

Etude et caractérisation de l'état " Viable mais Non Cultivable " chez Saccharomyces cerevisiae

Mohammad Salma

▶ **To cite this version:**

Mohammad Salma. Etude et caractérisation de l'état " Viable mais Non Cultivable " chez Saccharomyces cerevisiae. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2013. Français. NNT : 2013DIJOS041 . tel-00973496

HAL Id: tel-00973496

https://theses.hal.science/tel-00973496

Submitted on 4 Apr 2014

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

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

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Institut Universitaire de la Vigne et du Vin
UMR PAM A02-102

Equipe VAlMiS

THÈSE
Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Sciences de l'alimentation
Spécialité : Microbiologie

Par
Mohammad SALMA

Le 7 Novembre 2013

Etude et caractérisation de l'état «Viable mais Non Cultivable» chez *Saccharomyces cerevisiae*

Directeur de thèse
Hervé Alexandre

Co-encadrant
Sandrine Rousseaux

Jury :

Thierry Bergès	Professeur Université de Poitiers	Rapporteur
Jean-Marie François	Professeur INSA de Toulouse	Rapporteur
Delphine Sicard	Maître de Conférences, Université Paris-Sud, Orsay	Examinateur
Jean-Marie Perrier-Cornet	Professeur Agrosup Dijon	Examinateur
Sandrine Rousseaux	Maître de Conférences, Université de Bourgogne	Co-encadrante de thèse
Hervé Alexandre	Professeur, Université de Bourgogne	Directeur de thèse

« Le gain de la recherche, c'est la recherche elle-même. »

de Saint Grégoire de Nysse

REMERCIEMENTS

Je dédie ce travail à Sara, mon étoile et la plus chère à mon cœur, qui m'a accompagné et m'encouragé, de la plus belle des manières qui soit. Merci mon amour!"

Remerciements

Ce travail de thèse a été le labeur de trois années et je suis convaincu que la thèse est loin d'être un travail solitaire. Ce travail doctoral n'aurait jamais été une réussite sans le soutien d'un grand nombre de personnes que je tiens vivement à remercier, et qui m'ont encouragé à aller au bout de cette « grande aventure » qui a été des plus agréables à vivre : ***Ma Thèse !!*** *(Enfin! Que de chemin parcouru!)*

Tout d'abord, toute ma reconnaissance va à mon Directeur de thèse Monsieur le Professeur Hervé ALEXANDRE. Fier de compter parmi vos élèves, je suis sensible à la confiance que vous m'avez accordée, pour votre dévouement, votre persévérance et vos conseils avisés.

Une pensée chaleureuse pour la co-encadrante de thèse Madame le Maître de Conférence Sandrine ROUSSEAUX. Vous étiez une source de motivation et de courage. Je vous remercie pour votre disponibilité, pour vos remarques et critiques pertinentes et fructueuses et pour toutes nos discussions.

Je remercie les membres du jury pour le temps précieux qu'ils nous ont accordé et qui me font l'honneur d'évaluer mon travail. Je vous exprime ma respectueuse gratitude.

Je pense aussi à Madame Anabelle SEQUEIRA-LE GRAND, responsable du plateau technique de cytométrie, pour son aide précieuse, sa disponibilité et son soutien aussi bien scientifique qu'amical; et qui a toujours répondu présent, et avec enthousiasme, pour la cytométrie en flux tout au long de ces trois années.

Je remercie également Madame Aline Bonnotte pour sa gentillesse et son aide technique surtout pour les observations MEB.

Une sincère reconnaissance aux membres de l'Equipe VAlMiS pour leur accueil dont j'ai bénéficié, leur sympathie et leur soutien moral (tâchons de n'oublier personne !) : Alexandre Bastard, Aurelie Rieu, Cosette Grandvalet, Jean Guzzo, Jordi Ballester, Laurence

Noret, Magali Maitre, Mohand Sadoudi, Nabil Aoudia, Raphaelle Tourdot-Maréchal, Said Dandach, Stéphanie Weidmann-Desroche, Virginie Serpaggi, Franck Bagala et Vanessa David.

Il me faut également remercier la région Bourgogne pour leur soutien financier indispensable à la mise en place de cette thèse.

Enfin, je remercie mes parents pour leur amour inconditionnel et leur soutien.

LISTE DES ABREVIATIONS

Les abréviations courantes officielles du système international sont utilisées pour désigner les diverses unités de mesure (masses, volumes, concentrations…).

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

ATP: Adénosine triphosphate

BAAS: Voie de la biosynthèse des acides aminés soufrés

CMF: Cytométrie en flux

Cultivabilité: Anglicisme basé sur l'existence du mot « cultivability » qui n'a pas de traduction en français. Ce terme désigne la potentialité de croissance d'un micro-organisme sur ou dans un milieu de culture approprié.

DO_{600nm}: Densité Optique à 600 nm

DTT : Dithiothreitol

EtOH: Ethanol

FDA: Fluorescéine diacetate

FSC: Forward scatter

IP: Iodure de propidium

Levurienne: Néologisme constituant l'adjectif de levure, au même titre que bactérienne pour bactéries.

LiAc : Lithium acetate

M: Concentration molaire ($mol.L^{-1}$)

MBE: Microscopie à balayage électronique

NADH: Nicotinamide adénine dinucleotide

PBS: Tampon phosphate salin

PCR: *Polymérase Chain réaction* (Réaction de polymérisation en chaîne)

Ressuscitation: Le terme de ressuscitation a été souvent utilisé pour désigner la sortie de l'état viable non cultivable des micro-organismes. Néanmoins, il n'est pas à proprement parlé parfaitement approprié. Il s'inspire du terme anglais «ressuscitation» dont la traduction n'existe pas en français.

RNase: Ribonucléase

SSC: Side scatter

TBE : Tampon de migration utilisé en électrophorèse et composé de Tris, d'acide borique et d'EDTA.

TE : Tampon Tris EDTA

UFC: Unité Formant Colonie

v/v: Volume à volume.

VNC: Viable non cultivable

VSX%: Vin synthétique à X % d'éthanol

YPD: Yeast peptone dextrose

µ: Taux népérien de croissance (h^{-1})

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS 3
LISTE DES ABREVIATIONS 6
SOMMAIRE 8
TABLE DES ILLUSTRATIONS 11
INTRODUCTION GENERALE 16
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 19
I. La Levure *Saccharomyces cerevisiae*. 20
I.1 Taxonomie et morphologie 20
I.2 Physiologie et métabolisme 21
II. Notion de stress chez les microorganismes. 26
II.1. Effet de l'éthanol. 28
II.2. Effet du SO_2 35
a) Les différents états du dioxyde de soufre dans le vin: 35
b) Mode d'action du SO_2 39
c) Les mécanismes de résistance aux sulfites chez *S. cerevisiae* 41
III. Viabilité cellulaire et Etat VNC 46
IV. Caractéristique de l'état VNC 48
V. «Ressuscitation», la clé de l'hypothèse VNC 51
VI. Distinction entre cellules endommagées et cellules en état VNC 57
VII. L'état VNC en domaine œnologique 58
VIII. Technique pour la détection des VNC. 61
1. Méthodes à comptage direct : 63
2. Méthodes à base génétique 64
3. ATP bioluminescence: 64
4. Cytométrie en flux 65
X. La Cytométrie en flux dans la microbiologie 68
XI. L'étude du cycle cellulaire 75
XII. Objectifs de la thése 77

Sommaire

MATERIELS ET METHODES....79
I. Souches, plasmides et conditions de culture....80
II Construction d'une souche BY4742Δ*ssu1* pCEL13-*SSU1* surexprimant le gène *SSU1*....81
II-1 Préparation et analyse de l'ADN....81
II-2 Préparation des souches compétentes (DH5α)....83
II-3 Transformation des souches compétentes (DH5α) par le plasmide (pJET1.2-SSU1)....84
II-4 Extraction de l'ADN plasmidique (plasmide PJET-SSU1)....84
II-5 Construction du vecteur de surexpression....85
II-6 Transformation de S. cerevisiae par électroporation....86
III. Adaptation des différentes souches au milieu vin synthétique.....89
IV. Induction de l'état VNC....91
V. Induction de la sortie de l'état VNC....93
VI. Dénombrement des levures cultivables sur gélose....94
VII. Etude de la viabilité cellulaire....94
VII.1. Etude de l'activité estérase : Fluorescéine Di-Acétate (FDA)....94
VII.2. Fiabilité du marquage FDA....95
VII.3. Détection d'une activité métabolique dans des cellules en état VNC....96
VIII Analyse par cytométrie en flux....97
IX Etude du cycle cellulaire....98
IX.1. Protocole expérimental....98
IX.2. Analyse par CMF....99
X. Détermination du temps de sortie de l'état VNC....100
XI. Analyse des cellules en état VNC par microscopie à balayage électronique....101
XII. Effet du milieu de culture sur l'état VNC....102
XIII. Dosage des sucres réducteurs et des acides aminés totaux résiduels dans les milieux:....102
XIII. 1. Dosage des sucres réducteurs (Glucose et Fructose): DNS....102
XIII. 2. Dosage des acides aminés totaux résiduels du milieu....104
RESULTATS ET DISCUSSION....107
I. Mise en évidence de l'état VNC chez *S. cerevisiae.*....108
I.1 Optimisation de l'induction de l'état VNC....108
I.2 Etude de la viabilité cellulaire....114

I.3. Validation du marquage FDA 118

I.4. Détection d'une activité métabolique 121

II. Validation de l'état VNC 123

II.1. « Ressuscitation » des cellules 123

II.2. Détermination du temps de sortie de l'état VNC et comparaions avec le tempsde génération 128

II.3. Etude du cycle cellulaire 130

II.4. Caractérisation de l'état VNC 132

III. Effet du milieu de culture sur la détection de la cultivabilité 136

IV. Le rôle du gène *SSU1* dans l'état VNC. 139

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 143

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE 153

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure. 1: Schéma de la glycolyse (A) et du cycle de Krebs (B).. 22

Figure 2 Utilisation du glucose par *Saccharomyces* sous conditions anaérobies (fermentation). 23

Figure 3. Schéma récapitulatif du mode d'action de l'éthanol sur une cellule de levure. 29

Figure 4: Modification des taux d'acides gras majoritaires sous l'effet de différentes concentrations en éthanol..... 31

Figure 5. Les différentes formes du SO_2 dans une solution aqueuse représentées en pourcentage par rapport au SO_2 total et en fonction du pH du milieu. 36

Figure 6: Différentes formes du dioxyde de soufre dans les moûts et les vins..... 37

Figure 7: Schéma synthétique de la voie d'assimilation du sulfate ainsi que les réponses cellulaires de *S. cerevisiae* en présence de SO_2 moléculaire 42

Figure. 8 Schéma représentatif du test mixed culture recovery (MCR).. 53

Figure 9: Schéma explicatif de la re-croissance et de la « ressuscitation ». 58

Figure. 10: Représentation schématique d'un Cytomètre en flux. 66

Figure. 11: Les différents états physiologiques d'une cellule..... 68

Figure 12. Structure chimique de l'iodure de propidium..... 73

Figure 13: Formule chimique de la FDA et de son produit d'hydrolyse. 75
Figure 14. Les phases du cycle cellulaire (A) et l'histogramme d'ADN mesuré par cytométrie en flux (B). 76

Figure 15. Représentation schématique du plasmide pCEL13 et des différents sites de restriction. 85

Figure 16. Représentation schématique du géne *SSU1* et des différents sites de restriction possibles 85

Figure 17. La démarche expérimentale réalisée pour la surexpression du gène *SSU1* chez *S. cerevisiae* BY4742Δ*ssu1* 89

Figure 18 Distribution des cellules *S. cerevisiae* S288C analysée par CMF couplé au marquage IP dans les différentes phases du cycle cellulaire. 100

Figure 19. Réduction de l'acide 3,5-dinitrosalycilique (3,5-DNS ou DNS) en acide 3-amino-2-hydroxy-5-nitrsalicylique. 103

Figure 20. Effet de différentes doses de SO_2 moléculaire sur la formation des colonies de *S. cerevisiae* S288C cultivées en VS pH 3,5 à différentes teneurs en éthanol (0, 8 et 10%). 109

Figure 24. Analyse par CMF de la fluorescence de cellules de *S. cerevisiae* S288C dans du vin synthétique, à 8 % d'éthanol pH 3,5, marquées à la FDA. 113

Figure 21. Effet de l'ajout 4.5 $mg.L^{-1}$ de SO_2 moléculaire sur les cellules de levures *S. cerevisiae* S288C et *S. cerevisiae* PB2585 cultivées en VS 8%. La population levurienne totale a été déterminée par cytometrie (♦), la population cultivable par culture sur boite (■) et la population viable par cytometrie couplée au marquage FDA(▲). 115

Figure 22 Effet de l'ajout 4.5 $mg.L^{-1}$ de SO_2 moléculaire sur les cellules de levures *S. cerevisiae* S288C et *S. cerevisiae* PB2585 cultivées en VS 0%. La population levurienne totale a été déterminée par cytometrie (♦), la population cultivable par culture sur boite (■) et la population viable par cytometrie couplée au marquage FDA(▲). 116

Figure 25. Analyse par CMF de cellules de *S. cerevisiae* S288C en culture dans du VS à 8% d'alcool avec 10g.L^{-1} de SO_2 total après marquage à la FDA. 119

Figure 26Analyse par CMF de cellules de S. cerevisiae S288C en culture dans du VS à 8% d'alcool avec 25 mg.L^{-1} de Natamycine après marquage à la FDA. 120

Figure 29. Analyse par CMF de cellules de *S. cerevisiae* S288C marquées avec le FUN-1. L'intensité de la fluorescence verte apparaît sur l'axe des abscisses et l'intensité de fluorescence rouge est représentée sur l'axe des ordonnées. 122

Figure 23 «Ressuscitation» de *S. cerevisiae* S288C de l'état VNC en VS8%. Les figures représentent les variations des concentrations des cellules totales déterminées par cytometrie (♦), cultivables déterminées par culture sur boite (■) et viables déterminées par cytometrie couplée au marquage FDA (▲). 124

Figure 27. Suivi des populations totales, viables et cultivables de *S. cerevisiae* S288C (VS0%, pH 3,5) après addition de 20g.L^{-1} de sucres réducteurs 7 jours après le stress SO_2 sans modification du pH…..126

Figure 28. Suivi des populations totales, viables et cultivables de *S. cerevisiae* S288C (VS0%, pH 3,5) après addition de 20g.L^{-1} de sucres réducteurs 7 jours après le stress SO_2 avec augmentation modification du pH. 127

Figure 32. Croissance de *S. cerevisiae* S288C en VS 8% pH 4, carencé à 28°C. 128

Figure 33 Temps de sortie de l'état VNC pour des cellules de *S. cerevisiae* S288C après augmentation du pH 21 jours après le stress SO_2. 129

Figure. 30: Analyse par CMF et répartition des cellules de *S. cerevisiae* S288C en phase exponentielle cultivées en vin synthétique 8% d'éthanol dans les différentes phases du cycle cellulaire. 131

Figure 31. Analyse du cycle cellulaire par CMF, de cellules de *S. cerevisiae* S288C en VS8%.....132

Figure 34. Photographies de cellules de *S. cerevisiae* obtenues par MBE. (A) contrôle (VS8%, pH 3,5), (B) cellules en état VNC obtenues 14 jours après l'ajout du stress SO_2 (VS8%, pH 3,5 avec 4.5 $mg.L^{-1}$ SO_2 moléculaire). 133

Figure 35 Taille cellulaire (longueur et largeur) mesurée par MBE pour des cellules en condition (VS8%, pH 3,5) et en état VNC (14 jours après l'ajout du SO_2) 134

Figure 36. Effet des milieux de culture sur la cultivabilité de cellules en état VNC. (x) YPD liquide, (▲) vin synthétique 8% d'alcool pH 4, (♦) vin synthétique 8% d'alcool pH 3,5, (■) milieu YPD solide. 136

Figure 37. Induction de l'état VNC chez *S. cerevisiae* BY4742 (A) ; *S. cerevisiae* BY4742Δ*ssu1* (B) ; BY4742Δ*ssu1* pCEL13-*SSU1* (C) cultivées en vin synthétique modifié à 8% d'éthanol après addition de 4.5$mg.L^{-1}$ du SO_2. 140

Figure 38. Pourcentage de viabilité de *S. cerevisiae* BY4742 (♦) et *S. cerevisiae* BY4742Δ*ssu1* (■) pendant l'induction de l'état VNC en VSM 8% ethanol pH3.5 142

Tableau 1: Principales classes de gènes dont l'expression est modifiée en présence d'éthanol (1h) 32

Tableau 2: Bactéries décrites comme entrant en état VNC 50

Tableau 3. Exemples de travaux soutenant ou non l'hypothèse de la « ressuscitation» 51

Tableau 4 Distribution des gènes *rpf*-like chez différents organismes 55

Tableau. 5 Les avantages et les désavantages des analyses globale et cytologique 62

Tableau 6: Les différents fluorochromes utilisés en CMF pour la mesure de viabilité cellulaire. 70

Tableau 7: Les différents souches et plasmides utilisés lors de cette étude 80

Tableau 8.Composition du *Mix PCR* pour l'amplification du gène *SSU1* 82

Tableau 9: La composition du milieu réactionnel pour la ligation 83

Tableau 10.Composition du mix PCR pour l'amplification du gène *SSU1* 88

Table des illustrations

Tableau 11. Les différentes concentrations de métabisulfite de sodium à ajouter en fonction de la teneur du milieu (pH 3,5) en éthanol et la concentration du SO_2 moléculaire attendue. 91

Tableau 12 : Pourcentages des cellules en état VNC obtenus par CMF (FDA) 3 jours après le stress SO_2 ($4.5 mg.L^{-1}$) pour les différentes souches étudiées selon les différentes conditions expérimentales. 111

Tableau 13. Conditions d'entrée et de sortie de l'état VNC chez différentes microorganismes. 138

INTRODUCTION GENERALE

Le concept d'organisme «Viable mais Non Cultivable» (VNC) n'a été admis que récemment par la communauté scientifique comme une stratégie de survie (Oliver et al., 1995). Les cellules en état VNC sont incapables de croître sur les milieux de culture conventionnels mais possèdent néanmoins une activité métabolique (Yamamoto, 2000). Cet état est complexe et sa définition est très controversée. Cet état VNC est en effet connu chez les bactéries depuis 1982 (Xu et al., 1982), et la possibilité d'entrer dans cet état métabolique particulier, après un changement brutal de l'environnement, a été démontrée chez de nombreuses espèces bactériennes.

Pourtant, cet état n'a jamais été bien caractérisé chez les levures. Un manque de connaissances sur les conséquences morphologiques, physiologiques et métaboliques qui lui sont associées faisait l'objet de notre constat initial.

Il est bien connu que l'environnement viti-vinicole rassemble des conditions pouvant engendrer des situations de stress vis-à-vis des microorganismes (notamment: la présence d'alcool et de SO_2). En œnologie, l'état des connaissances concernant l'état VNC est limité. La possibilité d'un état VNC chez *S. cerevisiae* a été suggérée en 2005 par une étude de Divol et Lonvaud-Funel puis par les travaux d'Agnolucci et al. (2010). Il avait été montré que le sulfitage jouait un rôle dans l'entrée des cellules de *S. cerevisiae* en VNC, mais les conditions de sortie de cet état, qui est une phase essentielle dans la démonstration de l'existence de cet état métabolique, n'ont jamais été publiées.

Cette étude a comme objectif d'étudier précisément l'état VNC chez *Saccharomyces*, en déterminant les conditions d'entrée et de sortie de cet état en conditions modèles, ainsi qu'en comparant divers paramètres physiologiques et

métaboliques de la levure avant, pendant et après un état VNC en utilisant la cytometrie de flux (CMF) couplée au marquage à la Fluorescéine diacetate. De plus, une comparaison du profil du cycle cellulaire des cellules en état VNC juste avant et après l'induction de la «ressuscitation», en utilisant la CMF couplée à l'iodure de propidium est réalisée afin de démontrer que la reprise de la cultivabilité observée lors de la sortie de l'état VNC est due à une vraie « ressuscitation ».

Finalement, une analyse du rôle du gène *SSU1,* impliqué dans le mécanisme de résistance aux sulfites chez *S. cerevisiae* dans l'état VNC est effectuée.

Une première partie introductive rendra compte des connaissances actuelles sur l'état VNC chez les procaryotes et chez les eucaryotes et sur les techniques de détection existantes.

La deuxième partie du manuscrit concernera l'étude et la caractérisation de l'état VNC chez *Saccharomyces*. Une synthèse critique des résultats et les perspectives proposées, pour compléter ce travail, clôtureront ce manuscrit.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La Levure *Saccharomyces cerevisiae*.

I.1 Taxonomie et morphologie

Les levures *Saccharomyces* appartiennent au règne des champignons, à la division (embranchement) des *Ascomycota* (Ascomycètes), la sous-division des *Saccharomycotina*, la classe des *Saccharomycètes*, l'ordre des *Saccharomycetales* et la famille des *Saccharomycetaceae*. Les levures sont des eucaryotes unicellulaires, ayant une forme sphérique ou ovale, largement étudiées en biologie cellulaire et moléculaire. Leur état physiologique et leur morphologie peuvent varier selon les conditions de l'environnement. Lorsqu'elles se trouvent dans des conditions favorables de culture (température, aération, pH, etc.) elles peuvent se diviser activement par bourgeonnement (Boze et al., 2008). La taille d'une levure peut varier entre 1 et 9 µm en longueur et de 1 à 5 µm en largeur.

Les levures sont utilisées pour la fabrication du pain depuis plus de 3000 ans. Mais ce n'est qu'entre 1857 et 1863 que Louis Pasteur démontre le rôle de la levure en tant que micro-organisme responsable de la fermentation alcoolique (FA).

Cet organisme représente un système expérimental qui procure de nombreux avantages, entre autre la petite taille de son génome, ses hautes capacités de recombinaison alliées à un système génétique bien défini et la facilité à le manipuler en laboratoire. Ceci a permis à cette levure de devenir un des organismes modèles eucaryotes les mieux connus et les plus étudiés.

I.2 Physiologie et métabolisme

La composition biochimique de *S. cerevisiae* repose essentiellement sur les protéines, les lipides, les hydrates de carbone et les acides nucléiques (Fritsche, 1972). *S. cerevisiae* utilise plusieurs éléments, en faibles quantités, indispensables à son métabolisme tels que l'azote, le soufre, le phosphore, certains acides aminés, des vitamines et des oligo-éléments affectant ainsi les capacités fermentaires et la croissance de la levure (Birch et Walker, 2000; Dombek et Ingram, 1986; Ferreira et al., 2004).

Le phosphore : Il est assimilé préférentiellement en utilisant l'orthophosphate sous forme d'ion monovalent. Il est impliqué dans le maintien de l'intégrité membranaire et la synthèse des lipides et des hydrates de carbone (Winter, 1988).

L'azote. Afin d'être assimilé par les levures, l'azote doit être présent dans le milieu de culture. Les ions ammonium, les acides aminés et certains peptides de faible poids moléculaire peuvent être incorporés dans la cellule de la levure et y être métabolisés. L'ion ammonium et le glutamate sont les composés azotés le plus facilement assimilable par la levure (Winter, 1988).

Le soufre est assimilé généralement sous forme inorganique SO_4^{-2} (Rose, 1980). Le comportement métabolique de la levure peut être purement oxydatif, fermentaire, ou oxydo-réductif. Il dépend de la nature de la source carbonée et les conditions de culture (Rose, 1980).

a. Métabolisme oxydatif

Le métabolisme oxydatif permet la multiplication par bourgeonnement, ce métabolisme est l'un des métabolismes les plus énergétiques, avec un rendement cellulaire important. Il repose sur la production d'une biomasse et de dioxyde de carbone grâce à l'oxydation complète du glucose via les voies métaboliques de la glycolyse (**Figure. 1A**), du cycle de Krebs (**Figure. 1B**) et de la phosphorylation oxydative.

Il nécessite la présence d'oxygène et des concentrations en limitation de substrat (150 $mg.L^{-1}$ environ) (Sanchez, 2008). L'équation suivante présente le bilan énergétique théorique maximal de cette voie métabolique:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 + 28\ Pi + 28\ ADP \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O + 28\ ATP$$

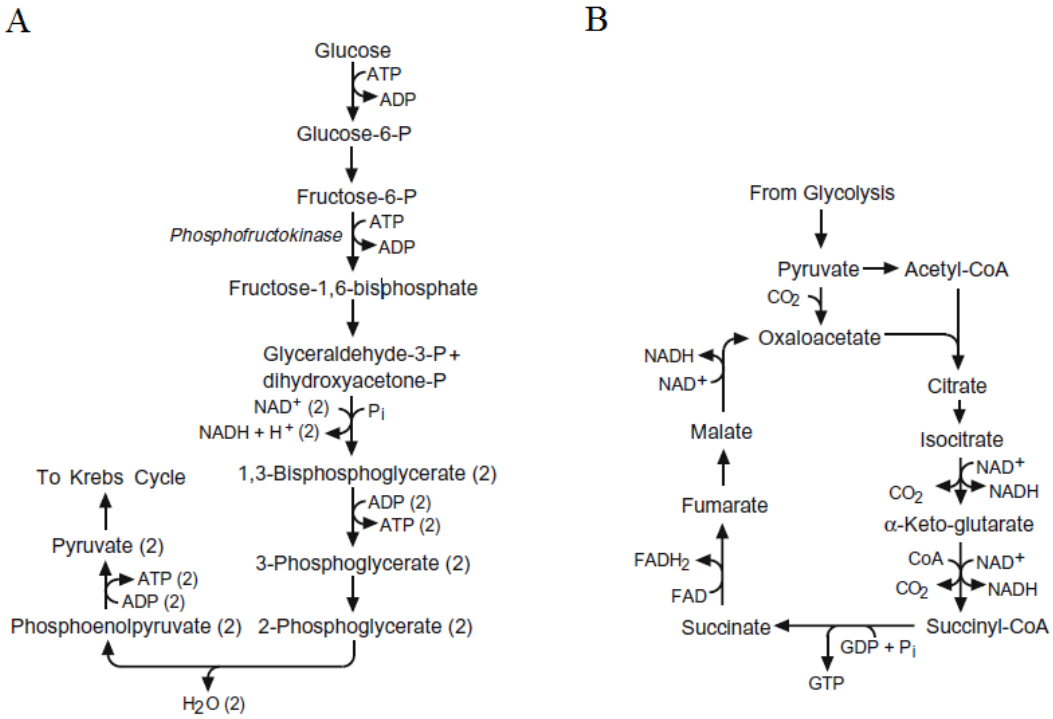


Figure. 1: Schéma de la glycolyse (A) et du cycle de Krebs (B). (Fritsche, 1972).

b. Métabolisme fermentaire

Ce métabolisme se caractérise généralement par un ensemble de réactions qui se produisent en absence d'oxygène comme accepteur final d'électron. Dans ces conditions, le pouvoir cellulaire à réoxyder les coenzymes réduits (NADH et FADH2) est fortement diminué (Fritsche, 1972). De plus dans cette situation, la biochimie cellulaire est modifiée de telle sorte que le pyruvate est réduit en acétaldéhyde puis en éthanol (fermentation), dont la dernière étape nécessite la présence du NADH (**Figure. 2**).

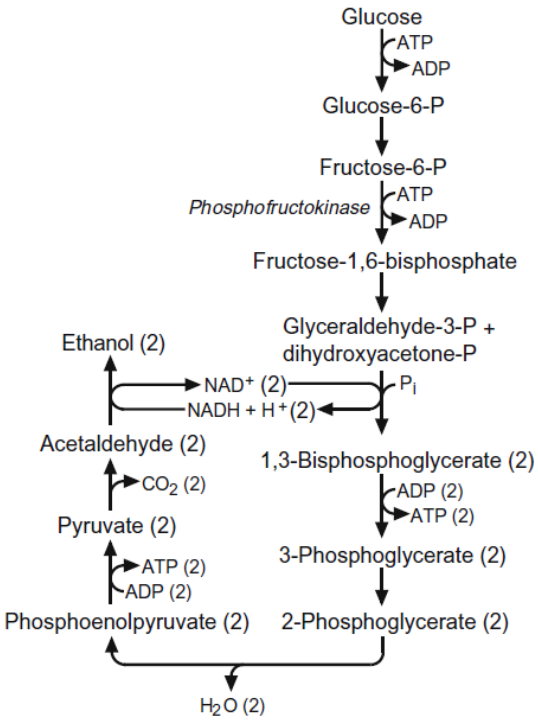


Figure 2 Utilisation du glucose par *Saccharomyces* sous conditions anaérobies (fermentation) (Fritsche, 1972).

Le bilan énergétique de la réaction est:

$$C_6H_{12}O_6 + 2\ Pi + 2\ ADP \rightarrow 2\ C_2H_6O + 2\ CO_2 + 2\ ATP$$

De plus, la formation de l'éthanol permet à la cellule de réoxyder le NADH qui a été produit durant la glycolyse.

Cependant en condition anaérobie, le cycle de Krebs n'est pas complètement fonctionnel, car l'activité de la succinate déshydrogénase nécessite la présence d'un coenzyme strictement respiratoire; le FAD (Furukawa et Kimura, 1971). Par contre, certaines enzymes du cycle de Krebs reste toujours actives (Camarasa et al., 2003). Cette portion active du cycle de Krebs (de l'oxaloacétate au succinate) génére le NADH qui sera réoxydé par la formation de glycérol à partir de la dihydroxyacétone. De plus, l'acide succinique est formé non par voie oxydative mais par la voie réductrice du cycle de Krebs en anaérobiose (Camarasa et al., 2003): oxaloacétate → malate → fumarate → succinate.

c. Métabolisme oxydo-réductif ou Métabolisme Respiro-fermentaire

En présence d'oxygène la levure *S. cerevisiae* a la particularité de présenter un métabolisme mixte: fermentation (production fermentaire d'éthanol) et respiration (production oxydative de biomasse).

Cependant en aérobiose, le métabolisme de la levure *S. cerevisiae* est purement oxydatif lorsque l'apport en glucose est faible. Dans ces conditions, la biomasse et le CO_2 sont les seuls produits synthétisés par la levure; le rendement en biomasse est alors maximum et égal à 0,5 g de biomasse par g de glucose (Blom et al., 2000; Flikweert et al., 1999; Van Hoek et al., 2000). Par contre le métabolisme cellulaire devient oxydo-réductif une fois que l'apport de glucose dépasse un certain seuil. Dans ce cas-là, les produits synthétisés

sont la biomasse, le CO_2, le glycérol, l'acétate, l'éthanol et le rendement en biomasse est fortement réduit. De plus, le NADH générée à partir de la glycolyse est réoxydé par la production d'éthanol (fermentation) plutôt que par les voies combinées au métabolisme oxydatif (glycolyse, cycle de Krebs et phosphorylation oxydative) (Fritsche, 1972). Cette bascule métabolique est appelée transition respiro-fermentaire ou effet Crabtree (Crabtree, 1929; Deken, 1966; Fiechter et Seghezzi, 1992) qui est du point de vue œnologique très important car cet effet Crabtree permet de réaliser la fermentation en présence d'une faible concentration d'oxygène.

Certaines levures sont fortement Crabtree positives et leur production d'éthanol dépend de la concentration en glucose; chez certaines, comme *S. cerevisae*, la synthèse d'éthanol débute au-delà de 2.5 $g.L^{-1}$ de glucose (Meijer et al., 1998) tandis que chez d'autres, il faut 20 à 50 $g.L^{-1}$ de glucose (Ratledge, 1991). Les levures Crabtree négatives sont les levures pour lesquelles la présence de glucose n'arrête pas la respiration.

Le transport du glucose est l'un des facteurs qui distinguent les levures Crabtree positives et des Crabtree négatives (Fiechter et Seghezzi, 1992; van Urk et al., 1989). En excès de glucose dans le milieu, le comportement des levures est différent : i) chez les levures Crabtree positives, le transport est facilité ce qui implique un afflux important de glucose, ii) les levures Crabtree négatives utilisent un symport-H^+ pour réguler l'entrée du glucose (Pronk et al., 1996).

II. Notion de stress chez les microorganismes.

Les microorganismes, comme tous les êtres vivants, répondent naturellement aux variations des facteurs environnementaux en faisant face à ces conditions désavantageuses pour leur survie. Lorsque les conditions environnementales menacent la survie des microorganismes ou les empêchent de vivre dans des conditions optimales, les cellules sont qualifiées de ″stressées″ (Hohmann et Mager, 2003). La notion de stress en biotechnologie est difficile à définir. Graumlich et Stevenson, (1979) définissent le stress comme une force ou une influence hostile qui tend à empêcher un système de fonctionner normalement.

Le déclenchement de mécanismes cellulaires complexes suite à un stress génère une réponse adaptative qui aboutit à un état de tolérance, et par conséquent à une survie dans des conditions qui sont normalement létales (Helmann, 2002). Ces variations peuvent être multiples et peuvent provoquer différentes «réponses dynamiques» à différents niveaux : macroscopique, microscopique et moléculaire chez le microorganisme, comme par exemple une modification du métabolisme cellulaire. D'autres réponses peuvent être mises en place: la modification de la capacité de croissance, de certaines fonctions physiologiques, de rendements et de productivités.

Cependant, entre l'état non stressé et la mort, un certain nombre d'états physiologiques différents peuvent exister. Ces adaptations physiologiques mises en œuvre nécessitent un temps de réponse plus ou moins long qui dépend entre autre, de l'intensité et de la rapidité de la variation subie (conditions sub-létales). Le passage d'un état physiologique

à un autre est conditionné par le degré de stress imposé par les conditions environnementales. Ce degré varie d'un individu à un autre (Booth et al., 2002).

Généralement la réponse de la levure face à un stress est également mise en œuvre de façon dynamique avec une capacité ou non d'adaptation aux conditions environnementales en fonction du temps (Attfield, 1997; Henson, 2003; Lacroix et Yildirim, 2007; Sonnleitner, 1998). Lors de la présence d'éléments tels que l'éthanol ou le SO_2 dans le milieu de culture, la levure répond en essayant de prévenir la dénaturation de l'intégrité cellulaire et la perte d'activité, en réponse passive ou active. La réponse active est généralement considérée comme une modification métabolique consommant de l'énergie (modifications de la synthèse des molécules intracellulaires et/ou de la composition lipidique de la membrane plasmique, de la morphologie de la cellule et de la composition intracellulaire). Par contre, la réponse passive dépend seulement de la vitesse de la perturbation physique entre le milieu intra et extracellulaire. Les réponses des levures aux perturbations peuvent engendrer des dommages irréversibles dans la cellule et même sa mort (Marechal et al., 1999).

Dans le domaine de l'œnologie, un certain nombre de paramètres peuvent influencer le métabolisme et les capacités dynamiques des différents microorganismes du vin et spécifiquement la levure *S. cerevisiae.* Ces paramètres œnologiques peuvent influencer le comportement de *S. cerevisiae* en affectant ses capacités de croissance et de production (Gibson et al., 2007; Hirasawa et al., 2007; Sainz et al., 2003). Parmi ces

paramètres, on note la concentration d'éthanol (Martini et al., 2004) et le SO_2 (Divol et Lonvaud-Funel, 2005; Serpaggi et al., 2012).

II.1. Effet de l'éthanol.

L'éthanol, excrété par les levures dans le milieu de culture au cours de la fermentation alcoolique, est l'un des principaux facteurs influant sur la croissance des levures. La présence d'éthanol en concentrations élevées dans le milieu de fermentation est à l'origine des modifications de perméabilité et de fluidité membranaires; donnant ainsi lieu à des désordres métaboliques importants. Ceci explique la diminution de la croissance spécifique ainsi que l'augmentation de la mort cellulaire (**Figure 3**). Généralement des concentrations de l'ordre de 1–2% (v/v) sont suffisantes pour diminuer la croissance cellulaire qui peut être arrêtée par une concentration de 10% (v/v) d'éthanol (Roehr, 2001). Selon Bai et al. (2004), une inhibition totale de la croissance cellulaire et de la vitesse de production est observée à une concentration de 13% (v/v) d'éthanol dans le milieu.

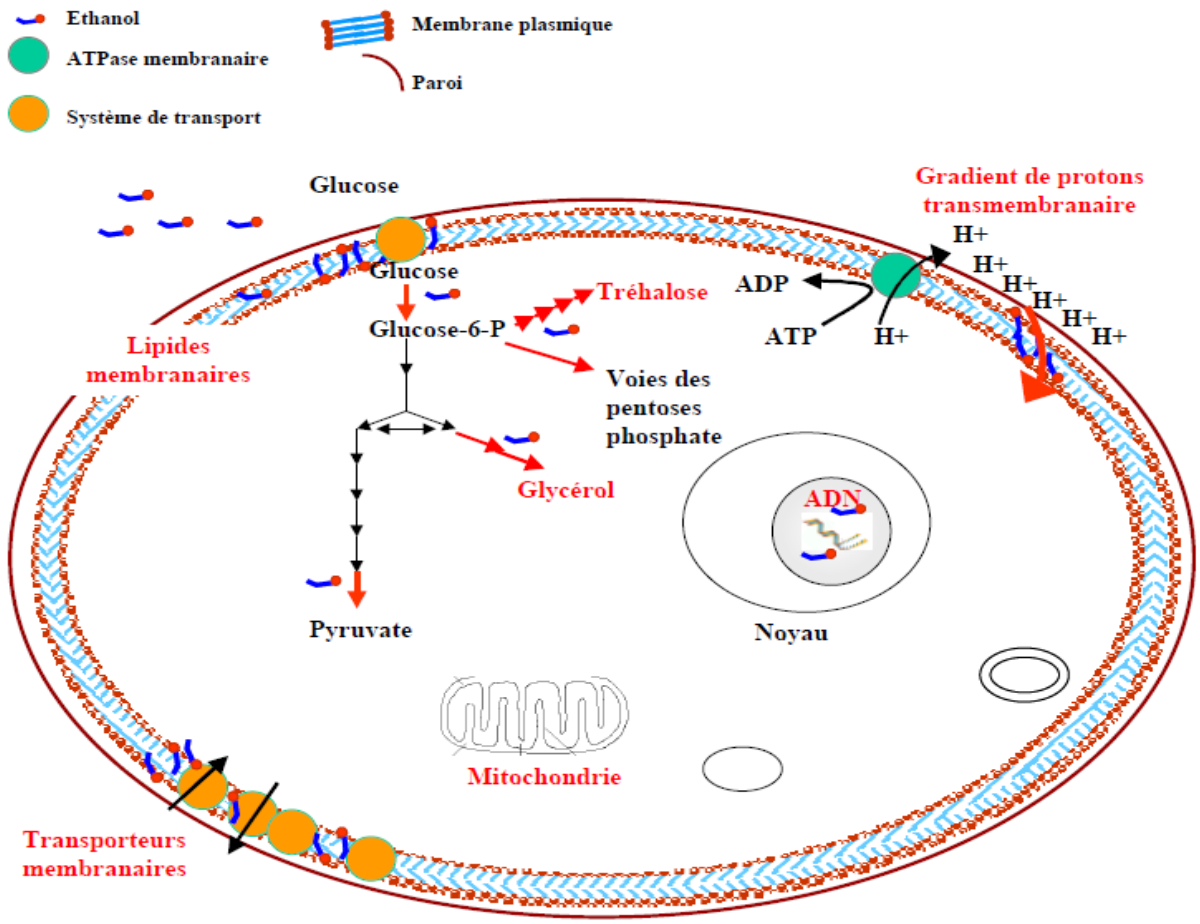


Figure 3. Schéma récapitulatif du mode d'action de l'éthanol sur une cellule de levure (Cot, 2006).

Plusieurs mécanismes d'adaptation sont impliqués dans la résistance à l'éthanol (**Figure 3**):

- Modification de la composition membranaire
- Modification de l'expression des protéines
- Synthèse du tréhalose (protecteur cellulaire)

1. *Modification de la composition membranaire:*

La membrane plasmique est la première cible de l'éthanol. Afin de diminuer l'effet de l'éthanol, la cellule modifie sa composition membranaire. Vu sa composition, l'éthanol peut perturber la structure de la membrane. Comme tout alcool, l'éthanol est une molécule amphiphile possédant une partie hydrophile (fonction hydroxyle) et une autre hydrophobe (fonction éthyle). Sa fonction hydroxyle interagit avec les têtes polaires des phospholipides tandis que la fonction éthyle s'intercale entre les chaînes aliphatiques (Slater et al., 1993).

La composition lipidique des membranes plasmiques des levures, incubées en présence d'éthanol, a fait l'objet de nombreuses études (Del castillo agudo, 1992; Beaven et al., 1982; Dinh et al., 2008; Huffer et al., 2011; Mishra et Prasad, 1989; Tierney et al., 2005). Une diminution du taux d'acides gras insaturés a été suggéré en présence d'éthanol (Del castillo agudo, 1992; Huffer et al., 2011). Au contraire, d'autre études font état à une augmentation du taux d'acides gras insaturés (**Figure 4**) (Beaven et al., 1982; Dinh et al., 2008).

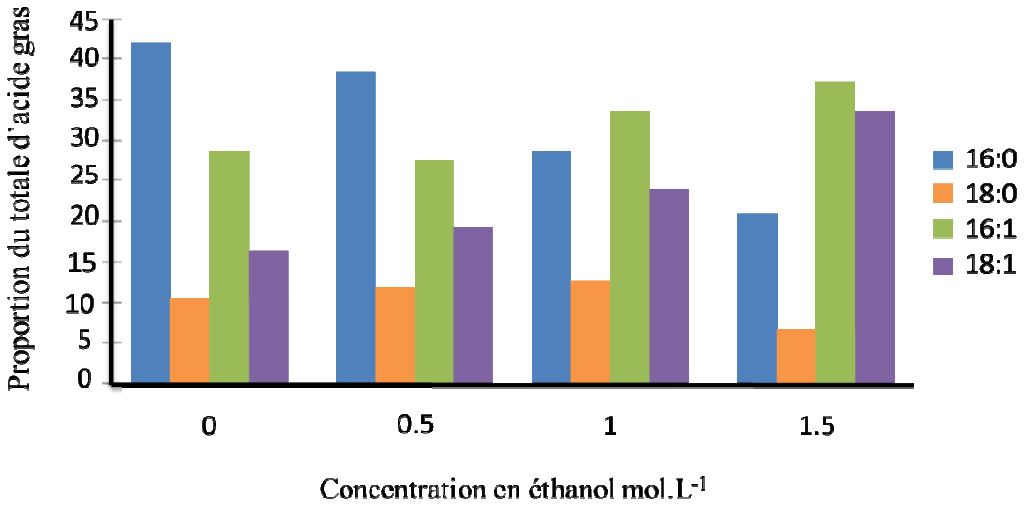


Figure 4: Modification des taux d'acides gras majoritaires sous l'effet de différentes concentrations en éthanol, d'après Beaven et al. (2004).

De plus, une corrélation positive a été démontrée entre la tolérance à l'éthanol et l'acide oléique (18 :1) (Aguilera et al., 2006; Beaven et al., 1982; Dinh et al., 2008; Lewis et al., 2010; Swan et Watson, 1999; You et al., 2003) et le taux d'ergostérol membranaire (Aguilera et al., 2006). Par contre, une corrélation négative a été constatée entre la tolérance à l'éthanol et le taux d'acide palmitique (16:0) (Dinh et al., 2008; Mishra et Prasad, 1989).

2. *Modification de l'expression des protéines*

L'éthanol provoque un retard dans la synthèse des ARN, de l'ADN et des protéines (Ingram, 1977). Les mitochondries sont les éléments les plus affectés par l'éthanol, particulièrement l'ADN mitochondrial (Ibeas et Jimenez, 1997). Différentes études ont analysé les modifications de transcription induites par exposition de *S. cerevisiae* à l'éthanol (Alexandre et al., 2001; Chandler et al., 2004; Lewis et al., 2010),

Alexandre et al. (2001) ont mis en évidence l'induction et la répression de gènes après un choc éthanol. La plus importante famille de gènes sur-exprimés lors d'un choc éthanol est la famille « cell rescue defense and virulence » (Alexandre et al., 2001). Certains de ces gènes sont impliqués dans la réponse au choc thermique (Heat Shock Protein), le maintien de l'homéostasie cellulaire, la synthèse et la dégradation du tréhalose ainsi que la réponse au stress oxydatif (Alexandre et al., 2001). L'étude réalisée par Chandler et al. (2004) a permis de lister les principales classes de gènes dont l'expression est modifiée par la présence d'éthanol (**Tableau 1).**

Tableau 1: Principales classes de gènes dont l'expression est modifiée en présence d'éthanol (1h) (Chandler et al., 2004)

Profil d'expression génique en présence d'éthanol	
Nombre de gènes surexprimés	100 (sur environ 6000 gènes)
Catégories des gènes surexprimés	• Métabolisme énergétique (Glycolyse, lipolyse, cycle de Krebs) • Induction des protéines HSP • Protéines de transport (glucose, acides aminés, peptides, ammonium)
Nombre de gènes réprimés	274
Catégories des gènes réprimés	• Machinerie de synthèse protéique • Métabolisme des acides aminés et nucléiques • Reproduction et cycle cellulaire • Protéines de transport

Plus récemment, trois groupes de gènes impliqués dans la résistance à l'éthanol ont été mis en évidence (Lewis et al., 2010 ; Ma et Liu, 2010).

1. **Gènes d'expression constitutive essentiels pour la viabilité en présence d'éthanol:**

Il s'agit des gènes impliqués dans la synthèse de l'ergostérol, des acides gras et du tréhalose ainsi que dans la dégradation du glycogène.

2. **Gènes d'expression constitutive conférant une tolérance accrue:**

C'est le cas des gènes impliqués dans la synthèse de l'ergostérol, ainsi que d'autres gènes codant pour des enzymes du métabolisme énergétique et des protéines chaperonnes, dont le niveau d'expression peut, ou non, augmenter lors de l'exposition à l'éthanol.

3. **Gènes inductibles conférant une tolérance accrue:**

C'est le cas des facteurs de transcription qui règlent l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress éthanol. On trouve parmi ces facteurs le Msn2p et le Msn4p. L'activation de ces facteurs de transcription permet la modification du pH intracellulaire et la dimunition de la production d'AMPc (Garreau et al., 2000). De plus, la surexpression de ces facteurs de transcription permet aux mutants d'acquérir une résistance accrue à de nombreux facteurs de stress, dont l'éthanol (Ma et Liu, 2010).

Des séquences consensus caractérisent les gènes induits par ces facteurs de transcription au niveau de leur région promotrice CCCCT, AAAAG: ces séquences sont appelées STREs (*STress Reponsive Elements*).

Parmi les gènes induits, on trouve des gènes codant pour :

- des enzymes intervenant dans la synthèse du tréhalose *TPS1* et *TPS2* (van Voorst et al., 2006),

- des protéines chaperonnes (la famille des *HSP70, HSP12, HSP104*) (Ogawa et al., 2000)
- une enzyme intervenant dans la production de glycérol (*GPD1*) (Ogawa et al., 2000)
- une enzyme impliquée dans la réponse au stress oxydatif (*CTT1*) (Ogawa et al., 2000).

4. Synthèse du tréhalose

Le tréhalose joue un rôle important dans la tolérance aux divers stress cellulaires, parmi lesquels l'exposition à l'éthanol (Lucero et al., 2000; Mansure et al., 1994; Sharma, 1997). La levure répond à l'éthanol par l'augmentation de la production de tréhalose et l'activation des gènes impliqués dans sa production (Lucero et al., 2000).

Le tréhalose agit selon deux mécanismes d'action différents :

i. Quand un choc éthanol a lieu, son accumulation peut intervenir dans la prévention de la diminution de l'activité de l'eau. De plus, il peut jouer un rôle d'osmoprotecteur et constituer une phase gélifiée dans le cytoplasme**.** Par ailleurs, lorsqu'il est présent en quantités importantes, la cellule peut entrer en dormance du fait du ralentissement de son métabolisme (Wiemken, 1990).

ii. Le tréhalose interagit, par liaisons hydrogènes, avec les têtes polaires des phospholipides et pourrait contribuer ainsi à la protection de l'intégrité membranaires (Lucero et al., 2000; Pereira et al., 2004). Le tréhalose peut remplacer l'eau (et donc dans notre cas l'éthanol également) (Pereira et al., 2004). Ce remplacement donnerait lieu à une phase gélifiée à l'interface eau-membrane,

ce qui limite l'interdigitation de la bicouche lipidique suite à la formation de liaisons polaires à la surface de la membrane.

II.2. Effet du SO_2

Le dioxyde de soufre (SO_2) est un composé antimicrobien et l'additif le plus utilisé en vinification comme conservateur. Le SO_2 a bien amélioré les processus de fermentation en inhibant la croissance des bactéries et des levures indésirables. L'action antiseptique du SO_2 semble être spécifique pour la vinification: la plupart des bactéries et levures indésirables sont plus sensibles au SO_2 que la levure *S. cerevisiae* (Romano. et Suzzi 1993). Pendant le stockage, le SO_2 bloque le développement de tous les microorganismes (re-fermentation des vins doux, fermentation malo-lactique involontaire). Le dioxyde de soufre est fongistatique aux pH élevés et à faibles concentrations, et il est un fongicide aux faibles pH et à des concentrations élevées (Ribéreau-Gayon et al., 2012). La dose de SO_2 à utiliser dépend à la fois de la population initiale, de la population finale acceptée et de la vitesse de destruction souhaitée; mais l'efficacité précise dépend largement de facteurs difficilement calculables en fonction de la nature de la souche et son stade de développement (http://sn1.chez-alice.fr/vin/article/partie_2.htm).

a) Les différents états du dioxyde de soufre dans le vin:

Dans le vin, comme dans le moût, le SO_2 se trouve sous différentes formes: HSO_3^-, SO_3^{2-} et SO_2 moléculaire (Divol et al., 2012).

L'équilibre chimique entre les différentes formes de SO_2 est fortement dépendant du pH du vin. Le SO_2 moléculaire est la forme la plus répandue lorsque le pH est inférieur à 2 (pK_1=1.81); entre pH 2 et 7 (pK_2= 6.91) c'est l'anion bisulfite qui est le plus répandu et par contre de pH 7 à 10 c'est la forme sulfite (**Figure 5**).

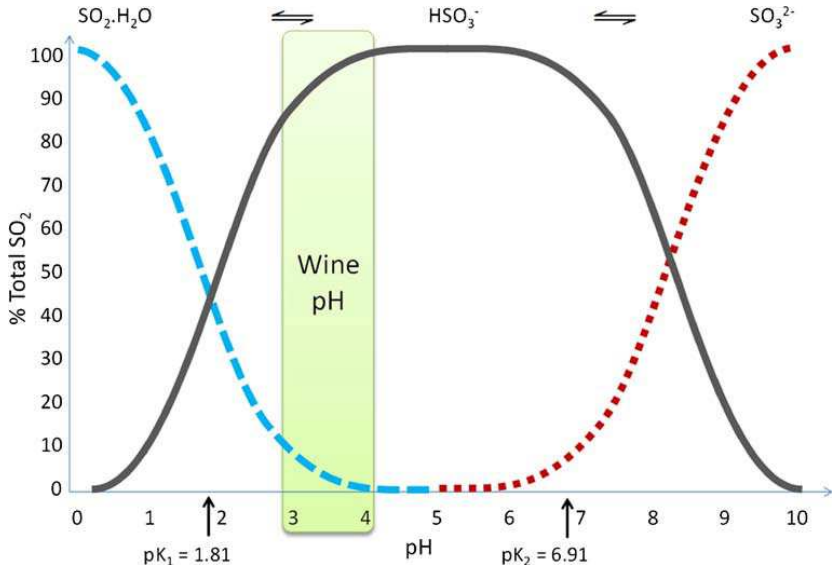


Figure 5. Les différentes formes du SO_2 dans une solution aqueuse représentées en pourcentage par rapport au SO_2 total et en fonction du pH du milieu. pK_1 est la constante de dissociation de la réaction chimique $SO_2\ H_2O \leftrightarrow HSO_3^- + H^+$ et pK_2 celle de la réaction $HSO_3^- \leftrightarrow SO_3^{2-} + H^+$ (Divol et al., 2012).

Etant donné que le pH du vin se situe entre 3 et 4, le SO_2 libre est principalement présent sous forme d'ion bisulfite (HSO_3^-) (**Figure 5**) même si cette forme montre une bonne activité à la fois contre les micro-organismes et contre l'oxydation, la forme la plus active du SO_2 est la forme moléculaire (SO_2) (Divol et al., 2012).

Différents composés (le glucose, le dihydroxyacétone-phosphate, l'acide oxaloacétique, le pyruvate, l'éthanal, l'acide alpha-cétoglutarique et l'acétaldéhyde) sont capables d'agir sur le SO_2 en se liant à sa forme moléculaire (Rankine et Pocock, 1969).

L'acétaldéhyde (Me-CHO), le plus réactif, interagit d'une manière stable avec l'ion bisulfite et sa présence réduit l'activité de l'additif (SO_2) par son action antimicrobienne et ses propriétés antioxydantes à la fois. La fraction de SO_2 liée par l'acétaldéhyde et d'autres composés représente la fraction combinée de l'additif proprement dit (**Figure. 6**).

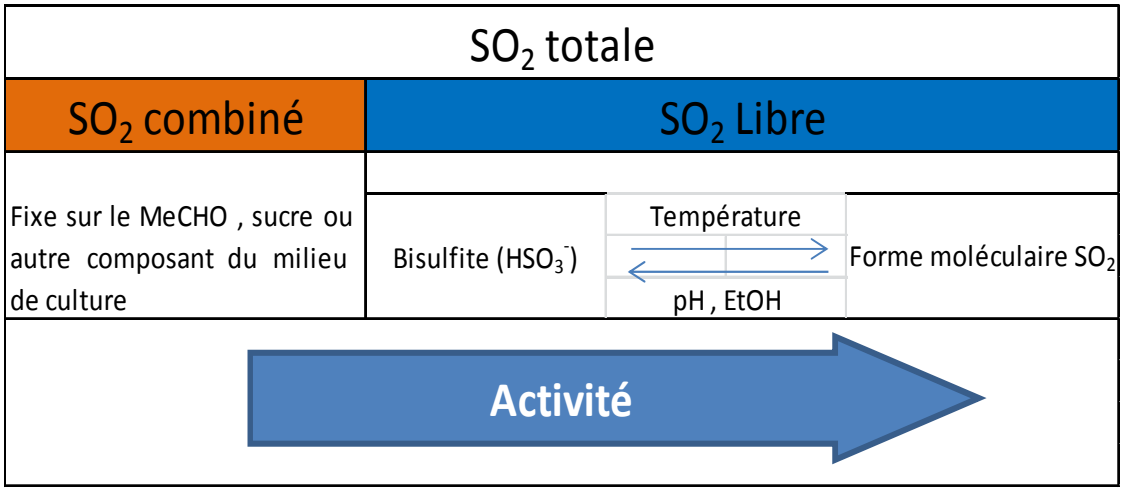


Figure 6: Différentes formes du dioxyde de soufre dans les moûts et les vins.

Comme le SO_2 moléculaire (H_2SO_3) est la forme la plus active du SO_2 dans le vin, il est essentiel pour les vinificateurs de connaître sa concentration. Malheureusement, il n'y a que les concentrations de SO_2 libre et totale qui peuvent être déterminées, contrairement à celles du SO_2 moléculaire qui nécessitent l'application de l'équation Henderson-Hasselbalch (Divol et al., 2012).

Si on néglige la faible concentration de SO_3^{2-} présent à pH du vin, la concentration moléculaire du SO_2 dans une solution aqueuse tamponnée à pH du vin est:

$$(SO_2 \text{ moléculaire}) = \frac{(HSO_3^-)}{10^{pH-pK1}}$$

Toutefois, vu que le SO_2 peut réagir avec un certain nombre de composés chimiques du vin; le SO_2 moléculaire peut être considéré seulement comme une petite fraction du SO_2 libre et non pas du SO_2 totale. Par conséquence, l'équation devient : (SO_2 moléculaire) $= \frac{(SO_2\ libre)}{1+10^{pH-pK1}}$

Pour des solutions aqueuses à 20°C, les valeurs de pK1 sont fournies par divers tableaux. Les valeurs de pK1 doivent être corrigées en fonction du pourcentage en alcool, de la température T (°C) et finalement de la force ionique I (= somme des activités des ions du milieu, en mole.L^{-1}) :

pK1= pH_M = pK_T – C avec :

pH_M = constnate de dissociation mixte

pH_T = Constante de dissociation thermodynamique

C= correction de force ionique et donc d'activité ionique

I= Force ionique (mole ; Litre)

$$C = \frac{A\sqrt{I}}{I + B\sqrt{I}}$$

Le calcul de l'activité ionique doit prendre en compte tous les ions, la température, l'alcool et le pH.

Or pour une valeur moyenne de force ionique (I) égale à 0,038 mole.L^{-1}, le pK1 est égal à 1,9499 + (Température -20) x 0,0322 + ((% éthanol) – 10) x 0,01971 (http://sn1.chez-alice.fr/vin/article/partie_4.htm).

b) Mode d'action du SO_2

L'entrée du SO_2 dans la cellule dépend de sa concentration dans le milieu et du pH. Le SO_2 n'agit à l'intérieur de la cellule que par l'intermédiaire de l'ion sulfite et/ou bisulfite. La concentration intracellulaire en SO_2 diminue quand le H_2SO_3 se dissocie en HSO_3^-, le SO_2 diffuse de nouveau à l'intérieur de la cellule jusqu'à ce que l'équilibre entre les concentrations intra et extracellulaires s'établit (Divol, 2004). Lorsque le pH est faible, la cellule transporte facilement, par diffusion, le SO_2 moléculaire à l'intérieur (Divol, 2004). Ce processus entraine une accumulation intracellulaire de HSO_3^- qui peut réagir sur les constituants de la cellule (Gunnison, 1981). Selon Anacleto et van Uden, (1982) la mort des cellules de *S. cerevisiae* par le SO_2 s'effectue en trois étapes:

- le SO_2 moléculaire se combine avec des récepteurs à la surface de la cellule.
- le changement d'activité du complexe récepteur.
- le SO_2 entraîne des dommages sur la membrane plasmique.

En effet le SO_2 inhibe la croissance microbienne en interférant avec les processus intracellulaires. Le SO_2 est une molécule très réactive et peut se lier à de nombreux métabolites et enzymes dans la cellule (Rankine et Pocock, 1969; Divol et al., 2012). Il peut ainsi se combiner au glucose, au dihydroxyacétone-phosphate, à l'acide oxaloacétique, au pyruvate, à l'éthanal et à l'acide alpha-cétoglutarique (Rankine et Pocock, 1969). De plus, le SO_2 peut inhiber la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), une enzyme essentielle dans la voie de la glycolyse (Hinze

et Holzer, 1986). Cette enzyme est responsable de la conversion de la glycéraldéhyde-3-phosphate en D-glycerate-1,3-bisphosphate (Divol et al., 2012). L'inhibition de GAPDH aboutit au blocage de la glycolyse et de la production de NADH (Divol et al., 2012). De plus, une chute de la concentration en adénosine triphosphate (ATP) dans la cellule lors d'une exposition au SO_2 a été observée (Freese et al., 1973; Schimz, 1980) à travers l'inactivation de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Park et Bakalinsky, 2000a).

Selon Maier et al. (1986), l'élimination du stress sulfite au niveau de la cellule, par l'addition d'acétaldéhyde dans le milieu, provoque une augmentation de 70% du niveau d'ATP par rapport à son niveau initial. De part la haute affinité des sulfites à l'acétaldéhyde, la formation de l'éthanol est inhibée. D'autres enzymes telles que l'ATPase, l'alcool déshydrogénase et la NAD^+-glutamate déshydrogénase sont inhibées par le sulfite (Maier et al., 1986). L'expression de l'*ALD6* (codant pour un acétaldéhyde déshydrogénase) est altérée en présence de sulfite (Aranda et al., 2006).

L'expression de *MET16* (codant pour une 3'-phosphoadenylylsulfate (PAPS) réductase, une enzyme impliquée dans la voie métabolique du sulfate) est fortement réduite par le SO_2 (Aranda et al., 2006). Outre l'inhibition des enzymes métaboliques, le sulfite se lie également aux protéines (destruction du pont disulfure), aux coenzymes (NAD^+ et FAD^+) et aux co-facteurs tels que la thiamine, les vitamines et la menadione (Carmack et al., 1950). Il a également été montré que le sulfite peut-être la cause des mutations ponctuelles au niveau de l'ADN en changeant A/T en C/G (Beech et Thomas, 1985; Meng et Zhang, 1992; Mukai et al., 1970; Pagano et Zeiger, 1987).

c) Les mécanismes de résistance aux sulfites chez *S. cerevisiae*

S. cerevisiae a été utilisée comme un organisme modèle pour étudier la réponse de la levure au stress sulfite (Park et Bakalinsky, 2000b). Les différentes études réalisées au niveau des bactéries, des levures et de cellules de mammifères ont montré la présence de différents mécanismes de résistance cellulaire contre le stress sulfite:

- la réduction de la teneur en soufre (Kobayashi et Yoshimoto, 1982; Yoshimoto et Sato, 1968)
- l'oxydation du soufre (Feng et al., 2007)
- la production d'acétaldéhyde (Stratford et al., 1987)
- la sulfitolyse (Mannervik et al., 1974)
- l'efflux actif de SO_2 par une pompe, Ssu1p (Park et Bakalinsky, 2000b).

Réduction du dioxyde de soufre

Le soufre est l'un des éléments essentiels pour la croissance des levures où il intervient dans la synthèse des acides aminés soufrés tels que la méthionine, la S-adénosyl-méthionine et la cystéine (Divol et al., 2012). La voie de la biosynthèse des acides aminés soufrés (BAAS) joue un rôle essentiel dans le transport actif du sulfate (SO_4^{2-}) dans la cellule à l'aide des protéines membranaire telle que la Ssu1p (Divol et al., 2012).

Les gènes *MET3, MET14, MET16 et MET5/MET10* codent respectivement pour les enzymes catalytiques suivantes : l'ATP sulfurylase, la cyclase-sulfate kinase, la PAPS

réductase et les deux sous-unités de la sulfite réductase permettant de catalyser le SO_4^{2-} en S^{2-} (Divol et al., 2012) (**Figure. 7**). Le sulfure (S^{2-}) ainsi obtenu, peut être soit utilisé dans la synthèse des acides aminés soufrés tel que la méthionine et la cystéine, soit excrété sous forme de H_2S (**Figure 7**).

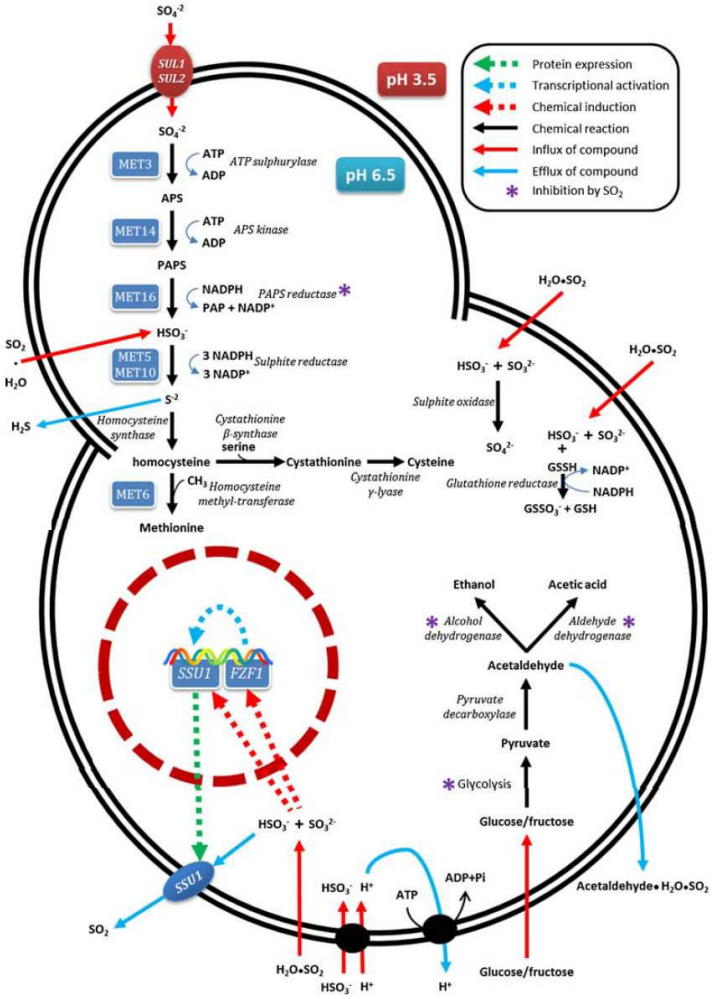


Figure 7: Schéma synthétique de la voie d'assimilation du sulfate ainsi que les réponses cellulaires de *S. cerevisiae* en présence de SO_2 moléculaire (Divol et al., 2012).

En outre, ces acides aminés soufrés, particulièrement la méthionine, règle négativement la voie BAAS. Aranda et al., (2006) ont en effet démontré qu'une concentration élevée de méthionine permet de diminuer la résistance cellulaire au SO_2. Ce qui a permis de conclure que le HSO_3^- est un métabolite intermédiaire dans la voie BAAS (Divol et al., 2012).

De plus, la concentration de l'adénine améliore la résistance cellulaire au SO_2. Aranda et al., (2006) ont montré que la présence de soufre ou de méthionine permet de diminuer l'expression de l'*ADE4*, un gène codant pour une enzyme impliquée dans le métabolisme de l'adénine.

Oxydation

L'oxydation du SO_2 dans les cellules eucaryotes est en général mal documenté, mais elle a été largement étudiée chez les bactéries, en particulier chez les Thiobacilles (Kappler et al., 2000; Suzuki et Silver, 1966). Jusqu'à aujourd'hui, aucune sulfite oxydase n'est décrite chez *S. cerevisiae* (Divol et al., 2012; Xu et al., 1994). Par contre, un complexe enzymatique possédant du thiosulfate et présentant des activités d'oxydation du soufre a été caractérisé chez la levure *Rhodotorula* (Kurek, 1985).

Production d'acétaldéhyde

L'acétaldéhyde chez la levure est produit durant la décarboxylation du pyruvate par la pyruvate décarboxylase et lors de la fermentation anaérobie.

L'acétaldéhyde est biologiquement toxique à des niveaux élevés et peut former des liaisons covalentes avec l'ADN et être la cause de mutations ponctuelles de l'ADN (Wang et al., 2000). L'impact de l'acétaldéhyde sur la fermentation est dû à sa forte

affinité pour le SO_2 libre, ce qui aboutit donc à réduire le stress sulfite sur les bactéries ainsi que sur les levures au cours de la fermentation (**Figure. 7**). L'acétaldéhyde est ainsi l'un des plus importants composés se combinant au SO_2 dans le vin. L'augmentation des concentrations d'acétaldéhyde (Liu et Pilone, 2000) et d'autres composés, contraignants du SO_2 tels que l'acide pyruvique et de l'acide α-cétoglutarique (produits et excrétés par les levures en présence de SO_2) a déjà été observé (Divol et al., 2012).

Sulfitolyse

Il a été montré qu'une résistance accrue au SO_2 est généralement corrélée positivement avec l'activité de la glutathion réductase ainsi que la concentration en glutathion (Casalone et al., 1989). Le glutathion pourrait être impliqué dans la détoxification du SO_2 via une réaction appelée «sulfitolyse » (Mannervik et al., 1974) (**Figure. 7**).

$$\mathbf{GSSG + HSO_3^- \rightarrow GSSO_3^- + GSH}$$

Dans cette équation, GSSG représente la forme oxydée du glutathion, GSH la forme réduite et $GSSO_3$ le glutathion-S-sulfonate (Divol et al., 2012). Chez *S. cerevisiae*, la glutathion réductase est codée par le gène *GLR1* et constitue l'élément catalyseur de cette réaction. Casalone et al. (1992) ont montré que le GSH n'augmente pas suite à l'exposition au SO_2 et que la concentration en glutathion (**GSSG**) ne diminue pas (Xu et al., 1994). Ainsi le rôle de la sulfitolyse dans la désintoxication du SO_2 est mise en doute (Divol et al., 2012).

L'efflux actif du SO_2 par la Ssu1p

D'un point de vue moléculaire, la résistance des souches de levures au SO_2 est attribuée au gène *FZF1* (Casalone et al., 1992) codant pour un facteur de transcription présentant cinq « doigts » de zinc (Avram et Bakalinsky, 1997). La surexpression du gène *FZF1* permet de supprimer le phénotype de sensibilité au SO_2 chez des mutants, notamment ceux déficients pour le gène *GRR1*. L'expression du gène *GRR1* présente des fonctions multiples (transport du glucose et répression par le glucose, expression du gène *SUC2*, transport de cation divalent, turnover des cyclines G1, suppression de la mutation *BEM2* influençant la morphologie des cellules).

Fzf1p est un facteur de transcription qui active le promoteur du gène *SSU1* (Avram et al., 1999) codant pour une protéine transmembranaire (Ssu1p) (**Figure. 7**). La présence de sulfites dans les milieux de croissance permet d'augmenter le niveau d'expression de *SSU1* (Nardi et al., 2010). Par ailleurs, les cellules déficientes en *SSU1* accumulent davantage de SO_2. Ces observations ont conduit à décrire que la protéine Ssu1p était une «pompe à sulfite» capable d'expulser les excès de SO_2 à l'extérieur de la cellule (Avram et Bakalinsky, 1997). Les différents transporteurs multi-drogues connus chez les levures ont tous un site de fixation de l'ATP, ce qui n'est pas le cas pour le gène *SSU1* (Divol, 2004). Ce transporteur utilise donc l'énergie (ATP) indirectement pour expulser le SO_2 à l'extérieur de la cellule (Divol, 2004).

III. Viabilité cellulaire et Etat VNC.

La viabilité cellulaire est définie comme la capacité d'exécuter toutes les fonctions nécessaires pour la survie dans des conditions données, de se reproduire et former une colonie. La notion de viabilité renvoie à des éléments ou fonctions nécessaires et suffisantes pour qu'une cellule demeure viable (Breeuwer et Abee, 2000):

i. Une membrane cytoplasmique intacte qui fonctionne comme une barrière entre le cytoplasme et l'environnement extracellulaire.
ii. Transcription de l'ADN et traduction des ARN.
iii. Génération d'énergie afin de maintenir le métabolisme cellulaire et synthétiser les principaux composants cellulaires.

La détermination de la viabilité d'un microorganisme peut être complexe puisque dans une suspension cellulaire, les cellules peuvent se trouver dans plusieurs états physiologiques en fonction des conditions de culture et de l'environnement extracellulaire: viables, viables mais non cultivables (VNC), actives, stressées, endommagées, «revivifiables», «moribondes» ou mortes (Kell et al., 1998).

Il a été décrit que les bactéries sporulantes (telles que *Bacillus, Clostridium, Sporosarcina*) en conditions défavorables produisent des structures particulières: les endospores. Ces cellules dites «dormantes» sont particulièrement résistantes à la chaleur, aux UV, aux agents chimiques ou encore à la dessiccation et peuvent maintenir leur viabilité pendant de longues périodes, en attendant des conditions favorables pour germer (Alleron, 2008).

Par contre, certaines bactéries non-sporulantes, quant à elles, utilisent une autre voie lorsqu'elles sont exposées à des conditions hostiles (Östling et al., 1993). Cet état, caractérisé par la différence entre la viabilité et l'activité d'un microorganisme a conduit à la proposition de l'existence d'un état «viable mais non cultivable» (VNC), désigné par Xu et al., (1982) comme représentant une stratégie des cellules non sporulantes pour répondre à des conditions hostiles. Cet état a été décrit pour la première fois chez *Vibrio cholerae* (Xu et al., 1982).

Le terme «viable mais non cultivable» (VNC) a été ainsi inventé pour décrire un état à partir duquel les microorganismes ne peuvent pas être récupérés (cultivés), mais dans lequel ils maintiennent certaines caractéristiques de cellules viables, telles que l'intégrité cellulaire et l'activité métabolique. Il semble exister un constat commun: les microorganismes dans des conditions environnementales ou de laboratoire peuvent entrer dans un tel état "VNC" (McDougald et al., 1998; Oliver et al., 1995; Roszak et al., 1984). Cet état «non récupérable» a souvent été interprété comme une conséquence de la dormance. Il doit être souligné que la dormance est par définition un phénomène réversible et que les cellules dormantes sont donc généralement inactives et cultivables (Kaprelyants et Kell, 1993a). Par contre une cellule en état VNC n'est pas une cellule en dormance; elle est métaboliquement active mais incapable de réaliser la division cellulaire (Yamamoto, 2000).

IV. Caractéristique de l'état VNC

Le concept d'organisme viable non cultivable n'a été admis par la communauté scientifique que très récemment comme une stratégie de survie (Oliver et al., 1995). Les cellules en état VNC sont incapables de croître sur les milieux de culture conventionnels mais possèdent néanmoins une activité métabolique (Yamamoto, 2000). Cet état est complexe et sa définition est très controversée. En effet, cette définition s'applique à deux états physiologiques différents:

- potentiellement réplicatives c'est-à-dire pouvant retrouver leur capacité à être cultivables si des conditions spécifiques sont rencontrées; ce qui conduit à la «ressuscitation» ou «réveil» des cellules (Divol et Lonvaud-Funel, 2005; McDougald et al., 1998; Millet et Lonvaud-Funel, 2000). Ce réveil est la démonstration de l'existence d'un état VNC chez l'espèce microbienne considérée. Dans ce cas, l'état VNC constituerait donc une stratégie de survie vis-à-vis des conditions défavorables de l'environnement (Colwell, 2000).

- en phase de transition, de la vie vers la mort cellulaire, au cours de laquelle ces cellules possèdent encore des signes d'activité métabolique et de respiration mais se dégradent progressivement (Yamamoto, 2000).

Les facteurs pouvant induire ou influencer l'état VNC sont variés (Gauthier, 2000; Su et al., 2013): les conditions oligotrophes (Lothigius et al., 2010; Rezaeinejad et Ivanov, 2011; Bukh, 2012), la température (Oliver et al., 1995; Trevors et al., 2012; Xu et al., 1982), la salinité (Pinto et al., 2011; Roth et al., 1988), la teneur en oxygène (Gauthier,

2000), la nutrition (Oliver et Wanucha, 1989), la lumière UV (Chen et al., 2012), les polluants organiques et les métaux lourds (Divol et al., 2012; Zhang et al., 2012) et l'aération (Rollins et Colwell, 1986).

Les microorganismes en état VNC peuvent subir des variations dramatiques dans leur morphologie et leur physiologie (Su et al., 2013). Des transformations cellulaires telles que la réduction de la taille des cellules, la diminution de la quantité d'ARN, la condensation du cytoplasme, l'incapacité à se multiplier ou encore la réduction de l'activité métabolique caractériseraient cet état VNC (McDougald et al., 1998; Tangwatcharin et al., 2006). De plus, l'état VNC est caractérisé par une diminution de la synthèse des macromolécules, une chute de la respiration jusqu'à un niveau indétectable (Morgan et al., 1991), la synthèse de peptidoglycanes (Nyström et Kjelleberg, 1989), un changement dans la composition lipidique des membranes (Linder et Oliver, 1989) ainsi que dans la composition des parois cellulaires (McDougald et al., 1998; Signoretto et al., 2000) et par une réduction de la taille des cellules, démontrées par de nombreux auteurs dont Rollins et Colwell, (1986) et Serpaggi et al., (2012). Au cours du passage en état VNC, les cellules assurent la maintenance de leur ADN (Lázaro et al., 1999).

L'état VNC survient majoritairement dans la phase de survie après la phase stationnaire. Plus de 60 espèces bactériennes sont décrites comme étant capables d'entrer en état VNC (**Tableau. 2**), incluant de nombreux pathogènes humains, Gram positifs (*Listeria monocytogenes*, *Enterocoques*, *Micrococcus luteus*, …) et Gram négatifs (*Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Legionella pneumophila*, *Campylobacter jejuni*,

Salmonella enterica, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, …) (Oliver, 2005; Su et al., 2013).

Tableau 2: Bactéries décrites comme entrant en état VNC (Oliver, 2005)

Aeromonas salmonicida	*Escherichia coli* (including EHEC)	*Pasteurella piscida*	*S. sonnei*
Agrobacterium tumefaciens	*Francisella tularensis*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Sinorhizobium meliloti*
Alcaligenes eutrophus	*Helicobacter pylori*	*P. fluorescens*	*Streptococcus faecalis*
Aquaspirillum sp.	*Klebsiella aerogenes*	*P. putida*	*Tenacibaculum sp.*
Burkholderica cepacia	*K. pneumonia*	*P. syringae*	*Vibrio angutilarum*
B. pseudomallei	*K. planticola*	*Ralstonia solanacearum*	*V. campbelli*
Campylobacter coli	*Lactobacillus plantarum*	*Rhisobium leguminosarum*	*V. cholerae*
C. jejuni	*Lactococcus lactis*	*R. meliloti*	*V. fisheri*
C. lari	*Legionella pneumophila*	*Rhodococcus rhodochrous*	*V. harveyi*
Cytophaga allerginae	*Listeria monocytogenes*	*Salmonella enteritidis*	*V. mimicus*
Enterobacter aerogenes	*Micrococcus flavus*	*S. typhi*	*V. natriegens*
E. cloacae	*M. luteus*	*S. typhimurium*	*V. parahaemolyticus*
Enterococcus faecalis	*M. varians*	*Serratia marcescens*	*V. proteolytica*
E. hirae	*Mycobacterium tuberculosis*	*Shigella dysenteria*	*V. shiloi*
E. faecium	*M. smegmatis*	*S. flexneri*	*V. vulnificus* (types 1 et 2)

En ce qui concerne les cellules eucaryotes, les connaissances approfondies sur l'état VNC sont quasiment inexistantes. L'une des premières études à poser l'hypothèse d'un état VNC chez des cellules eucaryotes est celle de Millet et Lonvaud en 2000 portant sur la levure *Brettanomyces* (Millet et Lonvaud-Funel, 2000). Mais des études plus récentes ont montré que le sulfitage du vin entrainait sans doute un état VNC chez cette levure de contamination *Brettanomyces* (Agnolucci et al., 2010; Serpaggi et al., 2012; du Toit et al., 2005). En se basant sur des études où le temps d'observation étaient de courte durée, un état comparable à celui de cellules bactériennes en état VNC avait déjà été supposé

chez *Saccharomyces cerevisiae* (Divol et Lonvaud-Funel, 2005; Guillou et al., 2003; del Mar Lleo et al., 2000).

V. «Ressuscitation», la clé de l'hypothèse VNC

La possibilité de «ressuscitation» des microorganismes ayant adopté l'état VNC est une condition *sine qua non* à la validation de l'hypothèse VNC (Oliver, 1993). Un certains nombres de chercheurs ont observés *in vitro, in vivo et in situ* le phénomène de «ressuscitation» des cellules en état VNC, tandis que d'autres n'ont pas réussi à induire ce phénomène (Jacob, 2010; Villarino et al., 2000) (**Tableau. 3**).

Tableau 3. Exemples de travaux soutenant ou non l'hypothèse de la « ressuscitation»

Organismes	Références qui supportent la ressuscitation	Références qui ne supportent pas la ressuscitation
Vibrio cholera	(Alam et al., 2006; Louis et al., 2003)	
Campylobacter jejuni	(Cappelier et al., 1999; Guillou et al., 2008)	(Medema et al., 1992; Verhoeff-Bakkenes et al., 2008)
Listeria monocytogenes	(Cappelier et al., 2007)	(Cappelier et al., 2005)
Eewinia anylovora	(Ordax et al., 2006)	
Escherichia coli O175H	(Mizunoe et al., 1999)	(Kolling et Matthews, 2001)
Legionella pneumophila	(Steinert et al., 1997)	
Ralstonia soanacaerum	(Grey et Steck, 2001)	
VIbrio alginolyticus	(Baffone et al., 2003)	
Streptococus parauberis	(Currás et al., 2002)	
Prolinoborus fassiculus		(Koechlein et Krieg, 1998)
Escherichia coli K-12		(Bogosian et al., 1996)

L'un des problèmes rencontrés avec les expériences de ressuscitation est la difficulté de prouver que la croissance observée est due à une vraie ressuscitation des cellules de

l'état VNC et non pas à une simple recroissance de quelques cellules cultivables (Jacob, 2010). De nombreux chercheurs affirment que la terminologie «ressuscitation» elle-même est fausse car les cellules en VNC ne peuvent pas devenir cultivables sous n'importe quelle condition (Barer, 1997).

Par contre, de nombreuses études ont montré la présence d'une «ressuscitation» après l'addition de nutriments aux cellules considérées comme en état VNC. Cependant, certains auteurs expliquent que le phénomène observé est dû à la présence d'une faible concentration résiduelle de cellules cultivables qui se développent et se divisent simplement en réponse à l'addition des nutriments (Barer et Harwood, 1999; Jacob, 2010; Kell et al., 1998; M. R. Barer, 1993). D'autres études ont montré que l'addition de nutriments sur des populations non cultivables ne permet pas d'observer la «ressuscitation» de ces cellules non cultivables (Bogosian et al., 1996, 1998). Il a été suggéré que la présence de cellules cultivables est indispensable pour la production d'un facteur qui permet de déclencher la ressuscitation chez les cellules non cultivables (Votyakova et al., 1994). Une telle hypothèse ne peut pas être étudiée sur des cultures pures, car il ne suffit pas simplement de mélanger des cellules cultivables avec des cellules non cultivables, car il est impossible de déterminer si la ressuscitation observée est le résultat de la multiplication des cellules cultivables après l'addition de nutriments. La méthode 'mixed culture recovery' (MCR) a donc été développée par Bogosian et al. (1998) pour répondre à cette hypothèse ainsi que pour déterminer si la ressuscitation des cellules non cultivables est due à un vrai phénomène de ressuscitation et non pas une

simple croissance de cellules cultivables résiduelles. Cette technique est basée sur l'utilisation de souches bactériennes distinguables entre elles par des marqueurs génétiques bien déterminés. Le test MCR, consiste à ajouter des souches bactériennes cultivables à une grande population de cellules non cultivables (**Figure. 8**).

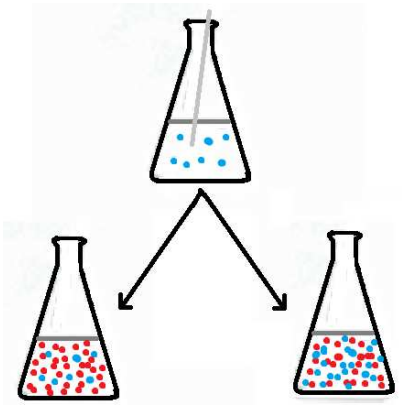


Figure. 8 Schéma représentatif du test mixed culture recovery (MCR). Le flacon en haut contient des cellules non cultivables (bleu) en suspension dans un milieu nutritif approprié pour leur croissance. Un petit nombre de cellules cultivables (rouge) est ajouté. Soit les cellules non cultivables ressuscitent et deviennent de nouveau cultivables, une augmentation de la population cellulaire (bleu) doit être observée (flacon en bas à droite) ; soit la croissance est limitée seulement aux cellules cultivables, sans aucun changement au niveau des cellules non cultivables (flacon en bas à gauche) (Bogosian et Bourneuf, 2001).

Après l'addition de nutriments et une période d'incubation, la culture obtenue est étalée sur un milieu gélosé, sur lequel les souches forment des colonies pouvant être discriminées visuellement. L'application du test MCR à plusieurs espèces bactériennes a montré que l'addition de nutriments ne permet la croissance que des cellules qui sont déjà cultivables, sans avoir aucun effet sur les cellules non cultivables (Bogosian et al., 1998). Ces résultats suggèrent que les cellules non cultivables sont des cellules mortes et que la ressuscitation est due simplement à la croissance des cellules cultivables résiduelles.

Une hypothèse développée par Whitesides et Oliver, (1997) propose que le phénomène observé lors du test (MCR) est lié à la présence de certains facteurs dans les nutriments ajoutés qui empêcheraient la ressuscitation des cellules non cultivables. Whitesides et Oliver, (1997) ont rapporté que les cellules non cultivables peuvent être ressuscitées par une simple élimination du stress induisant l'état VNC. Leur étude a été réalisée sur la bactérie *Vibrio vulnificus*, l'organisme devenu le paradigme de l'hypothèse VNC (Oliver, 2005). *V. vulnificus* a une température optimale de croissance de 37°C, et devient rapidement non cultivable à des températures inférieures à 5°C. Ces cellules non cultivables de *V. vulnificus* ainsi obtenues sont redevenues cultivables une fois la température élèvée à 37°C. Ce qui a permis à Whitesides et Oliver, (1997) de conclure, pour la première fois, la présence d'une vraie ressuscitation chez les bactéries.

Du Toit et al., (2005) ont mis en évidence chez *Brettanomyces bruxellensis*, l'entrée et la sortie d'un tel état en fonction de la concentration en oxygène dissous dans le vin. Dans le cas de cellules de *Brettanomyces bruxellensis* (Agnolucci et al., 2010) et de *S. cerevisiae* (Divol et Lonvaud-Funel, 2005) en état VNC induit par l'ajout de SO_2, la croissance de ces cellules sur gélose a été à nouveau possible suite à une culture en milieux liquides nutritifs de plusieurs jours permettant de modifier l'état physiologique des cellules. Récemment Serpaggi et al. (2012) ont montré la présence de l'état VNC chez *Brettanomyces bruxellensis* suite à un stress SO_2, et une «ressuscitation» est observée après élimination du stress SO_2.

Des études menées sur bactéries ont permis d'identifier certains facteurs impliqués dans le phénomène de «ressuscitation». Ces facteurs sont nommés «Ressuscitation promoting factors (Rpfs)». Ces protéines (Rpfs) ont été décrites pour la première fois comme des facteurs essentiels pour l'induction de la ressuscitation chez *Mycobacterium. tuberculosis* et *M. smegmatis* (Gupta et Srivastava, 2012a; Gupta et al., 2010; Mukamolova et al., 1998; Shleeva et al., 2002). L'observation de la séquence et de la structure de ces Rpfs a permis de mettre en évidence l'existence d'un domaine conservé de 70 résidus communs à toutes les protéines Rpf-like: le domaine Rpf (Cohen-Gonsaud et al., 2005; Gupta et Srivastava, 2012a) (**Tableau. 4**).

Tableau 4 Distribution des gènes *rpf*-like chez différents organismes (Gupta et Srivastava, 2012a)

Organisme	Taille du Génome (Mb)	Nombre des gènes *rpf*-like
Corynebacterium diphtheriae	2.5	3
Corynebavterium glutamicum	3.3	2
Corynebacterium efficiens	3.1	2
Micrococcus luteus	2.3	1
Mycobacterium avium	4.7	4
Mycobacterium bovis	4.3	5
Mycobacterium leprae	3.3	3
Mycobacterium marinum	6.5	4
Mycobacterium smegmatis	7	4
M. tuberculosis H37Rv	4.4	5
Streptomyces coelicolor	8.7	5
Streptomyces avermitilis	9	6

Toutes les protéines Rpfs possèdent un domaine lysozyme (Famille CAZy: GH22) et un domaine glutamate (Cohen-Gonsaud et al., 2005; Gupta et Srivastava, 2012a). Cette ressemblance avec le lysozyme type C ainsi que les études menées par Mukamolova et

al., (2006) indiquent qu'au moins certaines protéines Rpfs sont des hydrolases de peptidoglycanes, impliquées dans la digestion de la paroi cellulaire et la division cellulaire et qui permettraient d'activer la ressuscitation par un mécanisme encore inconnu (Cohen-Gonsaud et al., 2005; Gupta et Srivastava, 2012a; Gupta et al., 2010; Hett et al., 2007).

Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer comment l'hydrolyse de peptidoglycanes peut induire la ressuscitation chez les cellules en état VNC (Cohen-Gonsaud et al., 2005; Ravagnani et al., 2005). Le premier modèle montre que les fragments de peptidoglycanes agissent comme des cytokines en se liant à des récepteurs entraînant la croissance (Cohen-Gonsaud et al., 2005; Gupta et Srivastava, 2012b). Mais jusqu'à présent aucun récepteur n'a pu être identifié.

D'autre part, il a été également proposé que les protéines Rpfs supprimeraient le blocage de la division cellulaire (Ravagnani et al., 2005). Ce modèle suggère que les protéines Rpfs sont régulièrement produites au cours de la croissance cellulaire, mais réduites en période de dormance, ce qui limite ou bloque la division cellulaire (Ravagnani et al., 2005).

Finalement jusqu'à présent, aucune étude n'a permis de valider d'une manière définitive la ressuscitation des cellules en état VNC (Jacob, 2010).

VI. Distinction entre cellules endommagées et cellules en état VNC

La blessure ou lésion cellulaire est définie comme une sensibilité accrue aux composants de milieux de croissance qui ne sont pas normalement des facteurs inhibiteurs de croissance (Fratamico et al., 2005; Ray, 1989). L'état lésion cellulaire est transitoire, résultant d'un dommage cellulaire cumulatif, et peut être réversible dans des conditions appropriées pour permettre à la cellule endommagée de reprendre sa croissance. Par contre, la mort cellulaire est définie par l'incapacité d'une cellule à reprendre sa croissance.

En revanche l'hypothèse de l'état VNC présente un programme de différenciation spécifique à long terme dans un état de survie contrairement à la lésion cellulaire qui est caractérisée par la dégénérescence à court terme. En outre, la « ressuscitation » de l'état VNC est définie comme la conversion des cellules non cultivables en cellules cultivables sans aucun changement dans le nombre de cellules totales. Cette différence entre la lésion et l'état VNC, et entre re-croissance et «ressuscitation», doit être maintenue pour valider l'hypothèse VNC et pour conserver son identité unique (**Figure. 9**).

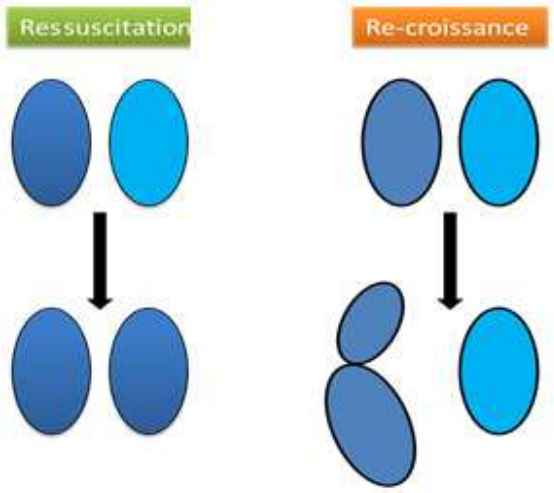


Figure 9: Schéma explicatif de la re-croissance et de la « ressuscitation ». Un mélange de cellules cultivables (cellules en bleu foncé) et non cultivables (cellules en bleu clair) est soumis à la ressuscitation. A gauche : vraie ressuscitation, les cellules non cultivables deviennent cultivables sans aucun changement dans le nombre de cellules totale. A droite : recroissance, seules les cellules cultivables reprennent leur croissance (Bogosian et Bourneuf, 2001).

VII. L'état VNC en domaine œnologique

L'environnement viti-vinicole rassemble des conditions pouvant engendrer des situations de stress vis-à-vis des microorganismes (notamment : la présence d'alcool, de SO_2). En œnologie, l'état des connaissances concernant l'état VNC est limité. Millet et Lonvaud-Funel, (2000) montrent que dans certaines conditions, des bactéries, mais également des levures, dont le genre *Brettanomyces*, sont capables de survivre dans un état physiologique VNC. En conditions de stress, ces levures *Brettanomyces* deviennent très petites et peuvent traverser des membranes de 0.45µm (Millet et Lonvaud-Funel, 2000).

De plus, lors d'une étude écologique menée au cours de la fermentation alcoolique de vins liquoreux, Mills et al., (2002) émettent l'hypothèse d'un état VNC après détection de *Candida stellata* par des méthodes excluant la culture préalable des cellules. L'existence de cet état chez *B. bruxellensis* a également été suggérée (du Toit et al., 2005). Il a été démontré que le SO_2 est un facteur de stress chimique induisant l'état VNC chez *B. bruxellensis*, correspondant à des cellules vivantes cultivées dans du vin synthétique pourvues d'activités métaboliques, mais incapables de se développer sur des milieux solides de dépistage (Agnolucci et al., 2010; Serpaggi et al., 2012).

Serpaggi et al., (2012) ont également caractérisé l'état VNC chez *B. bruxellensis* à un niveau protéomique par électrophorèse bidimensionnelle et par spectrométrie de masse. Ils ont montré que lorsque les cellules sont en état VNC, elles accumulent diverses enzymes impliquées directement ou indirectement dans la voie de la glycolyse.

del Mar Lleo et al. (2000) avaient déjà suggéré pour *S. cerevisiae*, l'existence d'un état comparable à celui décrit chez les bactéries. Millet, (2001) suggère la possibilité d'existence d'un état VNC pour expliquer les re-fermentations dans les vins liquoreux, et en tout cas, pour expliquer l'apparente stérilité du vin avant une nouvelle découverte d'activité microbienne. Plus récemment encore, Guillou et al., (2003) ont observé une perte de cultivabilité mais pas de viabilité chez *S. cerevisiae*, suite à un choc électrolytique de faible ampérage, décrivant ainsi un état comparable à l'état VNC bactérien. De même, Bleve et al., (2003) ont détecté la présence de levures de l'espèce *S. cerevisiae* dans des aliments pasteurisés dans un état similaire à celui de l'état VNC.

De plus, la perte de la cultivabilité chez *S. cerevisiae* a été observée suite à un stress sulfite (Divol et Lonvaud-Funel, 2005) mais par contre aucune étude n'a permis de valider que la reprise de la cultivabilité observée lors de la ressuscitation n'est pas due à la présence de cellules résiduelles cultivables qui se développent et se divisent. Il faut encore mentionner que les processus de ressuscitation ont été réalisés seulement avec des cultures qui étaient en état VNC dans les plupart des cas pour une courte période de temps.

De plus, d'autres études ont montré des modifications transcriptionnelles et protéiques au niveau de cellules de *S. cerevisiae* suite à un stress sulfite ou oxydatif (Kim et al., 2007; Park et Hwang, 2008). Des modifications sont présentées par une surproduction de protéines antioxydantes chez *S. cerevisiae* (Kim et al., 2007) et *Brettanomyces* (Serpaggi et al., 2012), ainsi qu'une induction de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des carbohydrates (Park et Hwang, 2008). Selon l'étude de Park et Hwang, (2008) les gènes réprimés suite à un stress SO_2 sont pour la plupart impliqués dans la croissance cellulaire et la transcription, ce qui reflèterait un arrêt de la croissance permettant à la cellule d'économiser de l'énergie.

En conséquence, en se basant sur l'étude réalisée par Divol et Lonvaud-Funel, (2005) ainsi que sur les modifications observées chez *S. cerevisiae* lors d'un stress oxydatif, on peut conclure que le stress sulfite est par conséquent à l'origine d'une entrée en VNC.

Finalement beaucoup d'études ont été réalisées sur différents microorganismes procaryotes afin de confirmer l'existence de l'état VNC. En revanche, c'est encore loin

d'être le cas pour les cellules eucaryotes chez lesquelles les connaissances sur l'état VNC sont quasiment inexistantes.

VIII. Technique pour la détection des VNC.

Les phénomènes centraux ayant conduit à la proposition de l'état VNC nécessitent encore des explications et restent le point de départ pour des expérimentations et discussions :

- La détection d'une certaine forme d'activité dans les cellules qui ne pouvaient pas être amenées à se reproduire et donc ne donnent pas lieu à des colonies.

- La capacité des cellules qui, toutes classées comme «non cultivables», ont retrouvé leur capacité de croissance détectable par des techniques de microbiologie classique.

Diverses méthodes ont été employées pour examiner la viabilité des cellules non cultivables. Cependant, il n'existe pas une méthode unique qui convienne pour tous les cas (Barcina et Arana, 2009; Colwell, 2009; Trevors, 2011).

La viabilité d'un microorganisme peut être évaluée directement dans la population cellulaire (analyse globale) ou d'une manière individuelle (analyse cytologique) (Bleve et al., 2003; Bogosian et al., 1998; Davey et Kell, 1996; Guillou et al., 2003; Kell et al., 1998; McDougald et al., 1998; Mills et al., 2002; Teixeira et al., 2002) **Tableau 5**.

Tableau. 5 Les avantages et les désavantages des analyses globale et cytologique (Davey et al., 2004)

	Avantages	Désavantages
Analyse globale	• Fournit une preuve suffisante que la cellule est vivante • Généralement facile à interpréter	• Lente • Sous-estime le nombre de cellules viables
Analyse cytologique	• Rapide • Le nombre total peut être déterminé simultanément	• Peut être difficile à interpréter • La viabilité n'est pas mesurée directement • Des faux positifs et faux négatifs peuvent se produire

Les analyses globales exigent que la population doit être complètement «non cultivable» (Davey et Kell, 1996; Kell et al., 1998). Par contre, les analyses cytologiques semblent être préférées dans de nombreuses études car les analyses cytologiques sont basées sur des analyses de viabilité indépendantes de la croissance cellulaire, telles que les techniques de marquage qui permettent d'évaluer la viabilité des cellules tout en conservant une structure cellulaire stable. Ces méthodes comprennent l'utilisation de marqueurs d'acides nucléiques, d'indicateurs redox ou métabolique (fluorescéine diacétate, FDA), de marqueurs du potentiel membranaire , qui peuvent être examinés par microscopie ou par cytométrie en flux (Davey et Kell, 1996; Kell et al., 1998; McDougald et al., 1998).

Parmi les méthodes développées pour la détection des cellules en état VNC on trouve :

- Méthodes à comptage direct
- Méthodes à base génétique
- ATP bioluminescence
- Cytométrie en flux

1. Méthodes à comptage direct :

L'une des méthodes connue pour la détection des organismes en état VNC est le comptage direct par l'acridine orange (CDAO) (Hobbie et al., 1977). Dans ce test, l'acridine orange (AO) est utilisé pour différencier les micro-organismes viables et non viables. Les monomères d'AO qui se fixent sur l'ADN des cellules viables et non viables produisent une fluorescence verte, tandis que les dimères d'AO qui se fixent sur l'ARN des cellules viables produisent une fluorescence rouge/orange. Ainsi, les cellules viables sont caractérisées par un double fluorescence verte et rouge/orange tandis que les cellules non viables présentant une fluorescence verte (Hobbie et al., 1977).

Une autre méthode de comptage directe couramment utilisée est le comptage direct des cellules viables (CDCV) développé par Kogure et al., (1979) mais qui néccess

ite que la population totale soit non cultivable afin de détecter les cellules VNC. Dans cette méthode, de l'extrait de levure est ajouté à des populations microbiennes avec de l'acide nalidixique. L'acide nalidixique empêche la réplication de l'ADN et la division cellulaire, l'extrait de levure favorise la synthèse protéique. Les cellules en état VNC réagissent à l'extrait de levure, mais sont incapables de se diviser; ces cellules

s'allongent, tandis que les organismes non viables demeurent inchangés. Les cellules VNC peuvent être détectées directement par une simple observation microscopique. Malheureusement, cette méthode prend au moins 6 heures ou plus pour produire des résultats.

2. Méthodes à base génétique

La PCR a été utilisée pour la détection des organismes en état VNC tels que *Vibrio cholerae* et *Shigella dysenteriae* en ciblant les gènes codant pour la toxine secréte par ces microorganismes (Islam et al., 1993; Koch et al., 1993). Cette technique permet d'amplifier de petites quantités d'ADN provenant d'un microorganisme cible (en état VNC) sans la nécessité de réaliser une réplication cellulaire. Oliver (1993) évoque la difficulté potentielle dans l'application de la PCR pour la détection des organismes en état VNC, probablement liée à certains changements du matériel génétique au cours de l'état VNC. En effet, un certain nombre d'études ont signalé de telles modifications au niveau de la structure de l'ADN (Brauns et al., 1991; Linder et Oliver, 1989; Trevors, 2011). Ces études indiquent une condensation de la région nucléaire, de tels changements pourraient donc toucher l'efficacité de la technique PCR.

3. ATP bioluminescence:

Toutes les cellules vivantes possèdent de l'adénosine triphosphate (ATP), les organismes en état VNC inclus. Il a été montré que le niveau d'ATP au niveau des cellules viables cultivables est plus important que chez les cellules en état VNC (Roth et

al., 1988). Ainsi les méthodes à base de la bioluminescence peuvent être un moyen utile pour détecter rapidement la biomasse totale des cellules viables.

4. Cytométrie en flux

La diversité des cellules vivantes et leur environnement rendent impossible la conception d'un seul test de viabilité ou d'énumération qui sera applicable à tous les types de cellules. Ceci est expliqué par le fait que la viabilité n'est pas facile à définir en fonction d'un seul paramètre physiologique ou morphologique.

Parmi toutes les techniques de détection développées, la cytométrie de flux (CMF) paraît prometteuse principalement dans le domaine œnologique. La CMF a été déjà utilisée pour le suivi des populations microbiennes et levuriennes au cours de la fermentation, validée par comparaison avec d'autres tests de viabilité telles que les méthodes de comptage sur boite (McSharry, 1994; Malacrinò et al., 2001; Salma et al., 2012) Récemment (Serpaggi et al., 2012) ont utilisé la CMF pour la détection et le dénombrement direct de levures *Brettanomyces* en état VNC dans le vin en utilisant la fluorescéine diacétate (FDA) comme fluorochrome.

Principaux avantages de la Cytométrie en flux

La CMF se définit comme l'étude précise des particules isolées (cellules, bactéries, etc.) entraînées par un flux liquide. La CMF se distingue des autres techniques analytiques car elle réunit les cinq caractéristiques essentielles suivantes: analyse quantitative, sensibilité de détection, rapidité, analyse multiparamétrique et tri cellulaire.

La CMF consiste à analyser les signaux optiques et/ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs :

- aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule, à leur structure interne ou à l'auto fluorescence de certaines cellules comme les végétaux, le phytoplancton, etc.

- aux propriétés optiques induites de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires.

La taille et la granularité (ou structure) de chacune des cellules sont fournis grâce à la diffusion lumineuse (dans l'axe du laser ou à 90°). En outre, les molécules fluorescentes présentées par la cellule sont excitées grâce à la source lumineuse.

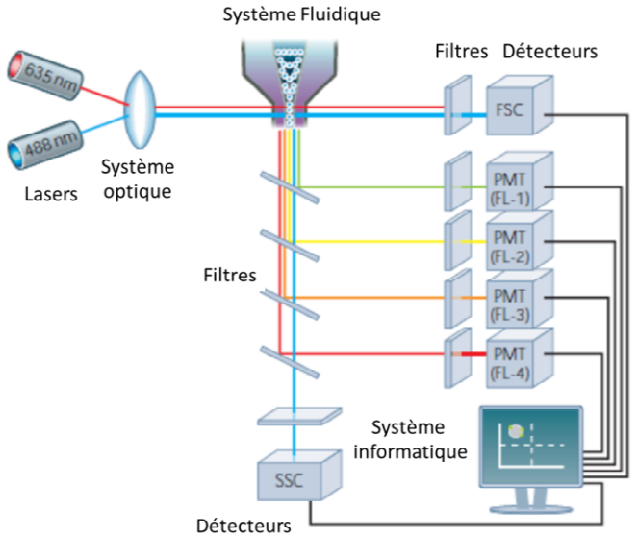


Figure. 10: Représentation schématique d'un Cytomètre en flux (Rahman, 2006).

Pour cela, une étape de marquage préalable est nécessaire avant le passage des cellules dans un cytomètre où elles sont injectées au centre d'une gaine liquide par l'intermédiaire d'une buse de 50 à 100 µm de diamètre. (**Figure. 10**).

Ce marquage est réalisé avec des molécules spécifiques d'une structure ou d'une fonction cellulaire, susceptibles d'émettre une fluorescence après leur illumination; il s'agit de fluorochromes spécifiques (intercalants) ou d'un immunomarquage fluorescent (anticorps marqués). Les détecteurs captent des signaux de diffusion et de fluorescence et les transforment en signaux électriques. Un système informatique traite les signaux et calcule les données statistiques avec les distributions des paramètres mesurés et donne des résultats sous forme d'histogrammes mono ou bi-paramétré. Les cellules sont réparties en fonction des paramètres étudiés, et chaque cellule est transformée en un "évènement électrique" (event) associé à plusieurs coordonnées (granularité, taille, fluorescence 1, fluorescence 2…). L'ensemble des évènements constituent des nuages de points (sur des cytogrammes) autour desquels des fenêtres électroniques sont dessinées (gating).

Les paramètres biologiques sont exprimés en pourcentages ou en unités arbitraires et évalués sur des sous-populations cellulaires.

X. La Cytométrie en flux dans la microbiologie

Depuis le développement des fluorochromes et l'amélioration de la technologie, la technique de CMF a gagné le monde de la microbiologie. L'un des intérêts de l'utilisation de la CMF en microbiologie est la détermination de la viabilité cellulaire. La croissance/réplication des cellules viables est l'un des principaux tests de la viabilité cellulaire. Dans les cellules viables, l'activité métabolique peut être affectée suite au changement des conditions extracellulaires. La perméabilité sélective ou l'intégrité de la membrane cellulaire est toujours détectable au niveau des cellules intactes; par contre les cellules mortes présentent toujours l'information génétique (ADN) mais avec une intégrité membranaire perdue (Caron et Badley, 1995). Une classification des états physiologiques de la cellule est également présentée par Bunthof, (2002) (**Figure 11**).

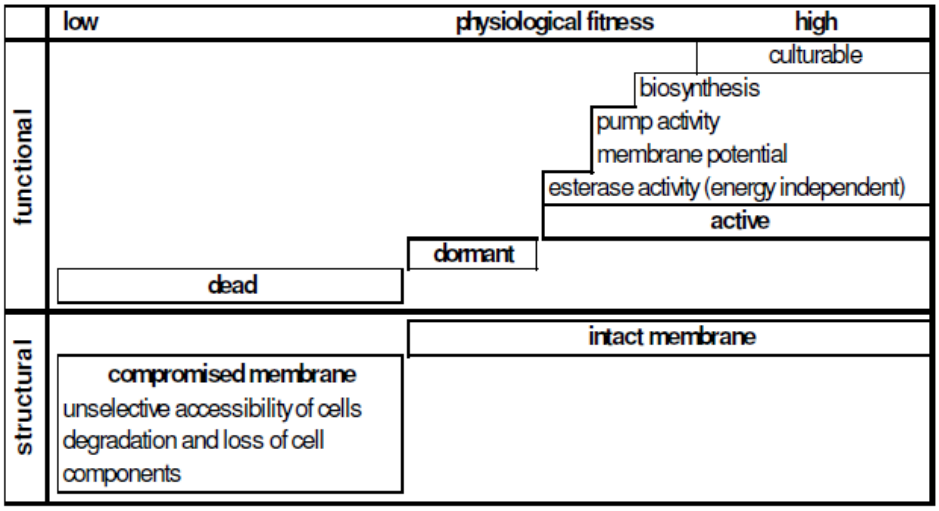


Figure. 11: Les différents états physiologiques d'une cellule (Bunthof, 2002).

La technologie des fluorochromes fluorescents propose des sondes pour une variété de fonctions cellulaires (Joux et Lebaron, 2000). L'utilisation de mélanges de

fluorochromes permet de classer les cellules viables en trois types: les cellules actives, intactes, ou perméabilisées mais métaboliquement actives.

a. Les Fluorochromes

Un fluorochrome ou fluorophore est une substance chimique capable d'émettre de la fluorescence après excitation. Ces molécules fluorescentes sont de taille et de nature chimiques diverses; certaines sont suffisamment petites pour être conjuguées à d'autres molécules (comme dans le cas des anticorps couplés à un fluorochrome); d'autres ne sont fluorescentes que dans certains états (marqueurs fluorescents vitaux qui ne sont fluorescents que lorsqu'ils sont complexés à l'ADN).

Le choix d'un fluorochrome doit répondre à plusieurs critères dont l'obtention d'un signal spécifique, durable et fort. Dans la cellule vivante, le fluorochrome doit permettre de respecter autant que possible les fonctions cellulaires. Le marquage des cellules par des fluorochromes permet d'accéder à des informations arbitrairement classées en deux catégories (Brown et al., 2004; Ratinaud, 1994): les paramètres fonctionnels et les paramètres structuraux.

Paramètres fonctionnels

Ces paramètres reflètent des modifications rapides dans des cellules vivantes, incluant aussi bien les activités enzymatiques (peroxydases, déshydrogénases, estérases...), les mouvements ioniques (calcium, pH...), ou la perméabilité membranaire.

Paramètres structuraux

Ils correspondent généralement à des macromolécules ou à un ensemble de constituants (ADN, protéines du cytosquelette...), ou à des molécules constitutives de taille plus faible mais présentes en concentration significative (antigène membranaire, cholestérol...).

b. Fluorochromes pour la détermination de la viabilité microbienne par cytométrie en flux

Plusieurs classes de fluorochromes peuvent être utilisées pour détecter la viabilité cellulaire et ceux-ci sont définis ci-dessous (**Tableau. 6**):

1. Fluorochrome à intégrité membranaire (exclusion)
2. Fluorochromes à potentiel membranaire (assimilable)
3. Fluorochromes à activités métaboliques

Tableau 6: Les différents fluorochromes utilisés en CMF pour la mesure de viabilité cellulaire.

Fluorochromes	Mode d'action	Référence
bis(1,3dibutylbarbituric acide) trimethine oxonol (DiBAC4(3))	Marquage des cellules mortes/stressées	(Beck et Huber, 1997; Deere et al., 1995; Jepras et al., 1995; López-Amorós et al., 1997; Mason et al., 1994, 1997; Suller et al., 1997)
Calcofluor White	Marquage des cellules mortes	(Berglund et al., 1987; Mason et al., 1995)
Carboxynaphtho Fluorescein diacetate	Activité enzymatique	(Davey et Kell, 1996)

Chemchrome B/Y	Activité enzymatique (esterase)	(Clarke et Pinder, 1998; Deere et al., 1998; Diaper et Edwards, 1994)
5cyano 2, 3ditolyltetrazolium chloride (CTC)	Activité respiratoire	(Joux et al., 1997; Kaprelyants et Kell, 1993b)
Ethidium bromide	Exclusion (integrité membranaire)	(Aeschbacher et al., 1986)
Fluorescein diacetate	Activité enzymatique	(Aeschbacher et al., 1986; Berglund et al., 1987; Diaper et Edwards, 1994; Malacrinò et al., 2001; Norden et al., 1995; Salma et al., 2012; Serpaggi et al., 2012)
Fluorescein di(β-D galactopyranoside	Activité enzymatique	(Plovins et al., 1994)
FUN-1 kit (Molecular probes)	Activité métabolique	(Millard et al., 1997; Prudêncio et al., 1998; Wenisch et al., 1997)
Propidium Iodide	Exclusion (integrité membranaire)	(Auger et al., 1993; Berglund et al., 1987; Deere et al., 1998; Gant et al., 1993; Niven et Mulholland, 1998)
Rhodamine 123	Marquage des cellules mortes	(Auger et al., 1993; Kaprelyants et Kell, 1993b; Porro et al., 1994)
SYTO Green	Exclusion (integrité membranaire)	(Langsrud et Sundheim, 1996; Millard et al., 1997)

TOPRO3	Exclusion (integrité membranaire)	(Davey et Kell, 1996)

Fluorochrome à intégrité membranaire

L'intégrité membranaire des cellules est utilisée comme un indicateur de dommage cellulaire ou de mort cellulaire. La mesure de l'intégrité membranaire des microorganismes est compliquée par la structure complexe de leur membrane cellulaire. Les fluorochromes d'acides nucléiques dépendant de la perméabilité membranaire sont souvent utilisés pour les mesures de l'intégrité de la membrane cellulaire. L'absorption de ces fluorochromes est associée à une perte irréversible de l'intégrité membranaire. Après l'absorption, les fluorochromes se fixent aux acides nucléiques et la fluorescence ainsi produite peut être détectée (Joux et Lebaron, 2000; Ueckert et al., 1995).

L'iodure de propidium, les marqueurs TOTO/BOBO/POPO/YOYO, la benzoxazolium-4-pyridinium, l'A-PRO et la série des SYTOX sont les fluorochromes les plus utilisés pour la mesure de l'intégrité membranaire (Davey et Kell, 1996; Schumann et al., 2003). L'iodure de propidium (**Figure 12**) est souvent le fluorochrome de choix pour les mesures de l'intégrité de la membrane cellulaire. La longueur d'onde d'excitation est de 536 nm et d'émission maximale de 620 nm (Haugland, 1996; Joux et Lebaron, 2000).

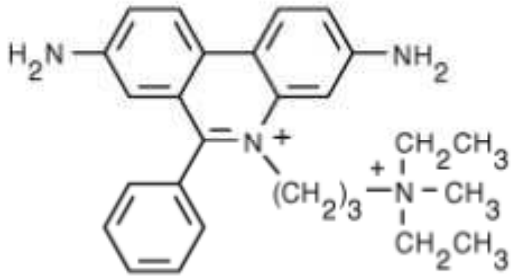


Figure 12. Structure chimique de l'iodure de propidium.

Fluorochrome à potentiel membranaire

Normalement, des différences de potentiel électrique existent à travers les membranes cellulaires. Ces différences sont dues à des gradients de concentration des ions $NaCl^-$ à travers la membrane cellulaire et aussi en raison du fonctionnement de pompes chimioosmotiques (Na^+, K^+ et Cl^-). Le potentiel transmembranaire est un élément essentiel pour la physiologie cellulaire. Il est impliqué dans la production d'ATP, l'autolyse, le transport du nutriment, la chimiotaxie et la survie à des faibles pH. La dépolarisation des cellules est le résultat de la réduction du potentiel de membrane à zéro en raison de la destruction de l'intégrité de la membrane cellulaire par des agents physiques, ou en raison de l'élimination des gradients de protons à travers la membrane par les protons ionophores comme la Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl hydrazone (CCCP) (Novo et al., 1999). Différents fluorochromes sont utilisés pour les mesures de potentiels membranaires tels que les mérocyanines, les cyanines et les oxonols. Ces fluorochromes peuvent être également divisés en deux groupes de fluorochromes: fluorochromes à réponse lente et fluorochromes à réponse rapide. Les fluorochromes à

réponse lente réagissent aux changements de potentiel de membrane en quelques secondes tandis que ceux à réponse rapide répondent en microsecondes. Les cyanines et les oxonols peuvent répondre par les deux mécanismes rapide ou lent (Waggoner, 1976). Les oxonols sont des fluorochromes lipophiles anioniques qui se concentrent dans les cellules avec un potentiel de membrane réduit et se lient aux composants riches en lipides.

Le lipophile anionique bis (1,3dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol (DiBAC4(3)) a été utilisé pour marquer les cellules eucaryotes dont les membranes étaient devenues dépolarisées (Wilson et Chused, 1985). Salma et al., (2012) ont montré que dans le domaine oenologique les bactéries lactiques ainsi que les levures viables et cultivables peuvent être marquées au DiBAC4(3), ceci est dû à la présence de facteurs dépolarisants dans le vin tels que l'éthanol, le pH acide (3,5), les sulfites et les produits phénoliques.

Fluorochromes à activités métaboliques

Une troisième classe de fluorochromes de viabilité est utilisée en biologie cellulaire souvent comme des marqueurs de viabilité positive dans des protocoles à double marquage avec du bromure d'éthidium ou l'iodure de propidium (Aeschbacher et al., 1986) ou seule (Malacrinò et al., 2001; Salma et al., 2012; Serpaggi et al., 2012).

La fluorescéine di-acétate (FDA) non-fluorescente en est un exemple. Ce fluorochrome est clivé par des estérases intracellulaires pour donner un produit fluorescent (dans ce cas, la fluorescéine), qui en conditions idéales n’est retenue que par les cellules vivantes.

Les cellules mortes avec des membranes perméabilisées ne se marquent pas avec la FDA car elles ne présentent pas d'activité enzymatique et / ou car la fluorescéine diffuse librement à travers leur membrane (**Figure. 13**). L'utilisation de ce type de fluorochrome couplée à la CMF a été bien établie par Serpaggi et al., (2012) pour l'analyse des cellules de *Brettenomyces* en état VNC.

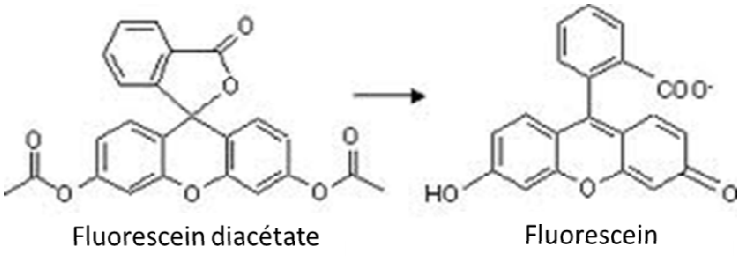


Figure 13: Formule chimique de la FDA et de son produit d'hydrolyse.

XI. L'étude du cycle cellulaire

Les deux applications de la CMF les plus recherchées sont la mesure de la teneur en ADN cellulaire et l'analyse du cycle cellulaire. En plus de la détermination de la teneur relative en ADN cellulaire, la CMF permet également l'identification et la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Trois phases distinctes peuvent être reconnues dans une population cellulaire en cours de prolifération (Tabll et Ismail, 2011) (**Figure 14**).

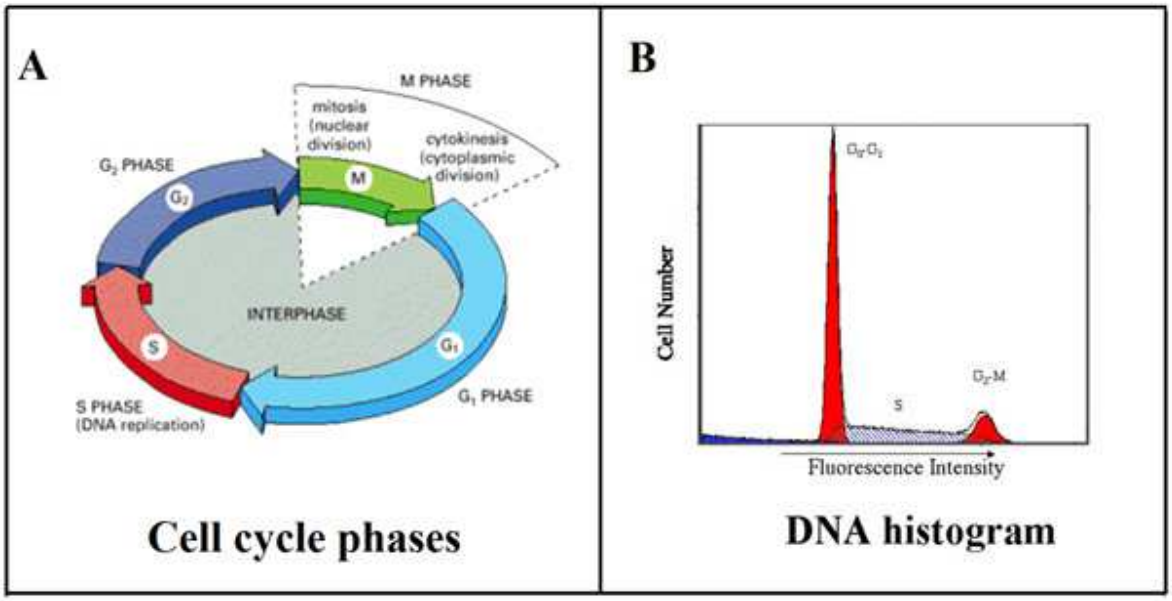


Figure 14. Les phases du cycle cellulaire (A) et l'histogramme d'ADN mesuré par cytométrie en flux (B) (Tabll et Ismail, 2011).

La CMF couplée à des fluorochromes spécifiques de l'ADN permet de déterminer la distribution des cellules dans le cycle cellulaire: les cellules contenant 2N chromosomes d'ADN sont des cellules en G1 et sont non proliférantes; les cellules contenant 4N chromosomes d'ADN sont en G2 ou en mitose. Entre ces 2 valeurs, on trouve les cellules en phase S.

Ces fluorochromes spécifiques doivent posséder deux qualités essentielles: combinaison stoechiométrique avec l'ADN et bonne émission de fluorescence après liaison à l'ADN. Les fluorochromes utilisés sont regroupés en deux catégories principales:

- Les agents intercalants: iodure de propidium, bromure d'éthidium (Ormerod et Kubbies, 1992).

- Les fluorochromes spécifiques aux paires de bases: Le Hoechst 33342/33258 (A-T) (Dubey et Raman, 1983) et la mithramycine (G-C) (Phillips et al., 2006).

XII. Objectifs de la thése

Beaucoup d'études ont été réalisées dans le but de confirmer l'existence de l'état VNC sur différents microorganismes procaryotes. Par conctre peu d'études ont été réalisé sur les cellules eucaryotes chez lesquelles les connaissances sur l'état VNC sont rares.

De ce fait les objectifs de ces travaux sont:

1. Evaluer l'effet du SO_2 sur l'induction de l'état VNC décrit fréquemment chez les eucaryotes, notamment chez la levure *S. cerevisiae*
2. Evaluer le pouvoir de «ressuscitation» de ces cellules VNC en utilisant la cytometrie de flux couplée à la FDA afin de mieux comprendre et valider l'existence de l'état VNC.
3. Démontrer que la reprise de la cultivabilité observée lors de la sortie de l'état VNC est due à une vraie « ressuscitation » :

   -comparaison du profil du cycle cellulaire en utilisant la CMF couplée à l'iodure de propidium des cellules en état VNC juste avant et après l'induction de la «ressuscitation».

   -détermination du temps de sortie de l'état VNC après l'élimination du stress SO_2, et du temps de génération des cellules cultivées dans un milieu similaire au milieu dans lequel se trouvent des cellules au moment de leur sortie de l'état VNC.

4. Etudier le rôle du gène *SSU1* dans le mécanisme de résistance aux sulfites chez *S. cerevisiae*, et sa relation avec l'état VNC; par la comparaison du comportement de différentes souches de *S. cerevisiae* BY4742, BY4742*Δssu1* et BY4742Δ*ssu1* pCEL13-*SSU1* face au stress sulfite.

MATERIELS ET METHODES

I. Souches, plasmides et conditions de culture

Les différentes souches bactériennes et levuriennes et les plasmides utilisés dans cette étude sont présentés dans le **Tableau 7**. Les plasmides sont construits et amplifiés dans *Escherichia coli* DH5α mise en culture dans un milieu Luria Bertani (LB) (Biolab diagnostics, Wadenville, Afrique du Sud). Le cas échéant, le milieu est supplémenté avec 100 $mg.L^{-1}$ d'ampicilline, pour la sélection de bactéries résistantes. Les souches *S. cerevisiae* (S288C, BY4742 et BY4742Δ*ssu1*) sont mises en culture à 28°C dans un milieu yeast-peptone dextrose (YPD: 10 $g.L^{-1}$ d'extrait de levure, 10 $g.L^{-1}$ de bacto-peptones, 20 $g.L^{-1}$ de glucose). Dans le cas de cultures sur milieux solides, le milieu décrit ci-dessus est supplémenté avec 20 $g.L^{-1}$ de bacto-agar. La sélection des transformants de levures est réalisée en utilisant un milieu synthétique (MS: 20 $g.L^{-1}$ de glucose, 6,7 $g.L^{-1}$ de base azotée de levure + sulfate d'ammonium et acides aminés (groupe Difco scientifique, Cascade Park, Afrique du Sud)) supplémenté avec 60 $\mu g.mL^{-1}$ de leucine et 30 $\mu g.\ mL^{-1}$ de lysine afin d'appliquer une auxotrophie à l'uracile.

Tableau 7: Les différents souches et plasmides utilisés lors de cette étude

Souche et plasmide	*Génotype/ Description*	*Référence*
S. cerevisiae S288C	*MATα SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1*	LGC Standards*
S. cerevisiae PB2585		Chardonnay. Fermol®
S. cerevisiae BY4742	S288C derivative, *MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*	(Brachmann et al., 1998)
S. cerevisiae BY4742 *Δssu1*	BY4742 derivative, *MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 ssu1::KanMX4*	EUROSCARF deletion library**

Escherichia coli DH5α	[*F- φ80lacZΔM15Δ(lacZYAargF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk−, mk+) phoA supE44 thi-1gyrA96 relA1 λ*]	GIBCO-Invitrogen Life technologies, Mowbray, South Africa
pCEL13	*2 µm* Ap^R *URA3* $PGK1_P$–$PGK1_T$	(Gundllapalli et al., 2006)

* http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/204508.aspx?geo_country=fr#characteristics

** http://www.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/yeast.html

II Construction d'une souche BY4742Δ*ssu1* pCEL13-*SSU1* surexprimant le gène *SSU1*

II-1 Préparation et analyse de l'ADN

L'ADN génomique de la souche *S. cerevisiae* BY4742 est isolé selon la méthode décrite par Ausubel, (1999). Un mL d'une culture de *S. cerevisiae* BY4742 est remis en suspension dans 1 ml de tampon CTAB (2.3M NaCl, 160 mM Tris-HCl, 1M CTAB (bromure d'hexadécyltriméthylammonium)). Une incubation à 55ºC pendant 20 min est réalisée, suivie d'une centrifugation à 12 000 g pendant 5 min à 4°C. Le surnageant obtenu est transféré dans un nouveau tube. Un volume égal d'alcool chloroform isoamyl (24:1) est ajouté suivi d'une centrifugation à 12 000 g pendant 10 min à 4°C. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et 50 µL d'acétate d'ammonium à 7,5 M et 800 µL d'éthanol froid 96% sont ajoutés. L'échantillon est incubé à 20°C pendant 1 h puis centrifugé à 12 000 g pendant 5 min à 4°C pour récupérer l'ADN. L'ADN obtenu est lavé par une solution de 70% d'éthanol et remis en suspension dans 80 µL de Tampon d'élution 8mM (1.2 $mg.L^{-1}$ Tris, 0.38 $mg.L^{-1}$ EDTA).

A partir de l'ADN génomique ainsi obtenu le gène *SSU1* est amplifié par PCR en utilisant les amorces suivantes: 5'ScSSU1fw (5'-

GGATCCATGGTTGCCAATTGGGTACTT-3') et 3'ScSSU1rev (5'-CTCGAGTTATGCTAAACGCGTAAAATCTAGAG-3'). Le mélange réactionnel de la PCR se compose comme suit **Tableau 8**:

Tableau 8.Composition du *Mix PCR* pour l'amplification du gène *SSU1*

Réactifs	Quantité
Enzyme polymérase Phusion DNA (10U) (Finnzymes, Finland)	0.5 µL
Tampon Phusion (5X) (Finnzymes, Pretoria, South Africa)	10 µL
(dNTP) 10mM	1 µL
ADN génomique (200ng)	1 µL
Amorces 5'ScSSU1fw (100µM)	0.125 µL
Amorces 3'ScSSU1rev (100µM)	0.125 µL
$MgCl_2$ (1.5 mM)	6.6 µL
H_2O	30.65 µL
Total	50µL

Le programme de PCR est composé d'un cycle de dénaturation initiale de 30s à 98°C, suivi par 35 cycles de 98°C pendant 10s (dénaturation), 58°C pendant 45s (hybridation), 72°C pendant 50s (élongation). Le programme se termine par une élongation finale de 10 min à 72°C.

Le gène *SSU1* de *S. cerevisiae* BY4742 ainsi amplifié par PCR est cloné directement dans *pJET1.2/blunt Cloning Vector* de Promega (Whitehead scientifique, Cape Town, Afrique du Sud) à température ambiante pendant 1 h en utilisant l'enzyme T4 DNA ligase (Fermentas, Inqaba Biotechnical Industries (PTY) Ltd., Pretoria, South Africa). La composition du milieu réactionnel est donnée dans le **Tableau 9**:

Tableau 9: La composition du milieu réactionnel pour la ligation

Réactifs	Quantité
Tampon de réaction pour la T4 DNA ligase 2X	10µL
Plasmide	50 ng
Insert (*SSU1*)	150 ng
T4 DNA ligase	0.1 U
H_2O stérile	qsq 20 µL

II-2 Préparation des souches compétentes (DH5α)

La souche DH5α est striée sur gélose LB et incubée pendant une nuit à 37°C. Trois à cinq colonies isolées sont inoculées dans 100 mL de milieu SOC liquide (20g.L^{-1} bactotryptone, 5g.L^{-1} extrait de levure, 10 mM NaCl, 20 g. L^{-1} glucose, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2.6H_2O$ et 10 mM $MgSO_4.7H_2O$) et incubées sous agitation pendant 15 h à 37°C. Un litre de milieu SOC est inoculé par cette préculture à une densité optique à 550 nm (DO_{550}) de 0,1, et incubé à température ambiante jusqu'à obtenir une DO à 550 nm de 0,8. La culture est refroidie à 4°C pendant 30 min, centrifugée à 2500 *g* pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est resuspendu dans de l'eau stérile froide (200 mL à 4°C), et de nouveau centrifugé à 2500 *g* pendant 15 minutes à 4°C. Cette opération est répétée deux fois. Le culot est resuspendu dans une solution aqueuse stérile et froide (200 mL, 4°C) contenant 15% (v/v) de glycérol et 2,5% (m/v) de D-sorbitol. Cette suspension est aliquotée par fractions de 100 µL qui sont directement congelées à –80 °C.

II-3 Transformation des souches compétentes (DH5α) par le plasmide (pJET1.2-SSU1)

Le plasmide (pJET1.2-*SSU1*) est introduit par choc thermique dans des cellules compétentes (DH5α) selon le protocole suivant: 5µL (50 à 200 ng) du produit de clonage est ajouté à 50µl des cellules compétentes (DH5α) et incubées dans la glace pendant une heure. Les bactéries sont ensuite soumises à un choc thermique à 42°C pendant 2 min puis remises dans la glace pendant 5 min. 930 µL du milieu LB sont ajoutés et les cellules sont incubées pendant 1h30min à 37°C et étalées ensuite sur un milieu LB solide contenant de l'ampicilline (Amp) à une concentration de 100 $mg.L^{-1}$.

II-4 Extraction de l'ADN plasmidique (plasmide PJET-SSU1)

Des colonies sont sélectionnées sur les boites LB-Amp et mises en culture dans 10 mL du milieu LB-Amp à 37°C pendant 1 jour sous agitation. L'ADN plasmidique (PJET-*SSU1)* est isolé à partir de cultures d'une nuit de *E. coli* en utilisant le Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Southern Cross Biotechnology, Cape Town, South Africa), selon les instructions du fournisseur. La construction plasmidique (PJET-*SSU1*) a été envoyée au centre analytique de l'université de Stellenbosch, en Afrique du Sud pour le séquençage en utilisant les amorces (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3' et 5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3') du plasmide pJET1.2.

II-5 Construction du vecteur de surexpression

Le gène *SSU1* est ensuite sous-cloné dans le vecteur d'expression pCEL13 de levure (Gundllapalli et al., 2006) (**Figure 15**).

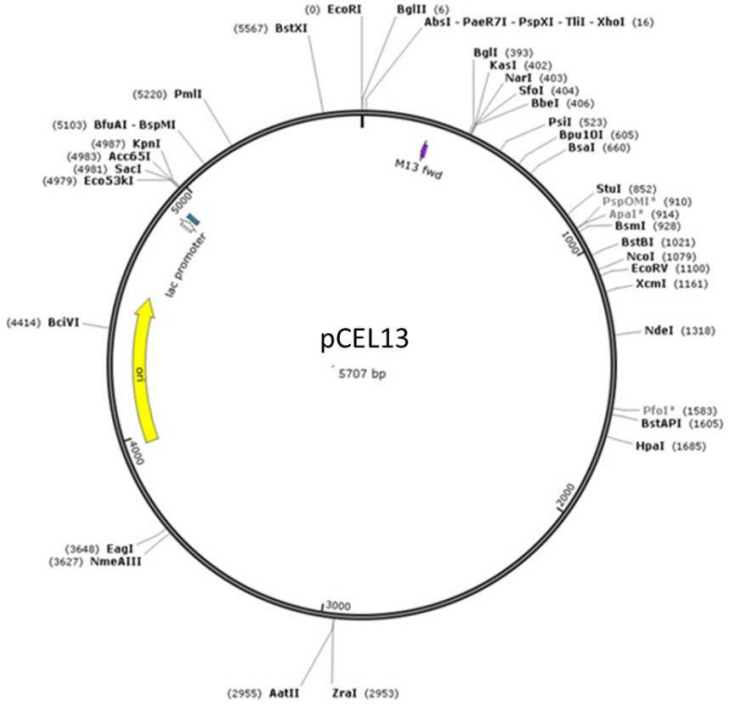


Figure 15. Représentation schématique du plasmide pCEL13 et des différents sites de restriction.

Dans une première étape, le gène *SSU1* **(Figure 16)** est digéré par *BamHI* et *XhoI* et inséré dans le vecteur pCEL13 digéré par *Bgl*II et *Xho*I.

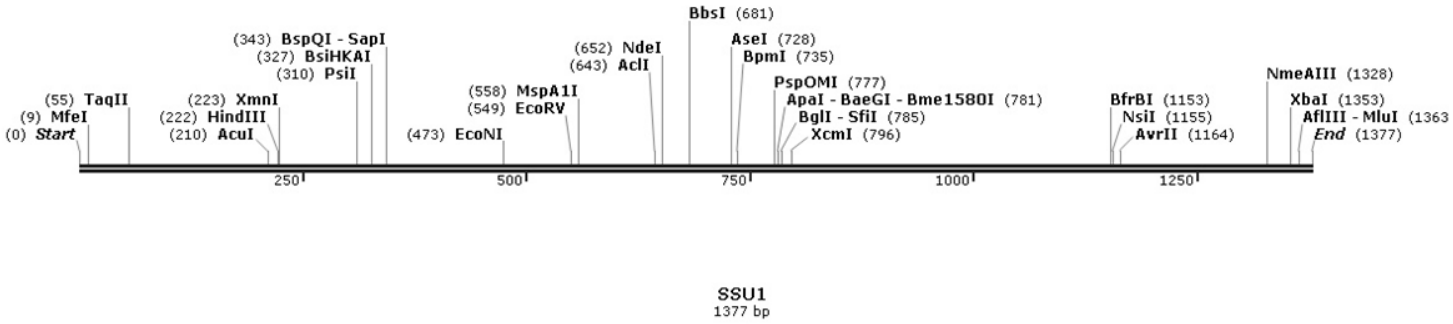


Figure 16. Représentation schématique du géne *SSU1* et des différents sites de restriction possibles

Le produit de la ligation pCEL13-*SSU1* est introduit par choc thermique dans des cellules compétentes (DH5α) selon le même protocole décrit dans le paragraphe IV en utilisant l'ampicilline pour sélectionner les cellules transformées.

Des colonies sont sélectionnées à partir de cultures d'une nuit de *E. coli* et l'ADN plasmidique est isolé en utilisant le Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Southern Cross Biotechnology, Cape Town, South Africa). La construction plasmidique (pCEL13-*SSU1*) est vérifiée par digestion enzymatique (*NDE1*) du vecteur. Les résultats de la digestion sont validés par une migration sur gel d'agarose 1% préparé dans du tampon 1x TBE contenant 1 µM de bromide d'ethidium révélé sous une lumière ultra violette (UV): deux bandes une de taille égale à 2000 pb et une à 5000 pb sont attendues car la séquence du gène *SSU1* présente un site de restriction pour l'enzyme NDE1 ainsi que le plasmide pCEL13.

II-6 Transformation de S. cerevisiae par électroporation

La structure plasmidique (pCEL13-*SSU1*) a été utilisée afin de surexprimer le gène *SSU1* chez la souche BY4742Δ*ssu1*. Cette souche de levure est auxotrophe pour une base azotée: l'uracile. Cette substance essentielle est apportée par complémentation. Le plasmide pCEL13-*SSU1* contenant le gène *URA* codant pour l'uracile est inséré dans les levures par électroporation selon la modalité décrite ci-après.

La méthode d'électroporation adaptée pour la transformation des souches de levures œnologiques industrielles développée par Volschenk H et al.,(2004) a été utilisée dans

cette étude. Les cellules de levures BY4742Δ*ssu1* sont pré-cultivées pendant une nuit dans 10 mL de milieu YPD à 30°C. A partir de cette pré-culture, une deuxième culture est réalisée dans 500 mL de milieu YPD à une densité optique de 0,1 à 600 nm (DO_{600}) et mise à 30°C jusqu'à atteindre une DO_{600} de 1,3 à 1,5. Les cellules de levures sont récoltées par centrifugation à 4000 g à 4°C et remises en suspension dans 80 ml d'eau Milli-Q. 10 ml du tampon TE (10X) (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7.5) est ajouté avec agitation, puis 10 mL de LiOAc à 1 M. Après une incubation à 30°C pendant 45 min avec agitation, 2,5 mL de DTT (Dithiothreitol) à 1 M sont ajoutés à la suspension cellulaire, suivie d'une incubation à 30°C pendant 15 min avec agitation. La suspension cellulaire est ensuite diluée jusqu'à un volume de 500 mL avec de l'eau Milli-Q. Trois centrifugations de 4000 g à 4°C sont réalisées. Le culot cellulaire est remis en suspension dans 250 ml d'eau Milli-Q froid après la première centrifugation. Après la seconde centrifugation, le culot cellulaire est remis en suspension dans 30 ml de sorbitol froid 1 M. Enfin à l'issue de la dernière centrifugation, le culot est repris dans 0,5 ml de sorbitol froid à 1 M. Un volume final (de 1 à 1,5 ml) de suspension cellulaire à DO_{600} d'environ 200 est obtenu. 50 µl des cellules de levures concentrées sont mélangées avec 1 µl d'ADN plasmidique et transférées dans une cuvette d'électroporation de 1,5 ml (Biorad, Afrique du Sud) et soumis à une impulsion de 1,5 kV, 25 mF et 200 ohms (Gene Pulser II Electroporator, Biorad, du Sud Afrique). Immédiatement après l'impulsion, 1 mL de milieu YPD froid est ajouté à la cuvette, suivie par une incubation de 2 à 4 heures à 30°C. 100µL sont ensuite étalés sur un milieu sélectif MS et incubés pendant 2 jours à 30°C. Les transformants positifs ont été identifiés par PCR sur colonie.

Cinq colonies pour chaque souche ont été choisies à partir des boites de MS agar et remises en suspension dans 50 µl d'eau stérile. 1 µL de cette suspension a été utilisé comme matrice pour la réaction de PCR. Les amorces utilisées sont 5'KPNPGK-631 (5'-GGGGTACCCTTTATTTTGGCTTCACCC-3') et 3'PGKKPN-1378 (5'-CGCGGGGGTACCGATAAATAATAGTCTATATATACG-3'). La réaction a eu lieu dans un volume total de 50 µL, et la composition du milieu réactionnel est la suivante (**Tableau 10**):

Tableau 10.Composition du mix PCR pour l'amplification du gène *SSU1*

Réactifs	Quantité
Taq DNA (Promega Corp., USA)	0.25 µL
10x *Taq* buffer	5 µL
(dNTP) 10mM	1 µL
ADN génomique (1 colonie dans 50µL d'eau stérile)	1 µL
Amorces 5'KPNPGK-631 (100µM)	0.02 µL
Amorces 3'PGKKPN-1378 (100µM)	0.02 µL
$MgCl_2$ (1.5 mM)	6.6 µL
H_2O	36.11 µL
Total	50µL

Le programme de PCR commence par une étape de dénaturation à 98°C pendant 10 minutes. Cette dernière est suivie par 35 cycles de dénaturation à 98°C pendant 10s, d'hybridation à 58°C pendant 30s et d'élongation à 72°C pendant 2 minutes, en terminant par une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 minutes. Les produits issus de la PCR sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose à 1% préparé dans du tampon 1x TBE contenant 1 µM de bromure d'éthidium et révélé sous une lumière ultra violette (UV) afin de valider la transformation de la levure; la taille relative du produit de PCR attendue est égale à 2 Kb (**Figure. 17**).

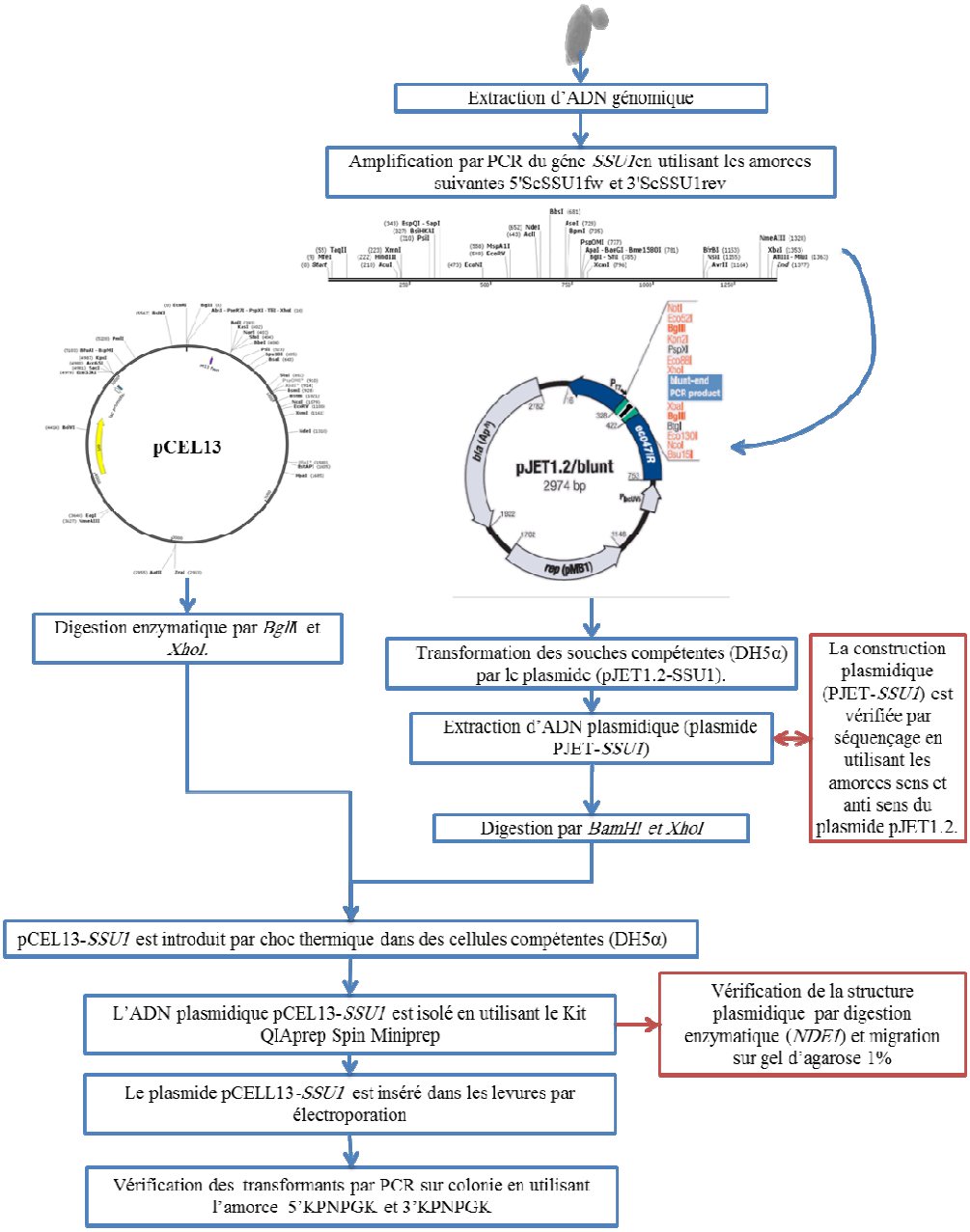


Figure 17. La démarche expérimentale réalisée pour la surexpression du gène *SSU1* chez *S. cerevisiae* BY4742Δ*ssu1*

III. Adaptation des différentes souches au milieu vin synthétique.

Les différentes souches de *S. cerevisiae* S228C, BY4742 et BY4742Δ*ssu1* sont mises en culture à 28°C pendant 5 jours dans un milieu YPD liquide. La souche *S.*

cerevisiae BY4742Δ*ssu1* pCEL13-*SSU1* est mise en culture dans un milieu MS à 28°C pendant 5 jours.

Pour la souche *S. cerevisiae* S228C, l'étude de l'état VNC est réalisée dans un milieu vin synthétique (VS) à 0%, 8% et 10% d'éthanol (3g.L^{-1} DL acide malique, 0.1% acide acétique glacial, 0.1g.L^{-1} de K_2SO_4, 0.025g.L^{-1} de $MgSO_4.7H_2O$, 1g.L^{-1} d'extrait de levures, 1.5 g.L^{-1} glucose, 1.5 g.L^{-1} fructose, X% (V/V) éthanol). Le pH des milieux de culture est ajusté à 3,5 par une solution de NaOH à 2M, puis les milieux sont filtrés sur une membrane de cellulose 0.2 µm (Millipore, Molsheim, France).

Par contre, les études de l'état VNC pour les souches *S. cerevisiae* BY4742, BY4742Δ*ssu1* et BY4742Δ*ssu1* pCEL13-*SSU1* sont réalisées dans un vin synthétique modifié (VSM) à 8% d'éthanol (3g.L^{-1} DL acide malique, 0.1% acide acétique glacial, 0.1g.L^{-1} de K_2SO_4, 0.025g.L^{-1} de $MgSO_4.7H_2O$, 1g.L^{-1} d'extrait de levures, 1.5 g.L^{-1} de glucose, 1.5 g.L^{-1} de fructose, 8% (V/V) éthanol, 6 g.L^{-1} de base azotée de levure avec du sulfate d'ammonium et d'acides aminés supplémenté avec 60 µg.mL^{-1} leucine et 30 µg.mL^{-1} de lysine afin d'appliquer une auxotrophie à l'uracile). Ce milieu VSM est supplémenté par 50 µg.mL^{-1} d'uracile dans le cas des cultures de *S. cerevisiae* BY4742 et BY4742Δ*ssu1*. Le pH est ajusté à 3,5 par une solution de NaOH à 2M, puis le milieu est filtré sur une membrane de cellulose 0.2 µm (Millipore, Molsheim, France).

Une préculture est réalisée de la façon suivante : une seule colonie est inoculée dans 10 ml de VS-YPD (50:50) (pour *S. cerevisiae* S228C) ou dans 10 ml de VSM-MS (50:50) (pour les souches *S. cerevisiae* BY4742, BY4742Δ*ssu1* et BY4742Δ*ssu1* pCEL13-*SSU1*) et incubée à 28°C pendant 3 jours. 5.10^5 cellules.mL^{-1} de cette préculture sont

inoculées dans 1 L du VS ou VSM, selon la souche, et incubées à 28°C pendant 3 jours afin d'obtenir environ 10^7cellules.mL^{-1}.

IV. Induction de l'état VNC

Dans notre étude, l'entrée en état VNC a été étudiée par l'addition de différentes concentrations de SO_2 moléculaire de 0 mg.L^{-1} jusqu'à 4.5 mg.L^{-1} sur une culture de *S. cerevisiae* (S288C ou PB2585) en VS à 0%, 8% et 10% d'éthanol en ajoutant un volume bien déterminé d'une solution de métabisulfite de sodium ($Na_2S_2O_5$) à 4 g.L^{-1} (**Tableau 11**).

Tableau 11. Les différentes concentrations de métabisulfite de sodium à ajouter en fonction de la teneur du milieu (pH 3,5) en éthanol et la concentration du SO_2 moléculaire attendue.

Teneur en éthanol	Concentration finale de métabisulfite de sodium ($Na_2S_2O_5$) (mg.L^{-1}) dans du vin (pH 3.5)	Concentration de SO_2 libre (mg.L^{-1})	Concentration de SO_2 moléculaire
0%	50.4	34	0.5
	103.7	70	1.0
	148.1	100	1.5
	207.4	140	2.0
	251.9	170	2.6
	295.7	200	3.0
	348.1	235	3.5
	400.0	270	4.0

	448.9	303	4.5
	503.7	340	5.0
8%	31.1	21	0.5
	62.2	42	1.0
	93.3	63	1.5
	125.9	85	2.0
	154.1	104	2.6
	185.2	125	3.0
	216.3	146	3.5
	247.4	167	4.0
	278.5	188	4.5
	311.1	210	5.0
10%	28.1	19	0.5
	56.3	38	1.0
	84.4	57	1.5
	112.6	76	2.0
	142.2	96	2.6
	168.9	114	3.0
	198.5	134	3.5
	226.7	153	4.0
	254.8	172	4.5
	281.5	190	5.0

Pour les souches *S. cerevisiae* BY4742, BY4742Δ*ssu1* et BY4742Δ*ssu1* pCEL13-*SSU1* l'entrée en état VNC est réalisée par l'addition de 4.5 $mg.L^{-1}$ de SO_2 moléculaire sur une culture en VSM à 8% d'éthanol. Pour l'ensemble des études, des prélèvements sont réalisés régulièrement durant l'incubation à 28°C pour la détermination de la concentration des différentes populations (totale, cultivable et viable) et pour étudier l'impact du stress sulfite et la survie des différentes souches de levures

V. Induction de la sortie de l'état VNC

Whitesides et Oliver, (1997) ont montré que les cellules non cultivables peuvent être ressuscitées par l'élimination du stress induisant l'état VNC. Ceci a été confirmé récemment par Serpaggi et al., (2012) qui ont montré que l'élimination du stress SO_2 induisant l'état VNC chez *Brettanomyces bruxellensis* est suffisante pour induire la ressuscitation de ces dernières. Dans notre étude l'induction de la ressuscitation est réalisée par une simple augmentation du pH (de 3.5 à 4) par l'addition d'une solution de NaOH à 2M suffisante pour diminuer à 0 $mg.L^{-1}$ la concentration moléculaire du SO_2 dans le milieu (**Figure. 5**).

L'induction de la sortie de l'état VNC est réalisée à différents temps après le stress SO_2 (3, 7, 14, 21 et 30 jours). Des prélèvements sont réalisés régulièrement durant l'incubation à 28°C pour la détermination de la concentration des différentes populations (totale, cultivable et viable) et pour étudier l'impact de l'élimination du stress sulfite sur la survie et la cultivabilité des levures.

VI. Dénombrement des levures cultivables sur gélose

La technique d'étalement sur boîte permet de quantifier les cellules capables de former des nouvelles colonies (UFC); 100 µL de suspension levurienne diluée ou non sont étalés sur gélose (YPD ou MS) en triplicat (différentes dilutions sont réalisées en fonction de la cultivabilité). A partir du quatrième jour suivant le stress SO_2, 1 mL de chaque suspension cellulaire est centrifugé à 5000 g, 5 min à température ambiante et le culot est mis en suspension dans 100µL d'eau Milli-Q puis étalé sur gélose (YPD ou MS) en triplicat. Les géloses sont ensuite incubées à 28°C dans l'étuve et les colonies formées sont comptées après 3 à 5 jours.

VII. Etude de la viabilité cellulaire

VII.1. Etude de l'activité estérase : Fluorescéine Di-Acétate (FDA)

La FDA (Sigma France (F7378)), comme déjà décrit, est un marqueur de viabilité dont le principe est de cibler l'activité enzymatique intracellulaire des micro-organismes vivants (activité cible : estérase). Le critère de viabilité repose sur l'activité enzymatique intracellulaire et l'intégrité membranaire du micro-organisme.

Dans le cytoplasme des cellules métaboliquement actives, le substrat initialement non fluorescent est clivé par une enzyme (estérase) libérant ainsi une fluorescence verte. Seules les cellules viables avec une intégrité de membrane conservée ont la capacité de réaliser le clivage et de retenir la fluorescence verte. Ainsi, les cellules vivantes, produisent une fluorescence verte (émission à 520-nm) lorsqu'elles sont excitées ce qui

permet de les discriminer facilement des cellules mortes, qui ne fluorescent pas. 0.5 mL de suspension cellulaire est ajouté à 0.5 mL d'un Tampon FDA ((0.5 M Na_2HPO_4 (Sigma 255793, Quentin Fallavier France); pH 7.4) et 0.5 M NaH_2PO_4 ((Sigma S2554, Quentin Fallavier France); pH 7), 1.5 µL de FDA à une concertation de 10µM dans l'acétone (Sigma F737, St Louis, MO, USA) sont ajoutés pour atteindre une concentration finale de 15µM. Une incubation est faite à température ambiante pendant 15 min à l'abri de la lumière suivie d'une analyse par cytométrie en flux.

VII.2. Fiabilité du marquage FDA

Afin de valider l'utilisation du marqueur FDA comme marquaur de l'état VNC, nous avons souhaité vérifier que la fluorecence observée lors du marquage FDA n'était pas le signe d'une activité estérase résiduelle. Différents stress létaux, la Natamycine (Delvocid, Humeau, France*)* à une concentration finale de 25mg. L^{-1} ou le SO_2 à concentration finale de 10g.L^{-1} totale, sont donc appliqués à une culture de trois jours de *S. cerevisiae* S288C dans du vin synthétique 8 % d'éthanol à pH 3.5 (10^7 cellules.mL^{-1}). 1 mL est prélevé toutes les 5 minutes et centrifugé à 13000 g pendant 5 min (25°C), le culot est lavé deux fois dans du tampon PBS (NaCl 130 mM, Sigma S9888, Quentin Fallavier France). La cultivabilité cellulaire est évaluée par un comptage sur boite (YPD) et la détermination de l'intensité de la fluorescence verte au niveau des cellules est ensuite mesurée par CMF en utilisant la FDA.

VII.3. Détection d'une activité métabolique dans des cellules en état VNC

Le fluorochrome (FUN-1) [2 chloro 4 (2,3 dihydro 3 méthyle (1,3 benzo thiazole-2-yl) méthylidène) 1 iodure phenylquinolinium] a été utilisé afin de confirmer la présence d'une activité métabolique dans des cellules non cultivables. Ce fluorochrome appartient à la classe des cyanines asymétriques et il est non fluorescent en solution aqueuse. De plus, il présente une forte affinité avec les acides nucléiques; une fois la membrane cellulaire de la levure perméabilisée, il se fixe sur l'ADN cellulaire produisant ainsi une fluorescence verte voire même jaune-vert (Millard et al., 1997). Chez la levure métaboliquement active, des structures intravacuolaire cylindriques (CIVS) sont produites, dans les vacuoles, après moins d'une heure d'exposition au FUN-1 quelles que soient les conditions de culture (oxydative ou fermentaire) (Millard et al., 1997). Ces structures CIVS, une fois excitées, produisent une fluorescence rouge à 470-590 nm.

Dans ce but, différentes cultures de *S. cerevisiae* S288C ont été préparées: i) une culture viable cultivable de *S. cerevisiae* S288C, ii) une culture morte (Natamycine (25mg. L^{-1}) pendant 1h à 28°C) et iii) une culture viable non cultivable (4.5mg.L^{-1} SO_2). 1mL de chacune de ces cultures est lavé deux fois avec du Tampon PG (PBS pH 7,2 contenant 2% de glucose). Une centrifugation à 10000 g pendant 5 min est réalisée à température ambiante et le culot cellulaire est remis en suspension dans une solution de PG afin de conserver l'activité métabolique des levures pendant l'expérience. Les cellules sont

ensuite incubées avec du FUN-1 à une concentration finale de 15 µM pendant 60 min à 28°C, puis analysées par cytométrie en flux.

VIII Analyse par cytométrie en flux

Les échantillons sont analysés à l'aide d'un cytomètre en flux Guava EasyCyte Plus SSC4C (Plateforme de Cytométrie, Structure Fédérative de Recherche Santé STIC, Fac. Médecine, Université de Bourgogne, 7, Bd Jeanne D'Arc, 21000-Dijon, France). Cet instrument est équipé d'un laser 488nm, de détecteurs « Forward scatter » (FSC, taille de la cellule) et « side scatter » (SSC, pour granularité) ainsi qu'un filtre à 525 nm pour la détection de la fluorescence verte et un filtre à 680 nm pour la détection de la fluorescence rouge. Ce cytomètre permet de déterminer le nombre précis de cellules ainsi que les pourcentages des populations totale et viable (FDA ou FUN-1), sans la nécessité de billes de référence, grâce à l'utilisation d'une pompe à seringue volumétrique qui permet l'analyse directe des différents échantillons et l'ajustement du débit tel que décrit par le fabricant en utilisant uniquement le logiciel d'analyse et d'acquisition Guava Cytosoft. Pour toutes les analyses, un minimum de 5000 événements ont été acquis, et tous les échantillons ont été analysés en utilisant l'échelle logarithmique. Les expériences ont été effectuées en duplicat et comprennent un échantillon non marqué comme contrôle sur une plaque à 96 puits. Les résultats sont traités avec le logiciel Guava Cytosoft et exprimés en pourcentage et concentration de cellules viables calculée par rapport au nombre total de cellules déterminé par cytométrie

en flux. La concentration des cellules en état VNC est représentée par la différence entre le nombre de cellules cultivables et viables.

IX Etude du cycle cellulaire

L'analyse du cycle cellulaire des levures permet de visualiser les différentes phases du cycle et ainsi de déterminer le nombre de cellules dans chaque phase. Cela permet de comparer le cycle cellulaire des levures dans les différentes étapes de l'état VNC dans le but de valider l'absence d'une prolifération cellulaire lors de la sortie de l'état VNC et donc confirmer la ressuscitation.

La mesure du cycle cellulaire par CMF divise le cycle en trois phases (**Figure. 14**): G0/G1, phase d'activation des cellules, S, phase de synthèse de l'ADN et G2/M, phase de mitose. Ces trois phases, différentes par leur quantité d'ADN, peuvent être identifiées par la CMF couplée à des fluorochromes spécifiques de l'ADN tel que l'iodure de propidium (IP).

IX.1. Protocole expérimental

1 mL de suspension cellulaire de *S. cerevisiae* S288C est prélevé régulièrement, en triplicat, avant et après l'induction des «ressuscitations» (3, 7, 14, 21 et 30 jours), puis centrifugé pendant 5 min à 10000 g à 4°C. Le culot cellulaire est ensuite resuspendu dans de l'éthanol froid (70%) puis incubé à 4°C pendant 3 heures afin de fixer les cellules.

Une centrifugation à 10000 g pendant 5 min est réalisée à 4°C, le culot cellulaire est lavé par 1 mL de tampon Citrate (50 mM) à pH 7 (Sigma S4641 Quentin Fallavier France). Le culot ainsi obtenu est suspendu dans 1 mL de tampon citrate (50 mM) contenant 0,25 $mg.mL^{-1}$ de RNAse (Sigma R4875, Quentin Fallavier France), afin de réaliser une quantification spécifique de l'ADN (Pozarowski et Darzynkiewicz, 2004). Une incubation pendant une heure à 50°C est réalisée et les cellules sont ensuite centrifugées pendant 5 min à 10000 g à 4°C; le culot cellulaire ainsi obtenu est resuspendu dans du tampon citrate contenant 8 $\mu g.mL^{-1}$ d'IP. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 3 jours à 4°C à l'abri de la lumière.

Une culture en VS en phase exponentielle est utilisée comme témoin négatif/contrôle afin de visualiser les différentes phases du cycle cellulaire des cellules en réplications.

IX.2. Analyse par CMF

Le cycle cellulaire est analysé à l'aide du cytomètre LSRII BD (Plateforme de Cytométrie, Structure Fédérative de Recherche Santé STIC, Fac. Médecine, Université de Bourgogne, 7, Bd Jeanne D'Arc, 21000-Dijon, France) en utilisant le filtre 575+-26 nm pour détecter l'IP. La population cellulaire d'intérêt est placée et sélectionnée sur FSC vs SSC. Cette population d'intérêt est ensuite analysée sur FL2 (Filtre 2) 575/26nm-W (largeur) vs. FL2 575/26nm-A (Aire) (**Figure 18A**). Les cellules en doublets, qui apparaissent à droite, sont ainsi éliminées et le cycle est étudié sous forme d'histogramme en utilisant PE 575/26nm-A comme paramètre d'analyse (**Figure 18B**.).

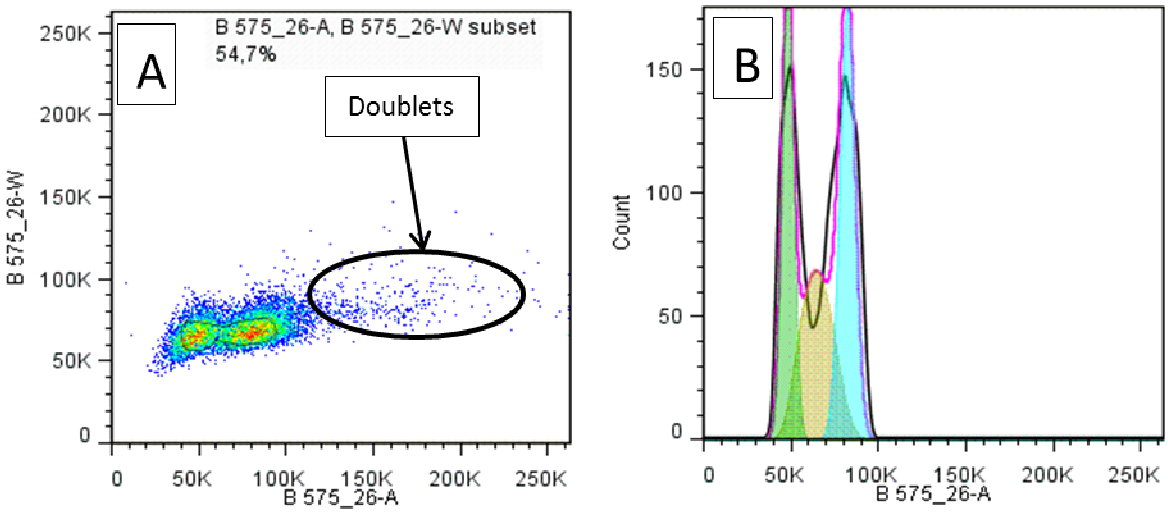


Figure 18 Distribution des cellules *S. cerevisiae* S288C analysée par CMF couplé au marquage IP dans les différentes phases du cycle cellulaire. (A) Population de *S. cerevisiae* S288C analysée sur FL2 (Filtre 2) 575/26nm-W (largeur) vs. FL2 575/26nm-A (Aire) : les cellules en doublets à droite ne sont pas prises en compte dans l'analyse. (B) Répartition des cellules de *S. cerevisiae* S288C dans les différentes phases du cycle cellulaire en utilisant PE 575/26nm-A comme paramètre d'analyse.

L'analyse du cycle cellulaire des différents échantillons est effectuée en utilisant la grandeur linéaire et le logiciel FlowJo.

X. Détermination du temps de sortie de l'état VNC

Une comparaison entre le temps de génération (G), définie comme étant la durée nécessaire pour le doublement de la biomasse cellulaire pendant la phase exponentielle, et la vitesse de sortie (temps de sortie) des cellules en état VNC est effectuée afin de valider l'absence d'une prolifération cellulaire au cours de la sortie de l'état VNC.

Le temps de génération de la souche *S. cerevisiae* S288C est déterminé en premier lieu dans un vin synthétique carencé et filtré (VSC) (VS obtenu par filtration d'une culture

de *S. cerevisiae* S288C de 14 jours dans du VS8%) afin de reproduire les mêmes conditions expérimentales (milieu carencé) qu'au cours de la sortie de l'état VNC. Le VSC filtré (pH 4) est inoculé avec une culture adaptée de *S. cerevisiae* S288C à une concentration finale de 10^4 UFC.mL^{-1}. 1 mL est prélevé régulièrement afin de suivre l'évolution de la DO_{600nm} ainsi que la cultivabilité sur milieu YPD solide. Une fois le temps de génération G déterminé, il sera comparé au temps nécessaire pour la sortie de l'état VNC observé après l'élimination du stress SO_2. Le temps de génération est calculé en utilisant la formule suivante:

$$\mathbf{G = \ln(2)/\mu\ (max)\ avec\ \ln(N2)-\ln(N1)=\mu\ (max)\ (t2-t1)}$$

(N2 est le nombre de cellules au temps T2 et N2 correspond au nombre de cellules au temps T2).

XI. Analyse des cellules en état VNC par microscopie à balayage électronique

Dans le but d'identifier les différences morphologiques liées à l'état VNC, des cellules viables cultivables et des cellules en état VNC en culture dans du vin synthétique sont déposées sur des lamelles de verre polylysine pendant 1 heure. Les cellules sont ensuite fixées sur des lamelles de verre à l'aide du tampon phosphate de sodium à 100 mM (pH 7,2) contenant 2,5% (v / v) de glutaraldéhyde pendant une nuit à 4°C. Après fixation, les cellules sont lavées cinq fois dans le même tampon pendant 30 min. Une série de déshydratation par l'éthanol et un séchage au point critique (ce point est caractérisé par des valeurs de T° et de pression pour lesquels un corps est à la fois liquide et gazeux) a été ensuite effectué. Les échantillons sont ensuite couverts avec une

couche d'or-palladium et observés par le SEM (FEI XL 30). L'analyse des images a été réalisée avec le logiciel Image J Version 1.46.

XII. Effet du milieu de culture sur l'état VNC

Plusieurs études suggèrent que le milieu de culture lui-même peut contenir des facteurs inhibiteurs de la sortie des cellules de l'état VNC (Agnolucci et al., 2010; Oliver, 2005). Afin de valider cette hypothèse chez les eucaryotes pouvant présenter l'état VNC, différents milieux de culture YPD liquide, VS8% pH 4 et pH 3,5, sont inoculés avec des cellules non cultivables à une concentration finale de 10^2 cellules.mL^{-1}. 100 µL de suspension levurienne, dilués ou non, sont étalés sur gélose (YPD) en triplicat (différentes dilutions sont réalisées en fonction de la cultivabilité). Les géloses (YPD) sont ensuite incubées à 28°C dans l'étuve et les colonies formées sont comptées après 3 à 5 jours.

XIII. Dosage des sucres réducteurs et des acides aminés totaux résiduels dans les milieux:

XIII. 1. Dosage des sucres réducteurs (Glucose et Fructose): DNS

Les sucres réducteurs (en raison de leur groupement carbonyl libre C=O), en milieu alcalin et chaud, permettent de réduire l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS) jaune en acide 3-amino 5 nitrosalicylique rouge orangé (**Figure 19**).

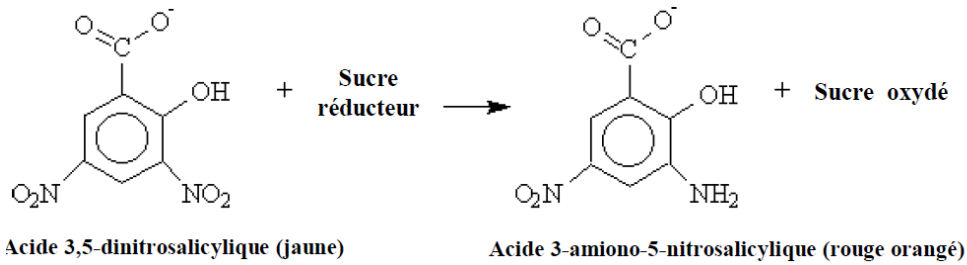


Figure 19. Réduction de l'acide 3,5-dinitrosalycilique (3,5-DNS ou DNS) en acide 3-amino-2-hydroxy-5-nitrsalicylique.

Le DNS ou réactif dinitrosalicylique est préparé de la façon suivante :

- 10 $g.L^{-1}$ d'acide 3,5-dinitrosalicylique
- 300 $g.L^{-1}$ de sodium potassium tartrate
- 16 $g.L^{-1}$ d'hydroxyde de sodium

Ces différents constituants sont dissous suivant l'ordre indiqué dans 1 L d'eau distillée. Le réactif est chauffé à 50°C pour dissoudre complètement le DNS.

Une solution mère de sucres réducteurs (glucose 1 $g.L^{-1}$ + fructose 1$g.L^{-1}$) est utilisée pour la préparation de la gamme étalon (pour obtenir des concentrations de 2 ; 1.8 ; 1.4 ; 1.2 ; 1 ; 0.8 ; 0.4 ; 0.2 et 0.1 $g.L^{-1}$).

Après avoir dilué l'échantillon (afin d'établir un intervalle de mesure cohérent avec la gamme étalon), 1 mL de chaque échantillon est ajouté à 1 mL de DNS dans des tubes à essai. Une homogénéisation est réalisée avant l'incubation des tubes au bain-marie à 100°C pendant 5 min. Les tubes sont ensuite refroidis dans un bain de glace et additionnés de 10 mL d'eau distillée. La densité optique des mélanges réactionnels est

mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm. Les différentes concentrations des échantillons sont déterminées à partir de la gamme étalon.

XIII. 2. Dosage des acides aminés totaux résiduels du milieu

L'azote aminé résiduel, dans le vin synthétique, est mesuré selon la méthode NOPA décrite par (Dukes et Butzke, 1998). Dans cette méthode, les acides α-aminés réagissent avec le réactif colorimétrique OPA/N-acétyl-L-cystéine (NAC), avec production d'un dérivé isoindol stable à température ambiante, cette réaction est mesurée par spectrophotométrie à 340 nm.

Réactifs

Solution A:

Cette solution est composée de 0.671g d'OPA dissout et amené à volume de 100 mL avec l'éthanol à 95% v/v. Cette solution est introduite dans une fiole jaugée de 1 L, puis 96 mL d'une solution aqueuse 1M NaOH, 8.468 g d'acide borique, et 0.816 g de NAC sont ajoutés. La solution est amenée à 1L avec de l'eau distillée.

Solution B :

Dans une fiole jaugée de 1L, 100 mL d'éthanol à 95% v/v, 96 mL d'une solution aqueuse 1M NaOH, 8.468 g d'acide borique, et 0.816 g de NAC sont ajoutés. La solution est amenée à 1L avec de l'eau distillée.

Mode Opératoire

Blanc-Réactif :

50 µL d'eau sont pipetés dans une cuve en quartz puis 3 mL de solution A sont ajoutés. Cette solution est utilisée pour faire le zéro du spectrophotomètre à 335 nm.

Echantillons:

50 µL de l'échantillon à analyser sont pipetés dans un cuve de quartz, 3 mL de la solution A sont ajoutés et une lecture à 335 nm est réalisée après une incubation pendant 10 minutes à température ambiante.

Blanc du vin synthétique:

50 µL du vin synthétique (frais) sont pipetés dans une cuve de quartz, 3 mL de la solution B sont ajoutés et une lecture à 335 nm est réalisée après une incubation pendant 10 minutes à température ambiante.

L'absorbance net est déterminée selon la formule suivante :

Absorbance net = "Absorbance de l'Echantillons" – "Absorbance du Blanc du vin Synthétique"

Courbe étalon et calcul de la concentration de l'azote aminé résiduel

La courbe étalon est préparée à partir d'une solution mère d'isoleucine 10mM. Cette solution est préparée dans une fiole jaugée en dissolvant 328 mg d'isoleucine dans 250 mL d'eau distillée. Les concentrations dans la gamme étalon seront comprises entre 2 et 10 mM, c'est-à-dire entre 28 à 140 $mg.L^{-1}$ d'azote. Si la concentration de l'échantillon est supérieure à cette plage, une dilution de l'échantillon est suggérée.

La concentration de l'azote aminé résiduel dans le vin est déterminée en appliquant la formule suivante : $mg.L^{-1}$ d'azote = (Absorbance x pente + valeur à l'origine) x facteur de dilution.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Mise en évidence de l'état VNC chez *S. cerevisiae.*

I.1 Optimisation de l'induction de l'état VNC

L'état VNC a été bien décrit chez les bactéries, spécifiquement chez *E. coli* et *Vibrio cholerae*. Cet état VNC est souvent rencontré chez des espèces bactériennes pathogènes (**Tableau 2**). Dans le vin, on considère que l'état VNC joue un rôle crucial en permettant aux levures d'altération de survivre tout au long du processus de fermentation du vin, même après la mise en bouteilles (Agnolucci et al., 2010; Divol et al., 2012; Millet et Lonvaud-Funel, 2000; Serpaggi et al., 2012).

L'état VNC a été observé, mais non démontré, chez différentes levures du vin, telles que *S. cerevisiae* et *B. bruxellensis*. (Agnolucci et al., 2010 ; Cocolin et Mills, 2003 ; Divol et Lonvaud-Funel, 2005 ; Divol et al., 2012 ; du Toit et al., 2005) . Seule l'étude récente réalisée par Serpaggi et al. (2012) a permis de prouver l'existence de l'état VNC chez *B. bruxellensis*. En effet, suite à un traitement des cellules de *B. bruxellensis* avec des doses supérieures ou égales à 0.8 $mg.L^{-1}$ de SO_2 moléculaire, *B. bruxellensis* devient non cultivable. Puis ces cellules redeviennent cultivables après élimination du stress SO_2 par simple augmentation du pH du milieu. De plus, l'existence d'une activité estérase a été démontrée chez ces cellules non cultivables après leur entrée en état VNC.

Très peu de connaissances sont disponibles sur les aspects moléculaires et cellulaires de l' état VNC chez les eucaryotes (Divol et al., 2012).

Pour cette raison et en se basant sur les résultats obtenus par Serpaggi et al. (2012) et les observations réalisées par Divol et Lonvaud-Funel, (2005), nous avons

souhaité démontrer et valider l'existence de l'état VNC chez un organisme modèle des cellules eucaryotes telle que la levure *S. cerevisiae*.

Dans ce but, le SO_2 a été choisi comme facteur induisant l'état VNC. Des tests préliminaires ont été réalisés sur des suspensions de *S. cerevisiae* S288C et PB2585 à 10^7 cellules.mL^{-1} afin de déterminer la concentration optimale de SO_2 (sous forme moléculaire, H_2SO_3) permettant d'obtenir des cellules viables mais non cultivables. Ainsi des suspensions cellulaires des deux souches de levure *S. cerevisiae* en vin synthétique (VS, pH 3,5) à différentes teneurs en éthanol (0, 8 et 10%) ont été traitées avec des concentrations de SO_2 moléculaire comprises entre 0 et 4.5 mg.L^{-1}.

Trois jours après l'application d'une dose égale à 4.5 mg.L^{-1} (SO_2 moléculaire), et quelle que soit la teneur du VS en éthanol, moins de dix Unités Formant Colonie (UFC) (soit moins de 10 UFC.mL^{-1} environ) sont observées pour 100 µL d'échantillons (**Figure 20**).

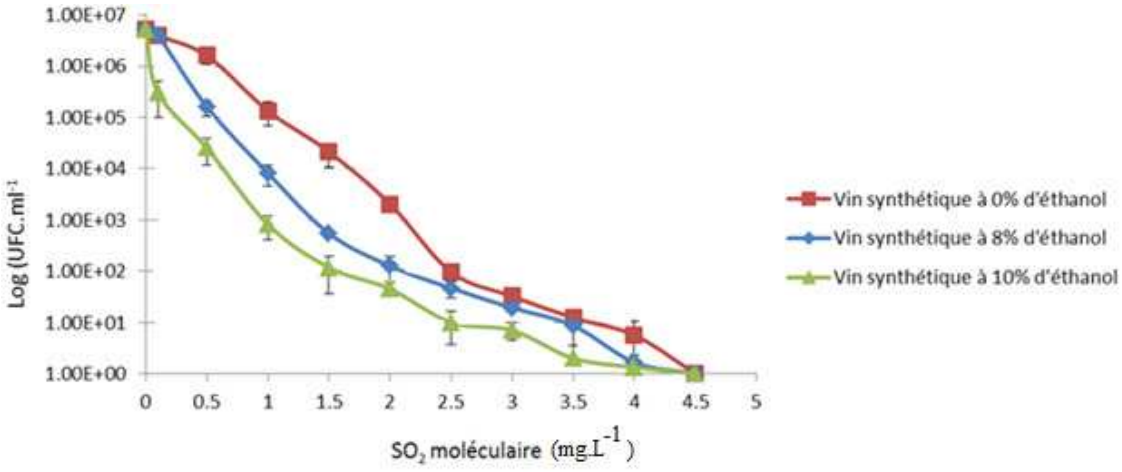


Figure 20. Effet de différentes doses de SO_2 moléculaire sur la formation des colonies de *S. cerevisiae* S288C cultivées en VS pH 3,5 à différentes teneurs en éthanol (0, 8 et 10%). Les résultats obtenus 3 jours après l'application du stress SO_2 représentent la moyenne de trois expériences indépendantes

Cette concentration de SO_2 moléculaire (4.5 $mg.L^{-1}$) est nettement plus élevée comparée à la concentration utilisée (0,8 $mg.L^{-1}$ de SO_2 moléculaire) pour inhiber totalement la croissance de *B. bruxellensis* sur gélose YPD (Agnolucci et al., 2010; Barata et al., 2008; Serpaggi et al., 2012; du Toit et al., 2005). Contrairement à *B. bruxellensis*, certaines espèces de levures telle que *Pichia*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, et *Zygosaccharomyces* sont plus résistantes au SO_2: et selon les études au moins 2 $mg.L^{-1}$ de SO_2 moléculaire sont nécessaires pour inhiber totalement leur croissance (Romano, et Suzzi, 1993; Warth, 1985). De plus, les souches de *S. cerevisiae* semblent être assez tolérantes au SO_2 avec une grande diversité de tolérance au SO_2 par rapport aux autres espèces de levures (Barata et al., 2008; Cocolin et Mills, 2003; Divol et al., 2006, 2012; Fugelsang et Edwards, 2007; Nardi et al., 2010). Les résultats obtenus au cours de notre étude (4.5 $mg.L^{-1}$ SO_2 moléculaire) semble être en accord avec ce qui est observé dans la littérature.

Afin de déterminer si les cellules non cultivables observées après application 4.5 mg. L^{-1}de SO_2 moléculaire étaient potentiellement en état VNC, une analyse par CMF avec marquage FDA a été entreprise. Sans ajout de SO_2, 90% (±6,2%) des cellules de *S. cerevisiae* S288C et PB2585 possèdent une activité estérase (Fluorescence verte) traduisant une activité métabolique. Trois jours après le traitement par 4.5 $mg.L^{-1}$ de SO_2 moléculaire, les cellules non cultivables marquées au FDA présentent une fluorescence verte, mais leur proportion varie selon la teneur du VS en éthanol (**Tableau 12**). Des variations similaires ont été déjà observés par Duckitt, (2012).

Tableau 12 : Pourcentages de cellules en état VNC analysées par CMF (FDA) 3 jours après l'application du stress SO_2 (4.5mg.L^{-1}) pour les différentes souches étudiées selon les différentes conditions expérimentales.

Souche	VS 0% d'alcool	VS 8% d'alcool	VS 10% d'alcool
S. cerevisiae S288C	15%	52.2%	<1%
S. cerevisiae PB2585	13%	40%	<1%

Le pourcentage des cellules en état VNC le plus faible est observé en VS10% (< 1% VNC) et le plus important est obtenu pour les cellules en VS8%, quelque soit la souche. En VS0% + 4.5 mg.L^{-1} SO_2 (moléculaire), un pourcentage intermédiaire de l'ordre de 14% est obtenu. (**Tableau. 12**).

Cette différence entre les pourcentages des cellules en état VNC, déterminés par CMF avec marquage FDA, dans les différentes modalités (VS0%, 8% et 10% d'éthanol) peut être expliquée de la manière suivante.

Les cellules en VS8% ont été cultivées trois jours avant l'application du stress SO_2 (4.5 mg.L-1) dans du milieu contenant 8% de l'éthanol. La présence d'éthanol à 8% a permis aux cellules de déclencher un programme d'expression génique spécifique pour protéger le système interne des effets de la variation causée par l'éthanol. Ce programme, dénommé la réponse au stress environnemental (RSE), comprend ~ 900 gènes dont l'expression est modifiée en réponse à des environnements stressants (Gasch, 2003; Stanley et al., 2010). La présence de 8% d'éthanol considéreé comme un stress modéré, permet ensuite à la levure d'acquérir une protection croisée contre différents stress.

Ainsi, après exposition au stress modéré éthanol 8%, la levure peut acquérir une résistance à des stress plus importants voire même létaux (Chen et al., 2003; Gasch, 2003; Teixeira et al., 2011) notamment dans notre cas au stress SO_2. Cet effet synergique a déjà été observé (Britz et Tracey, 1990; Cavazza et al., 2004; Duckitt, 2012).

Dans les conditions VS10%, il semble que la concentration en éthanol ne permette pas aux cellules de mettre en place une RSE : le stress étahnol 10% étant un stress fort et non modéré. Ainsi suite au stress éthanol 10% et à l'ajout de SO_2, les cellules ne présentent pas de capacité plus importante à résister au stress. Ce qui permettrait d'expliquer la différence obtenue entre les pourcentages des cellules en VNC obtenue en VS8% et VS10%.

Concernant la modalité VS0%, avant l'application du stress SO_2, les cellules ont été cultivées dans un milieu non stressant (absence d'éthanol), ce qui ne permet pas aux cellules de mettre en place une RSE. L'application ensuite du stress SO_2 devient alors un stress important qui peut expliquer que le pourcentage de cellules VNC soit inférieur au pourcentage obtenu pour la modalité VS8%.

Grâce à l'analyse par CMF couplée au marquage FDA, il est possible de détecter l'activité estérase chez les cellules en état VNC. Dans la littérature, la diminution de l'activité métabolique est l'une des caractéristiques des cellules en état VNC (Oliver, 2010), et a été observée chez *S. cerevisiae* en état VNC (Divol et Lonvaud-Funel, 2005). Ainsi, nous avons comparé l'intensité de fluorescence des cellules viables cultivables

(VS8%) et des cellules en état VNC (VS8%) par cytométrie de flux couplée au marquage FDA. Cette comparaison met en évidence une diminution de l'intensité de la fluorescence verte chez les cellules en état VNC et donc une diminution de l'activité métabolique (**Figure. 24**). En effet, l'apparition de fluorescence est due à une hydrolyse enzymatique du diacétate de fluoresceine en fluoresceine sous l'action d'estérases. Il semble concevable que cette diminution de fluorescence révèle une diminution de l'activité d'hydrolyse des cellules, et selon toute probabilité, une diminution de l'activité enzymatique globale des cellules et ainsi par extrapolation une diminution du métabolisme des cellules comme suggéré par Divol et Lonvaud-Funel, (2005). Nos résultats confirment ainsi ceux déjà décrits dans la littérature (Oliver, 2010) et observés chez *S. cerevisiae* en état VNC (Divol et Lonvaud-Funel, 2005).

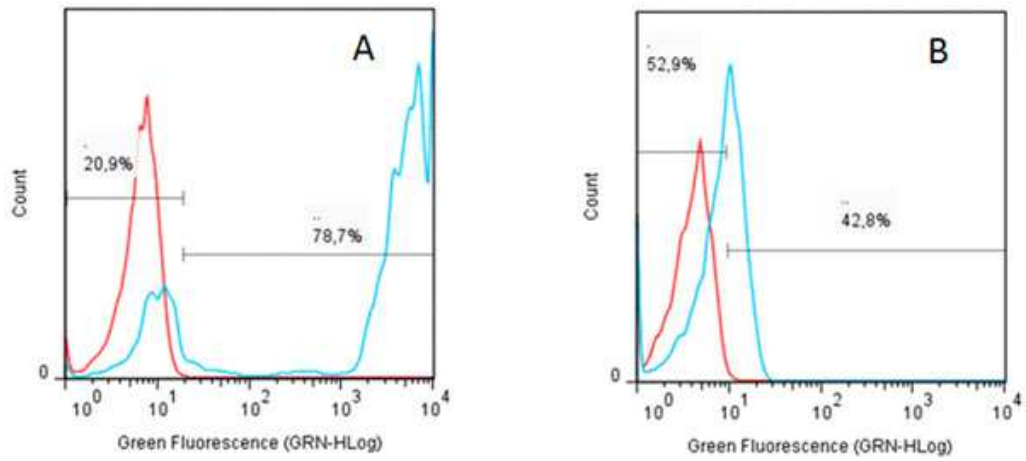


Figure 21. Analyse par CMF de la fluorescence de cellules de *S. cerevisiae* S288C dans du vin synthétique, à 8 % d'éthanol pH 3,5, marquées à la FDA. L'intensité de fluorescence verte (GRN-Hlog) est représentée sur l'axe des x et le nombre de cellules est représenté sur l'axe des ordonnées. (A) fluorescence verte de cellules de *S. cerevisiae* S288C (courbe rouge : auto-fluorescence et courbe bleue : après marquage au FDA. (B) fluorescence de cellules de *S. cerevisiae* S288C en état VNC (courbe rouge : auto-fluorescence et courbe bleue : après marquage à la FDA).

Par contre, cette différence de fluorescence persiste même après l'élimination du stress (données non présentées) quand les cellules deviennent viables et cultivables avec une faible activité métabolique (faible intensité de fluorescence verte) contrairement à ce qui était décrit par (Divol et Lonvaud-Funel, 2005).

I.2 Etude de la viabilité cellulaire

Afin de vérifier que les cellules viables par CMF marquage FDA mais non cultivables en VS0% et VS8% ne soient pas dans un état transitoire mais en réelle entrée en état VNC liée à des conditions environnementales défavorables, après ajout de 4.5 $mg.L^{-1}$ de SO_2 moléculaire, les différentes souches étudiées ont été incubées pendant 20 jours (VS0%) ou 30 jours (VS8%) à 28°C. 48 à 72 heures après l'ajout de SO_2, l'absence de cultivabilité est observée pour les deux souches en VS 8% (**Figure. 21) et VS** 0% (**Figure. 22**).

Aucune cellule n'a été détectée sur boite YPD et toutes les cellules viables sont non cultivables. La différence entre le pourcentage de cellules cultivables déterminé par comptage sur boite (YPD) et celui des cellules viables déterminé par CMF (FDA) suggère qu'une proportion de cellules entre en état VNC après l'application du stress sulfite (SO_2) : le pourcentage moyen de cellules en état VNC est égal à 14% (S288C et PB2585) en VS0% et à 46.1% en VS8%.

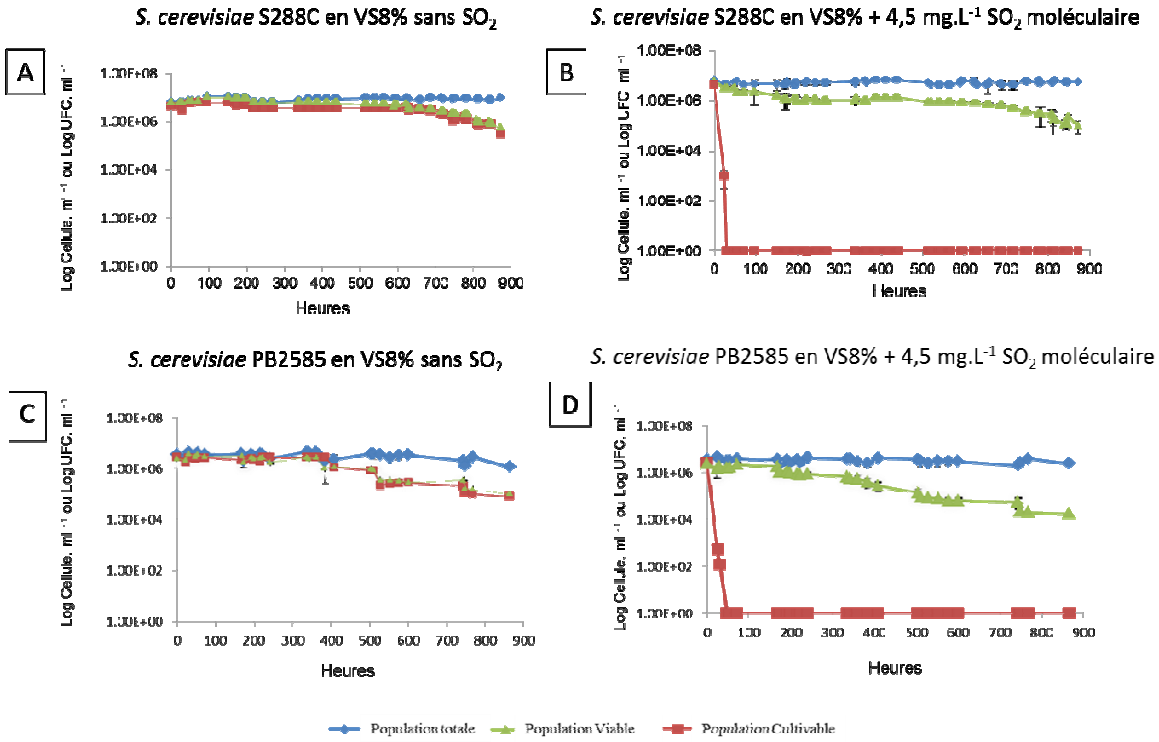


Figure 22. Effet de l'ajout 4.5 mg.L^{-1} de SO_2 moléculaire sur les cellules de levures *S. cerevisiae* S288C et *S. cerevisiae* PB2585 cultivées en VS 8%. La population levurienne totale a été déterminée par cytometrie (♦), la population cultivable par culture sur boite (■) et la population viable par cytometrie couplée au marquage FDA(▲). A : *S. cerevisiae* S288C en VS8% sans SO_2 ; B : *S. cerevisiae* S288C en VS8% en présence de 4.5mg.L^{-1} de SO_2 moléculaire ; C : *S. cerevisiae* PB2585 en VS8% sans SO_2 ; D : *S. cerevisiae* PB2585 en VS8% en présence de 4.5mg.L^{-1} de SO_2 moléculaire ; La valeur 0, choisie pour la clarté du graphique, correspond en réalité à un nombre indétectable (inférieur à 10 UFC.mL^{-1}). Les résultats obtenus représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

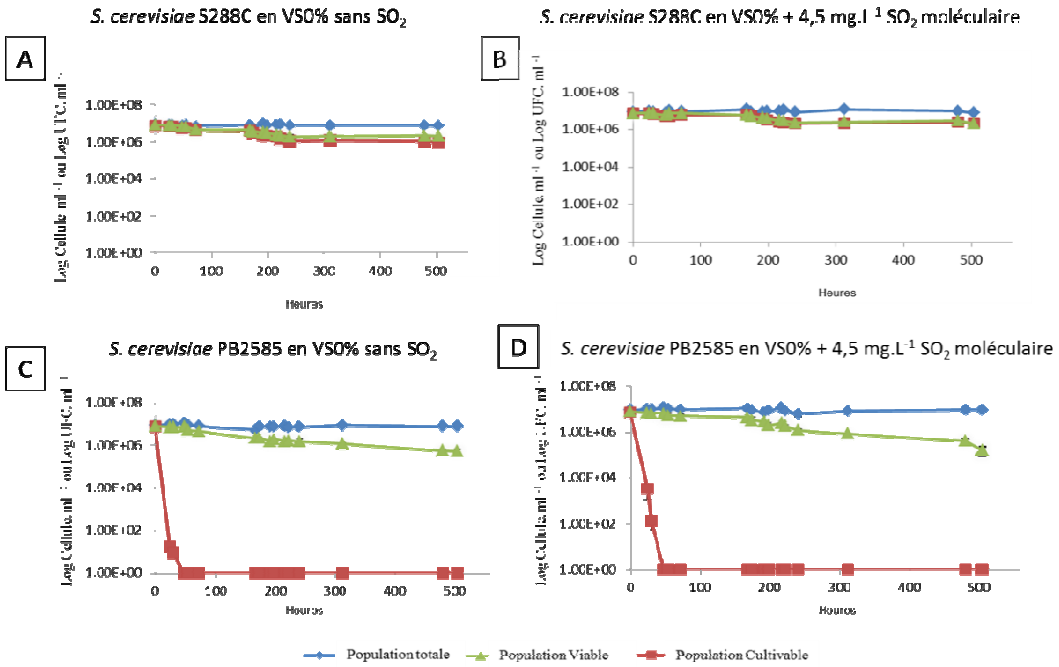


Figure 23 Effet de l'ajout 4.5 mg.L^{-1} de SO_2 moléculaire sur les cellules de levures *S. cerevisiae* S288C et *S. cerevisiae* PB2585 cultivées en VS 0%. La population levurienne totale a été déterminée par cytometrie (♦), la population cultivable par culture sur boite (■) et la population viable par cytometrie couplée au marquage FDA(▲). A : *S. cerevisiae* S288C en VS0% sans SO_2 ; B : *S. cerevisiae* S288C en VS0% en présence de 4.5mg.L^{-1} de SO_2 moléculaire ; C : *S. cerevisiae* PB2585 en VS0% sans SO_2 ; D : *S. cerevisiae* PB2585 en VS0% en présence de 4.5mg.L^{-1} de SO_2 moléculaire ; La valeur 0, choisie pour la clarté du graphique, correspond en réalité à un nombre indétectable (inférieur à 10 UFC.mL^{-1}). Les résultats obtenus représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

Après 15 jours de stress, 1% des cellules restent viables en VS 8% **(Figure. 21)** et VS 0% (**Figure. 22**). Ces observations sont en accord avec le rôle qui a été attribué au SO_2 dans l'induction de l'état VNC chez la levure *S. cerevisiae* (Divol et Lonvaud-Funel, 2005).

De plus, nous observons une diminution du pourcentage des cellules en état VNC au cours du temps (perte d'environ 1 log en 1 mois), indiquant ainsi que certaines cellules en état VNC sont en train de mourir. Ce même phénomène déjà observé par Divol et

Lonvaud-Funel, 2005 peut être dû à un effet cryptique (maintien de la viabilité par la présence de nutriments provenant des cellules mortes).

Ainsi pour l'ensemble de ces expérimentations, les deux souches *S. cerevisiae* (S288C) et (PB2585) étudiées entrent en état VNC suite à un stress SO_2 à 4.5 $mg.L^{-1}$ mais avec des pourcentages différents selon la teneur en alcool (**Tableau 12**). Ce qui montre bien que le SO_2 (4.5 $mg.L^{-1}$) est un facteur induisant l'entrée en état VNC chez *S. cerevisiae*. Les cellules peuvent maintenir leur viabilité pour une durée importante (20 jours en VS 0% et 30 jours en VS 8%). L'action du SO_2 sur *S. cerevisiae* à des concentrations élevées (4.5$mg.L^{-1}$) est rapide: la viabilité des cellules est fortement réduite de 90% (initialement avant le traitement) à 40 % ou 52 % (3 jours après le traitement selon la souche) en VS8% et à 14% en VS0%. Ceci est probablement dû au fait que l'absorption du SO_2 chez *S. cerevisiae* est un processus rapide (Divol et al., 2012; Macris et Markakis, 1974; Park et Bakalinsky, 2000b, 2004).

De plus, nos résultats semblent être comparables à ceux obtenus par Divol et Lonvaud-Funel (2005), qui ont montré que la population cultivable, déterminée par méthode traditionnelle de culture (milieu solide) a diminué moins rapidement et était indétectable après quelques jours (<1 $UFC.ml^{-1}$, 12 jours après l'addition du SO_2). Ce fait peut être dû aux vraies conditions œnologiques appliquées par Divol et Lonvaud-Funel, (2005), par ailleurs, une faible diminution de la population viable a été observée (perte d'environ 1 log en 1 mois), déterminée par épifluorescence, révélant ainsi l'existence toujours de cellules viables.

I.3. Validation du marquage FDA

Comme énoncé précédemment, la fluorescence mesurée au cours de cette expérimentation est le résultat de la conversion de la FDA non fluorescente en fluorescéine, un composé fluorescent vert. Ce principe est donc basé sur la mesure de l'activité estérase de cellules viables. Deux problèmes potentiels peuvent être rencontrés lors de l'utilisation de la FDA. Le premier est l'hydrolyse possible de la FDA en fluorescéine dans le cas de cellules mortes (activité estérase résiduelle). Le second est le phénomène de « Quenching » avec un ou plusieurs composants réactionnels du milieu de culture (Clarke et al., 2001; Peak et al., 2010). Il a été montré que le pH, la tryptone, la peptone, l'extrait de levure (Clarke et al., 2001), la lysine, l'arginine, l'histidine et la cystéine (Alarcón-Gutiérrez et al., 2008) peuvent favoriser l'hydrolyse de la FDA en absence de cellules vivantes. De plus, les débris du vin peuvent interférer et gêner la détection de certaines bactéries marquées au FDA (Malacrinò et al., 2001; Salma et al., 2012). Par contre des dilutions du milieu ou l'utilisation de tampons adéquats diminuent les risques d'autohydrolyse de la FDA par certains composés réactionnels (Alarcón-Gutiérrez et al., 2008; Clarke et al., 2001; Yguerabide et al., 1994).

Pour toutes ces raisons et afin de s'assurer que l'intensité de fluorescence verte observée dans les cellules en état VNC est le reflet de l'activité métabolique et non le résultat d'une activité estérase résiduelle de cellules mortes, l'intensité de fluorescence verte a été mesurée dans des cellules mortes obtenues en utilisant deux stress létaux appliqués individuellement : la natamycine (25mg.L^{-1}) et le SO_2 (10g.L^{-1}, total). Après

45 minutes de traitement au SO_2 (10g.L^{-1}, total) (**Figure. 25**) ou 150 minutes de traitement à la natamycine (25mg.L^{-1}) (**Figure. 26**), aucune cellule ne présente de fluorescence verte. Ceci indique que la fluorescence verte reflète une véritable activité métabolique et non pas une activité estérase résiduelle.

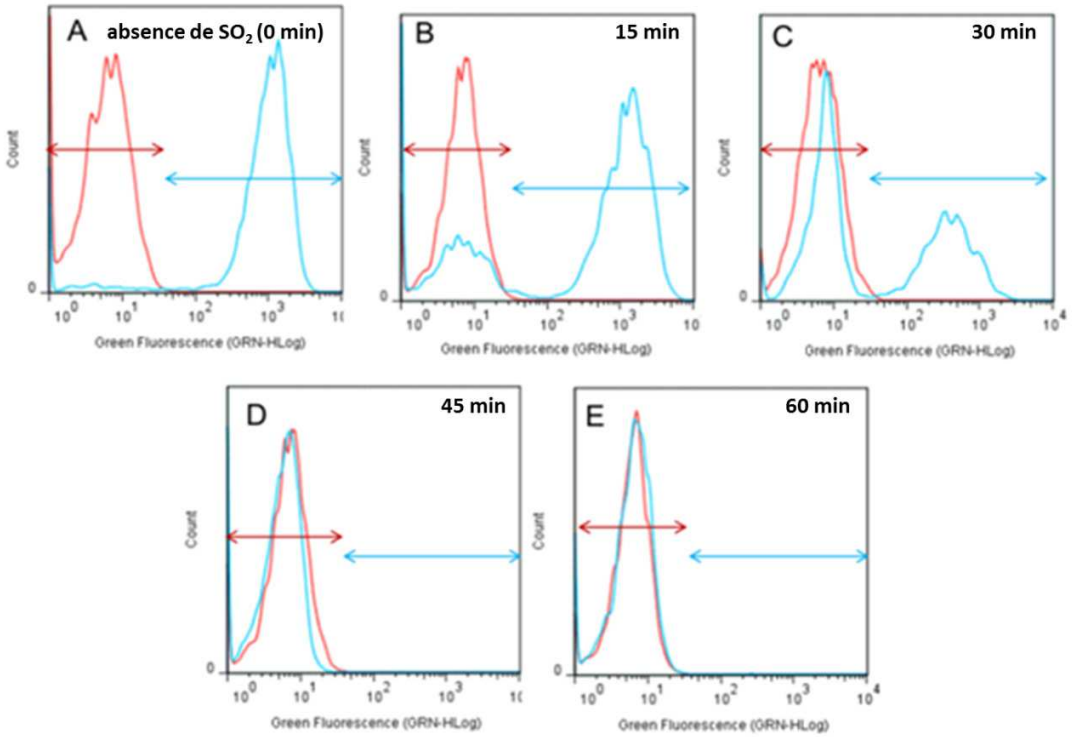


Figure 24. Analyse par CMF de cellules de *S. cerevisiae* S288C en culture dans du VS à 8% d'alcool avec 10g.L^{-1} de SO_2 total après marquage à la FDA. (A) cellules marquées en absence de SO_2 (0 min), (B) après 15 min, (C) après 30 min, (D) après 45 min et (E) après 60 min de traitement SO_2 (10g.L^{-1} total). L'intensité de fluorescence verte (GRN-Hlog) est représentée sur l'axe des abscisses et le nombre de cellules est représenté sur l'axe des ordonnées. Les différents histogrammes montrent la fluorescence de *S. cerevisiae* S288C avant (courbe rouge ; auto-fluorescence) et après (courbe bleue : marquage à la FDA).

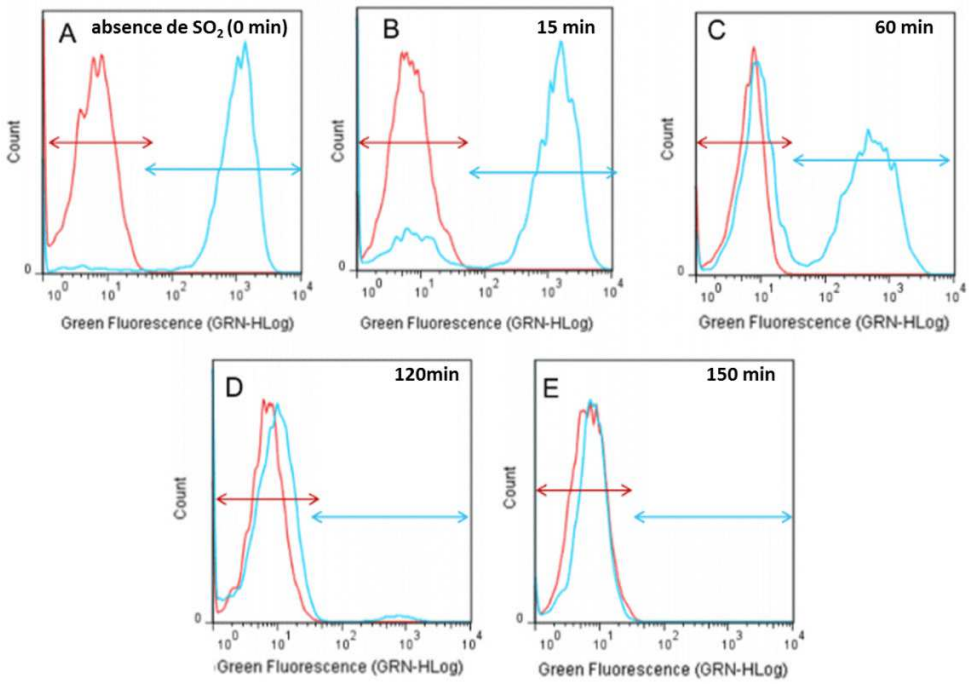


Figure 25Analyse par CMF de cellules de S. cerevisiae S288C en culture dans du VS à 8% d'alcool avec 25 mg.L^{-1} de Natamycine après marquage à la FDA. (A) cellules marquées en absence de Natamycine (0 min), (B) après 15 min, (C) après 60 min, (D) après 120 min et (E) après 150 min de traitement Natamycine (25 mg.L^{-1}) L'intensité de fluorescence verte (GRN-Hlog) est représentée sur l'axe des abscisses et le nombre de cellules est représenté sur l'axe des ordonnées. Les différents histogrammes montrent la fluorescence de *S. cerevisiae* S288C avant (courbe rouge : auto-fluorescence) et après (courbe bleue : marquage à la FDA).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Chand et al. (1994) qui ont montré qu'après une période de 40 min il y a une perte totale de l'activité estérase (analyse par FDA) dans le cas de cellules mortes. Ainsi les cellules, après une exposition au stress SO_2, qui sont toujours détectables par CMF (pour une période de temps supérieure à 24 heures après la perte de leur cultivabilité) sont bien dans un état VNC et sont métaboliquement actives comme observé en **Figures. 21 et 22**.

Ainsi par ces différentes expérimentations, nous avons démontré l'existence d'un état VNC chez la levure *S. cerevisiae* et que cet état pouvait se maintenir pendant une longue période de temps (30 jours). En effet, le stress sulfite en VS 8% est capable d'induire l'état VNC chez *S. cerevisiae* et la suppression de ce stress sulfite, par augmentation du pH du milieu, permet d'induire la «ressuscitation» des cellules de l'état VNC (VS8%) (**Figure. 23**). Par contre en VS0%, l'augmentation du pH ne permet pas la sortie des cellules de l'état VNC.

I.4. Détection d'une activité métabolique

Afin de confirmer que les cellules non cultivables obtenues 3 jours après l'application du stress, étaient bien actives métaboliquement, nous avons souhaité mettre en évidence une autre activité métabolique que l'activité estérase chez ces cellules non cultivables. Ainsi une analyse par CMF de cellules de *S. cerevisiae* S288C viables, cellules mortes et cellules non cultivables (3 jours après l'ajout de SO_2) a été réalisée à l'aide du marqueur, FUN-1. Le FUN-1 diffuse à travers la membrane de toutes les cellules (mortes ou vivantes) et donne lieu à une fluorescence verte (en se fixant sur l'ADN). La présence du FUN-1 au niveau des cellules métaboliquement actives permet la formation de structures cylindriques intra-vacuolaires (CIVS) au niveau desquelles le FUN-1 sera métabolisé et d'où il émet une fluorescence rouge (Hua et al., 2011; Millard et al., 1997).

L'analyse par CMF des cellules mortes marquées avec le FUN-1 montrent que > 97,87% des cellules diffusent une fluorescence verte indiquant que la membrane cytoplasmique est perméabilisée comme attendu dans le cas d'une cellule morte (Hua et al., 2011; Millard et al., 1997) (**Figure. 29A**). L'analyse des cellules viables par CMF, après avoir été marquées avec le FUN-1 montre la présence d'une fluorescence rouge dans 95,2% de la population. Ce résultat indique la formation des structures CIVS dans les vacuoles cellulaires nécessitant de l'ATP (Hua et al., 2011; Millard et al., 1997; Silva et al., 2012), ce qui montre que ces levures sont métaboliquement actives (**Figure. 29 B**).

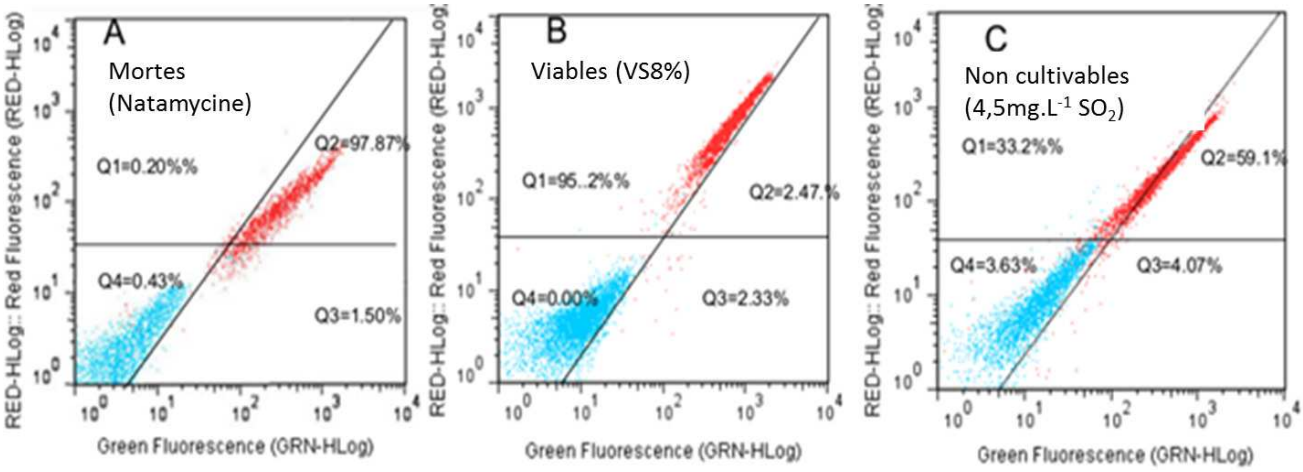


Figure 26. Analyse par CMF de cellules de *S. cerevisiae* S288C marquées avec le FUN-1. L'intensité de la fluorescence verte apparaît sur l'axe des abscisses et l'intensité de fluorescence rouge est représentée sur l'axe des ordonnées. (A): fluorescence des cellules mortes (Natamycine (25mg. L^{-1}) pendant 1h à 28°C après marquage avec le FUN-1. (B) : fluorescence des cellules viables après marquage avec le FUN-1. (C) : fluorescence des cellules non cultivables (4.5mg.L^{-1} SO_2) après marquage avec le FUN-1. Les cellules qui ne présentent pas de fluorescence rouge se situent au niveau des quadrants 3 et 4, les cellules présentant une fluorescence rouge se situent dans les quadrants 1 et 2. Les cellules présentant une fluorescence verte sont réparties dans les quadrants 2 et 3. Les cellules ne présentant pas de fluorescence verte sont réparties dans les quadrants 1 et 4. La population cellulaire en bleu correspond à l'autofluoresence des cellules.

Les cellules non cultivables (**Figure. 29 C**), analysées par la CMF après marquage avec le FUN-1, montrent que 33,2% de la population totale présente une fluorescence rouge,

ce qui indique la formation des structures CIVS et que le FUN-1 est transporté du cytosol vers la vacuole. La présence d'une fluorescence rouge dans les cellules non cultivables confirme que ces cellules sont métaboliquement actives comme déjà observé par le marquage au FDA.

II. Validation de l'état VNC

II.1. « Ressuscitation » des cellules

Pour valider l'état VNC d'une population cellulaire, il est nécessaire de démontrer que cette population peut ressortir de cet état et retrouver à nouveau sa capacité à se multiplier: ce phénomène est appelé la «réanimation» ou «ressuscitation» (Oliver, 1993). Ainsi, la capacité des cellules à sortir de l'état VNC a été étudiée à 3-7-14-21-29 jours après l'application du stress (**Figure. 23**) en augmentant le pH du milieu de 3,5 à 4,0 pour diminuer la concentration du sulfite (SO_2 moléculaire) (**Figure. 5**).

Un jour après l'élimination du SO_2 moléculaire en VS8%, les cellules de la souche *S. cerevisiae* S288C (**Figure. 23**) et de la souche *S. cerevisiae* PB2585 (résultats non présentés) deviennent à nouveau cultivables contrairement à ce qui a été rapporté par Divol, (2004). En effet, dans cette étude, il est rapporté que l'élimination seule du SO_2 par addition d'éthanal n'est pas suffisante pour observer la «ressuscitation». La «ressuscitation» ne pu être observée que quelques jours après la dilution au cinquième du vin (vrai vin) dans du jus de raisin lui-même dilué au demi dans de l'eau (Divol, 2004). Cette différence observée et comparée avec nos résultats, peut être due au fait que

la technique utilisée pour éliminer l'effet du SO_2 est différente ainsi que le milieu de culture utilisé.

Par contre, quelque soit le temps d'application du stress, l'augmentation de pH ne permet pas d'induire la sortie de l'état VNC pour l'ensemble des cellules en état VNC (souche S288C et PB2585) (**Figure. 23**).

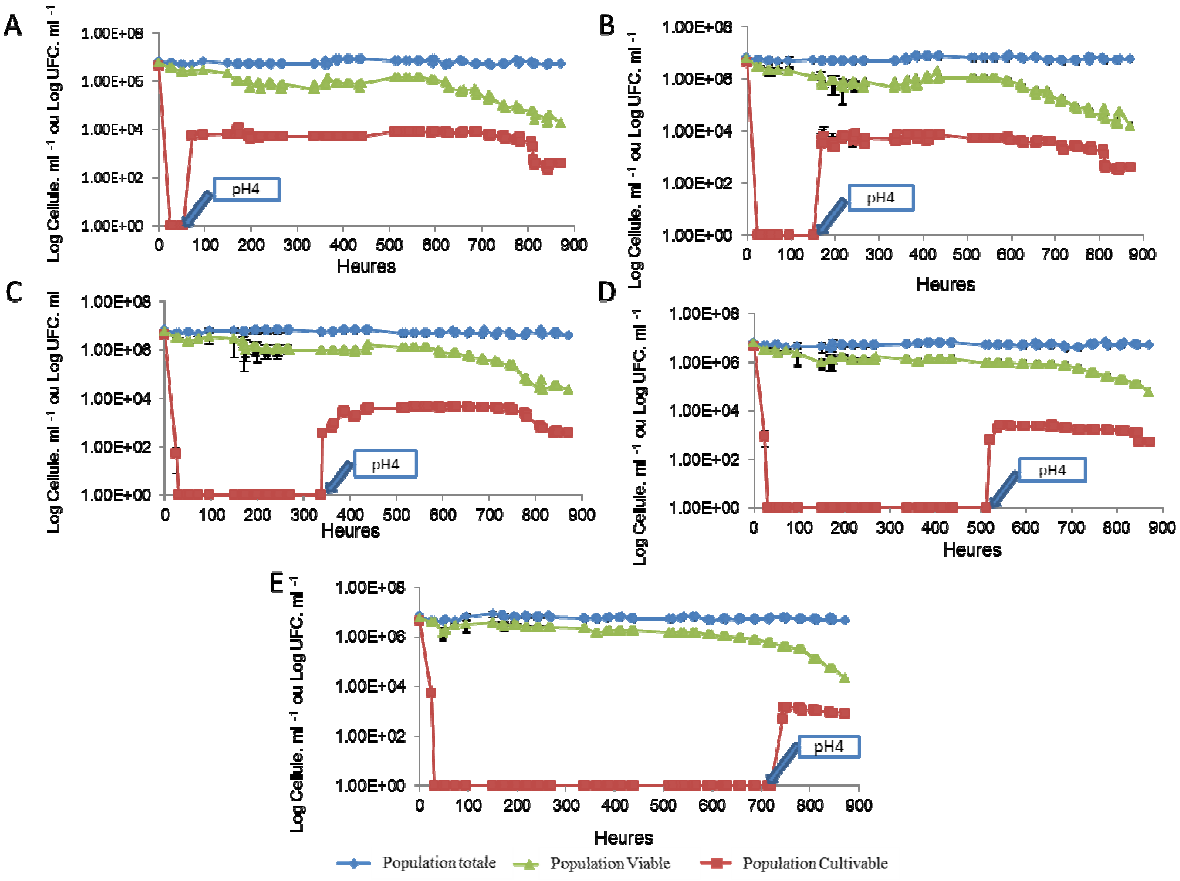


Figure 27 «Ressuscitation» de *S. cerevisiae* S288C de l'état VNC en VS8%. Les figures représentent les variations des concentrations des cellules totales déterminées par cytometrie (♦), cultivables déterminées par culture sur boite (■) et viables déterminées par cytometrie couplée au marquage FDA (▲). La "ressuscitation» est induite par l'élimination du SO_2 à différents jours (A: jour 3, B: jour 7, C: jour 14, D: jour 21 et E: jour 30). Les résultats présentés sont la moyenne de trois répétitions issues de trois expériences indépendantes. La valeur 0, choisie pour la clarté du graphique, correspond en réalité à un nombre indétectable (inférieur à 10 UFC.mL^{-1}).

En effet, seul 1% des cellules sortent de cet état. Ceci peut être dû à l'état physiologique hétérogène de la population. Selon Davey, (2011) après l'application d'un stress, une population microbienne renferme des cellules mortes, des cellules en état VNC et des cellules en train de mourir ou ayant dépassé le stade (ou point) irréversible à partir duquel le retour en état viable est impossible.

La sortie des cellules non cultivables en VS0% par l'augmentation du pH n'a pas pu être observée (résultats non présentés). Que ce soit pour l'entrée ou la sortie de l'état VNC, la présence de l'éthanol joue un rôle important. Ceci peut être expliqué par le fait que les cellules, avant l'induction de l'état VNC, se sont adaptées au stress éthanol (VS8%), affectant ainsi leur activité, leur perméabilité et leur fluidité membranaire. Les cellules auraient ainsi bénéficié de la mise en place de mécanismes d'adaptation à l'éthanol (RSE) qui leur aurait permis de mieux supporter le stress sulfite, comme discuté précedement. Ce mécanisme de protection croisée permettrait d'expliquer la différence obtenue entre les résultats en VS8% et VS0%.

Afin de comprendre pourquoi l'augmentation du pH, en VS0%, ne permet pas la reprise de la cultivabilité, un dosage des sucres réducteurs et de l'azote aminé résiduel est réalisé à 0 jour, 7 jours et 15 jours après le stress SO_2. Les dosages effectués précédemment montrent que le milieu de culture (VS0%) au moment de l'application du stress SO_2 est très pauvre en sucres réducteurs ($0.47 g.L^{-1}$) ainsi qu'en azote aminé (24 $mg.L^{-1}$). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus en VS8%. Ces valeurs permettent de dire que le milieu de culture VS0% présente en effet, une carence nutritionnelle

(sucres réducteurs < 0.5g.L^{-1} (Kaeberlein et al., 2004; Lin et Guarente, 2006; Tahara et al., 2013), azote assimilable < 150 mg·L^{-1} (Bely et al., 1990; Butzke, 1998; Nicolini et al., 2004)) qui pourrait induire un stress en condition VS0% en plus du stress SO_2.

Afin de remettre les cellules en conditions optimales, une solution de sucres (glucose + fructose) à une concentration de 2 g.L^{-1} (50:50) ou 20 g.L^{-1} (50:50) est ajoutée à une culture de *S. cerevisiae* S288C, 7 jours après le stress SO_2 ; puis le pH du milieu est augmenté dans une modalité (**Figure. 27**) et maintenu à 3.5 dans une autre modalité, et la cultivabilité a été analysée (**Figure. 28**).

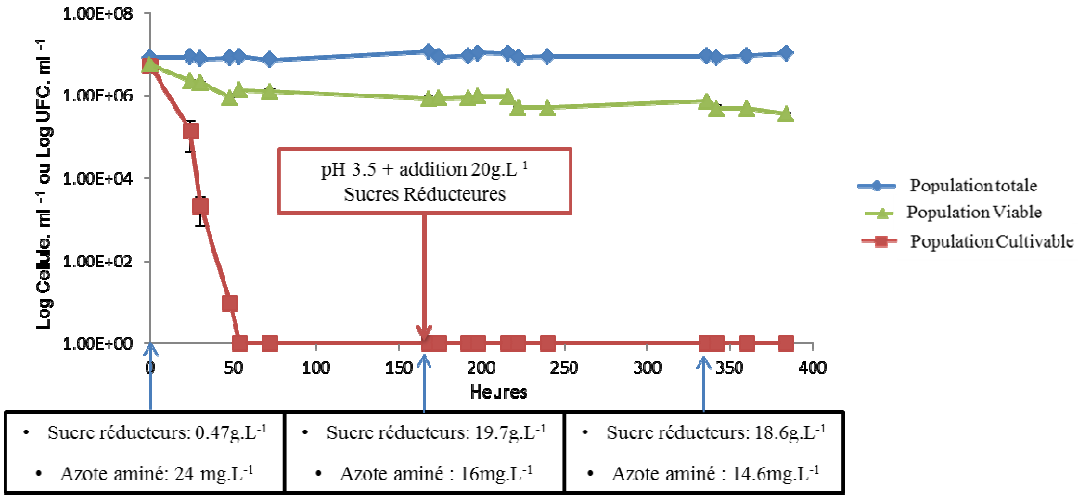


Figure 28. Suivi des populations totales, viables et cultivables de *S. cerevisiae* S288C (VS0%, pH 3,5) après addition de 20g.L^{-1} de sucres réducteurs 7 jours après le stress SO_2 sans modification du pH; Le dosage des sucres réducteurs et de l'azote organique résiduel a été réalisé. La valeur 0, choisie pour la clarté du graphique, correspond en réalité à un nombre indétectable (inférieur à 10 UFC.mL^{-1}). Les résultats obtenus représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

L'addition d'une source de sucres réducteurs sans aucune augmentation de pH ne permet pas aux cellules en état VNC de reprendre leur cultivabilité et n'affecte pas leur viabilité

(**Figure. 27**). Ceci peut être dû à la présence d'une concentration importante de SO_2 moléculaire dans le milieu de culture malgré l'addition des sucres réducteurs.

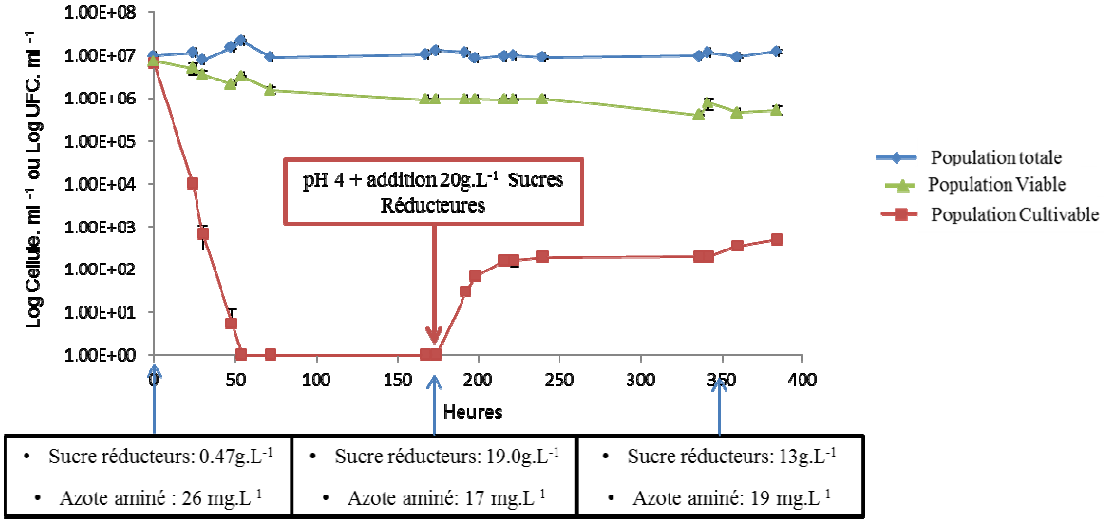


Figure 29. Suivi des populations totales, viables et cultivables de *S. cerevisiae* S288C (VS0%, pH 3,5) après addition de 20g.L^{-1} de sucres réducteurs 7 jours après le stress SO_2 avec augmentation modification du pH; Le dosage des sucres réducteurs et de l'azote organique résiduel a été réalisé. La valeur 0, choisie pour la clarté du graphique, correspond en réalité à un nombre indétectable (inférieur à 10 UFC.mL^{-1}). Les résultats obtenus représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

Par contre, l'addition des sucres réducteurs associée à l'augmentation du pH permet aux cellules de sortir de l'état VNC (**Figure 28**). Cette sortie est comparable à celle observée en VS8% (**Figure 23**), soit 1% de cellules à nouveau cultivables quelle que soit la concentration des sucres réducteurs apportée (2g.L^{-1} ou 20g.L^{-1}).

Etant donné que le milieu de culture VS8% présente une carence nutritionnelle comparable à celle observe en VS0% au moment de l'application du stress. La «ressuscitation» des cellules VNC en VS8% peut être expliquée par le fait que la levure *S. cerevisiae* est capable d'utiliser l'éthanol comme source de carbone, lorsque le milieu

est carencé en glucose (DeRisiet al. 1997; Galdieri et al. 2010; Guidi et al. 2010), comme une source indispensable à la «ressuscitation».

Il peut être donc suggérer, dans notre cas, que la présence d'une source de carbone ainsi que l'élimination du stress SO_2 par augmentation du pH sont indispensables pour la «ressuscitation» des VNC en milieu VS0% d'une manière comparable à celle observée en présence d'éthanol (VS8%) et que toute carence nutritionnelle (source de carbone) aboutit à l'inhibition de la ressuscitation.

II.2. Détermination du temps de sortie de l'état VNC et comparaions avec le tempsde génération

Le temps de génération de *S. cerevisiae* S288C a été déterminé pour des cellules cultivées dans un milieu carencé similaire au milieu dans lequel se trouvent les cellules au moment de leur sortie de l'état VNC. Ce temps est estimé à environ **10 h** (**Figure. 32).**

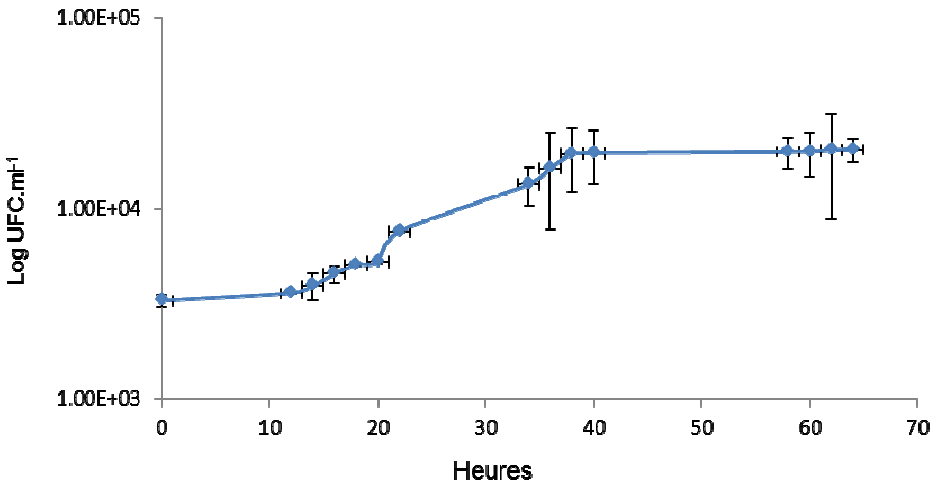


Figure 30. Croissance de *S. cerevisiae* S288C en VS 8% pH 4, carencé à 28°C. Les barres d'erreur indiquent les écarts types de trois expériences indépendantes.

Au moment de la sortie de l'état VNC après l'augmentation du pH, pour passer d'aucune cellule cultivable (limite de détection : 10 UFC.mL^{-1} ;) à 5,19.10^{2} UFC.mL^{-1} de cellules cultivables, **7h** ont été nécessaires. (**Figure. 33**).

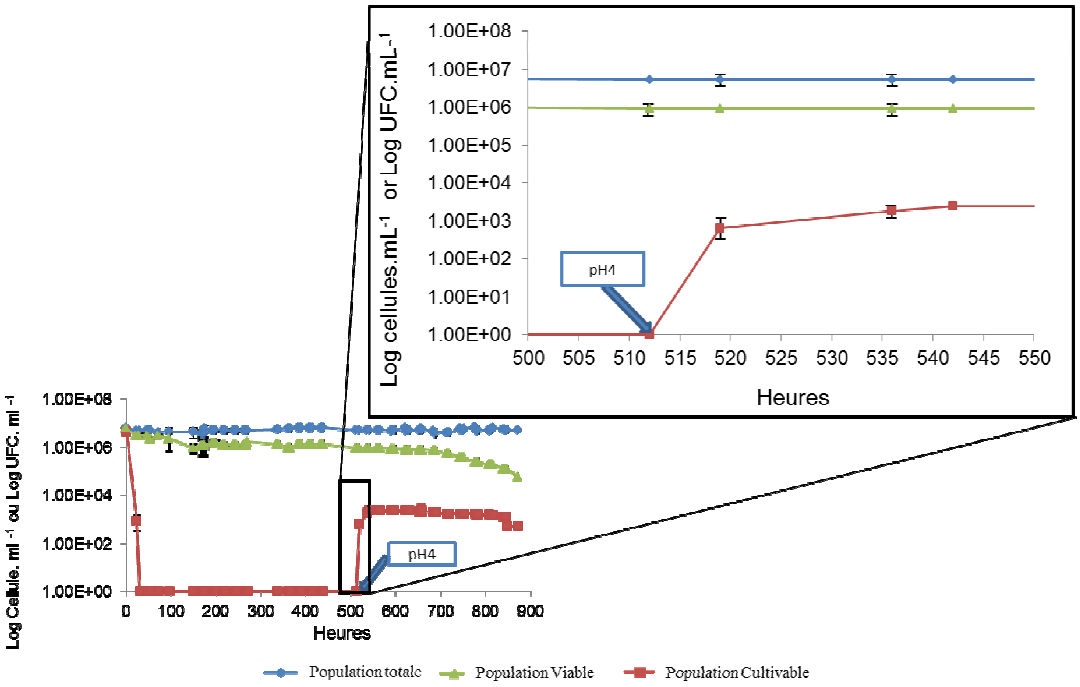


Figure 31 Temps de sortie de l'état VNC pour des cellules de *S. cerevisiae* S288C après augmentation du pH 21 jours après le stress SO_2. (♦) concentration des cellules totales déterminé par cytometrie, (■) concentration des cellules cultivables déterminée après étalement sur boite et (▲) concentration des cellules viables déterminée par cytometrie couplée au marquage FDA. La valeur 1 correspond à une valeur indétectable (< 10 UFCmL^{-1}). Les différentes valeurs représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

En tenant compte de la limite de détection, et du temps de génération calculé précédemment (10 h), au moins 56.9 h auraient été nécessaires au cours du processus de «ressuscitation» pour atteindre une concentration de 5,19.10^{2} UFC.mL^{-1} après l'augmentation du pH. Ainsi la comparaison de ces deux temps pour obtenir le même

taux de population nous permet de conclure que la sortie de l'état VNC observée est une vraie ressuscitation et non le résultat d'une multiplication de quelques cellules résiduelles.

II.3. Etude du cycle cellulaire

L'hypothèse de l'état VNC est basée sur le faitque les cellules sont capables de retrouver leur capacité à se multiplier à nouveau au moment de leur sortie de l'état VNC, et donc de retrouver un métabolisme normal lorsque les conditions environnementales s'améliorent. Cette « ressuscitation» a fait l'objet de débats (Bogosian et Bourneuf, 2001; Bogosian et al., 1998; Jacob, 2010; M. R. Barer, 1993), puisque certains suggèrent que la reprise de cultivabilité est due à la présence et à la reprise de croissance de quelques cellules résiduelles, avec un métabolisme normal, dans une population non cultivable. Pour démontrer que, dans notre étude, la reprise de cultivabilité observée après l'élimination du stress SO_2 (SO_2 moléculaire) est due à une réelle reprise de cultivabilité ou «ressuscitation», différentes analyses ont été réalisées :

- Comparaison du profil du cycle cellulaire des cellules en état VNC juste avant et après l'augmentation du pH par CMF.

L'utilisation de la CMF permet non seulement la détermination de la teneur relative en ADN cellulaire, mais également l'identification de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.

Afin de valider le protocole expérimental de marquage pour l'analyse du cycle cellulaire, le cycle cellulaire d'une population de cellules de *S. cerevisiae* S288C en croissance (phase exponentielle) dans du VS 8% a été étudiée à l'aide de la CMF couplée à l'iodure de propidium. Les résultats obtenus nous ont permis de répartir les cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire sur un histogramme basé sur la distribution théorique des cellules selon la relation linéaire entre l'intensité de fluorescence (IP) et la teneur cellulaire en ADN (**Figure. 30**): 26,1% des cellules sont en phase G1 (intensité de fluorescence ≈ 45.103), 43.33% des cellules possèdent une quantité d'ADN correspondant aux phases G 2 et M (intensité de fluorescence ≈ 90.103) et 43.33% des cellules sont en phase S phase au cours de laquelle l'ADN est synthétisé en permanence.

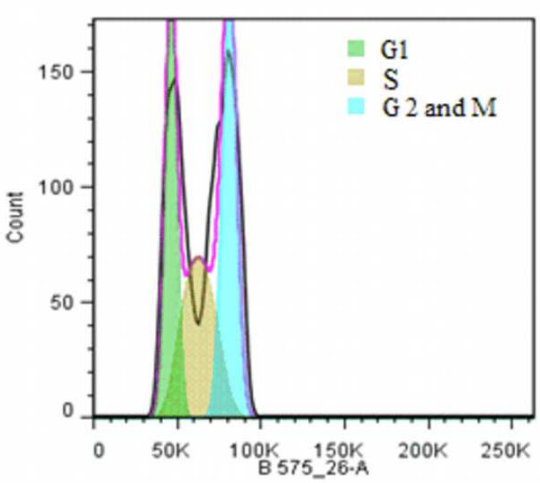


Figure. 32: Analyse par CMF et répartition des cellules de *S. cerevisiae* S288C en phase exponentielle cultivées en vin synthétique 8% d'éthanol dans les différentes phases du cycle cellulaire.

Afin de montrer que la reprise de cultivabilité observée au cours de la ressusictation est du à un vrai regain de cultivabilité et non pas a une recroissance de quelques cellules cultivables résiduelles, une comparaison du profil du cycle cellulaire des cellules en état

VNC et de cellules sortant de l'état VNC (3 jours après l'élimination de stress, pourcentage VNC égale à 68%) a été réalisée. Les résultats ont mis en évidence des profils similaires. En effet, la plupart des cellules dans les deux conditions sont dans la phase S (43,3%) (**Figure. 31**); démontrant ainsi l'absence d'une prolifération cellulaire au cours de la sortie de l'état VNC.

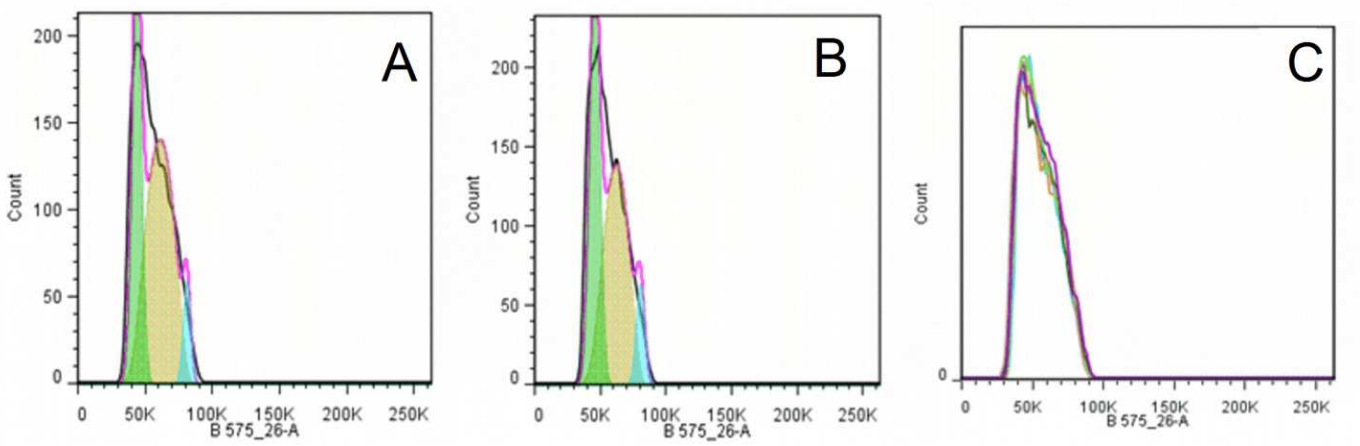


Figure 33. Analyse du cycle cellulaire par CMF, de cellules de *S. cerevisiae* S288C en VS8%. (A): cellules avant la sortie de l'état VNC (pH 3,5). (B) cellules après la sortie de l'état VNC (pH 4). Les profils montrent la distribution des cellules selon la relation linéaire entre l'intensité de la fluorescence (IP) et la teneur en ADN. Les populations de cellules G1 (vert), S (brun), et G2/M (en bleu) ont été déterminées. L'expérience a été répétée au moins trois fois et les données représentatives sont présentées. (C) montre la superposition des différents cycles analysés par la CMF (avant et après la sortie de l'état VNC).

II.4. Caractérisation de l'état VNC

Selon l'étude de Serpaggi et al. (2012), des modifications de la surface (invagination) au niveau de cellules de *Brettanomyces* en état VNC ont été observées. De plus, des modifications de la composition de la surface cellulaire en acides gras observées chez *V. vulnificus* (Day et Oliver, 2004), reflètent une capacité à modifier la

fluidité membranaire lors d'un passage en état VNC. Il a été encore observée chez *Helicobacter pylori* (Citterio, et al., 2004) des modifications protéiques de la composition de la surface cellulaire; et une modification du peptidoglycane chez *E.coli* lors de l'état VNC (Signoretto, et al., 2002) a été également mise en évidence.

Afin de voir si les modifications observées pour *Brettanomyces* en état VNC existent également chez la souche *S. cerevisiae* S288C en état VNC, une analyse par microscopie à balayage électronique (MBE) a été réalisée.

Les résultats montrent que la surface des cellules en état VNC (milieu VS 8% avec 4.5mg.L^{-1} de SO_2 moléculaire) est identique aux cellules cultivées en conditions standards (milieu VS) (**Figure. 34**).

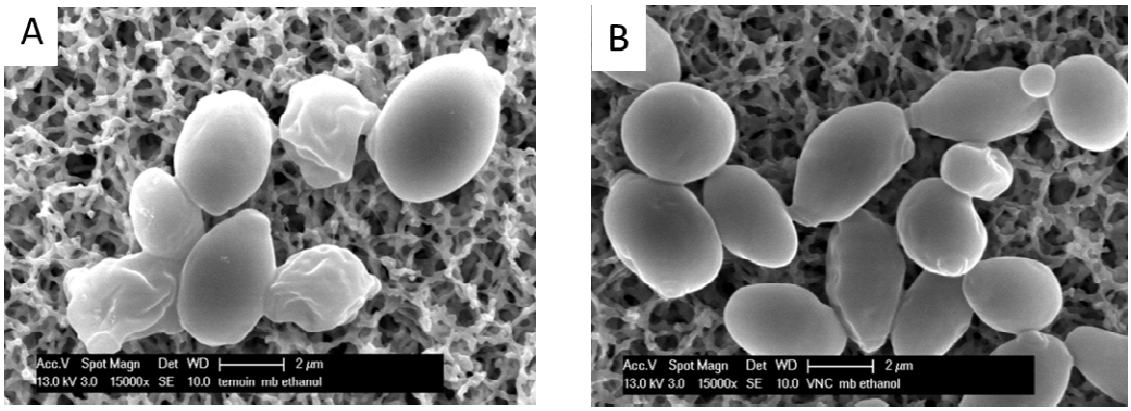


Figure 34. Photographies de cellules de *S. cerevisiae* obtenues par MBE. (A) contrôle (VS8%, pH 3,5), (B) cellules en état VNC obtenues 14 jours après l'ajout du stress SO_2 (VS8%, pH 3,5 avec 4.5 mg.L^{-1} SO_2 moléculaire).

En plus des modifications de la surface des cellules, il a été également décrit que les cellules en état VNC sont pour la plupart de taille inférieure à des cellules cultivables

(Oliver, 2010; Serpaggi et al., 2012). Chez *V. cincinnatiensis* par exemple, les cellules en état normal sont souvent sous forme spirale, alors que les cellules en état VNC évoluent graduellement vers une forme coccoïde (Zhong et al., 2009). Chez *Brettanomyces*, dans les conditions VNC, la taille moyenne des cellules a été déterminée comme diminuée de 22% comparée à leur taille en condition contrôle (Serpaggi et al., 2012). Et finalement chez les levures du vin une diminution de la taille des cellules de 6 µm à 3 µm de diamètre en moyenne a été montrée suite à l'addition de dioxyde de soufre (Divol, 2004).

En se basant sur toutes ces observations, la taille des cellules des différentes suspensions de *S. cerevisiae* (contrôle et en état VNC) dans notre étude a été déterminée et comparée à l'aide du logiciel Image J. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative ($P < 0.05$) (**Figure. 35**).

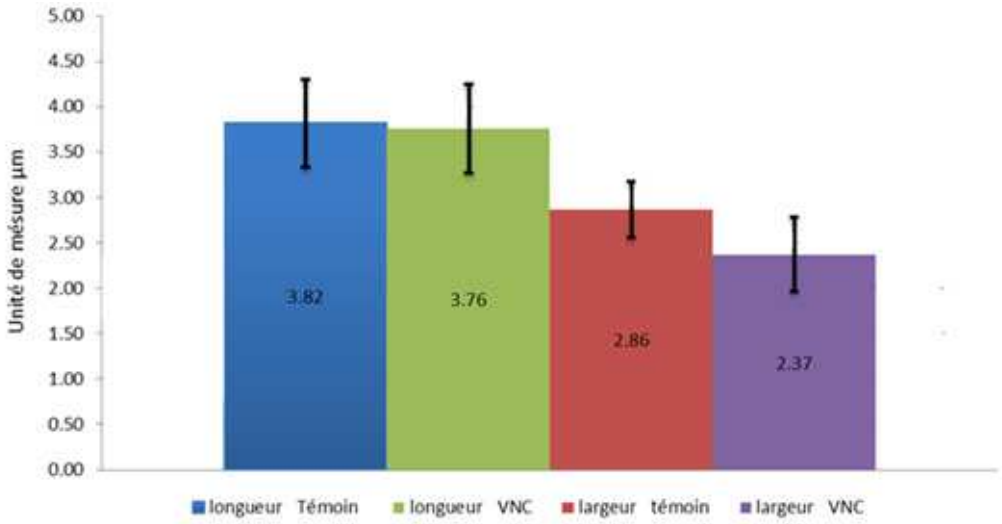


Figure 35 Taille cellulaire (longueur et largeur) mesurée par MBE pour des cellules en condition (VS8%, pH 3,5) et en état VNC (14 jours après l'ajout du SO_2). Les résultats obtenus représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

Ces résultats mettent en évidence que les cellules en état VNC chez *S. cerevisiae* dans nos conditions ne présentent pas de modifications au niveau de la surface ni de diminution de la taille contrairement aux autres microorganismes étudiés.

Ainsi, au cours de cette étude nous avons observé que:

- Après élimination du stress SO_2, une partie des cellules non cultivables sont à nouveau cultivables sur mileiu gélosé
- le temps de sortie de cellules en état VNC est différent du temps de génération de cellules cultivées dans un milieu présentant les mêmes conditions de culture
- la population totale au cours de la reprise de cultivabilité est stable
- le profil du cycle cellulaire de cellules en état VNC est similaire au profil de cellules sortant de l'état VNC

Ces résultats permettent de fournir la preuve que la reprise de cultivabilité observée suite à l'élimination du stress SO_2 est bien le résultat d'une **véritable «ressuscitation»** des cellules de l'état VNC et que cette reprise n'est pas due à une simple croissance de quelques cellules cultivables résiduelles comme le suggèrent de nombreux travaux (Barer et Harwood, 1999; Jacob, 2010; Kell et al., 1998; M. R. Barer, 1993). De plus ces résultats valident l'hypothèse développée par Oliver et al, (1993) qui a décrit que la sortie de l'état VNC correspond à une inversion des processus métaboliques et physiologiques; et que ces cellules VNC ne redeviennent cultivables que lorsque les conditions environnementales sont favorables.

III. Effet du milieu de culture sur la détection de la cultivabilité

Les cellules en état VNC peuvent être définies comme incapables de croître sur des milieux de culture conventionnels tout en possédant une activité métabolique (Yamamoto, 2000). Afin de vérifier cette hypothèse, une suspension cellulaire en état VNC à une concentration finale de 10^2 UCF.mL^{-1} a été inoculée dans un milieu YPD solide, liquide et dans du vin synthétique (pH 3.4 ou 4). Un jour après l'inoculation, une croissance des cellules est observée pour les cellules cultivées en milieu YPD liquide et en VS quel que soit le pH (**Figure.36**).

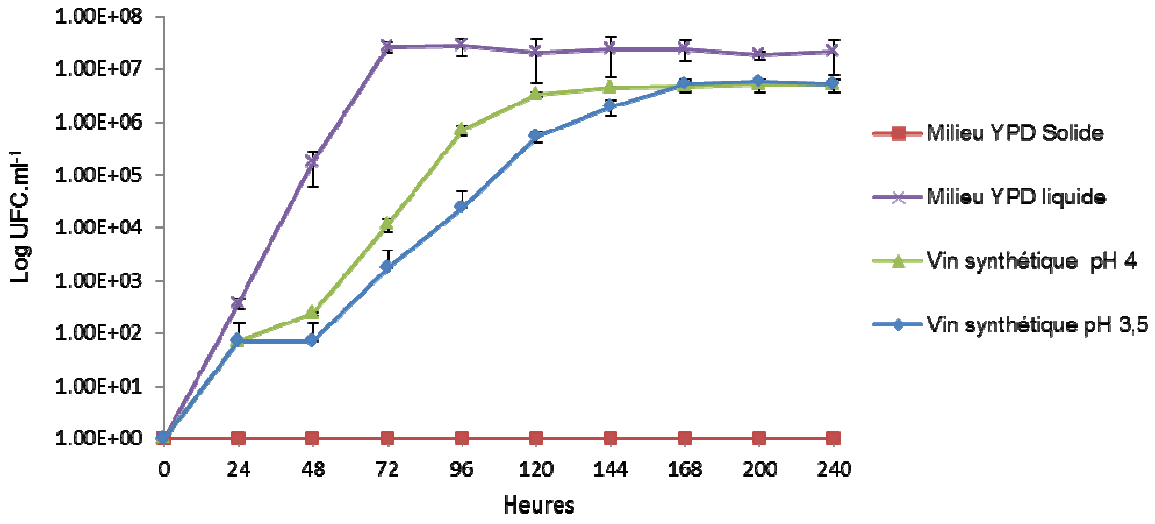


Figure 36. Effet des milieux de culture sur la cultivabilité de cellules en état VNC. (x) YPD liquide, (▲) vin synthétique 8% d'alcool pH 4, (♦) vin synthétique 8% d'alcool pH 3,5, (■) milieu YPD solide. La valeur 0, choisie pour la clarté du graphique, correspond en réalité à un nombre indétectable (inférieur à 1 UFC.mL^{-1}). Les résultats obtenus représentent la moyenne de trois répétitions indépendantes.

En milieu YPD liquide, le maximum de population (5.10^7 UFC.mL^{-1}) est atteint au bout de 72 h. En VS, il faut 120 h pour atteindre 5.10^6 UFC.mL^{-1} (pH 4) et 168 h en VS pH 3.5. Aucune croissance ou cellule n'est observée en milieu YPD solide.

Cette différence de croissance observée entre milieu solide et liquide pourrait être due, d'une part, à la présence de certains facteurs inhibiteurs de la «ressuscitation» en milieu solide (Whitesides et Oliver, 1997); et d'autre part à la différence entre le métabolisme des levures en croissance sur milieux solide et liquide (Cáp et al., 2009).

Cependant les cellules de levure qui poussent dans des milieux liquides présentent un profil de croissance typique. Après la phase de latence (adaptation au milieu de culture), une phase exponentielle de croissance débute, caractérisée par une croissance rapide sous des conditions d'abondance en éléments nutritifs. Ces deux phases sont suivies d'une phase stationnaire lorsque la croissance est significativement réduite ou arrêtée (Váchová et al., 2012).

Par contre sur des milieux solides, la levure comme d'autres micro-organismes, développe des populations multicellulaires organisées (colonies et biofilms), composées de cellules différenciées avec des fonctions spécialisées (Váchová et al., 2012). Meunier et Choder, (1999) ont montré que la croissance d'une colonie de *S. cerevisiae* est biphasique, commençant par une "phase de croissance rapide" (24 divisions env.) similaire à la phase de croissance exponentielle en culture liquide. Cette phase est suivie d'une "phase de croissance ralentie", au cours de laquelle les cellules dans le centre d'une colonie pénètrent progressivement dans la phase stationnaire et la croissance continue principalement sur la périphérie. De plus sur un substrat solide, les colonies de levures en croissance acidifient et alcalinisent alternativement le milieu (Palková et al., 2002). Dans la phase "acide", les colonies se développent, tandis que dans la phase "alcaline" la

croissance est transitoirement inhibée, liée à la production d'ammoniac volatile fonctionnant comme un signal influençant la reprogrammation du métabolisme et la différenciation cellulaire de la colonie (Palková et al., 1997, 2002).

Nos résultats suggèrent que la phase acide décrite par Palkova et al (2002) pourrait constituer un stress supplémentaire délétère à la survie des cellules. De plus, la «ressuscitation» observée en milieu liquide peut être expliquée par le fait que le nouveau milieu (YPD ou VS liquide) permet la diminution (par dilution) voire même l'élimination de l'effet du SO_2 permettant d'induire à son tour la ressuscitation ; ce phénomène a été déjà observé par Divol et Lonvaud-Funel, (2005) ainsi que par d'autres études;**Tableau 13**.

Tableau 13. Conditions d'entrée et de sortie de l'état VNC chez différentes microorganismes.

Microorganisme	Conditions d'entrée en état VNC	Conditions de "ressuscitation"	Référence
Aeromonas salmonicida	carence en nutriments, eau de mer à 15°C	milieu riche	Husevag, 1995
Citrobacter freundii	carence en nutriments, eau de mer stérile, 30°C	milieu nutritif	Dhiaf et al ., 2008
Micrococcus luteus	stockage en phase stationnaire, température ambiante	addition de surnageant de culture active	Kaprelyants et al ., 1994
Salmonella enteritidis	carence en nutriments, eau de rivière stérile, 25°C	addition de nutriments	Roszak et al ., 1984
Pseudomonas fluorescens	carence en nutriments, milieu minimum, 25°C	milieu sans source de carbone	Evdokimova et al ., 1994
Vibrio cincinnatiensis	carence en nutriments, eau de mer stérile, 4°C	augmentation de température et ajout de nutriments	Zhong et al ., 2008
Vibrio vulnificus	carence en nutriments, milieu défini, 5°C	eau de mer artificielle avec augmentation de température	Biosca et al ., 1996

IV. Le rôle du gène *SSU1* dans l'état VNC.

Les mécanismes de résistance au stress sulfite ont été largement étudiés chez la levure de fermentation *S. cerevisiae*. L'efflux actif du SO_2, impliquant la protéine membranaire Ssu1p codée par le gène *SSU1*, est l'un des mécanismes de résistance au stress sulfite les plus efficaces chez *S. cerevisiae* (Dhiaf et al., 2008). Les levures peuvent faire face aussi au SO_2 par d'autres systèmes tels que la production d'acétaldéhyde et la régulation positive des systèmes de réduction des sulfites (Zhong et al., 2009). En général, des mutations réalisées au niveau du gène *SSU1* augmente la sensibilité cellulaire au stress SO_2 alors que la surexpression du gène permet d'avoir une résistance accrue à la toxicité sulfite (Casalone et al., 1992; Park et Hwang, 2008).

Au cours de notre travail, nous avons mis en évidence que suite à un stress sulfite, les cellules de *S. cerevisiae* entrent en état VNC. Dans le but d'étudier le rôle et la relation de *SSU1* avec l'état VNC chez *S. cerevisiae*, le comportement de différentes souches de *S. cerevisiae* BY4742, BY4742*Δssu1* et BY4742Δ*ssu1* pCEL13-*SSU1* face au stress sulfite a été étudié et comparé. L'étude a été réalisée dans du vin synthétique modifié (VSM) à 8% d'éthanol contenant 4,5 $mg.L^{-1}$ de sulfites sous forme moléculaire. La viabilité cellulaire ainsi que la cultivabilité cellulaire ont été déterminées par CMF avec marquage au FDA et par comptage sur boite milieu MS. L'entrée en état VNC a été induite par l'addition de SO_2 (4,5 mg $.L^{-1}$ de SO_2 moléculaire) 3 jours après inoculation (temps 0).

La population totale est toujours stable au cours du temps pour l'ensemble des souches utilisées (**Figure 37**). Par contre, la cultivabilité diminue rapidement à des niveaux indétectables seulement pour BY4742 et BY4742*Δssu1* 30 h après l'addition du SO_2 **(Figure. 37 A et B)**. Pour la souche BY4742*Δssu1* pCEL13-*SSU1*, certaines cellules restent toujours cultivables (5,5 cellules.mL^{-1}), même après 30 h de traitement (**Figure. 37 C**).

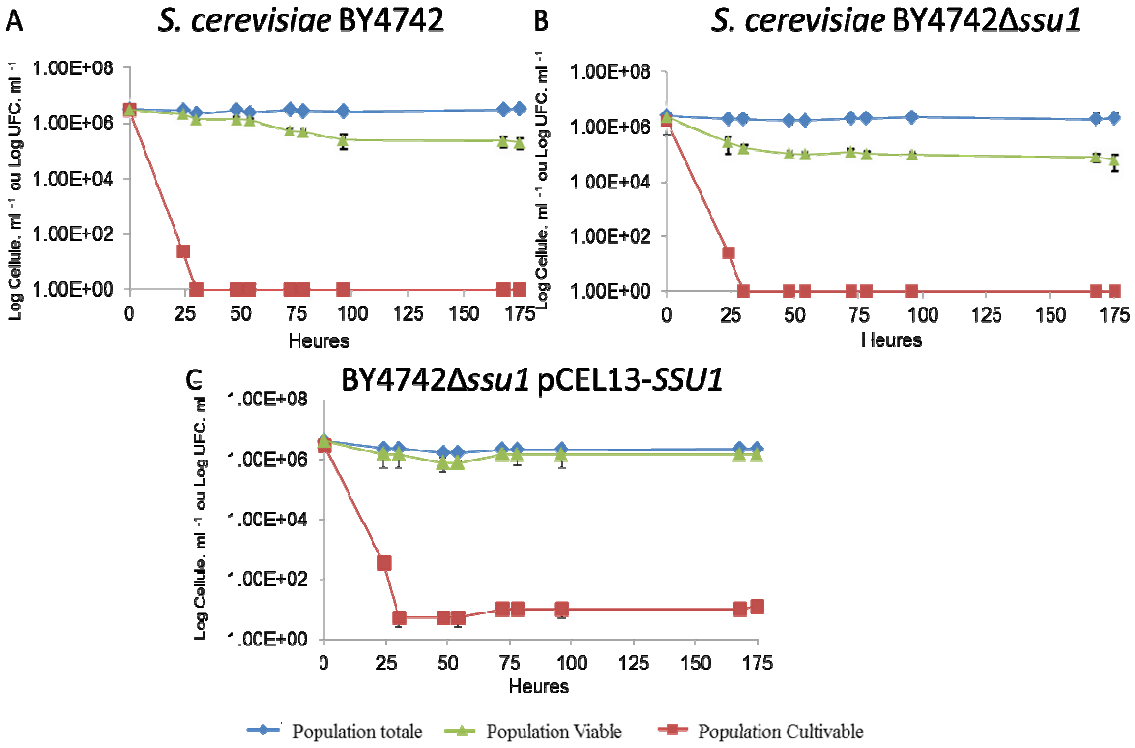


Figure 37. Induction de l'état VNC chez *S. cerevisiae* BY4742 (A) ; *S. cerevisiae* BY4742Δ*ssu1* (B) ; BY4742Δ*ssu1* pCEL13-*SSU1* (C) cultivées en vin synthétique modifié à 8% d'éthanol après addition de 4.5mg.L^{-1} du SO_2. Les valeurs présentées sont la moyenne de trois répétitions indépendantes. La valeur 0, choisie pour la clarté du graphique, correspond en réalité à un nombre indétectable (inférieur à 1 UFC.mL^{-1}).

La viabilité des cellules de BY4742*Δssu1* diminue plus rapidement après l'addition de SO_2 comparée aux deux autres souches: moins de 10% des cellules de

BY4742*Δssu1* restent viables 30 h après le traitement, alors que 60% des cellules des souches BY4742 et BY4742*Δssu1* pCEL13-*SSU1* restent viables 30 h après le traitement.

La diminution de la viabilité plus rapide chez la souche délétée 30h après l'ajout du SO_2, ainsi que la présence d'un faible taux de cellules toujours cultivables pour la souche BY4742*Δssu1* pCEL13-*SSU1* confirment le rôle de *SSU1* comme un mécanisme de résistance au sulfite (Avram et Bakalinsky, 1997; Divol et al., 2012; Park et Bakalinsky, 2000b; Park et Hwang, 2008). Cependant, après 78 h, la viabilité des souches BY4742 et BY4742*Δssu1* n'est plus significativement différente et des pourcentages de viabilité identiques (8%) sont observés (**Figure. 37 A et B, Figure. 38**), tandis que 61% des cellules de la souche BY4742*Δssu1* pCEL13-*SSU1* restaient viables. La surexpression de *SSU1* semble conférer à la souche BY4742*Δssu1* pCEL13-*SSU1* une résistance plus importante aux sulfites comme décrit précédemment (Avram et Bakalinsky, 1997; Park et Bakalinsky, 2000b). De plus si le gène *SSU1* était impliqué dans le phénotype de l'état VNC, toute délétion de ce dernier devrait conduire à diminuer le pourcentage des cellules en état VNC voir même la répression du phénotype VNC. Or dans notre étude, la souche BY4742Δ*ssu1* présente toujours des cellules en état VNC avec des pourcentages égaux à ceux obtenus pour la souche BY4742 (78 h après le stress): ce qui semble montrer que le gène *SSU1* n'est pas impliqué dans les mécanismes d'entrée en état VNC.

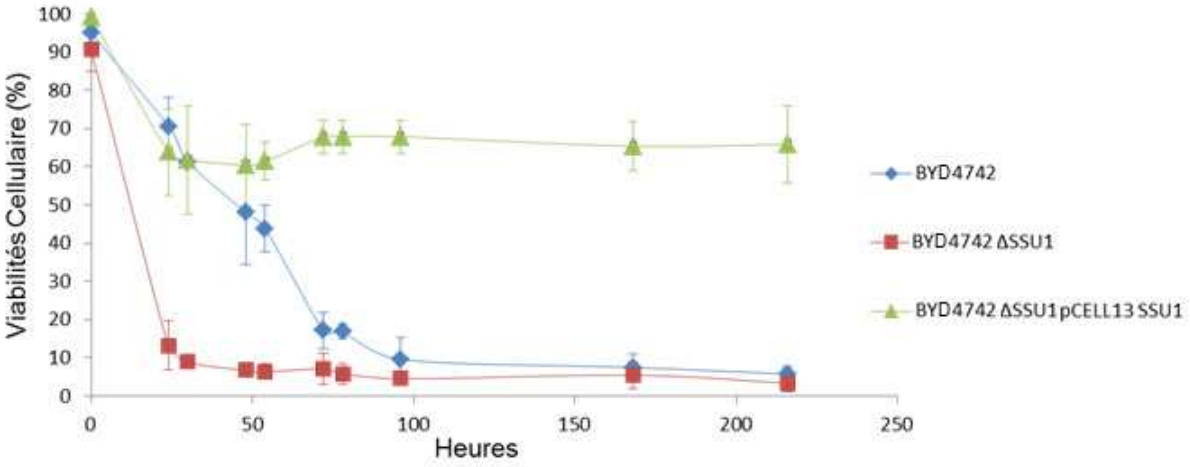


Figure 38. Pourcentage de viabilité de *S. cerevisiae* BY4742 (♦) et *S. cerevisiae* BY4742Δ*ssu1* (■) pendant l'induction de l'état VNC en VSM 8% ethanol pH3.5. Les barres d'erreur indiquent les écarts types des trois expériences indépendantes.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Depuis sa découverte, l'état VNC a fait l'objet de nombreux débats (Barcina et Arana, 2009; Barer, 1997; Bogosian et Bourneuf, 2001; Bogosian et al., 1998; Jacob, 2010; Kell et al., 1998; Nyström, 2003; Villarino et al., 2000) et plus particulièrement le fait que l'état VNC ne peut être validé si et seulement si la capacité des cellules à ressusciter après leur entrée en état VNC est démontrée.

Certains considèrent que les cellules en état VNC sont en fait des cellules mortes et que les techniques utilisées pour détecter les cellules dans cet état mettent en évidence qu'une activité biochimique résiduelle et que le regain de cultivabilité, n'est dû qu'à la présence d'une faible quantité de cellules cultivables présentes dans l'échantillon (Barcina et Arana, 2009; Jacob, 2010; Kell et al., 1998; Villarino et al., 2000). Pour d'autres auteurs, des cellules en état VNC ne peuvent ressusciter (Barer, 1997), et d'autres pensent que le regain de croissance peut être dû à des cellules blessées qui retrouvent leur capacité à se multiplier (Bogosian*, et al.*, 2000). L'élimination du facteur de stress permettrait aux cellules de « se réparer » et de reprendre une croissance. En se basant sur ces hypothèses, l'état VNC n'est pas un état génétiquement programmé dans la cellule.

Une étude réalisée par Trevors, (2011) montre que des cellules de *E. coli* 0157:H7 en état VNC maintiennent l'expression des gènes de Shiga-toxines *stx1* et *stx2* ; ce qui tend à prouver que les cellules en état VNC seraient de véritables cellules vivantes et non pas de simples cellules mortes. Mais il est nécessaire d'avoir certaines informations sur l'état moléculaire et cellulaire de cellules en train de mourir et après la mort, car certains gènes peuvent s'exprimer même pendant une courte période de temps (inconnu) après la mort

cellulaire (Trevors, 2011; Trevors et al., 2012). De plus selon Trevors et al.,(2012) certaines cellules bactériennes, après leur mort (traitement UV, ethanol, toluène) conservent leurs morphologies cellulaires contrairement à des cellules traitées par autoclavage ou par ultrasons qui perdent leurs intégrités membranaires, leurs contenus cellulaires ainsi que leurs gradients électrochimiques. De plus, la plupart des fonctions métaboliques sont arrêtées et la réserve ATP est perdue, ce qui nécessite la prise en compte de plusieurs facteurs à la fois pour définir une cellule morte (activité métabolique, état de la membrane cytoplasmique…) et ne pas se contenter seulement de la capacité de ces cellules à former des colonies sur des milieux appropriés pour leur croissance (Trevors et al., 2012).

De plus selon Barcina et Arana (2009) deux hypothèses ont été proposées pour expliquer l'état VNC:

1- **L'état VNC est une étape dans le cycle cellulaire pour les bactéries non différenciées et que ce n'est pas toujours facile d'induire la «ressuscitation».**

   Cette hypothèse est basée sur le fait que les cellules VNC sont des cellules vivantes (présence d'une synthèse protéique et d'une transcription gènétique (ex. *E. coli* 0157:H7, Trevors, 2011)). Etant donné que la population totale est souvent hétérogène, il est difficile de montrer que la «ressuscitation» est due au regain de cultivabilité des cellules en état VNC et non pas à une croissance de cellules cultivables mélangées à la population VNC (Bogosian et Bourneuf, 2001; Bogosian et al., 1998).

2- **L'état VNC est une stratégie de survie des populations.**

Cette hypothèse suggère que les populations bactériennes sont formées de deux types de cellules: les «altruistes» et les «survivantes». Lorsque les conditions environnementales sont défavorable, des constituants cellulaires et des molécules organiques sont libérés par les «altruistes» dans le milieu, permettant l'apparence d'une sous population VNC. Le matériel organique ainsi libéré peut être utilisé par les autres cellules pour réparer les lésions cellulaires engendrées par le stress. Dans ces conditions, une sous population de cellules cultivables peut se maintenir et ainsi assurer la survie de l'espèce malgré les conditions environnementales défavorable.

De plus Selon Nyström (2001), l'état VNC peut être dû soit à une cause directe, dans laquelle la perte de cultivabilité fait suite à une détérioration cellulaire après exposition à un stress dommageable, soit à une cause indirecte où la non-cultivabilité est un phénomène activement régulé, et dans ce cas l'état VNC représentera une réponse adaptative active permettant aux cellules stressées d'entrer dans un état non cultivable et de promouvoir ainsi leur survie à long terme face à des contraintes potentiellement mortelles.

Il faudra sans doute encore beaucoup d'études pour confirmer une de ces hypothèses, mais le nombre de cellules procaryotes étudiées et connues comme entrant en état VNC étant important, la possibilité de trouver une réponse reste élevée. En revanche, pour d'autres micro-organismes, en particulier les eucaryotes, cet état a reçu beaucoup moins d'attention. L'objectif de ces travaux était donc de valider et de prouver l'existence du phénotype VNC chez les eucaryotes et plus particulièrement chez la levure *S. cerevisiae*.

L'étude de la littérature a indiqué que le sulfite pourrait être l'un des principaux facteurs induisant l'entrée de *S. cerevisiae* dans un état comparable à l'état VNC (Divol et Lonvaud-Funel, 2005).

La première partie de notre travail a porté sur l'induction de l'état VNC par l'ajout de sulfite, et la capacité des cellules entrées dans cet état à ressusciter. Ainsi l'impact du sulfitage, à différentes doses et sur plusieurs souches de *S. cerevisiae* mises en culture dans du vin synthétique à différentes concentrations en éthanol (0%, 8% et 10% d'éthanol) a été entrepris. Les résultats montrent que l'addition de sulfite à une culture viable et cultivable de *S. cerevisiae* provoque l'entrée en état VNC avec une diminution de leur activité métabolique cellulaire.

Après élimination du SO_2 actif (moléculaire), par augmentation du pH d'un milieu VS8%, la capacité des cellules non cultivables à récupérer leur cultivabilité a été démontrée même après un stress sulfite supérieur à 30 jours.

Par contre l'addition de glucose est indispensable pour l'induction de la sortie de l'état VNC en VS0%.

Grâce à la CMF, la mesure de l'intensité de fluorescence verte, (FDA), au niveau des cellules en état VNC (après au moins 24 h) met en évidence une véritable activité estérase. Avec l'utilisation d'un autre marqueur le FUN-1, l'activité métabolique de cellules en état VNC a été validée.

Dans une deuxième partie, ce travail consiste à vérifier que la reprise de cultivabilité, observée après élimination du stress SO_2, est le résultat d'une véritable «ressuscitation»

et non une simple multiplication cellulaire . Le temps de génération, de cellules cultivées dans les mêmes conditions que celles rencontrées au moment de la sortie de l'état VNC a été déterminé et comparé, au temps de sortie calculé au cours de la reprise de la cultivabilité. La comparaison a permis de mettre en évidence une différence entre ces deux paramètres et d'affirmer que le temps mis par les cellules pour sortir de l'état VNC n'était pas caractéristique d'une multiplication cellulaire. Les profils du cycle cellulaire de cellules en état VNC et sortant de l'état VNC ont été réalisée par CMF et comparés. Dans les deux conditions le profil du cycle cellulaire est similaire ce qui nous a permis d'affirmer que la reprise de cultivabilité observée est le fait d'une véritable «ressuscitation».

L'ensemble de ces résultats valident l'hypothèse que l'état VNC implique que les cellules sont capables de retrouver leur capacité à se multiplier et que le regain de cultivabilité n'est pas lié à la présence d'une faible quantité de cellules cultivables présentes dans l'échantillon.

Nous avons également mis en évidence au cours de cette étude que le milieu de culture lui-même est un facteur lié à la détectabilité des cellules en état VNC. De plus, nous avons en effet observé une «ressuscitation» de cellules de *S. cerevisiae* en état VNC, uniquement pour les cellules inoculées en milieu liquide YPD ou VS. En revanche les cellules sur milieu YPD gélosé restent en état VNC. Ceci pourrait être dû, d'une part, à la présence de certains facteurs inhibiteurs de la «ressuscitation» principalement en

milieu solide soit à la différence entre le métabolisme des levures en croissance sur milieux solides et liquides.

Dans une troisième partie, nous avons souhaité étudier l'implication du gène *SSU1,* codant pour une pompe à SO_2, dans l'état VNC. Ainsi le gène *SSU1* jouerait un rôle dans le maintien de la viabilité cellulaire après l'addition du SO_2 au début de l'état VNC. Par contre, il ne semble pas être impliqué dans le maintien de l'état VNC chez *S. cerevisiae.* D'autres facteurs pourraient être en cause tels que l'action d'une réductase sulfite.

A l'issue de ce travail, nous pouvons conclure que la levure *S. cerevisiae* est capable d'entrer en état VNC. Mais il reste encore beaucoup à apprendre sur la physiologie, la biochimie et la génétique des cellules dans cet état physiologique afin de valider l'existence d'un phénotype VNC au niveau de la levure *S. cerevisiae*.

Ce travail de thèse n'a pas permis de montrer si l'état VNC correspond à un réel phénotype, avec un mécanisme moléculaire spécifique qui se traduit pas un arrêt de croissance programmé. Les cellules en état VNC peuvent simplement correspondre à des cellules blessées ou affaiblies par l'exposition à des conditions stressantes, et se seraient ce stress prolongé qui bloque la division cellulaire.

Pour répondre à cette question, une meilleure compréhension de l'impact du SO_2 sur les cellules est nécessaire (en particulier sur les enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique (l'alcool déshydrogénase, l'aldéhyde déshydrogénase, la pyruvate décarboxylase et autres)), pour déterminer dans quelle mesure la cinétique enzymatique est affectée par la présence du SO_2 est reliée à l'état VNC.

De plus afin de mieux caractériser l'état VNC et valider l'existence de ce phénotype chez *S. cerevisiae,* une étude transcriptomique permettrait d'approfondir les connaissances et mettre en évidence des gènes spécifiques impliqués dans l'état VNC. Une étude protéomique (Serpaggi et al., 2012) avait montré la surproduction des protéines antioxydantes et l'accumulation de diverses enzymes impliquées directement ou indirectement dans la voie de la glycolyse lorsque les cellules sont en état VNC.

Suite à cette étude et l'identification de gènes impliquées, la mutation des gènes surexprimés au cours de l'état VNC pourrait indiquer s'ils sont nécessaires à la formation et au maintien de l'état VNC. Par contre, étant donné le pourcentage faible des cellules en état VNC (% cellules mortes > 60%), un tri cellulaire est indispensable afin d'éliminer l'influence des cellules mortes avant l'étude transcriptomique. Des tests préliminaires de tri cellulaire ont déjà été réalisés au cours de ce travail, mais plusieurs problèmes ont été rencontrés suite à l'instabilité du marquage FDA. Il semble que l'utilisation d'un autre marqueur, tel que le FUN-1, serait appropriée.

Une alternative au tri cellulaire consisterait à extraire les ARN totaux (cellules vivantes et mortes en ayant au préalable étudié dans nos conditions la stabilité des ARN dans les cellules mortes. Il est bien connu que la demi-vie des ARNm est de l'ordre de quelques minutes (environ 1 à 30 min) à plusieurs heures chez la plupart des microorganismes et spécifiquement chez *S. cerevisiae* (Trevors et al., 2012; Wang et al., 2002). Ceci n'empêche pas la mesure de la stabilité des ARNm au niveau des cellules mortes ; une fois cette mesure validée, une analyse transcriptomique ultérieure des cellules en état

VNC peut être réalisée malgré la présence des cellules mortes (% cellules mortes > 60%).

Il serait nécessaire encore d'induire l'état VNC au niveau de *S. cerevisiae* en utilisant les différents facteurs décrits comme pouvant induire l'état VNC chez les bactéries: les conditions oligotrophes (Lothigius et al., 2010; Rezaeinejad et Ivanov, 2011; S. Bukh, 2012), la température (Oliver et al., 1995; Trevors et al., 2012; Xu et al., 1982), la salinité (Pinto et al., 2011; Roth et al., 1988), la teneur en oxygène (Gauthier, 2000), la nutrition (Oliver et Wanucha, 1989), la lumière UV (Chen et al., 2012), les polluants organiques et les métaux lourds (Divol et al., 2012; Zhang et al., 2012), et l'aération (Rollins et Colwell, 1986).

Il serait encore essentiel d'examiner les changements communs dans l'expression des gènes au cours de l'induction de l'état VNC, par les facteurs cités ci-dessus, afin de déterminer ce qui se passe exactement pendant cet état. Une meilleure connaissance du potentiel génétique et des réponses transcriptomiques, protéomiques et métaboliques de la levure au cours de l'état VNC est nécessaire pour bien comprendre cet état.

De plus, le développement de nouvelles protéines fluorescentes telles que le « short-lived » (Andersen et al. 1998), « timer » (Terskikh et al. 2000), « photoactivatable » (Patterson et Lippincott-Schwartz, 2002), permettrait de réaliser une étude par analyse monocellulaire à long terme (avant et après l'induction de l'état VNC) qui serait nécessaire pour mieux comprendre le phénomène VNC. Un exemple de cette analyse monocellulaire est la microscopie de fluorescence en temps réel qui fournirait une compréhension plus profonde des processus intracellulaires, les modes d'expression de

différents gènes impliqués dans l'état VNC, la localisation des protéines, et les interactions moléculaires.

Dans le cas du phénomène VNC, il est intéressant d'utiliser des fusions transcriptionnelles et traductionnelles par des protéines fluorescentes au niveau des gènes qui contrôlent les processus impliqués dans la croissance cellulaire, le métabolisme, la production des ribosomes, la réplication des chromosomes, etc, pour élucider la physiologie des cellules VNC à un niveau unicellulaire. Cette approche est particulièrement puissante lorsqu'elle est combinée à des systèmes de culture microfluidiques et à la microscopie de fluorescence en temps réel (Golding et al 2005;. Lionnet et Singer 2012).

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

A

Aeschbacher, M., Reinhardt, C.A., and Zbinden, G. (1986). A rapid cell membrane permeability test using fluorescent dyes and flow cytometry. Cell Biol. Toxicol. *2*, 247–255.

Agnolucci, M., Rea, F., Sbrana, C., Cristani, C., Fracassetti, D., Tirelli, A., and Nuti, M. (2010). Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. Int. J. Food Microbiol. *143*, 76–80.

Agudo, L. del C. (1992). Lipid content of *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance. Appl. Microbiol. Biotechnol. *37*, 647–651.

Aguilera, F., Peinado, R.A., Millán, C., Ortega, J.M., and Mauricio, J.C. (2006). Relationship between ethanol tolerance, H+-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. Int. J. Food Microbiol. *110*, 34–42.

Alam, M., Hasan, N.A., Sadique, A., Bhuiyan, N.A., Ahmed, K.U., Nusrin, S., Nair, G.B., Siddique, A.K., Sack, R.B., Sack, D.A., et al. (2006). Seasonal Cholera Caused by *Vibrio cholerae* Serogroups O1 and O139 in the Coastal Aquatic Environment of Bangladesh. Appl. Environ. Microbiol. *72*, 4096–4104.

Alarcón-Gutiérrez, E., Floch, C., Ruaudel, F., and Criquet, S. (2008). Non-enzymatic hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA) in a Mediterranean oak (Quercus ilex L.) litter. Eur. J. Soil Sci. *59*, 139–146.

Alexandre, H., Ansanay-Galeote, V., Dequin, S., and Blondin, B. (2001). Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. *498*, 98–103.

Alleron, L. (2008). Etude de l'état viable non cultivable (VBNC) chez *Legionella pneumophila* Lens après traitements monochloramine et thermique. Université de Poitiers. Poitiers

Anacleto, J., and van Uden, N. (1982). Kinetics and activation energetics of death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by sulfur dioxide. Biotechnol. Bioeng. *24*, 2477–2486.

Aranda, A., Jiménez-Martí, E., Orozco, H., Matallana, E., and Del Olmo, M. (2006). Sulfur and adenine metabolisms are linked, and both modulate sulfite resistance in wine yeast. J. Agric. Food Chem. *54*, 5839–5846.

Attfield, P.V. (1997). Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. Nat. Biotechnol. *15*, 1351–1357.

Auger, J., Leonce, S., Jouannet, P., and Ronot, X. (1993). Flow cytometric sorting of living, highly motile human spermatozoa based on evaluation of their mitochondrial activity. J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. *41*, 1247–1251.

Ausubel, F.M. (1999). Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology (New York: Wiley).

Avram, D., and Bakalinsky, A.T. (1997). SSU1 encodes a plasma membrane protein with a central role in a network of proteins conferring sulfite tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. *179*, 5971–5974.

Avram, D., Leid, M., and Bakalinsky, A.T. (1999). Fzf1p of *Saccharomyces cerevisiae* is a positive regulator of SSU1 transcription and its first zinc finger region is required for DNA binding. Yeast Chichester Engl. *15*, 473–480.

Andersen JB, Sternberg C, Poulsen LK, Petersen Bjorn S, Givskov M, Molin S (1998) New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. Appl Environ Microbiol 64:2240–2246

B

Biosca, E G, C Amaro, E Marco-Noales, and J D Oliver (1996). "Effect of Low Temperature on Starvation survival of the Eel Pathogen *Vibrio Vulnificus* Biotype 2." Applied and Environmental Microbiology 62, no. 2: 450–455.

Baffone, W., Citterio, B., Vittoria, E., Casaroli, A., Campana, R., Falzano, L., and Donelli, G. (2003). Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic Vibrio spp. Int. J. Food Microbiol. *89*, 31–39.

Bai, F.W., Chen, L.J., Zhang, Z., Anderson, W.A., and Moo-Young, M. (2004). Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. J. Biotechnol. *110*, 287–293.

Barata, A., Caldeira, J., Botelheiro, R., Pagliara, D., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2008). Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. Int. J. Food Microbiol. *121*, 201–207.

Barcina, I., and Arana, I. (2009). The viable but nonculturable phenotype: a crossroads in the life-cycle of non-differentiating bacteria? Rev. Environ. Sci. Biotechnol. *8*, 245–255.

Barer, M.R. (1997). Viable but non-culturable and dormant bacteria: time to resolve an oxymoron and a misnomer? J. Med. Microbiol. *46*, 629–631.

Barer, M.R., and Harwood, C.R. (1999). Bacterial viability and culturability. Adv. Microb. Physiol. *41*, 93–137.

Beaven, M.J., Charpentier, C., and Rose, A.H. (1982). Production and Tolerance of Ethanol in Relation to Phospholipid Fatty-acyl Composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. J. Gen. Microbiol. *128*, 1447–1455.

Beck, P., and Huber, R. (1997). Detection of cell viability in cultures of hyperthermophiles. FEMS Microbiol. Lett. *148*, 11–14.

Beech, w, and Thomas, s (1985). Action antimicrobienne de l' anhydride sulfureux. In Bulletin de l'OIV.

Bely, M., Sablayrolles, J.-M., and Barre, P. (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. J. Ferment. Bioeng. *70*, 246–252.

Berglund, D.L., Taffs, R.E., and Robertson, N.P. (1987). A rapid analytical technique for flow cytometric analysis of cell viability using calcofluor white M2R. Cytometry *8*, 421–426.

Birch, and Walker (2000). Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme Microb. Technol. *26*, 678–687.

Bleve, G., Rizzotti, L., Dellaglio, F., and Torriani, S. (2003). Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. Appl. Environ. Microbiol. *69*, 4116–4122.

Blom, J., Mattos, M.J.T.D., and Grivell, L.A. (2000). Redirection of the Respiro-Fermentative Flux Distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by Overexpression of the Transcription Factor Hap4p. Appl. Environ. Microbiol. *66*, 1970–1973.

Bogosian, G., and Bourneuf, E.V. (2001). A matter of bacterial life and death. EMBO Rep. *2*, 770–774.

Bogosian, G., Sammons, L.E., Morris, P.J., O'Neil, J.P., Heitkamp, M.A., and Weber, D.B. (1996). Death of the *Escherichia coli* K-12 strain W3110 in soil and water. Appl. Environ. Microbiol. *62*, 4114–4120.

Bogosian, G., Morris, P.J.L., and O'Neil, J.P. (1998). A Mixed Culture Recovery Method Indicates that *Enteric Bacteria* Do Not Enter the Viable but Nonculturable State. Appl. Environ. Microbiol. *64*, 1736–1742.

Booth, F.W., Chakravarthy, M.V., and Spangenburg, E.E. (2002). Exercise and gene expression: physiological regulation of the human genome through physical activity. J. Physiol. *543*, 399–411.

Boze, H., Moulin, G., and Galzy, P. (2008). Production of Microbial Biomass. In Biotechnology, H.-J. Rehm, and G. Reed, eds. (Wiley-VCH Verlag GmbH), pp. 166–220.

Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. Yeast Chichester Engl. *14*, 115–132.

Brauns, L.A., Hudson, M.C., and Oliver, J.D. (1991). Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. Appl. Environ. Microbiol. *57*, 2651–2655.

Breeuwer, P., and Abee, T. (2000). Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. Int. J. Food Microbiol. *55*, 193–200.

Britz, T. j., and Tracey, R. p. (1990). The combination effect of pH, SO_2, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. J. Appl. Microbiol. *68*, 23–31.

Brown, S., Poujol-Talbot, C., Kronenberger, J., Traas, J., and Satiat-Jeunemaitre, B. (2004). L'apport de la microscopie et de l'imagerie en génomique. In La génomique en Biologie Végétale, M.-G.J.F.B. J.F, ed. (INRA), p. 236.

Bunthof, C.J. (2002). Flow cytometry, fluorescent probes, and flashing bacteria. Wagening. University.

Butzke, C.E. (1998). Survey of Yeast Assimilable Nitrogen Status in Musts from California, Oregon, and Washington. Am. J. Enol. Vitic. *49*, 220–224.

C

Camarasa, C., Grivet, J. P. & Dequin, S. (2003). Investigation by 13C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. Microbiology 149, 2669–2678.

Cáp, M., Váchová, L., and Palková, Z. (2009). Yeast colony survival depends on metabolic adaptation and cell differentiation rather than on stress defense. J. Biol. Chem. *284*, 32572–32581.

Cappelier, J.M., Besnard, V., Roche, S., Garrec, N., Zundel, E., Velge, P., and Federighi, M. (2005). Avirulence of viable but non-culturable *Listeria monocytogenes* cells demonstrated by in vitro and in vivo models. Vet. Res. *36*, 589–599.

Cappelier, J.M., Besnard, V., Roche, S.M., Velge, P., and Federighi, M. (2007). Avirulent viable but non culturable cells of *Listeria monocytogenes* need the presence of an embryo to be recovered in egg yolk and regain virulence after recovery. Vet. Res. *38*, 573–583.

Cappelier, J.M., Minet, J., Magras, C., Colwell, R.R., and Federighi, M. (1999). Recovery in Embryonated Eggs of Viable but Nonculturable Campylobacter jejuni Cells and Maintenance of Ability To Adhere to HeLa Cells after Ressuscitation. Appl. Environ. Microbiol. *65*, 5154–5157.

Carmack, M., Moore, M.B., and Balis, M.E. (1950). The Structure of the Antihemorrhagic Sodium Bisulfite Addition Product of 2-Methyl-1,4-naphthoquinone (Menadione)1. J. Am. Chem. Soc. *72*, 844–847.

Caron, G.N.-V., and Badley, R.A. (1995). Viability assessment of bacteria in mixed populations using flow cytometry*. J. Microsc. *179*, 55–66.

Casalone, E., Colella, C.M., Daly, S., Gallori, E., Moriani, L., and Polsinelli, M. (1992). Mechanism of resistance to sulphite in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. *22*, 435–440.

Casalone, E., Colella, C.M., Ricci, F., and Polsinelli, M. (1989). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to sulphite. Yeast Chichester Engl. *5 Spec No*, S287–291.

Cavazza, A., Poznanski, E., and Trioli, G. (2004). Restart of Fermentation of Simulated Stuck Wines by Direct Inoculation of Active Dry Yeasts. Am. J. Enol. Vitic. *55*, 160–167.

Chand, S., Lusunzi, I., Veal, D.A., Williams, L.R., and Karuso, P. (1994). Rapid screening of the antimicrobial activity of extracts and natural products. J. Antibiot. (Tokyo) *47*, 1295–1304.

Chandler, M., Stanley, G.A., Rogers, P., and Chambers, P. (2004). A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Ann. Microbiol. *54*, 427–454.

Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., and Bahler, J. (2003). Global Transcriptional Responses of Fission Yeast to Environmental Stress. Mol. Biol. Cell 14, 214–229.

Chen, H., Fu, L., Luo, L., Lu, J., White, W.L., and Hu, Z. (2012). Induction and Ressuscitation of the Viable but Nonculturable State in a *Cyanobacteria*-Lysing Bacterium Isolated from Cyanobacterial Bloom. Microb. Ecol. *63*, 64–73.

Citterio, B., A. Casaroli, L. Pierfelici, M. Battistelli, E. Falcieri, and W. Baffone. (2004). Morphological changes and outer membrane protein patterns in *Helicobacter pylori* during conversion from bacillary to coccoid form. New Microbiol. 27:353-360.

Clarke, J.M., Gillings, M.R., Altavilla, N., and Beattie, A.J. (2001). Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity. J. Microbiol. Methods *46*, 261–267.

Clarke, R.G., and Pinder, A.C. (1998). Improved detection of bacteria by flow cytometry using a combination of antibody and viability markers. J. Appl. Microbiol. *84*, 577–584.

Cocolin, L., and Mills, D.A. (2003). Wine Yeast Inhibition by Sulfur Dioxide: A Comparison of Culture-Dependent and Independent Methods. Am. J. Enol. Vitic. *54*, 125–130.

Cohen-Gonsaud, M., Barthe, P., Bagnéris, C., Henderson, B., Ward, J., Roumestand, C., and Keep, N.H. (2005). The structure of a ressuscitation-promoting factor domain from *Mycobacterium tuberculosis* shows homology to lysozymes. Nat. Struct. Mol. Biol. *12*, 270–273.

Colwell, R.R. (2000). Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. J. Infect. Chemother. Off. J. Jpn. Soc. Chemother. *6*, 121–125.

Colwell, R.R. (2009). Viable but Not Cultivable Bacteria. In Uncultivated Microorganisms, S.S. Epstein, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 121–129.

Conway, M.K., Grunwald, D., and Heideman, W. (2012). Glucose, Nitrogen, and Phosphate Repletion in *Saccharomyces cerevisiae*: Common Transcriptional Responses to Different Nutrient Signals. G3 GenesGenomesGenetics *2*, 1003–1017.

Costa, V., Reis, E., Quintanilha, A., and Moradas-Ferreira, P. (1993). Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the key role of the mitochondrial superoxide dismutase. Arch. Biochem. Biophys. 300, 608–614.

Cot, M. (2006). Etudes physiologiques de l'adaptation et de la résistance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la production intensive d'éthanol. Université Paul Sabatier, Toulouse

Coutard, F., Crassous, P., Droguet, M., Gobin, E., Colwell, R.R., Pommepuy, M., and Hervio-Heath, D. (2007). Recovery in culture of viable but nonculturable Vibrio parahaemolyticus: regrowth or ressuscitation? ISME J. *1*, 111–120.

Crabtree, H.G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. Biochem. J. *23*, 536–545.

Currás, M., Magariños, B., Toranzo, A.E., and Romalde, J.L. (2002). Dormancy as a survival strategy of the fish pathogen *Streptococcus parauberis* in the marine environment. Dis. Aquat. Organ. *52*, 129–136.

D

Davey, H.M. (2011). Life, Death, and In-Between: Meanings and Methods in Microbiology. Appl. Environ. Microbiol. 77, 5571–5576.

Davey, H.M., and Kell, D.B. (1996). Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. Microbiol. Rev. *60*, 641–696.

Davey, H.M., Kell, D.B., Weichart, D.H., and Kaprelyants, A.S. (2004). Estimation of microbial viability using flow cytometry. Curr. Protoc. Cytom. Editor. Board J Paul Robinson Manag. Ed. Al *Chapter 11*, Unit 11.3.

Day AP & Oliver JD (2004) Changes in membrane fatty acid composition during entry of *Vibrio vulnificus* into the viable but nonculturable state. J. Microbiol 42: 69-73.

Deere, D., Porter, J., Edwards, C., and Pickup, R. (1995). Evaluation of the suitability of bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol, (diBA-C4(3)-), for the flow cytometric assessment of bacterial viability. FEMS Microbiol. Lett. *130*, 165–169.

Deere, D., Shen, J., Vesey, G., Bell, P., Bissinger, P., and Veal, D. (1998). Flow cytometry and cell sorting for yeast viability assessment and cell selection. Yeast Chichester Engl. *14*, 147–160.

Deken, R.H.D. (1966). The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. J. Gen. Microbiol. *44*, 149–156.

Del Mar Lleo, M., Pierobon, S., Tafi, M.C., Signoretto, C., and Canepari, P. (2000). mRNA Detection by Reverse Transcription-PCR for Monitoring Viability over Time in an *Enterococcus faecalis* Viable but Nonculturable Population Maintained in a Laboratory Microcosm. Appl. Environ. Microbiol. *66*, 4564–4567.

DeRisi, J.L., Iyer, V.R., Brown, P.O., 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. Science 278, 680–686.

Dhiaf A, Bakhrouf A & Witzel KP (2008) Resuscitation of eleven-year VBNC *Citrobacter*. J. Water Health. 6: 565-568.

Dhiaf, A., Bakhrouf, A., and Witzel, K.-P. (2008). Ressuscitation of eleven-year VBNC Citrobacter. J. Water Health *6*, 565–568.

Diaper, J. p., and Edwards, C. (1994). The use of fluorogenic esters to detect viable bacteria by flow cytometry. J. Appl. Microbiol. *77*, 221–228.

Dinh, T.N., Nagahisa, K., Hirasawa, T., Furusawa, C., and Shimizu, H. (2008). Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* Cells to High Ethanol Concentration and Changes in Fatty Acid Composition of Membrane and Cell Size. PLoS ONE *3*.

Divol, B. (2004). La microbiologie des vins issus de raisins botrytisés au cours de l'élevage. Caractérisation des souches de *Saccharomyces cerevisiae* responsables de refermentation. Institut national polytechnique de toulouse,Toulouse

Divol, B., and Lonvaud-Funel, A. (2005). Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. J. Appl. Microbiol. *99*, 85–93.

Divol, B., du Toit, M., and Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol. *95*, 601–613.

Divol, B., Miot-Sertier, C., and Lonvaud-Funel, A. (2006). Genetic characterization of strains of *Saccharomycescerevisiae* responsible for "refermentation" in Botrytis-affected wines. J. Appl. Microbiol. *100*, 516–526.

Dombek, K.M., and Ingram, L.O. (1986). Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. Appl. Environ. Microbiol. *52*, 975–981.

Dubey, D.D., and Raman, R. (1983). Effects of Hoechst 33258 on different cell cycle events. I. Inhibition of synthetic activities in bone-marrow cells of the mole rat Bandicota bengalensis. Exp. Cell Res. *149*, 419–432.

Duckitt, E. (2012). Investigating the impact of sulphur dioxide on *Brettanomyces bruxellensis* at a molecular and cellular level.. Université de Stellenbosch, Stellenbosch.

Dukes, B.C., and Butzke, C.E. (1998). Rapid Determination of Primary Amino Acids in Grape Juice Using an o-Phthaldialdehyde/N-Acetyl-L-Cysteine Spectrophotometric Assay. Am. J. Enol. Vitic. *49*, 125–134.

F

Feng, C., Tollin, G., and Enemark, J.H. (2007). Sulfite oxidizing enzymes. Biochim. Biophys. Acta *1774*, 527–539.

Ferreira, B.S., Calado, C.R.C., van Keulen, F., Fonseca, L.P., Cabral, J.M.S., and da Fonseca, M.M.R. (2004). Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain triggers acetate production to fuel biosynthetic pathways. J. Biotechnol. *109*, 159–167.

Fiechter, A., and Seghezzi, W. (1992). Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. J. Biotechnol. *27*, 27–45.

Flikweert, M.T., Kuyper, M., van Maris, A.J., Kötter, P., van Dijken, J.P., and Pronk, J.T. (1999). Steady-state and transient-state analysis of growth and metabolite production in a *Saccharomyces cerevisiae* strain with reduced pyruvate-decarboxylase activity. Biotechnol. Bioeng. *66*, 42–50.

François, J., Villanueva, M.E., and Hers, H.G. (1988). The control of glycogen metabolism in yeast. 1. Interconversion in vivo of glycogen synthase and glycogen phosphorylase induced by glucose, a nitrogen source or uncouplers. Eur. J. Biochem. FEBS *174*, 551–559.

Fratamico, P.M., Bhunia, A.K., and Smith, J.L. (2005). Foodborne Pathogens: Microbiology And Molecular Biology (Horizon Scientific Press).

Freese, E., Sheu, C.W., and Galliers, E. (1973). Function of Lipophilic Acids as Antimicrobial Food Additives. Nature *241*, 321–325.

Fritsche, W. (1972). The Yeasts, Vol. 2. Physiology and Biochemistry of Yeasts. Z. Für Allg. Mikrobiol. *12*, 349–349.

Fugelsang, K.C., and Edwards, C.G. (2007). Wine microbiology (New York, NY: Springer).

Furukawa, Y., Kimura, S., (1971). Effect of pantothenic acid deficiency on lipid metabolism in the yeast. J Vitaminol 17, 219-224.

G

Galdieri, Luciano, Swati Mehrotra, Sean Yu, and Ales Vancura (2010). “Transcriptional Regulation in Yeast During Diauxic Shift and Stationary Phase.” OMICS: a Journal of Integrative Biology 14, no. 6: 629–638.

Gant, V.A., Warnes, G., Phillips, I., and Savidge, G.F. (1993). The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics. J. Med. Microbiol. 39, 147–154.

Garreau, H., Hasan, R.N., Renault, G., Estruch, F., Boy-Marcotte, E., Jacquet, M., 2000. Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in Saccharomyces cerevisiae. Microbiol. Read. Engl. 146 (Pt 9), 2113–2120.

Gasch, A.P. (2003). The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses. In Yeast Stress Responses, P.D.S. Hohmann, and D.W.H. Mager, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 11–70.

Gauthier, M.J. (2000). Environmental Parameters Associated with the Viable but Nonculturable State. In Nonculturable Microorganisms in the Environment, R.R. Colwell, and D.J. Grimes, eds. (Springer US), pp. 87–112.

Gibson, B.R., Lawrence, S.J., Leclaire, J.P.R., Powell, C.D., and Smart, K.A. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. FEMS Microbiol. Rev. 31, 535–569.

Golding I, Paulsson J, Zawilski SM, Cox EC (2005) Real-time kinetics of gene activity in individual bacteria. Cell 123:1025–1036

Graumlich, T.R., and Stevenson, K.E. (1979). Respiration and viability of thermally injured Saccharomyces cerevisiae. Appl. Environ. Microbiol. 38, 461–465.

Grey, B.E., and Steck, T.R. (2001). The Viable But Nonculturable State of Ralstonia solanacearum May Be Involved in Long-Term Survival and Plant Infection. Appl. Environ. Microbiol. 67, 3866–3872.

Guidi, F., Francesca, G., Magherini, F., Francesca, M., Gamberi, T., Tania, G., Borro, M., Marina, B., Simmaco, M., Maurizio, S., Modesti, A., Alessandra, M., 2010. Effect of different glucose concentrations on proteome of Saccharomyces cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta 1804, 1516–1525.

Guillou, S., Besnard, V., El Murr, N., and Federighi, M. (2003). Viability of Saccharomyces cerevisiae cells exposed to low-amperage electrolysis as assessed by staining procedure and ATP content. Int. J. Food Microbiol. 88, 85–89.

Guillou, S., Leguerinel, I., Garrec, N., Renard, M.A., Cappelier, J.M., and Federighi, M. (2008). Survival of Campylobacter jejuni in mineral bottled water according to difference in mineral content: application of the Weibull model. Water Res. 42, 2213–2219.

Gundllapalli, S.B., Otero, R.R.C., and Pretorius, I.S. (2006). Development of a screening method for the indentification of a novel Saccharomyces cerevisiae mutant over-expressing Trichoderma reesei cellobiohydrolase II. Ann. Microbiol. 56, 143–150.

Gunnison, A.F. (1981). Sulphite toxicity: a critical review of in vitro and in vivo data. Food Cosmet. Toxicol. 19, 667–682.

Gupta, R.K., and Srivastava, R. (2012a). Ressuscitation promoting factors: a family of microbial proteins in survival and ressuscitation of dormant mycobacteria. Indian J. Microbiol. 52, 114–121.

Gupta, R.K., and Srivastava, R. (2012b). Ressuscitation Promoting Factors: a Family of Microbial Proteins in Survival and Ressuscitation of Dormant Mycobacteria. Indian J. Microbiol. 52, 114–121.

Gupta, R.K., Srivastava, B.S., and Srivastava, R. (2010). Comparative expression analysis of rpf-like genes of Mycobacterium tuberculosis H37Rv under different physiological stress and growth conditions. Microbiology 156, 2714–2722.

H

Haugland, R.P. (1996). Handbook of fluorescent probes and research chemicals (Molecular Probes).

Helmann, J.D. (2002). The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. Adv. Microb. Physiol. *46*, 47–110.

Henson M.A. (2003). Dynamic modeling and control of yeast cell populations in continuous biochemical reactors. Comput. Chem. Eng. *27*, 1185–1199.

Hett, E.C., Chao, M.C., Steyn, A.J., Fortune, S.M., Deng, L.L., and Rubin, E.J. (2007). A partner for the ressuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol. Microbiol. *66*, 658–668.

Hinze, H., and Holzer, H. (1986). Analysis of the energy metabolism after incubation of *Saccharomyces cerevisiae* with sulfite or nitrite. Arch. Microbiol. *145*, 27–31.

Hirasawa, T., Yoshikawa, K., Nakakura, Y., Nagahisa, K., Furusawa, C., Katakura, Y., Shimizu, H., and Shioya, S. (2007). Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. J. Biotechnol. *131*, 34–44.

Hobbie, J.E., Daley, R.J., and Jasper, S. (1977). Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. Appl. Environ. Microbiol. *33*, 1225–1228.

Hohmann, S., and Mager, W.H. (2003). Yeast Stress Responses (Springer).

Hua, S.S.T., Brandl, M.T., Hernlem, B., Eng, J.G., and Sarreal, S.B.L. (2011). Fluorescent viability stains to probe the metabolic status of aflatoxigenic fungus in dual culture of *Aspergillus flavus* and *Pichia anomala*. Mycopathologia *171*, 133–138.

Huffer, S., Clark, M.E., Ning, J.C., Blanch, H.W., and Clark, D.S. (2011). Role of alcohols in growth, lipid composition, and membrane fluidity of yeasts, bacteria, and archaea. Appl. Environ. Microbiol. *77*, 6400–6408.

Husevåg, Bente. (1995) "Starvation Survival of the Fish Pathogen *Aeromonas Salmonicida* in Seawater." FEMS Microbiology Ecology 16, no. 1: 25–32.

I

Ibeas, J.I., and Jimenez, J. (1997). Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces flor* yeasts. Appl. Environ. Microbiol. *63*, 7–12.

Ingram, L.O. (1977). Preferential inhibition of phosphatidyl ethanolamine synthesis in E. coli by alcohols. Can. J. Microbiol. *23*, 779–789.

Islam, M.S., Hasan, M.K., Miah, M.A., Sur, G.C., Felsenstein, A., Venkatesan, M., Sack, R.B., and Albert, M.J. (1993). Use of the polymerase chain reaction and fluorescent-antibody methods for detecting viable but nonculturable Shigella dysenteriae type 1 in laboratory microcosms. Appl. Environ. Microbiol. *59*, 536–540.

J

Jacob, J. (2010). The Systemic Practice of Misinterpretation of Scientific Data: The Case of Persisters, Small Colony Variants, Viable But Non-Culturable Bacteria, and Senescent Bacteria in Microbiology (Universal-Publishers).

Jepras, R.I., Carter, J., Pearson, S.C., Paul, F.E., and Wilkinson, M.J. (1995). Development of a Robust Flow Cytometric Assay for Determining Numbers of Viable Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. *61*, 2696–2701.

Jiang, Y., Davis, C., and Broach, J.R. (1998). Efficient transition to growth on fermentable carbon sources in *Saccharomyces cerevisiae* requires signaling through the Ras pathway. EMBO J. *17*, 6942–6951.

Joux, F., and Lebaron, P. (2000). Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. Microbes Infect. Inst. Pasteur *2*, 1523–1535.

Joux, F., Lebaron, P., and Troussellier, M. (1997). Succession of cellular states in a *Salmonella typhimurium* population during starvation in artificial seawater microcosms. FEMS Microbiol. Ecol. *22*, 65–76.

K

Kaeberlein, M., Kirkland, K.T., Fields, S., and Kennedy, B.K. (2004). Sir2-Independent Life Span Extension by Calorie Restriction in Yeast. PLoS Biol *2*, e296.

Kappler, U., Bennett, B., Rethmeier, J., Schwarz, G., Deutzmann, R., McEwan, A.G., and Dahl, C. (2000). Sulfite:Cytochrome c oxidoreductase from *Thiobacillus novellus*. Purification, characterization, and molecular biology of a heterodimeric member of the sulfite oxidase family. J. Biol. Chem. *275*, 13202–13212.

Kaprelyants, A.S., and Kell, D.B. (1993a). Dormancy in Stationary-Phase Cultures of *Micrococcus luteus*: Flow Cytometric Analysis of Starvation and Ressuscitation. Appl. Environ. Microbiol. *59*, 3187–3196.

Kaprelyants, A.S., and Kell, D.B. (1993b). The use of 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride and flow cytometry for the visualisation of respiratory activity in individual cells of *Micrococcus luteus*. J. Microbiol. Methods *17*, 115–122.

Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Weichart, D.H., Harwood, C.R., and Barer, M.R. (1998). Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. Antonie Van Leeuwenhoek *73*, 169–187.

Kim, I., Yun, H., and Jin, I. (2007). Comparative proteomic analyses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 strain against menadione-induced oxidative stress. J. Microbiol. Biotechnol. *17*, 207–217.

Kobayashi, K., and Yoshimoto, A. (1982). Studies on yeast sulfite reductase. IV. Structure and steady-state kinetics. Biochim. Biophys. Acta *705*, 348–356.

Koch, W.H., Payne, W.L., Wentz, B.A., and Cebula, T.A. (1993). Rapid polymerase chain reaction method for detection of *Vibrio cholerae* in foods. Appl. Environ. Microbiol. *59*, 556–560.

Koechlein, D.J., and Krieg, N.R. (1998). Viable but nonculturable coccoid forms of *Prolinoborus fasciculus* (Aquaspirillum fasciculus). Can. J. Microbiol. *44*, 910–912.

Kogure, K., Simidu, U., and Taga, N. (1979). A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. Can. J. Microbiol. *25*, 415–420.

Kolling, G.L., and Matthews, K.R. (2001). Examination of recovery in vitro and in vivo of nonculturable *Escherichia coli O157:H7*. Appl. Environ. Microbiol. *67*, 3928–3933.

Kurek, E.J. (1985). Properties of an enzymatic complex active in sulfite and thiosulfate oxidation by *Rhodotorula* sp. Arch. Microbiol. *143*, 277–282.

L

Lacroix, C., and Yildirim, S. (2007). Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. Curr. Opin. Biotechnol. *18*, 176–183.

Langsrud, S., and Sundheim, G. (1996). Flow cytometry for rapid assessment of viability after exposure to a quaternary ammonium compound. J. Appl. Bacteriol. *81*, 411–418.

Lázaro, B., Cárcamo, J., Audícana, A., Perales, I., and Fernández-Astorga, A. (1999). Viability and DNA Maintenance in Nonculturable Spiral *Campylobacter jejuni* Cells after Long-Term Exposure to Low Temperatures. Appl. Environ. Microbiol. *65*, 4677–4681.

Lewis, J.A., Elkon, I.M., McGee, M.A., Higbee, A.J., and Gasch, A.P. (2010). Exploiting natural variation in *Saccharomyces cerevisiae* to identify genes for increased ethanol resistance. Genetics *186*, 1197–1205.

Lin, S.-J., and Guarente, L. (2006). Increased Life Span due to Calorie Restriction in Respiratory-Deficient Yeast. PLoS Genet *2*, e33.

Linder, K., and Oliver, J.D. (1989). Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. Appl. Environ. Microbiol. *55*, 2837–2842.

Liu, S.-Q., and Pilone, G.J. (2000). An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. Int. J. Food Sci. Technol. *35*, 49–61.

Lleò, M.M., Bonato, B., Tafi, M.C., Signoretto, C., Boaretti, M., and Canepari, P. (2001). Ressuscitation rate in different *enterococcal* species in the viable but non-culturable state. J. Appl. Microbiol. *91*, 1095–1102.

López-Amorós, R., Castel, S., Comas-Riu, J., and Vives-Rego, J. (1997). Assessment of *E. coli* and *Salmonella* viability and starvation by confocal laser microscopy and flow cytometry using rhodamine 123, DiBAC4(3), propidium iodide, and CTC. Cytometry *29*, 298–305.

Lothigius, A., Sjöling, A., Svennerholm, A.-M., and Bölin, I. (2010). Survival and gene expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* during long-term incubation in sea water and freshwater. J. Appl. Microbiol. *108*, 1441–1449.

Louis, V.R., Russek-Cohen, E., Choopun, N., Rivera, I.N.G., Gangle, B., Jiang, S.C., Rubin, A., Patz, J.A., Huq, A., and Colwell, R.R. (2003). Predictability of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. Appl. Environ. Microbiol. *69*, 2773–2785.

Lucero, P., Peñalver, E., Moreno, E., and Lagunas, R. (2000). Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. *66*, 4456–4461.

M

M. R. Barer, L.T.G. (1993). The viable but non-culturable hypothesis and medical bacteriology. Rev. Med. Microbiol. *4*.

Ma, M., and Liu, L.Z. (2010). Quantitative transcription dynamic analysis reveals candidate genes and key regulators for ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. BMC Microbiol. *10*, 169.

Macris, B.J., and Markakis, P. (1974). Transport and toxicity of sulphur dioxide in *Saccharomyces cerevisiae* var ellipsoideus. J. Sci. Food Agric. *25*, 21–29.

Maier, K., Hinze, H., and Leuschel, L. (1986). Mechanism of sulfite action on the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg. *848*, 120–130.

Malacrinò, P., Zapparoli, G., Torriani, S., and Dellaglio, F. (2001). Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. J. Microbiol. Methods *45*, 127–134.

Mannervik, B., Persson, G., and Eriksson, S. (1974). Enzymatic catalysis of the reversible sulfitolysis of glutathione disulfide and the biological reduction of thiosulfate esters. Arch. Biochem. Biophys. *163*, 283–289.

Mansure, J.J., Panek, A.D., Crowe, L.M., and Crowe, J.H. (1994). Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. Biochim. Biophys. Acta *1191*, 309–316.

Marechal, P.A., Martínez de Marnañón, I., Poirier, I., and Gervais, P. (1999). The importance of the kinetics of application of physical stresses on the viability of microorganisms: significance for minimal food processing. Trends Food Sci. Technol. *10*, 15–20.

Martini, S., Ricci, M., Bonechi, C., Trabalzini, L., Santucci, A., and Rossi, C. (2004). In vivo 13C-NMR and modelling study of metabolic yield response to ethanol stress in a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. *564*, 63–68.

Mason, D.J., Allman, R., Stark, J.M., and Lloyd, D. (1994). Rapid estimation of bacterial antibiotic susceptibility with flow cytometry. J. Microsc. *176*, 8–16.

Mason, D.J., Dybowski, R., Larrick, J.W., and Gant, V.A. (1997). Antimicrobial action of rabbit leukocyte CAP18(106-137). Antimicrob. Agents Chemother. *41*, 624–629.

Mason, D.J., Lopéz-Amorós, R., Allman, R., Stark, J.M., and Lloyd, D. (1995). The ability of membrane potential dyes and calcafluor white to distinguish between viable and non-viable bacteria. J. Appl. Bacteriol. *78*, 309–315.

Mazón, M.J., Gancedo, J.M., and Gancedo, C. (1982). Phosphorylation and inactivation of yeast fructose-bisphosphatase in vivo by glucose and by proton ionophores. A possible role for cAMP. Eur. J. Biochem. FEBS *127*, 605–608.

McDougald, D., Rice, S.A., Weichart, D., and Kjelleberg, S. (1998). Nonculturability: adaptation or debilitation? FEMS Microbiol. Ecol. *25*, 1–9.

Medema, G.J., Schets, F.M., van de Giessen, A.W., and Havelaar, A.H. (1992). Lack of colonization of 1 day old chicks by viable, non-culturable *Campylobacter jejuni*. J. Appl. Bacteriol. *72*, 512–516.

Meijer, M. M. C., Boonstra, J., Verkleij, A. J., and Verrips, C. T. (1998). Glucose repression in Saccharomyces cerevisiae is related to glucose concentration rather than the glucose flux. The Journal of Biological Chemistry, 273 (37): 24102-24107.

Meng, Z., and Zhang, L. (1992). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by sodium bisulfite. Mutat. Res. *298*, 63–69.

Meunier, J.R., and Choder, M. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* colony growth and ageing: biphasic growth accompanied by changes in gene expression. Yeast Chichester Engl. 15, 1159–1169.

Millard, P.J., Roth, B.L., Thi, H.P., Yue, S.T., and Haugland, R.P. (1997). Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. Appl. Environ. Microbiol. *63*, 2897–2905.

Millet, V. (2001). Dynamique et survie des populations bactériennes dans les vins rouges au cours de l'élevage : interactions et équilibres. Université Bordeaux 2, Bordeaux

Millet, V., and Lonvaud-Funel, A. (2000). The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. Lett. Appl. Microbiol. *30*, 136–141.

Mills, D.A., Johannsen, E.A., and Cocolin, L. (2002). Yeast Diversity and Persistence in Botrytis-Affected Wine Fermentations. Appl. Environ. Microbiol. *68*, 4884–4893.

Minois, N., Lagona, F., Frajnt, M., and Vaupel, J.W. (2009). Plasticity of death rates in stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. Aging Cell *8*, 36–44.

Mishra, P., and Prasad, R. (1989). Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. *30*, 294–298.

Mizunoe, Y., Wai, S.N., Takade, A., and Yoshida, S. (1999). Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* O157 cells by using H2O2-degrading compounds. Arch. Microbiol. *172*, 63–67.

Morgan, J.A., Cranwell, P.A., and Pickup, R.W. (1991). Survival of *Aeromonas salmonicida* in lake water. Appl. Environ. Microbiol. *57*, 1777–1782.

Mukai, F., Hawryluk, I., and Shapiro, R. (1970). The mutagenic specificity of sodium bisulfite. Biochem. Biophys. Res. Commun. *39*, 983–988.

Mukamolova, G.V., Kaprelyants, A.S., Young, D.I., Young, M., and Kell, D.B. (1998). A bacterial cytokine. Proc. Natl. Acad. Sci. *95*, 8916–8921.

Mukamolova, G.V., Murzin, A.G., Salina, E.G., Demina, G.R., Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., and Young, M. (2006). Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and ressuscitation. Mol. Microbiol. *59*, 84–98.

N

Nardi, T., Corich, V., Giacomini, A., and Blondin, B. (2010). A sulphite-inducible form of the sulphite efflux gene SSU1 in a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. Microbiol. Read. Engl. *156*, 1686–1696.

Nicolini, G., Larcher, R., and Versini, G. (2004). Status of yeast assimilable nitrogen in Italian grape musts and effects of variety, ripening and vintage. Vitis, 43: 89-96.

Niven, G.W., and Mulholland, F. (1998). Cell membrane integrity and lysis in *Lactococcus lactis*: the detection of a population of permeable cells in post-logarithmic phase cultures. J. Appl. Microbiol. *84*, 90–96.

Norden, M.A., Kurzynski, T.A., Bownds, S.E., Callister, S.M., and Schell, R.F. (1995). Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) by flow cytometry. J. Clin. Microbiol. *33*, 1231–1237.

Novo, D., Perlmutter, N.G., Hunt, R.H., and Shapiro, H.M. (1999). Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxacarbocyanine and a ratiometric technique. Cytometry *35*, 55–63.

Nyström T (2001) Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. Arch Microbiol 176:159–164

Nyström, T. (2003). Nonculturable bacteria: programmed survival forms or cells at death's door? BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. *25*, 204–211.

Nyström, T., and Kjelleberg, S. (1989). Role of Protein Synthesis in the Cell Division and Starvation Induced Resistance to Autolysis of a Marine Vibrio during the Initial Phase of Starvation. J. Gen. Microbiol. *135*, 1599–1606.

O

Ogawa, Y., Nitta, A., Uchiyama, H., Imamura, T., Shimoi, H., and Ito, K. (2000). Tolerance mechanism of the ethanol-tolerant mutant of sake yeast. J. Biosci. Bioeng. *90*, 313–320.

Oliver, J.D. (1993) Formation of viable but nonculturable cells. In Starvation in bacteria. Ed S Kjelleberg New-York Plenum Press pp. 239-272.

Oliver, J.D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. J. Microbiol. Seoul Korea *43 Spec No*, 93–100.

Oliver, J.D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol. Rev. *34*, 415–425.

Oliver, J.D., and Wanucha, D. (1989). Survival of *Vibrio Vulnificus* at Reduced Temperatures and Elevated Nutrient. J. Food Saf. *10*, 79–86.

Oliver, J.D., Hite, F., McDougald, D., Andon, N.L., and Simpson, L.M. (1995). Entry into, and ressuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. Appl. Environ. Microbiol. *61*, 2624–2630.

Ordax, M., Marco-Noales, E., López, M.M., and Biosca, E.G. (2006). Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. Appl. Environ. Microbiol. *72*, 3482–3488.

Ormerod, M.G., and Kubbies, M. (1992). Cell cycle analysis of asynchronous cell populations by flow cytometry using bromodeoxyuridine label and Hoechst-propidium iodide stain. Cytometry *13*, 678–685.

Östling, Holmquist, L., Flärdh K., Svenblad B.,, Jouper-Jaan È., and Kjelleberg S (1993). Starvation and recovery of marine *Vibrio*. In Starvation in bacteria. Ed S Kjelleberg New-York Plenum Press 103–127.

P

Pagano, D.A., and Zeiger, E. (1987). Conditions affecting the mutagenicity of sodium bisulfite in *Salmonella typhimurium*. Mutat. Res. *179*, 159–166.

Palková, Z., Devaux, F., Icicová, M., Mináriková, L., Le Crom, S., and Jacq, C. (2002). Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. Mol. Biol. Cell 13, 3901–3914.

Palková, Z., Janderová, B., Gabriel, J., Zikánová, B., Pospísek, M., and Forstová, J. (1997). Ammonia mediates communication between yeast colonies. Nature 390, 532–536.

Park, H., and Bakalinsky, A.T. (2000a). SSU1 mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast *16*, 881–888.

Park, H., and Bakalinsky, A.T. (2000b). SSU1 mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast Chichester Engl. *16*, 881–888.

Park, H., and Bakalinsky, A.T. (2004). Evidence for Sulfite Proton Symport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Microbiol. Biotechnol. *v. 14(5) p. 967-971*.

Park, H., and Hwang, Y.-S. (2008). Genome-wide transcriptional responses to sulfite in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Microbiol. Seoul Korea *46*, 542–548.

Patterson GH, Lippincott-Schwartz J (2002) A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. Science 297:1873–1877

Peak, E., Chalmers, I.W., and Hoffmann, K.F. (2010). Development and Validation of a Quantitative, High-Throughput, Fluorescent-Based Bioassay to Detect *Schistosoma* Viability. PLoS Negl Trop Dis *4*, e759.

Pereira, C.S., Lins, R.D., Chandrasekhar, I., Freitas, L.C.G., and Hünenberger, P.H. (2004). Interaction of the disaccharide trehalose with a phospholipid bilayer: a molecular dynamics study. Biophys. J. *86*, 2273–2285.

Phillips, A., Darley, M., and Blaydes, J.P. (2006). GC-selective DNA-binding antibiotic, Mithramycin A, reveals multiple points of control in the regulation of Hdm2 protein synthesis. Oncogene *25*, 4183–4193.

Pinto, D., Almeida, V., Almeida Santos, M., and Chambel, L. (2011). Ressuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli. J. Appl. Microbiol. *110*, 1601–1611.

Plovins, A., Alvarez, A.M., Ibañez, M., Molina, M., and Nombela, C. (1994). Use of fluorescein-di-beta-D-galactopyranoside (FDG) and C12-FDG as substrates for beta-galactosidase detection by flow cytometry in animal, bacterial, and yeast cells. Appl. Environ. Microbiol. *60*, 4638–4641.

Poilpré, E. (2002). Mécanisme d'adaptation rapide de *Saccharomyces cerevisiae* en métabolisme oxydatif: implication des sucres de réserve et de la capacité respiratoire. Institut national des sciences appliquées, Toulouse

Porro, D., Smeraldi, C., Martegani, E., Ranzi, B.M., and Alberghina, L. (1994). Flow-cytometric determination of the respiratory activity in growing *Saccharomyces cerevisiae* populations. Biotechnol. Prog. *10*, 193–197.

Pozarowski, P., and Darzynkiewicz, Z. (2004). Analysis of cell cycle by flow cytometry. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *281*, 301–311.

Pronk, J.T., Yde Steensma, H., and Van Dijken, J.P. (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast Chichester Engl. *12*, 1607–1633.

Prudêncio, C., Sansonetty, F., and Côrte-Real, M. (1998). Flow cytometric assessment of cell structural and functional changes induced by acetic acid in the yeasts *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces* . Cytometry *31*, 307–313.

R

Rahman, M. (2006) Introduction to Flow Cytometry: Principles, Data Analysis, Protocols, Troubleshooting, AbD Serotec, Kidlington.

Ratinaud, M. (1994). Cytométrie par fluorescence: Apports comparatifs des techniques flux, image et confocale. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale .

Ratledge, C. (1991). Yeast physiology — a micro-synopsis. Bioprocess Eng. *6*, 195–203.

Ravagnani, A., Finan, C.L., and Young, M. (2005). A novel firmicute protein family related to the actinobacterial ressuscitation-promoting factors by non-orthologous domain displacement. BMC Genomics *6*, 39.

Ray, B. (1989). Injured Index and Pathogenic Bacteria: Occurence and Detection in Foods, Water and Feeds (CRC Press).

Rezaeinejad, S., and Ivanov, V. (2011). Heterogeneity of *Escherichia coli* population by respiratory activity and membrane potential of cells during growth and long-term starvation. Microbiol. Res. *166*, 129–135.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., and Lonvaud, A. (2012). Traité d'oenologie - Tome 1 - 6e éd. - Microbiologie du vin. Vinifications (Dunod).

Roehr, M. (2001). The Biotechnology of Ethanol (Wiley).

Rollins, D.M., and Colwell, R.R. (1986). Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. Appl. Environ. Microbiol. *52*, 531–538.

Romano, P., and Suzzi, G. (1993). Wine: Microbiology and Biotechnology (Taylor & Francis).

Rose, A.H. (1980). Recent research on industrially important strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Biol. Act. Yeast p. 103, Academic Press.

Roszak, D B, D J Grimes, and R R Colwell (1984). Viable but Nonrecoverable Stage of *Salmonella Enteritidis* in Aquatic Systems. Canadian Journal of Microbiology 30, no. 3: 334–338.

Roszak, D.B., Grimes, D.J., and Colwell, R.R. (1984). Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. Can. J. Microbiol. *30*, 334–338.

Roth, W.G., Leckie, M.P., and Dietzler, D.N. (1988). Restoration of colony-forming activity in osmotically stressed *Escherichia coli* by betaine. Appl. Environ. Microbiol. *54*, 3142–3146.

S

S. Bukh, A. (2012). Detection and Persistence of Clinical *Escherichia coli* in Drinking Water Evaluated by a Rapid Enzyme Assay and qPCR. Adv. Microbiol. *02*, 252–262.

Sainz, J., Pizarro, F., Pérez-Correa, J.R., and Agosin, E. (2003). Modeling of yeast metabolism and process dynamics in batch fermentation. Biotechnol. Bioeng. *81*, 818–828.

Salma, M., Rousseaux, S., Sequeira-Le Grand, A., and Alexandre, H. (2012). Cytofluorometric detection of wine lactic acid bacteria: application of malolactic fermentation to the monitoring. J. Ind. Microbiol. Biotechnol.

Sanchez Gonzalez, Y. (2008). Etude de l'adaptation et de la gestion de l'activité cellulaire dans un bioréacteur biétagé : intensification de la production d'éthanol. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse

Schimz, K.-L. (1980). The effect of sulfite on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. *125*, 89–95.

Schumann, R., Schiewer, U., Karsten, U., and Rieling, T. (2003). Viability of bacteria from different aquatic habitats. II. Cellular fluorescent markers for membrane integrity and metabolic activity. Aquat. Microb. Ecol. *32*, 137–150.

Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., and Alexandre, H. (2012). Characterization of the "viable but nonculturable" (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. Food Microbiol. *30*, 438–447.

Sharma, S.C. (1997). A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Lett. *152*, 11–15.

Shleeva, M.O., Bagramyan, K., Telkov, M.V., Mukamolova, G.V., Young, M., Kell, D.B., and Kaprelyants, A.S. (2002). Formation and ressuscitation of "non-culturable" cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase. Microbiology *148*, 1581–1591.

Signoretto, C., Lleò, M.M., Tafi, M.C., and Canepari, P. (2000). Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. Appl. Environ. Microbiol. *66*, 1953–1959.

Signoretto, C., M.M. Lleò, and P. Canepari. (2002). Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. Curr. Microbiol. 44:125-131.

Silva, F.C. da, Chalfoun, S.M., Siqueira, V.M. de, Botelho, D.M. dos S., Lima, N., and Batista, L.R. (2012). Evaluation of antifungal activity of essential oils against potentially *mycotoxigenic Aspergillus* flavus and *Aspergillus parasiticus*. Rev. Bras. Farmacogn. *22*, 1002–1010.

Slater, S.J., Ho, C., Taddeo, F.J., Kelly, M.B., and Stubbs, C.D. (1993). Contribution of hydrogen bonding to lipid-lipid interactions in membranes and the role of lipid order: Effects of cholesterol, increased phospholipid unsaturation, and ethanol. Biochemistry (Mosc.) *32*, 3714–3721.

Sonnleitner, B. (1998). Dynamic adaptation of microbes. J. Biotechnol. *65*, 47–60.

Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P.J., and Stanley, G.A. (2010). The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Appl. Microbiol. 109, 13–24.

Steinert, M., Emödy, L., Amann, R., and Hacker, J. (1997). Ressuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila Philadelphia* JR32 by Acanthamoeba castellanii. Appl. Environ. Microbiol. *63*, 2047–2053.

Stratford, M., Morgan, P., and Rose, A.H. (1987). Sulphur Dioxide Resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomycodes ludwigii*. J. Gen. Microbiol. *133*, 2173–2179.

Su, X., Chen, X., Hu, J., Shen, C., and Ding, L. (2013). Exploring the potential environmental functions of viable but non-culturable bacteria. World J. Microbiol. Biotechnol.

Suller, M.T., Stark, J.M., and Lloyd, D. (1997). A flow cytometric study of antibiotic-induced damage and evaluation as a rapid antibiotic susceptibility test for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. *40*, 77–83.

Suzuki, I., and Silver, M. (1966). The initial product and properties of the sulfur-oxidizing enzyme of thiobacilli. Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzym. Biol. Oxid. *122*, 22–33.

Swan, T.M., and Watson, K. (1999). Stress tolerance in a yeast lipid mutant: membrane lipids influence tolerance to heat and ethanol independently of heat shock proteins and trehalose. Can. J. Microbiol. *45*, 472–479.

T

Du Toit, W.J., Pretorius, I.S., and Lonvaud-Funel, A. (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of Acetobacter pasteurianus and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. J. Appl. Microbiol. *98*, 862–871.

Tabll, A., and Ismail, H. (2011). The Use of Flow Cytometric DNA Ploidy Analysis of Liver Biopsies in *Liver Cirrhosis* and *Hepatocellular Carcinoma*. In Liver Biopsy, H. Takahashi, ed. (InTech),.

Tahara, E.B., Cunha, F.M., Basso, T.O., Della Bianca, B.E., Gombert, A.K., and Kowaltowski, A.J. (2013). Calorie Restriction Hysteretically Primes Aging *Saccharomyces cerevisiae* toward More Effective Oxidative Metabolism. PLoS ONE *8*, e56388.

Tangwatcharin, P., Chanthachum, S., Khopaibool, P., and Griffiths, M.W. (2006). Morphological and physiological responses of *Campylobacter jejuni* to stress. J. Food Prot. *69*, 2747–2753.

Teixeira, H., Gonçalves, M.G., Rozès, N., Ramos, A., and San Romão, M.V. (2002). Lactobacillic acid accumulation in the plasma membrane of *Oenococcus oeni*: a response to ethanol stress? Microb. Ecol. *43*, 146–153.

Teixeira, M.C., Mira, N.P., and Sá-Correia, I. (2011). A genome-wide perspective on the response and tolerance to food-relevant stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Opin. Biotechnol. 22, 150–156.

Terskikh A, Fradkov A, Ermakova G, Zaraisky A, Tan P, Kajava AV, Zhao X, Lukyanov S, Matz M, Kim S, Weissman I, Siebert P (2000) ‘‘Fluorescent timer’’: protein that changes color with time. Science 290:1585–1588

Tierney, K.J., Block, D.E., and Longo, M.L. (2005). Elasticity and phase behavior of DPPC membrane modulated by cholesterol, ergosterol, and ethanol. Biophys. J. *89*, 2481–2493.

Trevors, J.T. (2011). Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells. J. Microbiol. Methods *86*, 266–273.

Trevors, J.T., Bej, A.K., Mojib, N., van Elsas, J.D., and Van Overbeek, L. (2012). Bacterial gene expression at low temperatures. Extrem. Life Extreme Cond. *16*, 167–176.

U

Ueckert, J., Breeuwer, P., Abee, T., Stephens, P., von Caron, G.N., and ter Steeg, P.F. (1995). Flow cytometry applications in physiological study and detection of foodborne microorganisms. Int. J. Food Microbiol. *28*, 317–326.

V

Váchová, L., Cáp, M., and Palková, Z. (2012). Yeast Colonies: A Model for Studies of Aging, Environmental Adaptation, and Longevity. Oxid. Med. Cell. Longev.

Van Hoek, van Dijken JP, and Pronk (2000). Regulation of fermentative capacity and levels of glycolytic enzymes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme Microb. Technol. *26*, 724–736.

Van Urk, H., Postma, E., Scheffers, W.A., and van Dijken, J.P. (1989). Glucose transport in crabtree-positive and crabtree-negative yeasts. J. Gen. Microbiol. *135*, 2399–2406.

Van Voorst, F., Houghton-Larsen, J., Jønson, L., Kielland-Brandt, M.C., and Brandt, A. (2006). Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. Yeast Chichester Engl. *23*, 351–359.

Verhoeff-Bakkenes, L., Hazeleger, W.C., Zwietering, M.H., and De JONGE, R. (2008). Lack of response of INT-407 cells to the presence of non-culturable *Campylobacter jejuni*. Epidemiol. Infect. *136*, 1401–1406.

Villarino, A., Bouvet, O., Regnault, B., Delautre, S., and Grimont, P.A. (2000). Cellular activities in ultra-violet killed *Escherichia coli*. Int. J. Food Microbiol. *55*, 245–247.

Volschenk H, Bloom.M, Van Staden.J, Husnik.J, and Van Vuuren.Hjj (2004). Genetic engineering of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for L-Malic acid degradation via an efficient malo-ethanolic. *Vol. 25 (2)*, p.63–72.

Votyakova, T.V., Kaprelyants, A.S., and Kell, D.B. (1994). Influence of Viable Cells on the Ressuscitation of Dormant Cells in *Micrococcus luteus* Cultures Held in an Extended Stationary Phase: the Population Effect. Appl. Environ. Microbiol. *60*, 3284–3291.

W

Waggoner, A. (1976). Optical probes of membrane potential. J. Membr. Biol. *27*, 317–334.

Wang, M., McIntee, E.J., Cheng, G., Shi, Y., Villalta, P.W., and Hecht, S.S. (2000). Identification of DNA adducts of acetaldehyde. Chem. Res. Toxicol. *13*, 1149–1157.

Wang, Y., Liu, C.L., Storey, J.D., Tibshirani, R.J., Herschlag, D., and Brown, P.O. (2002). Precision and functional specificity in mRNA decay. Proc. Natl. Acad. Sci. *99*, 5860–5865.

Warth, A.D. (1985). Resistance of yeast species to benzoic and sorbic acids and to sulfur dioxide.

Watson, K., and Cavicchioli, R. (1983). Acquisition of ethanol tolerance in yeast cells by heat shock. Biotechnol. Lett. 5, 683–688

Weichart, D., McDougald, D., Jacobs, D., and Kjelleberg, S. (1997). In situ analysis of nucleic acids in cold-induced nonculturable *Vibrio vulnificus*. Appl. Environ. Microbiol. *63*, 2754–2758.

Wenisch, C., Linnau, K.F., Parschalk, B., Zedtwitz-Liebenstein, K., and Georgopoulos, A. (1997). Rapid susceptibility testing of fungi by flow cytometry using vital staining. J. Clin. Microbiol. *35*, 5–10.

Whitesides, M.D., and Oliver, J.D. (1997). Ressuscitation of Vibrio vulnificus from the Viable but Nonculturable State. Appl. Environ. Microbiol. *63*, 1002–1005.

Whitesides, M.D., and Oliver, J.D. (1997). Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the Viable but Nonculturable State. Appl. Environ. Microbiol. 63, 1002–1005.

Wiemken, A. (1990). Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. Antonie Van Leeuwenhoek *58*, 209–217.

Wilson, H.A., and Chused, T.M. (1985). Lymphocyte membrane potential and Ca2+-sensitive potassium channels described by oxonol dye fluorescence measurements. J. Cell. Physiol. *125*, 72–81.

Winter, J. (1988). Fermentation alcoolique par *saccharomyces cerevisiae*: contribution a l'etude du controle de la dynamique fermentaire par l'inhibition et les facteurs nutritionnels. Thèse doctorat d'etat.

X

Xu, H.-S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J., and Colwell, R.R. (1982). Survival and viability of nonculturable*Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. Microb. Ecol. *8*, 313–323.

Xu, X., Wightman, J.D., Geller, B.L., Avram, D., and Bakalinsky, A.T. (1994). Isolation and characterization of sulfite mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. *25*, 488–496.

Y

Yamamoto, H. (2000). Viable but nonculturable state as a general phenomenon of non-spore-forming bacteria, and its modeling. J. Infect. Chemother. *6*, 112–114.

Yguerabide, J., Talavera, E., Alvarez, J.M., and Quintero, B. (1994). Steady-State Fluorescence Method for Evaluating Excited State Proton Reactions: Application to Fluorescein. Photochem. Photobiol. *60*, 435–441.

Yoshimoto, A., and Sato, R. (1968). Studies on yeast sulfite reductase. I. Purification and characterization. Biochim. Biophys. Acta *153*, 555–575.

You, K.M., Rosenfield, C.-L., and Knipple, D.C. (2003). Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content. Appl. Environ. Microbiol. *69*, 1499–1503.

Z

Zhang, D.-C., Mörtelmaier, C., and Margesin, R. (2012). Characterization of the bacterial archaeal diversity in hydrocarbon-contaminated soil. Sci. Total Environ. *421-422*, 184–196.

Zhong, L., Chen, J., Zhang, X., and Jiang, Y. (2009). Entry of *Vibrio cincinnatiensis* into viable but nonculturable state and its ressuscitation. Lett. Appl. Microbiol. *48*, 247–252.

.