

Offre de thèse au sein de l'équipe MALIM du laboratoire ABTE - UNICAEN

Secundilactobacillus collinoides au sein du microbiome cidricole : comprendre et prévenir l'apparition de la piqûre acroléique dans les produits cidricoles

Résumé et contexte du sujet :

Comprendre les mécanismes de production d'acroléine demeure une problématique majeure pour la filière cidricole. Le glycérol produit par les levures peut être dégradé par des bactéries lactiques entraînant un défaut organoleptique nommé piqûre acroléique. Cette piqûre est associée à la présence d'une bactérie lactique, *Secundilactobacillus collinoides*, qui convertit le glycérol en 3-hydroxypropionaldéhyde, précurseur transformé ultérieurement en acroléine en conditions de pH acide et/ou de température élevée. Nos travaux antérieurs ont montré l'existence de sous-populations de *S. collinoides* qui diffèrent par la structure (type I/type II) des opérons *pdu* codant pour l'enzyme glycérol deshydratase et par leur aptitude à métaboliser le glycérol. Mieux évaluer la place de *S. collinoides* dans le microbiome cidricole (interactions avec les autres bactéries et levures, conditions de croissance et de production de 3-HPA) est un enjeu pour détecter rapidement l'apparition d'une piqûre acroléique. Les recherches menées apporteront des résultats nouveaux sur cette problématique tout en s'appuyant sur des expertises et modèles microbiens existant du laboratoire (analyse de données métagénomiques, modèle d'interactions). Ce projet scientifique a vocation à répondre aux enjeux actuels de la filière cidricole sur l'amélioration de la qualité des produits cidricoles en dégagant des leviers technologiques applicables chez les producteurs pour maîtriser la piqûre acroléique. Ce sujet fera partie d'un projet collaboratif avec la filière cidricole dont la thématique scientifique globale est la maîtrise de la qualité des calvados.

Description et objectifs du projet :

Dans le cadre des travaux de recherche du laboratoire, nous nous intéressons particulièrement à la place des bactéries lactiques dans ces microbiomes. En effet, cette flore abondante et diversifiée est responsable de la fermentation malolactique qui permet d'adoucir les cidres en abaissant le pH par conversion de l'acide malique en acide lactique. Mais cette flore lactique peut aussi métaboliser les sources de carbone résiduelles, qu'il s'agisse du fructose, du glycérol ou de l'acide lactique, et ainsi être à l'origine d'altérations parmi lesquelles la piqûre acroléique qui demeure l'une des principales préoccupations de la filière cidricole. En effet des études antérieures réalisées par la chambre d'agriculture ont montré que plus de 90 % des producteurs sont concernés par les problèmes d'acroléine (Programme esters et typicité). Face à cette problématique, les producteurs de calvados se sont adaptés choisissant de distiller leur produit au stade le moins handicapant, c'est-à-dire lorsque le précurseur de l'acroléine, présent dans les cidres de distillation, s'est transformé en alcool allylique. Grâce à cette pratique, l'impact de l'acroléine dans les eaux-de-vie calvados est relativement limité, toutefois repousser la distillation pour permettre au précurseur de l'acroléine d'être converti en alcool allylique présente deux inconvénients :

- Risque d'une perte de "fruité" liée à la dégradation des esters d'acétate par les levures *Brettanomyces* qui se développent tardivement dans les cidres de distillation (Guichard *et al.*, 2019).
- Présence dans les eaux-de-vie de molécules (dont l'alcool allylique) qui au-delà de leur impact organoleptique éventuellement négatif pourraient avoir un impact négatif sur la santé.

La production d'acroléine dans les cidres est étroitement liée au métabolisme du glycérol, un des produits du métabolisme des levures lors de la fermentation alcoolique et dont la teneur dans les cidres de distillation atteint environ 5 g/L. Ce composé peut être dégradé en fin de fermentation alcoolique par certaines bactéries lactiques (Drilleau, 1991). Cette dégradation du glycérol entraîne des désordres organoleptiques en développant un goût d'amertume connu sous le nom de piqûre acroléique. Si la production d'acroléine s'observe chez des nombreuses espèces bactériennes (Seyfried *et al.*, 1996) dans le cidre elle est étroitement liée à la présence d'une bactérie lactique, *Secundilactobacillus collinoides*, capable de convertir le glycérol en 3-hydroxypropionaldéhyde (3-HPA), précurseur de l'acroléine. En conditions de pH acide et/ou de température élevée, par exemple lors de la distillation des cidres pour les eaux-de-vie, le 3-HPA est transformé en acroléine par déshydratation.

Des travaux antérieurs menés dans le cadre du projet MoNArC (Modulation des Notes Aromatiques des Calvados, Feder Innovation, 2017-2020) nous ont permis de constituer une collection de 72 souches de *Secundilactobacillus* (dont 70 appartiennent à l'espèce *collinoides*, une à l'espèce *breviis* et une à l'espèce *diolivorans*)

isolées des cidres de distillation. Au sein de cette collection deux types d'opéron *pdu* (opéron qui code pour les enzymes impliquées dans le métabolisme du glycérol) ont été caractérisés : l'un (qualifié de type I) similaire à celui de la souche de *S. collinoides* de référence LMG18850 connue pour dégrader le glycérol et le second (qualifié de type II) associé à la souche de *S. collinoides* de référence DSM20515^T, qui ne dégrade pas le glycérol. Toutes les souches possédant l'opéron de type I sont capables de dégrader le glycérol alors que 31 % des souches possédant l'opéron de type II en sont incapables. Ainsi, 3 profils génétiques et métaboliques ont pu être mis en évidence. Ces travaux ont permis d'établir un lien entre la production d'acroléine et la présence de *S. collinoides* toutefois la présence de cette espèce dans un cidre ne suffit pas à évaluer le risque de piquûre acroléique. Pour aller plus loin, une analyse comparative de huit génomes de souches de *S. collinoides* isolées à partir de cidres a été également menée dans le cadre de MoNArC. Les analyses génomiques ont montré une faible variabilité des principales caractéristiques génomiques entre les souches mais une différence majeure dans l'organisation de ces deux types d'opérons réside dans le type de régulateur transcriptionnel situé en amont de l'opéron. Pour le premier type d'opéron, le régulateur est identifié comme PocR, alors qu'il s'agit d'un régulateur de la famille des AraC dans le cas du second type d'opéron.

Ainsi, la compréhension des mécanismes de production d'acroléine dans les cidres demeure une réelle problématique qui nécessite une analyse des sous-populations de *S. collinoides*, une étude de la régulation de l'expression du gène *pduC* et des dynamiques d'interaction microbiennes. Le projet CELAD s'inscrit dans la continuité de recherches conduites au sein de l'équipe MALIM. Après une phase descriptive nécessaire, les résultats et les outils mis au point précédemment sont disponibles pour réaliser une étude scientifique approfondie sur l'influence des facteurs biotiques et abiotiques sur l'apparition de la piquûre acroléique dans des cidres à distiller. L'équipe MALIM s'appuiera sur le partenariat qu'elle a noué avec la filière cidricole via lors de projets antérieurs.

Cousin F.J., Le Guellec R., Schlusshuber M., Dalmasso M., Laplace J.M., Cretenet M. (2017). Microorganisms in fermented apple beverages: current knowledge and future directions. *Microorganisms*, 5(39).

Drilleau J. F. (1991). Les bactéries lactiques dans le cidre. Actes du colloque Lactic 1991, Bactéries Lactiques : 275-291.

Guichard H., Poupard P., Legoahec L., Millet M., Bauduin R., Le Quéré J.M. (2019). Brettanomyces anomalus, a double drawback for cider aroma. *LWT – Food Science and Technology*, 102, 214-222.

Misery B., Legendre P., Rue O., Bouchart V., Guichard H., Laplace J.M., Cretenet M. (2021). Diversity and dynamics of bacterial and fungal communities in cider for distillation. *International Journal of Food Microbiology*, 339, 108987.

Seyfried M., Daniel R., Gottschalk, G. (1996). Cloning, sequencing, and overexpression of the genes encoding coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. *Journal of Bacteriology*, 178, 5793–5796.

Valles B.S., Bedriñana R.P., Tascn N.F., Simón A.Q., Madrera R.R. (2007). Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology*, 24, 25-31.

Profil recherché :

Master 2 Recherche en microbiologie – biologie moléculaire – Ecologie microbienne. Des connaissances en bioinformatique sont souhaitées. Date du début de contrat : Septembre 2024.

Contacts :

Marina Cretenet UR ABTE EA4651 – Equipe MALIM, marina.cretenet@unicaen.fr, Tel : 0231565785

Jean-Marie Laplace UR ABTE EA4651 – Equipe MALIM jean-marie.laplace@unicaen.fr, Tel : 0231565038