation and reassociation of oligomers around their substrates. The speed of these associations could be one of the main factors influencing chaperon activity (Fu *et al.*, 2006 and 2012; Tikhomirova *et al.*, 2017).

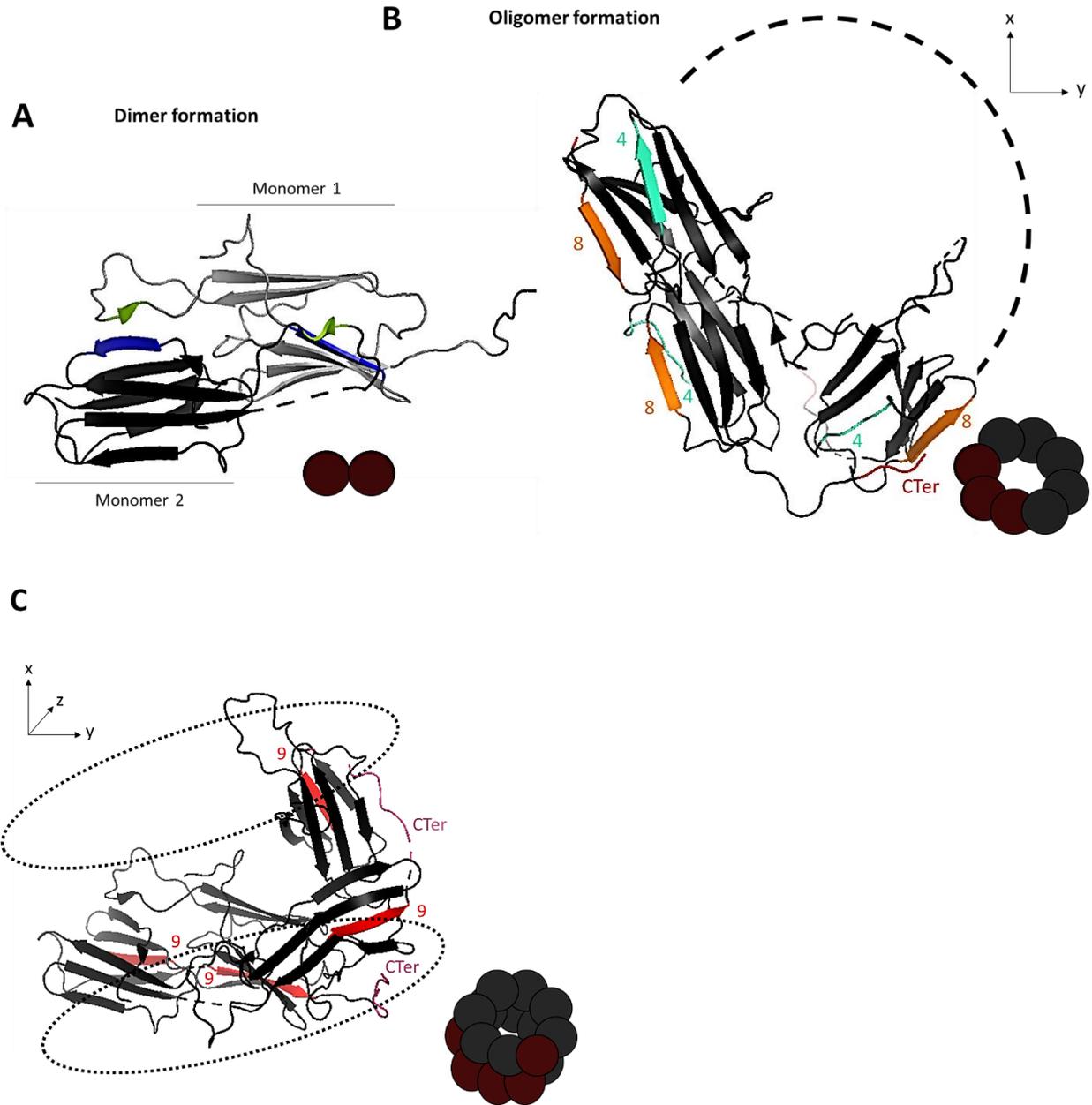


Figure 20 : Oligomerization process of sHsp using the example of *M. marinium* sHsp (pdb 5ZUL) (Bhandaru *et al.*, 2019). (A) Dimerization: interaction between the β_6 strand (green) of a monomer with the β_2 strand of the adjacent monomer (blue). (B) Oligomerization: interaction between the C-ter domain of a dimer (red) with the hydrophobic groove formed by the β_4 (turquoise) and β_8 (orange) strands of an adjacent dimer. (C) Large oligomer formation: interaction between the free C-ter domain (pink) of the oligomer with the β_9 (red) strand on another oligomer.

d) sHsp, actors of stress response with multiple activities

The proper folding of proteins is essential for life (Klaips *et al.* 2018), but unfortunately stress conditions dramatically increase their level of unfolding (Tyedmers *et al.* 2010). Indeed, the modification of environmental conditions (i.e. acidification) may modify the physicochemical properties of amino-acids, changing their interaction and consequently the final organization of the proteins. As the biological function of a protein is strongly linked to its tertiary structure, this denaturation will induce the loss of its function. This loss of functionality also induces modifications to the whole cellular and replicative metabolism (Berger *et al.*, 1996; Lim *et al.*, 2000). To survive, organisms have succeeded in adapting to their environment by developing various strategies for maintaining proteins. One of these strategies is the production of molecular chaperons such as sHsps (Jakob *et al.*, 1993; Boyle *et al.*, 1994; Singh *et al.* 1995; Wang *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1996; Guzzo *et al.*, 1997). Since the beginning of the 1990s several studies have suggested the molecular chaperone roles played by eukaryotic and bacterial sHSP. They constitute the first line of stress defense of the protein quality control (PQC) system (Bukau *et al.* 2006; Chen *et al.* 2011; Haslbeck *et al.*, 2015; Haslbeck *et al.*, 2019; Mogk *et al.*, 2019; Obuchowski *et al.*, 2020). sHSPs confer resistance to several kinds of stress such as heat, cold, salinity, ethanol, acid and chemicals (Carra *et al.*, 2017; Waters and Vierling *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2021; Tian *et al.*, 2022). sHSPs sequester denatured proteins in an ATP-independent manner (Jakob *et al.*, 1993; Rodriguez *et al.*, 2022) and thus could be considered more as "sequestrases" than "holdases", the term by which they are usually known (Haslbeck *et al.*, 2015; Haslbeck *et al.*, 2019; Mogk *et al.*, 2019; Reinle *et al.*, 2021). To refold the misfolded protein, oligomeric sHSPs must collaborate with the HSP70/100 complex (Veigner *et al.*, 1998). The chaperone Hsp70 binds to the denatured sHsp-protein assemblies to displace the sHSPs. This binding allows the recruitment of Hsp100 to extract and refold these proteins properly (Żwirowski *et al.* 2017). The same mechanisms have been observed both on eukaryotes such as *Saccharomyces cerevisiae* (Glover *et al.*, 1998; Cashikar *et al.*, 2005), and on bacteria like *E. coli* (Mogk *et al.*, 2003) and Archae such as *Synechocystis* (Giese *et al.*, 2005).

In addition to their role of molecular chaperone, the literature suggests a growing number of roles fulfilled by sHSPs. They have been described in some microorganisms as having an impact on virulence (Obuchowski *et al.*, 2020), cyst and spore formation (Henriques *et al.*, 1997; Cocotl-Yañez *et al.* 2014; Jee *et al.*, 2018), dormancy (Yuan *et al.*, 1996. Cunningham *et al.*, 1998), cell cycle regulation (Kim *et al.*, 2020), immune system modulation (Longo *et al.*, 2021) and biofilm formation (Yeh *et al.*, 1997; Zara *et al.*, 2002; Diaz *et al.*, 2006; Kuczynska-Wisnik *et al.*, 2010; Pidot *et al.*, 2018). Moreover, another role has been attributed to certain sHSP corresponding to the capacity of maintaining cell membrane integrity. This new activity has given rise to the concept of sHSPs as lipochaperones (Maitre *et al.* 2014) and will be described more precisely in the next chapter.

II) Zoom on sHSP lipochaperon activity.

The maintenance of the optimal state of fluidity of the cellular membrane is crucial to withstand stressful conditions. Organisms cannot synthesize the lipid bilayer *de novo* but can maintain a continuous process of lipid production and modification (Obuchowski *et al.*, 2020). However, these two processes take time and are not sufficient at the beginning of stress to limit changes in the fluidity and/or structure of the microdomain. These changes may act as a sensor perturbation for signal transduction, leading to the activation of sHSP genes (Glatz *et al.*, 2016, Vigh *et al.*, 2007). In addition to their common molecular chaperone activity, some sHsp have the particularity of performing a lipochaperon role by interacting with membrane lipids to maintain optimal membrane fluidity (Maitre *et al.*, 2012). This second activity seems to be temporally favoured over the chaperone activity, suggesting the importance for a cell to prioritise the regulation of its membrane fluidity following an environmental perturbation. This has been demonstrated for the human sHsp HSPB1 and HSPB5 and Lo18 from *O. oeni*. (De Maio *et al.*, 2019, Maitre *et al.*, 2014). Currently, little is known about this subject, and the few sHSPs described are present in model organisms representative of all kingdoms of life. However, a thorough study of all sHsps could demonstrate that lipochaperon activity may be a common trait of sHSP. Although they are known to interact with lipids (Table 3) (Kim *et al.*, 2011, Coucheney *et al.*, 2005, Balogi *et al.*, 2005), the mechanism of interaction remains poorly understood.

Certain sHsps have been described as having interactions with different membranes.

Immunolabeling techniques have made it possible to observe the interaction between sHSP 17.8 of *Arabidopsis thaliana* with the chloroplast membrane (Kim *et al.*, 2011), human HSPB1 and HPB5 with the mitochondrial membrane system and lipid rafts (De Maio *et al.*, 2021), HSPA from *Synechococcus* sp. with the thylakoid membrane (Nitta *et al.*, 2005; Obuchowski *et al.* 2020), and HSP16.3 from *Mycobacterium tuberculosis* with positively charged lipid bilayers of *M. tuberculosis* (Sun *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Wilhelmy's method showed that the interaction between the two sHSPs of *Schizosaccharomyces pombe*, HSP15.8 and HSP16, and different isolated lipids extracted from its membrane was sHsp-dose-dependent (Glatz *et al.*, 2016).

Lipo-chaperone activity, i.e. interaction with the membrane and then the regulation of membrane fluidity, was observed *in vivo* and *in vitro* by fluorescence anisotropy measurements (reflecting the fluidity state of lipid bilayers) on Lo18 of *O. oeni* (Coucheney *et al.*, 2005; Maitre *et al.*, 2012 and 2014; Weidmann *et al.*, 2010 and 2017) and sHSP 18.55 from *Lactiplantibacillus plantarum* interacting with the charged membrane after ethanol stress and severe heat stress (>48°C) (Capozzi *et al.*, 2011, 2012). Differential scanning calorimetry showed that sHSP17 from *Synechocystis* sp. can increase the physical order of the membrane to stabilize lipid membranes (Tsvetkova *et al.*, 2002; De Maio and Hightower 2021) in response to heat stress (Balogi *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2005). Finally, electrolyte leakage analysis was performed to measure cell membrane stability at elevated temperature on sHSP17.7 of *Daucus carota* (Ahn and Zimmerman, 2006).

Although the interaction mechanism is certainly lipid/sHSP dependent, other characteristics are also fundamental for it to occur (Figure 21):

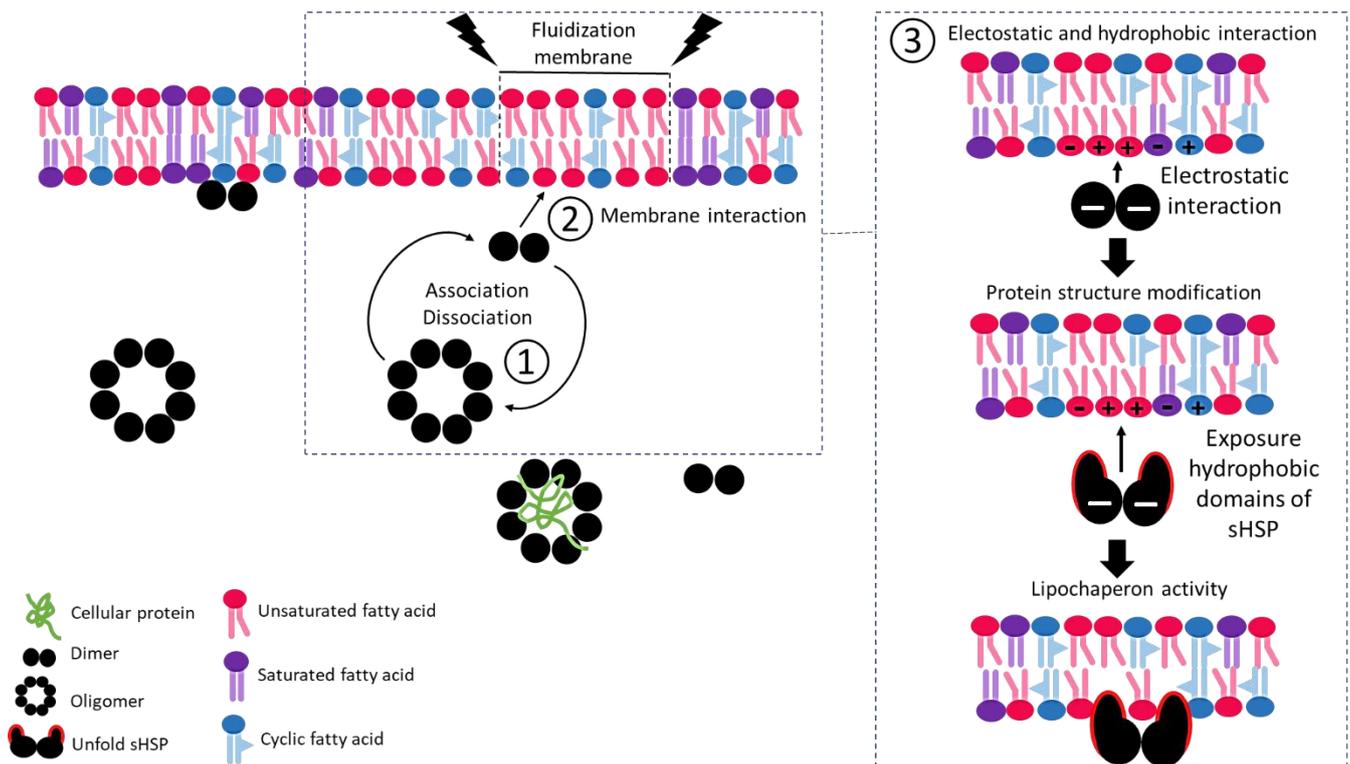


Figure 21 : Mechanism of interaction described between sHSP and the membrane. (1) Dissociation of the sHSP oligomer near the membrane allows lipid-protein interaction. (2) Interaction with the polar head of phospholipids according to their structure and state of fluidization (Tsvetkova et al., 2002; Maitre et al., 2012) (3) Electrostatic force, occurring during the disassembly process can attract the protein to the membrane and enhance hydrophobic force. This electrostatic force may expose hydrophobic domains of sHSP leading to protein structure modification (Zhang et al., 2005) which can then bind to the membrane (Chen et al., 2003, Tsvetkova et al., 2002).

① Association Dissociation

The dissociation of the sHSP oligomer is a prerequisite for lipid binding. The dynamics of oligomerization (association-dissociation) seems to be very important for all the sHSPs described above. Indeed, the loss of this equilibrium between dissociation and association leads to the inability of sHSPs to interact with the membrane (Balogi et al., 2008 ; Chen et al., 2003 ; Maitre et al., 2014 ; Zeng et al., 2015). Balogi and colleagues suggest that the dissociation of the oligomer into the dimeric structural unit near the membrane will allow their uptake by the membrane (Balogi et al., 2008), certainly due to the exposure of certain protein domains initially hidden in the oligomer (Zeng et al., 2015). It is important to note that the dissociation of oligomers appears to occur, in vitro, in a temperature range of 40°C to 50°C. For example, this dissociation occurs at 43°C for HSP26 from *S. cerevisiae*, and 40°C for sHSP 16.9 from wheat (Chen et al., 2003). This temperature range is similar to that of membrane fluidization.

② Specificity of sHsp-membrane interaction

The reversible interaction between sHSPs and membrane lipids is very specific and depends, on the one hand, on the sHSP, and on the other hand on the fluidity state of the membrane due to the degree of unsaturation of the fatty acids and the nature of the polar heads (Balogi *et al.*, 2008). These interactions prevent the formation of hyperfluidic states by regulating the lipid polymorphism of the membrane when its phospholipids are disordered (Glatz *et al.*, 2016; Tsvetkova *et al.*, 2002; Coucheney *et al.*, 2005). Phospholipid composition seems to be a key determinant of sHSP-membrane interaction. Indeed, the lipid bilayer is not just a hydrophobic wall, but a highly dynamic structure with a natural movement of phospholipids, making the membrane a very fluid environment (De Maio *et al.*, 2019). For example, Lo18 seems to interact better with a mix of saturated, unsaturated, and cyclic fatty acid than a highly rigid membrane with a high content of saturated fatty acids (Maitre *et al.*, 2012 and 2014). HSP15.8 from *S. pombe* has a higher affinity for monolayers (prepared in the Langmuir balance system) but interacts in an equivalent manner for all the major phospholipid groups such as phosphatidylinositol (PI), phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylglycerol (PG). In contrast, the second sHsp of *S. pombe*, HSP16, is more specific since it has a greater affinity for PG but less so for PI (Glatz *et al.*, 2016). Indeed, the disruption of the hydrogen bonds around the phosphate of the polar head would make it more accessible and it could then be the binding site between sHSP and lipids (Tsvetkova *et al.*, 2002). For instance, infrared spectroscopy performed on HSP16.3 of *M. tuberculosis* indicates that interaction is mediated via the head group of phospholipids and the hydrophobic part of the protein (Chen *et al.*, 2003), as was also demonstrated for Lo18 of *O. oeni* by measuring the anisotropy fluorescence of liposomes (Maitre *et al.*, 2012).

③ Electrostatic and hydrophobic interactions:

Electrostatic force is an important element in these interactions which may occur during the disassembly process. All the sHSPs described display a negative charge in neutral buffer solution and mainly interact with positively charged membranes (Capozzi *et al.*, 2011 and 2012, Glatz *et al.*, 2016, Sun *et al.*, 2005). However, there are also hydrophobic interactions between sHsps and the lipid bilayer that should not be neglected. Indeed, electrostatic interactions generate a slight conformational change in sHsp, exposing hydrophobic zones that interact with the membranes (Chen *et al.*, 2003, Tsvetkova *et al.*, 2002).

Thus, the structure of the protein in membrane stabilization is important. For instance, the flexibility and dynamism of *M. tuberculosis* HSP16.3 increases in the presence of *Mycobacterium* membrane lipids (Zhang *et al.*, 2005).

III) Analysis of primary structure: the beginning of understanding

Although the primary sequence of sHSP is poorly conserved, the protein structure (Poulain *et al.*, 2010) and the primordial activities of these proteins are rather homogeneous (Jong *et al.*, 1998). One explanation concerns certain motifs that remain highly conserved between sHSPs (Jong *et al.*, 1998), such as those of the α -crystallin domain allowing the oligomerisation of the protein (Morimot *et al.*, 1998). Indeed, directed mutagenesis experiments generating proteins with point mutations in HspH of *Bradyrhizobium japonicum* have shown that single modifications in this domain have a significant impact on the structure and chaperone activity of this sHsp (Lentze *et al.*, 2003). Some amino acids such as leucine at position 122 of HSP16.3 from *M. tuberculosis* or arginine present in the human α -crystalline domain are also essential for maintaining the stability of the protein, but also for the chaperone activity *in vivo* and *in vitro* (Mao *et al.*, 2001; Kumar *et al.* 1999). Finally, single mutations in the Lo18 protein of *O. oeni* lead to the loss of chaperone activity for the A123S mutation *in vivo* and *in vitro* (Weidmann *et al.*, 2010 and 2017; Maitre *et al.*, 2012). All these works show that some residues, highly conserved on the sHSP primary sequence, are essential for establishing chaperone activity. Thus, it seems possible to investigate the importance of conserved amino acids in predicting the lipochaperon activity of an sHSP.

If we compare the sequences of 12 sHSPs described as having lipochaperon activity (Table 3), a low sequence homology is obtained with 31.8% identity at the protein sequence level (Figure 22).

Table 3 : sHSPs described for their lipochaperon activity in model organisms.

	<i>Organism</i>	sHSP	References
Human	<i>Homo sapiens</i>	HSPB5	De Maio <i>et al.</i> , 2019
		HSPB1	
Plant	<i>Arabidopsis thaliana</i>	HSP17.8	Balogi <i>et al.</i> , 2008, Kim <i>et al.</i> , 2011
	<i>Daucus carota</i>	HSP17.7	Ahn and Zimmerman 2006, Balogi <i>et al.</i> , 2008
Yeats	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Hsp15.8	Glatz <i>et al.</i> , 2016
		Hsp16	
Bacteria	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Hsp18.55	Capozzi <i>et al.</i> , 2011
	<i>Oenococcus oeni</i>	Lo18	Coucheney <i>et al.</i> , 2005, Maitre <i>et al.</i> , 2012 and 2014, Weidmann <i>et al.</i> , 2010 and 2017
	<i>Synechocytis sp</i>	Hsp17	Balogi <i>et al.</i> , 2008, Tsvetkova <i>et al.</i> , 2002, De Maio and Hightower 2021.
	<i>Thermosynechococcus vulcanus</i>	HspA	Roy <i>et al.</i> , 1999
	<i>Synechococcus sp.</i>	HspA	Nitta <i>et al.</i> , 2005 ; Obuchowski <i>et al.</i> 2020
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	HSP16.3	Lini <i>et al.</i> , 2008 ; Sun <i>et al.</i> , 2005 ; Zhang <i>et al.</i> , 2005

If these 12 sequences are compared with 38 protein sequences of the sHSPs available in the literature, representative of the different kingdoms and particularly of lactic acid bacteria (20 of them), 28.4% identity is observed (Figure 22).

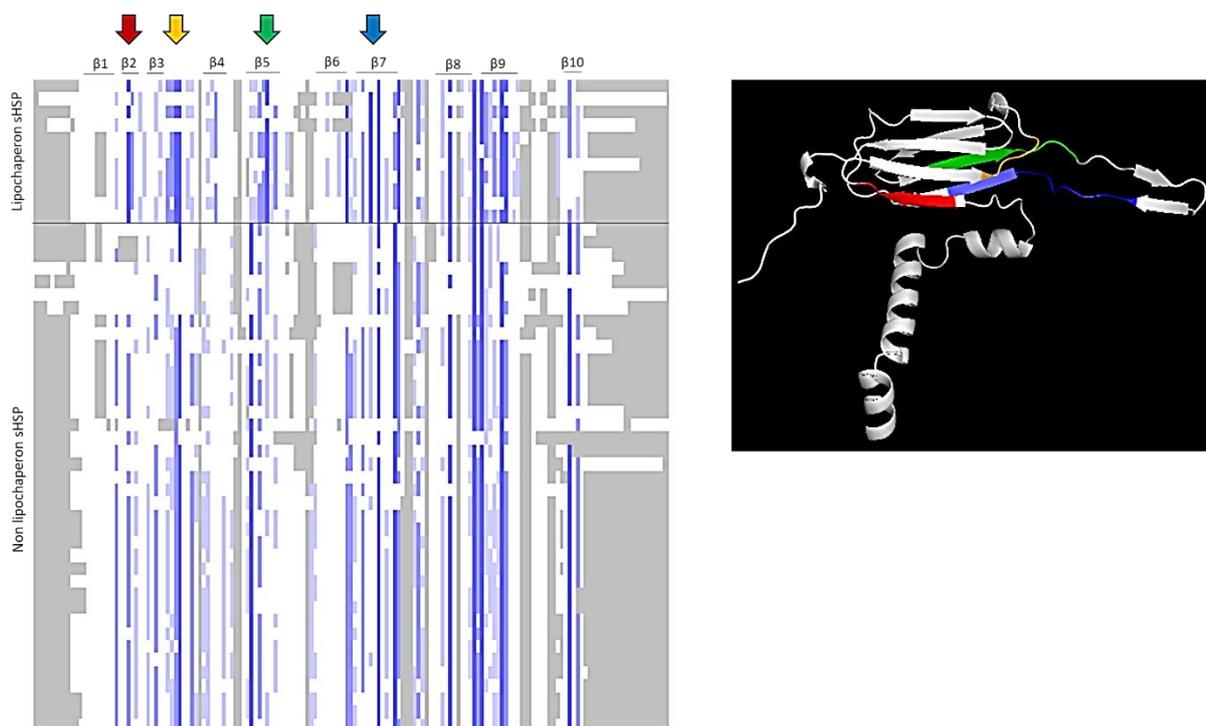


Figure 22 : sHSP primary sequence alignment by ClustalW algorithms using Jalview 2.11.2.5 software. (A) Comparison of the alignments of 12 primary sHSP sequences described for their lipochaperon activity named "lipochaperon sHSP" with 38 primary sHSP sequences not described for this role named "Non lipochaperon sHSP". Highly conserved (dark blue), conserved (blue), non-conserved (white) and unaligned (gray) residues are shown. Four domains, present on the $\beta 2$ sheet (red arrow), before the $\beta 4$ sheet (yellow arrow), $\beta 5$ sheet (green arrow) and $\beta 7$ sheet (blue arrow) respectively are more conserved on the lipochaperon sHSP. (B) Location of the four particularly conserved domains on a 3D predicted representation of an *O. oeni* sHSP Lo18 monomer.

Nevertheless, sequence alignment performed by ClustalW algorithms using Jalview 2.11.2.5 software between these two groups (described or not described for lipochaperon activity) shows the presence of four highly conserved amino-acid motifs in which the sHSP is able to act as a lipochaperon molecule (Figure 22). On these four amino acid motifs, "DKKET" on the $\beta 2$, "ELPG" upstream of the $\beta 4$ strand, the "LTISGKRE" on the $\beta 5$ and "RSERSYGSFR" on the $\beta 7$, the significantly (pValue: 0,042) most conserved residues of each are present in 77, 3% of the cases for the sHSP of the lipochaperon group versus 50% for the other sHSPs, (respectively, 72.2% vs 64.1%, 63.4% vs 43.7%, 81.8% vs 48.7% and 90.9% vs 43.6%). In addition, they are all present on concomitant β -sheets, which can lead to interaction between them. Studies have shown the impact of certain amino acids (present on the fourth amino-acid motifs: blue arrow in figure 4) on the protein structure without concluding on the loss of activity. Indeed, it appears that the second arginine present on the $\beta 7$ sheet of HSP 16.5 of *M. jannashii* can also interact via a hydrogen bridge with the oxygen atom of the glycine carbonyl group located just upstream of the $\beta 2$ sheet (Jong *et al.*, 1998), thus stabilizing this sheet. Likewise, the mutations R127W,

S135F, R136W, R140G, K141Q on human β 6/7 sHSPs affect monomer interactions and the formation of large oligomers (S135F, R136W), preventing their oligomerization (Mymrikov *et al.*, 2011). In addition, crystallography studies on sHsp (Kim *et al.* 1998; van Montfort *et al.* 2001; Lui *et al.*, 2015; Bhandari *et al.*, 2019) have defined that by interacting together the FXR (β 7) and GVL (β 9) domains maintain the tertiary structure of the protein (van Monfort *et al.* 2001). Nevertheless, many studies on the structure/function of sHSPs have focused on metazoan sHSPs. However, it appears that bacterial sHSPs may be less flexible than metazoan sHSPs (Lentze *et al.*, 2003; Studer *et al.*, 2002). This structural rigidity of bacterial sHSPs makes them more susceptible to point mutations or transduction (Studer *et al.*, 2002). This makes them excellent candidates for the *in vivo* and *in vitro* analysis of the importance of the four previously identified amino-acid motifs by sequence comparison. For instance, the second aromatic residue present on the last motif, "RSERSYGSFR" on β 7 of Lo18 of *O. oeni* is important for lipochaperon activity *in vivo* and *in vitro* (Weidmann *et al.* 2010 and 2017; Maitre *et al.*, 2012). Anisotropy measurements performed on the modified Lo18 protein Y107A showed its inability to prevent fluidization upon heat shock (Weidmann *et al.* 2010). Using a predicted model of Lo18 (obtained by trRosetta and confirmed by Alphafold 2), the aromatic ring of this tyrosine could act as a tenon between the two planes of the α -crystalline domain of Lo18 (Figure 23 A), by interacting with adjacent amino acids. Indeed, the predicted average distance of 3.6 Å between tyrosine and its four adjacent amino acids (Figure 23) allows van der Waals interactions to maintain the structure (Tanaka *et al.*, 1976; Scheraga *et al.*, 1968). In contrast, the number of interaction sites and the distance between these amino acids and the alanine instead of tyrosine (5.925 Å) disappear (Figure 23 B). It is important to note that all the amino acids that can interact with tyrosine are located on different β -sheets of α -cristallin. In addition, three of them are present on highly conserved amino-acid motifs described above (yellow and blue arrow, Figure 4).

By extension, it seems possible that these highly conserved amino-acid motifs between sHsp that possess lipochaperon activity play a role in their structure, allowing them to interact with the membrane.

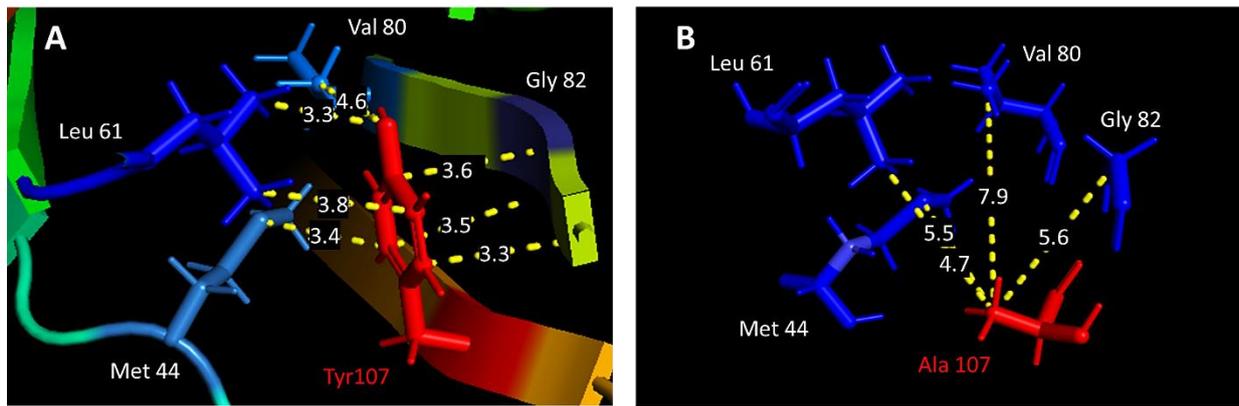


Figure 23 : Amino acid interaction distances in *O. oeni* sHsp Lo18. (A) interaction between the aromatic ring of tyrosine at position 107 (red) and its adjacent amino acids (blue) within an average radius of 3.6 Å; or (B) interaction of the alanine at position 107 from the tyrosine mutation (red) with adjacent amino acids (blue) within an average radius of 5.925 Å. The loss of the aromatic ring alters the interaction distances with other amino acids.

Conclusion:

To conclude, it appears that sHSPs can interact with lipids via certain amino acid residues present on the $\beta 2$, inter $\beta 3/4$, B5 and $\beta 7$ strands. These residues could have an important role in the structure and dynamics of oligomerization, and are certainly essential for the interaction and maintenance of optimal cell membrane fluidity. Despite the growing number of publications in this field, the overall mechanisms allowing the interaction between sHSPs and cell membranes are still poorly understood.

New experiments should focus on this activity and the highly conserved amino-acid motifs described above to increase knowledge in this field. This may be particularly interesting as the lack of lipochaperone activity of sHSPs is implicated in certain human pathologies. This is the case for example in the rare autosomal dominant form of familial exudative vitreoretinopathy which may be caused by the inability of human α -crystallin to interact with the retinal cell membrane (Bakthisaran *et al.*, 2015). Likewise, treatment of neurodegenerative diseases such as Parkinson's or Alzheimer's may be based on the use of lipochaperon activity of sHSP. The association of sHSPs with the membrane could allow targeting membranes or cytoskeletal domains to facilitate the incorporation of membrane proteins (Bakthisaran *et al.*, 2015), leading to the protection of neurons (Toth *et al.*, 2015). Finally, the ability of sHSP to protect membranes could be beneficial for probiotics or ferment production, especially for lactic acid bacteria.

Indeed, this would allow them to resist production processes such as freeze-drying, which is known to induce a deleterious modification of the membrane fluidity of microorganisms (Arena *et al.*, 2019). This has already been described for the Hsp18.55 of *L. plantarum* which induces cryotolerance by acting as an antifreeze protein (Arena *et al.*, 2019).

It appears that understanding the lipochaperon activity of sHSPs could become an important area of research in the next decades.

Author Contributions:

Conceptualization, TB. and SW.; methodology, TB. and SW.; formal analysis, TB. and SW.; investigation, TB. and SW.; resources, TB. and SW.; writing—original draft preparation, TB.; writing—review and editing, TB. and SW.; visualization, TB. and SW.; supervision, SW.; project administration, SW.; funding acquisition, SW. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding:

This research was funded by Conseil Régional de Bourgogne, the Université de Bourgogne grant number 2021Y-09559, and the ministère de l'Enseignement supérieur de la Recherche, grant number MESR 2020-04

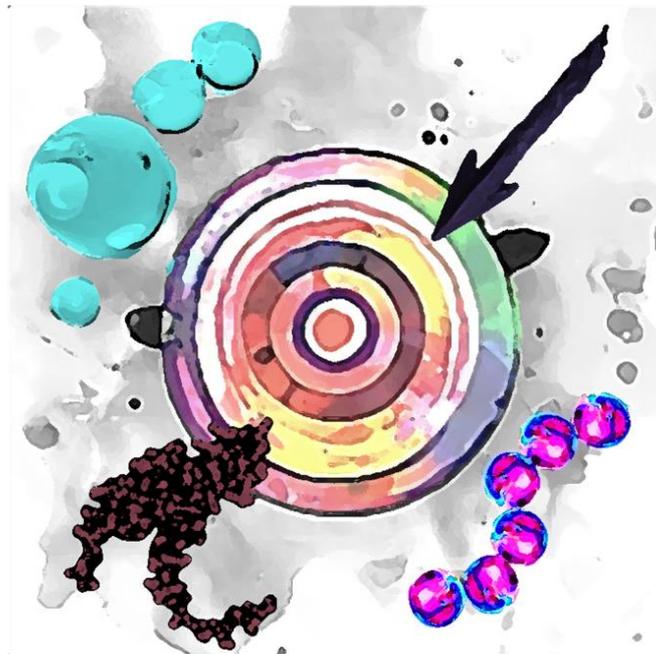
Acknowledgments:

We would like to thank Accent Europe compagny for their reading of the English text.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

Bien que les connaissances sur la contribution sHSPs dans les mécanismes de réponse au stress sont en constante expansion, leur fonction de lipochaperon demeure encore peu comprise, et les mécanismes fondamentaux associés sont insuffisamment décrits, et feront l'objet des deux premiers axes de cette thèse. De plus, l'impact des fonctions de chaperon et de lipochaperon dans divers mécanismes de survie, tant à l'échelle individuelle que de la population, demeure également relativement peu exploré chez les bactéries lactiques et fera l'objet du troisième axe de cette thèse.

II. OBJECTIFS DE THESE



En réponse au stress, la synthèse de la protéine Lo18, unique sHSP de *O. oeni*, (Guzzo *et al.*, 1998, 2000) joue un rôle primordial dans le maintien de la viabilité cellulaire, grâce à ses activités chaperon et lipochaperon (Delmas *et al.*, 2001; Guzzo *et al.*, 1998, 2000; Jobin *et al.*, 1997; Spano & Massa, 2006; Tourdot-Maréchal *et al.*, 2000). Des recherches antérieures menées au laboratoire ont mis en évidence l'importance de la structure et de la plasticité oligomérique de Lo18 dans ses fonctions (Coucheney *et al.*, 2005; Delmas *et al.*, 2001; Jobin *et al.*, 1997; Maitre *et al.*, 2012; Weidmann *et al.*, 2010). En effet, Lo18 est capable d'assurer son rôle de chaperon moléculaire sur les protéines cellulaires en cours d'agrégation suite au stress. La protéine est alors présente sous un mélange de différentes formes oligomériques (allant de 2 à 16 sous-unités) (Weidmann *et al.*, 2010). Parallèlement, lorsque la fluidité membranaire augmente, Lo18 interagit avec la membrane uniquement sous forme de dimère, assurant son rôle de lipochaperon moléculaire en maintenant l'intégrité membranaire (Maitre *et al.*, 2012, 2014). Cependant, la relation entre la structure de Lo18 et ses fonctions, en particulier pour sa fonction de lipochaperon moléculaire, demeure encore mal comprise (Lentze *et al.*, 2003; Santhanagopalan *et al.*, 2018; Weidmann *et al.*, 2010). De façon globale, les mécanismes fondamentaux impliqués dans l'interaction entre les sHSPs et la membrane restent sporadiques (Balogi *et al.*, 2008; De Maio *et al.*, 2019; Glatz *et al.*, 2016; Nitta *et al.*, 2005; Tsvetkova *et al.*, 2002; Vigh *et al.*, 2007; H. Zhang *et al.*, 2005). Enfin, bien qu'il soit clairement établi que l'activité chaperon de Lo18 est réduite en présence de membranes, ce qui suggère une affinité préférentielle pour les lipides (Maitre *et al.*, 2014), aucun travail n'a encore décrit les mécanismes sous-jacents. Dans ce contexte, trois objectifs principaux se dégagent.

1. Caractériser des liens entre la structure de Lo18 et son rôle de lipochaperon moléculaire. L'analyse de la structure primaire de Lo18 et sa comparaison avec celle d'autres sHSP a permis d'identifier plusieurs résidus hautement conservés chez les sHSP ayant une activité lipochaperon démontrée. Ces acides aminés peuvent avoir un rôle dans l'établissement de la structure de la protéine ou dans l'interaction avec la membrane. Ainsi la génération de protéines modifiées par mutagenèse dirigée sur ces acides aminés a permis d'étudier leur impact sur les activités de Lo18. La structure (secondaire, tertiaire et quaternaire) de Lo18 a été étudiée par des méthodes de dichroïsme circulaires à radiation synchrotron (SRCD), d'immunomarquage et de prédictions informatiques et a été mise en relation avec les mesures d'activités chaperon et lipochaperon de Lo18.

2. Caractérisation de l'impact de l'environnement lipidique sur la structure et l'activité lipochaperon de Lo18.

L'interaction des sHSPs avec la membrane a été décrite pour être à la fois sHSP-spécifique et dépendante des propriétés physicochimiques de la membrane (Balogi *et al.*, 2008; Csoboz *et al.*, 2022; Glatz *et al.*, 2016; Tsvetkova *et al.*, 2002). Dans ce second axe d'étude, nos travaux ont porté sur les liens existants entre la nature lipidique de membranes issues de cultures bactériennes différentes et (i) l'activité lipochaperon de Lo18, (ii) la structure de Lo18. Ainsi des analyses de SRCD sur les structures secondaires de Lo18 lors de son interaction avec des liposomes issus de cultures d'*O. oeni* ou de *L. plantarum*, son activité lipochaperon en présence de ces mêmes liposomes et son affinité pour différents domaines lipidiques membranaires ont permis de mieux comprendre l'impact de ces domaines lipidiques à la fois dans la mise en place de l'activité lipochaperon et la structuration de la protéine.

Parallèlement à ces travaux, nous avons recherché un éventuel rôle de Lo18 dans la formation de biofilm. En effet, la formation de biofilm, tout comme la synthèse de protéines de stress, représentent une stratégie efficace pour faire face aux conditions environnementales défavorables présentes dans le vin. Ces deux mécanismes peuvent co-exister et s'influencer positivement, comme c'est le cas entre IbpAB et les biofilms d'*E. coli* (Kuczyńska-Wiśnik *et al.*, 2010) ou Hsp18 et les biofilms de *M. ulcerans* (Pidot *et al.*, 2010). Concernant Lo18 et *O. oeni*, différents travaux réalisés au laboratoire ont montré que, en réponse au stress, les cellules en biofilm d'*O. oeni* continuent de synthétiser Lo18 (Bastard *et al.*, 2016). Toutefois, aucun lien entre la production de Lo18 par des cellules en biofilm et son rôle putatif dans la formation de cette structure tridimensionnelle n'a été établi et défini alors le troisième objectif de cette thèse.

3. Caractérisation de l'impact de la protéine Lo18 dans la formation de biofilm.

Des milieux enrichis en protéine Lo18 (surproduction en système hétérologue ou ajout de protéine purifiée dans un milieu de culture) ont été utilisés afin d'étudier l'impact de cette protéine dans l'architecture du biofilm. Les biofilms ainsi formés ont été étudiés par (i) observation de leur structure par microscopie confocale, et (ii) évaluation de leur résistance aux conditions stressantes thermique et acide par mesures de viabilité.

III. MATERIELS ET METHODES



A. Conditions de cultures

La souche de référence *Oenococcus oeni* ATCC-BAA-1163 (isolée de vin rouge en Aquitaine), la souche *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1 (Kleerebezem *et al.*, 2003) ainsi que deux souches de *Escherichia coli* DH5 α et BL21 ont été utilisées au cours de cette thèse.

Les cellules d'*O. oeni* ont été cultivées en anaérobiose à 28 °C dans du milieu FT80 modifié (FT80m) (Cavin *et al.*, 1989) ajusté à pH 5,3 : extrait de levure 5 g/L , extrait de viande : 5 g/L, phosphate de potassium monobasique : 0,6 g/L, sulfate de magnésium: 0,13 g/L, sulfate de manganèse: 3 mg/L, chlorure de potassium : 0,45 g/L, chlorure de calcium: 0,13 g/L , Tween 80 : 1 mL/L, glucose : 5 g/L, fructose : 3,5 g/L, acide malique 10 g/L.

Les cellules de *L. plantarum* ont été cultivées en anaérobiose à 28°C dans du milieu MRS ajusté à pH 6.3: peptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, extrait de viande 10 g/L, glucose 20 g/L, polysorbate 80 1 g/L, acétate de sodium 5 g/L, sulfate de magnésium 0.1 g/L, sulfate de manganèse 0.05 g/L, phosphate disodique 2 g/L.

Les cellules de *E. coli* ont été utilisées pour la surproduction des protéines afin de s'affranchir des difficultés de manipulation du génome de *O. oeni*. La souche *E. coli* DH5 α , possédant les mutations recA1 et endA1 facilitant l'insertion de plasmide, a été utilisée pour son efficacité de transformation et la production massive du plasmide pET28a. La souche BL21 de *E. coli* a été utilisée pour optimiser la production de la protéine Lo18 à partir du gène *hsp18* présent sur le plasmide pET28a placé sous la dépendance du promoteur T7 inductible à l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG). Les souches sont cultivées en aérobiose, sous agitation à 150 rpm, à 37°C dans du milieu LB : tryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, chlorure de sodium 10 g/L.

B. Obtention de transformants mutés sur le gène *hsp18*

La protéine Lo18 a été surproduite dans un système hétérologue chez *E. coli* afin d'être purifiée. Pour augmenter le rendement de purification, une étiquette poly-Histidine a été ajoutée en N-terminal de la protéine recombinante Lo18.

Pour cela, le gène *hsp18* codant pour la protéine Lo18 est cloné dans le plasmide d'expression pET28a au niveau des sites de restrictions NdeI et HindIII (Figure 24). La souche transformée nommée *E. coli* Lo18 (BL21 *hsp18*(OENOO_66120):: pET-*hsp18*-HIS) est résistante à la kanamycine, ce qui permettra sa sélection.

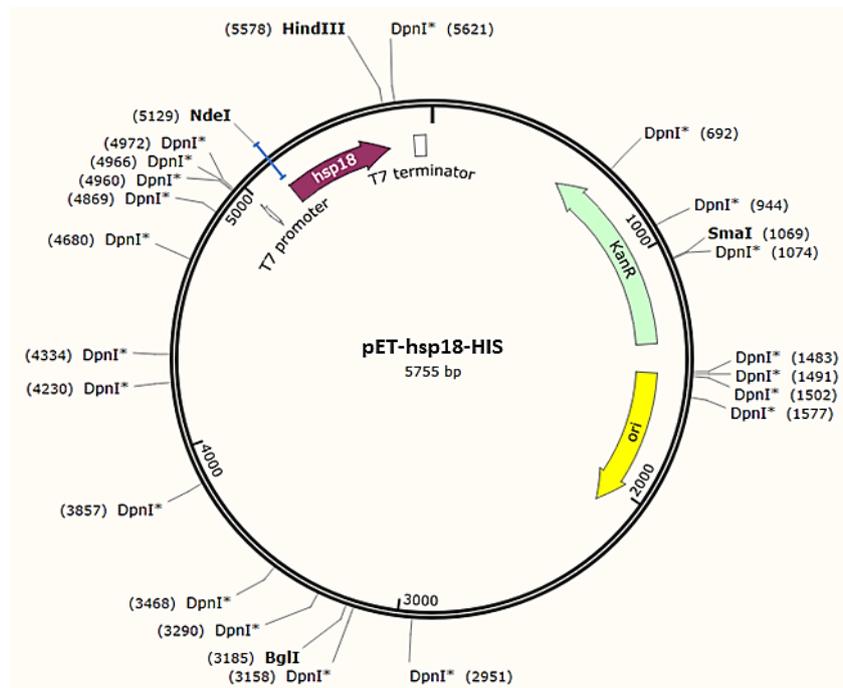


Figure 24 : Carte de restriction des sites DPN1 du plasmide pET28a-*hsp18*-HIS

1. Intégration du gène *hsp18* au plasmide pET28a

L'ADN de 1 mL d'une culture en phase exponentielle d'*O. oeni* a été extrait en suivant les instructions du kit InstaGene matrix (BioRad, France). L'amplification du gène *hsp18* par PCR a permis d'introduire les sites de restrictions HindIII et NdeI à ses extrémités. Pour cela, deux amorces flanquées des séquences NdeI en 5' et HindIII en 3' de la séquence de *hsp18* ont été dessinées (Tableau 4) et utilisées dans la réaction d'amplification suivante : 50 ng d'ADN, 0,5 µM de chaque amorce, 10 µL de 5X GO Taq Buffer, 1 µL de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de GO Taq (5 unités/µL) et de l'eau ultra pure pour un volume finale de 50 µL. Ce mix PCR a ensuite subi une dénaturation initiale (98 °C durant 30 s), 35 cycles de dénaturation (98 °C durant 8 s) / hybridation (63 °C durant 15 s) / élévation (72 °C durant 12,5 s) et une élévation finale (72 °C durant 2 min).

Les fragments PCR obtenus ont été purifiés avec le kit Nucleospin gel and PCR clean-up Kit (Macherey-Nagel), puis ont été insérés dans le plasmide pET28a par ligation en utilisant le mélange réactionnel suivant : 2 µL de T4 DNA ligase Buffer 10X, 40 ng de plasmide pET28a, 10 ng des fragments PCR amplifiés, 1 µL de T4 ligase et de l'eau ultra pure pour un volume final de 20 µL. Le mélange est incubé 1 h à 37 °C, puis l'enzyme T4 a été inactivée par 10 minutes d'incubation à 65 °C.

Tableau 4 : Souches, plasmides et amorces utilisés pour induire les mutations du gène *hsp18*

Souche <i>E. coli</i>	Caractéristiques et description	Resistance
DH5α	<i>F</i> ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA_argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺) <i>phoA supE44 thi_1 gyrA96 relA1 λ</i> ⁻	
BL21 Star (DE3)	<i>F ompT hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)	
<i>E. coli</i> Lo18	BL21 <i>hsp18</i> (OENOO_66120):: pET- <i>hsp18</i> -HIS	Kan ^r
<i>E. coli</i> E60K	BL21 <i>hsp18</i> (OENOO_66120):: pET-E60K	Kan ^r
<i>E. coli</i> T79V	BL21 <i>hsp18</i> (OENOO_66120):: pET-T79V	Kan ^r
<i>E. coli</i> G82V	BL21 <i>hsp18</i> (OENOO_66120):: pET-G82V	Kan ^r
<i>E. coli</i> R99D	BL21 <i>hsp18</i> (OENOO_66120):: pET-R99D	Kan ^r

Plasmides	Caractéristiques et description	Resistance
pET-28a	Vecteur d'insertion	Kan ^r
pET- <i>hsp18</i> -HIS	pET-28a fragment du gène <i>hsp18</i> de 447 bp cloné aux sites <i>NdeI</i> / <i>HindIII</i>	Kan ^r
pET-E60K	pET- <i>hsp18</i> -HIS mutation ponctuelle de l'acide glutamique par la lysine en position 60	Kan ^r
pET-T79V	pET- <i>hsp18</i> -HIS mutation ponctuelle de la thréonine par la valine en position 79	Kan ^r
pET-G82V	pET- <i>hsp18</i> -HIS mutation ponctuelle de la glycine par la valine en position 82	Kan ^r
pET-R99D	pET- <i>hsp18</i> -HIS mutation ponctuelle de l'arginine par l'acide aspartique en position 99	Kan ^r

Kan^r, résistance à la kanamycine.

Oligonucleotides	Sequence (5' _3')
Constructions des plasmides pET- <i>hsp18</i> _HIS, pET-E60K, pET-T79V, pET-G82V, pET-R99D	
F_Lo18_His	GCACAGCATATGGCAAATGAATTAATGGATAGAAATGATGG
F_Lo18_E60K	GAATACGGCCTGAAAATCAAACCTCCAGGCTTG
F_Lo18_T79V	CAAATGATAATCTAGTGGTATCAGGAGTTTTGAGTTCCAAGGCC
F_Lo18_G82V	CTAACGGTATCAGTAGTTTTGAGTTCCAAGGC
F_Lo18_R99D	CAAGAAAAATAATGTCGTTGACAGCGAACGTCGC
R_Lo18_His	TTGGCTAAGCTTTTATTGGATTTCAATATGATGAGTTTGACTTTTCG
R_Lo18_E60K	CAAGCCTGGAAGTTTGATTTTCAGGCCGTATTC
R_Lo18_T79V	GGCCTTGGAACCTCAAACCTCCTGATACCACTAGATTATCATTG
R_Lo18_G82V	GCCTTGGAACCTCAAACCTACTGATACCGTTAG
R_Lo18_R99D	GCGACGTTTCGCTGTCAACGACATTATTTTTCTTG

F_, forward; R_, reverse

2. Transformation des souches *E. coli* DH5a

La souche *E. coli* DH5a a été transformée par les plasmides obtenus précédemment. Pour cela, 100 µL de cellules d'*E. coli* DH5a rendues compétentes avec 0.05 M de CaCl₂ ont été mis en contact avec 2 µL du plasmide ligué puis placés 30 minutes dans la glace. Un choc thermique de 30 secondes à 42 °C a été réalisé afin de faire pénétrer le plasmide dans la cellule. Les cellules ont ensuite été placées 2 minutes dans la glace, puis incubées 1 h dans 400 µL de milieu SOC (tryptone 2 %, extrait de levure 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM et glucose 20 mM) à 37°C, sous agitation à 200 rpm. La suspension bactérienne a été étalée sur boîte (LB enrichi en kanamycine (50 µg/ml)) et incubée toute la nuit à 37 °C. Trois colonies ont été utilisées pour réaliser une extraction de plasmide, selon les instructions du kit d'extraction « Plasmid DNA extraction » commercialisé par la société Macherey Nagel, afin de vérifier l'intégration du gène *hsp18* au plasmide par électrophorèse.

3. Mutation ponctuelle du gène *hsp18*

Afin d'étudier l'importance de certains résidus de la protéines Lo18, les mutations suivantes ont été réalisées :

- E60K : l'acide glutamique en position 60 a été remplacé par une lysine,
- T79V : la thréonine en position 79 a été remplacée par une valine,
- G82V : la glycine en position 82 a été remplacée par une valine
- R99D : l'arginine en position 99 a été remplacée par un acide aspartique.

Le gène *hsp18* présent sur plasmide pET28a a été muté de façon à modifier ces différents résidus. Les souches obtenues ont été respectivement nommées *E. coli* E60K, *E. coli* T79V, *E. coli* G82V et *E. coli* R99D (Tableau 4).

Les mutations ont été introduites par PCR en utilisant un couple d'amorces complémentaires de même séquence que le gène *hsp18* avec une unique modification au niveau de la mutation voulue (Figure 25, Tableau 4). Pour chaque échantillon 2,5 µL de 5X Q5Taq Buffer, 1,5 µL de MgCl₂, 0,25 µL de dNTPs, 0,625 µL de chaque amorce à 10µM, 0,0625 µL de Q5 Taq, 3,5 µL de plasmide (50 ng) et de l'eau ultra pure pour un volume final de 12 µL ont été mélangés. L'amplification (du plasmide entier) est réalisée par 18 cycles de dénaturation/hybridation/élongation : dénaturation à 98 °C durant 20 s, hybridation à 57 °C durant 30 s et élongation à 72 °C durant 188 s.

Afin d'éliminer le plasmide matrice et de ne conserver que les plasmides contenant l'insert modifié, une étape de digestion des produits PCR a été réalisée pendant une heure avec 1 µL d'enzyme DPN1 à 10 U/µL. Cette enzyme va se fixer sur les sites DPN1 méthylés de l'ADN matrice et dégrader les plasmides matrices utilisés lors de la réaction de PCR. À la suite de cette digestion, 100 µL de cellules d'*E. coli* DH5α ont été, de nouveau, transformés, comme détaillé ci-haut, afin d'obtenir une grande quantité de plasmides. La présence des mutations a ensuite été vérifiée par séquençage en suivant les instructions de la société GENEWIZ. Les résultats des séquençages ont été analysés par BLAST. Une fois la séquence vérifiée, les plasmides ont été extraits puis introduits dans la souche d'*E. coli* BL21, en suivant le même protocole de transformation que pour la souche DH5α.

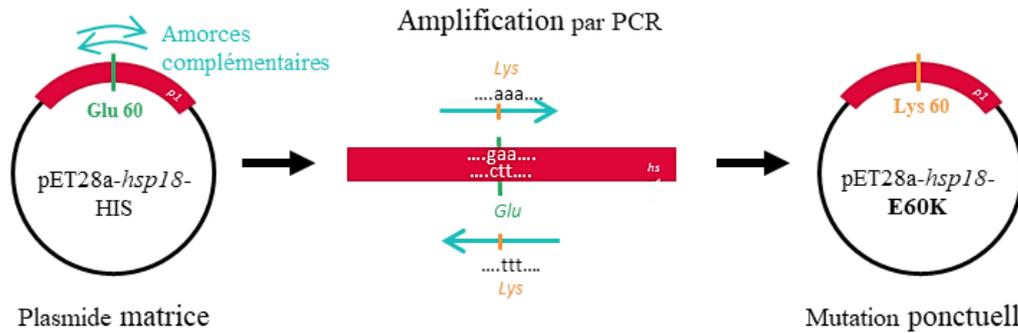


Figure 25 : Stratégie utilisée pour induire les mutations ponctuelles E60K, G82V, T79V et R99D. Deux amorces complémentaires de même séquence que le gène *hsp18* avec une unique modification au niveau de la mutation voulue (codon codant soit pour de l'E60, le G82, le T79 ou le R99) ont été utilisées pour amplifier le plasmide pET28a-*hsp18*-HIS. L'amplification du plasmide avec le couple d'amorces a permis d'obtenir les plasmides pET28a-*hsp18*-E60K pET28a-*hsp18*-G82V, pET28a-*hsp18*-T79V, pET28a-*hsp18*-R99D, codant respectivement pour les protéines modifiées de Lo18 E60K, G82V, T79V et R99D

C. Production des protéines Lo18 et Lo18 modifiées

1. Induction

La transcription du gène *hsp18* a été induite par ajout d'IPTG dans le milieu de culture. L'IPTG permet la formation d'un complexe avec le répresseur de l'opéron lactose au sein de la cellule permettant alors la synthèse de l'ARN polymérase T7. Cet ARN polymérase T7 nouvellement synthétisé peut se fixer au promoteur T7 présent sur le plasmide pET28a (sur lequel le gène *hsp18* est présent) induisant la transcription du gène codant pour Lo18. Grâce à sa forte efficacité, l'ARN polymérase T7 permet la surexpression du gène *hsp18*, ce qui mène à une surproduction de la protéine Lo18 dans la cellule (Figure 26).

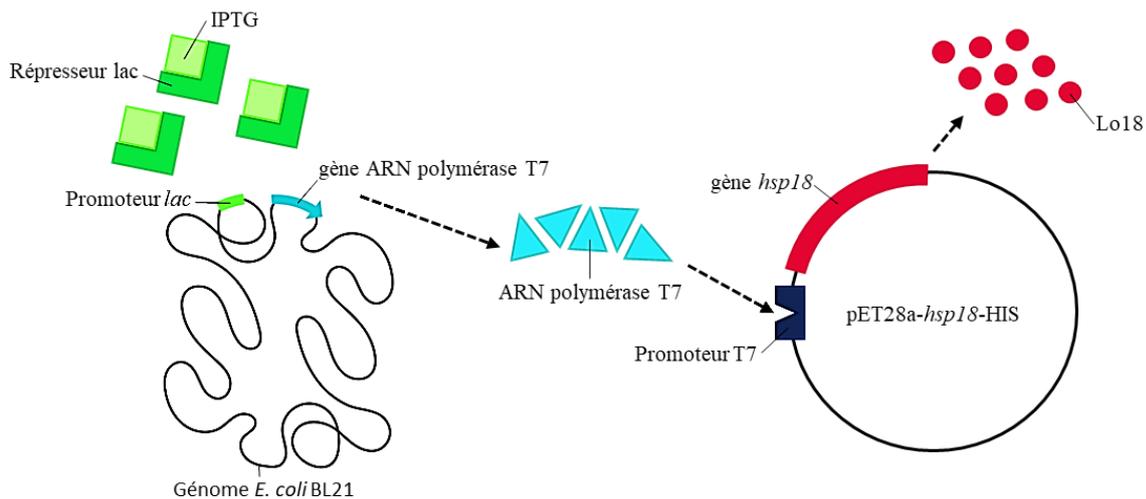


Figure 26 : Mécanisme d'induction du gène *hsp18* par l'inducteur IPTG, (adapté de Novagen pET expression manual). Réalisée avec Biorender.

Dans les faits, les cellules d'*E. coli* BL21 contenant le plasmide pET28a-*hsp18* ont été incubées dans du milieu LB contenant de la kanamycine (50 µg/mL) une nuit à 37 °C sous agitations à 200 rpm. Cette culture primaire a été utilisée pour ensemencer du milieu LB frais à une DO_{600nm} de 0,1 (1 UDO = 5·10⁷ UFC/mL). Lorsque la culture a atteint une DO_{600nm} = 0,5 – 0,6, 1mL d'IPTG à 50 mM a été ajouté afin d'induire la production de la protéine Lo18. Après trois heures d'induction, les cellules bactériennes ont été récoltées par centrifugation pendant 10 minutes à 4000g. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois, puis resuspendues dans 60 mL de tampon A (0,2 mM de tampon phosphate, 500 mM NaCl), permettant l'interaction de la protéine avec la colonne de purification. La culture bactérienne précédemment resuspendue a été centrifugée 30 secondes à 1000g pour éliminer d'éventuels débris. Les cellules ont ensuite été broyées à l'aide du broyeur de cellules Continuous Flow Cell Disrupter (Constant Systems Ltd, UK) en utilisant un programme de 3 cycles à 28 kPSI. Le lysat cellulaire obtenu a été centrifugé une heure à 4°C à 12000g pour éliminer les débris cellulaires présents. Le surnageant est stocké à -20 °C.

2. Purification

Les lysats cellulaires contenant la protéine sauvage ou modifiée ont été purifiés par chromatographie d'affinité à l'aide d'une colonne HisTrap HP, 1ml (Cytiva, US). Les queues

histidines présentes au niveau N-terminal de la protéine Lo18 vont interagir avec les ions nickel présents dans la colonne et être retenues dans la colonne à l'inverse des autres protéines présentes dans le lysat. L'éluion de la protéine Lo18 sera réalisée par compétition entre les molécules d'imidazoles présentes dans le tampon d'éluion, ayant une très forte affinité pour les ions nickel, et les noyaux imidazole des histidines de la queue histidine (Figure 27).

Pour ce faire 5 ml de lysat cellulaire ont été injectés dans la colonne précédemment équilibrée avec 10 mL de tampon A (0,2 mM de tampon phosphate, 500 mM NaCl, pH 7) avec un débit de 1 mL/minute. Un gradient d'éluion a été mis en place à un débit de 1 mL/minute (pour un volume de 20 mL) afin d'atteindre une concentration de 100% de tampon B (0,2 mM de tampon phosphate, 500 mM NaCl, 500 mM d'imidazole, pH 8). La concentration de 100% de tampon B a été maintenue pendant 10 mL avec un débit de 1 mL/minute. Durant cette phase, différentes fractions éluées sont collectées et la quantité de protéines est mesurée par un dosage de Bradford. La présence de la protéine purifiée au sein de ces fractions a été vérifiée par western-blotting. La protéine purifiée a ensuite été stockée à -20 °C.

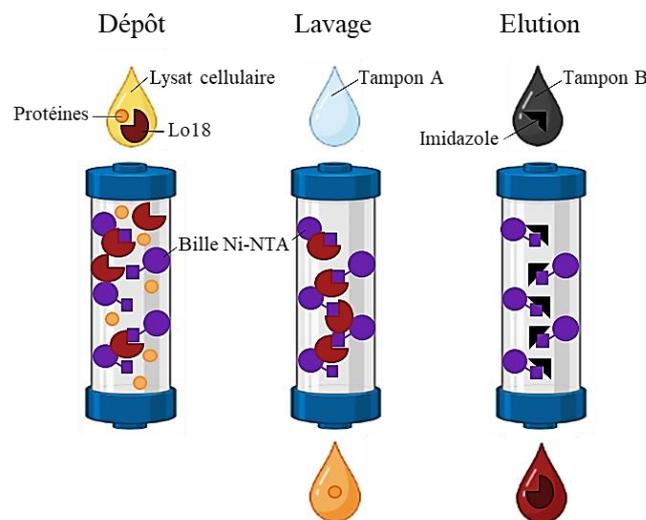


Figure 27 : Principe de purification de la protéine Lo18 sur colonne His-Trap. Le lysat cellulaire contenant la protéine d'intérêt est chargé sur la colonne His-Trap. Les protéines Lo18, portant une queue histidine, sont retenues sur la colonne et interagissent avec les billes de nickel. La colonne est ensuite lavée avec une solution tampon. Durant cette étape de lavage, les protéines non fixées aux billes de nickel sont éluées. Enfin, l'utilisation d'un second tampon contenant de l'imidazole (qui se fixe aux billes de nickel) permet le décrochage et l'éluion des protéines Lo18. Réalisée avec Biorender.

D. Analyses de la structure des protéines Lo18 et Lo18 modifiées

Les différentes structures protéiques (de la structure primaire à la structure quaternaire) de la protéine Lo18 ont été analysées. Ces analyses multi-structurelles ont permis (i) d'observer par alignement de séquences la récurrence de résidus hautement conservés chez les sHSP décrites pour leur rôle de lipochaperon moléculaire, (ii) d'évaluer l'impact de ces résidus conservés (correspondant aux substitutions choisies dans le paragraphe IV.B.3) sur la structure tertiaire de la protéine et leur rôle dans l'interaction avec des lipides membranaires.

1. Alignements multiples de structures primaires entre les sHSP

La structure primaire des sHSP a été analysée par alignements multiples de séquences, afin de déterminer la présence de motifs conservés entre les sHSP possédant une activité lipochaperon.

Pour ce faire, les structures primaires de 50 sHSP issues d'organismes présents dans l'ensemble des règnes du vivant ont été alignées par le logiciel Muscle (Tableau 5 et 6).

L'alignement de séquences des 11 sHSP décrites pour leur interaction avec la membrane a été comparé avec celui des 39 sHSP encore non décrites pour cette activité avec le logiciel Jalview 2.11.1.4.

Tableau 6 : Séquences des 50 sHSP utilisées lors de l'alignement des structures primaires (Partie 2)

Règne	Organisme	sHSP	Numéro d'accèsion	Séquence
Bactérie	<i>Synechococcus sp.</i>	HspA	A0A0H5K3K6	MALVRSFLPYEFDREILGTLQRMISRFQPWPWTEALFELKLSFAFAVEVKEIDAELRVELPGIDPKDLDLQVTAETAVVLKGERSEDRSEAEGLVLETFRYGAFFRVIPLPAQVKNTEAQAQDYQNGVLVTLPKRDEELHKVYKVDLGHLLAAAPAAEACER
	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	HspA	Q06823	MADLSYRRGTGSPQRTREWDFPQQMQLANVDPFELANHPWFANRQGPFAFVRETHEAVIFKADLPVYDEKIDIEVLTIGDRVSYSGKREKREKRESERYFAVERSGFSRAFTLPEGYDGDNRADLKNVGLVTLPKRPEYQPKRIQVASSGTEQKEHIKA
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Hsp20	A0A2Y4EMW2	MTNDMNRHNDMMDAMNDWFGPRNFDDTEIENMQSDVAETDKDYTVKIDMPGMKNEDINNVYKDGFLTVVGSRKSFKDTSDKDKNIHKERSEGRISRSYRLPNIVA SEIRAQYDNGVLTITLPKQNAGADNSIHID
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	hsp1	O52190	MLNKIQHRNLNTYSVYPLDFYSVYTPLNFFEDFSRSLFNDFKPFHKTDIHEITDNEYLVEAELPGIKEDIQVYIYENGVLITISGQQQIDA VNEDEKKNLRSERNLTSVRRQYLLENVKEDEIKASYSDGVLKVTLPKSNKEIKKSISIE
	<i>Lactocaseibacillus casei</i>	hsp18	K0N8Z3	MANEVLNRRNELMNNVNDPFDNLARRFFGVPVSDWMDWATAITSTA VNGLLTDVKE TKDA YE VHVDPGIDKNNIKMNYHDGVL SIN VHKDDITDHADKNGNVMMSERNYGTMSRSYQLPNV DNASNIKAAAYQDQVGLNITMPKL TESKE SGNHIEIQ
	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	Hsp20	A0A1J3C609	MANDLMRRNDVLSDFPFDNLGRHLFDSLTPANVDRSRVLKTDIQENDQA YVVKVYDVPGEKQNSLSYDRDVL SIAVKHEEQADHADNDGNMLMSERSYGRMSRSYRLPNVNEGGQISAKVNDGVL TIDLPKMTSDQKGNHQINID
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Hsp20	G6F3V4	MTNDMLNRYNDLFDQIGGWLDNSKDLLSDSHAFRNLQSDVAEDEHE YTVKIDVPGMSKDDIHL SYTDGILTISAHRSTFKDDSDKKNLRLQERSEGSYSR SFLPNV DKKGISA KLDGGVLT VTLPKAAPEENEDITIE
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Hsp20	A0A3A9YJ08	MANDMMNRRNDMMDAMNDWFGPRNFDDSEIENMQSDVAETDKDYVVKIDMPGMKNDDIKLNYKDGVL SVAGTRKAFKDTNDKERNIIHKERSEGRISRSYRLPNV VANEIHA KYDNGVLTITLPKQTAGDDDSIQID
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	hsp2	O52192	MLNKIQHRNLNTYSVYPLDFYSVYTPLNFFEDFSRSLFNDFKPFHKTDIHEITDNEYLVEAELPGIKEDIQVYIYENGVLITISGQQQIDA VNEDEKKNLRSERLS TSVQRQYLLENVKEDEIKASYSDGVLK VTLPKDSNKEIKKSISIE
	<i>Carnobacterium sp. CP1</i>	Hsp20	A0A0U3NTI7	MPHDLRKKSDPFDSPFDLFDDESPPFDKLSLAHEKNNFKADVHE TDKE YE VKVDLPGFDKDNISIEFDHDLVTHAKRHEASEKNNEEQYIKQERSYGSMTIRQFYLKNADEENSKASYKDDGVLTLKMPKIALEDSKKKQISIE
	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	Hsp21	Q03X19	MSNLMQRFSDDIDFEMNQAMHPWSDQRLLPKSIKTDVIEKDDRFVTAELAGVYKDDINIDYKNDQLLISAKRDEFKDHHDHGDGNILOSER TYGVS SRA YLPGVYDSSKITAKFANGELRVELPKQATEQ SSTNVIKID
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Hsp20	E0NGP6	MANEMMNRNDMWDPFDRLARFFNDSNWATP TSLKTDVSESDKDYNVKIDVPGIDKDKIKLNYQDQV LNVEVKKDSFADHEDKEHNVTMTERNYGIMHRSYS LPGA VKASDKAKVNNNGVLSITLPKTNDSSSGIEIE
	<i>Pediococcus parvulus</i>	Hsp20	A0A176TJV4	MANELRNRPDDDEAPLDFDNGFKNFKSMTEGSSMKTDIRENEKDYQVSAELPGFKKENIDLNYDNDITLTVTGKHNVYDKEQKDEKGNLRQERSYSNYSRQF YLPNIDRDKISAS YDGGV LK VTLPKSEEKLGQKQIPIN
	<i>Pentozococcus</i>	Hsp20	Q03DQ8	MANEMMNRNDMWDPFDRLSRGFFNNGWDGTSKTLKTDVSESDTYKVKIDVPGIDKDKIKLDYQDQV LNVEVKKDSFADHEDKEHNVTMTERS YGIMRRSYELPRVKAEDIKAKV DNGVLSITLPKASGEKTSGIEIE
	<i>Aerococcus sp</i>	Hsp20	A0A256BN88	MGLFPTMNNRGLGRNFFNDFFDSMMDIRMKITDIRE TDNAYILD AELPGFNKEDINDYNNVLTIAANKETTNEEKDEKEGTYIRRRSSQSFSRHFL VEHIKNEDIDASFENG VLT VTMPKAADKETTNSHRIEIN
	<i>Aerococcus urinae</i>	Hsp20	A0A329PDN7	MSRVPSLSSPFLGFDEIERALDRVVKGADGYPPIYNIERCGRDDGQPERLRITLAVAGFTRDQLDV TTEENQLVIRGRQDDKTRQYIHRGIAARHFQRITFLADGMYYIGADLKNGLLSIDLARPEPERVVK TIAINEHE
	<i>Weissella halotolerans</i>	Hsp20	A0A0R2G6R6	MANEMNYRGGRAPLLDALSEAFEPVTVNAGDSNMSFKTDIKEITDNDYVVT AELPGLQKSDIGLK YQDDTL SIAVKRESQEE TKDDDDGKAVLSERYYGAMRSR SYLPHVAIDDIKASYENGILTVTLPKADEAQVNNIDIQ
	<i>Weissella confusa</i>	hsp3	A0A0R2F3L8	MSHDLLRHDAF GDLLDKMANASLQAAPAFGADVKSDVVEKDDHYE VVADIPGVKDDIKVDYEDGTLQISA TRHEIKHSDKDKGNILQSER SFGVGRSYLPNV DREKYS AKYKNGV LHTLPKAEVAK KSAUKIED
	<i>Weissella bombi</i>	HSP20	A0A1C3Z0H6	MANELSNRFGMFDWHDHFNDFNHLTPFAAQLKSDVVDSDNHYEVSVDVPGINKDDNLSYQGDITL SIA TKQASKTDKDDQGNVLTQERSAGHIQRS YLPGVDFNKITAKVSDGVLQVTLPKSETTNNHRISID
	<i>Streptococcus panthophilus</i>	HSP21	A0A172Q927	MLTPKLFSDGLLNDNWFDDVYSKEFTNRRNISKVAGREMLMDVKKKDHYDVEIDLPGVKKENITIELQNGV LNTASKSHDREKDKEDNIIRQERYGTMSRSF YVGDNVVTADDDVHGKFDGVLVTLPIPKKEPTEKLDNPNRISID

2. Quantification des types de structures secondaires

a. Dichroïsme circulaire

Afin d'analyser avec précision et robustesse la structure secondaire de Lo18, le choix de l'utilisation d'un rayonnement synchrotron a été fait pour les mesures de dichroïsmes circulaires. En effet, l'utilisation de cette lumière plus intense et naturellement polarisée améliore le rapport signal sur bruit, permettant l'utilisation d'échantillons protéiques peu concentrés. A la suite d'un appel à projet (Proposal 20220067), ces mesures de dichroïsme circulaire à rayonnement synchrotron (SRCD) ont été réalisées sur la ligne de faisceau DISCO au Synchrotron SOLEIL (France) en collaboration avec le Dr F. Wien (Synchrotron SOLEIL) et le Dr. S. Combet (Laboratoire Léon Brillouin CEA Saclay). Ces mesures permettent d'estimer la quantité d'hélices α , de feuillets β , de coudes ou de domaines non structurés de la protéine Lo18 et des protéines modifiées, que ce soit lors d'une rampe thermique et/ou lorsque la protéine est en interaction avec des lipides membranaires de différentes natures. En principe, le rayonnement synchrotron polarisé, déphasé et circulaire est dévié lorsqu'il traverse un échantillon chiral. L'intensité de cette déviation est caractéristique des différentes structures secondaires des protéines (Figure 28).

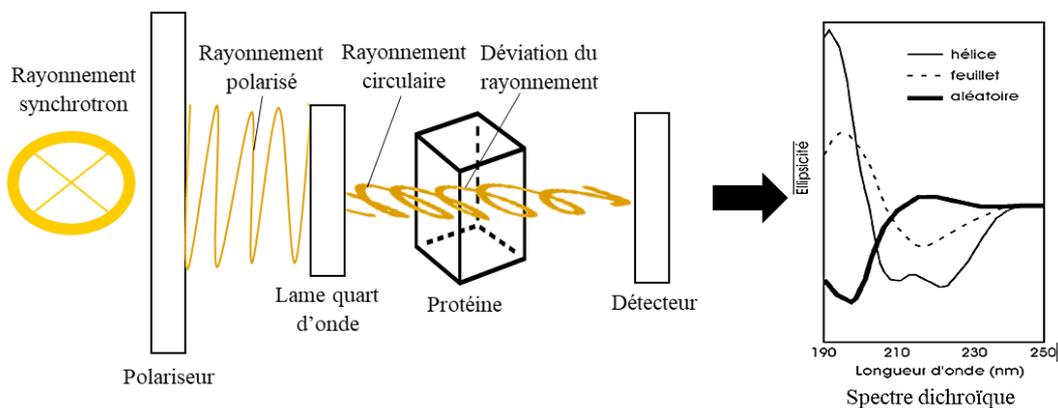


Figure 28 : Déviation de la lumière polarisée circulaire, permettant l'analyse des structures secondaires des protéines.

En détail, l'instrument a été calibré en utilisant un acide camphre-10-sulfonique (Sigma Aldrich, Saint-Louis, US) pur à 99 % à 25 °C (Miles *et al.*, 2004). Les échantillons de protéines (Lo18 ou modifiées) ont été préparés dans un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0, afin de limiter au maximum le bruit de fond dû au tampon.

Ensuite, 50 µl d'échantillon ont été déposés dans une cellule cylindrique démontable en quartz Suprasil (Hellma, Allemagne) de 0,02 cm de trajet optique. Les échantillons ont été soumis à une rampe thermique de 15 °C à 84 °C (pas de 3 °C) au cours de laquelle trois acquisitions de spectres sont faites par pas de 1 nm de 262 nm à 176 nm, avec un temps d'intégration de 1,2 s et une largeur de bande spectrale de 1 nm. Pour chaque condition testée, trois spectres de la ligne de base (tampon phosphate et/ou solutions lipidiques sans protéine) équivalents ont été collectés à 15 °C. Pour chaque condition, les trois spectres collectés (contenant la protéine) ont été moyennés et lissés (9 points avec lissage Savitzky-Golay), puis soustraits avec les spectres moyennés et lissés de la ligne de base adéquate. Les spectres ont ensuite été mis à zéro entre 250 et 260 nm. Tous les spectres ont été normalisés en fonction de la concentration en protéines et de la longueur du trajet à l'aide du logiciel CDToolX.

Un protocole similaire a été utilisé en présence de liposomes (produit comme décrit dans le paragraphe III.E.2) avec 20 µM de liposomes et 140 µM de protéines (Lo18 ou modifiées), avec un balayage thermique de 25 à 55 °C avec un pas de 5 °C. La déconvolution des spectres a été réalisée avec le serveur BeStSel (Micsonai *et al.*, 2022).

b. Prédiction bio-informatique

La connaissance, même prédictive, de la structure secondaire de Lo18 est un élément clé dans la compréhension de ses fonctions. En effet, la prédiction bio-informatique de cette structure couplée aux résultats *in vitro* obtenus par dichroïsme circulaire, permet de prédire la proportion et la localisation des structures secondaires. De plus la prédiction informatique permet également d'estimer théoriquement le degré d'exposition de certains domaines de la protéine. Ces paramètres ont été prédits pour les protéines Lo18 et Lo18 modifiées, afin d'observer une modification de structure induite par les substitutions d'acides aminés, précédemment décrites (paragraphe IV.B.3). Pour ce faire les structures primaires de protéines Lo18 ou Lo18 modifiées ont été téléchargées dans le logiciel PredictProtein 1.0.88 afin de réaliser une prédiction de leur repliement par alignements.

3. Prédiction des structures tertiaires de Lo18 par analyse bio-informatique

Aucune structure cristallographiée n'étant pour le moment résolue pour la protéine Lo18, sa structure tertiaire a été prédite grâce au logiciel AlphaFold 2. La structure obtenue a ensuite servi de référence et de comparatif avec l'unique modèle prédictif disponible durant l'étude par modélisation des interactions Lo18/membrane (A0NLC2_OENOE), mais incomplet au niveau N-terminal. Néanmoins, c'est le modèle A0NLC2_OENOE qui a été utilisé pour modéliser la modification de structure de la protéine Lo18 lors d'une augmentation de température et lors de l'interaction avec une membrane de POPC.

a. Création et analyse d'un modèle de structure tertiaire de la protéine Lo18 par AlphaFold 2.

Grâce à l'avènement de la bio-informatique, des modèles fiables ont pu être établis, comme ceux réalisés par le logiciel AlphaFold 2. En s'appuyant sur l'intelligence artificielle (Deep Learning), ce logiciel utilise la base de données de la « Protein Data Bank » (PDB) pour apprendre comment les protéines se replient. L'efficacité de ce programme, démontré lors du rassemblement du Critical Assessment of protein Structure Prediction fin 2020 (CAPS14), a montré que les structures tertiaires obtenues par le logiciel sont comparables à celles obtenues expérimentalement avec une fiabilité particulièrement haute, dont l'erreur de position attendue n'excède pas 5 Å. Cette avancée technologique a permis de mettre à jour la structure du domaine α -cristallin de Lo18 avec une grande précision, au courant de l'année 2022. Néanmoins certains domaines, comme les domaines terminaux, ainsi que la longue boucle reliant le feuillet β 5 au feuillet β 7, semblent être plus difficiles à prédire avec une distance d'erreur estimée jusqu'à 30 Å par rapport à la structure réelle de la protéine.

Le modèle obtenu a ensuite été informatiquement modifié au niveau des quatre substitutions d'acide aminés étudiées par le logiciel PyMol 2.5.3, afin d'obtenir un modèle pour les protéines modifiées E60K, T79V, G82V et R99D.

Grâce aux fonctionnalités de mesure du logiciel, la distance entre chaque acide aminé d'intérêt (initiaux ou substitués) et leurs proches voisins a été mesurée. La modification de structure induite par ces modifications d'interaction intra-protéique a été également prédite.

b. Modification de la structure protéique de Lo18 observée par modélisation

Plus finement, la modification de structure de la protéine Lo18 au cours d'une rampe thermique ou lors de son interaction avec une membrane modèle a été suivie par modélisation informatique, en collaboration avec le Pr. P. Senet et le Dr. P. Delarue de l'Institut Carnot Bourgogne (ICB).

Des simulations de dynamique moléculaire (MD) dans l'eau explicite ont été réalisées à partir des structures initiales : (i) A0NLC2 tronquée des 25 premiers acides aminés du domaine N-terminal (Waterhouse *et al.*, 2018), (ii) structure totale obtenue à l'aide des logiciels en ligne trRosetta et Alphafold2 (ces modèles sont apparus similaires). Pour l'ensemble de ces structures initiales les simulations ont été réalisées avec ou sans une membrane modèle de POPC. Toutes les simulations ont été réalisées avec le logiciel de MD GROMACS (Abraham *et al.*, 2018). La membrane de POPC a été générée par le serveur CHARMM-GUI. Les ions Na^+ et Cl^- ont été ajoutés à une concentration de 0,1 M afin d'équilibrer les charges à la surface de la protéine. Les vitesses initiales ont été choisies au hasard. Une boîte cubique pour la protéine sans la membrane de POPC a été utilisée pour l'ensemble NPT (Nombre d'atomes - Pression - Température). Lorsque la membrane POPC est présente, un couplage de pression semi-isotrope avec une boîte quadratique (15 nm) contenant plus de 300 000 atomes a été utilisé. Le système a été chauffé pendant 40 ps et équilibré pendant 600 ps avec des contraintes plus faibles, pour finir sans contrainte à 310 K. Différentes séries de MD de 1 et 2 μs de durée ont été réalisées pour simuler et analyser les interactions des modèles Lo18 avec la membrane. Des simulations de la protéine Lo18 à 360 K, 385 K, 410 K, 435 et 460 K ont également été effectuées. Ces températures simulées correspondent aux comportements de dépliement du dimère Lo18 observés aux températures comprises entre 12°C et 87°C.

4. Evaluation de la modification de la structure quaternaire de Lo18 lors de l'interaction avec la membrane par « cross-linking »

Afin d'observer l'impact (i) des substitutions d'acides aminés de la protéine Lo18 et (ii) de l'interaction avec la membrane sur l'organisation oligomérique de la protéine Lo18, des expériences de « cross-linking » suivies d'immunomarquage ont été menées *in vitro* en présence de protéines purifiées et *in vivo* en système hétérologue chez *E. coli*.

Préparation des échantillons *in vitro* d'après Delmas *et al.*, (2001) :

Dix μM de protéines Lo18 ou Lo18 modifiée ont été mis en présence, ou non, de 25 μM de liposomes puis incubés 10 minutes afin de permettre l'interaction protéines-lipides. Les structures oligomériques des protéines produites pendant cette incubation ont été immobilisées par action d'une solution de bis(sulfosuccinimidyl) suberate (BS3) fraîchement préparée dans un tampon de réticulation (25 mM MES pH 7,5, 25 mM NaCl, 0,5 mM DTT), de sorte que la concentration finale de BS3 était de 2 mM (Figure 29). Une incubation de 30 minutes à température ambiante a été réalisée. Les échantillons ont ensuite été re-suspendus dans du tampon Laemmli 1X (BioRad) afin d'avoir une concentration en protéines de 20 μg .

Préparation des échantillons *in vivo* d'après Delmas *et al.*, (2001.) :

Afin de visualiser l'impact des substitutions *in vivo* sur l'état oligomérique de la protéine Lo18, les expériences ont été menées en système hétérologue sur les souches *E. coli* E60K, G82V, T79V et R99D.

Les cellules ont été cultivées sous agitation à 37 °C dans du milieu LB supplémenté en kanamycine (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) jusqu'à $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0.2. Pour permettre l'induction de la protéine Lo18, 50 μM d'IPTG ont été ajoutés à la suspension bactérienne, puis incubée de nouveau jusqu'à une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,5. Les cellules ont ensuite été soumises à un choc thermique à 50 °C durant 1 h. Les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS, puis incubées 30 minutes à température ambiante dans une solution de formaldéhyde à une concentration finale de 1% (w/w) afin de figer les structures oligomériques (Figure 29).

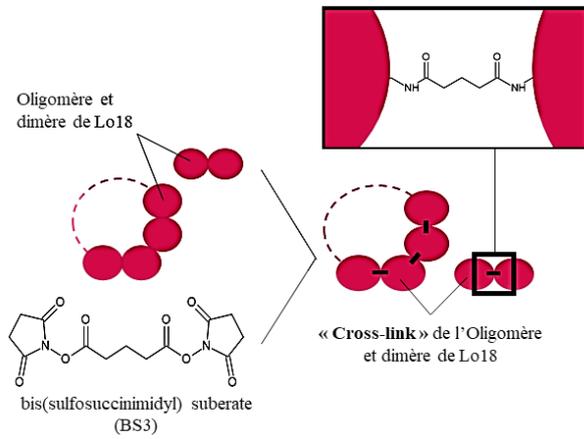
Les cellules ont été re-suspendues dans des tubes comprenant 200 mg billes en verre de 50 µm de diamètre et 1mL de tampon Laemmli 1X afin d'être lysées à l'aide d'un Precellys (Precellys Evolution). Pour cela un programme de casse de 3 fois 45 secondes avec un temps de pause d'une minute entre chaque agitation a été appliqué.

Immunomarquage :

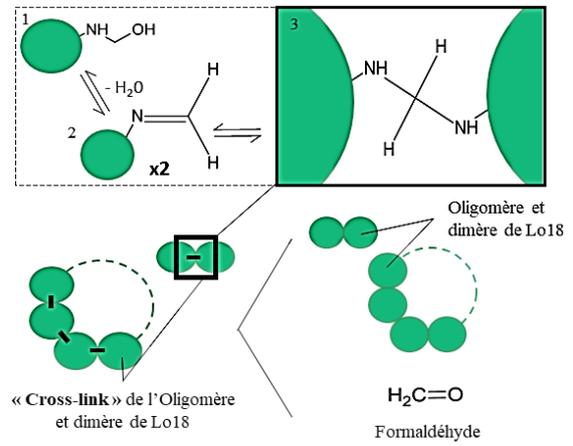
Dix µL d'échantillons protéiques ont été déposés dans un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) dont la composition pour 1 gel est : (i) : gel de migration : 10 µL de tétraméthyléthylènediamine (TEMED), 2,5 mL de tampon Tris-Glycine, 1,25 mL d'eau, 1,25 mL d'acrylamide 40% et 75µL de persulfate d'ammonium (APS) et (ii) : gel de tassement : 20 µL de TEMED, 3 mL de tampon de tassement et 100 µL d'APS. Le gel est installé dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon de migration Tris-Glycine 1X puis soumis à un courant de 100V jusqu'à migration complète des échantillons protéiques.

Les protéines présentes sur le gel de polyacrylamide ont été transférées sur une membrane de PVDF avec une attention particulière pour la migration des protéines de petits poids moléculaires. La protéine Lo18 a ensuite été détectée par immunomarquage en adaptant le protocole décrit par Guzzo *et al.*, (1998). Pour ce faire, la membrane a été passivée 1h dans une solution de Regilait 5%/ TBS (Tris 0,2 M, NaCl 1,5 M, pH: 7,6), lavée avec une solution de TBS puis incubée successivement 1h dans un bain d'anticorps primaire et secondaire. Un anticorps primaire de lapin dirigé contre Lo18 et un anticorps secondaire anti-IgG de lapin dirigé contre l'anticorps primaire et couplé à une peroxydase ont été respectivement dilués au 1/750 et 1/2000 dans une solution de Regilait 5%/ TBS. L'anticorps secondaire est détecté par réaction chimio luminescente de la peroxydase après ajout de 1 mL de luminol (Figure 29 C)

A. BS3 « Cross-linking »



B. Formaldéhyde « Cross-linking »



C. Immunomarquage

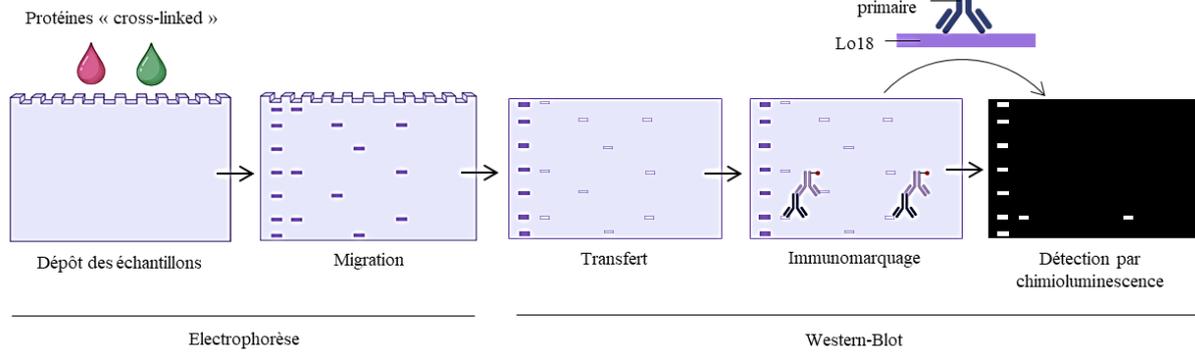


Figure 29 : Immunomarquage de la protéine Lo18. « Cross-linking » (A) *in vitro* et (B) *in vivo* des structures oligomériques de la protéine Lo18. (C) Détection des différentes structures oligomérique par immunomarquage. Réalisée avec Biorender.

E. Analyses de l'activité chaperon et lipochaperon des protéines Lo18 et Lo18 modifiées

1. Mesure de l'activité chaperon par thermostabilisation de protéines cellulaires

Les lysats cellulaires des souches d'*E. coli* surexprimant les protéines Lo18, E60K, T79V, G82V et R99 ont été produits comme décrit dans le paragraphe III.B.3. Afin de tester la thermostabilité des protéines cellulaires présentes dans le lysat, la concentration totale en protéines a été mesurée par réaction colorimétrique de Bradford (Biorad, France) et ajustée à 3,5 mg/mL dans un tampon phosphate de sodium (pH 7). La dénaturation des protéines des lysats a été obtenue après chauffage à 55 °C pendant 30 minutes. Les lysats ont ensuite été centrifugés à 12 000 g pendant 10 minutes. La quantité de protéines dans les fractions surnageantes (correspondant aux protéines non agrégées) a été mesurée par réaction colorimétrique de Bradford.

2. Production de liposomes avec des lipides membranaires purifiés de *O. oeni* et *L. plantarum*

Culture d'*O. oeni* :

Une première culture d'*O. oeni* est effectuée par inoculation de 10 µL de suspension bactérienne cryo-conservée dans 5mL de FT80m frais puis laissée croître sous anaérobiose 48h à 28°C. Cette première culture est utilisée pour inoculer 45 mL de milieu FT80m frais à DO_{600nm} :0,05 (1 UDO = 2·10⁸ UFC/mL). Une croissance pendant 24 h à 28 °C sous anaérobiose permet d'obtenir la culture de travail. Les cellulesensemencées à une DO_{600nm} initiale de 0,05 sont incubées à 28°C soit :

- (i) 24h afin d'atteindre le milieu de la phase exponentielle (DO_{600nm} : 0,6),
- (ii) 48h afin d'atteindre la phase stationnaire (DO_{600nm} : 1,2),
- (iii) 48h en presence de 8% d'éthanol.

Les cellules cultivées en présence de 8% d'éthanol ont été préalablement adaptées 48h dans une solution de FT80m enrichie en 4% d'éthanol.

Culture de *L. plantarum* :

Une première culture de *L. plantarum* est effectuée par inoculation de 10 µL de suspension bactérienne cryo-conservé dans 5mL de MRS pH 6,2 frais puis laissé croître sous anaérobiose 24 h à 28 °C. La solution bactérienne obtenue a été inoculée à DO_{600nm} : 0,05 dans 50 mL de MRS et incubée à 28 °C durant 3h afin d'atteindre le milieu de la phase exponentielle (DO_{600nm} : 0,6).

Purification des lipides membranaires d'après la méthode de Bligh and Dyer (1954):

L'équivalent de 50 unités DO (1 UDO = $1,10^8$ UFC/mL), pour chaque échantillon, a été lavé 2 fois dans de l'eau physiologique (9 g.L⁻¹ NaCl), puis re-suspendu dans 1 mL d'eau physiologique. Après ajout de 3,75 mL de CHCl₃/MeOH (1:2), la solution a été incubée une heure à température ambiante et mélangée vigoureusement toutes les 5 minutes. Ensuite, 1,25 mL de chloroforme et 1,25 mL d'eau physiologique ont été ajoutés. La solution a été centrifugée à 4°C durant 10 minutes à 3000g et la phase inférieure a été récupérée et stockée dans un tube en verre. Les échantillons sont soit conservés une semaine maximum à -20 °C soit utilisés après évaporation du chloroforme sous un filet d'azote pour la production de liposomes.

Production de liposomes :

Après évaporation du chloroforme par un flux d'azote, la pellicule lipidique ainsi formée dans le tube a été re-suspendue délicatement dans 10 mL de tampon phosphate à 50 mM pH 7 préalablement chauffés à 55 °C.

La pellicule lipidique obtenue a été re-suspendue par 2 cycles de sonication de 2 minutes chacun (Branson Ultrasonics™ CPX-952-138R, Branson Ultrasonics, Brookfield, CT, US). La solution est ensuite incubée 4 h à 55 °C afin de réhydrater les phospholipides. Les particules lipidiques ont ensuite été extrudées à travers une membrane en polycarbonate avec des pores de 1 µm de diamètre.

Les liposomes ont été conservés à 4 °C pendant une semaine au maximum.

3. Détermination de la composition en acides gras membranaires

Analyse des acides gras totaux par GCMS-NCI, réalisé par la Lipidomic Analytical Platform (LAP) de Dijon.

Les extraits lipidiques de la membrane obtenus par la méthode de Bligh et Dyer (50 µL) ont été mélangés avec 25 µL d'un mélange de standards internes d'acides gras (Avanti Polar Lipids, France) contenant : 1146 ng d'acide myristique-d3, 4973 ng d'acide palmitique-d3, 3703 ng d'acide stéarique-d3, 3174 ng d'acide linoléique-d4, 45,8 ng d'acide arachidique-d3, 1632 ng d'acide arachidonique-d8, 47,6 ng d'acide béhénique-d3, 476,1 ng de DHA-d5, 22,9 ng de Lignoceric-d4, et 17,6 ng d'acide cérotique-d4. Les acides gras totaux ont été quantifiés après hydrolyse alcaline par GCMS-NCI (Blondelle *et al.*, 2017)

Analyse des lipides par LCMS2 réalisé par la Lipidomic Analytical Platform (LAP) de Dijon.

Les extraits lipidiques de la membrane obtenus par la méthode de Bligh et Dyer (200 µL) ont été séchés sous vide et mélangés à un mélange d'étalons internes (50 µL) (CDN Isotopes, France et Cayman, France), (14:0)4CL (800 ng), (12:0)2DG (8 µg), et (21:0)2PC (50 ng). L'échantillon (1 µL) a été analysé par LCMSMS en utilisant une colonne Zorbax®Eclipse Plus C18 1,8 µm, 2,1 x 100 mm maintenue à 55 °C (Agilent Technologies).

Dans les faits, les digalactosyldiacylglycérols (DGDG), les monogalactosyldiacylglycérols (MGDG) et les diacylglycérols (DG) ont été séparés sur un système LC 1260 Infinity (Agilent Technologies) avec un gradient de phase mobile A (acétonitrile/eau/1M de formiate d'ammonium (60/39/1 v/v/v) avec 0,1% d'acide formique) et de la phase mobile B (isopropanol/acétonitrile/1M de formiate d'ammonium (90/9/1 v/v/v) avec 0,1% d'acide formique)(Cajka *et al.*, 2023) à un débit de 0,4 mLmL/min réglé comme suit : 1 min de maintien à 50% B ; 50-60% B en 4 min ; 60-85% B en 10 min ; 85-99% B en 1 min ; 2 min de maintien à 99%, 99%-50% ramp-down en 0.1 min et maintenu à 50% B pendant 3.9 min.

L'acquisition a été effectuée sur un triple quadripôle 6460 (Agilent Technologies) équipé d'une source ESI Jet stream (température 250 °C, nébuliseur 20 L/min, gaz de gaine 11 L/min, température du gaz de gaine 220 °C, capillaire 3500 V, buse 1000 V) fonctionnant en mode SRM (Single Reaction Monitoring) positif (fragmenteur 148 V, énergie de collision 23 V). Les transitions ont été définies comme la perte neutre de 359 Da pour le DGDG ou de 197 Da pour le MGDG à partir de leurs ions $[M^+NH_4]^+$ respectifs (Carriot *et al.*, 2021). Le DG (en tant qu'adduits NH_4^+) a été quantifié en fonction de la somme du signal résultant de la perte neutre de son acide gras sn-1 ou sn-2. Enfin, les concentrations en lipides ont été déterminées en calculant leur réponse relative au (12:0)2DG utilisé comme étalon interne.

Les phosphatidylglycérols (PG) et les lysyl-phosphatidylglycérols (lysyl-PG) ont été séparés avec les mêmes phases mobiles et la même colonne que pour les DG, et le gradient d'élution utilisé a été fixé comme suit : 2 min de maintien à 50% B ; 50-99% B en 14 min ; 2 min de maintien à 99%, 99%-50% ramp-down en 0,1 min ; retour aux conditions initiales en 1,9 min. L'acquisition a été effectuée sur un triple quadripôle 6460 (Agilent Technologies) équipé d'une source ESI Jet stream (température 200 °C, nébuliseur 20 L/min, gaz de gaine 11 L/min, température du gaz de gaine 220 °C, capillaire 3500 V, buse 1000 V) fonctionnant en mode positif Single Reaction Monitoring (SRM) (fragmenteur/collecteur 116 V/13 V et 300 V/34 V pour le PG et le Lysyl-PG respectivement). Les transitions ont été définies comme la perte neutre de 189 Da ou 300 Da pour les ions $[PG^+NH_4]^+$ et $[Lysyl-PG^+H]^+$ respectivement. Les concentrations en lipides ont été déterminées en calculant les rapports de réponse relatifs par rapport au (12:0)2DG utilisé comme étalon interne.

L'analyse des cardiolipines (CL) et des phosphatidylcholines (PC) a été réalisée comme décrit précédemment (Cotte *et al.*, 2019; Vial *et al.*, 2015), sauf qu'un système LC Vanquish, couplé à un spectromètre de masse Altis à triple étage quadripolaire (TSQ) équipé d'une source d'ionisation par électrospray chauffée (Thermo Scientific) a été utilisé (gaz de gaine, 50 arb ; gaz auxiliaire, 10 arb ; gaz de balayage, 1 arb ; température du tube de transfert d'ions, 325 °C ; température du vaporisateur, 350 °C et tension de pulvérisation d'ions, 3500 V (+), et 2500 V (-)). Les concentrations en lipides pour toutes les classes de lipides quantifiées ont été exprimées en pmol/mg d'extrait de Bligh et Dyer.

4. Mesure de l'activité lipochaperon par spectrofluorimétrie

La modification de la fluidité membranaire des liposomes a été suivie *in vitro* en présence ou en absence des protéines Lo18 ou Lo18 modifiée, afin d'évaluer l'activité lipochaperon de chaque protéine. L'activité lipochaperon de la protéine Lo18 a également été mesurée en présence de liposomes ayant différents profils lipidiques : soit des lipides provenant d'espèces bactériennes différentes (*O. oeni* et *L. plantarum*) soit des lipides issus de différentes phases de croissance d'*O. oeni* (i) phase exponentielle en condition de croissance optimale ou en présence d'éthanol, (ii) phase stationnaire. Pour ce faire, la fluidité membranaire a été suivie par des mesures d'anisotropie de fluorescence grâce à un spectrofluorimètre Fluorolog 3 (FLUOROLOG-3, Jobin Yvon Inc, USA) sur la plateforme DimaCell à Dijon. En effet, la fluidité membranaire est inversement proportionnelle à l'anisotropie de fluorescence (Figure 30).

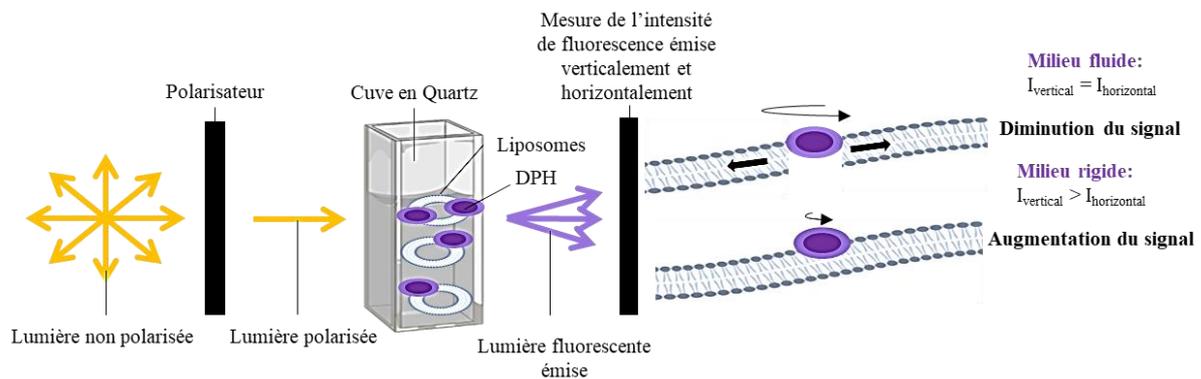


Figure 30 : Mesure d'anisotropie de fluorescence. Réalisée avec Biorender.

Pour chaque condition, la fluidification membranaire a été induite soit :

- Lors d'une rampe thermique d'une amplitude maximale de 15 °C à 84 °C permettant d'obtenir une vue d'ensemble de cette activité.
- Par un choc thermique à 45 °C maintenue 15 minutes permettant d'analyser le dynamisme de cette activité.

Analyse en rampe thermique :

Dans une cuve en quartz, 250 μ l de liposomes, 2,75 mL de tampon phosphate à 50 mM pH 7, 1 μ M de 1,6-diphényl-1,3,5hexatriène (DPH) ont été mélangés. Selon la condition testée, 10 μ M de la protéine Lo18 ou Lo18 modifiée ont été ajoutés. La modification de la fluidité des liposomes a été suivie sous agitation faible à 800 rpm lors d'une rampe thermique de 15 °C à 84 °C, avec un pas de 2 °C. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission étaient respectivement de 360 nm et 431 nm.

Analyse en choc thermique :

Deux cent cinquante microlitres de liposomes ont été ajoutés à 2,75 mL de tampon phosphate à 50 mM pH 7 dans une cuve en quartz et sous agitation faible à 800 rpm. Après approximativement 450 secondes à 20 °C, 1 μ M de la sonde DPH a été ajouté et l'incubation a été prolongée pendant 900 s. Ensuite, 10 μ M de la protéine Lo18 ont été ajoutés et incubés de nouveau pendant 300 s afin de laisser le système lipides DPH protéine se stabiliser (le même intervalle de temps a été respecté également en absence de la protéine Lo18). Un choc thermique à 45 °C a été effectué pendant 15 minutes. Comme pour la rampe thermique, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission étaient respectivement de 360 nm et 431 nm.

Des expériences complémentaires ont été menées *in vivo* en système hétérologue sur les souches de *E. coli* surexprimant les protéines Lo18 ou modifiées. Pour ce faire les cellules ont été cultivées dans du milieu LB enrichi en 50 μ g/mL de kanamycine jusqu'à atteindre une $DO_{600nm} = 0,2$. La production des protéines Lo18 ou Lo18 modifiées a été induite par ajout de 50 μ M d'IPTG et incubé à nouveau jusqu'à $DO_{600nm} : 0,6$. La suspension bactérienne a ensuite été lavée deux fois avec de l'eau physiologique (NaCl 9 g/L) et re-suspendue dans du tampon MES (50 mM de Acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique, 10 mM de glucose, ajusté à pH 4,8 avec du KOH) afin d'obtenir une concentration cellulaire de l'ordre de $5 \cdot 10^6$ UFC/ml. 3 mL de la suspension bactérienne ont été mélangés avec 1 μ L de DPH dans une cuve en quartz et sous agitation faible à 800 rpm. Mis à part l'ajout de la protéine Lo18, les mesures en choc thermique et en rampe ont été menées comme décrit *in vitro*.

Au moins trois mesures indépendantes ont été réalisées pour chacune des conditions testées sur l'anisotropie de fluorescence. Les valeurs d'anisotropie obtenues ont été normalisées pour être exprimées en pourcentage par rapport à la valeur initiale à T0.

5. Caractérisation de l'interaction Lo18/ lipides membranaires

a. Immunomarquage des phospholipides préférentiels

Afin d'établir la nature des interactions entre la protéine Lo18 et les lipides membranaires, l'interaction spécifique de Lo18 avec différents phospholipides a été testée selon les critères suivants ; (i) degré d'insaturation, (ii) charge de la tête polaire. Pour cela, une expérience d'interaction lipides/protéines (Lipid protein overlay assay ; LPO) a été menée (Dowler *et al.*, 2002.) via l'immunomarquage de l'interaction entre la protéine Lo18 et des phospholipides ancrés à une membrane de PVDF (Figure 31).

En détail, 2 μ L de dipalmitoyl phosphatidyléthanolamine (DPPE), dioléoyl phosphatidyléthanolamine (DOPE), acide dioléoyl phosphatidique (DOPA), dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC), dioléoyl phosphatidylcholine (DOPC), dipalmitoyl phosphatidylglycérol (DPPG) ou dioléoyl phosphatidylglycérol (DOPG) (Avanti polar, Etats Unis) à 1,5 mM ont été déposés sur une membrane de PVDF (Fisher scientific, Etats-Unis). La membrane a été incubée 1h, sous agitation à 70 rpm à température ambiante dans une solution de Régilait 5%/ TBS enrichie en protéines Lo18 à 7,5 μ g/mL. La membrane a ensuite été lavée par agitation douce (60 rpm) avec du TBS puis incubée successivement en présence d'anticorps primaire et secondaire, dilués respectivement à 1/750 et 1/2000. L'interaction entre l'anticorps secondaire et Lo18 a été révélée par chimioluminescence via un kit ECL (Thermo Fisher, Etats-Unis).

En parallèle, les mêmes phospholipides ont été déposés sur une membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène) et marqués durant 15 minutes au Nile Red à 50nM afin de vérifier leur accroche sur la membrane.

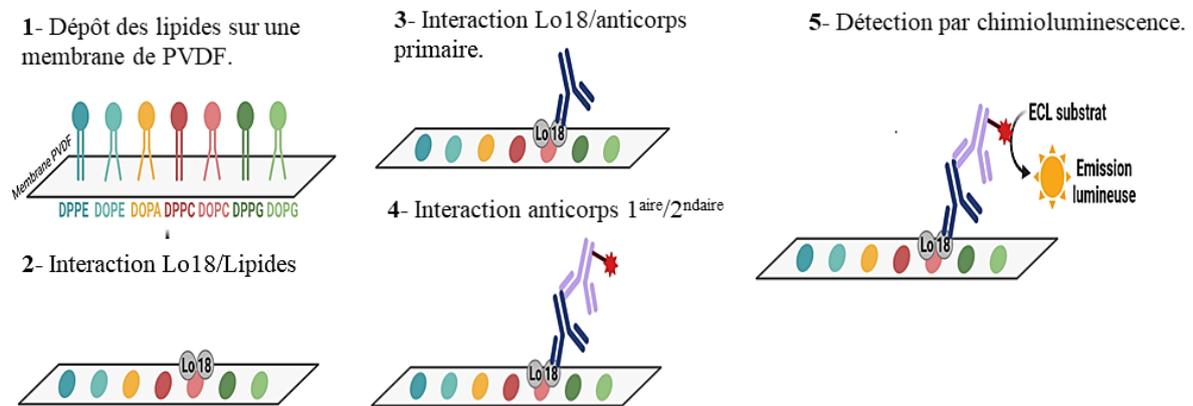


Figure 31 : Immunomarquage des interactions entre la protéine Lo18 et différents phospholipides. Réalisée avec Biorender

b. Dynamique d'interaction lipides/protéines par Switch-SENSE®

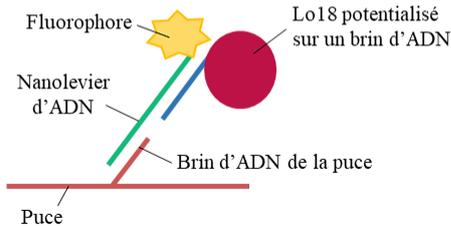
Afin de caractériser le dynamisme de cette interaction, des expérimentations de « Switch-sense » ont été réalisées en collaboration avec Paloma Fernandez-Varela de Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Université Paris-Saclay.

Sur une puce, des nanoleviers d'ADN sont actionnés électriquement par des microélectrodes lors de la liaison entre deux molécules. En effet la molécule d'intérêt est potentialisée sur le brin complémentaire du brin d'ADN présent sur la puce. En parallèle, le ligand de la molécule est injecté dans l'environnement de la puce par microfluidique. Lors de l'interaction entre la molécule et son ligand, le fluorophore présent à l'extrémité du brin matrice va détecter le changement dans son environnement local. Cette modification va se traduire par un changement du signal reçu (Figure 32).

En pratique, la première étape a consisté à potentialiser la protéine Lo18 sur un brin d'ADN complémentaire à celui de la puce en suivant les recommandations du fabricant (kit Dynamic biosensors amine coupling kit 1 for protéine >5 kb).

Puis, 100 nM de protéines ont été fonctionnalisés sur la puce et 30mM de liposomes ont été introduits dans le système par des techniques de microfluidique. Des mesures d'interaction entre la protéine et les liposomes ont alors été menées au cours du temps à 20 °C, et analysées directement en utilisant le logiciel de Dynamic Biosensors.

1- Potentialisation de Lo18 sur le nanolevier d'ADN



2- Introduction des liposomes par microfluidique

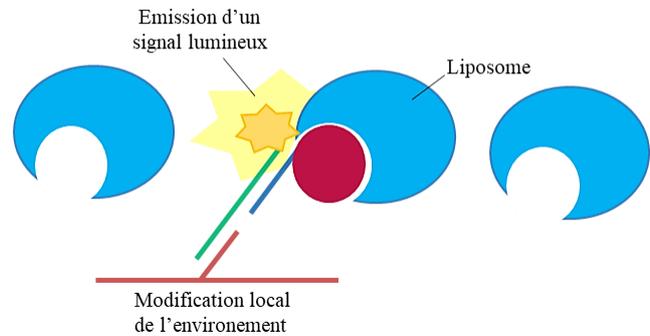


Figure 32 : Mesure par Switch-SENSE du dynamisme d'interaction entre la protéine Lo18 et les liposomes.

c. Charge de Lo18, mesure du potentiel zêta

La charge de la protéine Lo18 a été déterminée par mesure de son potentiel zeta. La vitesse de déplacement des particules de Lo18 soumises à un courant de 120V a été mesurée à l'aide d'un Zétamètre (ZetaCompact, CAD instruments, France). Pour cela, des solutions de PBS à 0,2 M (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄ 10 mM et KH₂PO₄ 1,8 mM) et à différents pH (2 à 8) complémentés avec 250 µL à 3 mg/mL de Lo18 purifiée ont été utilisées pour mesurer la charge de la protéine aux différents pH. Pour chaque pH dix mesures ont été effectuées.

F. Caractérisation des biofilms formés en présence de Lo18

La formation de biofilm de (i) *E. coli* et (ii) *O. oeni* en présence de la protéine Lo18 dans le milieu de culture a été décrite, afin d'observer l'impact de Lo18 dans la réponse au stress au niveau de la population bactérienne.

1. Formation de biofilm sur microplaque de polystyrène

Après avoir réalisé une préculture, les cellules d'*O. oeni* sont inoculées à DO_{600nm} : 0,1 dans du milieu FT80m et inoculée à raison de 1mL par puits dans une microplaque de polystyrène 24 puits. Les cellules sont incubées à température optimale (respectivement 28 °C et 37 °C) pendant 24h. Pour les échantillons tests, le milieu de culture est enrichi en protéine Lo18 à 10 μ M ou d'un lysat cellulaire enrichi en Lo18 sauvage ou modifiée (A123S, Y107A, Δ Cter) . Les puits ont ensuite été lavés soigneusement deux fois avec du PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaH_2PO_4 10 mM et KH_2PO_4 1,8 mM) avant de décrocher les biofilms par aspiration-refoulement et griffage vigoureux. Un dénombrement sur milieu FT80m gélosé est alors réalisé.

2. Mesure de l'épaisseur des biofilms par microscopie confocale

L'aspect des différents biofilms formés a été analysé sur la plateforme DimaCell de Dijon par microscopie confocale à l'objectif x10. Les puits ont été lavés délicatement avec du PBS. 7.5 μ M de Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (cFDA) (7,5 μ M) a été ajoutés afin de marquer respectivement les bactéries vivantes avant d'être incubés 15 minutes à 28 °C. Chaque échantillon a été excité à 750 nm avec un laser de 2487 mV utilisé à 4% de sa puissance. Les images obtenues suite à l'acquisition des biofilms formés ont été analysées dans leur axes x, y et z sur un volumes de 1 mm³. Les données de neuf répétitions ont ensuite été traitées avec le logiciel LAS X (Nikon). L'épaisseur des biofilms a été mesurée sur l'axe z, à raison d'une mesure tous les 100 μ m, soit 10 mesures par biofilm.

3. Résistance aux stress thermique et alcool des cellules en biofilm d'*O. oeni*.

Des biofilms d'*O. oeni*, en présence ou en absence de Lo18, ont été cultivés comme décrit dans le paragraphe III.F.1. Le milieu de culture des puits a ensuite été minutieusement remplacé par un tampon MES à pH 7 (pour les puits témoins et le stress thermique) ou à pH 2,5 (pour le stress acide).

Les puits soumis au stress acide et les puits témoins ont été incubés pendant 4 heures à 28°C, tandis que ceux soumis au stress thermique ont été incubés à 45°C pendant 4 heures. Les cellules formant les biofilms de chaque puits ont été soigneusement détachées par aspiration-refoulement et grattage vigoureux. Un dénombrement sur milieu FT80m a ensuite été réalisé.

G. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des résultats obtenus par anisotropie de fluorescence, thermostabilisation protéique, SRCD, lipidomique, immunomarquage, résistances au stress et microscopie confocale, ont été réalisées par le logiciel statistique RStudio (version 1.2.5033). La normalité de la distribution et l'homogénéité des variances de chaque condition ont été testées par le test de Shapiro-Wilk et le test de Bartlett, respectivement. Ensuite, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les échantillons avec un niveau de signification de $\alpha = 0,05$. Tous les tests statistiques ont été considérés comme significatifs à une valeur $p < 0,05$.

IV. RESULTATS



Lors de stress environnementaux, comme les stress thermiques, nutritionnels, osmotiques ou oxydatifs, différents composants cellulaires vont être négativement impactés, pouvant entraîner la mort de l'ensemble de la population cellulaire. En effet, au niveau du cytoplasme, les protéines natives peuvent se déplier au point de devenir non fonctionnelles (Karshikoff *et al.*, 2015). Pour éviter la perte de structure et de fonctions de ces protéines, les protéines de choc thermique (HSP), dont les small HSPs (sHSPs), peuvent intervenir. Les HSPs permettront de replier les protéines natives, partiellement dépliées par le stress, en exerçant leur rôle de chaperon moléculaire (Beltramo *et al.*, 2004; Jobin *et al.*, 1997, 1999; Mills *et al.*, 2005; Olguín *et al.*, 2010). Au niveau de la membrane, premier senseur du stress, certaines sHSPs peuvent également jouer un rôle de lipochaperon moléculaire en participant à la maintenance d'une fluidité membranaire optimale (Bonomo *et al.*, 2018; Chu-Ky *et al.*, 2005). Actuellement, seul un petit nombre de sHSP est décrit pour cette seconde activité. De ce fait, les mécanismes impliqués dans l'interaction entre les membranes et les sHSPs restent encore peu compris (Balogi *et al.*, 2008; De Maio *et al.*, 2019; Glatz *et al.*, 2016; Maitre *et al.*, 2012; Nitta *et al.*, 2005; Tsvetkova *et al.*, 2002; Vigh *et al.*, 2007; Weidmann *et al.*, 2010; H. Zhang *et al.*, 2005). Le peu de données disponibles dans la littérature indiquent qu'il semblerait que, lorsque les oligomères se dissocient en dimères aux abords de la membrane, des forces électrostatiques et hydrophobes déforment la protéine, lui permettant ainsi de pénétrer dans la membrane et de contribuer au maintien de sa fluidité (Chen *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2018; Maitre *et al.*, 2012; Tsvetkova *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005). Enfin, au niveau de la population, un impact positif sur la formation de biofilm a également été décrit pour quelques sHSPs, notamment chez *Mycobacterium ulcerans* (Diaz *et al.*, 2006, Pidot *et al.*, 2018), chez *E. coli* (Kuczynska-Wisnik *et al.*, 2010) ou chez *L. plantarum* (Rajasekharan & Shemesh, 2022).

Concernant la sHsp Lo18, de précédant travaux ont démontré les liens existant entre sa plasticité oligomérique et ses fonctions (Coucheney *et al.*, 2005; Delmas *et al.*, 2001; Jobin *et al.*, 1997; Maitre *et al.*, 2012; Weidmann *et al.*, 2010). En effet, Lo18 est retrouvée au niveau des membranes sous forme de dimères (Maitre *et al.*, 2012, 2014) alors que pour exercer son activité chaperon elle est présente dans le cytoplasme sous différentes formes oligomériques pouvant aller jusqu'à 16 sous-unités (Maitre *et al.*, 2012). De plus, Lo18 a une affinité plus importante pour les substrats lipidiques que pour les substrats protéiques (Maitre *et al.*, 2014).

Dans ce contexte, les mécanismes fondamentaux impliqués dans la mise en place de l'interaction entre la protéine Lo18 et les membranes ont été étudiés, en utilisant des approches *in silico*, *in vitro* et *in vivo* (mesures d'anisotropie de fluorescence, dichroïsme circulaire, techniques d'immunomarquage ou de modélisation). Dans ces travaux, l'attention a été portée d'une part sur les modifications de structure de Lo18 en fonction (i) des conditions environnementales et (ii) de la nature des lipides membranaires et d'autre part sur le rôle de certains acides aminés conservés au sein des sHSPs dans l'activité lipochaperon.

En parallèle, l'apport de Lo18 dans la formation de biofilm a été recherché. En effet, de précédents travaux réalisés au laboratoire ont montré que la protéine Lo18 est également produite dans les cellules en biofilm (Bastard *et al.*, 2016). Grâce à son association avec les membranes, Lo18 pourrait alors être excrétée dans le milieu extracellulaire, par des mécanismes encore inconnus et exercer un rôle dans la structure du biofilm.

A. Activité lipochaperon des sHSPs, une histoire de structure ?

1. Introduction

Au cours de l'évolution, le domaine α -cristallin des sHSPs, a été soumis à une pression évolutive importante liée à l'adaptation au stress, menant à une forte hétérogénéité de séquences entre les sHSPs (Kriehuber *et al.*, 2010; Mogk *et al.*, 2019). Cependant malgré cette hétérogénéité de séquences, les structures secondaires, tertiaires et quaternaires ainsi que les fonctions des sHSPs sont semblables (de Jong *et al.*, 1998; Poulain *et al.*, 2010). Cela suggère que certains résidus de l' α -cristallin pourraient jouer un rôle crucial dans la structure et les fonctions des sHSPs. Cette hypothèse a été largement démontrée en ce qui concerne l'activité chaperon des sHSPs. En effet, les études de Lentze et collaborateurs (Lentze *et al.*, 2003; Lentze & Narberhaus, 2004) ont révélé que des modifications ponctuelles au niveau du domaine α -cristallin ont un impact significatif sur la structure et l'activité chaperon de la protéine HspH de *Bradyrhizobium japonicum* (Lentze *et al.*, 2003). Des résultats similaires ont été observés pour les protéines Ta16.9 de *Triticum aestivum*, Ps18.1 de *Pisum sativum* (Santhanagopalan *et al.*, 2018), Hsp16.9 du blé (van Montfort *et al.*, 2001), Hsp16.3 de *Mycobacterium tuberculosis* (Mao & Chang, 2001), ainsi que pour Lo18 (Weidmann *et al.*, 2010).

En ce qui concerne l'activité lipochaperon des sHSPs, aucune étude n'a encore démontré de lien entre la structure de la protéine et sa capacité à interagir avec les lipides membranaires. Néanmoins, nous avons pu identifier, chez les sHSPs déjà décrites comme ayant une activité lipochaperon la présence de quatre motifs d'acides aminés hautement conservés qui pourraient potentiellement impacter la structure et la fonction lipochaperon de ces sHSPs (Bellanger & Weidmann, 2023). Au sein de ces motifs, 4 acides aminés semblent particulièrement conservés : l'acide aspartique en position 60 (E60), la thréonine en position 79 (T79), la glycine en position 82 (G82) et l'arginine en position 99 (R99). En se basant sur les propriétés physico-chimiques de ces acides aminés, quatre protéines modifiées ont été générées. L'acide aspartique (E60), chargé négativement, a été substitué par une lysine (K) chargée positivement, générant la protéine modifiée Lo18-E60K. La thréonine (T79) a été remplacée par une valine (V) pour éliminer le groupement alcool de la thréonine, engendrant ainsi la protéine modifiée Lo18-T79V, limitant potentiellement l'interaction de Lo18 avec ses substrats. La glycine (G82) a été substituée par une valine (V), générant la protéine modifiée G82V, pouvant influencer la liaison des deux plans du domaine α -cristallin (ACD). Enfin, l'arginine (R99), porteuse d'une charge positive, a été remplacée par un acide glutamique (D) chargé négativement, permettant d'obtenir la protéine modifiée R99D.

La surproduction et la purification de ces protéines modifiées a permis de conduire des études *in vitro* de caractérisation de l'activité chaperon par mesure de la thermostabilisation de protéines cellulaires ou de l'activité lipochaperon par mesures d'anisotropie de fluorescence. Les activités lipochaperon de ces protéines ont été également évaluées *in vivo* chez *E. coli*. Simultanément, nous avons suivi l'évolution des structures secondaires, tertiaires et quaternaires de ces protéines, d'abord seules, puis lors de leurs interactions avec les lipides membranaires. Les structures secondaires ont été étudiées par dichroïsme circulaire à rayonnement synchrotron (SRCD), en collaboration avec les Dr. Frank Wien (Synchrotron SOLEIL), Dr. Sophie Combet et Dr. Paloma Varela-Fernandez (Université Paris-Saclay). Les structures tertiaires et quaternaires ont été étudiées respectivement par modélisation en collaboration avec le Pr. Patrick Senet et le Dr. Patrice Delarue (ICB Dijon) ou par immunomarquage en réponse à une augmentation de la température.

Pour enrichir notre compréhension sur le fonctionnement des sHSPs de bactéries lactiques, une collaboration avec le Dr. Maria Teresa Rocchetti de l'équipe du Dr Daniela Fiocco (Université de Foggia, Italie) a permis d'appliquer nos connaissances à l'étude des 3 sHSPs de la bactérie lactique *L. plantarum*.

Dans ce cadre, l'activité lipochaperon de ces sHSPs a été recherchée et leurs structures primaires ont été analysées afin de rechercher les motifs hautement conservés précédemment décrits.

L'ensemble des résultats obtenus sont présentés dans cette partie sous forme d'articles publiés et de résultats complémentaires.

2. Article de recherche 1 :

Titre: Significant influence of four highly conserved amino acids in lipochaperon-active sHsps on the structure and functions of the Lo18 protein.

Auteurs : Tiffany Bellanger¹, David da Silva Barreira¹, Frank Wien², Patrice Delarue³, Patrick Senet³, Aurélie Rieu¹, Fabrice Neiers⁴, Paloma Fernández Varela⁵, Sophie Combet⁶, Stéphanie Weidmann^{1*}.

¹ Procédés Alimentaires et Microbiologiques (PAM), AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, Laboratoire VAIMiS-IUVV, Dijon, France.

* Correspondence: stephanie.desroche@u-bourgogne.fr

²: Synchrotron SOLEIL, L'Orme des Merisiers, Saint Aubin BP 48, 91192, Gif-sur-Yvette, France.

³: Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne, UMR 6303 CNRS, Université de Bourgogne Franche-Comté, 21078 Dijon, France.

⁴: Laboratory: Flavour Perception: Molecular Mechanisms (Flavours), INRAE, CNRS, Institut Agro, Université de Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France.

⁵: Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198 Gif-sur-Yvette, France.

⁶: Laboratoire Léon-Brillouin (LLB), UMR12 CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, F-91191, Gif-sur-Yvette CEDEX, France

Keywords: lipochaperon activity, small Heat Shock Protein, structural modification, point-mutation, fluidity regulation, lactic acid bacteria

Publié à Scientific reports (IF : 4.99)

Autorisation des principaux éditeurs de réutiliser le contenu.

Summary

To cope with environmental stresses, bacteria have developed different strategies, including the production of small heat shock proteins (sHSP). All sHSPs are described for their role as molecular chaperones. Some of them, like the Lo18 protein synthesized by *Oenococcus oeni*, also have the particularity of acting as a lipochaperone to maintain membrane fluidity in its optimal state following cellular stresses. Lipochaperon activity is poorly characterized and very little information is available on the domains or amino acids key to this activity. The present aim is to investigate the importance at protein structure and function level of four highly conserved residues in sHSP exhibiting lipochaperon activity. Thus, by combining *in silico*, *in vitro* and *in vivo* approaches the importance of three amino acids present on the core of the protein was evidenced in maintenance of both the structure of Lo18 and its functions.

Introduction

One consequence of environmental stresses is a change in membrane fluidity of the cells to offset the physical stress effects on the membrane (Beney & Gervais, 2001). Unfortunately, these stresses inducing modifications can still damage the cell, leading to multiple consequences at the membrane and cytoplasmic level, thus having a very strong impact on the fitness of the bacteria. Lactic acid bacteria (LAB) are not exempt from these consequences, especially since they evolve in harsh environments (Fonseca *et al.*, 2019). For example, the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*, involved in malolactic fermentation, is subjected to various stresses affecting its membrane fluidity, such as acid, alcohol, or thermal modifications (Tourdot-Maréchal *et al.*, 2000). During its evolution, *O. oeni* has developed different strategies to adapt to these stresses, such as the regulation of its internal pH, the modification of its membrane composition and the synthesis of stress proteins (Beltramo *et al.*, 2004; Bonomo *et al.*, 2018; Guzzo *et al.*, 1997; Jobin *et al.*, 1997).

Among the different stress proteins involved in counteracting the deleterious effect of stress, the present study focuses on Lo18, the unique small heat shock protein (sHSP) encoded by *O. oeni*. sHSPs are small proteins ranging from 12 to 35 kDa (Ingolia & Craig, 1982), with highly heterogeneous primary sequences, especially in the variable terminal domains, but they also contain a conserved α -crystallin domain (Lentze *et al.*, 2003; Mogk *et al.*, 2019). In the latter domain, a sandwich structure like that found in immunoglobulins, is necessary for their activities (Haslbeck *et al.*, 2005; Tikhomirova *et al.*, 2017).

Indeed, all sHSPs have been reported to protect against stressed-protein aggregation through their molecular chaperone activity (Haslbeck & Vierling, 2015; Mogk *et al.*, 2019; Obuchowski & Liberek, 2020). In addition, some of them have been found to also interact with the membrane to exert a lipochaperon activity, by maintaining optimal membrane fluidity, crucial for cell survival. For example, HSPA from *Synechococcus sp.* (Nitta *et al.*, 2005; Obuchowski & Liberek, 2020), HSP17 from *Synechocystis sp.* (De Maio & Hightower, 2021; Török *et al.*, 2001), HSP17.8 from *Arabidopsis thaliana* (Kim *et al.*, 2011) HSP15.8 and HSP16 from *Schizosaccharomyces pombe* (Glatz *et al.*, 2016) and HSP18.55 from *Lactiplantibacillus plantarum* (Rocchetti *et al.*, 2023) have been described as possessing this second activity.

Lo18 is also one of the sHSPs that carries out both these activities. Previous studies have shown that after heat or ethanol stresses, Lo18 interacts as a dimer at the membrane level to rapidly stop increasing membrane fluidity (Coucheney *et al.*, 2005; Maitre *et al.*, 2012, 2014; Weidmann *et al.*, 2010). Currently, few data are available in the literature on the molecular mechanisms involved in lipochaperon activity, either for Lo18 or for the other lipochaperon sHSPs (Bellanger & Weidmann, 2023).

Recently, it has been observed that all sHSP with lipochaperon activity have certain highly conserved amino acids (Bellanger & Weidmann, 2023). In order to assess the importance of these amino acids, four of them (three located in the core of the protein and one located in an adjacent loop) were studied for their possible roles in maintaining the structure and functions of *O. oeni* sHSP Lo18. Proteins modified for these amino acids were produced. *In silico*, *in vitro* and *in vivo* approaches were then used to characterize these different proteins, notably for their structure and their lipochaperon and molecular chaperon functions. The data obtained indicated that (i) on the core of the protein, the mutations resulted in a modification of the ratio between α -helices and β -sheets, particularly affecting lipochaperon activity; (ii) on the loop between β 5 and β 7, the mutation affected the protein's structure, insertion and rigidification capacities, without major loss of functions.

Results

Key aminoacids for Lo18 lipochaperon activity

To investigate the protein domain of sHSP involved in membrane interaction, four proteins with amino acid substitutions were produced (Figure 33A). These amino acids are highly conserved residues among sHSP with lipochaperon activity (Bellanger & Weidmann, 2023).

The E60K, T79V, G82V and R99D substitutions of Lo18 correspond to the main conserved residues of the “ELPG” motif, upstream of the β 4 strand for the E60K substitution, the “LTISGKRE” motif on the β 5 strand for the T79V and G82V substitutions, and “RSERSYGSFR” motif on the β 6/ β 7 strands for the R99D substitution (Bellanger & Weidmann, 2023).

The variation of the membrane fluidity of liposomes formed by lipids extracted from *O. oeni* cells was measured by steady-state fluorescence anisotropy of DPH in the absence or presence of Lo18 or modified protein following (i) temperature ramping (15 °C to 63 °C, with step of 2 °C/min), (Figure 33B to 33F) and (ii) heat shock at 45 °C (Figure 33G to 33K).

Concerning the thermal ramping, all conditions (with or without sHsp) are similar at 15°C, with an anisotropy value of around 0.2. Increasing temperature causes liposomes to fluidize, resulting in a decrease in fluorescence anisotropy ranging from 0.195 to 0.075 for liposomes alone (62% decrease) versus 0.204 to 0.156 (24% decrease) for liposomes in the presence of Lo18 protein. The modified proteins presented significantly different profiles, with lipochaperon activity reduced by 40% and 50% for the T79V and G82V proteins (fluorescence anisotropy ranging from 0.189 to 0.114 and 0.205 to 0.101 respectively), and abolished for E60K with a reduction of around 52% (fluorescence anisotropy ranging from 0.195 to 0.094) similar to conditions without Lo18 or in the presence of lysozyme (negative control). For the R99D protein (modification of the β 6/ β 7 loop), lipochaperon activity is maintained with a decrease in fluorescence anisotropy of around 40%; anisotropy values are low (ranging from 0.144 to 0.097), but it should be noted that the starting anisotropy is low and the slope of the curve is similar to the slope of the curve obtained with the Lo18 protein (Supplementary data; Tableau 7).

For the R99D protein (modification of the β 6/ β 7 loop), a decrease in fluorescence anisotropy of around 40% are observed (ranging from 0.144 to 0.097). However, it should be noted that the starting anisotropy is low and the slope of the curve is similar to the slope of the curve obtained with the Lo18 protein (Supplementary data S1). Together these two points suggest a transient decrease in lipochaperon activity, particularly at low temperatures.

For the measurement of fluorescence anisotropy following heat shock at 45°C, three phases can be defined: (i) the equilibration phase, in which the reaction mix consists of liposomes and DPH probe in buffer, (ii) the addition of modified or unmodified sHsp or lysozyme, and (iii) the application of heat shock. Fluorescence anisotropy at the start of the experiment is similar under all conditions (value around 0.15).

The addition of Lo18, T79V and G82V proteins significantly increases fluorescence anisotropy by 45%, 30% and 26% respectively (anisotropy values of 0.149 to 0.205 for Lo18, 0.147 to 0.191 for T79V and 0.161 to 0.203 for G82V), suggesting that the presence of the protein immediately rigidifies the liposomes. No significant differences were observed when E60K, R99D and lysozyme were added. Heat shock at 45°C rapidly fluidized liposomes, which showed fluorescence anisotropy ranging from 0.205 to 0.159 (22% decrease) in the presence of Lo18, or from 0.155 to 0.091 in the absence of protein (41% decrease). Only the R99D protein showed anisotropy values and a thinning profile similar to those obtained for Lo18 (ranging from 0.178 to 0.163). The addition of E60K, T79V and G82V proteins does not limit fluidization. In the presence of these proteins, the final fluorescence anisotropy fluctuates between 0.128 and 0.124. These values are significantly close to those obtained in the presence of lysozyme (negative control) (Figure 33, Supplementary data; Tableau 7).

In summary, following induced amino acid modifications, lipochaperon activity is either abolished (E60K), decreased (T79V and G82V), or transiently decreased (R99D).

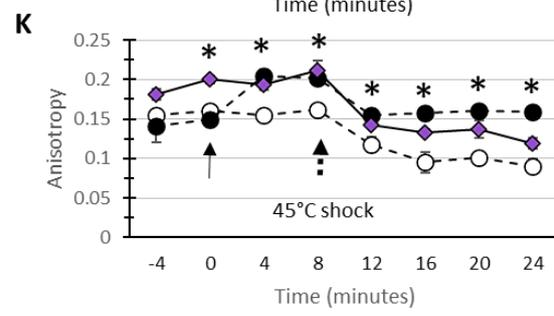
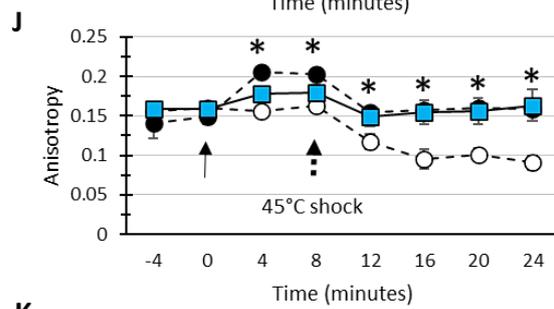
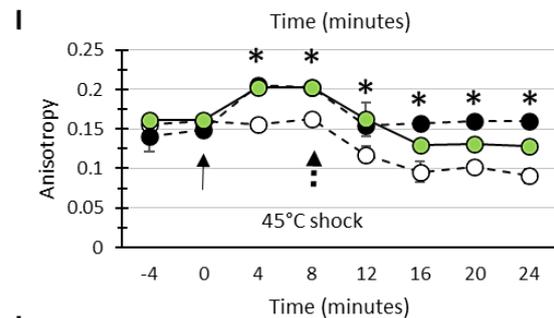
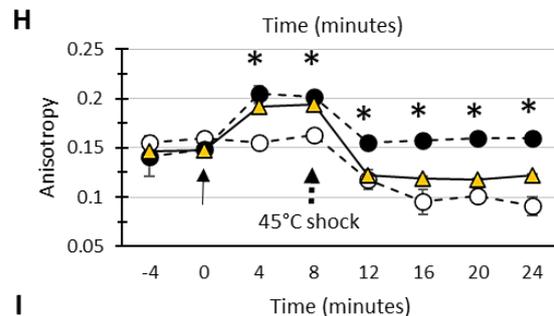
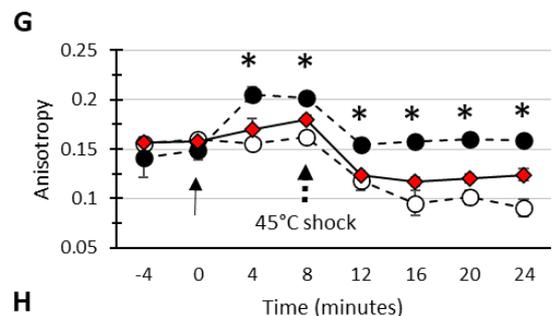
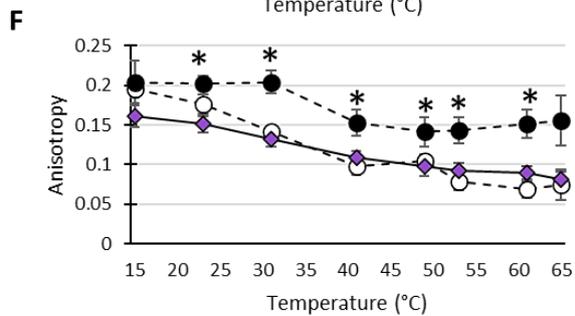
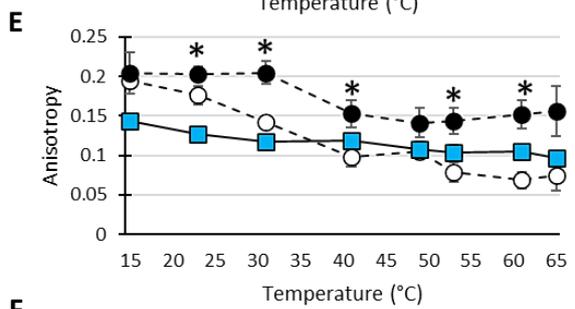
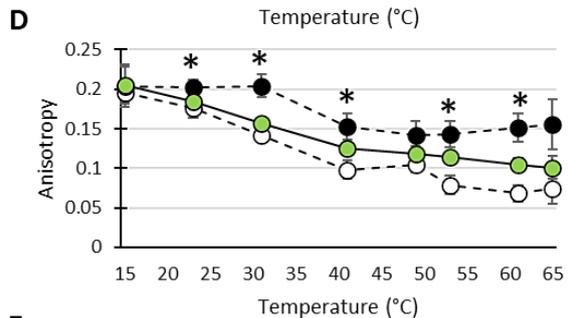
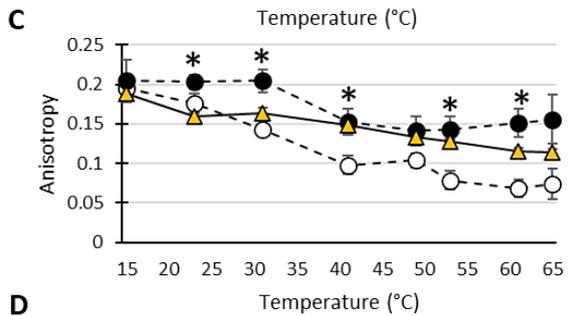
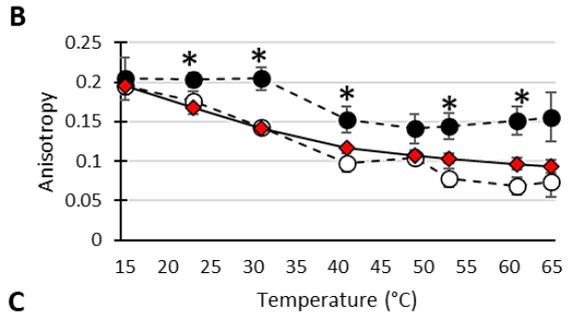
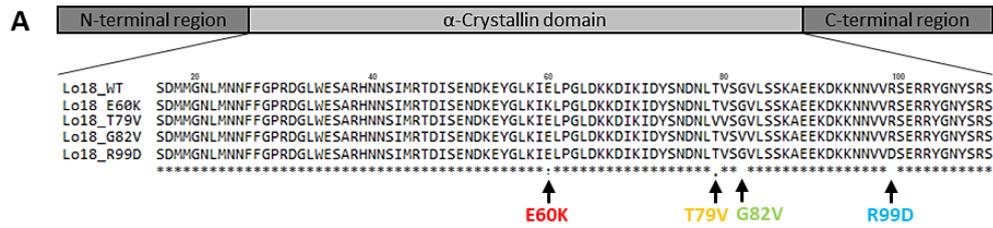


Figure 33 : Lipochaperon activity of Lo18 or modified proteins. (A) Sequence alignment of Lo18 or modified proteins. The alignments are performed on the α -crystallin domain of *O. oeni* Lo18 (accession number CAA67831) or modified after point substitution. The following E60K, T79V, G82V and R99D modifications are indicated with arrows below the sequences. The alignment was performed with MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Stars, double points and points indicate amino acid residues that are identical in 100%, 80% and 60%, respectively, of all the proteins. (B to K) Measurement of the fluorescence anisotropy of DPH inserted into *O. oeni* liposomes during a temperature rise between 16 and 64°C (B to F) or after a thermal shock at 45°C (G to K). Each panel illustrates liposome fluidisation in the absence of Lo18 (represented by a dotted line and white circles), in the presence of Lo18 WT (represented by a dotted line and black circles), or modified variants of Lo18, namely E60K (red circles) in panels B and G, T79V (yellow diamonds) in panels C and H, G82V (green triangles) in panels D and I, and R99D (blue squares) in panels E and J. Lysozyme (represented by purple diamonds) in panels F and K was used as a negative control in this experiment. For heat shock at 45°C (G to K), three phases were defined: the equilibration phase (before 0 min), in which the reaction mixture consists of liposomes and the DPH probe in buffer, the addition of sHSPs (represented by a solid arrow) and the application of heat shock at 45°C (dotted arrow). The data represent the means and SEs of three independent experiments.

Key aminoacids for Lo18 chaperon activity

The thermostability at 55°C of a pool of proteins present in an *E. coli* cell lysate was evaluate after overproduction of Lo18 or the modified proteins. The relative quantity of each protein was assessed before and after induction of heat stress by electrophoresis, allowing comparison of the quantities of protected proteins, which depend on the concentration of the chaperone protein present in the corresponding lysate (Supplemental data; Figure 39). In the presence of the Lo18 protein, 35% of the cells in the cell lysate aggregated under heat stress (from 3.5 mg/mL to 2.3 mg/mL). Conversely, lysate protein aggregation reached 67% in the negative control condition (3.5mg/mL to 1.2 mg/mL). All the modified proteins had a significantly reduced protein aggregation rate compared with the Lo18 condition with the exception of R99D, respectively 53.9% (1.6 mg/mL), 58.3 (1.5 mg/mL), 53.7 (1.6 mg/mL) and 49.2 (1.8 mg/mL) for E60K, T79V, G82V and R99D. Nevertheless, with the exception of T79V, the protein aggregation rate was significantly higher than in the control condition (Figure 34). The low rate of protein aggregation during heat stress reflects the chaperone activity of Lo18. As a consequence, apart from R99D, the other modified proteins have reduced (E60K and G82V) or abolished (T79V) chaperone activity.

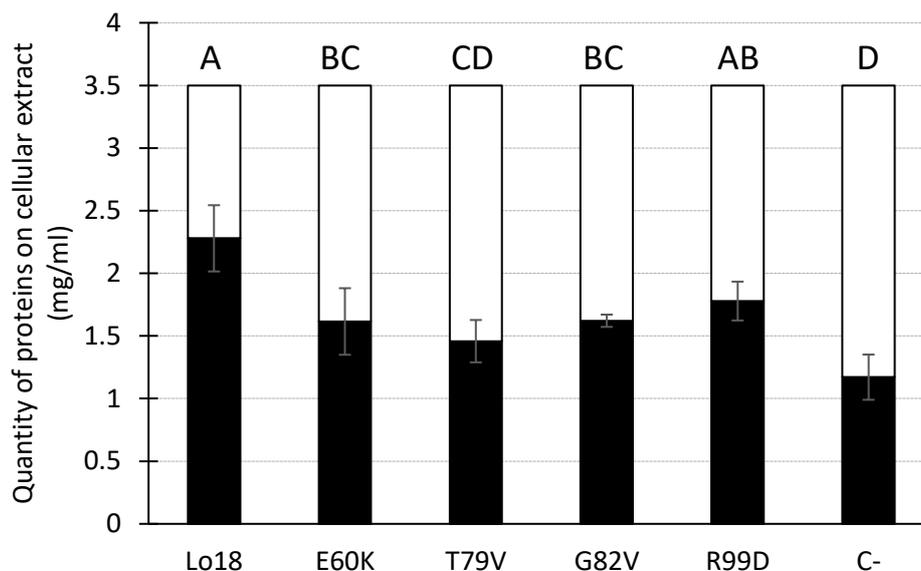


Figure 34 : Thermostabilization of proteins from *E. coli* cellular lysates were surproduction of Lo18 or modified protein are induced. *E. coli* construction with empty plasmid has been used as negative controle (C-). The protein concentration of the lysate was fixe at 3.5 mg/mL, then heat 30 minutes at 55°C. The amount of protein unaggregated were measured. The data represent the means and SE of three independent experiments.

Role of these conserved key amino acids in the structure of Lo18

In order to explain the change in the lipochaperon activity of the mutated proteins, their different structural levels were analyzed. *In silico* measurements of the distances between the modified amino acids (E60K, T79V, G82V and R99D) and their adjacent amino acids showed a modification of these distances, affecting the probability of their putative interactions. One exception was the T79V substitution for which no major modification was predicted (Figure 35). For the E60K substitution, the glutamic acid residue at position 60 (E60-red) have the correct distance to bind with three amino acids (blue) present on the β 2 and β 9 strands (Figure 35). Once modified with lysine (60K), these interactions lapsed and were replaced by a possible interaction with 2 other amino acids on the β 9 strand (green) (Figure 35). The impact of the G82V substitution on the distance interaction of adjacent amino acids was much pronounced. Glycine at position 82 (G82-red) could bind to four amino acids (blue) present on strands β 4, β 5, and β 7. The substituted valine (82V) created two potential additional interactions with two amino acids present between the β 3 and β 4 strands and on the β 4 strand (green), without glycine being able to physically bond with all the amino acids.

In addition, the presence of valine created a steric imbalance that resulted in the rotation of the aromatic rings of tyrosine at position 107 (Y107) (Figure 3). Because this tyrosine has been described linking the two planes of the α -crystallin domain together (Bellanger & Weidmann, 2023), the G82V substitution could disrupt the β -sandwich structure of the α -crystallin domain. In the R99D substitution, the aspartic acid in position 99 (99D-red) was no longer accessible to interact with the aspartic acid in position 90 (D90-blue) present on the β_6 loop, compared to the original arginine (R99-red) (Figure 35). At least E60, G82 and Y107 residues have a correct distance to allow their interaction each other to stabilize the monomer structure.

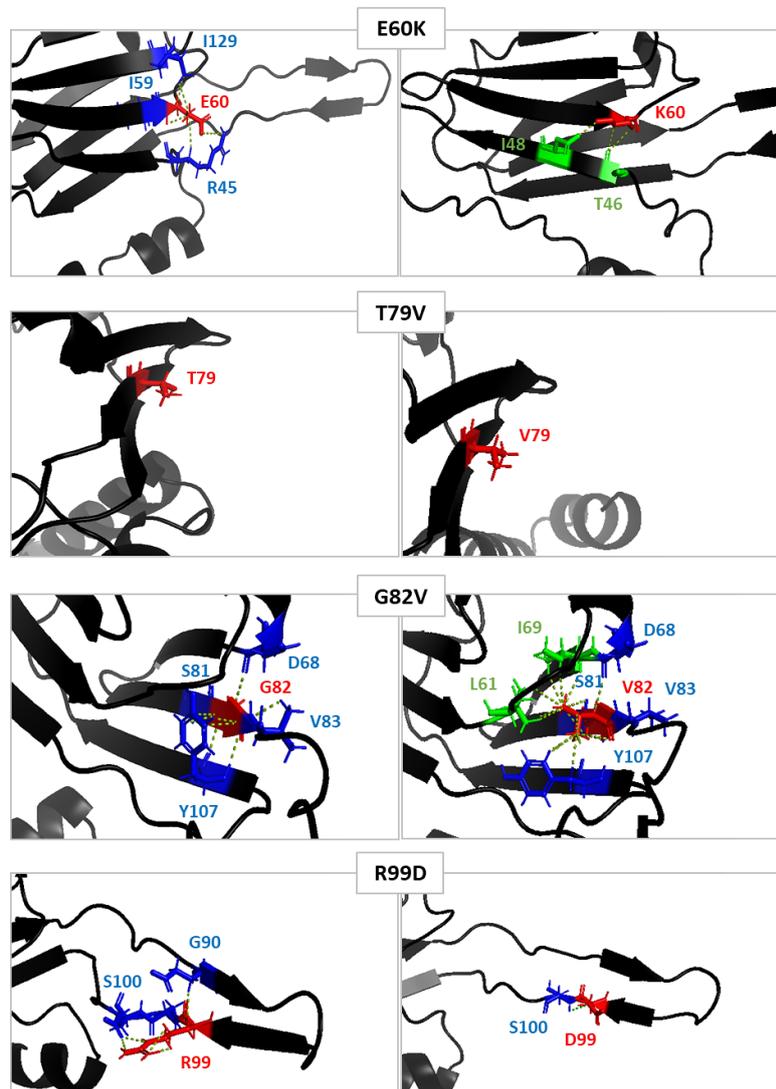


Figure 35 : Protein structure modifications induced by point mutation by in silico measurement. Impact of E60K, T79V, G82V and R99D amino acid substitution on predicted 3D Lo18 structure. Substituted amino acids are represented in red, neighbor amino acids able to interact with the initial residues in blue and neighbor amino acids able to interact with substituted residues in green. Interactions between amino acids are represented by yellow dotted line.

To describe further the changes in the secondary structure of these proteins, *in silico* prediction or synchrotron radiation circular dichroism (SRCD) experiments were conducted on the Lo18 and modified proteins during temperature elevation (Figure 36).

The structural predictions made on the modified proteins suggest that all the point mutations have an impact on the secondary structure of the Lo18 protein, with marked structural modifications for the E60K and R99D modified proteins. Indeed, an increase in the number of α -helix around 12% was predicted for these two proteins (Figure 36A).

SRCD measurement reinforced the *in silico* observation obtained. Each point mutation affected slightly (for G82V) or strongly (for E60K and R99D) the structure of the protein (Figure 36 B-E). The secondary structures of Lo18 and G82V are relatively close. On the contrary, the T79V protein shows few modifications compared with Lo18, while the E60K and R99D proteins are very strongly impacted (Table 7). More precisely, the α -helices and β -sheets were the main structures impacted by these substitutions. A moderate increase in α -helices for T79V (14.1% at 25°C and 20.2% at 60°) and a significant increase for E60K and R99D proteins (31.2 and 28.4% at 25°C and 13.8 and 25.2% at 60°C respectively) was observed. Conversely, up to 45°C, the proportion of β -sheet is significantly higher for Lo18 (around 42%) than for the modified proteins (18.8% for E60K, 28.4% for G82V, 25.7% for T79V and 18.3% for R99D). From 55°C onwards, the proportion of Lo18 β -sheet decreases to be similar to modified proteins at 60°C. The turns and the non-ordered protein structures (other structures) were less impacted for the point mutations with (Figure 36; Table 7).

Tableau 7: SRCD measurement of secondary structure (α -helix, β -sheet, turn and other structures) of Lo18 or modified proteins. Data corresponding to means \pm SE and statistical analysis. Measurement were replicat three time and analyse by Kruskal-Wallis statistical test (p.value<0.05).

α -Helix [%]/ Température (C°)	25	35	45	55	60
Lo18	1.5 \pm 0.4 ^A	2.6 \pm 0.2 ^A	2.7 \pm 0.5 ^A	3.2 \pm 0.2 ^A	3.8 \pm 0.9 ^A
E60K	31.2 \pm 1.6 ^C	26.1 \pm 1.2 ^C	15.9 \pm 7.8 ^{BC}	11.7 \pm 2.0 ^B	13.8 \pm 5.5 ^{ABC}
G82V	5.9 \pm 7.3 ^{AB}	10.1 \pm 7.1 ^{AB}	7.3 \pm 5.8 ^{AB}	1.9 \pm 1.7 ^A	6.1 \pm 10.6 ^{AB}
T79V	14.1 \pm 6.2 ^B	15.1 \pm 5.2 ^B	10.9 \pm 4.9 ^B	20.1 \pm 10.2 ^{BC}	20.2 \pm 5.5 ^{BC}
R99D	28.4 \pm 1.8 ^C	25.1 \pm 1.3 ^C	23.9 \pm 3.5 ^C	27.7 \pm 5.6 ^C	25.2 \pm 6.0 ^C
β -sheet [%]/Température (C°)	25	35	45	55	60
Lo18	42.8 \pm 3.2 ^A	43.1 \pm 4.0 ^A	41.9 \pm 1.7 ^A	30.9 \pm 1.9 ^A	32.3 \pm 2.2 ^A
E60K	12.3 \pm 1.8 ^B	14.6 \pm 1.3 ^B	29.5 \pm 3.7 ^B	31.1 \pm 2.9 ^A	31.5 \pm 2.5 ^A
G82V	29.7 \pm 7.8 ^C	25.9 \pm 6.1 ^C	29.7 \pm 5.4 ^B	34.6 \pm 5.3 ^A	29.2 \pm 12.8 ^A
T79V	28.6 \pm 7.4 ^C	27.0 \pm 6.7 ^C	25.5 \pm 1.8 ^{BC}	18.9 \pm 5.3 ^B	13.5 \pm 4.6 ^B
R99D	17.6 \pm 2.2 ^D	18.2 \pm 0.8 ^D	19.2 \pm 5.9 ^C	17.2 \pm 1.9 ^B	17.5 \pm 2.2 ^{AB}
Turn [%]/ Température (C°)	25	35	45	55	60
Lo18	12.6 \pm 1.3 ^A	12.1 \pm 1.9 ^A	12.8 \pm 1.2 ^A	17.1 \pm 0.7 ^A	15.9 \pm 1.4 ^A
E60K	14.1 \pm 1.1 ^A	12.9 \pm 1.3 ^{AB}	10.5 \pm 1.4 ^B	9.7 \pm 0.9 ^C	10.6 \pm 2.5 ^A
G82V	17.3 \pm 6.0 ^A	20.5 \pm 3.4 ^C	19.8 \pm 2.0 ^C	14.2 \pm 3.8 ^B	16.5 \pm 5.8 ^A
T79V	13.2 \pm 2.3 ^A	11.7 \pm 0.9 ^A	11.1 \pm 1.0 ^B	14.5 \pm 2.2 ^B	15.9 \pm 3.2 ^A
R99D	15.2 \pm 1.0 ^A	14.8 \pm 0.9 ^{BC}	16.0 \pm 1.4 ^C	19.1 \pm 1.1 ^A	19.6 \pm 0.3 ^A
Other structure [%]/ Température (C°)	25	35	45	55	60
Lo18	43.1 \pm 2.1 ^A	42.2 \pm 2.3 ^A	42.7 \pm 1.1 ^A	48.8 \pm 1.5 ^A	48.0 \pm 0.4 ^A
E60K	42.3 \pm 2.0 ^A	46.3 \pm 1.7 ^A	44.1 \pm 5.7 ^A	47.6 \pm 2.0 ^A	44.1 \pm 5.4 ^A
G82V	47.1 \pm 5.6 ^A	43.5 \pm 4.8 ^A	43.2 \pm 2.3 ^A	49.3 \pm 0.2 ^A	48.2 \pm 4.0 ^A
T79V	44.1 \pm 1.7 ^A	46.2 \pm 2.8 ^A	52.5 \pm 6.2 ^A	46.5 \pm 13.0 ^A	50.4 \pm 5.0 ^A
R99D	38.8 \pm 3.0 ^A	41.9 \pm 2.0 ^A	40.9 \pm 1.4 ^A	36.0 \pm 4.8 ^A	37.8 \pm 4.0 ^A

All these structural changes taken together suggest that the slightest modification could impact the whole structure of the protein and therefore its functionality. Indeed, a prediction of this structural change suggests that the most secondary structure affected proteins (E60K and R99D) are more likely to have a variation in solvent exposure (Figure 36F).

Finally, the quaternary structure of the Lo18 or modified proteins was monitored by immunolabelling using an *E. coli* heterologous system (Figure 36G). For the Lo18 protein, several bands were observed corresponding to different oligomerization state (oligomer, dimer, trimer) of the protein with of complete and/or truncated forms (Coucheney *et al.*, 2005; Delmas *et al.*, 2001). The modified proteins also showed numerous bands corresponding to these multimeric forms. It is noticeable that E60K, T79V and R99D was able to produce very few quantities of dimeric form.

The structural data set demonstrated an effect of the point mutations on the monomeric structure of Lo18 and consequently on its multimeric structure. The measured changes in lipochaperon activity could therefore be attributed to these structural modifications.

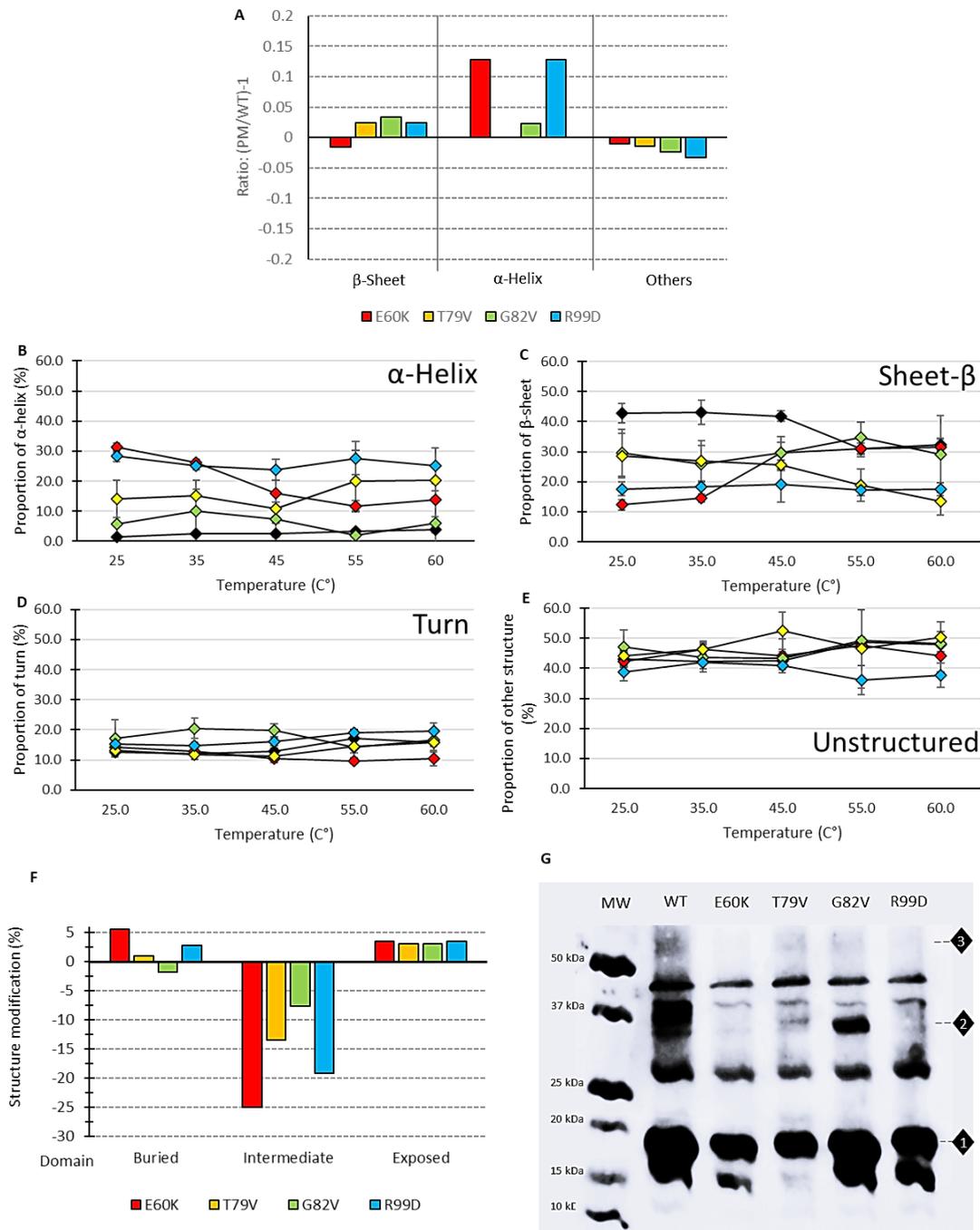


Figure 36 : Measuring the impact of point modifications on the structure of proteins. Structure modification of Lo18 (black), E60K (red), T79V (yellow), G82V (green) and R99D (blue) induced by thermal ramping (25 °C to 50 °C on the four types of secondary structures, (A) α -helix, (B) β -sheet, (C) turns and (D) other secondary structures, evaluated by SRCD. The data represent the means and SE of three independent experiments. (E) Prediction of the impact of point mutation substitution on secondary structure accessibility. (F) Oligomeric structure of Lo18 WT or modified. Immunolabelling of Lo18 after in vivo cross-linking. The diamond-shaped numbers from 1 to 3 indicate the presence of monomer, dimer and trimer respectively.

Modification of Lo18 structure in the presence of membrane lipids

To further characterize the changes in the secondary structures of the protein and their impact on lipochaperon activity, SRCD experiments were performed during a thermal ramp from 20°C to 60°C. For Lo18 in the presence of liposomes, a decrease in the proportion of β -sheets in favor of α -helices, and unordered structures is observed whatever the temperature tested (Figure 37A). For example, at 45°C (shock anisotropy temperature), the proportion of β -sheets decreases from 40% to 28% in the presence of liposomes; on the contrary the proportion of α -helices and non-ordered structure increases respectively from 3% to 9% to and from 42% to 48% with liposomes addition (Figure 37A).

Besides the analysis of the spectra obtained by SRCD of the Lo18 protein showed that in the presence of liposomes a distinct shoulder appeared in the 195-210 nm range, with a signal elevation of about 35% at 201 nm (lowest point of the spectrum) at 25 °C compared to the condition without liposomes (Figure 37B). This phenomenon could indicate the insertion of the protein into the lipid bilayer of the liposome.

Further, the interaction between the liposomes and the modified proteins was monitored and compared to Lo18. At 25 °C, no distinct shouldered spectra in the presence of liposomes were observed for E60K and R99D (Figure 37B). Finally, whether insertion occurred, the presence of liposomes stabilized the protein structure upon temperature elevation (Supplemental data; Figure 38).

All together, these results highlight the modification of the secondary and tertiary structures of the Lo18 protein after interaction with a lipid bilayer by putatively exposing specific Lo18 domains able to interact with the membrane.

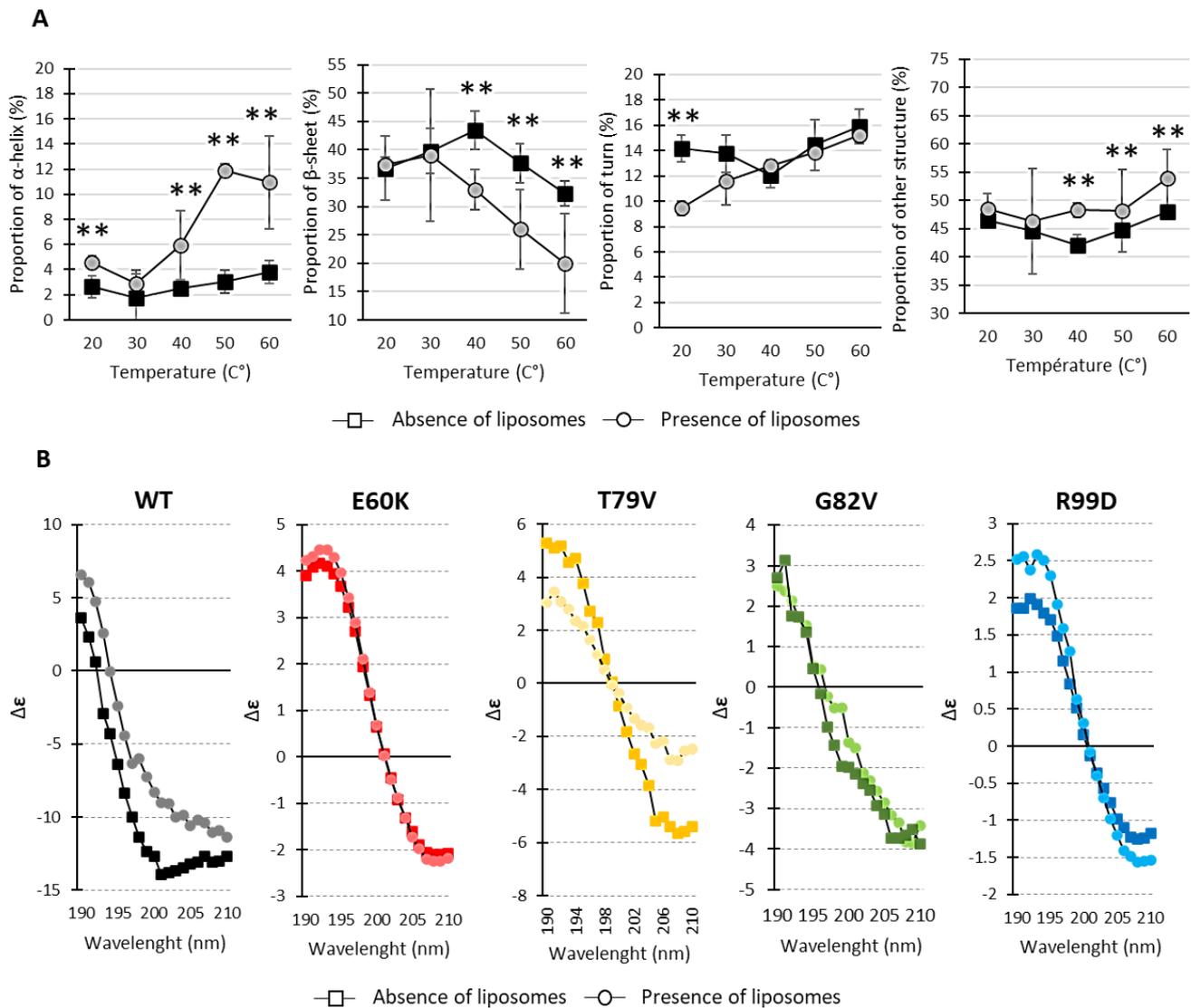


Figure 37 : Impact of Lo18/ liposomes interaction on protein secondary structure. (A) Structure modification of Lo18 WT induce by thermal slope (20°C to 60°C) on the four main secondary structures α -helix, β -sheet, turns and other secondary structure in presence (black square) or absence (grey dot) of liposomes. The data represent the means and SE of three independent experiments. (B) SRCD spectra on 190-210 nm wavelength for Lo18 WT (black), E60K (red), T79V (yellow), G82V (green) and R99D (blue) in presence (dark square) or absence (light dot) of liposomes at 25°C. Data represent the means of three replicats analyzed by Mann-Withney U-test.

Discussion

Stress proteins such as small heat shock proteins (sHSP) are present in almost all organisms. Although they have all been described for their role as molecular chaperones (Chang *et al.*, 1996; Guzzo *et al.*, 1997; Jakob *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1995), a growing number of studies have shown that some of them also play the role of lipochaperon by acting at the cell membrane level to maintain its integrity (Coucheney *et al.*, 2005; Laskowska *et al.*, 1996; B. Y. Lee *et al.*, 1992; Maitre *et al.*, 2012, 2014; Otani *et al.*, 2005; Rocchetti *et al.*, 2023; Török *et al.*, 2001;

Weidmann *et al.*, 2010). Few sHSPs have been described as performing both these activities, the mechanisms involved in the lipochaperon activity are still very poorly understood. Recent study has shown that certain residues are highly conserved in sHSPs with lipochaperon activity (Bellanger & Weidmann, 2023). In this context, the interaction between Lo18 sHsp and *O. oeni* membrane lipids was studied in the bases of structure-function relationship (Table 8).

Table 8 : The table summarises the chaperone and lipochaperone activities of Lo18 or modified proteins according to their secondary structure modifications. The presence or absence of Lo18 is used as a reference for these activities, where "++" indicates a high level, "+" a moderate level, and "-" an absence of activity

	Lo18	E60K	T79V	G82V	R99D	∅ Lo18
Chaperon activity	++	+	-	+	++	-
Lipochaperon activity slope	++	-	+	+	++	-
Lipochaperon activity shock	++	-	-	+	++	-
Membrane rigidification by protein addition	++	-	++	++	-	-
Membrane insertion (SRCD)	++	-	+	+	-	-
α-Helix	-	++	+	-	++	
β-Sheet	++	-	+	+	-	
Turn	=	=	=	=	=	
Other structure	=	=	=	=	=	

The impact of four of these highly conserved residues (E60, T79, G82 and R99) was assessed for both Lo18 chaperon and lipochaperon activities. With the exception of the modified protein R99D, the chaperon and lipochaperon activities of the modified proteins were reduced (T79V and G82V) or abolished (E60K). Interestingly, the loss of lipochaperon activity of the modified proteins did not correlate with the loss of chaperone activity, as previously demonstrated for the Y107A (loss of lipochaperon activity only) and A123S (loss of chaperone activity only) proteins (Weidmann *et al.*, 2010). The E60K protein, which no longer has lipochaperone activity, still possesses chaperone activity, and vice versa for the T79V protein. These results support the hypothesis that key residues are required for the activity of sHSPs, either chaperon or lipochaperon. Nevertheless, the importance of conserved residues on Lo18 activities appears to be strongly correlated with their location on the protein.

Indeed, only modifications of residues present on the core (E60K, T79V, G82V) generate a loss of activity, as was already the case for A123S and Y107A proteins (Weidmann *et al.*, 2010). In contrast, modifications of residues present on the long $\beta 5/\beta 6$ loop, do not cause loss of chaperone activity (E81A and R82G of HspH from *Bradyrhizobium japonicum* (Lentze *et al.*, 2003) and R99D from *O. oeni*) and lipochaperon (R99D). Modification of the protein's structure could explain these losses of activity, as has often been described for chaperone activity on sHSPs. For example, structural modification of the α -crystallin domain has an impact on chaperone activity (Das & Liang, 1997; Srinivas *et al.*, 2003) as has been described for human HSPB1 (Alderson *et al.*, 2019), HSPH from *B. japonicum* (Lentze *et al.*, 2003) or the plant sHSPs Ta16.9 and Ps18.1, from *Triticum aestivum* and *Pisum sativum* respectively (Santhanagopalan *et al.*, 2018). While the link between the structure of sHSPs and their lipochaperon activity has yet to be fully demonstrated, it is highly likely that structural modifications also affect its lipochaperon activity.

The secondary to quaternary structures of the various modified proteins were studied to further investigate the structure-function relationship. Predicted structural changes made *in silico* were confirmed *in vitro* by SRCO experiments for all the modified proteins tested. In general, a decrease in the proportion of β -sheets in favor of an increase in α -helices was observed, suggesting that the amino acids of interest present from the core protein domain help to maintain the secondary structure of both planes of the Lo18 protein. These modifications are more or less marked with a very strong alteration of the E60K protein and much less important modifications for the G82V protein. With regard to residue R99, the significant increase in the proportion of α -helices could reflect a relaxation of the β -sheets present on the $\beta 6/\beta 7$ loop (Cerpa *et al.*, 1996). Indeed, the change in charge induced by the replacement of arginine (R) by aspartic acid (D) locally modifies electrostatic interactions, particularly with aspartic acid at position 90. The decrease in these interaction forces will affect the formation of hydrogen bonds between the $\beta 6$ and $\beta 7$ sheets of the loop, enhancing their folding into α -helices (Edsall, 1952; Frauenfelder, 2010). Similar results have been described following point mutations in the long loop of the human HSPB1 protein (E130K point mutation) (Bhattacharya & Ray, 2021). Likewise, point mutations in the core of the human γ D-crystallin protein, whose structure and function are close to α -crystallin (to which sHSPs belong), have also been observed (Evans *et al.*, 2004). Immunostaining results confirm that modifications of the secondary structure led to an alteration of the quaternary structure.

With the exception of G82V, which is weakly modified at the level of its secondary structure, the dimeric structure formation of the other modified proteins is strongly altered, which may explain changes in activities (Maitre *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2015).

To get a better understanding of the relation between the structural modification of the studied proteins and their lipochaperon activity, the impact of the presence of lipids was studied in more detail. The addition of liposomes to the Lo18 protein also promoted a decrease in the proportion of β -sheets in favor of α -helices. These results suggest that interaction with liposomes increases the relaxation of the protein, as described for HSP16.3 from *M. tuberculosis* (Zhang *et al.*, 2005). In the presence of lipid bilayers (liposomes) the Lo18 protein spectra presents a decrease of the 208nm negative absorption and a batho-chromic (red-) shift of the π - π^* electronic transition, which reflects most likely protein insertion into the bilayer (Steinbrecher *et al.*, 2012; Waeytens *et al.*, 2022). Indeed, the spectra obtained in SRCD, and the size and concentration of the liposomes, allowed obtaining a signal similar to the classical one obtained in oriented circular dichroism, a state-of-the-art technique for studying protein insertion into a membrane (Bürck *et al.*, 2016). For the modified proteins, the SRCD spectra obtained in the presence of liposomes are different from those obtained for the Lo18 protein. The modified E60K and R99D proteins are no longer able to enter the bilayer, which is reflected by the retention of their negative absorption at 208 nm, while the T79V and G82V proteins can still be inserted. The anisotropy results for the latter two proteins confirm this insertion, with rapid rigidification of the liposomes as soon as the proteins are introduced. Unexpectedly, although R99D no longer appears to insert into liposomes, it retains lipochaperone activity. However, this protein could establish contacts with the membrane, favored by the replacement of the aspartic amino acid. (Kanwa *et al.*, 2020). Indeed, physically, aspartic acid (D) is more strongly attracted to negatively charged phospholipids present in high proportion in the *O. oeni* membrane than arginine (R) (Kanwa *et al.*, 2020; Teixeira *et al.*, 2002).

In conclusion, Understanding the mechanisms involved in the interaction between cell membranes and sHSPs are important not only for fundamental knowledge, but for their applications, especially in the health sector. For example results could be on two human sHSPs (HSPB1 and HSPB5) already studied for their therapeutic role in the brain through the spectrum of their chaperone and lipochaperone activity (De Maio *et al.*, 2019; Quraishe *et al.*, 2008; Webster *et al.*, 2019). In this work, modifications of 4 amino acids particularly conserved in sHsp allowed us to discriminate structure-function links depending on the site of modification in the α -crystallin domain.

For the three residues (E60, T79 and G82) present on the core of the protein, the greater the structural modifications, the greater the impact on lipochaperon activity. On the contrary, these structural modifications seem to affect chaperone activity to a lesser extent. In contrast, the amino acid modification present on the $\beta 5/\beta 6$ loop induces a major change in the protein's secondary structures without major impact on chaperone and lipochaperon activities. Thus, fine regulatory mechanisms to be elucidated in the future need to be highlighted.

Material and methods

Media and growth conditions

O. oeni ATCC BAA-1163 was grown at 28 °C and at pH 5.3 in FT80 medium modified by the addition of meat extract instead of casamino acids (Cavin *et al.*, 1989). *E. coli* BL21 star (DE3) cells were transformed with the plasmids pET28a-hsp18-HIS, pET-E60K, pET-T79V, pET-G82V and pET-R99D, named respectively *E. coli* Lo18 and *E. coli* E60K, *E. coli* T79V, *E. coli* G82V and *E. coli* R99D, and were grown aerobically at 37 °C in Luria–Bertani (LB) medium broth supplemented with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin (Sigma, Saint-Louis, US).

Strain and plasmid construction

The *hsp18* gene was generated from the plasmid pET-*hsp18* 27 by PCR amplification using two primers: Lo18N-NdeI 5'-GCACAGCATATGGCAAATGAATTAATGGATAGAAATGATGG-3' (forward) and Lo18C-HindIII 5'-TTGGCTAAGCTTTTATTGGATTTC AATATGATGAGTTTGACTTTTCG-3' (reverse), respectively. The coding region of the *hsp18* gene was then cloned into the NdeI and HindIII sites of the expression vector pET28a (Invitrogen, US). The resulting plasmid, designated pET-hsp18-HIS, contains the unmodified complete *hsp18* coding region with a sequence coding the hexahistidine tag in 5', under the control of the inducible promoter T7.

Site-directed mutations leading to single amino acid exchanges in Lo18 were introduced by primer-based mutagenesis, using pET-hsp18-HIS as a template. The *hsp18* gene was modified by PCR using specific primers E60K, T79V, G82V and R99D containing a point-nucleotide mutation (Supplementary data, Tableau 4). The template plasmid was eliminated using a *DpnI* restriction enzyme (BioLabs) at 10U/ μL .

Chemically competent *E. coli* BL21 Star (DE3) cells were transformed with the resulting vectors (pET-E60K, pET-T79V, pET-G82V and pET-R99D), according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, US).

Protein expression and purification

For all strains (overexpressing proteins Lo18, E60K, T79V, G82V and R99D), cell-free extracts were prepared from 1 L culture of *E. coli* cells grown at 37 °C in LB medium supplemented with kanamycin (50 mg/mL). The production of Lo18 or modified protein was induced by adding 50 µM IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside) for 3 h at 37 °C and shaking. The bacterial solution was centrifuged for 10 min at 4000 g to harvest the cells. The cells were then washed twice and resuspended in 60 mL of buffer A (0.2 mM phosphate buffer pH 7.0, 500 mM NaCl). The cells were then disrupted over 3 cycles at 8 kPSI using the Continuous Flow Cell Disrupter (Constant Systems Ltd, UK). The resulting cell lysate was centrifuged for 1 h at 4°C at 12,000 g to remove the cellular debris present.

Purification of cell lysates containing Lo18 or modified protein were purified by affinity chromatography using a HisTrap HP column, 1mL (Cytiva, US). To do this, 5 mL of cell lysate were injected into the column previously equilibrated with 10 mL of buffer A with a flow rate of 1 mL/min. An elution gradient was set up with 20 mL at a flow rate of 1 mL/min to reach a 100% concentration of buffer B (0.2 mM phosphate buffer, 500 mM NaCl, 100 mM imidazole, pH 8). The 100% buffer B concentration was maintained for 10 mL with a flow rate of 1 mL/min. The purified protein was then stored at -20 °C. An additional dialysis step was added before the circular dichroism experiments. Thus, the samples were dialyzed against 30 times the volume of sodium phosphate buffer pH 7.0, using an Ultracel amicon with a 10 kDa cut-off (Merck, US).

Assay for Thermostability of Lo18 or modified protein

Cellular lysate for all the strains (overexpressing proteins Lo18, E60K, T79V, G82V and R99D) were produce as described above. In order to test the thermostability of *E. coli* cellular proteins, the total protein concentration of the lysates was measured by Bradford assay (Biorad, France) and adjusted at 3.5 mg/mL on phosphate buffer (pH 7). To measure the protein denaturation, lysates were heated at 55°C for 30 minutes and centrifuged at 12 000g for 10 minutes.

The amount of protein in the supernatant fractions (corresponding to unaggregated proteins) was measured by Bradford assay.

Structure analysis

In silico structure prediction and protein membrane interaction

The secondary structure of Lo18 and modified proteins was predicted using the PredictProtein online software. Then, models of the tertiary structure of these proteins were generated using trRosetta and Alphafold2 online software. The impact of amino acid present on the point mutation of all the models obtained was analyzed using the measurement functionality of PyMOL 4.60 software.

Molecular Dynamic simulations (MD) in explicit water were performed using initial structures: A0NLC2 truncated of the first 25 amino acids of the N-terminal domain (Waterhouse *et al.*, 2018), and total structure obtained using trRosetta and Alphafold2 online software. All unbiased simulations were carried out with the GROMACS software package (Abraham *et al.*, 2018). Na⁺, Cl⁻ ions were added at a concentration of 0.1 M. The initial velocities were chosen randomly. The system was warmed up for 40 ps and equilibrated for 600 ps with lower restraints, finishing with no restraints at 310 K. We performed different MD runs which simulated between 1 and 2 μ s the interactions of the proteins to 360 K, 385 K, 410 K, 435 and 460 K. Those simulated temperatures correspond to the behaviors (unfolding) of the Lo18 dimer observed at the temperatures between 12°C and 87°C.

Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism spectra were collected on the DISCO beamline (Synchrotron SOLEIL, France); In detail, the instrument was calibrated using a 99% pure (+) camphor-10-sulphonic acid (Sigma Aldrich, Saint-Louis, US) at 25 °C after each beam fill (Miles *et al.*, 2004). Protein samples (Lo18 or modified proteins) were prepared in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0. Then, 50 μ L of sample was loaded into a 0.02 cm pathlength demountable cylindrical quartz Suprasil cell (Hellma, Germany) and subjected to a thermal scan from 15 °C to 84 °C with a step of 3 °C. Each dataset was collected in 1 nm steps from 262 nm to 176 nm, with an integration time of 1.2 s and a spectral bandwidth of 1 nm. Three scans of each sample and the equivalent baseline were collected.

At each temperature step the three collected spectra were averaged and smoothed (9 points with Savitzky-Golay smoothing), and baseline subtracted with the averaged and smoothed spectra of the buffer without protein taken at 15°C. Spectra were then zeroed between 250 and 260 nm. All spectra were normalized according to the protein concentration and pathlength using the CDToolX software.

A similar protocol was used in presence of liposomes (preparation described below) using 250 µM liposomes and 140 µM proteins, with a thermal scan from 25 to 55°C with a step of 5°C. Deconvolution of the spectra was made with BeStSel server (Micsonai *et al.*, 2022)

Cross-linking

The oligomeric statuses of Lo18 and modified protein were analyzed by cross-linking experiments *in vivo*. Measurements were performed as described by Delmas *et al.* (2001) (Delmas *et al.*, 2001). Therefore, cellular extracts were treated with formaldehyde, to a final concentration of 1% (w/w). Five µg of cross-linked samples were separated onto 12% SDS-PAGE gel before Western blot analysis using antibodies against Lo18.

Lipid interaction

Preparation of liposomes

Lipids from an *O. oeni* culture in exponential phase were extracted and purified according to Bligh and Dyer (1959) and Maitre *et al.*, (2012) (Bligh & Dyer, 1959; Maitre *et al.*, 2012) with slight modification. A film of extracted lipids was obtained by evaporating chloroform using a nitrogen flux. Then, a pre-warmed 50 mM phosphate buffer pH 7.0 at 55 °C was added to the sample and gently mixed. The lipid solution was sonicated twice for 2 min (Branson Ultrasonics™ CPX-952-138R, Branson Ultrasonics, Brookfield, CT, US) and rehydrated for 4 h at 55 °C. The lipid particles were then extruded through a polycarbonate membrane with 1 µm diameter pores to obtain the liposomes which were stored at 4 °C for a maximum of 1 week.

Fluidity measurements

Membrane fluidity was monitored by fluorescence anisotropy measurement using a Fluorolog 3 spectrofluorimeter (FLUOROLOG-3, Jobin Yvon Inc, USA).

The anisotropy values (inversely proportional to the membrane fluidity) were calculated according to Shinitzky and Barenholz (1978) (Shinitzky & Barenholz, 1978). Excitation and emission wavelengths were 360 nm and 431 nm, respectively. The measurement was performed for 30 min (1 determination every 10 s) in a quartz cuvette filled with 250 μ L of liposomes prepared as described above, with 3 μ M of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) as a probe (Sigma Aldrich, Saint-Louis, US). Data were recorded in the presence or absence of Lo18 or modified protein, using a mass ratio of 1:2 (m/m) between the sHSP and the liposomes. After inserting the probe (10 min at 10 C), a linear temperature gradient from 15 to 63°C (increase of 2°C per min) controlled by a Peltier system (QNW TC1 temperature controller, Quantum Northwest, Liberty Lake, WA, USA) and heat shock at 45°C for 15 min were applied to the liposome suspension. Each experiment was done in triplicate.

Statistical analysis

At least three independent measurements were performed for each of the conditions tested on fluorescence anisotropy, thermostability and SRCD measurement. Statistical analyses were performed by the statistical RStudio software (version 1.2.5033). The normality of the distribution and homogeneity of the variances of each condition were tested by the Shapiro-Wilk test and the Bartlett test, respectively. Then, a non-parametric Kruskal-Wallis test was used to compare the samples with a significance level of $\alpha = 0.05$. All the statistical tests were considered significant at a p-value < 0.05 .

Acknowledgments

This work was supported by the Regional Council of Bourgogne- Franche-Comté, and the Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. The authors would like to thank the Dimacell Platform (Agrosup Dijon, INRA, INSERM, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon France) and the Synchrotron SOLEIL (CNRS-CEA Paris Saclay, France) for x-ray beamtime on DISCO beamline (project # 20220067). We would also like to thank Accent Europe for proofreading the English text.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Author contribution: **T. B.** and **S. W:** Conceptualization, **T. B.**, and **S. W:** Methodology, **T. B.** Formal analysis, **T. B.**, **S. W**, **D. S.- B** and **P. D.** : Investigation, **T. B.**, **S. W**, **F. W.** and **P. S.** : Resources, **T. B.** and **S. W** : Writing – Original Draft, **T.B**, **S. W.**, **D. S.-B.**, **P. D.**, **P. S.**, **F. W.**, **A. R.**, **F. N.**, **P. F.-V.** and **S. C.** : Writing – Review & Editing; **S. W.:** Validation, Project administration and Funding acquisition

Data availability: The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Supplementary data

Table 9: Supplementary data, measurement of fluorescence anisotropy after insertion of the DPH probe into liposomes derived from *O. oeni* membrane lipids during a thermal ramp from 16 to 64°C or after a thermal shock at 45°C. For the heat shock, three phases can be defined: the equilibration phase (before 0 min), in which the reaction mixture consists of liposomes and the DPH probe in buffer, the addition of modified or unmodified sHsp (Lo18, E60K, T79V, G82V, R99D absence of Lo18 or lysozyme), and the application of a heat shock. Data correspond to means \pm SE and statistical analysis. Measurements were replicated three times and analysed using the Kruskal-Wallis statistical test (P-value<0.05).

		Lo18	∅ Lo18	E60K	T79V	G82V	R99D	Lysozyme
Slope	Interaction Lo18/liposomes	0.0139 \pm 0.007 DE	-0.0012 \pm 0.001 A	0.0031 \pm 0.004 CD	0.011 \pm 0.002 A	0.0105 \pm 0.004 AB	0.0048 \pm 0.003 BC	-0.0016 \pm 0.001 E
Heat shock	heat shock	-0.0045 \pm 0.001 AB	-0.0045 \pm 0.001 C	-0.0035 \pm 0.0003 B	-0.0045 \pm 0.0004 C	-0.0047 \pm 0.0004 CD	-0.0011 \pm 0.004 A	-0.0058 \pm 0.001 D
Anisotropy values	Before the induction	0.141 \pm 0.02 AB	0.155 \pm 0.006 AB	0.157 \pm 0.0005 AB	0.146 \pm 0.001 B	0.161 \pm 0.005 AC	0.159 \pm 0.003 AC	0.181 \pm 0.007 C
	Add of Lo18	0.149 \pm 0.01 AB	0.16 \pm 0.003 A	0.158 \pm 0.002 AB	0.147 \pm 0.001 B	0.161 \pm 0.003 A	0.159 \pm 0.004 AB	0.2 \pm 0.005 C
	heat shock	0.205 \pm 0.008 C	0.155 \pm 0.005 A	0.17 \pm 0.01 AB	0.191 \pm 0.004 BC	0.203 \pm 0.007 C	0.178 \pm 0.002 AB	0.194 \pm 0.006 C
	4 minutes after shock	0.202 \pm 0.001 C	0.162 \pm 0.003 A	0.18 \pm 0.004 AB	0.194 \pm 0.002 BC	0.203 \pm 0.008 C	0.178 \pm 0.009 AB	0.212 \pm 0.012 C
	8 minutes after shock	0.155 \pm 0.006 B	0.118 \pm 0.01 A	0.124 \pm 0.001 A	0.123 \pm 0.005 A	0.162 \pm 0.022 B	0.149 \pm 0.012 B	0.143 \pm 0.004 B
	12 minutes after shock	0.157 \pm 0.004 C	0.095 \pm 0.013 A	0.117 \pm 0.004 A	0.119 \pm 0.003 A	0.129 \pm 0.004 B	0.155 \pm 0.015 BC	0.133 \pm 0.003 BC
	16 minutes after shock	0.16 \pm 0.003 D	0.101 \pm 0.007 A	0.121 \pm 0.005 AB	0.117 \pm 0.001 AB	0.131 \pm 0.005 BC	0.156 \pm 0.017 CD	0.137 \pm 0.011 BC
Heat shock	20 minutes after shock	0.159 \pm 0.004 C	0.091 \pm 0.009 A	0.124 \pm 0.006 B	0.122 \pm 0.002 AB	0.128 \pm 0.007 B	0.163 \pm 0.02 C	0.119 \pm 0.008 AB
Anisotropy values	15°C	0.204 \pm 0.027 A	0.195 \pm 0.01 A	0.195 \pm 0.009 A	0.189 \pm 0.005 A	0.205 \pm 0.023 A	0.1443705 \pm 0.008 A	0.161 \pm 0.014 A
	23°C	0.203 \pm 0.009 BC	0.176 \pm 0.012 A	0.1678 \pm 0.008 BC	0.156 \pm 0.004 BCD	0.185 \pm 0.007 AB	0.128 \pm 0.007 D	0.151 \pm 0.011 CD
	31°C	0.204 \pm 0.014 B	0.142 \pm 0.007 A	0.142 \pm 0.005 B	0.163 \pm 0.007 A	0.157 \pm 0.003 A	0.118 \pm 0.006 C	0.132 \pm 0.01 BC
	41°C	0.152 \pm 0.017 C	0.098 \pm 0.012 A	0.117 \pm 0.003 BC	0.149 \pm 0.004 A	0.126 \pm 0.006 AB	0.119 \pm 0.007 BC	0.109 \pm 0.007 BC
	49°C	0.141 \pm 0.018 A	0.104 \pm 0.009 A	0.108 \pm 0.006 A	0.134 \pm 0.003 A	0.119 \pm 0.009 A	0.107 \pm 0.01 A	0.097 \pm 0.011 A
	53°C	0.144 \pm 0.016 D	0.079 \pm 0.012 A	0.103 \pm 0.006 C	0.128 \pm 0.002 AB	0.114 \pm 0.005 BC	0.104 \pm 0.01 CD	0.092 \pm 0.009 CD
	61°C	0.152 \pm 0.018 B	0.069 \pm 0.01 A	0.096 \pm 0.008 AB	0.115 \pm 0.004 AB	0.104 \pm 0.008 AB	0.105 \pm 0.008 AB	0.09 \pm 0.009 AB
Heat slope	65°C	0.156 \pm 0.031 A	0.075 \pm 0.019 A	0.094 \pm 0.008 A	0.114 \pm 0.005 A	0.101 \pm 0.015 A	0.097 \pm 0.005 A	0.081 \pm 0.009 A

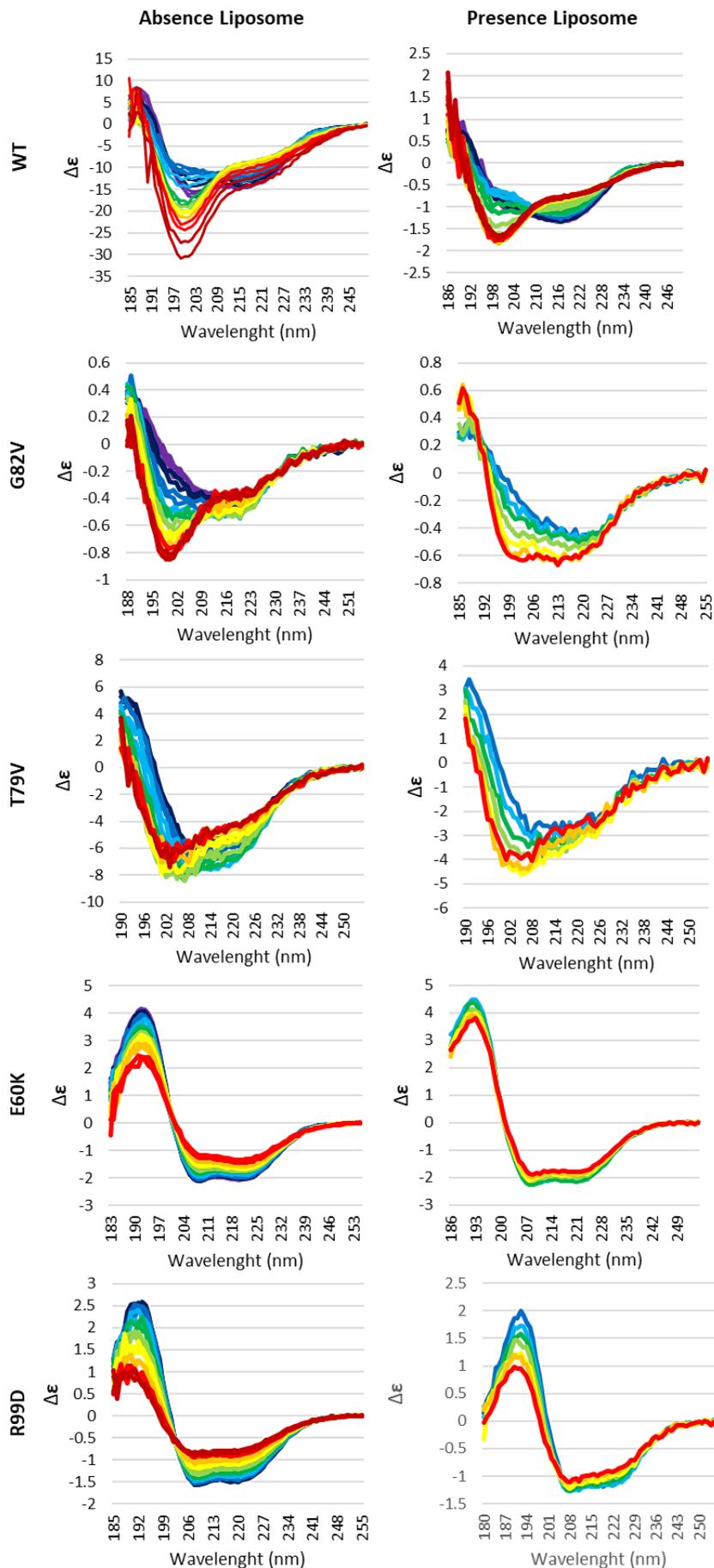


Figure 38 :
Supplementary data,
SRCD spectra of Lo18
WT, E60K, T79V, G82V
and R99D in presence or
 absence of liposomes on
 temperature slope
 respectively to 25 to 76°C
 with step of 3°C in absence
 of liposomes and to 25°C
 to 55°C with a step of 5°C
 in presence of liposomes.
 Color gradient from dark
 blue to red are correlate
 respectively from the
 smallest to the highest
 temperature of slope.

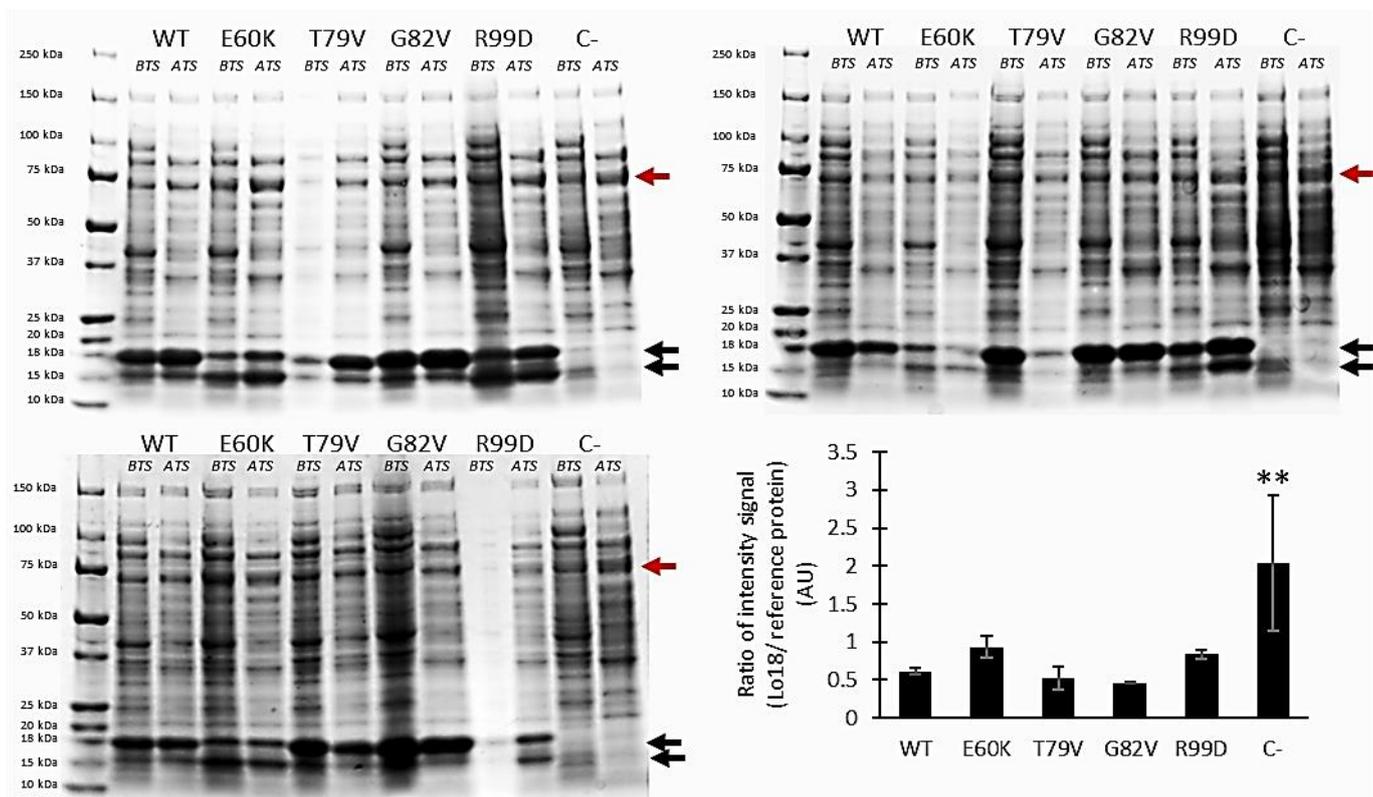


Figure 39 : Supplementary data, verification of the induction of Lo18 and modified proteins, used in protein thermostabilisation measurements, by electrophoresis. Each gel represents a repeat and the black arrow corresponds to the expected size of the Lo18 protein.

3. Résultats complémentaires

Les résultats présentés dans l'article précédant ont mis en évidence l'importance de certains acides aminés hautement conservés entre les sHSPs possédant une activité lipochaperon dans l'activité lipochaperon de Lo18. En effet, les substitutions E60K, T79V, et G82V dans la protéine Lo18 correspondant respectivement aux motifs " ELPG ", en amont du feuillet β 4 et " LTISGKRE " sur le feuillet β 5, ont entraîné une diminution ou une abolition de l'activité lipochaperon de Lo18.

a. Résidus impliqués dans l'activité lipochaperon des sHSPs de *L. plantarum*:

Afin d'observer l'importance de ces résidus conservés dans le maintien de l'activité lipochaperon des sHSPs, et en collaboration avec le Dr. Maria Teresa Rocchetti et le Dr. Daniela Fiocco de l'université de Foggia (Italie), l'activité lipochaperon et les séquences des trois sHSPs de *L. plantarum* ont été évaluées. Une partie des résultats obtenus a fait l'objet d'un article de recherche publié chez Cell stress and Chaperones (Rocchetti et al, 2023) Seule la partie sur l'activité lipochaperon, issue de mon travail, sera présentée dans ce paragraphe, néanmoins l'article complet figure dans les annexes de ce manuscrit.

Premièrement les séquences des trois sHSPs, HSP1 HSP2 et HSP3, de *L. plantarum* ont été comparées à celle de Lo18 (Figure R40). A l'exception de la glycine présente sur le feuillet β 5 (correspondant au résidu G82 de Lo18) qui est remplacé par une alanine, les deux autres résidus (thréonine et acide glutamique, respectivement T79 et E60 chez Lo18) sont présents sur la protéine HSP2. A l'inverse, aucun de ces trois résidus n'est présent chez HSP1 et HSP3 où ils sont respectivement remplacés par de la valine (V), de la serine (S) et de l'acide aspartique (N). De manière intéressantes, ces trois derniers acides aminés (V, S, N) possèdent des caractéristiques physico-chimiques différentes de ceux retrouvés chez Lo18 (hydrophobicité, charge, encombrement stérique). De ce fait, il semblerait plausible que seule HSP2 (possédant les acides aminés conservés chez les sHSPs ayant une activité lipochaperon) puisse interagir avec la membrane et limiter sa fluidification.

		42S		52D		62P		72D		82G		92D																																															
<i>O. oeni</i>	Lo18	N	S	I	M	R	T	D	I	S	E	N	D	K	E	Y	G	L	K	I	E	L	P	G	L	D	K	K	D	I	K	I	D	Y	S	N	D	N	L	T	V	S	G	V	L	S	S	K	A	E	E	K	D	K	K	N	N	V	V
	HSP1	D	Q	V	L	K	T	D	I	N	E	T	D	D	Q	Y	Q	V	K	V	D	V	P	G	I	D	K	Q	D	V	K	L	D	Y	R	D	N	V	L	S	I	K	V	Q	K	D	S	F	V	D	H	E	D	Q	Q	N	I	V	
<i>L. plantarum</i>	HSP2	H	V	G	M	K	T	D	V	V	E	H	D	D	D	Y	T	V	T	A	E	L	P	G	F	D	K	D	A	I	T	V	K	Y	A	D	E	W	L	T	I	R	A	H	R	S	Q	-	-	D	D	R	N	D	D	G	R	V	L
	HSP3	G	S	V	L	K	T	D	I	K	E	N	D	D	Q	Y	T	M	K	V	D	I	P	G	I	D	K	Q	N	I	A	L	K	Y	R	D	G	T	L	S	I	A	V	K	R	D	S	I	S	D	E	S	D	K	D	G	N	I	I

Figure 40 : Alignement multiple des séquences des trois sHSPs de *L. plantarum* et de Lo18. Lo18 a été utilisée comme référence lors de cet alignement, les résidus en couleur représentent le résidu E60 (en rouge), le résidu T79 (en jaune) et le résidu G82 (en vert ou en gris).

Afin d'évaluer la capacité de HSP1, HSP2 et HSP3 à réguler la fluidité membranaire de *L. plantarum*, des mesures d'anisotropie de fluorescence ont été effectuées suite à un stress thermique. La fluidité des liposomes, formés à partir des lipides extraits de cellules de *L. plantarum* cultivées en phase exponentielle de croissance, a été suivie lors d'une rampe thermique (15°C à 65°C) en présence ou en absence de HSP1, HSP2 ou HSP3 (Figure 41). Seule HSP2 a permis de limiter la fluidification des liposomes tout au long de la rampe thermique. A l'inverse HSP1 n'a eu aucun effet. HSP3, quant à elle, présente un comportement également différent : sa présence entraîne une rigidification des liposomes lorsque la température est inférieure à 40°C ; puis au-delà de cette température, une fluidification est mesurée. Ainsi, à 65°C la fluidification membranaire atteint 38% de la valeur d'anisotropie initiale en absence de sHSPs contre 47% en présence de HSP2, ou 30% en présence de HSP3. Ces résultats renforcent les hypothèses suggérant l'importance de ces résidus dans l'activité lipochaperon des sHSPs. Notons que ces résidus sont présents sur des motifs eux même très conservés qui pourraient également impacter l'activité lipochaperon des sHSPs.

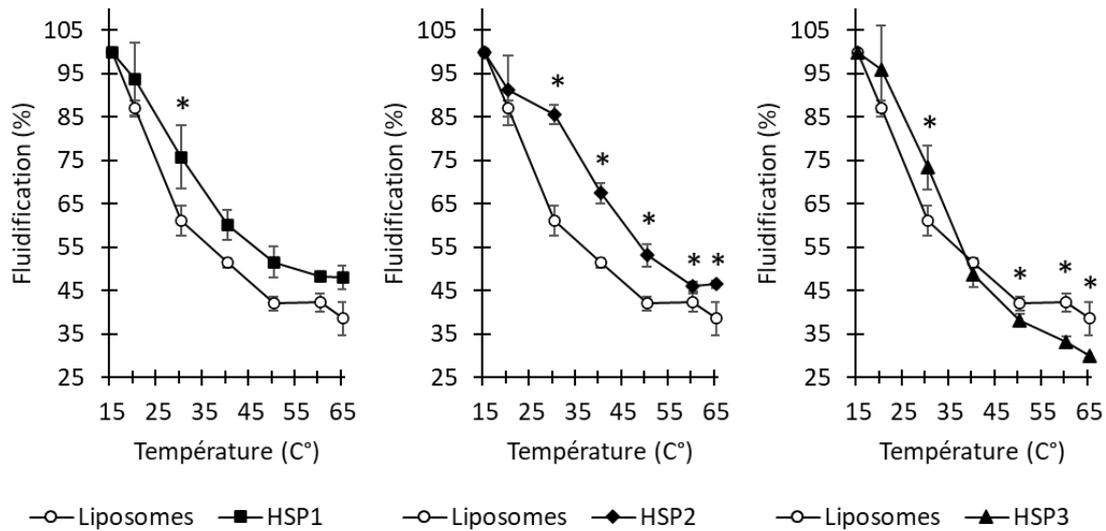


Figure 41 : Effet de HSP1, HSP2 ou HSP3 sur la fluidité membranaire de vésicules lipidiques dérivées de *L. plantarum*. L'anisotropie de fluorescence de la sonde DPH insérée dans les vésicules a été mesurée en fonction de l'augmentation de la température, en absence (cercle ouvert) ou en présence de HSP1, HSP2 ou HSP3 (symboles pleins). Les graphiques représentent les moyennes et les écarts-types d'au moins 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$, test U de Mann-Whitney.

b. Rôle de la structure secondaire dans l'activité lipochaperon de Lo18 :

Nos travaux ont précédemment permis de mettre en évidence que les acides aminés E60, T79, G82 et R99 jouaient un rôle au niveau de la structure de la protéine Lo18. De manière intéressante nous avons observé que les mutations faites au niveau du corps de la protéine (mutations E60K, T79V et G82V) entraînaient une diminution de l'activité lipochaperon de Lo18 d'autant plus importante que la structure secondaire de la protéine était modifiée. Afin de mieux comprendre l'influence de ces acides aminés sur la structure et les sites actifs potentiel de Lo18, des simulations de la structure secondaire et tertiaire de Lo18 ont été réalisées informatiquement.

Tout d'abords, les structures primaires des protéines Lo18 sauvages ou modifiées ont été analysées par alignement multiple, par le logiciel PredictProtein. Ces alignements ont permis de prédire des modifications de structures secondaires et d'accessibilité au solvant, aux protéines et aux macromolécules (ADN et ARN) chez les protéines modifiées (Figure 42). La localisation sur la protéine, de l'impact de chaque mutation, est représentée par une zone de couleur, respectivement en rouge pour E60K, jaune pour T79V, vert pour G82V et bleu pour R99D.

Les protéines pour lesquelles une diminution du nombre de sites d'interaction avec les protéines et/ou les macromolécules dans l'environnement de la sHSP est prédite, ont montré des activités chaperon et lipochaperon diminuées. Ceci est particulièrement remarquable pour la protéine T79V qui perd l'activité chaperon et les sites prédits de fixation aux protéines au niveau des feuillets $\beta 4$ et $\beta 5$. Il est intéressant de noter que cette perte d'activité chaperon peut être soit (i) directement liée au fait que les protéines dénaturées ne puissent plus interagir avec le feuillet $\beta 4$ de la protéine ou (ii) que l'association entre les feuillets $\beta 4/\beta 8$ et le domaine C-terminal soit limité, ne permettant plus la formation de larges oligomères indispensables à l'activité chaperon. Concernant l'activité lipochaperon diminuée notamment pour les protéines modifiées T79V ou E60K, des modifications (proportion de domaines cachés et/ou de désordre) sont prédites au niveau du domaine N-terminal de ces protéines. Ces résultats obtenus *in silico*, renforcent à nouveaux les liens existants entre la structure de Lo18 et ses fonctions.

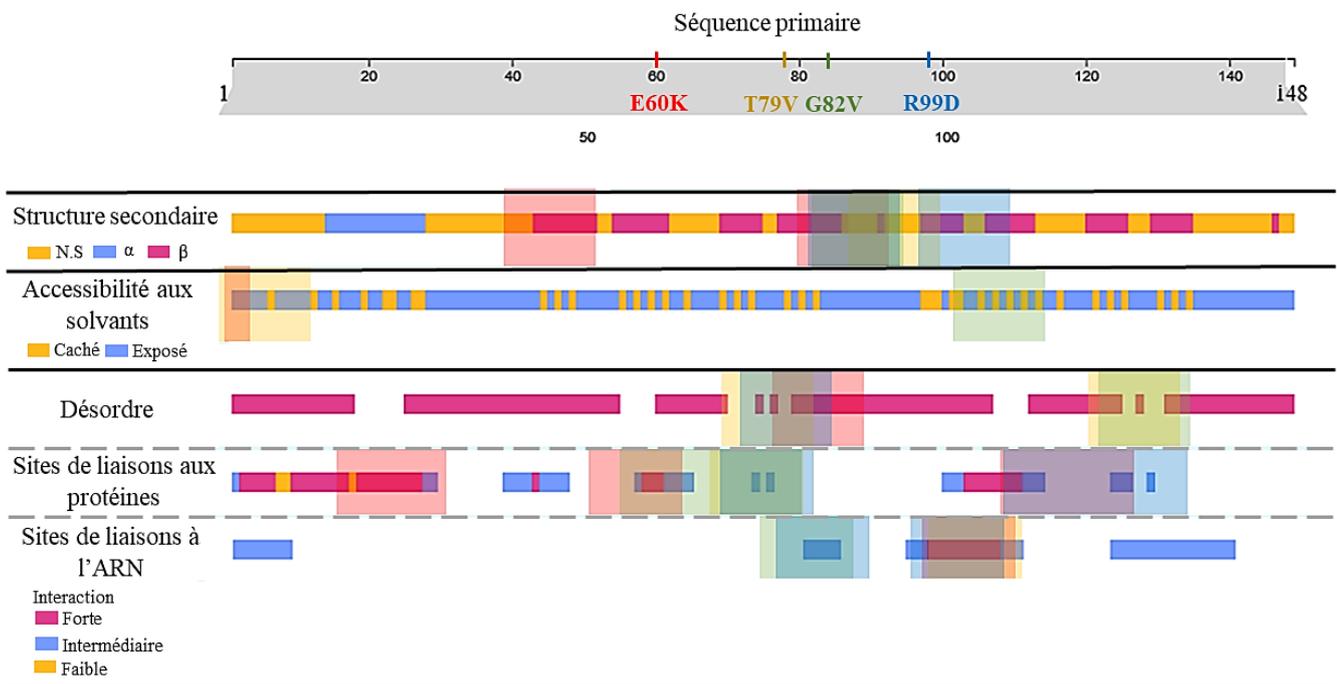


Figure 42 : Prédiction de l'impact des modifications sur la structure secondaire et l'accessibilité au solvant, aux protéines et aux macromolécules (ADN et ARN) réalisée par le logiciel PredictProtein. La localisation sur la protéine des modifications induites par les mutations est représentée par une zone de couleur, respectivement en rouge pour E60K, jaune pour T79V, vert pour G82V et bleu pour R99D.

En complément de cette prédiction, et afin d'illustrer la modification de structure observée *in vitro* lors des mesures de SRCD, la structure secondaire de la protéine Lo18 a été modélisée dans une gamme de température allant de 12°C à 85°C (Figure 43). Dans cette modélisation, les structures secondaires correspondant aux feuillets β , aux hélices α et aux structures intermédiaires sont représentées par des pixels verts, violets et bleus respectivement (Figure 43A). Arbitrairement la température de 12°C a été prise comme référence, puis comparée aux données obtenues à 40°C, 50°C, 62°C, 75°C et 85°C. Pour chaque température, la localisation des modifications a été mise en évidence sur une modélisation 3D de la protéine Lo18 (Figure 43B). Les modifications majeures et mineures, observables par la perte de netteté du motif présent sur la figure R9A, sont représentées respectivement en rouge et en bleu (Figure 43B). Un changement de structure, concernant principalement le domaine N-terminal et la longue boucle reliant le feuillet β 5 au feuillet β 7, est notable dès 40°C. A 50°C, de légères modifications au niveau du feuillet β 8 et une petite partie du feuillet β 4 sont observées. Passé cette température, les structures secondaires de la protéine poursuivent leur destruction, conduisant à une protéine complètement dénaturée à 85°C. Néanmoins, certains domaines comme les feuillets β 3 et β 7 gardent une structure peu altérée jusqu'à 75°C. Il est intéressant de noter que certains acides aminés importants dans l'activité lipochaperon de Lo18, comme les résidus E60 ou Y107, sont présents sur ces feuillets β 3 ou β 7. De plus, rappelons que les feuillets β 4 et β 8, affectés précocement par la température, sont essentiels pour la formation de larges oligomères. Cette modification de structure à ce niveau pourrait potentiellement favoriser la dissociation du complexe protéique en dimère, lui permettant ensuite d'interagir avec la membrane.

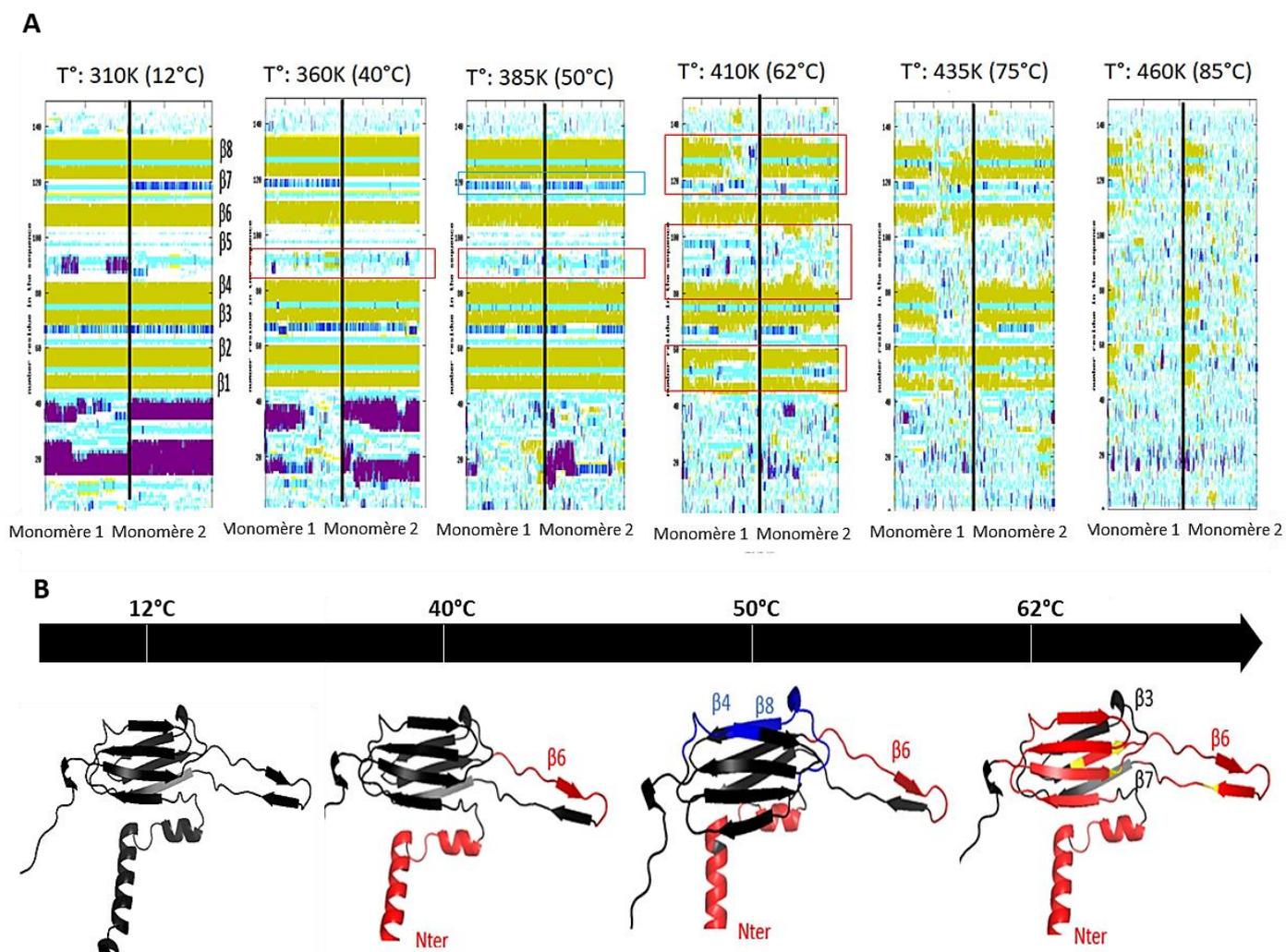


Figure 43 : Impact de la température sur la structure de Lo18. (A) Structure secondaire prédite de Lo18 à différentes températures (12°C à 85°C). Les structures secondaires sont représentées comme suit : hélices α en violet, feuillets β en vert, structures intermédiaires en bleu et parties non structurées en blanc. (B) Représentation 3D des domaines de Lo18 (A0NLC2) affectés par l'augmentation de la température. Les modifications majeures de la structure sont représentées en rouge, les mineures en bleu et les résidus E60, T79, G82 et R99 en jaune.

c. Cas de la protéine modifiée R99D :

Si la structure de la protéine est essentielle pour sa fonction de lipochaperon moléculaire, il a été surprenant de constater que la mutation R99D effectuée au niveau de la longue boucle entre le feuillet $\beta 5$ et $\beta 7$ a eu un impact significatif sur la structure de la protéine sans pour autant affecter de façon importante ses fonctions.

En effet, dans l'article présenté précédemment, nous avons observé par SRCO que la protéine Lo18 était fortement affectée par la mutation R99D au niveau de sa structure secondaire. Plus particulièrement, il a été constaté une diminution importante de la proportion des feuillets β au profit des hélices α . Par la localisation de ce résidu, il est possible que la majeure partie de ces modifications soient situées au niveau de la boucle reliant les feuillets $\beta 5$ et $\beta 7$. De manière inattendue, malgré cette modification de structure, les mesures d'anisotropie de fluorescence réalisées *in vitro* sur des liposomes issus d'une culture d'*O. oeni* (résultats présentés dans l'article précédent) n'ont pas montré de modifications majeures de l'activité lipochaperon de Lo18.

Les mesures d'anisotropie de fluorescence réalisées, cette fois-ci *in vivo* afin d'évaluer la modification de la fluidité membranaire d'*E. coli* ayant surexprimé la protéine modifiée R99D, ont montré des résultats opposés (Figure 44). La fluidification des cellules d'*E. coli* a atteint 85% de leur valeur d'anisotropie initiale après 15 minutes à 50°C en présence de la protéine modifiée R99D, contre 103% en présence de Lo18 et 97% pour les cellules seules, témoignant d'une perte d'activité lipochaperon de la protéine modifiée R99D. Il est intéressant de se demander quelles étaient les différences principales entre ces deux expérimentations pouvant expliquer les différences de résultats observés. L'une des hypothèses pourrait être que la nature lipidique différente des membranes d'*O. oeni* et *E. coli*, puisse moduler l'activité lipochaperon et la structure de Lo18. Il n'est, cependant, pas exclu qu'*in vivo* d'autres mécanismes prennent également le relais.

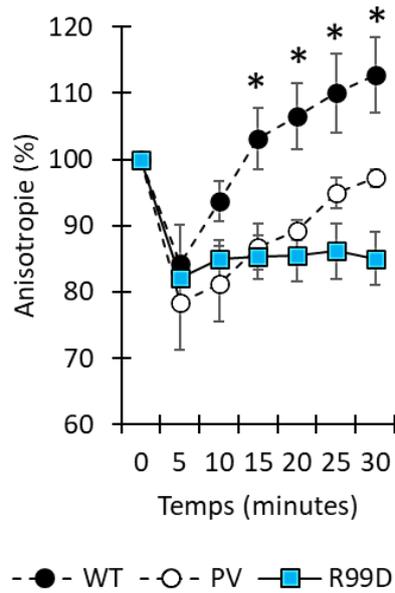


Figure 44 : Mesure d'anisotropie de fluorescence *in vivo*, après insertion de la sonde DPH dans les membranes des cellules d'*E. coli* durant un choc thermique à 45 °C, après induction de la protéines Lo18 (rond noir) ou de la protéine modifiée R99D. Une construction d'*E. coli* avec un plasmide vide a été utilisée comme contrôle négatif (PV). Les données représentent les moyennes +/- SE de trois expériences indépendantes analysée par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis

B. L'environnement lipidique induit-il une modification de structure de la protéine Lo18 nécessaire à l'activité lipochaperon des sHSPs?

1. Introduction

Suite à des stress environnementaux, une fluctuation plus ou moins importante de la fluidité membranaire peut être observée, pouvant conduire à la mort cellulaire en absence de mécanismes de résistance. Pour maintenir une fluidité optimale, les cellules peuvent ajuster la composition lipidique de leur membrane. Cependant, cette adaptation n'est pas immédiate et vise à contrer le stress à long terme. Pour agir rapidement au niveau membranaire, certaines cellules peuvent produire des protéines qui, en interagissant avec les lipides membranaires, contribuent à la stabilité de la membrane, comme c'est le cas de certaines sHSPs.

Des études antérieures ont montré que Lo18 a une affinité plus forte pour les substrats lipidiques que pour les substrats protéiques, lorsque la composition lipidique des membranes n'est pas encore adaptée au stress (Coucheney *et al.*, 2005; Maitre *et al.*, 2014). La première partie de ce travail de thèse conduit à penser que, selon la provenance des lipides utilisés (*O. oeni* ou *E. coli*) l'activité lipochaperon de la protéine modifiée R99D, était ou non présente. Ainsi, la composition lipidique de la membrane pourrait jouer un rôle dans la mise en place de l'activité lipochaperon de Lo18. L'implication de la composition membranaire a été rapportée pour d'autres sHSPs. En effet, l'interaction de sHSP avec la membrane a été décrite pour être à la fois sHSP-spécifique et dépendante des propriétés physicochimique de la membrane (telles que le degré d'insaturation des acides gras et la composition des têtes polaires), notamment pour HSPB5 chez l'homme, HSP15.8 et HSP16 de *S. pombe*, ou HSP16.3 de *M. tuberculosis* (Balogi *et al.*, 2008; Csoboz *et al.*, 2022; Glatz *et al.*, 2016; Tsvetkova *et al.*, 2002). Cependant les mécanismes mises en jeu et les liens entre la nature lipidique de la membrane et l'activité lipochaperon des sHSPs restent actuellement peu connus. Dans ce contexte, l'affinité de Lo18 pour des domaines lipidiques membranaires et son activité de lipochaperon ont été évaluées en utilisant différents types de lipides : (i) des vésicules issues des lipides purifiés de différentes phases de croissance de cultures *d'O. oeni* ou de *L. plantarum* ou (ii) des phospholipides commerciaux.

Dans un premier temps, des lipides ont été purifiés soit à partir de cultures d'*O. oeni* à différents stades de croissance (phase exponentielle, phase stationnaire ou au cours d'une culture en présence de 8% d'éthanol) soit d'une culture de *L. plantarum* (en phase exponentielle de croissance). Ces lipides ont été utilisés pour préparer des liposomes dont la composition lipidique a été déterminée en collaboration avec la plateforme LAP (Lipidomic Analytical Platform). En parallèle, la modification de la structure secondaire de Lo18 lors de son interaction avec les différents liposomes a été évaluée par SRCD au synchrotron SOLEIL, en collaboration avec le Dr. Frank Wien (Synchrotron SOLEIL), le Dr. Sophie Combet et le Dr. Paloma Varela-Fernandez (Université Paris-Saclay). Enfin, l'affinité de Lo18 pour différents phospholipides choisis pour leur nature physico-chimique (degré de saturation ou charge de leur tête polaire) a également été recherchée par immunomarquage. L'ensemble des résultats obtenus dans cette partie sont présentés sous forme d'un articles soumis à FEBS journal, ainsi que de résultats complémentaires.

2. Article de recherche 2 :

Titre: Structural modification of the sHSP Lo18 leading to loss of lipochaperon activity induce by stress adapted membrane interaction.

Auteurs : Tiffany Bellanger¹, Frank Wien², Sophie Combet³, Paloma Fernandez-Varela⁴, Stéphanie Wiedmann^{1@}

¹ Procédés Alimentaires et Microbiologiques (PAM), AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, Laboratoire VAIMiS-IUVV, Dijon, France.

@ Correspondence: stephanie.desroche@u-bourgogne.fr

²: Synchrotron SOLEIL, L'Orme des Merisiers, Saint Aubin BP 48, 91192, Gif-sur-Yvette, France.

³: Laboratoire Léon-Brillouin (LLB), UMR12 CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, F-91191, Gif-sur-Yvette CEDEX, France

⁴: Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198 Gif-sur-Yvette, France.

Keywords: Lipochaperone activity, Small Heat Shock Protein, Structural modification point-mutation, fluidity regulation, Lactic acid bacteria.

Soumis à FEBS journal (IF : 5.62)

Introduction

The acidity and alcohol concentration present in wine are the main causes of membrane damage found in wine-grown cells (Chu-Ky *et al.* 2005). Changes in charge induced by low pH or -OH residues, which have a strong affinity for the polar heads of phospholipids, disrupt the organization and structure of the membrane, which has an impact on the cell's permeability and membrane fluidity (Da Silveira *et al.* 2003; Wen-ying & Zhen-kui 2013). However, maintaining membrane fluidity is essential for the survival of micro-organisms. Any change in membrane fluidity disrupts the flux of nutrients/wastes across the membrane and dissipates the proton motive force (D'Amico *et al.* 2006; Olguín *et al.* 2009), which can slow down cell metabolism leading to cell growth arrest (Cisilotto *et al.* 2021; Gonzalez and Morales 2022). To maintain their membrane integrity, most of the key micro-organisms involved in the winemaking process have developed different strategies.

For *Oenococcus oeni*, the main lactic acid bacteria involved in malolactic fermentation, one of these mechanisms is the synthesis of stress proteins, such as its unique small heat shock protein (sHSP) named Lo18. sHSPs are small proteins of 12 to 42 kDa, present in almost all organisms. In oligomeric form, they are mainly known for their ability to prevent the aggregation of cellular proteins thanks to their chaperone activity. (Maitre *et al.* 2012; Haslbeck and Vierling 2015; Mogk *et al.* 2019; Obuchowski and Liberek 2020). However, for some sHSPs, such as HSPB1 and HSPB5 from human (De Maio *et al.* 2019), HSPA from *Synechococcus* sp. (Nitta *et al.* 2005; Obuchowski and Liberek 2020), HSP17 from *Synechocystis* sp. (Török *et al.* 2001; De Maio and Hightower 2021), HSP17.8 from *Arabidopsis thaliana* (Kim *et al.* 2011), HSP15.8 and HSP16 from *Schizosaccharomyces pombe* (Glatz *et al.* 2016), HSP18.55 from *Lactiplantibacillus plantarum* (Rocchetti *et al.* 2022) or Lo18 (Jobin *et al.* 1997; Guzzo *et al.* 1997; Delmas *et al.* 2001; Coucheney *et al.* 2005; Weidmann *et al.* 2010; Maitre *et al.* 2012, 2014), a second activity has been described. This activity, known as molecular lipochaperone, consists to help cells to maintain optimal membrane fluidity. According to the literature, when oligomers dissociate into dimers close to the membrane, electrostatic and hydrophobic forces deform the protein, allowing it to penetrate the membrane and maintain optimal fluidity (Bellanger and Weidmann 2022).

Regarding Lo18, previous studies have shown that (i) the structure and oligomeric plasticity of the protein have an impact on its lipochaperon activity (Weidmann *et al.* 2010; Maitre *et al.* 2014) and (ii) that Lo18 preferentially interacts with membrane lipids not yet adapted to stress (Maitre *et al.* 2014). However, the link between Lo18 lipochaperon activity or more generally sHSPs and membrane lipid profile remain poorly described and understood.

The aim of this work was to identify the link between the lipochaperone activity of Lo18 and the lipid composition of the membranes it interacts with. To do this, the preferred lipid substrate of Lo18 was determined by immunolabelling. The lipochaperone activity and structural modifications of Lo18 were observed when it interacted with four types of liposomes, whose lipid composition was derived, either from *O. oeni* cultures at different growth phases (exponential, stationary or adapted to 8% ethanol) or from an exponential phase culture of *L. plantarum*. The results enabled (i) to identify the preferred lipid substrates of Lo18 and (ii) to suggest that Lo18 structure depends on the quantity of preferential lipids present in the membranes, thus conditioning lipochaperon activity.

Material and methods

Media and growth conditions

O. oeni ATCC BAA-1163 was grown in modified FT80 medium (Cavin *et al.* 1989) at pH 5.3 and 28°C in the presence or absence of 8% ethanol. *L. plantarum* WFS1 was grown in MRS medium (Condalab, Spain) at pH 6.2 and 28°C.

Preparation of liposomes

O. oeni and *L. plantarum* cultures were grown to the exponential and/or stationary growth phase before being extracted and purified according to the methods of Bligh and Dyer (Bligh and Dyer 1959). Liposomes were produced by adapting the method described by Maitre *et al.* (Maitre *et al.* 2012). Indeed, the chloroform present in the lipid fraction was evaporated using a nitrogen flow. The lipids were then gently resuspended in 10 mL of 50 mM phosphate buffer pH 7.0 previously heated to 55 °C. After being sonicated twice for 2 min (Branson Ultrasonics™ CPX-952-138R, Branson Ultrasonics, Brookfield, CT, US), the lipid solution was rehydrated for 4 h at 55 °C. The lipid particles were then extruded through a polycarbonate membrane with 1 µm diameter pores to obtain the liposomes. Liposomes were stored at 4 °C for up to 1 week.

Fluidity Measurements

Fluorescence anisotropy measurements (reflecting the fluidity state of the membrane) were performed using a Fluorolog 3 spectrofluorometer (FLUOROLOG-3, Jobin Yvon Inc, USA). Each measurement was performed at an excitation and emission wavelength of 360 nm and 431 nm, respectively. In details, 250 μ L of liposomes prepared as described above, 3 μ M of 1,6-diphenyl-1,3,5hexatriene (DPH) probe (Sigma Aldrich, St. Louis, US) were mixed in a quartz cuvette (10 mm optical path) to a final volume of 3 mL. Measurements were performed on the liposome suspension in the presence or absence of Lo18 with a mass ratio of 1:2 (m/m) (Lo18/liposomes) following a temperature rise from 15 to 84°C (2°C per min increase) controlled by a Peltier system (QNW TC1 temperature controller, Quantum Northwest, Liberty Lake, WA, USA). For each experiment, an anisotropy value was obtained each 14.6 s and calculated according to Shinitzky and Barenholz (Shinitzky and Barenholz 1978) . Each experiment was performed in triplicate.

Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism spectra were collected on the DISCO beamline (Synchrotron SOLEIL, France) according to Evans et al (Evans *et al.* 2004) . In detail, the instrument was calibrated using a 99% pure (+) camphor-10-sulphonic acid (Sigma Aldrich, Saint-Louis, US) at 25°C after each beam fill (Miles *et al.* 2004). 140 μ M Lo18 sample was prepared alone in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 or in the presence of liposomes 250 μ M liposomes. Then, 50 μ L of sample was loaded into a 0.02 cm pathlength demountable cylindrical quartz Suprasil cell (Hellma, Germany) and subjected to a thermal scan from 15°C to 84°C with a step of 3°C. Each dataset was collected in 1 nm steps from 262 nm to 176 nm, with an integration time of 1.2 s and a spectral bandwidth of 1 nm. Three scans of each sample and the equivalent baseline were collected. The sample spectrum was averaged across the three repeats, and the averaged baselines (buffer without protein) subtracted. Baseline-subtracted spectra were zeroed between 250 and 260 nm. All the spectra were normalized according to the protein concentration and pathlength using the CDToolX software and deconvoluted using Bestsel online software (Micsonai *et al.* 2022).

Lipid Protein overlay assay

The interactions between lipids and Lo18 or modified proteins were observed by immunostaining, according to Dowler (Dowler *et al.* 2002). A drop of 2 μ L of dipalmitoyl phosphatidylethanolamine (DPPE), dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE), dioleoyl phosphatidic acid (DOPA), dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC), dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC), dipalmitoyl phosphatidylglycerol (DPPG) and dioleoylphosphatidylglycerol (DOPG) (Avanti polar, USA) at 1.5 mM was deposited on a PVDF membrane (Fisher scientific, USA). The membrane was blocked in TBS/Regilait 5% 1 h at 70 rpm and washed three times for 5 min with TBS. It was then incubated with Lo18 or modified purified protein at 7.5 μ g/mL and washed again three times. Afterward, the protein bound to the lipids was detected with antibodies against Lo18 (1/750) and against the primary antibody (1/2000) by incubating the membrane for 1 h at 70 rpm for each antibody. Chemiluminescence was detected using ECL reagent kit (Thermo Fisher, USA). In order to quantify the interaction between Lo18 and the phospholipids a normalization step was added. For that, the proportion of phospholipids fixe to the PVDF membrane was measured by fluorescence imaging after 15 minutes incubation with 50 mM of Nile Red staining. Then the signal intensity obtained for the immulabelling measurement was adjusted to the signal obtain for the Nile Red staining.

Lipidomic analysis

Total fatty acids analysis by GCMS-NCI

Bligh and Dyer lipid extracts (50 μ L) were mixed with 25 μ L of a fatty acids internal standard mix (Avanti Polar Lipids, France) containing 1146 ng of myristic acid-d3, 4973 ng of palmitic acid-d3, 3703 ng of stearic acid-d3, 3174 ng of linoleic acid d4, 45.8 ng of arachidic acid-d3, 1632 ng of arachidonic acid-d8, 47.6 ng of behenic acid-d3, 476.1 ng of DHA-d5, 22.9 ng of Lignoceric-d4, and 17.6 ng of cerotic acid-d4. Total fatty acids were quantitated after alkaline hydrolysis by GCMS-NCI as previously described (Blondelle *et al.*, 2017).

Lipids analysis by LCMS2

Bligh and Dyer lipid extracts (200 μ L) were dried under vacuum and mixed with an internal standard mix (50 μ L) (CDN Isotopes, France and Cayman, France) , (14:0)4CL (800 ng), (12:0)2DG (8 μ g), and (21:0)2PC (50 ng) (Bligh & Dyer). Sample (1 μ L) was analyzed by

LCMSMS using a Zorbax®Eclipse Plus C18 1,8 µm, 2,1 x 100mm column maintained at 55°C (Agilent Technologies).

Briefly, digalactosyldiacylglycerols (DGDG), monogalactosyldiacylglycerols (MGDG), diacylglycerols (DG) were separated on a 1260 Infinity LC system (Agilent Technologies) with a gradient of mobile phase A (acetonitrile/water/1M ammonium formate (60/39/1 v/v/v) with 0.1% formic acid), and mobile phase B (isopropanol/acetonitrile/1M ammonium formate (90/9/1 v/v/v) with 0.1% formic acid) (Cajka *et al.*, 2023) at a flow rate of 0.4ml/min set as follows : 1 min hold at 50% B; 50-60% B in 4 min; 60-85% B in 10 min; 85-99% B in 1 min; 2 min hold at 99%, 99%-50% ramp-down in 0.1 min and maintained at 50% B for 3.9 min. Acquisition was realized on a 6460 Triple Quadrupole (Agilent Technologies) equipped with an ESI Jet stream source (temperature 250 °C, nebulizer 20 L/min, sheath gas 11 L/min, sheath gas temperature 220°C, capillary 3500 V, nozzle 1000 V) operating in positive Single Reaction Monitoring (SRM) mode (fragmentor 148 V, collision energy 23 V). Transitions were set as the neutral loss of 359 Da for DGDG or 197 Da for MGDG from their respective [M+NH₄]⁺ ions (Carriot *et al.*, 2021) DG (as NH₄⁺ adducts) were quantified according to the sum of the signal resulting from the neutral loss of either their sn-1 or sn-2 fatty acid. Finally, lipid concentrations were determined by calculating their relative response to (12:0)2DG used as internal standard.

Phosphatidylglycerols (PG), lysyl-phosphatidylglycerols (lysyl-PG) were separated with the same mobile phases and column as for DGs, and the elution gradient used was set as follows: 2 min hold at 50% B; 50-99% B in 14 min; 2 min hold at 99%, 99%-50% ramp-down in 0.1 min; return to initial conditions in 1.9 min. Acquisition was realized on a 6460 Triple Quadrupole (Agilent Technologies) equipped with an ESI Jet stream source (temperature 200 °C, nebulizer 20 L/min, sheath gas 11 L/min, sheath gas temperature 220°C, capillary 3500 V, nozzle 1000 V) operating in positive Single Reaction Monitoring (SRM) mode (fragmentor/collector 116 V/13 V and 300 V/34 V for PG and Lysyl-PG respectively). Transitions were set as the neutral loss of 189 Da or 300 Da for [PG+NH₄]⁺ and [Lysyl-PG+H]⁺ ions respectively. Lipid concentrations were determined by calculating relative response ratios with regards to (12:0)2DG used as internal standard.

The analysis of cardiolipins (CL) and phosphatidylcholines (PC) was achieved as previously described (Cotte *et al.*, 2019; Vial *et al.*, 2015) except that a Vanquish LC system, coupled to a triple-stage quadrupole (TSQ)

Altis mass spectrometer equipped with a heated electrospray ionization source (Thermo Scientific) was used (sheath gas, 50 arb; auxiliary gas, 10 arb; sweep gas, 1 arb; ion transfer tube temperature, 325°C; vaporizer temperature, 350°C and ion spray voltage, 3500 V (+), and 2500 V (-)). Lipid concentrations for all quantified lipid classes were expressed in pmol/mg of Bligh and Dyer extract.

Statistical analysis

For each condition tested on fluorescence anisotropy, immunolabelling, lipidic profile and secondary structure analysis were performed from three independent measurements. The anisotropy values obtained were normalized to be expressed in percentage compared to the initial value at 15°C. Statistical analyses were performed by the statistical RStudio software (version 1.2.5033). The normality of the distribution and homogeneity of the variances of each condition were tested by the Shapiro-Wilk test and the Bartlett test, respectively. Then, a non-parametric Kruskal-Wallis test was used to compare the samples with a significance level of $\alpha = 0.05$. All the statistical tests were considered significant at a p-value < 0.05 .

Results

Lipids membrane composition impact lipochaperon activity of Lo18

In order to determine the impact of lipid composition on the lipochaperon activity of Lo18, liposomes made up of purified lipids from cultures of (i) *O. oeni* at different growth phases (exponential, stationary and grown in the presence of 8% of ethanol) and (ii) *L. plantarum* were used. The lipid composition of these four liposomes was first determined by chromatography (Figure 45). Analysis of the polar heads showed that digalactosyldiacylglycerols (DGDG) were the main lipids found in *O. oeni* regardless of the growth phase, representing 38%, 64% and 57% respectively of the total lipids in liposomes from cultures in the exponential phase, stationary phase or in the presence of 8% ethanol. For liposomes derived from *O. oeni* and *L. plantarum* cultures in exponential phase, phosphatidylglycerol (PG) also represented a predominant lipid, accounting for 39% of total lipids for *O. oeni* and 67% for *L. plantarum* (Figure 45 A). Lysyl-PG, cardiolipins (CL) and phosphatidylcholins (PC) are also present in *O. oeni* membranes in very low quantities, from 0.009% in cells cultured in in exponential phase

to 0.2% in those adapted to 8% ethanol of CL. In contrast, *L. plantarum* cells, which contain very little CL and PC (around 0.001%), have a Lysyl-PG content of around 7%. Regarding the fatty acid chains, they ranged from myristic acid, C14:0, to lactobacillic and dihydrosterulic acid (respectively cycC19:0 n-7 and cycC19:0 n-9), abbreviated C19:1 (Figure 45B, Supplementary data; Table 10). Palmitic acid, C16:0 (saturated), and oleic acid, C18:1 (unsaturated), are the most abundant fatty acids in *O. oeni* cells in exponential or stationary phase, representing 37% and 26% respectively in exponential phase and 29% and 25% in stationary phase. During adaptation to alcohol the proportion of unsaturated fatty acids was significantly reduced, representing 12% of lipids compared with 28% and 29% in the exponential and stationary phases. This decrease in saturated fatty acids is mainly due to the decrease in the proportion of C18:1, from 26% to 25% in the exponential and stationary phase to 11% in the presence of ethanol. Unexpectedly, the proportion of C19:1 cyclic fatty acids was not significantly increased under stress (stationary phase or ethanol), although it reached 30% in stationary phase compared with 21% in exponential phase.

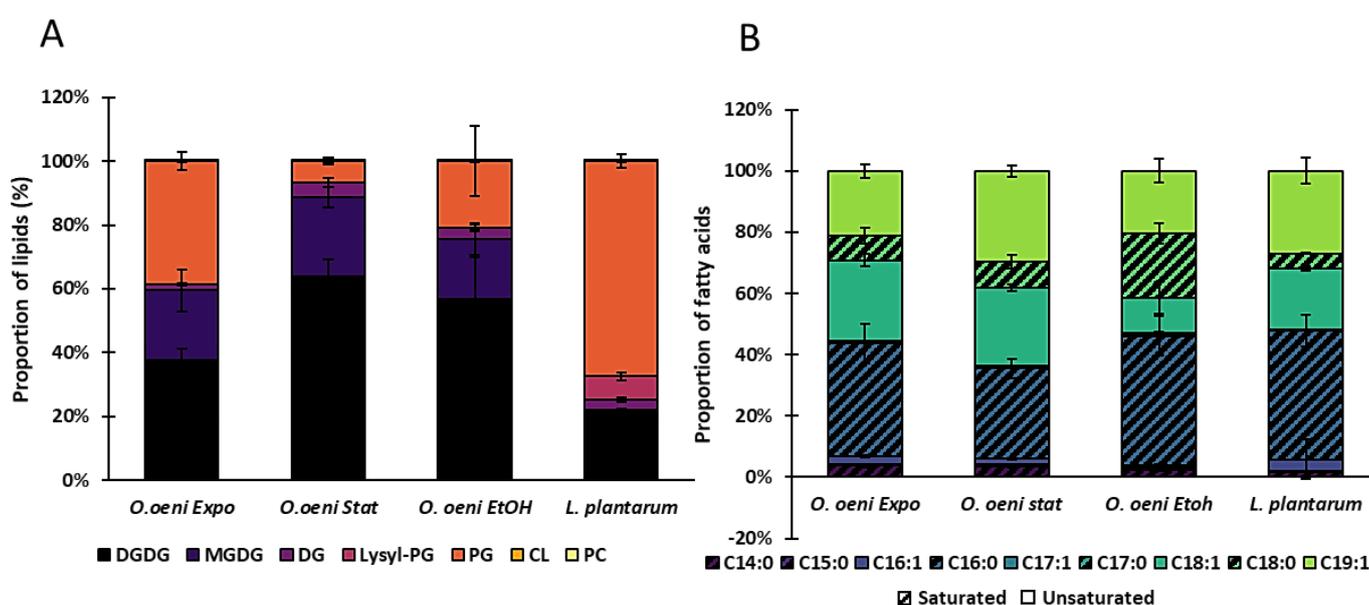


Figure 45: Lipidic composition of the liposomes used. Lipidic profiles of (i) *O. oeni* liposomes in exponential, stationary, or 36 h ethanol-adapted, or (ii) *L. plantarum* liposomes. Proportion of polar head group type (A) and fatty acids (B) of each liposome. The data represent the means and SE of three independent experiments and are analyzed statistically by Kruskal-Wallis nonparametric test.

The variation of the membrane fluidity of these four liposomes was then measured by steady-state fluorescence anisotropy of DPH in the absence or presence of Lo18 during a thermal ramping from 15°C to 81°C (Figure 46).

The ability of the Lo18 protein to maintain membrane fluidity was shown to be specific to liposomes. Lo18 maintained membrane fluidity in liposomes from both exponential and stationary cultures of *O. oeni* and exponential culture of *L. plantarum*, notably reaching 66%, 67% and 51% of their initial anisotropy value in the presence of Lo18 versus 36%, 52% and 37% in the absence of Lo18 at 65°C. However, the lipochaperone effect of Lo18 appeared later on liposomes in stationary phase than on those in exponential phase. With regard to the maintenance of membrane integrity in liposomes from ethanol-adapted *O. oeni* cultures, no difference was observed in the presence or absence of Lo18. However, whether liposomes were grown in stationary phase or adapted to alcohol, their fluidization was less pronounced than that of liposomes in exponential phase, which could explain the slight disparity between conditions with and without Lo18 (Supplementary data, Table 11)

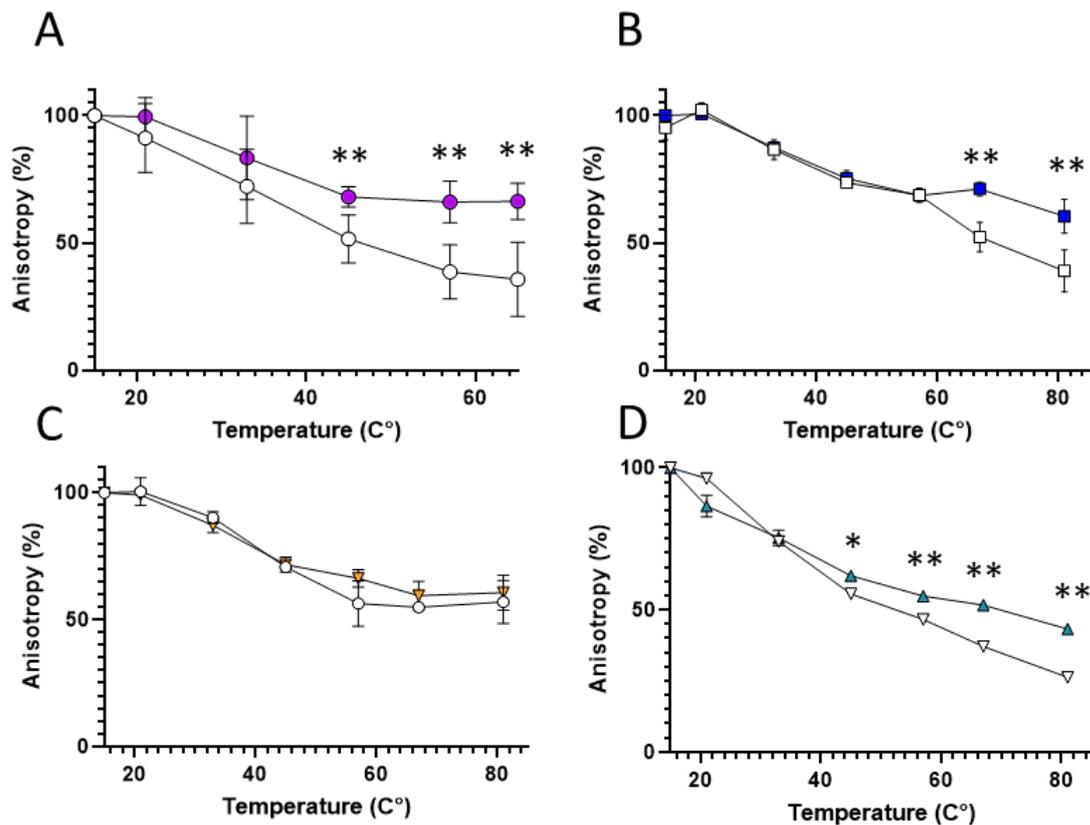


Figure 46 : Lipochaperone activity of Lo18 according to the lipidic substrate. Measure of fluorescence anisotropy of DPH inserted into liposomes of: (i) *O. oeni* in the exponential phase (circle), the stationary phase (square), or 36 h ethanol-adapted (inverted triangle), or (ii) *L. plantarum* (triangle) during thermal ramping between 15 to 85 °C in the absence (white symbols) or presence of Lo18 (colored symbols). The data represent the means and SE of three independent experiments and are analyzed statistically by the Mann-Whitney U-test.

Favored lipidic Lo18 substrates

To link the data obtained on anisotropy measurement and the lipidic profile of liposomes used, the types of phospholipids involved in this interaction have been investigated. For that, immunoblotting measurement allowed to observe the interaction between Lo18 and several common phospholipids chosen for their physical properties and also their presence in *O. oeni* membranes. Phospholipids were either unsaturated (dioleoyl, DO-) or saturated (dipalmitoyl, DP-) lipids with neutral (phosphatidylethanolamine, -PE and phosphatidylcholine, -PC) or negative (phosphatidic acid, -PA and phosphatidylglycerol, -PG) charged head group. The intensity of the signal obtained after hybridization with Lo18 was normalized with the quantity of phospholipids fixed on the PVDF membrane (obtained after staining with Nile Red) (Supplementary Data; Figure 49). After this normalization step, Lo18 was identified as able to interact specifically with phospholipids; the quantification step showed an increased affinity for unsaturated fatty acids (DOPG, DOPC and DOPE) and/or with phosphatidylglycerol head group (DPPG and DOPG). Interestingly, very low signal was observed with DOPA (Figure 47). These results suggest that Lo18 may interact with membrane thanks to hydrophobic and electrostatic interactions forces.

Impact of the membrane lipids composition on the structure of Lo18

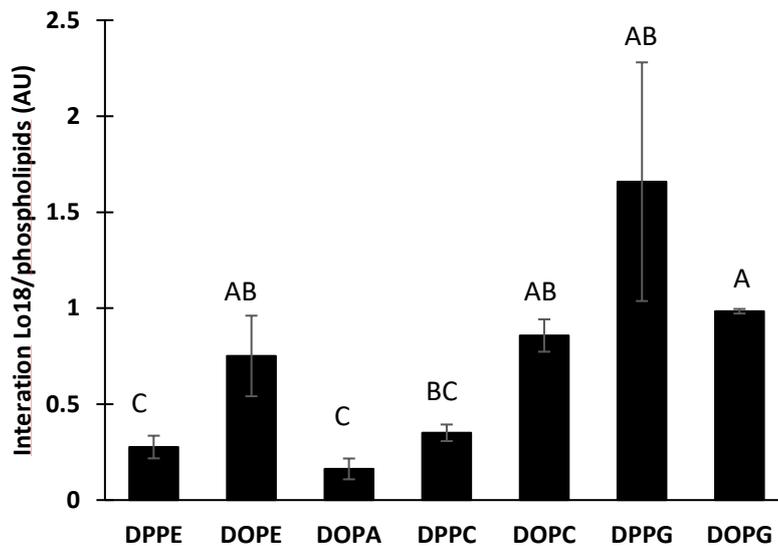


Figure 47 : Lipid affinity test of Lo18. Immunolabeling measurements were performed between Lo18 and several common phospholipids: unsaturated (dioleoyl, DO-) or saturated (dipalmitoyl, DP-) lipids with neutral (phosphatidylethanolamine, -PE and phosphatidylcholine, -PC) or negative (phosphatidic acid, -PA and phosphatidylglycerol, -PG) charged head group. The intensity of the signal obtained after the hybridization with Lo18 was normalized with the number of phospholipids fixed to the PVDF membrane. The data represent the means and SE of three independent experiments and are analyzed statistically by the Kruskal-Wallis nonparametric test.

To further characterize the modification of lipochaperon activity linked to the lipidic profil of the membrane used, the secondary structures of Lo18 during its interaction with the four types of liposomes were monitor by SRCD experiments during a thermal ramping from 20°C to 60°C (Figure 48). The proportion of α -helix increases significantly when Lo18 interacts with liposomes. Indeed, during a thermal ramp (15 to 75°C) the helix rate is around 5% for the Lo18 protein whereas it reaches 9%, 14%, 17% and 7% respectively when interacting with liposomes from *O. oeni* cells in exponential, stationary and ethanol adapted phases, as well as with *L. plantarum* cells. Notably, strong discrimination was obtained at a temperature of 45°C with a α -helix rate of up to 24% when interacting with liposomes from ethanol-adapted cells, compared with ~7% for the other conditions (Figure R48A). In contrast, interaction with liposomes decreased the proportion of β -sheets. For example, at 45°C for Lo18 alone, the proportion of β -sheets was of 43% compared to 37%, 35%, 21% and 31% respectively upon interaction with liposomes from an exponential, stationary or alcohol-adapted phase culture of *O. oeni* or a culture of *L. plantarum* (Figure R48B).

This reduction in the proportion of β -sheets was greater when interacting with liposomes from *O. oeni* cells in exponential phase than with those from ethanol-adapted stationary-phase cultures and *L. plantarum* cells. Furthermore, a reduction in the abundance of β -sheets in favor of an increase in non-ordered structures was observed at 45°C, regardless of the origin of the liposomes, suggesting denaturation of the Lo18 protein (Figure R48C and R48D).

Insertion of Lo18 into the liposomes could also be monitored by SRCD measurement. Upon insertion of Lo18 into the membrane a distinct epaulement appeared in the 195-210 nm range (Figure R48E to R48I). This shoulder is clearly visible when interacting with liposomes derived from *O. oeni* cells in exponential or stationary phase showing at 15°C a $\Delta\epsilon$ value at 200nm of -10.1 and -11.6 respectively, compared to -14.7 for the protein alone, and totally absent in the other two conditions (-15.7 and -15.8 respectively for liposomes derived from an alcohol-adapted culture and from a *L. plantarum* culture). This insertion can be observed up to 45°C, beyond which the structure of Lo18 begins to be affected. However, it is interesting to note that the secondary structure of Lo18 interacting with liposomes from stationary-phase, alcohol-adapted or *L. plantarum* cultures appears to be less sensitive to temperature damage than the protein alone (represented by the black dotted line) or interacting with liposomes from exponential-phase cultures (Figure R48H).

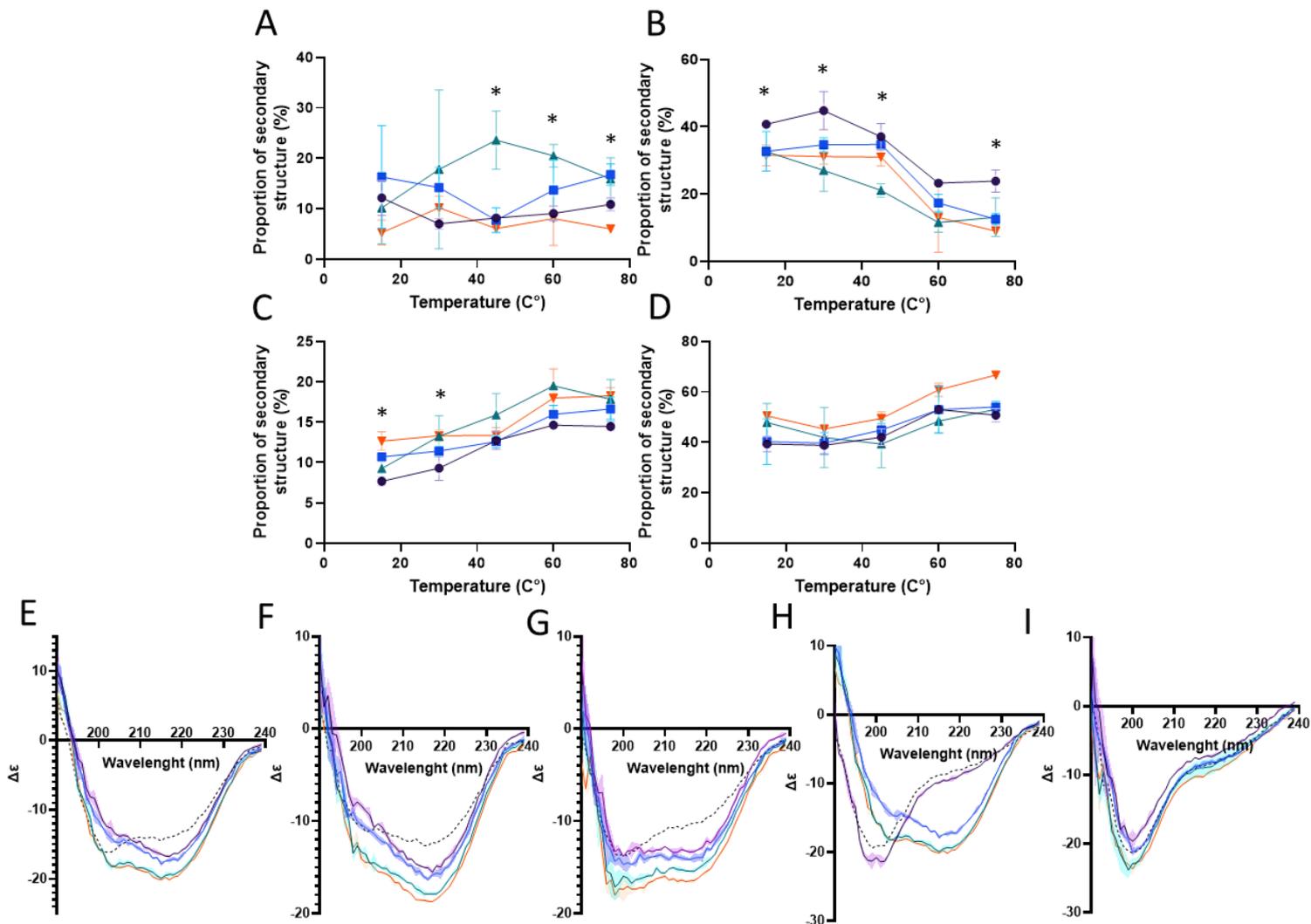


Figure 48 : Structure modification of Lo18 protein according to its membrane interaction. Secondary structure modifications of Lo18 in interaction with liposomes of (i) *O. oeni* in the exponential phase (circle, black), the stationary phase (square, blue) or 36 h ethanol-adapted (inverted triangle, orange), or (ii) *L. plantarum* (triangle, dark green). Proportion of secondary structures: α -helix (A), β -sheet (B), turn (C), or unordered structure (D) monitored during thermal ramping (from 15°C to 85°C). SRCD spectra on 190-240 nm wavelength range at 15°C (E), 30 °C (F), 45 °C (G), 60 °C (H), and 75 °C (I) of Lo18 in interaction with liposomes (same color code as previous) or alone (black dotted line). The data represent the means and SE of three independent experiments and are analyzed statistically by the Kruskal-Wallis nonparametric test, $pV < 0.05$.

Discussion

Membranes are the first cellular component affected by environmental changes. Depending on the time and intensity of the stress, the viscosity of the membrane, of the range 0.1 Pa.s, can be modified, leading to its fluidization or rigidification (Denich *et al.* 2003). To maintain optimum membrane fluidity, cells deploy a variety of mechanisms. In bacteria, adjustments such as changes in (i) saturated/unsaturated fatty acid ratios, (ii) the nature of unsaturations, (iii) the length of fatty acid carbon chains or (iv) changes in polar heads are frequently observed (Beney

and Gervais 2001; Denich *et al.* 2003; Bouix and Ghorbal 2015; Fonseca *et al.* 2019). However, these response mechanisms can only regulate membrane fluidity in the long term. To cope rapidly with an alteration in membrane integrity, cells have the capacity to synthesize proteins acting as regulators of membrane fluidity, as sHSPs, like Lo18 synthesized by *O. oeni* (Lee *et al.* 1992; Laskowska *et al.* 1996; Török *et al.* 2001; Otani *et al.* 2005; Coucheney *et al.* 2005; Weidmann *et al.* 2010; Maitre *et al.* 2012, 2014; Csoboz *et al.* 2022; Rocchetti *et al.* 2022). Previous studies have shown that Lo18 has a stronger affinity for lipid substrates than for protein substrates; especially when the lipid composition of membranes is not yet adapted to stress (Maitre *et al.* 2014). The lipochaperone activity of sHSPs depends then on the lipid composition of the membrane.

In this context, the affinity of Lo18 for lipid membrane domains and its lipochaperon activity were evaluated using different types of lipids: (i) vesicles with lipids purified from different growth phases cultures of *O. oeni* or *L. plantarum* or (ii) commercial phospholipids.

Firstly, the Lo18 lipochaperon activity was monitored over the fluidization of four different types of liposomes. Three of them was composed of lipid extracted from *O. oeni* different growth phase culture (exponential phase, stationary phase or after 36h 8% ethanol adaptation) mimicking respectively a non-stress membrane and two stress-adapted membranes (Teixeira *et al.* 2002; Maitre *et al.* 2014). The fourth liposome, reconstituted from exponential growth phase *L. plantarum* membrane, was used to test the specificity of Lo18. Each type of liposome showed a modulation of its lipidomic profile. Indeed, liposomes from the both bacterial cultures (*O. oeni* and *L. plantarum*) in exponential phase had a significantly higher proportion of PG (phosphatidylglycerol) than liposomes from the *O. oeni* culture in stationary phase or adapted to alcohol. In addition, all the liposomes, except those adapted to alcohol, had a high proportion of oleic acid (C18:1). The diminution of unsaturated fatty acids observed on lipids from ethanol-adapted culture, is a long term adaptative mechanism allowing the cells to compensate the fluidifying effect caused by ethanol (Grogan and Cronan 1997; Denich *et al.* 2003; Bouix and Ghorbal 2017; Fonseca *et al.* 2019).

As consequence to the adaptation on lipids composition the rigidity of the four liposomes were not similar. The more rigid the membrane, the less mobile the phospholipids and the more ordered they are. In results to a greater bilayer stability, a restriction of protein insertion (Fonseca *et al.* 2019) and a decreased protein activity (Lenaz 1987) can be noticed.

This could potentially explain the lack of Lo18 insertion on rigid membrane, such as stress-adapted membrane. A loss of negative absorption and a batho-chromic (red-) shift of the π - π^* electronic transition at 208 nm (Bürck *et al.* 2016) are overserved on SRCD spectra in presence of ethanol-adapted liposomes that translates the protein inability to insert into the membrane. Consequently, liposomes from exponential-phase cultures has a lipid composition which may enhanced their interaction with Lo18, allowing a more effective lipochaperon activity, in contrast to liposomes from ethanol-adapted cultures. Indeed, Lo18 displayed an ability to restrain the fluidization of liposomes from *O. oeni* and *L. plantarum* cultures in exponential phase but had no effect on the fluidization of liposomes from *O. oeni* cultures in stationary phase or adapted to ethanol.

To deeper decipher the link between lipochaperon activity and the binding ability of Lo18, its affinity to several phospholipids chosen for their physical properties were determined by immunolabelling. Lo18 were able to interact with all the common phospholipids tested, except DOPA which, due to its conical conformation, might be less accessible (Zhukovsky *et al.* 2019). However, the interaction between the different phospholipids was not at the same intensity, suggesting a greater affinity for unsaturated fatty acids and/or with phosphatidylglycerol head group. The observation of a Lo18 membrane affinity that is dependent on both the nature of the polar heads and the degree of unsaturation of the membrane lipids is consistent with what has been shown for other sHSPs such as for human HSPB1 (De Maio *et al.* 2019; Csoboz *et al.* 2022), HSP16 from *S. pombe* (Glatz *et al.* 2016), HSP17 from *Synechocystis* (Tsvetkova *et al.* 2002) or HSP12 from *Ustilago maydis* (Mitra *et al.* 2023). Moreover, it is also important to note that the fewer phospholipids in the membrane with a high affinity for Lo18, the lower the lipochaperon. As the greater Lo18 lipids affinity is for fluid membrane lipids, the exhibition of hydrophobic cores in the bilayer could be higher, creating hydrophobic docking surfaces to which Lo18 can bind (Csoboz *et al.* 2022). It appears that by interacting with membrane, Lo18 may limit the formation of hyperfluidic states and stabilise the membrane certainly in liquid crystalline form as previously described (Tsvetkova *et al.* 2002; Coucheney *et al.* 2005; Glatz *et al.* 2016; Bellanger and Weidmann 2022)

At least, in accordance with literature on membrane protein (Lenaz 1987) the decrease in membrane fluidity caused by the increase in saturated fatty acids may modify the structure of Lo18. In order to validate this hypothesis, the secondary structures of Lo18 were determined during Lo18-liposomes interaction by SRCD measurement.

In interaction with the four types of liposomes, an increase of the proportion of α -helices in disfavor to β -sheets was observed compared to the Lo18 protein alone. It was particularly marked in presence of liposomes with a high initial rigidity, such as those obtained from ethanol adapted culture. Indeed, at 45° the proportion of α -helices is eight times higher than the protein alone, as well as the proportion of β -sheets is divided by two. These structural modifications could reflect a major relaxation and flexibility of the Lo18 structure during its interaction with liposomes (Balogi *et al.* 2005; Schulz and Schirmer 2013).

To summarize, the results obtained show that (i) Lo18 has a higher affinity for unsaturated lipids and/or lipids with polar glycerol heads, and (ii) the lipid composition is crucial for lipochaperon activity. Indeed, the lower the content of these preferential lipids in the membrane, the greater the relaxation of Lo18 during its interaction, decreasing then the lipochaperon activity. Taken together, these results allow to suppose that Lo18 may be attracted and deformed by polar head groups to interact with unsaturated fatty acids, suggesting the involvement of electrostatic and hydrophobic forces to bind Lo18 and lipid membrane.

In conclusion, this work has contributed to a better understanding of the mechanisms of interaction between sHSPs and bacterial membranes. Such an understanding could allow the use of sHsps for their lipochaperone role in different fields, such as in the agri-food industry (Capozzi or Arena 2019) or in the medical field for the treatment of neurodegenerative diseases (Tóth *et al.* 2015).

Acknowledgments

This work was supported by the Regional Council of Bourgogne- Franche-Comté Bourgogne grant number 2021Y-09559, and the Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, grant number MESR 2020–04. The authors would like to thank the Dimacell Platform (Agrosup Dijon, INRA, INSERM, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon France), the lipidomic platform (ADRESSE) and the Synchrotron SOLEIL (CNRS-CEA Paris Saclay, France) for x-ray beamtime on DISCO beamline (project # 20220067). We would also like to thank Accent Europe for proofreading the English text.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Author contribution:

T. B. and S. W: Conceptualization, T. B., and S. W: Methodology, T. B. Formal analysis, T. B., S. W: Investigation, T. B., S. W, F. W.. : Resources T. B. and S. W : Writing – Original Draft T.B, S. W., F. W., P. F.-V. and S. C. : Writing – Review & Editing S. W.: Validation, Project administration and Funding acquisition

Data availability: The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Supplementary data

Table 10: Supplementary data, lipidomic analysis of the four liposomes used during experiments. Data corresponding to means \pm SE and statistical analysis for each line. Measurement were replicat three time and analyse by Kruskal-Wallis statistical test (P-value<0.05).

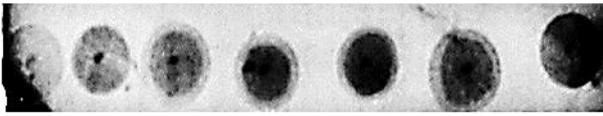
	<i>O. oeni</i> Exponential	<i>O. oeni</i> Stationary	<i>O. oeni</i> Ethanol 8%	<i>L. plantarum</i>	
Fatty acids (%)	C14:0	3.7 \pm 0.5 A	3.5 \pm 0.5 A	2.3 \pm 0.4 AB	1.8 \pm 0.2 B
	C15:0	0.6 \pm 0.1 A	0.5 \pm 0.1 A	0.8 \pm 0.1 A	0.1 \pm 0 B
	C16:1	2.4 \pm 0.6 A	1.9 \pm 0.5 A	0.8 \pm 0.3 A	3.9 \pm 0.8 B
	C16:0	36.9 \pm 6.3 A	29.6 \pm 3.1 A	42.2 \pm 6.5 A	42.1 \pm 5.1 A
	C17:1	0.6 \pm 0.1 A	0.4 \pm 0.1 AB	0.3 \pm 0.1 BC	0.2 \pm 0.1 C
	C17:0	0.4 \pm 0.1 B	0.4 \pm 0.1 B	0.7 \pm 0.1 A	0.1 \pm 0 C
	C18:1	26.3 \pm 2 A	25.5 \pm 1.1 A	11.5 \pm 5.1 B	20 \pm 0.7 B
	C18:0	7.9 \pm 2.7 A	8.6 \pm 2.3 A	21 \pm 3.3 B	4.9 \pm 0.3 A
	C19:1	21.2 \pm 2.2 A	29.6 \pm 1.9 A	20.4 \pm 3.9 A	26.9 \pm 4.2 A
Polar head groups (%)	DGDG	37.5 \pm 33.5 AB	63.8 \pm 5.3 A	56.7 \pm 13.3 A	21.6 \pm 0.9 B
	MGDG	22 \pm 6.7 A	24.8 \pm 3.2 A	18.7 \pm 4.9 A	0.3 \pm 0.1 B
	DG	1.7 \pm 0.3 A	4.7 \pm 1.3 A	3.7 \pm 1.1 A	3.4 \pm 0.7 A
	Lysyl-PG	0.2 \pm 0.2 A	0 \pm 0 A	0 \pm 0 A	7.2 \pm 1.1 B
	PG	38.6 \pm 2.7 AB	6.7 \pm 1.2 C	20.8 \pm 10.9 BC	67.4 \pm 2 A
	CL	0.009 \pm 0.003 A	0.05 \pm 0.01 B	0.02 \pm 0.008 AB	0.002 \pm 0.0005 C
	PC	0.0001 \pm 0.00008 A	0.00006 \pm 0.000004 A	0.0003 \pm 0.0002 A	0.0007 \pm 0.0001 B

Table 11: Supplementary data, anisotropy measurement of liposomes of (i) *O. oeni* in exponential, stationary or ethanol-adapted or (ii) *L. plantarum* during thermal ramping between 15 to 65 °C in the absence or presence of Lo18. The data present the means of three independent experiments.

		<i>O. oeni</i>			<i>L. plantarum</i>
	Condition	Exponential	Stationary	Ethanol-adapted	Exponential
Anisotropy without Lo18	15°C	0.189	0.185	0.201	0.186
	65°C	0.070	0.105	0.108	0.070
	Rate of fluidification (%)	-63.0	-43.4	-46.2	-62.3
	Slope	-0.0024	-0.0016	-0.0019	-0.0023
Anisotropy with Lo18	15°C	0.220	0.228	0.239	0.208
	65°C	0.155	0.161	0.144	0.103
	Rate of fluidification (%)	-29.5	-29.2	-39.8	-50.5
	Slope	-0.0013	-0.0013	-0.0019	-0.0021

A

Nil Red coloration control



DPPE DOPE DOPA DPPC DOPC DPPG DOPG

B

Immunostaining



DPPE DOPE DOPA DPPC DOPC DPPG DOPG

Figure 49: Supplementary data, lipids staining by 50 mM of Nile Red of several common phospholipids: unsaturated (dioleoyl, DO-) or saturated (dipalmitoyl, DP-) lipids with neutral (phosphatidylethanolamine, -PE and phosphatidylcholine, -PC) or negative (phosphatidic acid, -PA and phosphatidylglycerol, -PG) charged head group (A). Immunolabelling interaction between Lo18 and the several common phospholipids (B). The membrane presented correspond to an experiment representative of three independent measurement.

3. Résultats complémentaires

Les résultats précédemment décrits ont mis en évidence l'affinité spécifique de Lo18 pour les lipides insaturés et/ou les lipides ayant une tête polaire de phosphatidylglycérol. De plus, il a également été observé que moins ces lipides étaient présents dans la membrane, plus la structure de Lo18 était modifiée, et moins son activité lipochaperon était importante. Cependant, les forces et le dynamisme impliqués dans cette interaction n'ont pas été décrits dans cette étude et font l'objet des résultats complémentaires.

a. Forces physico-chimiques impliquées dans l'interaction entre Lo18 et la membrane :

Afin d'évaluer l'impact des forces d'interactions électrostatiques et hydrophobes mises en jeu dans l'interaction entre Lo18 et les lipides membranaires, le comportement d'un dimère de Lo18 tronqué pour les 20 premiers acides aminés du domaine N-terminal (modèle A0NLC2, seul modèle disponible lors de la modélisation) a été modélisé en présence d'une membrane modèle de POPC (phosphatidylcholine). Rappelons que la forme tronquée de Lo18 au niveau de son domaine N-terminal est une forme fréquemment retrouvée, pour Lo18 ou d'autres sHSPs, qui ne semble pas présenter de modifications pour son activité. La modélisation a permis de quantifier une interaction Lo18-membrane de POPC, caractérisée par une distance entre Lo18 et la membrane de POPC inférieure à 0,2 nm. Cette interaction est observée dès 100 ns, et aucune dissociation n'a été constatée au-delà de ce délai indiquant une interaction rapide et persistante (Figure 50A). Deux domaines spécifiques de Lo18 ont été identifiés dans cette interaction : une partie du domaine N-terminal et la boucle située entre les feuillettes $\beta 5$ et $\beta 7$. Ces prédictions suggèrent que certains résidus présents sur ces domaines, tels que la phénylalanine en position 34 (F34) d'un monomère ou les asparagines en position 20 et 25 (N20 et N25) de l'autre monomère soient à moins de 0,2 nm de la membrane de POPC dans 28% et 85% des cas, respectivement (Figure 50B). En outre, le modèle obtenu à partir de ces prédictions suggère que le domaine N-terminal tronqué puisse pénétrer la membrane POPC du résidu N20 (premier acide aminé dans le modèle utilisé) au résidu F34 (Figure 50C).

Ce domaine de 14 résidus est riche en acides aminés hydrophobes pouvant permettre une interaction de nature hydrophobe entre le domaine N-terminal et les acides gras de la membrane. En revanche, les résidus d'asparagine en position 95 (N95) et d'arginine en position 99 (R99) présents au niveau du feuillet β_6 montrent une probabilité d'interaction allant de 12,5% à 23% (Figure 50A), mais ils ne semblent pas capables de pénétrer la membrane de POPC (Figure 50C). Par conséquent, il semblerait que l'interaction entre Lo18 et la membrane de POPC soit due à des d'interactions de nature hydrophobe et électrostatique. Plus précisément, les interactions hydrophobes entre la membrane et le domaine N-terminal pourraient favoriser l'insertion de Lo18, tandis que les interactions électrostatiques au niveau du feuillet β_6 pourraient faciliter l'adhérence de Lo18 à la membrane modèle.

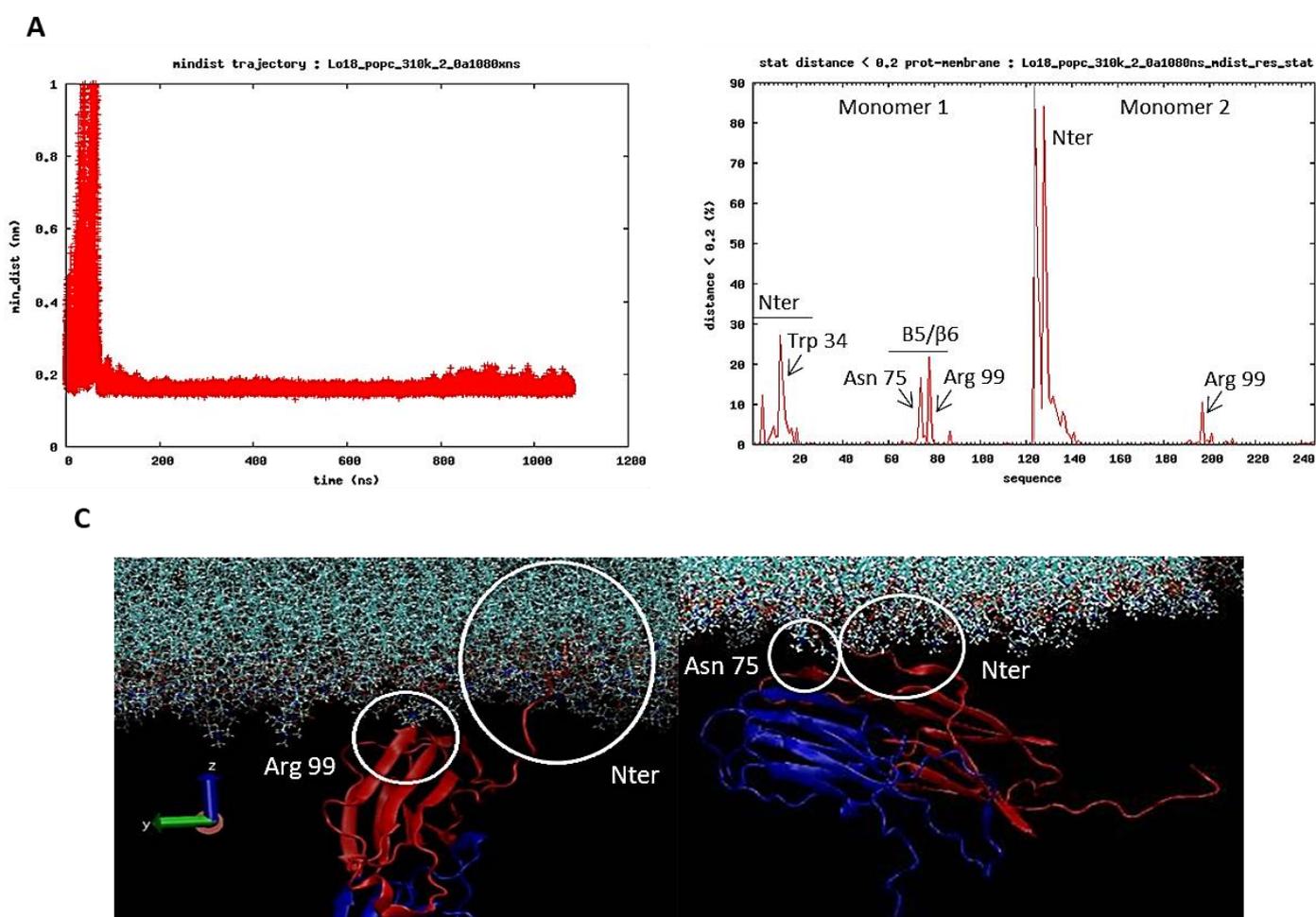


Figure 50 : Modélisation de l'interaction Lo18/membrane (A) Prédiction de la distance entre des résidus de Lo18 et la membrane POPC. Probabilité qu'un résidu de Lo18 se trouve à moins de 2 Å de la membrane modèle POPC. Plus la probabilité est élevée, plus l'interaction entre ce résidu et la membrane modèle POPC est importante (B). Prédiction de la distance d'interaction entre un dimère modèle de Lo18 (tronqué de son domaine N-terminal) au cours du temps. L'interaction entre Lo18 et la membrane est rendue possible lorsque la distance est inférieure à 2 Å. (C) Représentation 3D des sites d'interaction entre Lo18 (domaine N-terminal, asparagine 75 et arginine 99, entourées en blanc) et la membrane modèle POPC.

En complément de cette modélisation, la charge globale de la protéine Lo18 ainsi que la distribution des charges et des domaines hydrophobes sur la protéine ont également été recherchées. Pour ce faire le potentiel zêta, qui évalue l'attraction électrostatique et donc la charge globale de Lo18 (Figure 51A) et les différents domaines (électrostatiques et hydrophobes) de la protéine ont été examinés. Les résultats obtenus ont montré que, bien que la protéine Lo18 ait une charge nette globale négative lorsque le pH est supérieur à 3, elle comporte de larges domaines chargés positivement, principalement hydrophiles, notamment au niveau de ses domaines terminaux (Figure 51B). Il semble plausible que ces domaines chargés positivement puissent se lier avec des lipides chargés négativement, comme le phosphatidylglycérol (PG) qui est l'un des lipides majoritairement présents dans la membrane d'*O. oeni* (résultats présentés dans l'article au paragraphe IV.B.2).

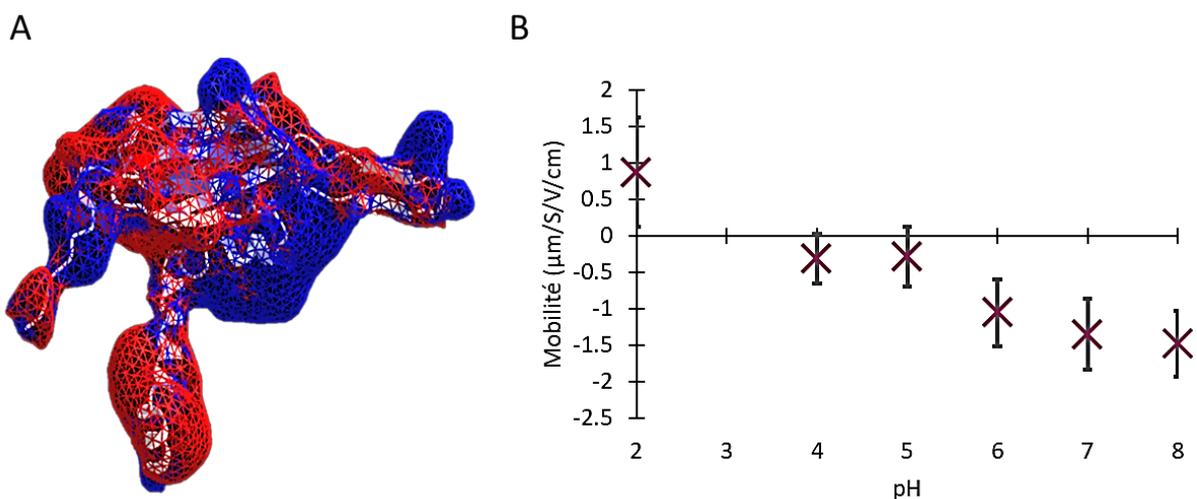


Figure 51 : Répartition des charges sur la protéine Lo18 (A) Mesure du potentiel zêta de la protéine Lo18 traduisant la mobilité de la protéine dans du PBS à 0,2 M à différents pH (2 à 8) soumis à un courant de 120 V. Dix répétitions, +/- SD. (B) Représentation 3D de la répartition des charges négatives (bleu) et positives (rouge) sur la protéine Lo18.

b. Cinétique d'interaction entre la protéine Lo18 et la membrane :

Afin d'évaluer la cinétique de l'interaction entre la protéine Lo18 et la membrane, une collaboration avec le Dr. Paloma Fernandez-Varela (université Paris-Saclay) a été engagée. Nous avons déterminé les cinétiques d'association et de dissociation entre Lo18 et des liposomes issus d'une culture en phase exponentielle d'*O. oeni* par switchSENSE®. Lo18 présente une activité lipochaperon plus importante avec ces liposomes, c'est pourquoi ils ont été choisis.

Brièvement le switchSENSE® correspond à un nanolevier d'ADN, sur lequel la molécule d'intérêt est potentialisée, qui est actionné électriquement par des microélectrodes en or. Lorsque la protéine d'intérêt interagit avec son ligand (des liposomes dans notre cas), un fluorophore fixé à l'extrémité du brin matrice détecte les changements locaux d'environnement et émet un signal. Bien que la faible potentialisation de Lo18 sur les nanoleviers d'ADN n'ait pas permis de quantifier précisément la constante d'affinité de l'interaction Lo18/liposomes, il a été possible d'estimer les cinétiques de cette interaction (Figure 52). L'interaction entre la protéine Lo18 et les liposomes a montré une vitesse d'association et de dissociation rapide, de l'ordre d'une quarantaine de secondes (Figure 52). Des résultats similaires avaient également été observés par modélisation (Figure 50) et lors des mesures d'anisotropie de fluorescence (résultats présentés dans le 1^{er} article de recherche de ce manuscrit) où une rigidification des liposomes avait été observée dans les secondes qui avaient suivies l'ajout de Lo18 à la solution contenant les liposomes. La rapidité de cette réaction suggère que les mécanismes permettant l'interaction Lo18/membrane puissent être de nature électrostatique.

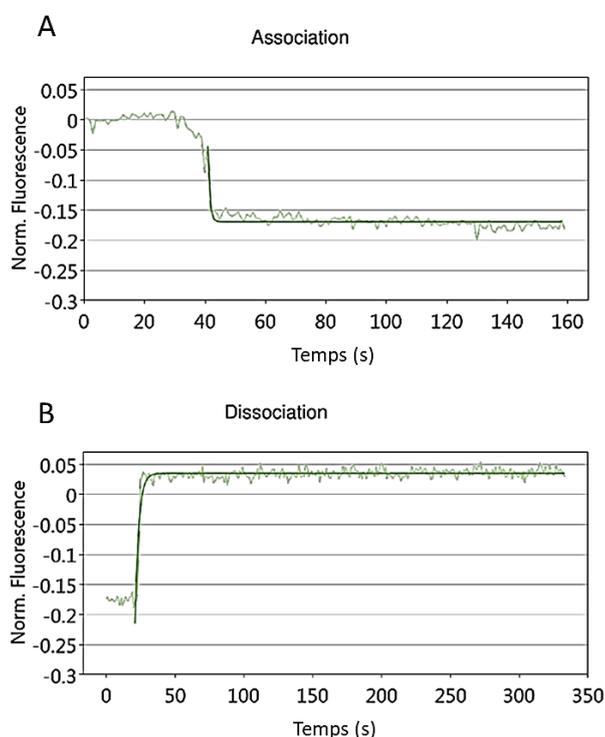


Figure 52 : Cinétique d'association et de dissociation de la protéine Lo18 (100 μ M) avec des liposomes (30 μ M) issus d'une culture d'*O. oeni* en phase exponentielle de croissance dans du tampon phosphate, obtenue par SwitchSENSE®.

C. Caractérisation de l'impact de Lo18 dans la réponse au stress à l'échelle de la population bactérienne.

L'étude de l'impact de Lo18 dans la formation de biofilm est à un stade encore préliminaire. De ce fait, les travaux réalisés dans cet axe de thèse ne permettent pas leur soumission dans un article de recherche original. Néanmoins, pour faciliter la lecture, les résultats obtenus sont présentés sous forme d'article.

1. Introduction

La vie en communauté joue un rôle essentiel dans la survie des organismes. De ce fait, le mode de vie sous forme de biofilm représente le mode de vie microbien prédominant (Costerton, 1995; Flemming & Wingender, 2010). Ce regroupement cellulaire confère à la population bactérienne une résistance accrue face aux stress chimiques ou physiques tels que les stress acides, éthanol ou encore les variations de température (Ciofu *et al.*, 2022). Il a été constaté que certaines cellules au sein du biofilm peuvent contribuer à renforcer la résistance globale au stress de l'ensemble du biofilm en partageant des molécules et des macromolécules qu'elles produisent (Lee *et al.*, 2010) Par exemple, certaines sHSPs impliquées dans la résistance aux stress grâce à leurs rôles de chaperon et/ou lipochaperon moléculaire ont été décrites comme ayant un effet positif sur la formation du biofilm. C'est notamment le cas pour IbpAB chez *E. coli* (Kuczyńska-Wiśnik *et al.*, 2010), Hsp18 chez *M. ulcerans* (Pidot *et al.*, 2010) HSP1 et HSP2 chez *L. plantarum* (Rajasekharan & Shemesh, 2022) ou HSP12 chez *S. cerevisiae* (Zara *et al.*, 2002). En ce qui concerne la protéine Lo18, les travaux de Bastard et collaborateur ont démontré que, en réponse au stress, les cellules en biofilm d'*O. oeni* continuent de synthétiser Lo18 (Bastard *et al.*, 2016). Cependant, aucun lien entre la synthèse ou la présence de Lo18 dans l'environnement et la formation de biofilm n'a été étudié à ce jour.

Dans ce cadre, nos objectifs étaient de caractériser les effets de la présence de la protéine Lo18 (i) sur la formation des biofilms, et (ii) sur la résistance des cellules en biofilm à des stress environnementaux : un stress thermique (qui est un stress de référence) et un stress acide (stress caractéristique du milieu vin). Pour cela, des biofilms d'*O. oeni* formés en présence ou absence de Lo18 ont été analysés. Tout d'abord la structure et la biomasse de ces biofilms ont été caractérisées par microscopie confocale et méthode de microbiologie classique.

Les biofilms ainsi formés ont été soumis à différents stress physiques (45°C) ou chimiques (pH 2,5) pour une durée de 1h à 4h dans le but d'évaluer la contribution de la protéine Lo18 dans leur résistance. Ce travail a permis d'étudier la contribution de la protéine Lo18 dans la cohésion des cellules du biofilm et dans leur résistance aux stress, particulièrement ceux de nature chimique.

2. Matériels et méthodes

Les méthodes expérimentales utilisées dans ce chapitre, notamment l'évaluation de l'épaisseur du biofilm, de la biomasse, ainsi que de la viabilité cellulaire en réponse aux stress thermique et acide, sont détaillées dans la section "Matériels et Méthodes" de ce manuscrit.

3. Resultats/Discussion

Pour survivre aux conditions difficiles retrouvées dans le vin (alcool, acide, sulfites) *O. oeni* a mis en place de nombreux mécanismes de résistance, dont la formation de biofilm. En effet, à l'échelle de la population, les cellules d'*O. oeni* peuvent s'organiser sous forme de biofilm (Bastard *et al.*, 2016), à l'échelle individuelle elles peuvent également synthétiser des protéines de stress thermiques comme Lo18 (Beltramo *et al.*, 2004; Guzzo *et al.*, 2000; Jobin *et al.*, 1999; Maitre *et al.*, 2014). Des recherches antérieures menées au sein du laboratoire ont montré que ces deux mécanismes peuvent coexister simultanément (Bastard *et al.*, 2016), sans qu'aucun lien n'ait été établi. Actuellement, un nombre croissant d'études ont permis de montrer un impact positif des sHSPs dans la formation de biofilm (Diaz *et al.*, 2006; Kuczynska-Wisnik *et al.*, 2002; Pidot *et al.*, 2010; Rajasekharan & Shemesh, 2022; Zara *et al.*, 2002). Il nous est alors paru légitime de se questionner sur le rôle que pourrait avoir la protéine Lo18 dans la formation de biofilm.

a. Impact de Lo18 sur la structure du biofilm

Afin de caractériser l'impact de l'ajout de la protéine Lo18 au milieu de culture lors de la formation de biofilm, les cellules d'*O. oeni* ont été cultivées 24h à 28°C dans du milieu FT80 enrichi ou non avec 10 µM de Lo18 ou 10 µM de BSA (contrôle négatif). Les cellules vivantes des biofilms ainsi formés ont ensuite été marquées en vert avec 75 µM de 5-Carboxylfluorescein Diacetate (cFDA) puis observées dans les trois dimensions par microscopie confocale (Figure 53A). Pour chaque condition, dix photos, issues de répétitions indépendantes, ont été prises. Pour chacune de ces photos, 10 mesures de l'épaisseur du biofilm ont été prises sur des coupes longitudinales à 100 µm d'intervalle. Les biofilms constitués de cellules cultivées en présence de Lo18 sont apparus deux fois moins épais, passant d'une épaisseur de 35 µm et 32 µm en absence de Lo18 ou présence de BSA, respectivement, à 18 µm en présence de Lo18 (Figure 53B). Cependant, bien que l'épaisseur moyenne du biofilm soit impactée par la présence de Lo18, les épaisseurs minimales et maximales des biofilms n'étaient pas différentes, suggérant une hétérogénéité de la répartition cellulaire plus importante en absence de Lo18 (Figure 53B). Dans le même temps, la biomasse de chaque biofilm (absence ou présence de Lo18 ou de BSA) a été quantifiée par dénombrement. L'ensemble des biofilms avait une biomasse similaire d'environ $7 \cdot 10^7$ UFC/mL (Figure 53C). Étant donné que la biomasse de l'ensemble des biofilms est inchangée alors que l'épaisseur diminue en présence de Lo18, il semble possible que Lo18 puisse favoriser la cohésion des cellules au sein du biofilm. Les biofilms ainsi structurés, pourrait permettre une meilleure résistance au stress, principalement chimique en limitant l'exposition des cellules.

Des résultats opposés ont été rapportés à la suite de la surexpression de HSP18 de *M. ulcerans* dans des cellules d'*E. coli* au cours de la formation du biofilm. En effet, les biofilms produits suite à cette surexpression présentaient à la fois une biomasse et une épaisseur plus importantes que ceux formés par les cellules n'exprimant pas HSP18 (Pidot *et al.*, 2010). Cependant, dans ces travaux HSP18 était présente dans le milieu intracellulaire, contrairement à Lo18 dans nos expériences. Dans le milieu intracellulaire, HSP18 pourrait influencer, grâce à son rôle de chaperon, les mécanismes d'exportation et de synthèse de diverses molécules impliquées dans les différentes étapes de la formation du biofilm (substance polymérique, flagelles, fimbriae) favorisant l'augmentation de la biomasse et l'épaisseur des biofilms (Pidot *et al.*, 2010; Van Houdt & Michiels, 2005).

A l'inverse, il est plausible que, une fois présentes dans le milieu extracellulaire, les sHSPs puissent interagir avec ces structures et les composants de la matrice extracellulaire (EPS), favorisant alors l'attachement et l'agrégation cellulaire. Cette augmentation de l'attachement cellulaire pourrait potentiellement conduire à la formation d'un biofilm plus cohésif, comme observé en présence de Lo18.

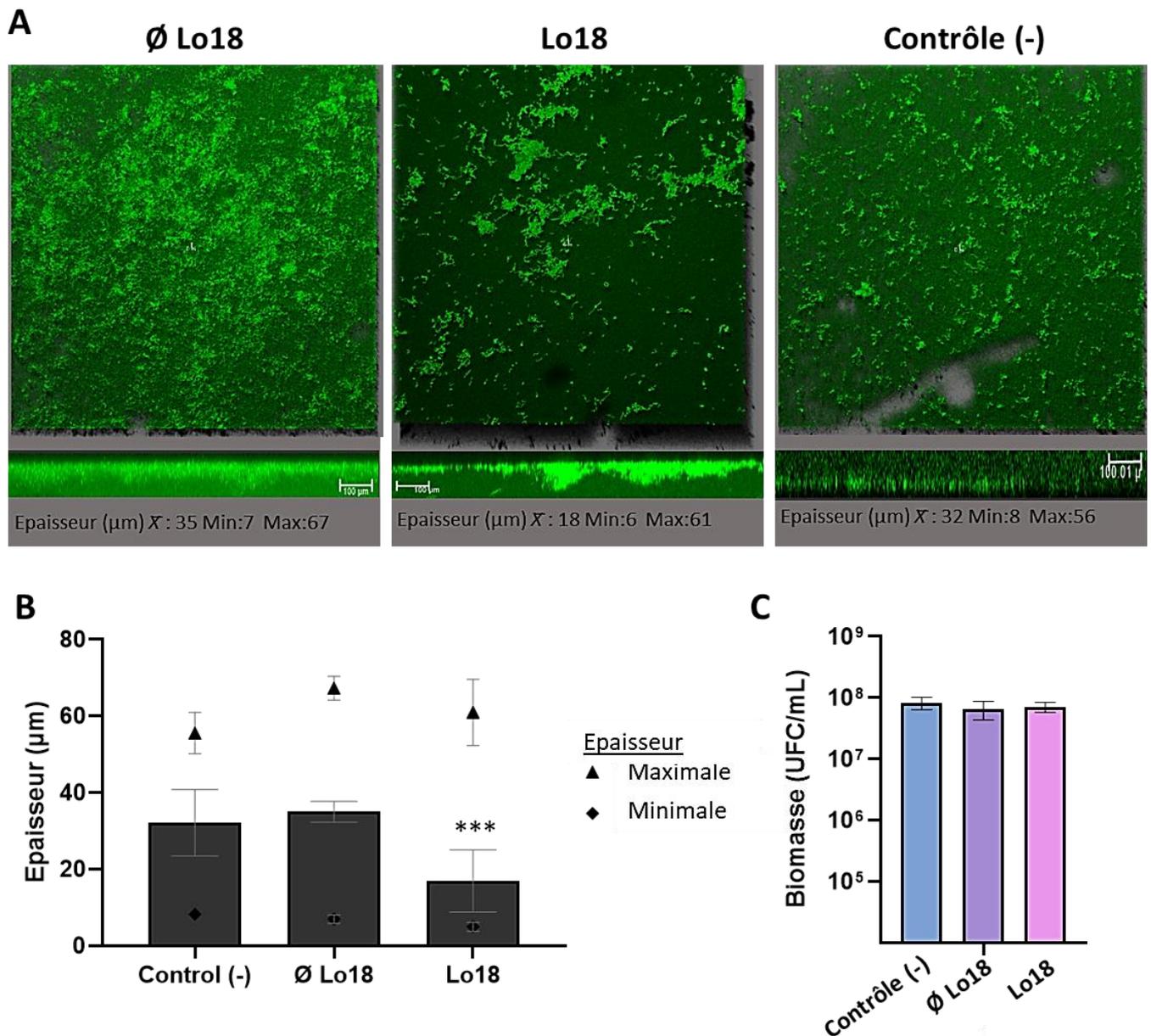


Figure 53 : Caractérisation de biofilm d'*O. oeni* cultivé en présence de Lo18. (A) Biofilm de 24h cultivé dans du milieu FT80 enrichi ou non avec 10μM de Lo18 ou 10μM de BSA (contrôle négatif). Les cellules vivantes ont été marquées en vert avec 75 μM de 5-Carboxylfluorescein Diacetate (cFDA) puis observées dans les trois dimensions par microscopie confocale. (B) Mesure de l'épaisseur du biofilm, pour chaque biofilm, une mesure sur une coupe longitudinale a été faite tous les 100 μm sur 1 cm. Les épaisseurs moyennes, minimales et maximales ont été représentées. (C) Mesure de la biomasse des biofilms par dénombrement. Chaque mesure a été répétée 10 fois lors de l'analyse microscopique et trois fois lors des dénombrements. Les résultats ont été analysés par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis, p.value < 0.05.

b. Résistance aux stress physique et chimique

Les biofilms étant décrits comme des structures de résistances au stress, nous nous sommes intéressés à la résistance des cellules des différents biofilms (cultivés en absence ou présence de Lo18 ou de BSA) aux stress physique et chimique (ici thermique et acide). Pour ce faire, les biofilms ont été respectivement incubés à 45°C ou dans un tampon MES à pH 2,5 durant 4h (temps nécessaire pour permettre la perte de viabilité des cellules cultivées en absence de Lo18) (Figure 54). En accord avec les résultats précédemment décrits, en absence de stress, aucune modification de biomasse n'est observée entre les conditions testées, leur biomasse étant alors de l'ordre de $1,3 \cdot 10^8$ UFC/mL. De même, à la suite du stress thermique à 45°C, aucune différence significative n'a également été observée, avec une biomasse d'environ $1 \cdot 10^8$ UFC/mL. A l'inverse, à la suite d'un stress acide (pH 2,5), la biomasse des cellules du biofilm cultivé en présence de Lo18, était 2,8 fois plus importante que celle obtenue en absence de Lo18 ou en présence de BSA, passant de $2,8 \cdot 10^8$ UFC/mL (+Lo18) à $9,8 \cdot 10^7$ UFC/mL (-Lo18) et $1 \cdot 10^8$ UFC/mL (+BSA) respectivement. Ces résultats indiquent de nouveau que la présence de Lo18 pendant la formation du biofilm, pourrait favoriser la cohésion des cellules, et améliorer (même faiblement) leur viabilité lors de stress chimiques. Des résultats similaires ont été rapportés chez IbpA chez *E. coli* (Kuczynska-Wisnik *et al.*, 2002) ou HSP18 chez *M. ulcerans* (Pidot *et al.*, 2010), que ce soit dû à une augmentation de la cohésion cellulaire au sein du biofilm comme observé pour Lo18 ou dû à une action intracellulaire de ces sHSPs. En effet, il est important de noter que lors de stress physiques, tels que les variations de température, la cohésion cellulaire accrue des biofilms cultivés en présence de Lo18 pourrait ne pas suffire à éviter l'élévation de la température au niveau de chaque cellule. En revanche, cette cohésion cellulaire renforcée pourrait limiter la diffusion du tampon acide à travers le biofilm. De ce fait les cellules situées au centre du biofilm seraient préservées du stress, ce qui contribuerait à accroître la survie globale de la population.

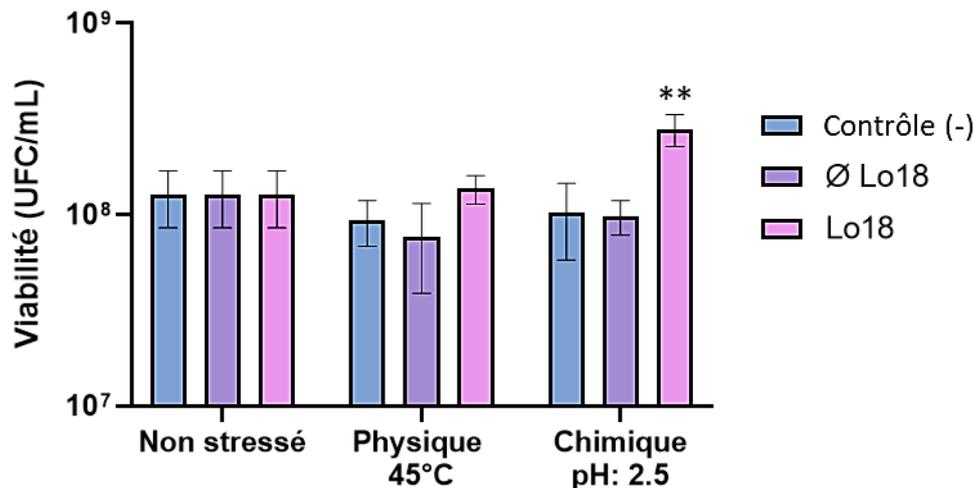


Figure 54 : Résistance aux stress physiques et chimiques des cellules en biofilm. Viabilité des cellules en biofilm cultivées en absence ou présence de Lo18 ou BSA (contrôle -), après une incubation de 4h dans soit du tampon MES à 30°C (non stressé), à 45°C (stress thermique) ou dans du tampon MES à pH 2,5 (stress acide). Les résultats représentent la moyenne de trois répétitions indépendantes +/- SEM et ont été analysés par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis, p.value < 0.05.

c. L'augmentation de la cohésion des cellules en biofilm ; une nouvelle fonction de Lo18 ?

Depuis la fin des années 1990, il a été établi que certaines protéines, peuvent remplir plusieurs fonctions distinctes. Ces protéines sont alors dites « moonlighting protein » (Jeffery, 1999). La protéine Lo18, qui exerce deux fonctions distinctes, de chaperon et lipochaperon moléculaire, au sein de la cellule pourrait éventuellement être considérée comme une protéine moonlighting. Par conséquent, il est légitime de se demander si l'impact observé sur la structure des biofilms est attribuable à l'une des deux fonctions connues de Lo18 ou à une troisième fonction encore inconnue. Pour répondre à cette question, des biofilms d'*O. oeni* ont été cultivés en présence ou en l'absence d'un lysat cellulaire d'*E. coli*. Préalablement à l'obtention du lysat, la surexpression de la protéine Lo18 est déclenchée, permettant d'obtenir une très forte concentration en Lo18 dans le lysat. Les protéines Lo18 modifiées soit par remplacement de l'alanine en position 123 par une sérine soit par remplacement de la tyrosine en position 107 par une alanine (A123S et Y107A) ont été obtenues par mutagenèse dirigée.

Leur surexpression dans le lysat cellulaire d'*E. coli*, aboutit à une abolition respectivement de l'activité chaperon et lipochaperon de Lo18 (Weidmann *et al.*, 2010). La protéine délétée pour la partie C-terminale (Δ Cter) limite la formation d'oligomères.

Aucune différence de biomasse n'est observée pour les biofilms formés en absence ou présence de la protéine Lo18 et des protéines modifiées Y107A et A123S, avec une moyenne de $1,2 \cdot 10^8$ UFC/mL dénombrée. De manière intéressante, la présence de la protéine Lo18 tronquée au niveau du domaine C-terminal (Δ Cter) a quant à elle entraîné une augmentation faible mais significative de la biomasse, atteignant $5,6 \cdot 10^8$ UFC/mL (Figure 55). L'absence d'impact des protéines modifiées A123S et Y107A pourrait suggérer que l'activité chaperon ou lipochaperon de Lo18 ne serait pas déterminante dans la structuration des biofilms. Cependant, il convient de noter que la structure quaternaire de Lo18 influence considérablement ses fonctions. De ce fait, l'incapacité de la Lo18 Δ Cter à former des oligomères pourrait impacter des fonctions nécessaires, encore inconnues, lors de la formation de biofilm. En effet, nous ne pouvons pas exclure que les protéines Lo18 Y107A, A123S ou Δ Cter aient interagi avec les protéines et/ou lipides présents dans le lysat cellulaire et que le résultat de ces interactions ait ensuite limité ou non le développement des biofilms.

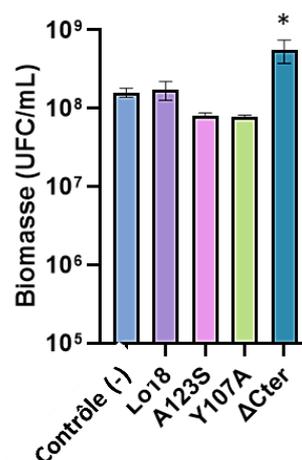


Figure 55 : Biomasse des cellules en biofilm cultivées en absence ou présence de la protéine Lo18 sauvage (violet) ou modifiée ; A123S (rose), Y107A (vert) et Δ Cter (bleu). Les résultats représentent la moyenne de trois répétitions indépendantes \pm SEM et ont été analysés par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis, p.value < 0.05.

Enfin, bien que nous ayons constaté un effet bénéfique de Lo18 sur la résistance au stress des cellules du biofilm lorsque cette protéine est présente dans le milieu de culture, aucune étude n'a jusqu'à présent localisé la protéine dans le milieu extracellulaire, à l'inverse de HSP18 de *Mycobacterium* qui a été observé dans la matrice extracellulaire (Diaz *et al.*, 2006).

Cependant, des recherches antérieures menées au sein du laboratoire ont mis en évidence la présence de Lo18 à la surface externe de la membrane cellulaire (Coucheney *et al.*, 2005). Dans cette optique, nous avons recherché la protéine Lo18 par immunomarquage dans le surnageant d'une culture d'*O. oeni*, à un stade avancé de la phase stationnaire (Figure 56). Les résultats de cet immunomarquage n'ont pas permis d'observer Lo18 dans le milieu extracellulaire. Néanmoins, nous ne pouvons exclure la possibilité qu'en réponse à un stress physique ou chimique, la protéine puisse être sécrétée par des mécanismes encore non élucidés.

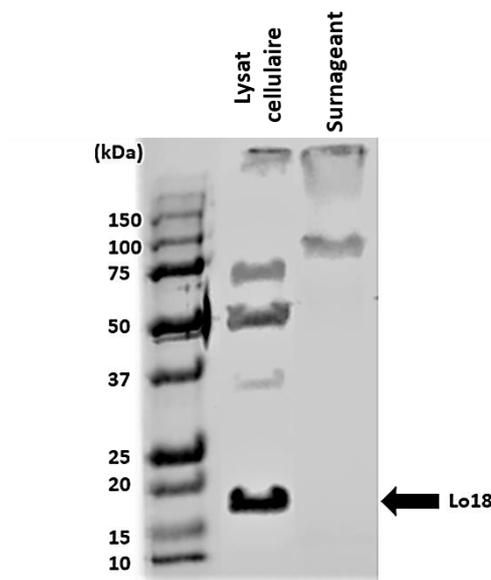


Figure 56 : Recherche de la protéine Lo18 par immunomarquage dans un lysat cellulaire d'*E. coli* après induction à l'IPTG ou dans le surnageant d'une culture (4L) d'*O. oeni* en fin de phase stationnaire.

Il semble plausible qu'en réaction au stress Lo18 puisse être exportée via des vésicules membranaires (MVs) (Figure 57). Lors du stress, de petites parties de la bicouche lipidique d'*O. oeni* pourraient se détacher de la membrane sous forme de vésicules membranaires (MVs), comme c'est le cas pour d'autres bactéries lactiques (Baumgarten *et al.*, 2012; Schooling & Beveridge, 2006). Ces MVs, une fois détachées des cellules, contiennent des quantités importantes de protéines parmi lesquelles pourraient se trouver des sHSPs. C'est notamment le cas pour les MVs de *Lactocaseibacillus casei* qui renferment HSP3 (da Silva Barreira *et al.*, 2022). Une fois dans le milieu extracellulaire, ces MVs pourraient libérer leur contenu, rendant ainsi accessible les protéines qu'elles transportent (Lay *et al.*, 2018). Ceci étant d'autant plus probable que, en réponse au stress, Lo18 est majoritairement recrutée au niveau de la membrane pour y exercer son rôle de lipochaperon moléculaire (Coucheney *et al.*, 2005).

Les méthodes utilisées pour la recherche de Lo18 dans le surnageant incluent une étape de filtration drastique qui aurait pu conduire à la perte de ces MVs, empêchant la détection de Lo18 à ce stade. Cette piste d'étude devrait donc être envisagée sérieusement lors de la recherche de Lo18 dans le milieu environnant.

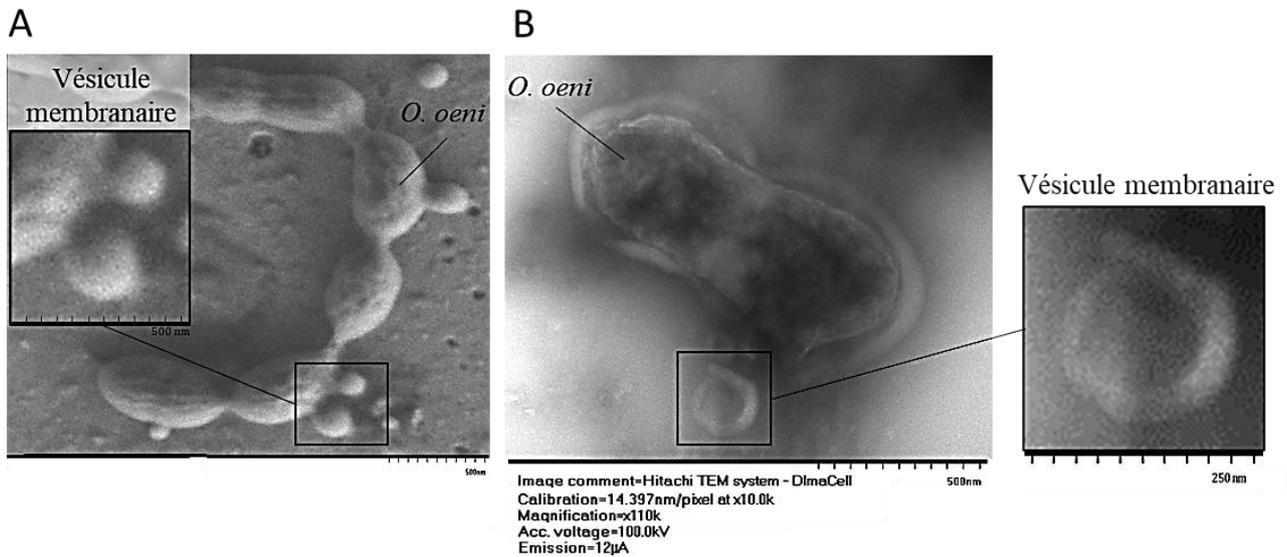


Figure 57 : Formation de vésicules membranaires par *O. oeni* (A. Rieu, données non publiées). Observations microscopiques réalisées sur la plateforme DimaCell par (A) microscopie électronique à balayage (MEB) et (B) microscopie électronique à transmission (MET) des vésicules membranaires sur et aux abords des cellules d'*O. oeni*.

V. DISCUSSION/PERSPECTIVES



Pour faire face aux stress environnementaux, la synthèse de protéines de choc thermique, telles que les sHSPs, est capitale chez la plupart des organismes (Beissinger & Buchner, 1998; Ellis, 1990; Hartl, 1996; Tyedmers *et al.*, 2010). En effet, en présence de conditions environnementales défavorables, divers constituants cellulaires peuvent être dégradés (protéines, lipides, acides nucléiques). L'ensemble des sHSPs sont décrites pour leur rôle de chaperon moléculaire (Mogk *et al.*, 2019; Obuchowski & Liberek, 2020), leur permettant de limiter l'agrégation protéique (Beltramo *et al.*, 2004; Jobin *et al.*, 1997, 1999; Mills *et al.*, 2005; Olguín *et al.*, 2010). En limitant cette agrégation protéique, la plupart des sHSPs sont décrites comme exerçant une influence dans divers mécanismes de réponse aux stress, aussi bien à l'échelle de la population qu'à l'échelle cellulaire. Par exemple, au niveau de la population, il a été rapporté que certaines sHSPs peuvent participer à la formation de biofilms ou au transfert latéral de gènes (Diaz *et al.*, 2006; Kuczyńska-Wiśnik *et al.*, 2010; Pidot *et al.*, 2010; Rajaram *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2010; Zara *et al.*, 2002). D'autres sHSPs peuvent également intervenir, au niveau cellulaire, dans la formation de spores, dans la différenciation et le développement cellulaire, dans la dégradation des protéines, ou dans l'autophagie (Bakthisaran *et al.*, 2015; De Maio *et al.*, 2019; Henriques *et al.*, 1997).

En complément de cette fonction de chaperon moléculaire, une seconde fonction distincte de lipochaperon moléculaire est décrite pour certaines sHSPs (Balogi *et al.*, 2008; Coucheney *et al.*, 2005; Nitta *et al.*, 2005; Vigh *et al.*, 2007). Cependant, si l'activité chaperon est largement décrite dans la littérature, et que les liens entre la structure des protéines et cette fonction sont clairement établis très peu d'informations sont disponibles sur l'activité lipochaperon des sHSPs. (Dabbaghizadeh & Tanguay, 2020; Dudich *et al.*, 1995; Giese & Vierling, 2002; Haslbeck *et al.*, 1999; Khaleghinejad *et al.*, 2023; Lentze *et al.*, 2003; Lentze & Narberhaus, 2004; Mogk *et al.*, 2003; Santhanagopalan *et al.*, 2018; Shatov *et al.*, 2021; Sun & MacRae, 2005; V. Sudnitsyna *et al.*, 2012, 2012; van Montfort *et al.*, 2001). Lorsque la membrane plasmique est endommagée par le stress, ces sHSPs en se liant aux lipides membranaires vont permettre de maintenir la fluidité membranaire dans un état optimal (Bonomo *et al.*, 2018; Chu-Ky *et al.*, 2005). Actuellement, les impacts connexes des sHSPs dans la réponse aux stress particulièrement au niveau de la population cellulaire et les mécanismes impliqués dans l'activité lipochaperon des sHSPs, restent peu connus. De ce fait, l'étude principale de cette thèse a été la caractérisation des mécanismes fondamentaux impliqués dans l'activité lipochaperon des sHSPs via l'étude de la sHSP Lo18. Dans un second temps, la recherche de l'impact de Lo18 lors de la formation de biofilm a également été initiée.

A. A l'échelle de l'individu : analyse de l'activité lipochaperon des sHSPs par l'étude structure fonction de la protéine Lo18

L'objectif majeur de cette thèse a donc consisté à caractériser les mécanismes d'interaction protéines-lipides mis en jeu dans l'activité lipochaperon des sHSPs. Nos travaux sur Lo18 ont montré que son activité lipochaperon était dépendante (i) de la composition lipidique et de la fluidité de la membrane et (ii) de certains acides aminés clés pour l'établissement de sa structure secondaire. Notons que ces acides aminés (l'acide glutamique en position 60, la thréonine en position 79, la glycine en position 82 et l'arginine en position 99), sont présent sur des motifs fortement conservés chez les sHSPs décrites pour avoir une activité lipochaperon, respectivement en gras sur les motifs conservés, “ELPG” en aval du feuillet β 4, “LTISGKRE” sur le feuillet β 5, et “RSERSYGSFR” sur le feuillet β 6/ β 7 (Bellanger & Weidmann, 2023). Trois hypothèses concomitantes permettent d'expliquer l'apport de ces domaines lipidiques et protéiques dans l'activité lipochaperon des sHSPs. Ces domaines pourraient (i) servir de sites d'interaction entre Lo18 et la membrane, (ii) permettre l'insertion de Lo18 dans la membrane et/ou (iii) influencer la structure de Lo18.

Domaines lipidiques et protéiques impliqués dans l'interaction sHSP/membrane :

Au niveau de la membrane, Lo18 interagit préférentiellement avec des phospholipides insaturés et/ou ayant une tête polaire de phosphatidylglycérol. De manière intéressante ces types de lipides sont ceux majoritairement retrouvés dans les membranes d'*O. oeni* encore non adaptées au stress, lorsque l'activité lipochaperon de Lo18 est la plus importante. Des résultats similaires ont été rapportés pour HSP16 de *S. pombe* (Glatz *et al.*, 2016) et HSPB1 de l'homme (Csoboz *et al.*, 2022; De Maio *et al.*, 2019). Dans les trois cas, il semble que l'interaction soit médiée à la fois par l'état de fluidité de la membrane et par les charges présentes au niveau de la tête lipidique et de certains domaines de la sHSP (Csoboz *et al.*, 2022; De Maio *et al.*, 2019).

Au niveau de la protéine Lo18, les analyses *in silico* ont permis d'identifier plusieurs domaines ou résidus potentiellement impliqués dans l'interaction entre Lo18 et la membrane.

En effet lors d'expériences de modélisation entre la protéine et une membrane de POPC, une interaction avec le résidu R99 ainsi qu'une insertion, d'environ 17 acides aminés, du domaine N-terminal ont été visualisées.

Notons que le modèle de Lo18 utilisé lors de cette modélisation est tronqué de 20 acides aminés au niveau du domaine N-terminal. Ce type de protéine tronquée est une forme physiologiquement présente chez différentes sHSPs, notamment observée chez Ta16.9 du blé, HSPB1 chez l'homme ou Lo18 lors d'études *in vivo* et *in vitro*. (Coucheney *et al.*, 2005; Guo & Cooper, 2000; Heirbaut *et al.*, 2014; Maitre *et al.*, 2012; Santhanagopalan *et al.*, 2018).

En plus du résidu R99, les résidus E60, T79, G82 pourraient également être importants dans les mécanismes d'interaction. Ces résidus ont un impact dans la structure de la protéine Lo18 et permettent d'augmenter l'accessibilité à des sites d'interaction présumés avec des protéines et/ou des macromolécules. Une fois ces résidus modifiés (respectivement par une lysine (K) une valine (V), une glycine (G) ou un acide aspartique (D)), une partie de ces sites d'interactions avec des protéines et/ou macromolécules, principalement situés au niveau du domaine N-terminal, ne sont plus présents. Ils sont certainement masqués par des modifications de structure de la protéine. De manière intéressante, sur ces protéines modifiées plus la perte de ces sites d'interactions était importante, plus leur activité lipochaperon était affectée. Ces prédictions informatiques suggèrent donc que le domaine N-terminal de Lo18 pourrait être un site clé dans l'interaction entre Lo18 et la membrane, et devrait faire l'objet d'une étude détaillée. Il convient cependant de noter que les résultats obtenus correspondent à une prédiction faite avec une membrane modèle composée uniquement de POPC, minoritaire dans la composition des membranes d'*O. oeni*.

Afin d'implémenter le modèle membranaire utilisé, l'affinité de Lo18 pour des substrats lipidiques mixtes, plus représentatifs des membranes d'*O. oeni* pourrait être évaluée à l'aide d'une balance de Langmuir. Il serait aussi pertinent de confirmer les prédictions informatiques obtenues pour Lo18 *via* des expériences *in vitro*. Pour cela une étude par RT-HPLC (HPLC en phase inversée) pourrait être menée. Après traitement par des enzymes protéolytiques, les fragments de Lo18 obtenus pourraient être mis en solution avec des liposomes. Les fragments peptidiques liés aux liposomes induiraient une diminution de la hauteur des pics caractéristiques de ces fragments seuls lors de l'analyse HPLC (Lyu *et al.*, 2023).

Insertion de Lo18 dans la membrane :

Les mesures de SRCD et d'anisotropie de fluorescence ont permis d'observer des défauts d'insertion de Lo18 en présence des liposomes issus d'une culture d'*O. oeni* adaptée à l'alcool ou d'une culture de *L. plantarum*, montrant l'importance (i) du niveau de fluidité membranaire et (ii) de la composition lipidique, ces deux paramètres étant interdépendants. Par ailleurs, l'insertion des protéines modifiées E60K et R99D dans les liposomes issus d'une culture d'*O. oeni* en phase exponentielle est diminuée. Des modifications d'insertion ont également été rapportées dans la littérature, à la suite des mutations R116C/H et Y118D, présentes sur le feuillet β 7 de la protéine HSPB4 chez l'homme (Tjondro *et al.*, 2016). A l'inverse, des mutations au niveau du domaine N-terminal (Q16R et L9P) de la protéine HSP17 chez *Synechocystis* ont entraîné une meilleure insertion de HSP17 dans la membrane (Balogi *et al.*, 2008; Horváth *et al.*, 2008). L'ensemble de ces résultats suggère que l'insertion des sHSPs dans la membrane dépend à la fois du degré de fluidité membranaire et de certains résidus/domaines protéiques des sHSPs (Balogi *et al.*, 2008; De Maio *et al.*, 2019; Horváth *et al.*, 2008; Mitra *et al.*, 2023). En effet, il est possible que les pertes d'insertion décrites soient imputables à certains acides aminés (E60 et R99 pour Lo18, R116 et Y118 pour HSPB4). Le résidu R99 est directement impliqué à la fois dans l'interaction Lo18/membrane et dans la structure protéique de Lo18, alors que les résidus E60, R116 et Y118 jouent un rôle essentiel uniquement dans la structure de Lo18 ou de HSPB4 respectivement (Bera *et al.*, 2002; Tedesco *et al.*, 2022). Il est également intéressant de noter que les modifications structurales (statut oligomérique et structure secondaire) induites lors d'un stress thermique, au niveau du domaine α -cristallin (ACD) des sHSPs humaines, facilitent leur insertion dans la membrane (Mitra *et al.*, 2023; Tjondro *et al.*, 2016).

La composition lipidique des membranes pourrait également être déterminante dans l'insertion des sHSPs, comme c'est le cas pour HSP17 de *Synechocystis* qui semblerait s'insérer plus efficacement dans des membranes de DMPG ou DMPS en phase cristalline liquide que des membranes de DPPE en phase gel (Balogi *et al.*, 2008; Horváth *et al.*, 2008). Notons également, qu'une fluidité membranaire excessive ou insuffisante, comme c'est respectivement le cas pour les liposomes issus de cultures de *L. plantarum* et d'*O. oeni* adaptées à l'alcool, semble dans les deux cas limiter l'insertion de Lo18.

Enfin, de manière étonnante, l'incapacité des protéines Lo18 sauvages ou modifiées à s'insérer dans les membranes ne s'est pas toujours traduit par une perte de son activité lipochaperon.

La protéine modifiée R99D et Lo18 ont conservé une activité lipochaperon sur des liposomes issus d'une culture en phase exponentielle, respectivement d'*O. oeni* et de *L. plantarum*. Par conséquent, bien que l'insertion de Lo18 dans la membrane semble jouer un rôle important dans l'activité lipochaperon des sHSPs, d'autres mécanismes doivent également être également mis en jeu. Néanmoins, l'insertion des sHSPs dans la membrane pourrait améliorer les forces d'interaction entre Lo18 et la membrane. Il serait alors intéressant de comparer les constantes d'affinité (association et dissociation) en présence de la protéine modifiée R99D ou des liposomes dont les lipides sont issus d'une culture de *L. plantarum*, avec les constantes d'affinité lors de l'interaction Lo18 et des liposomes dont les lipides sont issus d'une culture de *O. oeni* en phase exponentielle, par la technique de SwitchSENSE®.

Implication des modifications de la structure secondaire et tertiaire de Lo18 dans l'activité lipochaperon :

Des études préalablement réalisées au laboratoire ont démontré l'importance de la structure quaternaire de Lo18 dans ses rôles de chaperon et lipochaperon moléculaire (Maitre *et al.*, 2012), démontrant que Lo18 exerce son rôle de lipochaperon uniquement sous forme de dimère. Certains domaines protéiques de HSPB1 humaine (Zeng *et al.*, 2015), impliqués dans l'interaction avec la membrane, sont exposés uniquement lorsque HSPB1 est sous forme de dimère. Le rôle de la structure quaternaire des sHSPs dans l'activité lipochaperon n'est plus à démontrer. De ce fait, lors de cette thèse, nous nous sommes donc particulièrement intéressées à l'impact des structures secondaires et tertiaires de la protéine Lo18 dans la mise en place de l'activité lipochaperon.

Une diminution de la proportion de feuillets β , principalement, au profit des hélices α a été quantifiée lors de l'interaction de Lo18 avec la membrane, suggérant une certaine flexibilité de Lo18. Cette flexibilité protéique a aussi été décrite comme étant essentielle pour favoriser l'interaction entre HSP16.3 et la membrane de *M. tuberculosis* (X.-S. Zhang *et al.*, 2007). En analysant plus en détails ces modifications de structure, il est apparu qu'elles sont à la fois liées à la nature lipidique des membranes avec lesquelles la sHSP interagit et à la présence de certains résidus sur la protéine. En effet, moins la membrane est riche en phospholipides insaturés et/ou ayant une tête polaire de phosphatidylglycérol, plus la modification de structure est importante.

La structure protéique a aussi été impactée par les quatre mutations testées, suggérant un rôle potentiellement majeur de E60 et R99, modéré de T79 et mineur de G82 dans la structure de Lo18.

De manière intéressante, il apparaît que l'activité lipochaperon de Lo18 est fortement influencée par les modifications de structure survenant avant ou pendant l'interaction avec la membrane. Il semblerait que plus ces modifications tendent à conférer une organisation protéique relâchée (diminution de la proportion de feuillets β), plus l'activité lipochaperon de Lo18 est importante. Il convient de noter que la flexibilité observée en présence de la protéine R99D durant l'interaction avec les lipides peut principalement être attribuée à des modifications au niveau de la longue boucle reliant les deux plans de l'ACD. Ces résultats suggèrent alors qu'une flexibilité de la structure de Lo18 au niveau de l'ACD est cruciale dans son activité lipochaperon. Ainsi au cours d'un cycle d'association/dissociation des oligomères, les dimères pourraient être attirés vers des domaines membranaires fluides riches en phosphatidylglycérol. Lors de cette attraction ou durant l'interaction avec la membrane en cours de fluidification, la structure de la protéine se modifie, entraînant une diminution de la proportion de feuillets β nécessaires à (i) l'insertion de la protéine dans la membrane et/ou (ii) son rôle de lipochaperon (Figure 58). A l'inverse, l'augmentation de la proportion de feuillets β durant l'interaction inhibe l'activité lipochaperon. Néanmoins certains aspects chronologiques de ces modifications de structures restent partiellement compris et devrait faire l'objet de futurs travaux à la fois *in silico* par le biais de modélisation, et *in vitro* via des analyses de microscopie à force atomique, de diffusion ou cristallographie à rayon X ou de spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) (Miura, 2018).

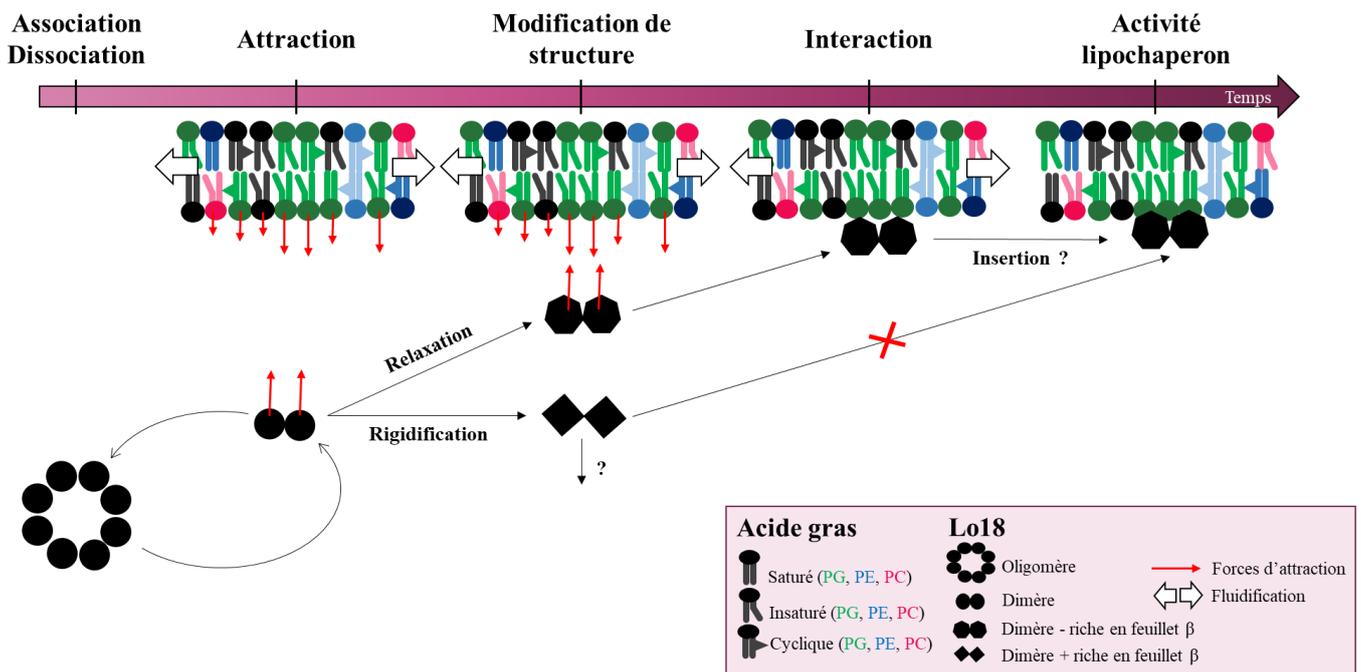


Figure 58 : Modèle chronologique de l'interaction entre Lo18 et la membrane d'*O. oeni*. En réponse à la fluidification des membranes et à la suite d'un cycle d'association/dissociation des oligomères, les dimères proches de la membrane pourraient être attirés vers des domaines membranaires insaturés et/ou riches en phosphatidylglycérol (flèche rouge). Durant cette attraction des déformations structurelles de la protéine pourraient être induites. Si ces modifications de structures diminuent la proportion de feuillets β , l'interaction Lo18/membrane pourrait être favorisée. A la suite de cette interaction, une insertion putative de Lo18 dans la membrane pourrait également renforcer son activité lipochaperon lui permettant alors de restreindre efficacement la fluidité membranaire. A l'inverse, il semblerait que des modifications de structure augmentant la proportion de feuillets β , ne permettent plus à Lo18 de réguler la fluidité membranaire.

B. A l'échelle de la population : impact des fonctions des sHSPs lors de la formation de biofilm

Grace à leur rôle de chaperon moléculaire les sHSPs peuvent être impliquées dans diverses voies cellulaires comme le transfert horizontal de gène, l'agrégation cellulaire ou la formation de biofilm, permettant une meilleure résistance au stress de l'ensemble de la population cellulaire (Kuczyńska-Wiśnik *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2008; Pidot *et al.*, 2010).

Par exemple, les travaux de Tsai et collaborateur ont mis en évidence, que la protéine HspL d'*Agrobacterium tumefaciens* interviendrait dans le transfert horizontal de gènes, en prévenant le facteur de virulence VirB8 de l'agrégation thermique (Tsai *et al.*, 2010). La surexpression de HSP27 de l'homme interviendrait dans l'adhésion cellulaire. En effet, HSP27 induit, par des mécanismes inconnus, la phosphorylation d'une protéine kinase impliquée dans l'adhésion cellulaire (FAK) et d'une protéinase participant à la dégradation de la matrice extracellulaire (MMP-2), ce qui permet alors de renforcer l'adhésion cellulaire de cellules fibroblastiques sur des supports de polystyrène (Lee *et al.*, 2010). Les sHSPs IpbA/B d'*E. coli* favoriseraient, quant à elle, la formation de biofilm. Suite à un stress oxydatif, les protéines IpbA/B protègent les enzymes impliquées dans la réponse à ce stress de l'agrégation protéique. Ceci a pour conséquence de limiter l'excrétion d'indole (oxydant fort impliqué dans le quorum sensing chez *E. coli*) dans le milieu extracellulaire (Kuczyńska-Wiśnik *et al.*, 2010), favorisant alors la croissance des cellules d'*E. coli* en biofilms (Lee *et al.*, 2008).

L'apport de l'activité lipochaperon dans la protection des populations bactériennes pourrait également s'avérer important, particulièrement lors de la formation de biofilm. En effet, l'activité lipochaperon des protéines IbpA/B d'*E. coli* ou HSP18 de *Mycobacterium ulcerans* affecte la formation de biofilm (Kuczyńska-Wiśnik *et al.*, 2010; Pidot *et al.*, 2010). En limitant la fluidification membranaire, ces sHSPs réduisent la perméabilité membranaire des cellules, ce qui influence alors la synthèse ou l'exportation de diverses molécules et la modification de structures impliquées dans les différentes étapes de la formation du biofilm, telles que les flagelles ou les EPS (Van Houdt & Michiels, 2005).

Cependant, il semblerait que parfois ni les activités chaperon ou lipochaperon des sHSPs ne soit pleinement mises en jeu dans les effets pro-biofilm observés. Par exemple, l'étude des sHsp de *L. plantarum* dans la formation de biofilm sur support polystyrène a montré que seule HSP1 favorisait la formation de biofilm (Rajasekharan & Shemesh, 2022) alors que cette protéine ne présente pas l'activité chaperon ou lipochaperon la plus importante parmi les 3 sHSP de *L. plantarum* (Arena *et al.*, 2019; Rocchetti *et al.*, 2023). Ainsi, l'effet pro-biofilm observé pour HSP1 pourrait être aussi dû à des mécanismes ou des fonctions encore inconnus pour cette sHSP.

En ce qui concerne la protéine Lo18, nos résultats n'ont pas permis de distinguer l'influence de l'activité chaperon ou de l'activité lipochaperon dans la formation de biofilm.

En effet, lors de la formation de biofilm, l'étude de l'influence de Lo18 ainsi que de deux protéines modifiées de Lo18, A123S ne présentant plus d'activité chaperon, et Y107A ne présentant plus d'activité lipochaperon a été entreprise. Aucune des protéines modifiées utilisées n'a permis de moduler la quantité de biomasse des biofilms formés par rapport à ceux cultivés en présence de la protéine sauvage. À l'inverse, un effet positif sur le biofilm a été observé lorsqu'une troisième protéine modifiée de Lo18 (Δ Cter) a été testée. Cette protéine tronquée au niveau de son domaine C-terminal, est altérée pour la formation de larges oligomères. Soulignons, cependant, que ni l'activité chaperon, ni l'activité lipochaperon de cette protéine modifiée (Δ Cter) n'ont été étudiées. De plus, pour les trois protéines modifiées testées (A123S, Y107A et Δ Cter) nous ne pouvons pas exclure qu'une interaction avec les protéines et/ou lipides présents dans l'environnement extracellulaire ou des modifications structurales aient eu lieu, ce qui aurait potentiellement pu influencer le développement des biofilms.

Afin de distinguer l'apport de l'activité chaperon, lipochaperon ou d'une éventuelle troisième activité dans la formation de biofilm, il est nécessaire de renforcer l'étude menée sur les protéines modifiées de Lo18 (A123S, Y107A et Δ Cter). En effet, l'ensemble des tests effectués ont été réalisés en utilisant un lysat cellulaire enrichi en protéines Lo18 (sauvages ou modifiées), pour pallier à un rendement de purification trop faible de ces protéines. Néanmoins, bien qu'informatif, nous ne pouvons pas négliger les biais importants induit par l'utilisation d'un lysat cellulaire. Pour s'affranchir de ce problème, il semble nécessaire d'améliorer le rendement de purification de ces protéines afin (i) d'évaluer l'impact de la perte du domaine C-terminal (mutant Δ Cter) sur les activités chaperon et lipochaperon de la protéine Lo18, et (ii) de répéter les expériences de formation de biofilm en présence de ces protéines purifiées. De plus, disposant d'autres protéines modifiées au laboratoire, (étudiées notamment dans le 1^{er} chapitre de cette thèse) dont la perte d'activités chaperon et lipochaperon a été caractérisé, il semble pertinent de les ajouter à notre étude. L'ensemble de ces résultats participerait à démontrer l'éventuelle contribution des activités de Lo18 dans la formation de biofilm ; les mécanismes mis en jeu restant alors encore à identifier.

Enfin, que ce soit grâce à leur activité chaperon, lipochaperon ou une troisième fonction encore inconnue, la présence des sHSPs dans l'environnement extracellulaire a favorisé une meilleure survie des cellules au sein du biofilm, renforçant ainsi la résistance au stress de l'ensemble de la population cellulaire (Kuczyńska-Wiśnik *et al.*, 2010; Pidot *et al.*, 2010; Rajasekharan &

Shemesh, 2022). Cependant si certaines sHSPs comme HSP18 de *M. ulcerans* ont été observées dans milieu extracellulaire (Diaz *et al.*, 2006) ce n'a pas été le cas de la protéine Lo18. En effet, la recherche de Lo18 dans le milieu extracellulaire d'une culture de cellules planctoniques, en fin de phase stationnaire n'a pas permis de détecter cette protéine. Des travaux réalisés précédemment au laboratoire avaient démontré que, durant cette phase, Lo18 était largement produite dans les cellules d'*O. oeni* (Guzzo *et al.*, 1997). Cependant, il n'est pas exclu que Lo18 puisse être excrétée en réponse à des stress aigus (augmentation de la température, du taux d'alcool ou de l'acidité) ou pendant la formation du biofilm, via de mécanismes encore inconnus. L'une des hypothèses discutées dans le paragraphe précédent (IV.C.3) serait que Lo18, de la même manière que HSP3 de *L. casei* (da Silva Barreira *et al.*, 2022) puisse être excrétée des cellules *via* des vésicules membranaires (MVs.). En effet, ces structures membranaires sont particulièrement produites en cas de stress et lors de la formation de biofilm. Le protocole utilisé dans notre étude ne permettait pas de conserver les MVs et il semble tout à fait plausible que Lo18 puisse avoir été emportée avec ces MVs lors des étapes de préparation et concentration du surnageant de culture (Baumgarten *et al.*, 2012; Schooling & Beveridge, 2006). Des études portant sur les MVs produites par *O. oeni* ont été initiées au laboratoire. Toutefois, les protéines transportées *via* ces MVs restent actuellement inconnues. L'étude du protéome contenu dans ces MVs devrait permettre de vérifier cette hypothèse. Enfin, ce n'est pas parce que Lo18 n'a pas été observée dans le surnageant de culture qu'elle n'est pas présente dans la matrice du biofilm. Une recherche approfondie de Lo18 dans cette matrice pourrait également s'avérer pertinente.

C. Conclusion

Ce travail de thèse a permis d'enrichir les connaissances sur les mécanismes fondamentaux impliqués dans la réponse au stress *via* l'utilisation de sHSPs, tant au niveau de la cellule que de la population bactérienne. Dans ce contexte, nous avons développé des approches aussi bien *in silico*, *in vitro* que *in vivo*, incluant des mesures d'anisotropie, de SRCD, ainsi que des techniques d'immunomarquage, de modélisation ou de microscopie. L'ensemble de ces techniques nous a permis d'enrichir les connaissances sur l'activité lipochaperon des sHSPs et sur leur apport dans la formation de biofilm.

Concernant l'activité lipochaperon, nous avons déterminé (i) les domaines membranaires (en particulier le type de phospholipides) et des acides aminés impliqués dans l'interaction entre les sHSPs et la membrane et (ii) la contribution des modifications structurelles des sHSPs dans cette activité. Nous avons également, montré l'apport des sHSPs dans la formation et la résistance au stress de cellules en biofilm. L'ensemble de ces points a permis de mieux comprendre les mécanismes de réponse au stress des micro-organismes via l'intervention des sHSPs, aussi bien à l'échelle de la cellule que de la communauté.

Les sHSPs étant présentes dans la quasi-totalité des organismes, la compréhension des mécanismes gouvernant leurs interactions avec les membranes cellulaires est importante non seulement d'un point de vue fondamental, mais aussi pour les applications qui pourraient découler de leurs fonctions, en particulier dans le secteur de la santé ou de l'agroalimentaire.

VI. REFERENCES



A

- Ahn, Y.-J., & Zimmerman, J. L. (2006). Introduction of the carrot HSP17.7 into potato (*Solanum tuberosum* L.) enhances cellular membrane stability and tuberization in vitro. *Plant, Cell and Environment*, 29(1), 95–104. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01403.x>
- Abraham, M. J., van der Spoel, D., Lindahl, E., & Hess, B. (2018). GROMACS user manual version 2018. Royal Institute of Technology and Uppsala University.
- Alberts, B. M. (1989). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing. <https://bibliotheque.utc.fr/Default/doc/SYRACUSE/200130/molecular-biology-of-the-cell>
- Alderson, T. R., Roche, J., Gastall, H. Y., Dias, D. M., Pritišanac, I., Ying, J., Bax, A., Benesch, J. L. P., & Baldwin, A. J. (2019). Local unfolding of the HSP27 monomer regulates chaperone activity. *Nature Communications*, 10(1), 1068. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08557-8>
- Amerine, M. A., & Berg, H. W. (1980). *The technology of wine making* (4th ed). Avi Pub. Co.
- Angelova, A., Fajolles, C., Hocquelet, C., Djedäini-Pilard, F., Lesieur, S., Bonnet, V., Perly, B., Lebas, G., & Mauclair, L. (2008). Physico-chemical investigation of asymmetrical peptidolipidyl-cyclodextrins. *Journal of Colloid and Interface Science*, 322(1), 304-314. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.03.023>
- Ansell, G. B., & Spanner, S. (1982). Chapter 1 Phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. In J. N. Hawthorne & G. B. Ansell (Éds.), *New Comprehensive Biochemistry* (Vol. 4, p. 1-49). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(08\)60005-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60005-8)
- Augusteyn, R. C. (2004). α -crystallin: A review of its structure and function. *Clinical and Experimental Optometry*, 87(6), 356–366. <https://doi.org/10.1111/j.1444-0938.2004.tb03095.x>

Arena, M. P., Capozzi, V., Longo, A., Russo, P., Weidmann, S., Rieu, A., Guzzo, J., Spano, G., & Fiocco, D. (2019). The phenotypic analysis of *Lactobacillus plantarum* shsp mutants reveals a potential role for hsp1 in cryotolerance. *Frontiers in Microbiology*, 10, 838. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00838>

Azad, S. (2017). Amino acids: its types and uses. *international journal of advanced Biochemistry Research*, 1(1), 13-16.

B

Bajaj, M., & Blundell, T. (1984). Evolution and the tertiary structure of proteins. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 13(1), 453-492. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.13.060184.002321>

Bakthisaran, R., Tangirala, R., & Rao, Ch. M. (2015). Small heat shock proteins : Role in cellular functions and pathology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1854(4), 291-319. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.12.019>

Baldwin, R. L., & Rose, G. D. (2016). How the hydrophobic factor drives protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(44), 12462-12466. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610541113>

Baldwin, A. J., Lioe, H., Hilton, G. R., Baker, L. A., Rubinstein, J. L., Kay, L. E., & Benesch, J. L. P. (2011). The polydispersity of α B-Crystallin is rationalized by an interconverting polyhedral architecture. *Structure*, 19(12), 1855–1863. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.09.015>

Balogi, Z., Török, Z., Balogh, G., Jósvay, K., Shigapova, N., Vierling, E., Víggh, L., & Horváth, I. (2005). “Heat shock lipid” in cyanobacteria during heat/light-acclimation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 436(2), 346–354. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.02.018>

- Balogi, Z., Cheregi, O., Giese, K. C., Juhász, K., Vierling, E., Vass, I., Víg, L., & Horváth, I. (2008). A Mutant Small Heat Shock Protein with increased thylakoid association provides an elevated resistance against uv-b damage in *Synechocystis 6803*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(34), 22983-22991. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710400200>
- Baneyx, F., & Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1399–1408. <https://doi.org/10.1038/nbt1029>
- Bartowsky, E. J. (2005). *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation – moving into the molecular arena. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 174-187. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00286.x>
- Bartowsky, E. J., & Borneman, A. R. (2011). Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(3), 441-447. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3546-2>
- Basha, E., O'Neill, H., & Vierling, E. (2012). Small heat shock proteins and α -crystallins: Dynamic proteins with flexible functions. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(3), 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.005>
- Bastard, A., Coelho, C., Briandet, R., Canette, A., Gougeon, R., Alexandre, H., Guzzo, J., & Weidmann, S. (2016). Effect of biofilm formation by *Oenococcus oeni* on malolactic fermentation and the release of aromatic compounds in wine. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00613>
- Baumgarten, T., Sperling, S., Seifert, J., von Bergen, M., Steiniger, F., Wick, L. Y., & Heipieper, H. J. (2012). Membrane vesicle formation as a multiple-stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(17), 6217-6224. <https://doi.org/10.1128/AEM.01525-12>
- Bech-Terkilsen, S., Westman, J. O., Swiegers, J. H., & Siegumfeldt, H. (2020). *Oenococcus oeni*, a species born and moulded in wine : A critical review of the stress impacts of wine and the physiological responses. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 26(3), 188-206. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12436>

- Beissinger, M., & Buchner, J. (1998). How chaperones fold proteins. *Biological Chemistry*, 379(3), 245-259.
- Bellanger, T., & Weidmann, S. (2023). Is the lipochaperone activity of sHSP a key to the stress response encoded in its primary sequence? *Cell Stress and Chaperones*, 28(1), 21-33. <https://doi.org/10.1007/s12192-022-01308-7>
- Beltramo, C., Grandvalet, C., Pierre, F., & Guzzo, J. (2004). Evidence for multiple levels of regulation of *Oenococcus oeni* clpP-clpL Locus Expression in Response to Stress. *Journal of Bacteriology*, 186(7), 2200-2205. <https://doi.org/10.1128/JB.186.7.2200-2205.2003>
- Beney, L., & Gervais, P. (2001). Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1-2), 34-42. <https://doi.org/10.1007/s002530100754>
- Bera, S., Thampi, P., Cho, W. J., & Abraham, E. C. (2002). A positive charge preservation at position 116 of alpha A-crystallin is critical for its structural and functional integrity. *Biochemistry*, 41(41), 12421-12426. <https://doi.org/10.1021/bi0204140>
- Berger, F., Morellet, N., Menu, F., & Potier, P. (1996). Cold shock and cold acclimation proteins in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globiformis* SI55. *Journal of Bacteriology*, 178(11), 2999–3007. <https://doi.org/10.1128/jb.178.11.2999-3007.1996>
- Bhagavan, N. V. (2002). CHAPTER 4—Three-Dimensional Structure of Proteins. In N. V. Bhagavan (Éd.), *Medical Biochemistry* (Fourth Edition) (p. 51-65). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012095440-7/50006-8>
- Bhandari, S., Biswas, S., Chaudhary, A., Dutta, S., & Suguna, K. (2019). Dodecameric structure of a small heat shock protein from *Mycobacterium marinum* M. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 87(5), 365–379. <https://doi.org/10.1002/prot.25657>
- Bhattacharya, S., & Ray, S. (2021). In silico screening and exploration into phenotypic alterations of deleterious oncogenic single nucleotide polymorphisms in HSPB1 gene. *Genomics*, 113(4), 2812-2825. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.06.017>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification—PubMed. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.

- Blondelle, J., Pais De Barros, J.-P., Pilot-Storck, F., & Tiret, L. (2017). Targeted Lipidomic Analysis of Myoblasts by GC-MS and LC-MS/MS. In J. G. Ryall (Éd.), *Skeletal Muscle Development* (Vol. 1668, p. 39-60). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7283-8_4
- Boelens, W. C. (2014). Cell biological roles of α B-crystallin. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 115(1), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.02.005>
- Boelens W. C. (2020). Structural aspects of the human small heat shock proteins related to their functional activities. *Cell stress & chaperones*, 25(4), 581–591. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01093-1>
- Bonomo, M. G., Di Tomaso, K., Calabrone, L., & Salzano, G. (2018). Ethanol stress in *Oenococcus oeni*: Transcriptional response and complex physiological mechanisms. *Journal of Applied Microbiology*, 125(1), 2-15. <https://doi.org/10.1111/jam.13711>
- Booth, I. R. (2007). The regulation of intracellular pH in bacteria. In D. J. Chadwick & G. Cardew (Éds.), *Novartis Foundation Symposia* (p. 19-37). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470515631.ch3>
- Booth, I. R. (1985). Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological Reviews*, 49(4), 359–378. <https://doi.org/10.1128/mr.49.4.359-378.1985>
- Bouix, M., & Ghorbal, S. (2017). Assessment of bacterial membrane fluidity by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*, 143, 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.10.005>
- Boyle, D., & Takemoto, L. (1994). Immunolocalization of the C-terminal and N-terminal regions of alpha-A and alpha-B crystallins. *Current Eye Research*, 13(7), 497–504. <https://doi.org/10.3109/02713689408999881>
- Bozaykut, P., Ozer, N. K., & Karademir, B. (2014). Regulation of protein turnover by heat shock proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 77, 195–209. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.012>
- Bracher, A., & Hartl, F. U. (2013). Chaperonins. In W. J. Lennarz & M. D. Lane (Éds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Second Edition) (p. 456-460). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00080-3>

Bretscher, M. S. (1985). The Molecules of the Cell Membrane. *Scientific American*, 253(4), 100-109.

Bukau, B., & Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92(3), 351–366. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80928-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80928-9)

Bürck, J., Wadhvani, P., Fanghänel, S., & Ulrich, A. S. (2016). Oriented circular dichroism : A method to characterize membrane-active peptides in oriented lipid bilayers. *Accounts of Chemical Research*, 49(2), 184-192. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00346>

C

Cajka, T., Hricko, J., Rudl Kulhava, L., Paucova, M., Novakova, M., & Kuda, O. (2023). Optimization of mobile phase modifiers for fast LC-MS-based untargeted metabolomics and lipidomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 1987. <https://doi.org/10.3390/ijms24031987>

Camberg, J. L., Doyle, S. M., Johnston, D. M., & Wickner, S. (2013). Molecular Chaperones. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (p. 456-460). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00221-7>

Capozzi, V., Tufariello, M., De Simone, N., Fragasso, M., & Grieco, F. (2021). biodiversity of oenological Lactic Acid Bacteria : Species- and Strain-Dependent Plus/Minus Effects on Wine Quality and Safety. *Fermentation*, 7(1), 24. <https://doi.org/10.3390/fermentation7010024>

Carra, S., Alberti, S., Arrigo, P. A., Benesch, J. L., Benjamin, I. J., Boelens, W., Bartelt-Kirbach, B., Brundel, B. J. J. M., Buchner, J., Bukau, B., Carver, J. A., Ecroyd, H., Emanuelsson, C., Finet, S., Golenhofen, N., Goloubinoff, P., Gusev, N., Haslbeck, M., Hightower, L. E., ... Tanguay, R. M. (2017). The growing world of small heat shock proteins : From structure to functions. *Cell Stress and Chaperones*, 22(4), 601-611. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0787-8>

Carra, S., Alberti, S., Benesch, J. L. P., Boelens, W., Buchner, J., Carver, J. A., Cecconi, C., Ecroyd, H., Gusev, N., Hightower, L. E., Klevit, R. E., Lee, H. O., Liberek, K.,

- Lockwood, B., Poletti, A., Timmerman, V., Toth, M. E., Vierling, E., Wu, T., & Tanguay, R. M. (2019). Small heat shock proteins: Multifaceted proteins with important implications for life. *Cell Stress and Chaperones*, 24(2), 295-308. <https://doi.org/10.1007/s12192-019-00979-z>
- Carriot, N., Paix, B., Greff, S., Viguier, B., Briand, J.-F., & Culioli, G. (2021). Integration of LC/MS-based molecular networking and classical phytochemical approach allows in-depth annotation of the metabolome of non-model organisms—The case study of the brown seaweed *Taonia atomaria*. *Talanta*, 225, 121925. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121925>
- Cashikar, A. G., Duennwald, M., & Lindquist, S. L. (2005). A chaperone pathway in protein disaggregation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(25), 23869–23875. <https://doi.org/10.1074/jbc.m502854200>
- Caspers, G.-J., Leunissen, J. A. M., & de Jong, W. W. (1995). The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved “ α -crystallin domain.” *Journal of Molecular Evolution*, 40(3), 238–248. <https://doi.org/10.1007/bf00163229>
- Cavin, J. F., Prevost, H., Lin, J., Schmitt, P., & Divies, C. (1989). Medium for screening *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(3), 751-753.
- Cerpa, R., Cohen, F. E., & Kuntz, I. D. (1996). Conformational switching in designed peptides: The helix/sheet transition. *Folding and Design*, 1(2), 91-101. [https://doi.org/10.1016/S1359-0278\(96\)00018-1](https://doi.org/10.1016/S1359-0278(96)00018-1)
- Chabanon, M., Stachowiak, J., & Rangamani, P. (2017). Systems biology of cellular membranes: A convergence with biophysics. *Wiley Interdisciplinary Reviews Systems Biology and Medicine*, 9. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1386>
- Chang, H.-C., Tang, Y.-C., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2007). SnapShot: Molecular chaperones, part I. *Cell*, 128(1), 212.e1-212.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.001>
- Chang Y-Y, Eichel J & Cronan JE (2000) Metabolic Instability of *Escherichia coli* Cyclopropane Fatty Acid Synthase Is Due to RpoH-Dependent Proteolysis. *J Bacteriol* **182**, 4288–4294

- Chang, Z., Primm, T. P., Jakana, J., Lee, I. H., Serysheva, I., Chiu, W., Gilbert, H. F., & Quioco, F. A. (1996). *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa Antigen (Hsp16.3) functions as an oligomeric structure in vitro to suppress thermal aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, 271(12), 7218-7223. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.12.7218>
- Chattopadhyay, M., & Jagannadham, M. (2001). Maintenance of membrane fluidity in *Antarctic bacteria*. *Polar Biology*, 24(5), 386-388. <https://doi.org/10.1007/s003000100232>
- Chen, J., Feige, M. J., Franzmann, T. M., Bepperling, A., & Buchner, J. (2010). Regions outside the α -Crystallin Domain of the small Heat Shock Protein Hsp26 are required for its dimerization. *Journal of Molecular Biology*, 398(1), 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.02.022>
- Chen, Y., Lu, Y.-J., Wang, H.-W., Quan, S., Chang, Z., & Sui, S.-F. (2003). Two-dimensional crystallization of a small heat shock protein HSP16.3 on lipid layer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310(2), 360-366. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.026>
- Chu-Ky, S., Tourdot-Marechal, R., Marechal, P.-A., & Guzzo, J. (2005). Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: Effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1717(2), 118-124. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.015>
- Ciofu, O., Moser, C., Jensen, P. Ø., & Høiby, N. (2022). Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nature Reviews. Microbiology*, 20(10), 621-635. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00682-4>
- Cisilotto, B., Scariot, F. J., Vivian Schwarz, L., Mattos Rocha, R. K., Longaray Delamare, A. P., & Echeverrigaray, S. (2021). Yeast stress and death caused by the synergistic effect of ethanol and SO² during the second fermentation of sparkling wines. *OENO One*, 55(4), 49-69. <https://doi.org/10.20870/oenone.2021.55.4.4809>
- Cocotl-Yañez, M., Moreno, S., Encarnación, S., López-Pliego, L., Castañeda, M., & Espín, G. (2014). A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst

- desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, 160(3), 479–487. <https://doi.org/10.1099/mic.0.073353-0>
- Coelho, C., Gougeon, R. D., Perepelkine, L., Alexandre, H., Guzzo, J., & Weidmann, S. (2019). Chemical transfers occurring through *Oenococcus oeni* biofilm in different enological Conditions. *Frontiers in Nutrition*, 6, 95. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00095>
- Contreras, A., Ribbeck, M., Gutiérrez, G. D., Cañon, P. M., Mendoza, S. N., & Agosin, E. (2018). mapping the physiological response of *Oenococcus oeni* to ethanol stress Using an Extended Genome-Scale Metabolic Model. *Frontiers in Microbiology*, 9, 291. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00291>
- Cortez, P., Cerdeira, A., Almeida, F., Matos, T., & Reis, J. (2009). Modeling wine preferences by data mining from physicochemical properties. *Decision Support Systems*, 47(4), 547-553. <https://doi.org/10.1016/j.dss.2009.05.016>
- Costello, P. J., Siebert, T. E., Solomon, M. R., & Bartowsky, E. J. (2013). Synthesis of fruity ethyl esters by acyl coenzyme A : Alcohol acyltransferase and reverse esterase activities in *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 114(3), 797-806. <https://doi.org/10.1111/jam.12098>
- Costerton, J. (1995). Overview of microbial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(3), 137-140. <https://doi.org/10.1007/BF01569816>
- Cotte, A. K., Cottet, V., Aires, V., Mouillot, T., Rizk, M., Vinault, S., Binquet, C., De Barros, J.-P. P., Hillon, P., & Delmas, D. (2019). Phospholipid profiles and hepatocellular carcinoma risk and prognosis in cirrhotic patients. *Oncotarget*, 10(22), 2161-2172. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26738>
- Coucheney, F., Gal, L., Beney, L., Lherminier, J., Gervais, P., & Guzzo, J. (2005). A small HSP, Lo18, interacts with the cell membrane and modulates lipid physical state under heat shock conditions in a lactic acid bacterium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1720(1-2), 92-98. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.11.017>
- Cronan, J. E. (1978). Molecular biology of bacterial membrane lipids. *Annual Review of Biochemistry*, 47(1), 163-189. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.47.070178.001115>
- Csoboz, B., Gombos, I., Kóta, Z., Dukic, B., Klement, É., Varga-Zsíros, V., Lipinszki, Z., Páli, T., Víg, L., & Török, Z. (2022). The small heat shock protein, HSPB1, interacts with

and modulates the physical structure of membranes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7317. <https://doi.org/10.3390/ijms23137317>

Cunningham, A. F., & Spreadbury, C. L. (1998). Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton α -crystallin homolog. *Journal of Bacteriology*, 180(4), 801–808. <https://doi.org/10.1128/jb.180.4.801-808.1998>

D

D’Amico, S., Collins, T., Marx, J., Feller, G., Gerday, C., & Gerday, C. (2006). Psychrophilic microorganisms : Challenges for life. *EMBO Reports*, 7(4), 385-389. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400662>

Da Silveira, M. G., Golovina, E. A., Hoekstra, F. A., Rombouts, F. M., & Abee, T. (2003). Membrane fluidity adjustments in ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 5826-5832. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.5826-5832.2003>

da Silva Barreira, D., Lapaquette, P., Novion Ducassou, J., Couté, Y., Guzzo, J., & Rieu, A. (2022). Spontaneous prophage induction contributes to the production of membrane vesicles by the gram-positive bacterium *Lactocaseibacillus casei* BL23. *mBio*, 13(5), e02375-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.02375-22>

Dabbaghizadeh, A., & Tanguay, R. M. (2020). Structural and functional properties of proteins interacting with small heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones*, 25(4), 629-637. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01097-x>

Daggett, V., & Fersht, A. R. (2003). Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends in Biochemical Sciences*, 28(1), 18-25. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)00012-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)00012-9)

Darsonval, M. (2015). Etude des mécanismes moléculaires de la réponse au stress chez *Oenococcus oeni* et mise en oeuvre d’outils pour l’exploration fonctionnelle de gènes d’intérêt œnologique [Thèse de doctorat, Dijon]. <https://www.theses.fr/2015DIJOS065>

- Darsonval, M., Msadek, T., Alexandre, H., & Grandvalet, C. (2016). The antisense RNA approach : A new application for in vivo investigation of the stress response of *Oenococcus oeni*, a wine-associated lactic acid bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(1), 18-26. <https://doi.org/10.1128/AEM.02495-15>
- Das, B. K., & Liang, J. J.-N. (1997). Detection and characterization of α -crystallin intermediate with maximal chaperone-like activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236(2), 370-374. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6950>
- Davis, C. R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T. H., & Fleet, G. H. (1985). Practical implications of malolactic fermentation : A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36(4), 290-301. <https://doi.org/10.5344/ajev.1985.36.4.290>
- de Jong, W. W., Caspers, G.-J., & Leunissen, J. A. M. (1998). Genealogy of the α -crystallin—small heat-shock protein superfamily. *International Journal of Biological Macromolecules*, 22(3–4), 151–162. [https://doi.org/10.1016/s0141-8130\(98\)00013-0](https://doi.org/10.1016/s0141-8130(98)00013-0)
- de Jong, WW, Leunissen JA, Voorter CE. (1993). Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a039992>
- De Maio, A., & Hightower, L. E. (2020). Heat shock proteins and the biogenesis of cellular membranes. *Cell Stress and Chaperones*, 26(1), 15–18. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01173-2>
- De Maio, A., & Hightower, L. E. (2021). Heat shock proteins and the biogenesis of cellular membranes. *Cell Stress and Chaperones*, 26(1), 15-18. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01173-2>
- De Maio, A., Cauvi, D. M., Capone, R., Bello, I., Egberts, W. V., Arispe, N., & Boelens, W. (2019). The small heat shock proteins, HSPB1 and HSPB5, interact differently with lipid membranes. *Cell Stress and Chaperones*, 24(5), 947-956. <https://doi.org/10.1007/s12192-019-01021-y>
- de Kruijff, B. (1987). Polymorphic regulation of membrane lipid composition. *Nature*, 329(6140), 587-588. <https://doi.org/10.1038/329587a0>

- Delbecq, S. P., & Klevit, R. E. (2013). One size does not fit all: The oligomeric states of α B crystallin. *FEBS Letters*, 587(8), 1073–1080. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.021>
- Delbecq, S. P., Rosenbaum, J. C., & Klevit, R. E. (2015). A mechanism of subunit recruitment in human small heat shock protein oligomers. *Biochemistry*, 54(28), 4276–4284. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00490>
- Delmas, F., Pierre, F., Divies, C., & Guzzo, J. (2001). Biochemical and physiological studies of the small heat shock protein Lo18 from the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3(4), 601-610.
- Deng, W., Li, R., Xu, Y., Mao, R., Chen, S., Chen, L., Chen, L., Liu, Y.-G., & Chen, Y. (2020). A lipid transfer protein variant with a mutant eight-cysteine motif causes photoperiod- and thermo-sensitive dwarfism in rice. *Journal of Experimental Botany*, 71(4), 1294-1305. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz500>
- Denich, T. J., Beaudette, L. A., Lee, H., & Trevors, J. T. (2003). Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods*, 52(2), 149-182. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00155-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00155-0)
- Derré, I., Rapoport, G., & Msadek, T. (1999). CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls clp and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 31(1), 117-131. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01152.x>
- Devi, A., & Anu-Appaiah, K. A. (2018). Diverse physiological and metabolic adaptations by *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* in response to the phenolic stress during wine fermentation. *Food Chemistry*, 268, 101-109. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.073>
- Di Stasio, E., & De Cristofaro, R. (2010). The effect of shear stress on protein conformation. *Biophysical Chemistry*, 153(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2010.07.002>
- Diaz, D., Döbeli, H., Yeboah-Manu, D., Mensah-Quainoo, E., Friedlein, A., Soder, N., Rondini, S., Bodmer, T., & Pluschke, G. (2006). Use of the immunodominant 18-Kilodalton small heat shock protein as a serological marker for exposure to *Mycobacterium*

ulcerans. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(12), 1314-1321.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00254-06>

Dicks, L. M. T., Dellaglio, F., & Collins, M. D. (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. Nov., comb. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(2), 395-397. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-2-395>

Dowhan, W., & Bogdanov, M. (2002). Chapter 1 Functional roles of lipids in membranes. In *New Comprehensive Biochemistry* (Vol. 36, p. 1-35). Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(02\)36003-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(02)36003-4)

Dowler, S., Kular, G., & Alessi, D. R. (2002). Protein Lipid Overlay Assay. *Science Signaling*, 11. <https://doi.org/10.1126/stke.2002.129.pl6>

Drici-Cachon, Z., Guzzo, J., Cavin, J.-F., & Diviès, C. (1996). Acid tolerance in *Leuconostoc oenos*. Isolation and characterization of an acid-resistant mutant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44(6), 785-789.
<https://doi.org/10.1007/BF00178619>

Dubin, R. A., Wawrousek, E. F., & Piatigorsky, J. (1989). Expression of the murine alpha B-crystallin gene is not restricted to the lens. *Molecular and Cellular Biology*, 9(3), 1083–1091. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.3.1083-1091.1989>

Dudich, I. V., Zav'yalov, V. P., Pfeil, W., Gaestel, M., Zav'yalova, G. A., Denesyuk, A. I., & Korpela, T. (1995). Dimer structure as a minimum cooperative subunit of small heat-shock proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1253(2), 163-168. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(95\)00135-X](https://doi.org/10.1016/0167-4838(95)00135-X)

E

Edsall, J. T. (1952). Structure of Proteins. *Nature*, 170(4315), 53-55.
<https://doi.org/10.1038/170053a0>

- Eisenberg, D. (2003). The discovery of the α -helix and β -sheet, the principal structural features of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), 11207-11210. <https://doi.org/10.1073/pnas.2034522100>
- Eisenhaber, F., Persson, B., & Argos, P. (1995). protein structure prediction : recognition of primary, secondary, and tertiary structural features from amino acid sequence. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(1), 1-94. <https://doi.org/10.3109/10409239509085139>
- Ellington, A., & Cherry, J. M. (1996). Characteristics of amino acids. *current protocols in Molecular Biology*, 33(1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mba01cs33>
- Ellis, R. J. (1990). The molecular chaperone concept. *Seminars in Cell Biology*, 1(1), 1-9.
- Evans, P., Wyatt, K., Wistow, G. J., Bateman, O. A., Wallace, B. A., & Slingsby, C. (2004). The P23T cataract mutation causes loss of solubility of folded γ D-Crystallin. *Journal of Molecular Biology*, 343(2), 435-444. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.050>

F

- Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., & Subramaniam, S. (2011). Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(11), 637-647. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.009>
- Faria-Oliveira, F., Puga, S., & Ferreir, C. (2013). Yeast : world's finest chef. In I. Muzzalupo (Éd.), *Food Industry*. InTech. <https://doi.org/10.5772/53156>
- Fei, X., Ye, X., LaRonde, N. A., & Lorimer, G. H. (2014). Formation and structures of GroEL:GroES, 2 chaperonin footballs, the protein-folding functional form. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35), 12775-12780. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412922111>
- Ferenczy, G. G., & Kellermayer, M. (2022). Contribution of hydrophobic interactions to protein mechanical stability. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 1946-1956. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.04.025>

- Férey, N., Nelson, J., Martin, C., Picinali, L., Bouyer, G., Tek, A., Bourdot, P., Burkhardt, J. M., Katz, B. F. G., Ammi, M., Etchebest, C., & Autin, L. (2009). Multisensory VR interaction for protein-docking in the CoRSAIRE project. *Virtual Reality*, 13(4), 273-293. <https://doi.org/10.1007/s10055-009-0136-z>
- Fisher, H. F. (1964). A limiting law relating the size and shape of protein molecules to their composition*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 51(6), 1285-1291. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.6.1285>
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Fonseca, F., Pénicaud, C., Tymczynsyn, E. E., Gómez-Zavaglia, A., & Passot, S. (2019). Factors influencing the membrane fluidity and the impact on production of lactic acid bacteria starters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(17), 6867-6883. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10002-1>
- Frauenfelder, H. (2010). Tertiary Structure of Proteins. In H. Frauenfelder, S. S. Chan, & W. S. Chan (Éds.), *The Physics of proteins: an introduction to biological physics and molecular biophysics* (p. 75-81). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1044-8_9
- Frydman, J. (2001). Folding of newly translated proteins in vivo: The role of molecular chaperones. *Annual Review of Biochemistry*, 70, 603-647. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.603>
- Fu, M.-S., De Sordi, L., & Mühlischlegel, F. A. (2012). Functional characterization of the small heat shock protein Hsp12p from *Candida albicans*. *PLoS ONE*, 7(8), e42894. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042894>
- Fu, X., Jiao, W., & Chang, Z. (2006). Phylogenetic and biochemical studies reveal a potential evolutionary origin of small heat shock proteins of animals from bacterial class A. *Journal of Molecular Evolution*, 62(3), 257–266. <https://doi.org/10.1007/s00239-005-0076-5>

G

- Garcie, C., Tronnet, S., Garénaux, A., McCarthy, A. J., Brachmann, A. O., Pénary, M., Houle, S., Nougayrède, J.-P., Piel, J., Taylor, P. W., Dozois, C. M., Genevaux, P., Oswald, E., & Martin, P. (2016). The bacterial stress-responsive hsp90 chaperone (htpg) is required for the production of the genotoxin colibactin and the siderophore yersiniabactin in *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases*, 214(6), 916-924. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw294>
- Gardoni, E., Benito, S., Scansani, S., Brezina, S., Fritsch, S., & Rauhut, D. (2021). Biological deacidification strategies for white wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 42(2). <https://doi.org/10.21548/42-2-4474>
- Garvie, E. I. (1967). *Leuconostoc oenos* sp.nov. *Journal of General Microbiology*, 48(3), 431-438. <https://doi.org/10.1099/00221287-48-3-431>
- Gerasimavicius, L., Livesey, B. J., & Marsh, J. A. (2022). Loss-of-function, gain-of-function and dominant-negative mutations have profoundly different effects on protein structure. *Nature Communications*, 13, 3895. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31686-6>
- Giese, K. C., Basha, E., Catague, B. Y., & Vierling, E. (2005). Evidence for an essential function of the N terminus of a small heat shock protein *in vivo*, independent of *in vitro* chaperone activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(52), 18896–18901. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506169103>
- Gil-Sánchez, I., Bartolomé Suáldea, B., & Victoria Moreno-Arribas, M. (2019). Malolactic fermentation. in *red wine technology* (p. 85-98). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00006-2>
- Glatz, A., Pilbat, A.-M., Németh, G. L., Vince-Kontár, K., Jósavay, K., Hunya, Á., Udvardy, A., Gombos, I., Péter, M., Balogh, G., Horváth, I., Vígh, L., & Török, Z. (2016). Involvement of small heat shock proteins, trehalose, and lipids in the thermal stress management in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Stress and Chaperones*, 21(2), 327-338. <https://doi.org/10.1007/s12192-015-0662-4>
- Glover, J. R., & Lindquist, S. (1998). Hsp104, Hsp70, and Hsp40. *Cell*, 94(1), 73–82. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81223-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81223-4)
- Gonzalez, R., & Morales, P. (2022). Truth in wine yeast. *Microbial Biotechnology*, 15(5), 1339-1356. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13848>

- Grandvalet, C. (2017). *Oenococcus oeni*: Queen of the cellar, nightmare of geneticists: This article is part of the Microbe Profiles collection. *Microbiology*, 163(3), 297-299. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000456>
- Grandvalet, C., Assad-García, J. S., Chu-Ky, S., Tollot, M., Guzzo, J., Gresti, J., & Tourdot-Maréchal, R. (2008). Changes in membrane lipid composition in ethanol- and acid-adapted *Oenococcus oeni* cells: Characterization of the *cfa* gene by heterologous complementation. *Microbiology*, 154(9), 2611-2619. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/016238-0>
- Grandvalet, C., Coucheney, F., Beltramo, C., & Guzzo, J. (2005). Ctsr is the master regulator of stress response gene expression in *Oenococcus oeni*. *Journal of Bacteriology*, 187(16), 5614-5623. <https://doi.org/10.1128/JB.187.16.5614-5623.2005>
- Grogan, D. W., & Cronan, J. E. (1997). Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4), 429-441. <https://doi.org/10.1128/mubr.61.4.429-441.1997>
- Guo, Z., & Cooper, L. F. (2000). An N-Terminal 33-amino-acid-deletion variant of hsp25 retains oligomerization and functional properties. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 270(1), 183-189. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2401>
- Guzzo, J. (2011). Stress Responses of *Oenococcus oeni*. In E. Tsakalidou & K. Papadimitriou (Éds.), *Stress responses of Lactic Acid Bacteria* (p. 349-365). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92771-8_15
- Guzzo, J., Delmas, F., Pierre, F., Jobin, M. -p., Samyn, B., Van Beeumen, J., Cavin, J. -f., & Diviès, C. (1997). A small heat shock protein from *Leuconostoc oenos* induced by multiple stresses and during stationary growth phase. *Letters in Applied Microbiology*, 24(5), 393–396. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.1997.00042.x>
- Guzzo, J., Jobin, M.-P., & Diviès, C. (1998). Increase of sulfite tolerance in *Oenococcus oeni* by means of acidic adaptation. *FEMS Microbiology Letters*, 160(1), 43-47. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12888.x>
- Guzzo, J., Jobin, M.-P., Delmas, F., Fortier, L.-C., Garmyn, D., Tourdot-Maréchal, R., Lee, B., & Diviès, C. (2000). Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as a function of environmental changes and growth phase. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3), 27-31. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00209-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00209-9)

H

- Han, M.-J., Yun, H., & Lee, S. Y. (2008). Microbial small heat shock proteins and their use in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 26(6), 591–609. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.004>
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381(6583), 571–580. <https://doi.org/10.1038/381571a0>
- Haslbeck, M., & Vierling, E. (2015). A first line of stress defense : Small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *Journal of Molecular Biology*, 427(7), 1537-1548. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.002>
- Haslbeck, M., Miess, A., Stromer, T., Walter, S., & Buchner, J. (2005). Disassembling protein aggregates in the yeast cytosol. *Journal of Biological Chemistry*, 280(25), 23861–23868. <https://doi.org/10.1074/jbc.m502697200>
- Haslbeck, M., Peschek, J., Buchner, J., & Weinkauff, S. (2016). Structure and function of α -crystallins: Traversing from in vitro to in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1860(1), 149–166. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.06.008>
- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H. E., Chen, S., Saibil, H. R., & Buchner, J. (1999). Hsp26 : A temperature-regulated chaperone. *The EMBO Journal*, 18(23), 6744-6751. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.23.6744>
- Hayer-Hartl, M., Bracher, A., & Hartl, F. U. (2016). The GroEL–GroES chaperonin machine : a nano-cage for protein folding. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(1), 62-76. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.07.009>
- Heirbaut, M., Beelen, S., Strelkov, S. V., & Weeks, S. D. (2014). Dissecting the functional role of the n-terminal domain of the human Small Heat Shock Protein HSPB6. *PLOS ONE*, 9(8), e105892. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105892>

- Henriques, A. O., Beall, B. W., & Moran, C. P., Jr. (1997). CotM of *Bacillus subtilis*, a member of the alpha-crystallin family of stress proteins, is induced during development and participates in spore outer coat formation. *Journal of Bacteriology*, 179(6), 1887–1897. <https://doi.org/10.1128/jb.179.6.1887-1897.1997>
- Hilton, G. R., & Benesch, J. L. P. (2012). Two decades of studying non-covalent biomolecular assemblies by means of electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of The Royal Society Interface*, 9(70), 801–816. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0823>
- Hilton, G. R., Hochberg, G. K. A., Laganowsky, A., McGinnigle, S. I., Baldwin, A. J., & Benesch, J. L. P. (2013). C-terminal interactions mediate the quaternary dynamics of α B-crystallin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1617), 20110405. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0405>
- Hinze, H., & Holzer, H. (1986). Analysis of the energy metabolism after incubation of *Saccharomyces cerevisiae* with sulfite or nitrite. *Archives of Microbiology*, 145(1), 27-31. <https://doi.org/10.1007/BF00413023>
- Holm Hansen, E., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J. C., & Arneborg, N. (2001). The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 541-547. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01426.x>
- Horváth, I., Multhoff, G., Sonnleitner, A., & Víg, L. (2008). Membrane-associated stress proteins: More than simply chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(7-8), 1653-1664. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.02.012>
- Horwitz, J. (2003). Alpha-crystallin. *Experimental Eye Research*, 76(2), 145–153. [https://doi.org/10.1016/s0014-4835\(02\)00278-6](https://doi.org/10.1016/s0014-4835(02)00278-6)

I

- Ingolia, T. D., & Craig, E. A. (1982). Four small *Drosophila* heat shock proteins are related to each other and to mammalian α -crystallin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(7), 2360–2364. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.7.2360>

J

- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., & Buchner, J. (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *Journal of Biological Chemistry*, 268(3), 1517–1520. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)53882-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)53882-5)
- Janin, J., Bahadur, R. P., & Chakrabarti, P. (2008). Protein–protein interaction and quaternary structure. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 41(2), 133-180. <https://doi.org/10.1017/S0033583508004708>
- Jee, B., Singh, Y., Yadav, R., & Lang, F. (2018). Small Heat Shock Protein16.3 of *Mycobacterium tuberculosis*: after two decades of functional characterization. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49(1), 368–380. <https://doi.org/10.1159/000492887>
- Jeffery, C. J. (1999). Moonlighting proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(1), 8-11. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01335-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01335-8)
- Jenal, U. (1998). An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *The EMBO Journal*, 17(19), 5658-5669. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5658>
- Jobin, M.-P., Delmas, F., Garmyn, D., Diviès, C., & Guzzo, J. (1997). Molecular characterization of the gene encoding an 18-kilodalton small heat shock protein associated with the membrane of *Leuconostoc oenos*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 609-614. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.2.609-614.1997>
- Jobin, M.-P., Garmyn, D., Diviès, C., & Guzzo, J. (1999). Expression of the *Oenococcus oeni* *trxA* gene is induced by hydrogen peroxide and heat shock. *Microbiology*, 145(5), 1245-1251. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-5-1245>
- Joshi, S. A., Hersch, G. L., Baker, T. A., & Sauer, R. T. (2004). Communication between ClpX and ClpP during substrate processing and degradation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nsmb752>
- Junprung, W., Supungul, P., & Tassanakajon, A. (2021). Structure, gene expression, and putative functions of crustacean heat shock proteins in innate immunity.

Developmental & Comparative Immunology, 115, 103875.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103875>

K

- Kanwa, N., De, S. K., Maity, A., & Chakraborty, A. (2020). Interaction of aliphatic amino acids with zwitterionic and charged lipid membranes: Hydration and dehydration phenomena. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22(6), 3234-3244.
<https://doi.org/10.1039/C9CP06188F>
- Kappé, G., Leunissen, J. A. M., & de Jong, W. W. (2002). Evolution and diversity of prokaryotic small heat shock proteins. In *Small Stress Proteins* (pp. 1–17). Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-56348-5_1
- Karshikoff, A., Nilsson, L., & Ladenstein, R. (2015). Rigidity versus flexibility: The dilemma of understanding protein thermal stability. *FEBS Journal*, 282(20), 3899-3917.
<https://doi.org/10.1111/febs.13343>
- Khaleghinejad, S. H., Shahsavani, M. B., Ghahramani, M., & Yousefi, R. (2023). Investigating the role of double mutations R12C/P20R, and R12C/R69C on structure, chaperone-like activity, and amyloidogenic properties of human α B-crystallin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 242(Pt 1), 124590.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124590>
- Kim, D. H., Xu, Z.-Y., Na, Y. J., Yoo, Y.-J., Lee, J., Sohn, E.-J., & Hwang, I. (2011). Small heat shock protein Hsp17.8 functions as an Akr2a cofactor in the targeting of chloroplast outer membrane proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 157(1), 132-146. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178681>
- Kim, R., Kim, K. K., Yokota, H., & Kim, S.-H. (1998). Small heat shock protein of *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(16), 9129–9133. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9129>
- Klaips, C. L., Jayaraj, G. G., & Hartl, F. U. (2017). Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *Journal of Cell Biology*, 217(1), 51–63.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201709072>

- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S. A., Sandbrink, H. M., Fiers, M. W. E. J., Stiekema, W., Lankhorst, R. M. K., Bron, P. A., Hoffer, S. M., Groot, M. N. N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W. M., & Siezen, R. J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), 1990-1995. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337704100>
- Klevit, R. E. (2020). Peeking from behind the veil of enigma: Emerging insights on small heat shock protein structure and function. *Cell Stress and Chaperones*, 25(4), 573–580. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01092-2>
- Klotz, I. M., Langebman, N. R., & Dahmall, D. W. (1970). Quaternary Structure of Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 39(1), 25-62. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.39.070170.000325>
- Kriehuber, T., Rattei, T., Weinmaier, T., Bepperling, A., Haslbeck, M., & Buchner, J. (2010). Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. *The FASEB Journal*, 24(10), 3633-3642. <https://doi.org/10.1096/fj.10-156992>
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., & Uchiyama, H. (2008). Biofilm formation by Lactic Acid Bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(4), 381-386. <https://doi.org/10.1263/jbb.106.381>
- Kuczynska-Wisnik, D., Kędzierska, S., Matuszewska, E., Lund, P., Taylor, A., Lipinska, B., & Laskowska, E. (2002). The *Escherichia coli* small heat-shock proteins IbpA and IbpB prevent the aggregation of endogenous proteins denatured *in vivo* during extreme heat shock. *Microbiology*, 148(6), 1757-1765. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-6-1757>
- Kumar, L. V. S., Ramakrishna, T., & Rao, Ch. M. (1999). Structural and functional consequences of the mutation of a conserved arginine residue in α A and α B Crystallins. *Journal of Biological Chemistry*, 274(34), 24137–24141. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.34.24137>

Kunkee, R. (1991). Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making. *FEMS Microbiology Letters*, 88(1), 55-71. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(91\)90696-8](https://doi.org/10.1016/0378-1097(91)90696-8)

L

Lafon-Lafourcade, S., Carre, E., & Ribéreau-Gayon, P. (1983). Occurrence of Lactic Acid Bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(4), 874-880. <https://doi.org/10.1128/aem.46.4.874-880.1983>

Landini, P. (2009). Cross-talk mechanisms in biofilm formation and responses to environmental and physiological stress in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 160(4), 259-266. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.03.001>

Larsen, P. O. (1980). 6—Physical and chemical properties of amino acids. In B. J. Mifflin (Éd.), *Amino Acids and Derivatives* (p. 225-269). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-675405-6.50012-7>

Laskowska, E., Wawrzynów, A., & Taylor, A. (1996). IbpA and IbpB, the new heat-shock proteins, bind to endogenous *Escherichia coli* proteins aggregated intracellularly by heat shock. *Biochimie*, 78(2), 117-122. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(96\)82643-5](https://doi.org/10.1016/0300-9084(96)82643-5)

Lay, S. L., Martinez, M. C., & Andriantsitohaina, R. (2018). Vésicules extracellulaires, biomarqueurs et bioeffecteurs du syndrome métabolique. *médecine/sciences*, 34(11), Article 11. <https://doi.org/10.1051/medsci/2018239>

Lee, B. Y., Hefta, S. A., & Brennan, P. J. (1992). Characterization of the major membrane protein of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, 60(5), 2066-2074. <https://doi.org/10.1128/iai.60.5.2066-2074.1992>

Lee, H. H., Molla, M. N., Cantor, C. R., & Collins, J. J. (2010). Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature*, 467(7311), Article 7311. <https://doi.org/10.1038/nature09354>

- Lee, J.-W., Kwak, H.-J., Lee, J.-J., Kim, Y.-N., Lee, J. W., Park, M.-J., Jung, S. E., Hong, S.-I., Lee, J.-H., & Lee, J.-S. (2008). HSP27 regulates cell adhesion and invasion via modulation of focal adhesion kinase and MMP-2 expression. *European Journal of Cell Biology*, 87(6), 377-387. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2008.03.006>
- Lelj-Garolla, B., & Mauk, A. G. (2011). Roles of the N- and C-terminal sequences in Hsp27 self-association and chaperone activity. *Protein Science*, 21(1), 122–133. <https://doi.org/10.1002/pro.761>
- Lentze, N., & Narberhaus, F. (2004a). Detection of oligomerisation and substrate recognition sites of small heat shock proteins by peptide arrays. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325(2), 401-407. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.043>
- Lentze, N., Aquilina, J. A., Lindbauer, M., Robinson, C. V., & Narberhaus, F. (2004b). Temperature and concentration-controlled dynamics of rhizobial small heat shock proteins. *European Journal of Biochemistry*, 271(12), 2494–2503. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04180.x>
- Lentze, N., Studer, S., & Narberhaus, F. (2003). Structural and functional defects caused by point mutations in the α -Crystallin domain of a bacterial α -Heat Shock Protein. *Journal of Molecular Biology*, 328(4), 927–937. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00356-5](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00356-5)
- Lim, J., Thomas, T., & Cavicchioli, R. (2000). Low temperature regulated DEAD-box RNA helicase from the antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*. *Journal of Molecular Biology*, 297(3), 553–567. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3585>
- Linderstrom-Lang, K. U. (1952). *Proteins and enzymes : Lane medical lectures, 1951*. Stanford University Press.
- Lini, N., Rehna, E. A., Shiburaj, S., Maheshwari, J. J., Shankernarayan, N. P., & Dharmalingam, K. (2008). Functional characterization of a small heat shock protein from *Mycobacterium leprae*. *BMC microbiology*, 8, 208. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-208>
- Liu, Q.-N., Liu, Y., Xin, Z.-Z., Zhu, X.-Y., Ge, B.-M., Li, C.-F., Wang, D., Bian, X.-G., Yang, L., Chen, L., Tian, J.-W., Zhou, C.-L., & Tang, B.-P. (2018). A small heat shock protein 21 (sHSP21) mediates immune responses in Chinese oak silkworm *Antheraea*

- pernyi*. International Journal of Biological Macromolecules, 111, 1027-1031. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.147>
- Liu, S.-Q. (2002). Malolactic fermentation in wine—Beyond deacidification. Journal of Applied Microbiology, 92(4), 589-601. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01589.x>
- Liu, S.-Q., Aung, M. T., Lee, P.-R., & Yu, B. (2016). Yeast and volatile evolution in cider co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus*. Annals of Microbiology, 66(1), 307-315. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1110-5>
- Longo, A., Russo, P., Capozzi, V., Spano, G., & Fiocco, D. (2021). Knock out of sHSP genes determines some modifications in the probiotic attitude of *Lactiplantibacillus plantarum*. Biotechnology Letters, 43(3), 645-654. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03041-6>
- Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. Antonie Van Leeuwenhoek, 76(1-4), 317-331.
- Lorentzen, M. P. G., & Lucas, P. M. (2019). Distribution of *Oenococcus oeni* populations in natural habitats. Applied Microbiology and Biotechnology, 103(7), 2937-2945. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09689-z>
- Los, D. A., & Murata, N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1666(1-2), 142-157. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.08.002>
- Lyu, M., Bai, Y., Orihara, K., Miyanaga, K., & Yamamoto, N. (2023). GAPDH Released from *Lactobacillus johnsonii* MG Enhances Barrier Function by Upregulating Genes Associated with Tight Junctions. Microorganisms, 11(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061393>

M

- Ma, P., Li, J., Qi, L., & Dong, X. (2021). The archaeal small heat shock protein hsp17.6 Protects proteins from oxidative inactivation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2591. <https://doi.org/10.3390/ijms22052591>
- Maaroufi, H., & Tanguay, R. M. (2013). Analysis and phylogeny of small heat shock proteins from marine viruses and their cyanobacteria host. *PLoS ONE*, 8(11), e81207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081207>
- MacRae, T. H. (2000). Structure and function of small heat shock/ α -crystallin proteins: Established concepts and emerging ideas. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(6), 899–913. <https://doi.org/10.1007/pl00000733>
- Mainz, A., Peschek, J., Stavropoulou, M., Back, K. C., Bardiaux, B., Asami, S., Prade, E., Peters, C., Weinkauff, S., Buchner, J., & Reif, B. (2015). The chaperone α B-crystallin uses different interfaces to capture an amorphous and an amyloid client. *Nature Structural Molecular Biology*, 22(11), 898–905. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3108>
- Maitre, M., Weidmann, S., Dubois-Brissonnet, F., David, V., Covès, J., & Guzzo, J. (2014). Adaptation of the wine bacterium *Oenococcus oeni* to ethanol stress : Role of the small heat shock protein Lo18 in membrane integrity. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 2973-2980. <https://doi.org/10.1128/AEM.04178-13>
- Maitre, M., Weidmann, S., Rieu, A., Fenel, D., Schoehn, G., Ebel, C., Coves, J., & Guzzo, J. (2012). The oligomer plasticity of the small heat-shock protein Lo18 from *Oenococcus oeni* influences its role in both membrane stabilization and protein protection. *Biochemical Journal*, 444(1), 97–104. <https://doi.org/10.1042/bj20120066>
- Mao, Q., & Chang, Z. (2001). Site-Directed mutation on the only universally conserved residue leu122 of small heat shock protein hsp16.3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(5), 1257–1261. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6062>
- Marcion, G., Seigneuric, R., Chavanne, E., Artur, Y., Briand, L., Hadi, T., Gobbo, J., Garrido, C., & Neiers, F. (2015). C-terminal amino acids are essential for human heat shock protein 70 dimerization. *Cell Stress and Chaperones*, 20(1), 61-72. <https://doi.org/10.1007/s12192-014-0526-3>

- Marcobal, Á., de las Rivas, B., Moreno-Arribas, M. V., & Muñoz, R. (2006). Evidence for horizontal gene transfer as origin of putrescine production in *Oenococcus oeni* RM83. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7954-7958. <https://doi.org/10.1128/AEM.01213-06>
- Martínez B, Rodríguez A, Kulakauskas S & Chapot-Chartier M-P (2020) Cell wall homeostasis in lactic acid bacteria: threats and defences. *FEMS Microbiology Reviews* 44, 538–564
- Matsumoto, K., Kusaka, J., Nishibori, A., & Hara, H. (2006). Lipid domains in bacterial membranes. *Molecular Microbiology*, 61(5), 1110-1117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05317.x>
- McGovern, P. E. (2013). *Ancient Wine : The search for the origins of viticulture*. In *Ancient Wine*. Princeton University Press. <https://doi.org/10.1515/9781400849536>
- McGovern, P. E., Glusker, D. L., Exner, L. J., & Voigt, M. M. (1996). Neolithic resinated wine. *Nature*, 381(6582), Article 6582. <https://doi.org/10.1038/381480a0>
- McGovern, P. E., Hartung, U., Badler, V. R., Glusker, D. L., & Exner, L. J. (1997). The beginnings of winemaking and viticulture in the ancient Near East and Egypt, 39(1), 3-21.
- McGovern, P. E., Luley, B. P., Rovira, N., Mirzoian, A., Callahan, M. P., Smith, K. E., Hall, G. R., Davidson, T., & Henkin, J. M. (2013). Beginning of viticulture in France. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(25), 10147-10152. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216126110>
- McGovern, P., Jalabadze, M., Batiuk, S., Callahan, M. P., Smith, K. E., Hall, G. R., Kvavadze, E., Maghradze, D., Rusishvili, N., Bouby, L., Failla, O., Cola, G., Mariani, L., Boaretto, E., Bacilieri, R., This, P., Wales, N., & Lordkipanidze, D. (2017). Early Neolithic wine of Georgia in the south caucasus. *proceedings of the national academy of sciences*, 114(48). <https://doi.org/10.1073/pnas.1714728114>
- Micsonai, A., Moussong, É., Wien, F., Boros, E., Vadász, H., Murvai, N., Lee, Y.-H., Molnár, T., Réfrégiers, M., Goto, Y., Tantos, Á., & Kardos, J. (2022). BeStSel : Webserver for secondary structure and fold prediction for protein CD spectroscopy. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W90-W98. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac345>

- Miles, A. J., Wien, F., & Wallace, B. A. (2004). Redetermination of the extinction coefficient of camphor-10-sulfonic acid, a calibration standard for circular dichroism spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 335(2), 338-339. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.08.035>
- Mills, D. A., Rawsthorne, H., Parker, C., Tamir, D., & Makarova, K. (2005). Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 465-475. <https://doi.org/10.1016/j.fmre.2005.04.011>
- Mirghani, R., Saba, T., Khaliq, H., Mitchell, J., Do, L., Chambi, L., Diaz, K., Kennedy, T., Alkassab, K., Huynh, T., Elmi, M., Martinez, J., Sawan, S., & Rijal, G. (2022). Biofilms : Formation, drug resistance and alternatives to conventional approaches. *AIMS Microbiology*, 8(3), 239-277. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2022019>
- Mitra, A., Bhakta, K., Kar, A., Roy, A., Mohid, S. A., Ghosh, A., & Ghosh, A. (2023). Insight into the biochemical and cell biological function of an intrinsically unstructured heat shock protein, Hsp12 of *Ustilago maydis*. *Molecular Plant Pathology*, 24(9), 1063-1077. <https://doi.org/10.1111/mpp.13350>
- Miura, K. (2018). An overview of current methods to confirm protein-protein interactions. *Protein and Peptide Letters*, 25(8), 728-733. <https://doi.org/10.2174/0929866525666180821122240>
- Mogk, A., Deuerling, E., Vorderwülbecke, S., Vierling, E., & Bukau, B. (2003). Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Molecular Microbiology*, 50(2), 585-595. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03710.x>
- Mogk, A., Ruger-Herreros, C., & Bukau, B. (2019). Cellular functions and mechanisms of action of small heat shock proteins. *Annual Review of Microbiology*, 73(1), 89-110. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115515>
- Molière, N., & Turgay, K. (2014). The key to unlock the Hsp100/Clp protein degradation machines of Mycobacterium : Hsp100/Clp proteases of Mycobacterium. *Molecular Microbiology*, 93(4), 583-586. <https://doi.org/10.1111/mmi.12696>
- Montfort, van, Basha, Friedrich, Slingsby, & Vierling. (2001). Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nature Structural Biology*, 8(12), 1025–1030. <https://doi.org/10.1038/nsb722>

- Mörner CT. (1894). Untersuchen der proteinsubstanzen in licht-brechenden medien des auges. Hoppe-Seyler's Z physiol Chem. 1894;18:61–106.
- Moss, C. W., Lambert, M. A., & Merwin, W. H. (1974). Comparison of rapid methods for analysis of bacterial fatty acids. *Applied Microbiology*, 28(1), 80-85. <https://doi.org/10.1128/am.28.1.80-85.1974>
- Müller-Thurgau, H. (1891) Über die ergebnisse neueruntersuchungen auf den gebiete der weinbereitung. *Ber. XII Dtsch.Weinbaukong (Worms)*, 128
- Muley, L., Baum, B., Smolinski, M., Freindorf, M., Heine, A., Klebe, G., & Hangauer, D. G. (2010). Enhancement of hydrophobic interactions and hydrogen bond strength by cooperativity: synthesis, modeling, and molecular dynamics simulations of a congeneric series of thrombin inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(5), 2126-2135. <https://doi.org/10.1021/jm9016416>
- Munchbach, M., Dainese, P., Staudenmann, W., Narberhaus, F., & James, P. (1999). Proteome analysis of heat shock protein expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *European Journal of Biochemistry*, 264(1), 39–48. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00567.x>
- Mymrikov, E. V., Seit-Nebi, A. S., & Gusev, N. B. (2011). Large potentials of small heat shock proteins. *Physiological Reviews*, 91(4), 1123–1159. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2010>

N

- Najmanovich, R., Kuttner, J., Sobolev, V., & Edelman, M. (2000). Side-chain flexibility in proteins upon ligand binding. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 39(3), 261-268. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(20000515\)39:3<261::AID-PROT90>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(20000515)39:3<261::AID-PROT90>3.0.CO;2-4)
- Naowarojna, N., Cheng, R., Lopez, J., Wong, C., Qiao, L., & Liu, P. (2021). Chemical modifications of proteins and their applications in metalloenzyme studies. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 6(1), 32-49. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2021.01.001>

- Narberhaus, F. (2002). α -Crystallin-Type Heat Shock Proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1), 64–93. <https://doi.org/10.1128/mnbr.66.1.64-93.2002>
- Nielsen, J. C., & Richelieu, M. (1999). Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 740-745. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.2.740-745.1999>
- Nissen, P., & Arneborg, N. (2003). Characterization of early deaths of non-Saccharomyces yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 180(4), 257-263. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0585-9>
- Nitta, K., Suzuki, N., Honma, D., Kaneko, Y., & Nakamoto, H. (2005). Ultrastructural stability under high temperature or intensive light stress conferred by a small heat shock protein in cyanobacteria. *FEBS Letters*, 579(5), 1235-1242. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.095>

O

- O'Brien, J. S. (1967). Cell membranes—Composition : Structure: Function. *Journal of Theoretical Biology*, 15(3), 307-324. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90140-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90140-3)
- O'Leary, W. M. (1962). The fatty acids of bacteria. *Bacteriological Reviews*, 26(4), 421-447. <https://doi.org/10.1128/br.26.4.421-447.1962>
- O'Toole, G. A. (2003). To build a biofilm. *Journal of Bacteriology*, 185(9), 2687-2689. <https://doi.org/10.1128/JB.185.9.2687-2689.2003>
- Obuchowski, I., & Liberek, K. (2020). Small but mighty : A functional look at bacterial sHSPs. *Cell Stress and Chaperones*, 25(4), 593-600. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01094-0>
- Olguín, N., Bordons, A., & Reguant, C. (2010). Multigenic expression analysis as an approach to understanding the behaviour of *Oenococcus oeni* in wine-like conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 88-95. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.032>

- Oliveberg, M., Tan, Y. J., & Fersht, A. R. (1995). Negative activation enthalpies in the kinetics of protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(19), 8926-8929. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.19.8926>
- Orengo, C., Michie, A., Jones, S., Jones, D., Swindells, M., & Thornton, J. (1997). CATH – a hierarchic classification of protein domain structures. *Structure*, 5(8), 1093-1109. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00260-8](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00260-8)
- Otani, M., Ueki, T., Kozuka, S., Segawa, M., Sano, K., & Inouye, S. (2005). Characterization of a Small Heat Shock Protein, Mx Hsp16.6, of *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 187(15), 5236-5241. <https://doi.org/10.1128/JB.187.15.5236-5241.2005>

P

- Pace, C. N., Fu, H., Lee Fryar, K., Landua, J., Trevino, S. R., Schell, D., Thurlkill, R. L., Imura, S., Scholtz, J. M., Gajiwala, K., Sevcik, J., Urbanikova, L., Myers, J. K., Takano, K., Hebert, E. J., Shirley, B. A., & Grimsley, G. R. (2014). Contribution of hydrogen bonds to protein stability : Hydrogen Bonds and Protein Stability. *Protein Science*, 23(5), 652-661. <https://doi.org/10.1002/pro.2449>
- Paramithiotis, S., Stasinou, V., Tzamourani, A., Kotseridis, Y., & Dimopoulou, M. (2022). Malolactic fermentation—theoretical advances and practical considerations. *Fermentation*, 8(10), 521. <https://doi.org/10.3390/fermentation8100521>
- Park, H., & Hwang, Y.-S. (2008). Genome-wide transcriptional responses to sulfite in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Microbiology*, 46(5), 542-548. <https://doi.org/10.1007/s12275-008-0053-y>
- Pasteur, L. (1875). *Etudes sur le vin. Ses maladies et les causes qui les provoquent. Procédés nouveaux pour le conserver et pour le vieillir.* <https://www.livre-rare-book.com/book/5472703/13646>
- Pauling, L., & Corey, R. B. (1951). The pleated sheet, a new layer configuration of polypeptide chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 37(5), 251-256. <https://doi.org/10.1073/pnas.37.5.251>

- Pauling, L., & Corey, R. B. (1953). Two rippled-sheet configurations of polypeptide chains, and a note about the pleated sheets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 39(4), 253-256. <https://doi.org/10.1073/pnas.39.4.253>
- Pérez-Nevado, F., Albergaria, H., Hogg, T., & Girio, F. (2006). Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 108(3), 336-345. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.012>
- Picard, D. (2002). Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(10), 1640-1648. <https://doi.org/10.1007/PL00012491>
- Pidot, S. J., Porter, J. L., Tobias, N. J., Anderson, J., Catmull, D., Seemann, T., Kidd, S., Davies, J. K., Reynolds, E., Dashper, S., & Stinear, T. P. (2010). Regulation of the 18 kDa heat shock protein in *Mycobacterium ulcerans*: An alpha-crystallin orthologue that promotes biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 78(5), 1216-1231. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07401.x>
- Piper, P. W. (1995). The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiology Letters*, 134(2-3), 121-127. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07925.x>
- Ponomarenko, M., Stepanenko, I., & Kolchanov, N. (2013). Heat shock proteins. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (pp. 402–405). Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-374984-0.00685-9>
- Poolman, B., Molenaar, D., Smid, E. J., Ubbink, T., Abee, T., Renault, P. P., & Konings, W. N. (1991). Malolactic fermentation: Electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. *Journal of Bacteriology*, 173(19), 6030-6037. <https://doi.org/10.1128/jb.173.19.6030-6037.1991>
- Poorten, O. V. der, Knuhtsen, A., Pedersen, D. S., Ballet, S., & Tourwé, D. (2016, octobre 12). Side chain cyclized aromatic amino acids: great tools as local constraints in peptide and peptidomimetic design (world) [Review-article]. ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01029>
- Poulain, P., Gelly, J.-C., & Flatters, D. (2010). Detection and architecture of Small Heat Shock Protein monomers. *PLoS ONE*, 5(4), e9990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009990>

Pripis-Nicolau, L., Revel, G., Bertrand, A., & Lonvaud-Funel, A. (2004). Methionine catabolism and production of volatile sulphur compounds by *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 1176-1184. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02257.x>

Q

Quraishe, S., Asuni, A., Boelens, W. C., O'Connor, V., & Wyttenbach, A. (2008). Expression of the small heat shock protein family in the mouse CNS : Differential anatomical and biochemical compartmentalization. *Neuroscience*, 153(2), 483-491. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.01.058>

R

Rajaram, H., Chaurasia, A. K., & Apte, S. K. (2014). Cyanobacterial heat-shock response : Role and regulation of molecular chaperones. *Microbiology*, 160(4), 647-658. <https://doi.org/10.1099/mic.0.073478-0>

Rajasekharan, S. K., & Shemesh, M. (2022). Spatiotemporal bio-shielding of bacteria through consolidated geometrical structuring. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 8(1), 37. <https://doi.org/10.1038/s41522-022-00302-2>

Rankine, B. C., & Pocock, K. F. (1969). Influence of yeast strain on binding of sulphur dioxide in wines, and on its formation during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 20(2), 104-109. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740200210>

Reinle, K., Mogk, A., & Bukau, B. (2022). The diverse functions of small heat shock proteins in the proteostasis network. *Journal of Molecular Biology*, 434(1), 167157. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167157>

Reissmann, S. (2023). Mechanism of Action of Group II Chaperonins.

Rocchetti, M. T., Bellanger, T., Trecca, M. I., Weidmann, S., Scrima, R., Spano, G., Russo, P., Capozzi, V., & Fiocco, D. (2023). Molecular chaperone function of three small heat-

shock proteins from a model probiotic species. *Cell Stress and Chaperones*, 28(1), 79-89. <https://doi.org/10.1007/s12192-022-01309-6>

Rodriguez Ospina, S., Blazier, D., Criado-Marrero, M., Gould, L., Gebru, N., Beaulieu-Abdelahad, D., Wang, X., Remily-Wood, E., Chaput, D., Stevens, S., Jr., Uversky, V., Bickford, P., Dickey, C., & Blair, L. (2022). Small heat shock protein 22 improves cognition and learning in the tauopathic brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 851. <https://doi.org/10.3390/ijms23020851>

Roullier-Gall, C., Hemmler, D., Gonsior, M., Li, Y., Nikolantonaki, M., Aron, A., Coelho, C., Gougeon, R. D., & Schmitt-Kopplin, P. (2017). Sulfites and the wine metabolome. *Food Chemistry*, 237, 106-113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.039>

Roy, S. K., Hiyama, T., & Nakamoto, H. (1999). Purification and characterization of the 16-kDa heat-shock-responsive protein from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*, which is an alpha-crystallin-related, small heat shock protein. *European Journal of Biochemistry*, 262(2), 406–416. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00380.x>

Russell, N. J. (1989). Functions of lipids : Structural roles and membrane functions. *Microbial lipids*, 2, 279-365.

S

Saji, H., Iizuka, R., Yoshida, T., Abe, T., Kidokoro, S., Ishii, N., & Yohda, M. (2008). Role of the IXI/V motif in oligomer assembly and function of StHsp14.0, a small heat shock protein from the acidothermophilic archaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 71(2), 771–782. <https://doi.org/10.1002/prot.21762>

Salema, M., Capucho, I., Poolman, B., San Romão, M., & Dias, M. C. (1996). *In vitro* reassembly of the malolactic fermentation pathway of *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*). *Journal of Bacteriology*, 178(18), 5537-5539. <https://doi.org/10.1128/JB.178.18.5537-5539.1996>

- Santhanagopalan, I., Degiacomi, M. T., Shepherd, D. A., Hochberg, G. K. A., Benesch, J. L. P., & Vierling, E. (2018). It takes a dimer to tango: Oligomeric small heat shock proteins dissociate to capture substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 293(51), 19511–19521. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra118.005421>
- Sarkar, D., Bali, R., & Sharma, T. (2018). Analyzing Wine Types and Quality. In D. Sarkar, R. Bali, & T. Sharma (Éds.), *Practical machine learning with python : a problem-solver's guide to building real-world intelligent systems* (p. 407-446). Apress. https://doi.org/10.1007/978-1-4842-3207-1_9
- Sauer, R. T., Bolon, D. N., Burton, B. M., Burton, R. E., Flynn, J. M., Grant, R. A., Hersch, G. L., Joshi, S. A., Kenniston, J. A., Levchenko, I., Neher, S. B., Oakes, E. S. C., Siddiqui, S. M., Wah, D. A., & Baker, T. A. (2004). Sculpting the proteome with AAA+ proteases and disassembly machines. *Cell*, 119(1), 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.020>
- Schimz, K.-L., & Holzer, H. (1979). Rapid decrease of ATP content in intact cells of *Saccharomyces cerevisiae* after incubation with low concentrations of sulfite. *Archives of Microbiology*, 121(3), 225-229. <https://doi.org/10.1007/BF00425059>
- Schooling, S. R., & Beveridge, T. J. (2006). Membrane Vesicles : An overlooked component of the matrices of biofilms. *Journal of Bacteriology*, 188(16), 5945-5957. <https://doi.org/10.1128/JB.00257-06>
- Schopf, J. W. (2006). Fossil evidence of archaean life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1470), 869–885. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1834>
- Schröder, H., Langer, T., Hartl, F. U., & Bukau, B. (1993). DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *The EMBO Journal*, 12(11), 4137-4144. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06097.x>
- Schulz, G. E., & Schirmer, R. H. (2013). *Principles of Protein Structure*. Springer Science & Business Media.
- Shatov, V. M., Sluchanko, N. N., & Gusev, N. B. (2021). Replacement of Arg in the conserved N-terminal RLFDQxFG motif affects physico-chemical properties and chaperone-like

- activity of human small heat shock protein HspB8 (Hsp22). *PloS One*, 16(6), e0253432. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253432>
- Shatov, V., Weeks, S., Strelkov, S., & Gusev, N. (2018). The role of the arginine in the conserved n-terminal domain RLFDQXFG motif of human small heat shock proteins hspb1, hspb4, hspb5, hspb6, and hspb8. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 2112. <https://doi.org/10.3390/ijms19072112>
- Shaw, N. (1974). Lipid composition as a guide to the classification of bacteria. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 17, p. 63-108). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70555-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70555-0)
- Shinitzky, M., & Barenholz, Y. (1978). Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 515(4), 367-394. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(78\)90010-2](https://doi.org/10.1016/0304-4157(78)90010-2)
- Siddique, M., Gernhard, S., von Koskull-Döring, P., Vierling, E., & Scharf, K.-D. (2008). The plant sHSP superfamily: Five new members in *Arabidopsis thaliana* with unexpected properties. *Cell Stress and Chaperones*, 13(2), 183–197. <https://doi.org/10.1007/s12192-008-0032-6>
- Singh, K., Groth-Vasselli, B., Kumosinski, T. F., & Farnsworth, P. N. (1995). α -Crystallin quaternary structure: Molecular basis for its chaperone activity. *FEBS Letters*, 372(2-3), 283-287. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00980-N](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00980-N)
- Sotomayor-Vivas, C., Hernández-Lemus, E., & Dorantes-Gilardi, R. (2022). Linking protein structural and functional change to mutation using amino acid networks. *PLOS ONE*, 17(1), e0261829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261829>
- Spano, G., & Massa, S. (2006). Environmental stress response in wine Lactic Acid Bacteria : Beyond *Bacillus subtilis*. *Critical Reviews in Microbiology*, 32(2), 77-86. <https://doi.org/10.1080/10408410600709800>
- Srinivas, V., Raman, B., Rao, K. S., Ramakrishna, T., & Rao, C. M. (2003). Structural perturbation and enhancement of the chaperone-like activity of α -crystallin by arginine hydrochloride. *Protein Science*, 12(6), 1262-1270. <https://doi.org/10.1110/ps.0302003>
- Steinbrecher, T., Prock, S., Reichert, J., Wadhvani, P., Zimpfer, B., Bürck, J., Berditsch, M., Elstner, M., & Ulrich, A. S. (2012). Peptide-lipid interactions of the stress-response

- peptide TisB that induces bacterial persistence. *Biophysical Journal*, 103(7), 1460-1469. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.07.060>
- Strahl, H., & Errington, J. (2017). Bacterial membranes : structure, domains, and function. *Annual Review of Microbiology*, 71(1), 519-538. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095630>
- Studer, S., Obrist, M., Lentze, N., & Narberhaus, F. (2002). A critical motif for oligomerization and chaperone activity of bacterial α -heat shock proteins. *European Journal of Biochemistry*, 269(14), 3578–3586. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03049.x>
- Sudnitsyna, M., V. Mymrikov, E., S. Seit-Nebi, A., & B. Gusev, N. (2012). The role of intrinsically disordered regions in the structure and functioning of small heat shock proteins. *Current Protein & Peptide Science*, 13(1), 76–85. <https://doi.org/10.2174/138920312799277875>
- Sun, W., Van Montagu, M., & Verbruggen, N. (2002). Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1577(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(02\)00417-7](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(02)00417-7)
- Sun, Y., & MacRae, T. (2005). Small heat shock proteins : Molecular structure and chaperone function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(21), 2460-2476. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5190-4>
- Sund, H., & Weber, K. (1966). The quaternary structure of proteins. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 5(2), 231-245. <https://doi.org/10.1002/anie.196602311>
- Swan, T. M., & Watson, K. (1997). Membrane fatty acid composition and membrane fluidity as parameters of stress tolerance in yeast. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(1), 70-77. <https://doi.org/10.1139/m97-010>

T

- Tang, Y.-C., Chang, H.-C., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2007). SnapShot: Molecular chaperones, part II. *Cell*, 128(2), 412.e1-412.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.013>
- Tedesco, B., Cristofani, R., Ferrari, V., Cozzi, M., Rusmini, P., Casarotto, E., Chierichetti, M., Mina, F., Galbiati, M., Piccolella, M., Crippa, V., & Poletti, A. (2022). Insights on Human Small Heat Shock Proteins and their alterations in diseases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 842149. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.842149>
- Teixeira, H., Goncalves, M. G., Rozes, N., Ramos, A., & San Romao, M. (2002). Lactobacillic acid accumulation in the plasma membrane of *Oenococcus oeni* : A response to ethanol stress? *Microbial Ecology*, 43(1), 146-153. <https://doi.org/10.1007/s00248-001-0036-6>
- Tian, X., Zhao, L., Song, X., Yan, Y., Liu, N., Li, T., Yan, B., & Liu, B. (2016). HSP27 inhibits homocysteine-induced endothelial apoptosis by modulation of ROS production and mitochondrial caspase-dependent apoptotic pathway. *BioMed Research International*, 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/4847874>
- Tikhomirova, T. S., Selivanova, O. M., & Galzitskaya, O. V. (2017). α -Crystallins are small heat shock proteins: Functional and structural properties. *Biochemistry (Moscow)*, 82(2), 106–121. <https://doi.org/10.1134/s0006297917020031>
- Tjondro, H. C., Xi, Y.-B., Chen, X.-J., Su, J.-T., & Yan, Y.-B. (2016). Membrane insertion of α A-crystallin is oligomer-size dependent. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 473(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.033>
- To, T. M. H., Grandvalet, C., & Tourdot-Maréchal, R. (2011). Cyclopropanation of membrane unsaturated fatty acids is not essential to the acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3327-3334. <https://doi.org/10.1128/AEM.02518-10>
- Tofalo, R., Battistelli, N., Perpetuini, G., Valbonetti, L., Rossetti, A. P., Perla, C., Zulli, C., & Arfelli, G. (2021). *Oenococcus oeni* lifestyle modulates wine volatilome and

malolactic fermentation outcome. *Frontiers in Microbiology*, 12, 736789.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.736789>

Török, Z., Goloubinoff, P., Horváth, I., Tsvetkova, N. M., Glatz, A., Balogh, G., Varvasovszki, V., Los, Dmitry. A., Vierling, E., Crowe, J. H., & Vigh, L. (2001). Synchocystis HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(6), 3098-3103.
<https://doi.org/10.1073/pnas.051619498>

Török, Z., Horvath, I., Goloubinoff, P., Kovács, E., Glatz, A., Balogh, G., & Vigh, L. (1997). Evidence for a lipochaperonin: Association of active protein folding GroESL oligomers with lipids can stabilize membranes under heat shock conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(6), 2192-2197.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2192>

Tóth, M. E., Sántha, M., Penke, B., & Vigh, L. (2015). How to stabilize both the proteins and the membranes: diverse effects of sHSPs in neuroprotection. In *Heat Shock Proteins* (pp. 527–562). Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-16077-1_23

Tourdot-Maréchal, R., Cavin, J.-F., Drici-Cachon, Z., & Diviès, C. (1993). Transport of malic acid in *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation: A model to evaluate the kinetic parameters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39(4), 499-505. <https://doi.org/10.1007/BF00205040>

Tourdot-Maréchal, R., Gaboriau, D., Beney, L., & Diviès, C. (2000). Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3), 269-273. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00202-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00202-6)

Toyofuku, M., Tashiro, Y., Yusuke, H., Kurosawa, M., & Nomura, N. (2015). Bacterial membrane vesicles, an overlooked environmental colloid: Biology, environmental perspectives and applications. *Advances in colloid and interface science*, 226. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.08.013>

Tremblay, Y. D. N., Hathroubi, S., & Jacques, M. (2014). Les biofilms bactériens: Leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78(2), 110-116.

- Tsai, Y.-L., Chiang, Y.-R., Narberhaus, F., Baron, C., & Lai, E.-M. (2010). The Small Heat-shock Protein HspL Is a VirB8 chaperone promoting Type IV secretion-mediated DNA transfer. *Journal of Biological Chemistry*, 285(26), 19757-19766. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.110296>
- Tsvetkova, N. M., Horvath, I., Torok, Z., Wolkers, W. F., Balogi, Z., Shigapova, N., Crowe, L. M., Tablin, F., Vierling, E., Crowe, J. H., & Vigh, L. (2002). Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13504-13509. <https://doi.org/10.1073/pnas.192468399>
- Tyedmers, J., Mogk, A., & Bukau, B. (2010). Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(11), 777-788. <https://doi.org/10.1038/nrm2993>

V

- V. Sudnitsyna, M., V. Mymrikov, E., S. Seit-Nebi, A., & B. Gusev, N. (2012). The role of intrinsically disordered regions in the structure and functioning of small heat shock proteins. *Current Protein & Peptide Science*, 13(1), 76-85. <https://doi.org/10.2174/138920312799277875>
- Van De Weert, M., Haris, P. I., Hennink, W. E., & Crommelin, D. J. A. (2001). Fourier transform infrared spectrometric analysis of protein conformation : effect of sampling method and stress factors. *Analytical Biochemistry*, 297(2), 160-169. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5337>
- Van Houdt, R., & Michiels, C. W. (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*, 156(5-6), 626-633. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.02.005>
- van Montfort, R. L. M., Basha, E., Friedrich, K. L., Slingsby, C., & Vierling, E. (2001). Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nature Structural Biology*, 8(12), 1025-1030. <https://doi.org/10.1038/nsb722>
- Veinger, L., Diamant, S., Buchner, J., & Goloubinoff, P. (1998). The Small Heat-shock Protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent

refolding by a multichaperone network. *Journal of Biological Chemistry*, 273(18), 11032–11037. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.18.11032>

Vial, G., Chauvin, M.-A., Bendridi, N., Durand, A., Meugnier, E., Madec, A.-M., Bernoud-Hubac, N., Pais De Barros, J.-P., Fontaine, É., Acquaviva, C., Hallakou-Bozec, S., Bolze, S., Vidal, H., & Rieusset, J. (2015). Imeglimin normalizes glucose tolerance and insulin sensitivity and improves mitochondrial function in liver of a High-Fat, High-Sucrose Diet Mice Model. *Diabetes*, 64(6), 2254-2264. <https://doi.org/10.2337/db14-1220>

Vicente, J., Baran, Y., Navascués, E., Santos, A., Calderón, F., Marquina, D., Rauhut, D., & Benito, S. (2022). Biological management of acidity in wine industry : A review. *International Journal of Food Microbiology*, 375, 109726. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109726>

Vigh, L., Horváth, I., Maresca, B., & Harwood, J. L. (2007). Can the stress protein response be controlled by ‘membrane-lipid therapy’? *Trends in Biochemical Sciences*, 32(8), 357-363. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.06.009>

Vilela-Moura, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., Silva, R. D., Chaves, S. R., Sousa, M. J., & Côrte-Real, M. (2011). The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine quality : Reduction of volatile acidity of grape musts and wines. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(2), 271-280. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2898-3>

Vincent, M. S., & Ezraty, B. (2023). Methionine oxidation in bacteria : A reversible post-translational modification. *Molecular Microbiology*, 119(2), 143-150. <https://doi.org/10.1111/mmi.15000>

Voet, D., & Voet, J. G. (2016). *Biochimie* (3e éd). De Boeck supérieur.

Vogel, C., Bashton, M., Kerrison, N. D., Chothia, C., & Teichmann, S. A. (2004). Structure, function and evolution of multidomain proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 14(2), 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.03.011>

Volkenstein, M. V. (1965). Coding of polar and non-polar amino-acids. *Nature*, 207(4994), Article 4994. <https://doi.org/10.1038/207294a0>

W

- W. Jaworek, M., Möbitz, S., Gao, M., & Winter, R. (2020). Stability of the chaperonin system GroEL–GroES under extreme environmental conditions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22(6), 3734-3743. <https://doi.org/10.1039/C9CP06468K>
- Waeytens, J., Turbant, F., Arluison, V., Raussens, V., & Wien, F. (2022). Analysis of bacterial amyloid interaction with lipidic membrane by orientated circular dichroism and infrared spectroscopies. *Bacterial Amyloids* (Vol. 2538, p. 217-234). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2529-3_15
- Wang, K., Spector, A. (1995). Alpha-crystallin can act as a chaperone under conditions of oxidative stress. *Investigative ophthalmology & visual science*, 36(2), 311–321.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL : Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(Web Server issue), W296-W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Waters, E. R., & Vierling, E. (2020). Plant small heat shock proteins – evolutionary and functional diversity. *New Phytologist*, 227(1), 24–37. <https://doi.org/10.1111/nph.16536>
- Webster, J. M., Darling, A. L., Uversky, V. N., & Blair, L. J. (2019). Small Heat Shock Proteins, Big impact on protein aggregation in neurodegenerative disease. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1047. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01047>
- Weeks, S. D., Baranova, E. V., Heirbaut, M., Beelen, S., Shkumatov, A. V., Gusev, N. B., & Strelkov, S. V. (2014). Molecular structure and dynamics of the dimeric human small heat shock protein HSPB6. *Journal of structural biology*, 185(3), 342–354. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.12.009>
- Weidmann, S., Maitre, M., Laurent, J., Coucheney, F., Rieu, A., & Guzzo, J. (2017). Production of the small heat shock protein Lo18 from *Oenococcus oeni* in *Lactococcus lactis* improves its stress tolerance. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 18-23. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.005>

- Weidmann, S., Rieu, A., Rega, M., Coucheney, F., & Guzzo, J. (2010). Distinct amino acids of the *Oenococcus oeni* small heat shock protein Lo18 are essential for damaged protein protection and membrane stabilization : Protein protection and membrane stabilization by smHsp Lo18. *FEMS Microbiology Letters*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01999.x>
- Wen-ying, Z., & Zhen-kui, K. (2013). Advanced progress on adaptive stress response of *Oenococcus oeni*. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, 20(1), 91-96. [https://doi.org/10.1016/S1006-8104\(13\)60015-X](https://doi.org/10.1016/S1006-8104(13)60015-X)
- Wirth. (2003). Les protéines de choc thermique (heat shock proteins-Hsps). II. Hsp70 : biomarqueur et acteur du stress cellulaire. *Facmv.Ulg.Ac.Be. Annales02/2003*. http://www.facmv.ulg.ac.be/amv/articles/2003_147_2_05.pdf
- Wu, C.-C., Naveen, V., Chien, C.-H., Chang, Y.-W., & Hsiao, C.-D. (2012). Crystal Structure of DnaK Protein Complexed with Nucleotide Exchange Factor GrpE in DnaK Chaperone System. *Journal of Biological Chemistry*, 287(25), 21461-21470. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.344358>

Y

- Yang, K., Liu, M., Wang, J., Hassan, H., Zhang, J., Qi, Y., Wei, X., Fan, M., & Zhang, G. (2018). Surface characteristics and proteomic analysis insights on the response of *Oenococcus oeni* SD-2a to freeze-drying stress. *Food Chemistry*, 264, 377-385. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.137>
- Yeh, C.-H., Chang, P.-F. L., Yeh, K.-W., Lin, W.-C., Chen, Y.-M., & Lin, C.-Y. (1997). Expression of a gene encoding a 16.9-kDa heat-shock protein, Oshsp16.9, in *Escherichia coli* enhances thermotolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(20), 10967-10972. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.10967>
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., & He, J. (2019). Biofilms : The Microbial “Protective Clothing” in extreme environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), 3423. <https://doi.org/10.3390/ijms20143423>

Yu, X., Wang, C., & Li, Y. (2006). Classification of protein quaternary structure by functional domain composition. *BMC Bioinformatics*, 7, 187. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-187>

Yuan, C.-X., Czarnecka-Verner, E., & Gurley, W. B. (1997). Expression of human heat shock transcription factors 1 and 2 in HeLa cells and yeast. *Cell Stress & Chaperones*, 2(4), 263. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(1997\)002<0263:eohhst>2.3.co;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(1997)002<0263:eohhst>2.3.co;2)

Z

Zanirati, D. F., Abatemarco, M., Sandes, S. H. D. C., Nicoli, J. R., Nunes, Á. C., & Neumann, E. (2015). Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe*, 32, 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.12.007>

Zara, S., Antonio Farris, G., Budroni, M., & Bakalinsky, A. T. (2002). HSP12 is essential for biofilm formation by a Sardinian wine strain of *S. cerevisiae*. *Yeast*, 19(3), 269-276. <https://doi.org/10.1002/yea.831>

Zeng, L., Tan, J., Lu, T., Lei, Q., Chen, C., & Hu, Z. (2015). Small heat shock proteins and the endoplasmic reticulum: Potential attractive therapeutic targets? *Current Molecular Medicine*, 15(1), 38–46. <https://doi.org/10.2174/1566524015666150114111745>

Zhang, H., Fu, X., Jiao, W., Zhang, X., Liu, C., & Chang, Z. (2005). The association of small heat shock protein Hsp16.3 with the plasma membrane of *Mycobacterium tuberculosis*: Dissociation of oligomers is a prerequisite. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330(4), 1055–1061. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.092>

Zhang, X.-S., García-Contreras, R., & Wood, T. K. (2007). YcfR (BhsA) Influences *Escherichia coli* Biofilm Formation through Stress Response and Surface Hydrophobicity. *Journal of Bacteriology*, 189(8), 3051-3062. <https://doi.org/10.1128/JB.01832-06>

Zhang, Y.-M., & Rock, C. O. (2016). Chapter 3—Fatty Acid and Phospholipid Biosynthesis in Prokaryotes. In N. D. Ridgway & R. S. McLeod (Éds.), *Biochemistry of Lipids*,

Lipoproteins and Membranes (Sixth Edition) (p. 73-112). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63438-2.00003-1>

Zhou, H.-X., & Pang, X. (2018). Electrostatic interactions in protein structure, Folding, Binding, and Condensation. *Chemical Reviews*, 118(4), 1691-1741.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00305>

Zhu, L., & Qian, Q. (2020). Gain-of-function mutations : Key tools for modifying or designing novel proteins in plant molecular engineering. *Journal of Experimental Botany*, 71(4), 1203-1205. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz519>

Zhukovsky, M. A., Filograna, A., Luini, A., Corda, D., & Valente, C. (2019). Phosphatidic acid in membrane rearrangements. *FEBS Letters*, 593(17), 2428-2451.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.13563>

Żwirowski, S., Kłosowska, A., Obuchowski, I., Nillegoda, N. B., Piróg, A., Ziętkiewicz, S., Bukau, B., Mogk, A., & Liberek, K. (2017). Hsp70 displaces small heat shock proteins from aggregates to initiate protein refolding. *The EMBO Journal*, 36(6), 783–796.
<https://doi.org/10.15252/emj.201593378>

VII. ANNEXES

Titre: Molecular chaperone function of three small heat-shock proteins from a model probiotic species.

Auteurs : Maria Teresa Rocchetti ¹, Tiffany Bellanger ², Maria Incoronata Trecca ¹, Stephanie Weidmann ², Rosella Scrima ¹, Giuseppe Spano ³, Pasquale Russo ^{3 4}, Vittorio Capozzi ⁵, Daniela Fiocco ⁶

- ¹ Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Foggia, Via Pinto 1, 71122, Foggia, Italy.
- ² Univ. Bourgogne, Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, Dijon, France.
- ³ Department of Agriculture Food Natural Science Engineering (DAFNE), University of Foggia, Via Napoli 25, 71122, Foggia, Italy.
- ⁴ Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences, University of Milan, Via Luigi Mangiagalli 25, 20133, Milano, Italy.
- ⁵ Institute of Sciences of Food Production, National Research Council (CNR) of Italy, C/O CS-DAT, Via Michele Protano, 71122, Foggia, Italy.
- ⁶ Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Foggia, Via Pinto 1, 71122, Foggia, Italy. daniela.fiocco@unifg.it.

Keywords: Protein aggregation · Heat stress · Holdase · Lipochaperone · Membrane fluidity · sHSP

Publié à Cell Stress and Chaperones (IF :3.82)

Autorisation des principaux éditeurs de réutiliser le contenu.



Molecular chaperone function of three small heat-shock proteins from a model probiotic species

Maria Teresa Rocchetti¹ · Tiffany Bellanger² · Maria Incoronata Trecca¹ · Stephanie Weidmann² · Rosella Scrima¹ · Giuseppe Spano³ · Pasquale Russo^{3,4} · Vittorio Capozzi⁵ · Daniela Fiocco¹

Received: 17 September 2022 / Revised: 5 October 2022 / Accepted: 31 October 2022 / Published online: 22 November 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

Small heat-shock proteins (sHSP) are ubiquitous ATP-independent chaperones that prevent irreversible aggregation of heat-damaged denaturing proteins. *Lactiplantibacillus plantarum* is a widespread Gram-positive bacterium with probiotic claims and vast potential for agro-food, biotechnological and biomedical applications. *L. plantarum* possesses a family of three sHSP, which were previously demonstrated to be involved in its stress tolerance mechanisms. Here, the three *L. plantarum* sHSP were heterologously expressed, purified and shown to have a chaperone activity in vitro, measuring their capacity to suppress protein aggregation, as assayed spectrophotometrically by light scattering. Their anti-aggregative capacity was found to be differently influenced by pH. Differences were also found relative to their holdase function and their capacity to modulate liposome membrane fluidity, suggesting interplays between them and indicating diversified activities. This is the first study assessing the chaperone action of sHSP from a probiotic model. The different roles of the three sHSP can increase *L. plantarum*'s capabilities to survive the various types of stress characterising the diverse habitats of this highly adaptable species. Reported evidence supports the interest in *L. plantarum* as one of the model species for bacteria that have three different sHSP-encoding genes in their genomes.

Keywords Protein aggregation · Heat stress · Holdase · Lipochaperone · Membrane fluidity · sHSP

Introduction

Small heat-shock proteins (sHSP) are ATP-independent molecular chaperones found in all life kingdoms (Haslbeck et al. 2019). Their structure is characterised by a low molecular

weight (12–43 kDa) and the presence of a central, highly conserved α -crystallin domain (approximately 100 amino acids long), flanked by N- and C-terminal regions with more variable sequence and length. sHSP bind denaturing proteins, thereby preventing their irreversible aggregation and maintaining them in a native-like refolding-competent state, so that, upon release, sHSP-trapped substrates can recover their native conformation thanks to the ensuing recruitment of ATP-dependent chaperones (Carra et al. 2019; Obuchowski et al. 2021; Reinle et al. 2022).

sHSP are key players in the molecular stress response: they protect cells from damage under adverse conditions, mainly thermal stress, but even support protein homeostasis under physiological conditions (Haslbeck and Vierling 2015). The chaperone properties of sHSP seem closely connected to their capacity to form oligomeric quaternary structures of different sizes that encage the unfolding substrate, shielding it from the external environment and protecting it from further aggregation/precipitation (Maitre et al. 2012, 2014; Fleckenstein et al. 2015; Żwirowski et al. 2017). This preservation of misfolded proteins from uncontrolled aggregation is described as holdase function and can be measured

✉ Daniela Fiocco
daniela.fiocco@unifg.it

¹ Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Foggia, Via Pinto 1, 71122 Foggia, Italy

² Univ. Bourgogne, Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, Dijon, France

³ Department of Agriculture Food Natural Science Engineering (DAFNE), University of Foggia, Via Napoli 25, 71122 Foggia, Italy

⁴ Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences, University of Milan, Via Luigi Mangiagalli 25, 20133 Milano, Italy

⁵ Institute of Sciences of Food Production, National Research Council (CNR) of Italy, C/O CS-DAT, Via Michele Protano, 71122 Foggia, Italy

by assessing the prevention of insoluble protein agglomerations (Mogk et al. 2019; Reinle et al. 2022).

Although the main substrates of sHSP are cytoplasmic proteins, some microbial sHSP were also found to associate with membrane lipids, thereby modulating the bilayer fluidity (Sales et al. 2000; Török et al. 2001) through a lipochaperone function. For instance, in the wine-associated lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*, a membrane-stabilising role was ascribed to the sHSP Lo18 (Maitre et al. 2014; Darsonval et al. 2016).

Lactiplantibacillus plantarum is a versatile species of lactic acid bacteria (LAB) that inhabits vegetables and human-associated niches, including fermented food, gut and vaginal mucosa (Siezen et al. 2010). *L. plantarum* strains exhibit probiotic attributes and hold great potentialities for agro-food, biotechnological and biomedical applications (Seddik et al. 2017; Rocchetti et al. 2021; Zhang et al. 2022). In particular, *L. plantarum* strain WCFS1 has been thoroughly studied and is considered a model for gaining insights into interactions between probiotic microorganisms and human hosts (van den Nieuwboer et al. 2016). *L. plantarum* WCFS1 genome, one of the largest among lactobacilli, harbours three diverse sHSP-encoding genes, referred to as *hsp1*, *hsp2* and *hsp3* (Kleerebezem et al. 2003; Siezen et al. 2012). In effect, bacterial genomes usually contain only one or two sHSP encoding genes; however, in about 10%, there are three sHSP genes, hence being a minority but well-represented condition, particularly prevalent in non-pathogenic species (Kriehuber et al. 2010; Haslbeck 2016).

In earlier studies, we found that the three *hsp* genes of *L. plantarum* are differently organised and transcriptionally regulated (Spano et al. 2004, 2005; Fiocco et al. 2010; Russo et al. 2012; Bove et al. 2013). Moreover, analysis of the knock-out (KO) *L. plantarum* mutants for each of the *hsp* genes suggested their diversified contribution to stress response, with HSP2 owing a house-keeping function for proteome homeostasis and possibly controlling membrane fluidity (Capozzi et al. 2011b, a), HSP3 involved in thermotolerance, HSP1 playing cryoprotective functions (Arena et al. 2019) and potentially involved in probiotic (immunomodulatory) interactions with the host (Longo et al. 2021).

In this study, we report the biochemical characterisation of *L. plantarum* WCFS1 sHSP: by cloning and heterologous expression of the three *hsp* genes, the recombinant, native forms of HSP1, HPS2 and HSP3 were obtained and assayed in vitro for molecular chaperone activity and for the ability to modulate membrane fluidity.

Material and methods

Bacterial strains and culture conditions

The bacterial strains used in this work are listed in supplementary Table S1. *Escherichia coli* strain MACH-1-T1 was

used for DNA cloning, while *E. coli* strain BL21 (DE3) was used for the expression of recombinant proteins (recombinant HSPs expression through the SUMO fusion technology). *E. coli* was grown in Luria–Bertani (LB) broth at 37 °C, with shaking. Kanamycin (50 µg mL⁻¹) was added when required. *L. plantarum* WCFS1 was grown in De Man Rogosa Sharpe (MRS, Liofilchem, Italy) broth (pH 6.2), at 30 °C, without shaking. Agar (15 g L⁻¹) was added to obtain solid media.

DNA extraction

Plasmids were isolated from *E. coli* using QIAprep spin miniprep kits (Qiagen, Hilden, Germany). *L. plantarum* genomic DNA was isolated using a microbial DNA extraction kit (Cabru, Milan, Italy), according to the manufacturer's guidelines.

Cloning, expression and purification of recombinant sHSP

The open reading frames of the genes encoding small heat-shock proteins, i.e., *hsp1*, *hsp2* and *hsp3* (locus tag lp_0129, lp_2668 and lp_3352, respectively, on the *L. plantarum* WCFS1 complete genome, NCBI BioProject: PRJNA356) were amplified from the chromosomal DNA of *L. plantarum* WCFS1 using Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), specific forward and reverse primers and the following thermal profile: 2 min at 94 °C, 35 cycles comprising 15 s at 94 °C, 30 s at 55 °C and 50 s at 68 °C, and 7 min at 68 °C. All the plasmids and oligonucleotides used in this work are listed in Table S1.

After checking specific amplification and correct amplicon size by agarose gel electrophoresis, the PCR products were T/A cloned into pET SUMO vector, using the pET SUMO Protein Expression System kit (Invitrogen, Life Technologies), according to the manufacturer's instructions, to generate pET-SUMO-HSP1, pET-SUMO-HSP2 and pET-SUMO-HSP3, respectively, which encode HSP1, HSP2 or HSP3 with an extra N-terminal polyhistidine (6xHis) tag and a SUMO fusion protein. Ligations were transformed into Mach1-T1^R chemically competent *E. coli* cells. Transformed *E. coli* colonies containing the recombinant vectors with the correct orientation were screened and selected by PCR (using T7 promoter FOR and HSP REV primers). Plasmids were purified using Qiaprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and sequenced using the Big-dye Terminator kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), with primers SUMO Forward and T7 reverse (both from Invitrogen), to check for correct cloning and absence of any mutation in the *hsp* open reading frames (ORF). Plasmids were then transformed into chemically competent *E. coli* BL21 (DE3) cells, and the expression of the

corresponding 6xHis-tagged-SUMO-HSP fusion proteins was induced by adding 1 mM isopropyl- β -D-Thiogalactoside (IPTG) to exponentially growing cultures of *E. coli* in LB medium containing 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of kanamycin. The expression of recombinant fusion 6xHis-SUMO-HSP proteins was checked through sodium-dodecyl-sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The recombinant fusion sHSP were purified by affinity chromatography, under native conditions, using the Ni–NTA agarose purification system (Novex, Life Technologies), following the manufacturer’s instructions. After dialysis, 6xHis-tagged recombinant fusion sHSP were digested with SUMO-protease (Invitrogen by Life Technologies), in order to remove the N-terminal peptide containing the 6xHis- and SUMO-tag, therefore generating native sHSP (i.e., without any additional amino acids between the SUMO protease cleavage site and the start of sHSP). Undigested recombinant fusion sHSP, 6xHis-SUMO-tag peptides and SUMO protease were removed from the cleavage reaction by affinity chromatography on HisPur™ Ni–NTA Resin (Thermo Fisher Scientific) by batch method. Purified native sHSP were dialysed against 50 mM sodium phosphate (NaP) buffer at pH 7.0, concentrated, spectrophotometrically quantified and stored in aliquots at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Purification of sHSP was checked by SDS-PAGE, using 4–15% MP TGX Stain-Free precast polyacrylamide gel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), which was further stained with colloidal Coomassie G-250 (Bio-Rad Laboratories) in order to check the absence of any additional bands besides that of sHSP. Purified sHSPs were analysed by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF–MS, Autoflex III™, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) to evaluate their molecular weight (see supplemental information). Some biochemical features of *L. plantarum* sHSP, along with their deduced amino acid sequences, are reported as supplemental information (Table S2).

Chaperone activity assay

The molecular chaperone activity of sHSP was evaluated by their ability to protect a model protein substrate, i.e., citrate synthase (CS), from thermal aggregation. According to Buchner and Grallert (1998), pig heart CS (from Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dialysed with TE buffer (50 mM Tris–HCl, 2 mM EDTA, pH 8), then concentrated to 17 mg mL^{-1} at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and centrifuged at $14,000\times\text{rpm}$, 30 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, to remove precipitated protein-complexes. The supernatant containing undenatured CS was concentrated to 30 μM (monomer) and stored in aliquots at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Thermal aggregation of CS was monitored over time by measuring absorbance at 360 nm (A_{360}), which reflects the formation of insoluble protein aggregates, as previously described (Buchner and Grallert 1998; Maitre et al. 2012).

Briefly, CS (0.3 μM) was denatured at $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 50 mM sodium phosphate buffer at pH 5.5, 7.0 or 8.0 in the presence or absence of 0.3, 1.2, 4.8 or 9.6 μM of each sHSP, corresponding to molar ratios (sHSP:CS) of 1:1, 4:1, 16:1 and 32:1, respectively. Aggregation of CS was measured in a quartz cuvette by an Agilent Cary 3500 UV–Vis spectrophotometer equipped with thermostated cell holder and stirrer. The measurements were performed over a 20 min period, recording A_{360} at 0.1 s intervals. Experiments were performed in triplicate. Lysozyme (Sigma–Aldrich), which shares a similar molecular mass with sHSP, was used as a negative control protein, i.e., devoid of any known molecular chaperone activity.

Holdase activity

Solubility determination was assessed as previously described (Fleckenstein et al. 2015). Briefly, 10 μg of CS in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 were incubated for 1 h at $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the presence or absence of HSP1, HSP2 or HSP3 or with a mixture of the three sHSP, at a molar ratio of 16:1 (sHSP:CS). Samples were centrifuged at $20,800\times\text{g}$ for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ to separate the soluble fraction from the pellet (i.e., containing aggregated proteins). Proteins in the soluble fraction were precipitated by cold acetone (10 min on ice) and centrifuged at $14,000\times\text{rpm}$, 30 min at $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. The precipitated proteins and the pellet were solubilised by the Laemmli buffer (Bio-rad) and resolved on a hand-casting 12% TGX Stain-Free polyacrylamide gel (Bio-rad), further stained with colloidal Coomassie G-250. Gel images were acquired by Gel Doc instrument (Bio-rad) and quantified by Image software. Ten μg of CS (0.3 μM in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0), processed as all holdase assay samples, were used as control.

Liposomes preparation and membrane fluidity measurements

Liposomes were prepared with total lipids from 30 absorbance units of *L. plantarum* cells harvested in exponential-phase ($OD_{600}=0.7\text{--}0.8$) during growth in optimal culture conditions. Lipid extraction and liposome preparation were carried out as described by Maitre et al. (2012) with slight modifications. Briefly, after lipid extraction, according to Bligh and Dyer (1959), a film was obtained by evaporation of chloroform using a nitrogen flux. Then, a pre-warmed 50 mM phosphate buffer pH 7 at $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ was added, and the sample was gently mixed, sonicated twice for 2 min (Branson Ultrasonics™ CPX-952-138R, Branson Ultrasonics, Brookfield, CT, US) and incubated for 4 h at $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. The lipid particles were then extruded through a polycarbonate membrane with 1 μm diameter pores to

obtain the liposomes. Liposomes were stored at 4 °C during a 1-week maximum.

Fluorescence anisotropy, which is inversely proportional to membrane fluidity, was measured in a quartz cuvette filled with 250 μ L of liposomes prepared as described above, containing 3 μ M of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) probe (Sigma Aldrich) and in the absence or the presence of 10 μ M of purified HSP1, HSP2 or HSP3, using a mass ratio of 1:2 (m/m) between sHSP and liposomes. Lysozyme (10 μ M) was used as a negative control. Measurements were performed for 30 min (1 determination every 10 s). After probe insertion (10 min at 10 °C), a linear gradient of temperature from 15 to 65 °C (increase of 2 °C per minute) controlled by a Peltier system (QNW TC1 temperature controller, Quantum Northwest, Liberty Lake, WA, USA) was applied to the liposome suspension. Anisotropy measurements were carried out using a Fluorolog 4 spectrofluorimeter (FLUOROLOG-4, Jobin Yvon Inc, USA), and anisotropy values were calculated according to Shinitzky and Barenholz (1978). Excitation and emission wavelengths were 360 nm and 431 nm, respectively. Each experiment was done in triplicate.

Statistics

Quantitative variables were expressed as mean \pm SD, unless otherwise indicated; their differences were tested by the non-parametric Mann–Whitney *U* test. *p* values < 0.05 were considered statistically significant. For all analyses, the Statview software package, SAS (v. 5.0), was used.

Results

Chaperone-like activity of sHSP

The disaggregase activity of sHSPs was evaluated *in vitro* by assessing their ability to protect a non-native model substrate (CS) from thermal aggregation. When heated at 45 °C, CS forms insoluble aggregates that scatter light at 360 nm (Fig. 1, solid squares). The addition of increasing amounts of purified HSP1, HSP2 or HSP3, at molar ratios of 4:1, 16:1 and 32:1 (sHSP:CS), caused a dose-dependent decline in light scattering, which can be attributed to the capacity of sHSP to prevent CS thermal-induced aggregation. In detail, upon 20 min heat exposure, at molar ratios 4:1, 16:1 and 32:1 (sHSP:CS), HSP1

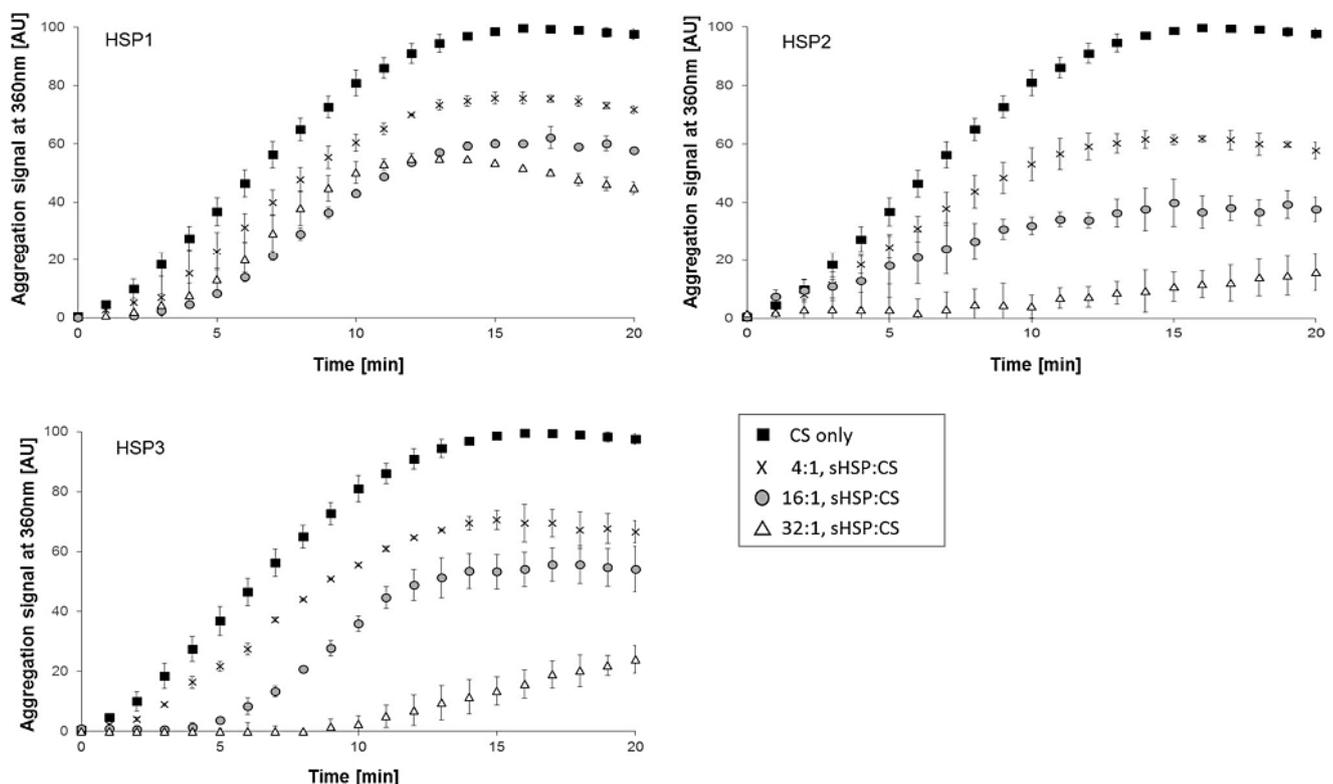


Fig. 1 Dose-dependent inhibition of citrate synthase (CS) aggregation by *L. plantarum* sHSP. CS (0.3 μ M) was incubated at 45 °C with increasing concentrations of HSP1, HSP2 or HSP3, and protein aggregation was monitored by the increase in light scattering at 360 nm. The saturation signal was normalised to 100. CS alone,

solid square; CS + 1.2 μ M sHSP (molar ratio 4:1, sHSP:CS), crosses; CS + 4.8 μ M sHSP (molar ratio 16:1), grey circles; CS + 9.6 μ M sHSP (molar ratio 32:1), open triangle. Mean and SD from at least 2 experiments

caused a drop of the aggregation signal to approximately 70%, 60% and 45%; HSP2 to about 60%, 30% and 15%; and HSP3 to approximately 65%, 55% and 25%, respectively, when compared to the control (CS only). The addition of each sHSP at a molar ratio of 1:1 relative to CS resulted in a light scattering signal mostly overlapping with that found at a 4:1 ratio (Fig. S1). The observed anti-aggregative effect was specific and depended on the presence of sHSP, as negative control solutions containing CS with a molar excess of nonchaperone control protein (i.e., lysozyme) did not result in attenuated aggregation; on the other hand, sHSP alone did not aggregate (Fig. S2).

In order to understand whether the three sHSP could cooperate to prevent thermal aggregation of proteins, aggregation assays were carried out incubating CS with a mixture of all three sHSP together, each at a concentration of 0.4 μM or 1.6 μM in order to get an overall sHSP concentration of 1.2 μM or 4.8 μM , corresponding to a molar ratio of 4:1 or 16:1 (sHSP:CS). The aggregation was inhibited but without any apparent synergistic effect (Fig. S3), as the extent of inhibition was similar to that observed for the single sHSP, when used at the same ratios (Fig. 1).

The chaperone activity of each sHSP was also examined as a function of the pH. Heat-induced aggregation assays of CS, incubated or not with a 4:1 molar excess of each sHSP, were carried out at pH values of 5.5 and 8.0 and compared with those performed at 7.0 (Fig. 2). At pH 7.0, the anti-aggregative effect of the three sHSP was similar, with HSP2 exerting a more evident anti-aggregative capacity. At acidic pH (5.5), both HSP1 and HSP2 retained activity (i.e., light scattering signal decreased by approximately 50%), while HSP3 seemed to lose its aggregation-inhibiting properties; at pH 8.0, in the presence of either HSP1 or HSP2, CS aggregation was still decelerated compared to control, though, after almost 15 min, the light scattering signal in the presence of HSP2 tended to overlap with that of CS alone; conversely, the presence of HSP3 would not protect the substrate from aggregation.

Overall, while HSP1 and HSP2 seem to function, to a different extent, in a pH range spanning from 5.5 to 8.0, HSP3 exhibits a narrower pH interval for optimal anti-aggregative activity.

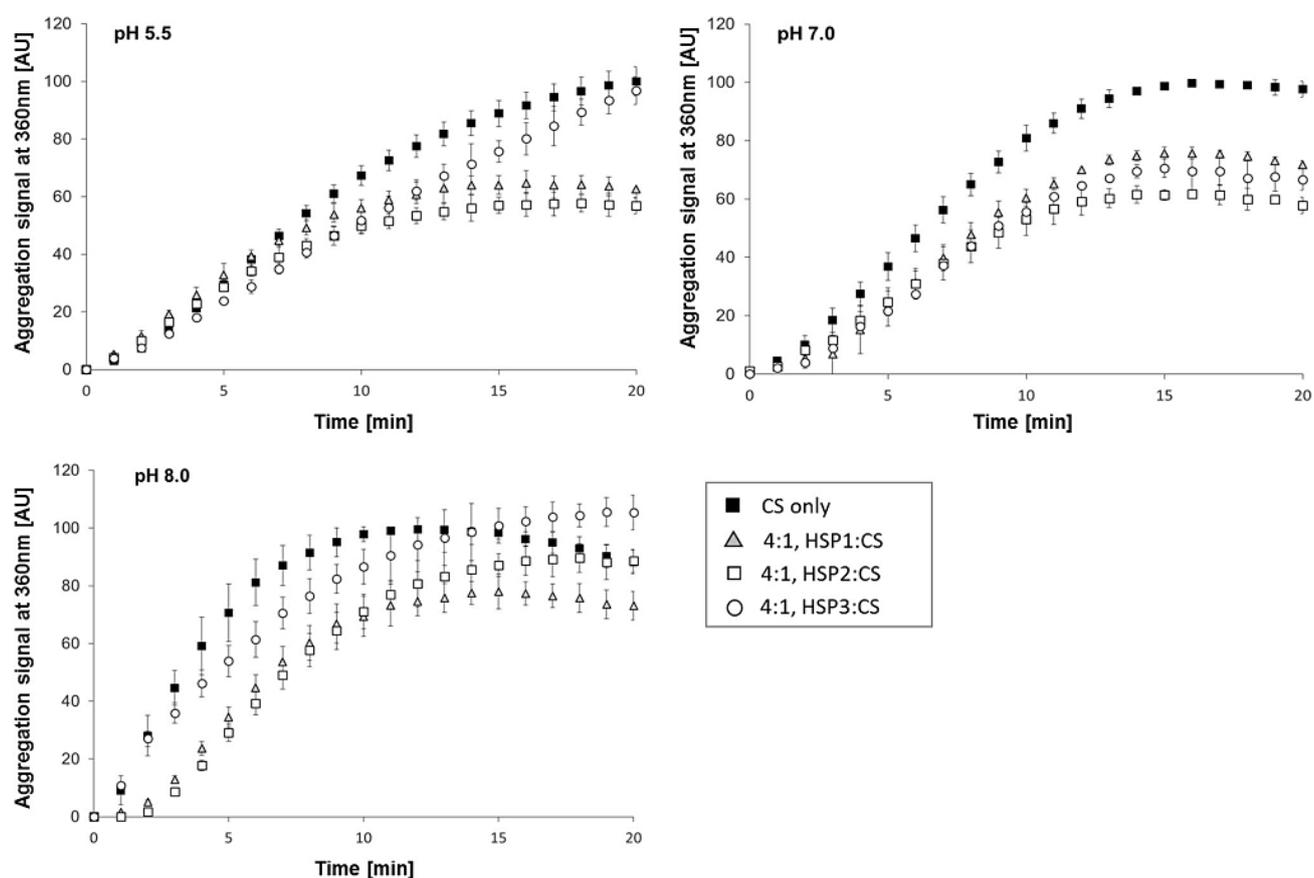


Fig. 2 The effect of pH on the chaperone activity of HSP1, HSP2 and HSP3. Thermal induced aggregation of 0.3 μM citrate synthase (CS), solid squares, was monitored in 50 mM Na-phosphate buffer at pH 5.5, pH 7.0 and pH 8.0 in the presence of 1.2 μM HSP1 (grey triangle), or HSP2 (open square), or HSP3 (open circle), (4:1 molar ratio,

sHSP:CS). The cuvette was incubated at 45 $^{\circ}\text{C}$, and the protein aggregation was monitored by detecting light scattering at 360 nm. The saturation signal was normalised to 100. Mean and SD from at least 2 experiments

Holdase function

sHSP should associate quite strongly with the unfolding substrates, holding them long enough before involving other members of the chaperone machinery. Hence, such sHSP holdase function should decrease the amount of precipitating substrate, while augmenting its soluble fraction.

In order to test the potential holdase activity of HSP1, HSP2 and HSP3, the solubility of heat-denatured model substrate CS was monitored in the presence and absence of each of the three HSP, using a molar ratio of 16:1 (sHSP:CS). Such ratio was found to markedly slow down aggregation (i.e., for all three sHSP, light scattering of CS declined by $\geq 40\%$, upon 20 min heat treatment, see above, Fig. 1), but not too much to prevent us from detecting potential differences between the sHSP in their holdase activity. With the aim to assess any cooperative effects between sHSP, the assay was also performed with a mixture of the three sHSP. After 1-h incubation at 45 °C, the amount of soluble (i.e., non-aggregated) and precipitated (i.e., aggregated) CS was determined by separation into supernatant and sediment fractions, respectively, via centrifugation and SDS-PAGE analysis (Fig. 3). Compared to control (i.e., CS alone exposed to 45 °C, lane 1, Pellet), when HSP1 was present, the pellet fraction contained a significantly decreased amount of precipitated CS; upon incubation with the mixture of three sHSP, a slightly but significantly lower level of precipitated

CS was found. On the other hand, in the presence of either HSP2 or HSP3, the amount of precipitated CS was similar to that of control. Besides, low levels of each HSP could be detected in the pellet (Fig. 3, Pellet). Conversely, there was a significant increase of CS recovered in the soluble fraction when this substrate was incubated with the mixture of all three HSPs or, to a lower extent, with HSP1; whereas the amount of soluble CS was similar to heat-exposed control in presence of HSP2 or HSP3 (Fig. 3, Supernatant). Moreover, most of the sHSP were observed in the soluble fraction, indicating that these proteins, coherently with their putative function, do not appear to be aggregated by heat.

Taken together, these findings indicate that, under the tested conditions, HSP1 can bind aggregating substrates strongly enough thus reducing, though not suppressing completely, their precipitation, whereas HSP2 and HSP3, although capable of slowing down initial aggregation (Fig. 1), cannot maintain CS in a soluble form during prolonged heat exposure. Interestingly, co-incubation with a mixture of the three HSP resulted in the highest holdase activity (i.e., highest amount of CS in the soluble fraction), suggesting that they could act synergically in keeping the substrate in solution.

Lipochaperone activity

Liposomes formed by lipids extracted from *L. plantarum* cells, collected during exponential growth, were mixed with

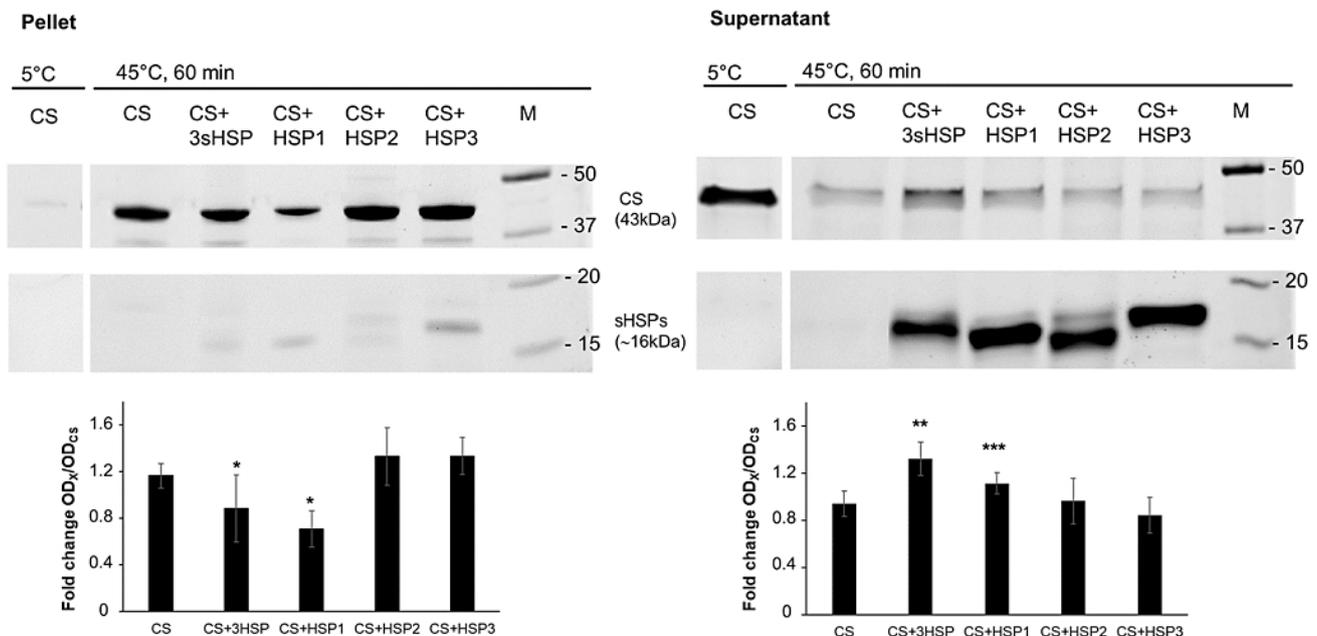


Fig. 3 Holdase activity of *L. plantarum* sHSP. The solubility of a heat destabilised (45 °C, 60 min) CS in the absence and presence of HSP1, HSP2, HSP3 or all three sHSP (molar ratio sHSP: CS=16:1) was determined by separation into supernatants and pellet fractions. Pellet (aggregated CS) was isolated from supernatants (soluble CS) by centrifugation, and both fractions were analysed by SDS-PAGE. A

representative SDS-PAGE of the analysed fractions is reported. The same amount of CS not exposed to thermal stress (5 °C) represents the negative and positive control for pellet and supernatant, respectively. M, molecular weight markers. * $p < 0.05$ vs CS, CS+HSP2, CS+HSP3; ** $p < 0.05$ vs CS, CS+HSP2, CS+HSP3; *** $p < 0.05$ vs CS+HSP3

DPH probe. Then, the variation of membrane fluidity was measured by steady-state fluorescence anisotropy of DPH during temperature ramping (15 °C to 65 °C), in the absence or presence of HSP1, HSP2 or HSP3 (Fig. 4). The gradual decrease of the anisotropy values reflected the increasing fluidisation of liposomes. Increasing the temperature up to 65 °C caused the liposomes to become more fluid, reaching 38.6% of the initial anisotropy value; similar results were obtained in presence of lysozyme, which was used as a negative control. The addition of HSP1 did not seem to have any impact on the regulation of membrane fluidity, except at low temperatures of 30 °C. A significant lipochaperone activity was observed for HSP2, which allowed to limit the fluidification of liposomes from 30 °C. At this temperature, the observed anisotropy was 85.5% of the initial value, compared to 61.2% in the absence of HSP2 ($p < 0.05$). The rigidifying effect of HSP2 continued throughout the thermal ramp allowing to reach 46.5% of initial anisotropy at 65 °C (Fig. 4). The anisotropy profile obtained for HSP3 was quite different. A

limitation of membrane fluidisation was observed at 30 °C ($p < 0.05$), but this effect did not persist during the thermal ramp, as the liposomes become more fluid from 50 °C.

Discussion

sHSP are molecular chaperones that associate with misfolded and/or unfolding proteins, preventing their uncontrolled aggregation and maintaining them in a condition that facilitates subsequent refolding or degradation by other members of the cell chaperone systems. *L. plantarum* is a widespread member of LAB, found in habitats where it is exposed to several kinds of stress. Unlike the majority of lactobacilli, possessing single sHSP, *L. plantarum* owns three different members of this chaperone family (Capozzi et al. 2011b). Such redundancy may afford a flexible response to variable environmental conditions, thus contributing to the high adaptability of this species (Han et al. 2008; Papadimitriou et al. 2016).

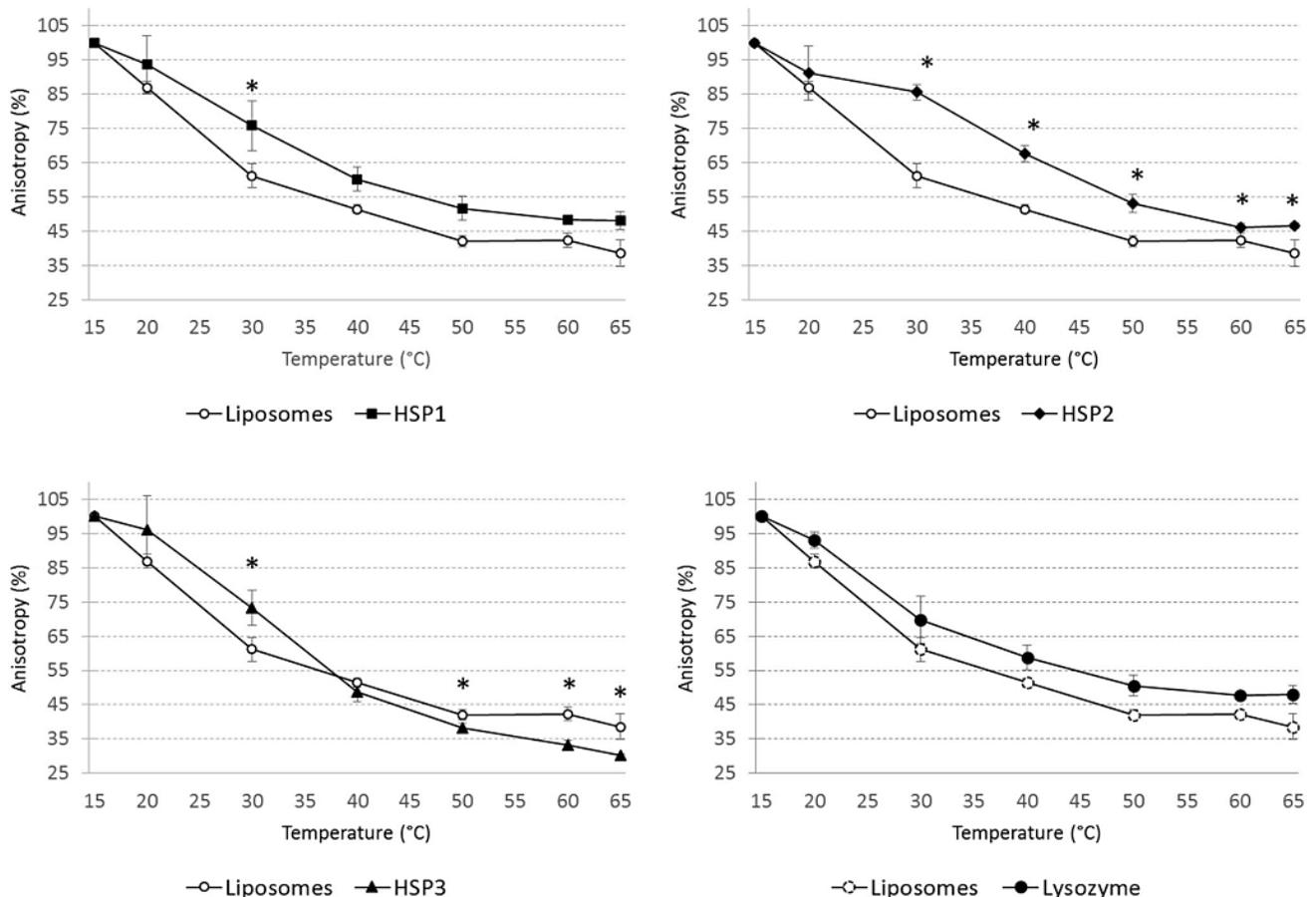


Fig. 4 The effect of HSP1, HSP2 or HSP3 on membrane fluidity of lipid vesicles derived from *L. plantarum*. Fluorescence anisotropy of DPH probe inserted into vesicles was measured according to the temperature increase, in the absence (open circle) or presence of HSP1,

HSP2 or HSP3 (solid symbols). Anisotropy was also measured in presence of lysozyme (solid circle), as a negative control. Mean and SD from at least 3 independent experiments. * $p < 0.05$, Mann–Whitney U test

Indeed, the presence of three HSP, which may have specialised for diverse functions or stress conditions, can contribute to the robustness of probiotics and biotechnologically relevant microbial species, which, for their application, undergo severe and diversified stress (Fiocco et al. 2020).

Although bacterial sHSP have been thoroughly studied (Obuchowski and Liberek 2020; Obuchowski et al. 2021), chiefly in model species such as *E. coli* (Piróg et al. 2021), only a very few works have investigated the sHSP of probiotic microorganisms (Capozzi et al. 2011b; Khaskheli et al. 2015). The involvement of *L. plantarum* sHSP in stress response strategies was demonstrated previously, mainly by expression, gene knockout (KO) and phenotypic studies (Fiocco et al. 2007; Capozzi et al. 2011a; Arena et al. 2019). In this work, by monitoring spectrophotometrically the turbidity of heat-destabilised protein solutions, we prove that all three sHSP have a chaperone role in vitro, as they could delay the thermal aggregation of a non-native substrate. Indeed, though assays based on light-scattering signal measurements are rather qualitative, they are specific for molecular chaperone activity (Buchner and Grallert 1998). The observed anti-aggregative activity was sHSP dose-dependent, thus pointing to a specific effect. In this regard, we found that, compared to HSP1, HSP2 and HSP3 were more effective in delaying aggregation. Indeed, over a 20-min heat exposure, the aggregation signal was reduced to 15% and 25% when CS was incubated with 32:1 molar excess of HSP2 and HSP3, respectively. Aggregation was highly inhibited only when *L. plantarum* sHSP concentration far exceeded that of the unfolding substrate (i.e., molar ratio of 16:1 and 32:1, sHSP:CS). This might depend on an intrinsically low activity of the purified recombinant sHSP or on the conditions used for the assays. However, it may even reflect that sHSP action relies on the formation of large assemblies that capture the denaturing proteins and physically isolate them from the external environment (Reinle et al. 2022). Therefore, numerous sHSP monomers would be required for efficient substrate trapping, and, similarly to other known sHSP, *L. plantarum* HSP2 and HSP3 could work as aggregation-preventing chaperones when present in excess. Besides, though all three HSP were previously found to be induced by heat (Spano et al. 2004, 2005; Russo et al. 2012), earlier studies indicated also that HSP1 might protect cell from freeze–thaw damage (Arena et al. 2019); therefore, its chaperone activity might have specialised rather for cold-related stress.

A pH-dependent chaperone activity has been observed earlier for sHSP, from both microbes (Maitre et al. 2012) and animals (Chernik et al. 2004; Fleckenstein et al. 2015), as pH is known to modulate their quaternary structures. Here, *L. plantarum* sHSP were found to respond differently to pH. While all three sHSP seemed to function at neutral pH (pH 7.0), only HSP1 and HSP2 were active at pH 5.5, i.e., a value which is observed in the cytoplasm of acid tolerant

lactobacilli, including *L. plantarum*, when living in acidic environment (McDonald et al. 1990; Siegumfeldt et al. 2000). Conversely, at pH 8.0, which is a value that can be reached in the cytoplasm of alkali-resistant *L. plantarum* (Sawatari and Yokota 2007), only HSP1 retained a significant anti-aggregative ability. Such diversified pH effect might underlie the protection of cellular proteins under various conditions, thus enabling the growth of *L. plantarum* over a wide pH range and confirming the broad stress tolerance of this species (Parente et al. 2010). Interestingly, previous studies demonstrated that the transcription of *hsp1* and, to a lower extent, *hsp2* was strongly induced in the acidic sectors of a system simulating the gastro-intestinal transit (Bove et al. 2013). Besides, at low pH, the growth of *L. plantarum hsp1* KO mutant strain was much slower than the *hsp3* mutant (Arena et al. 2019). Thus, our present data would corroborate further the involvement of HSP1 and HSP2 in coping with acid stress, highlighting a differentiation in the role of the three sHSP in stress response.

sHSP work within a protein quality control network comprising holdases, foldases, unfoldases, disaggregases and proteases, which cooperate for the cellular proteostasis (Reinle et al. 2022). In this system, sHSP act first, by sequestering denaturing substrates. sHSP should form a stable complex with the denaturing client, until this can be either delivered to other chaperones of the system or targeted to degradation. When we tested the three sHSP for this holdase capacity, overall, we found a poor such ability. Only HSP1 and the mixture of all three sHSP contrasted CS precipitation. Indeed, though HSP2 and HSP3 could clearly delay CS aggregation, during early heat exposure, they did not seem capable of forming stable enough assemblies with it. HSP2 and HSP3 might have substrate preferences (Basha et al. 2004), or, simply, they do not work as holdases under the tested conditions. It is also possible that their physiological role in the cell does not imply the capacity to bind tightly to the denaturing substrate, which could be played by HSP1 only and/or by other chaperones. Some sHSP bind their clients stably, storing them for the disaggregating machineries, while others can associate only transiently with the substrate (de Miguel et al. 2009). Both sHSP types contribute to protein homeostasis and enhance bacterial cell survival under stress (Obuchowski et al. 2021). There are other examples of earlier investigated sHSP that are not effective in protecting heat-damaged substrates from insolubilisation (Basha et al. 2010; Obuchowski et al. 2019). Perhaps, in *L. plantarum*, a stable complex with unfolding substrates may require other partner proteins or more HSP types. Divergent functions, as well as functional cooperations, have been attributed to the sHSP from organisms possessing multiple members for this class of chaperones (de Miguel et al. 2009; Basha et al. 2010; Bepperling et al. 2012). Indeed, while most bacteria have a single sHSP, *E. coli* and other *Enterobacteriaceae* own two different sHSP, i.e., IbpA and IbpB, that have specialised towards different roles: the former acts as an

efficient holdase, while the latter is a weak substrate-binder, but promotes the dissociation of assemblies, enhancing subsequent refolding of client substrates (Matuszewska et al. 2005; Ratajczak et al. 2009; Obuchowski et al. 2019). Very recently, Piróg et al. (2021) demonstrated that IbpA and IbpB do associate into a functional heterodimer, working as a two-protein sHSP machinery. Such cooperation might occur even for the three sHSP of *L. plantarum*. Based on our findings, it is tempting to speculate that HSP1, HSP2 and HSP3 could interplay for an efficient trapping of the substrate, possibly by forming mixed assemblies. However, this hypothesis needs further specific studies to be ascertained.

Fluorescence anisotropy measurement is a method of choice for studying changes in membrane fluidity. In the field of sHSP, few studies have focused on the regulation of membrane fluidity by these proteins, but rather on their physical interaction with the membrane. In this work, the fluidity of a model membrane reconstituted from lipids extracted from the plasma membrane of *L. plantarum* was monitored as a function of temperature variation. Thus, the potential lipochaperone activity of *L. plantarum* HSP1, HSP2 or HSP3 could be evaluated in vitro as previously described for other sHSP (Török et al. 2001; Coucheney et al. 2005; Maitre et al. 2014). Overall, at 30 °C, i.e., a physiological growth temperature for *L. plantarum*, all three sHSP determined a significantly different membrane fluidity, pointing to a potential interaction with liposomes. However, at heat stress temperature (i.e., 40–45 °C), only HSP2 would retain an anti-fluidising effect. Our results show a clear lipochaperone activity for HSP2, with a significant reduction in membrane fluidisation from 30 °C. These findings are similar to those obtained for other sHSP, which were ascribed a membrane-stabilising activity, such as Lo18 from *O. oeni*, HSP17 from *Synechocystis* or HSP16.3 from *Mycobacterium tuberculosis* (Török et al. 2001; Tsvetkova et al. 2002; Coucheney et al. 2005; Zhang et al. 2005; Chowdary et al. 2007; Balogi et al. 2008; Maitre et al. 2014). Indeed, in the presence of these proteins, an improved physical order, in model lipid membranes, is observed when environmental conditions favouring membrane fluidisation are applied (i.e., heat, ethanol, benzyl alcohol in particular) (Török et al. 2001; Maitre et al. 2014). These different works suggest that sHSP-lipid associations are partly related to the change in membrane fluidity (which is temperature dependent) and partly linked to conformational changes of sHSP induced by the increase of temperature, allowing to expose certain regions of sHSP favourable to the interaction with the membrane (Zhang et al. 2005; Chowdary et al. 2007; Balogi et al. 2008; Maitre et al. 2014). For example, the electrostatic interactions keeping the proteins properly filled can be modified upon temperature increase, generating changes in their conformation and exposing their hydrophobic regions that could interact with membranes (Tsvetkova et al. 2002; Chen et al. 2003). In the present work, no action of either sHSP was

observed at temperatures below 30 °C, thus suggesting that a protein conformational change would be necessary for their interaction with the membrane. This in vitro study confirms the membrane fluidity regulation activity previously ascribed to HSP2, as earlier shown in vivo in *L. plantarum* (Capozzi et al. 2011b, a, 2012). Our data, therefore, reinforce the hypothesis that HSP2 has an important role due to its probable interaction with the membrane, allowing it to regulate its fluidity by a still unknown mechanism.

The addition of HSP3 resulted in a similar anisotropy profile as HSP2, by showing a modulation of membrane fluidity from 30 °C. However, this effect was no longer detected at 40 °C and even seemed to be reversed at 50 °C. Thus, the particular profile observed with HSP3 requires further investigation to understand how this protein functions in relation to the membrane as a function of temperature.

In summary, the data presented in this work establish the chaperone function of *L. plantarum* HSP1, HSP2 and HSP3. Their in vitro activity was found to be different in suppressing aggregation of thermally destabilised proteins, in the influence of pH conditions, in terms of holdase capacity and in the ability to modulate membrane fluidity. The specialization of *L. plantarum* sHSP may pertain even other functional aspects (e.g., modes of activation, client selection, etc.) that deserve further investigations. Moreover, future analyses shall be undertaken to understand the mechanism by which these three sHSP stabilise protein aggregates and interact with lipid bilayer. It is interesting to underline how this study contributes to proposing *L. plantarum* as one of the model bacteria for prokaryotes harbouring in their genomes three genes coding for sHSP.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12192-022-01309-6>.

Acknowledgements The authors wish to thank Dr. Claudia Di Matteo for helping in DNA sequencing.

Author contribution D.F. and M.T.R. designed and supervised the experiments. D.F. performed molecular cloning; M.T.R. and M.I.T. performed protein purification and aggregation assays; M.T.R., T.B. and SW planned, performed and analysed lipochaperone assay; D.F. and M.T.R. prepared the manuscript; V.C., P.R., R.S. and G.S. critically revised the manuscript; and M.T.R., V.C. and G.S. acquired funding. All authors have read and agreed to the submitted version of the manuscript.

Funding Open access funding provided by Università di Foggia within the CRUI-CARE Agreement. M.T.R. is the recipient of a research contract for the project no. UNIFG171 – CUP D74I19003340002, as part of the initiative “Research for Innovation (REFIN)—POR PUGLIA FESR FSE 2014- 2020- Azione 10.4”. P. R. is the beneficiary of a grant by MIUR in the framework of “AIM: Attraction and International Mobility” (PON R&I2014-2020) (practice code D74I18000190001). Part of this research was supported with funding from the University of Foggia “Bando relativo al finanziamento dei progetti di ricerca a valere sul Fondo per i Progetti di Ricerca di Ateneo,” PRA 2020 granted to M.T.R. This work was supported by the Conseil Régional de Bourgogne Franche-Comté (grant number 2021Y-09559) and the Dimacell Platform.

Declarations

Competing interests The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Arena MP, Capozzi V, Longo A et al (2019) The phenotypic analysis of *Lactobacillus plantarum* hsp mutants reveals a potential role for hsp1 in cryotolerance. *Front Microbiol* 10:1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00838>
- Balogi Z, Cheregi O, Giese K, Juhasz K, Vierling E, Vass I, Vigh LHI (2008) A mutant small heat shock protein with increased thylakoid association provides an elevated resistance against UV-B damage in *Synechocystis* 6803. *J Biol Chem* 283:22983–22991
- Basha E, Jones C, Wysocki P, Vierling E (2010) Mechanistic differences between two conserved classes of small heat shock proteins found in the plant cytosol. *J Biol Chem* 285:11489–11497. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.074088>
- Basha E, Lee GJ, Demeler B, Vierling E (2004) Chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from wheat. *Eur J Biochem* 271:1426–1436. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04033.x>
- Bepperling A, Alte F, Kriehuber T et al (2012) Alternative bacterial two-component small heat shock protein systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:20407–20412. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209565109>
- Bligh EDW (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Bove P, Russo P, Capozzi V, Gallone A, Spano G, Fiocco D (2013) *Lactobacillus plantarum* passage through an oro-gastro-intestinal tract simulator: carrier matrix effect and transcriptional analysis of genes associated to stress and probiosis. *Microbiol Res* 168:351–359
- Buchner J, Grallert HJU (1998) Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein. *Methods Enzym* 290:323–338. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(98\)90029-5](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(98)90029-5)
- Capozzi V, Arena MP, Crisetti E, Spano GFD (2011a) The hsp 16 gene of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* is differently regulated by salt, high temperature and acidic stresses, as revealed by reverse transcription quantitative PCR (qRT-PCR) analysis. *Int J Mol Sci* 12:5390–5405. <https://doi.org/10.3390/ijms12085390>
- Capozzi V, Fiocco D, Weidmann S et al (2012) Increasing membrane protection in *Lactobacillus plantarum* cells overproducing small heat shock proteins. *Ann Microbiol* 62:517–522. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0285-7>
- Capozzi V, Weidmann S, Fiocco D et al (2011b) Inactivation of a small heat shock protein affects cell morphology and membrane fluidity in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Res Microbiol* 162:419–425. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.02.010>
- Carra S, Alberti S, Benesch JLP et al (2019) Small heat shock proteins: multifaceted proteins with important implications for life. *Cell Stress Chaperones* 24:295–308. <https://doi.org/10.1007/s12192-019-00979-z>
- Chen Y, Lu YJ, Wang HW et al (2003) Two-dimensional crystallization of a small heat shock protein HSP16.3 on lipid layer. *Biochem Biophys Res Commun* 310:360–366. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.026>
- Chernik IS, Panasenko OO, Li Y, Marston SB, Gusev NB (2004) pH-induced changes of the structure of small heat shock proteins with molecular mass 24/27 kDa (HspB1). *Biochem Biophys Res Commun* 324:1199–1203
- Chowdary TK, Raman B, Ramakrishna T, Rao CM (2007) Interaction of mammalian Hsp22 with lipid membranes. *Biochem J* 401:437–445. <https://doi.org/10.1042/BJ20061046>
- Coucheny F, Gal L, Beney L et al (2005) A small HSP, Lo18, interacts with the cell membrane and modulates lipid physical state under heat shock conditions in a lactic acid bacterium. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1720:92–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.11.017>
- Darsonval M, Msadek T, Alexandre H, Grandvalet C (2016) The anti-sense RNA approach: a new application for in vivo investigation of the stress response of *Oenococcus oeni*, a wine-associated lactic acid bacterium. *Appl Environ Microbiol* 82:18–26. <https://doi.org/10.1128/AEM.02495-15>
- de Miguel N, Braun N, Bepperling A, Kriehuber T, Kastenmüller A, Buchner J, Angel SOHM (2009) Structural and functional diversity in the family of small heat shock proteins from the parasite *Toxoplasma gondii*. *Biochim Biophys Acta* 1793:1738–1748. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.08.005>
- Fiocco D, Longo A, Arena MP, Russo P, Spano G, Capozzi V (2020) How probiotics face food stress: they get by with a little help. *Crit Rev Food Sci Nutr* 60:1552–1580. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1580673>
- Fiocco D, Capozzi V, Collins M et al (2010) Characterization of the CtsR stress response regulon in *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* 192:896–900. <https://doi.org/10.1128/JB.01122-09>
- Fiocco D, Capozzi V, Goffin P et al (2007) Improved adaptation to heat, cold, and solvent tolerance in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:909–915. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1228-x>
- Fleckenstein T, Kastenmüller A, Stein ML et al (2015) The chaperone activity of the developmental small heat shock protein Sip1 is regulated by pH-dependent conformational changes. *Mol Cell* 58:1067–1078. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.019>
- Han MJ, Yun H, Lee SY (2008) Microbial small heat shock proteins and their use in biotechnology. *Biotechnol Adv* 26:591–609. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.004>
- Haslbeck M (2016) Small heat shock proteins in bacteria. *Stress Environ Regul Gene Expr Adapt Bact* 2:747–753. <https://doi.org/10.1002/9781119004813.ch71>
- Haslbeck M, Vierling E (2015) A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *J Mol Biol* 427:1537–1548. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.002>
- Haslbeck M, Weinkauff S, Buchner J (2019) Small heat shock proteins: simplicity meets complexity. *J Biol Chem* 294:2121–2132. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.002809>
- Khaskheli GB, Zuo F, Yu RCS (2015) Overexpression of small heat shock protein enhances heat- and salt-stress tolerance of *Bifidobacterium longum* NCC2705. *Curr Microbiol* 71:8–15. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0811-0>
- Kleerebezem M, Boekhorst J, Van Kranenburg R et al (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1990–1995. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337704100>
- Kriehuber T, Rattei T, Weinmaier T, Bepperling A, Haslbeck M, Buchner J (2010) Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. *FASEB J* 24:3633–3642

- Longo A, Russo P, Capozzi V et al (2021) Knock out of sHSP genes determines some modifications in the probiotic attitude of *Lactiplantibacillus plantarum*. *Biotechnol Lett* 43:645–654. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03041-6>
- Maitre M, Weidmann S, Dubois-Brissonnet F et al (2014) Adaptation of the wine bacterium *oenococcus oeni* to ethanol stress: role of the small heat shock protein lo18 in membrane integrity. *Appl Environ Microbiol* 80:2973–2980. <https://doi.org/10.1128/AEM.04178-13>
- Maitre M, Weidmann S, Rieu A et al (2012) The oligomer plasticity of the small heat-shock protein Lo18 from *Oenococcus oeni* influences its role in both membrane stabilization and protein protection. *Biochem J* 444:97–104. <https://doi.org/10.1042/BJ20120066>
- Matuszewska M, Kuczynska-Wisnik D, Laskowska E, Liberek K (2005) The small heat shock protein IbpA of *Escherichia coli* cooperates with IbpB in stabilization of thermally aggregated proteins in a disaggregation competent state. *J Biol Chem* 280:12292–12298. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412706200>
- McDonald LC, Fleming HP, Hassan HM (1990) Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* 56:2120–2124. <https://doi.org/10.1128/aem.56.7.2120-2124.1990>
- Mogk A, Ruger-Herreros C, Bukau B (2019) Cellular functions and mechanisms of action of small heat shock proteins. *Annu Rev Microbiol* 73:89–110. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115515>
- Obuchowski I, Karaš P, Liberek K (2021) The small ones matter—sHsps in the bacterial chaperone network. *Front Mol Biosci* 8:1–7. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.666893>
- Obuchowski I, Liberek K (2020) Small but mighty: a functional look at bacterial sHSPs. *Cell Stress Chaperones* 25:593–600. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01094-0>
- Obuchowski I, Piróg A, Stolarska M et al (2019) Duplicate divergence of two bacterial small heat shock proteins reduces the demand for Hsp70 in refolding of substrates. *PLoS Genet* 15:1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008479>
- Papadimitriou K, Alegria A, Bron PA, de Angelis M, Gobetti M, Kleerebezem M, Lemos JA, Linares DM, Ross P, Stanton C, Turroni F, van Sinderen D, Varmanen P, Ventura M, Zúñiga M, Tsakalidou EKJ (2016) Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:837–890
- Parente E, Ciocia F, Ricciardi A et al (2010) Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. *Int J Food Microbiol* 144:270–279. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.005>
- Piróg A, Cantini F, Nierzwicki Ł, et al (2021) Two Bacterial Small Heat Shock Proteins, IbpA and IbpB, Form a Functional Heterodimer. *J Mol Biol* 433:167054. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167054>
- Ratajczak E, Zietkiewicz S, Liberek K (2009) Distinct activities of *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB promote efficient protein disaggregation. *J Mol Biol* 386:178–189. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.12.009>
- Reinle K, Mogk A, Bukau B (2022) The diverse functions of small heat shock proteins in the proteostasis network: functions and mechanisms of sHsps. *J Mol Biol* 434:167157. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167157>
- Rocchetti MT, Russo P, Capozzi V et al (2021) Bioprospecting antimicrobials from *Lactiplantibacillus plantarum*: key factors underlying its probiotic action. *Int J Mol Sci* 22:12076. <https://doi.org/10.3390/ijms222112076>
- Russo P, Mohedano ML, Capozzi V et al (2012) Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and ΔctsR mutant strains under physiological and heat stress conditions. *Int J Mol Sci* 13:10680–10696. <https://doi.org/10.3390/ijms130910680>
- Sales K, Brandt W, Rumbak ELG (2000) The LEA-like protein HSP12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochim Biophys Acta* 1463:267–278. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(99\)00215-1](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(99)00215-1)
- Sawatari Y, Yokota A (2007) Diversity and mechanisms of alkali tolerance in lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* 73:3909–3915. <https://doi.org/10.1128/AEM.02834-06>
- Seddik HA, Bendali F, Gancel F et al (2017) *Lactobacillus plantarum* and its probiotic and food potentialities. *Probiotics Antimicrob Proteins* 9:111–122. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9264-z>
- Shinitzky M, Barenholz Y (1978) Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim Biophys Acta* 515:367–394
- Siegmundfeldt H, Rechinger KB, Jakobsen M (2000) Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Appl Environ Microbiol* 66:2330–2335. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2330-2335.2000>
- Siezen RJ, Tzeneva VA, Castioni A et al (2010) Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. *Environ Microbiol* 12:758–773
- Siezen RJ, Francke C, Renckens B, Boekhorst J, Wels M, Kleerebezem M van HS (2012) Complete resequencing and reannotation of the *Lactobacillus plantarum* WCFS1 genome. *J Bacteriol* 194:195–196. <https://doi.org/10.1128/JB.06275-11>
- Spano G, Beneduce L, Perrotta C, Massa S (2005) Cloning and characterization of the hsp 18.55 gene, a new member of the small heat shock gene family isolated from wine *Lactobacillus plantarum*. *Res Microbiol* 156:219–224. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.09.014>
- Spano G, Capozzi V, Vernile A, Massa S (2004) Cloning, molecular characterization and expression analysis of two small heat shock genes isolated from wine *Lactobacillus plantarum*. *J Appl Microbiol* 97:774–782. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02359.x>
- Török Z, Goloubinoff P, Horváth I et al (2001) *Synechocystis* hsp17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3098–3103. <https://doi.org/10.1073/pnas.051619498>
- Tsvetkova NM, Horvath I, Torok Z, Wolkers WF, Balogi Z, Shigapova N, Crowe LM et al (2002) Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* 21:13504–13509. <https://doi.org/10.1073/pnas.192468399>
- van den Nieuwboer M, van Hemert S, Claassen E, de Vos WM (2016) *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and its host interaction: a dozen years after the genome. *Microb Biotechnol* 9:452–465. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12368>
- Zhang H, Fu X, Jiao W, Zhang X, Liu C, Chang Z (2005) The association of small heat shock protein Hsp16.3 with the plasma membrane of *Mycobacterium tuberculosis*: Dissociation of oligomers is a prerequisite. 330, 1055–1061. *Biochem Biophys Res Commun* 330:1055–1061
- Zhang C, Zhang Y, Ma K, Wang G, Tang M, Wang R, Xia Z, Xu Z, Sun M, Bao X, Gui HWH (2022) *Lactobacillus plantarum* Lp3a improves functional constipation: evidence from a human randomized clinical trial and animal model. *Ann Transl Med* 10:316. <https://doi.org/10.21037/atm-22-458>
- Żwirowski S, Kłosowska A, Obuchowski I, Nillegoda NB, Piróg A, Zietkiewicz S, Bukau B, Mogk ALK (2017) Hsp70 displaces small heat shock proteins from aggregates to initiate protein refolding. *EMBO J* 36:783–796. <https://doi.org/10.15252/embj.201593378>

Titre : Mécanismes de résistance au stress chez les bactéries lactiques impliquant des sHSPs: investigation du mécanisme mis en jeu dans l'activité lipochaperon de la protéine Lo18 chez *O. oeni*.

Mots clés : Activité lipochaperon, sHSP, fluidité membranaire, structure/fonction, bactérie lactique, biofilm

Résumé : Les bactéries lactiques (LAB), telles que *O. oeni*, impliquées dans les processus de fermentation malolactique du vin, sont soumises à d'importants stress environnementaux. La plupart de ces stress affectent négativement la survie des micro-organismes. Parmi les différentes stratégies de réponse mises en jeu par les LAB, on retrouve la formation de biofilm et la production de petites protéines de choc thermique (sHSP). Les sHSPs, sont décrites pour leur activité de chaperon moléculaires. A ce titre, elles sont capables de replier les protéines natives, partiellement dénaturées par les stress environnementaux. Un petit nombre d'entre elles est décrit pour avoir une seconde activité de lipochaperon moléculaire leur permettant de maintenir une fluidité membranaire optimale, au cours des stress environnementaux. Actuellement, les mécanismes impliqués dans l'interaction entre les membranes et les sHSPs restent encore peu connus. Il semblerait que, lorsque les oligomères de ces sHSPs se dissocient en dimères à la surface de la membrane, des forces électrostatiques et hydrophobes déforment la protéine, lui permettant ainsi de pénétrer la membrane et de contribuer au maintien de sa fluidité

La protéine Lo18, l'unique sHSP d'*O. oeni* fait partie des sHSPs décrites pour ces deux activités. Dans ce contexte, nous avons entrepris une exploration des mécanismes fondamentaux impliqué dans l'interaction entre la protéine Lo18 et les membranes par des techniques *in silico*, *in vitro* et *in vivo*, comprenant des mesures d'anisotropie, de radiation circulaire à rayonnement synchrotron ainsi que des techniques d'immunomarquage et de modélisation. Nos recherches ont révélé que, sous l'influence à la fois de la nature des lipides membranaires et de certains résidus de la protéine, la structure protéique de Lo18 est modifiée. Cette modification de structure, particulièrement au niveau de la structure secondaire, s'avère être essentielle pour son activité lipochaperon. Enfin, nos travaux ont également permis de montrer l'implication de Lo18 dans la résistance de biofilm de *O. oeni* au stress acide, stress majoritairement retrouvé dans le vin.. L'ensemble de ces travaux a permis une meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux dans la réponse au stress impliquant des sHSPs.

Title: Stress resistance mechanisms in lactic acid bacteria involving sHSPs: investigation of the mechanism involved in the lipochaperon activity of the Lo18 protein in *O. oeni*.

Keywords : Activité lipochaperon, sHSP, fluidité membranaire, structure/fonction, bactérie lactique, biofilm

Summary: Lactic acid bacteria (LAB), such as *O. oeni*, involved in the malolactic fermentation of wine, are subjected to major environmental stresses. Most of these stresses adversely affect the survival of the micro-organisms. Among the various response strategies employed by LAB are biofilm formation and the production of small heat shock proteins (sHSPs). sHSPs are described for their molecular chaperone activity. As such, they are capable of folding native proteins that have been partially denatured by environmental stresses. A small number have been described to have a second molecular lipochaperon activity, enabling them to maintain optimal membrane fluidity during environmental stresses. At present, little is known about the mechanisms involved in the interaction between membranes and sHSPs. It would appear that when the oligomers of these sHSPs dissociate into dimers at the membrane surface, electrostatic and hydrophobic forces deform the protein, allowing it to penetrate the membrane and help maintain its fluidity.

The Lo18 protein, the only sHSP in *O. oeni*, is one of the sHSPs described for these two activities. In this context, we undertook an exploration of the fundamental mechanisms involved in the interaction between the Lo18 protein and membranes using *in silico*, *in vitro* and *in vivo* techniques, including anisotropy measurements, circular synchrotron radiation as well as immunolabelling and modelling techniques. Our research revealed that, under the influence of both the nature of the membrane lipids and certain residues of the protein, the protein structure of Lo18 is modified. This structural modification, particularly at the level of the secondary structure, proves to be essential for its lipochaperon activity. Finally, our work has also demonstrated the involvement of Lo18 in the resistance of *O. oeni* biofilms to acid stress, a stress found mainly in wine. Taken together, this work has led to a better understanding of the fundamental mechanisms in the response to stress involving sHSPs.