



HAL
open science

Tolérance et réponse adaptative au stress acide chez *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*

Isabelle Guillouard, Eng-Mong Lim, Maarten van de Guchte, Christine Grimaldi, Stéphanie Penaud, Emmanuelle Maguin

► **To cite this version:**

Isabelle Guillouard, Eng-Mong Lim, Maarten van de Guchte, Christine Grimaldi, Stéphanie Penaud, et al.. Tolérance et réponse adaptative au stress acide chez *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Le Lait*, 2004, 84 (1-2), pp.1-6. 10.1051/lait:2003044 . hal-00895529

HAL Id: hal-00895529

<https://hal.science/hal-00895529>

Submitted on 11 May 2020

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.

Tolérance et réponse adaptative au stress acide chez *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*

Isabelle GUILLOUARD^a, Eng-Mong LIM^b, Maarten Van de GUCHTE^a,
Christine GRIMALDI^a, Stéphanie PENAUD^a, Emmanuelle MAGUIN^{a*}

^a Unité de Génétique Microbienne, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

^b Varoise de concentrés – Coca-Cola Midi, Parc d'activité du Plateau Signe, av. de Berlin,
BP 701, 83030 Toulon Cedex 9, France

Abstract – Tolerance and adaptative acid stress response of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Using several approaches, we studied the acid stress response of different strains of *Lactobacillus bulgaricus*. We showed that after an acid shock, the cell survival varied considerably between strains and that all the studied strains were able to develop an acid adaptive response. For one of these strains, we characterized, using two-dimensional electrophoresis, the modifications in the protein pattern induced by acid adaptation. Out of the 50 proteins up-regulated under the adaptive conditions, 21 were identified after N-terminal sequencing. They belong to different functional categories including stress response and general metabolism. To allow a larger genetic exploration of *L. bulgaricus*, the genome of the type strain ATCC 11842 was sequenced in collaboration with the Genoscope. All together, these genomic and post-genomic data should lead to a better understanding of *L. bulgaricus* physiology and its environmental adaptability.

Lactobacillus bulgaricus / acid stress / proteome / genome sequence

Résumé – En utilisant plusieurs approches, nous avons étudié le comportement de différentes souches de *Lactobacillus bulgaricus* face à un stress acide. Nous avons observé que la survie des cellules à un choc acide variait considérablement entre les souches et que toutes les souches étudiées étaient capables d'initier une réponse adaptative à l'acidité. Pour l'une des souches, nous avons caractérisé, par électrophorèse bidimensionnelle, les changements protéiques intervenant dans la réponse adaptative à l'acidité. Parmi les 50 protéines induites pendant l'adaptation, 21 ont pu être identifiées après séquençage N-terminal. Elles appartiennent à différentes catégories fonctionnelles dont celles des réponses aux stress et du métabolisme général. Afin de permettre une exploration génétique plus large de *L. bulgaricus*, le génome complet de la souche type ATCC 11842 a été séquencé en collaboration avec le Génoscope. Toutes ces données de génomique et de post-génomique nous conduiront à une meilleure compréhension de la physiologie de *L. bulgaricus* et notamment de son adaptabilité environnementale.

Lactobacillus bulgaricus / stress acide / protéome / séquence génomique

* Auteur correspondant : maguin@jouy.inra.fr

1. INTRODUCTION

Les bactéries lactiques jouent un rôle majeur dans l'industrie alimentaire et particulièrement dans l'industrie laitière. En France, la consommation de yaourts et autres laits fermentés est proche de 29 kg par personne et par an (http://www.data.lait.com/fr/ultra_frais/marche.asp). *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* est une bactérie lactique homofermentaire utilisée en co-culture avec *Streptococcus thermophilus* pour la production de yaourts. Outre sa fonction d'acidification du lait par fermentation du lactose en acide lactique, *L. bulgaricus* participe également à l'élaboration des qualités organoleptiques, hygiéniques et probiotiques du produit [12].

Au cours des processus de production du ferment, de fermentation du lait et après l'ingestion des produits fermentés, *L. bulgaricus* est soumis à une variété de stress. L'acidité est un des stress rencontrés par la bactérie aussi bien dans les yaourts (pH 4,3 à 4,5) que dans l'estomac (pH 1,5 à 2) [3]. Le pH optimal de croissance de *L. bulgaricus* est d'environ 6, alors que le pH limite de croissance se situe entre 4,2 et 3,8 suivant les souches et le milieu de culture [10]. L'acidification croissante du milieu, entraînée par la production d'acide lactique, impose donc à la bactérie d'exprimer des mécanismes d'adaptation qui lui permettent de poursuivre sa croissance jusqu'à un pH inhibiteur, puis d'y survivre. Cependant, les mécanismes permettant de résister aux différents stress, et en particulier aux bas pH, sont peu connus chez *L. bulgaricus*.

L'un de nos objectifs est d'étudier les mécanismes responsables de la résistance au stress acide chez *L. bulgaricus*. Nous avons montré une variabilité de la capacité de résistance à un bas pH de différentes souches de *L. bulgaricus*. La caractérisation des protéines induites lors de l'adaptation à l'acidité par électrophorèse bidimensionnelle a été entreprise. Nous avons également débuté un programme de génomique de *L. bulgaricus* qui nous fournira les données génétiques nécessaires à la

compréhension de l'adaptation aux différents stress rencontrés par la bactérie.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches bactériennes de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* VI-1004, VI-1007, VI-1010, VI-1019 et VI-1020 (Rhodia Food, Aubervilliers, France et Danone Vitapole, Palaiseau, France) ont été utilisées pour cette étude. Pour chaque expérience, les cultures ont été réalisées en milieu chimiquement défini MPL [2] et incubées à 42 °C. Par dilutions successives, les cultures ont été maintenues en phase de croissance exponentielle précoce ($DO_{600} < 0,3$) pendant au moins 16 h avant les expériences de stress afin d'éviter les modifications de tolérance aux stress liées à la phase stationnaire.

2.2. Test de survie au stress acide

Les cultures en phase exponentielle de croissance sont diluées à $DO_{600} = 0,08$ et cultivées dans 1,5 mL de milieu MPL à pH 6 pendant 1h30. Après centrifugation, les culots cellulaires sont repris dans 1 mL de milieu MPL à pH 3,6. La viabilité est mesurée par étalement sur boîtes de milieu MRS, immédiatement (T_0) et 30 min après le transfert à pH acide (T_{30}). Le taux de survie est égal au nombre d'unités formant des colonies (ufc) à T_{30} rapporté au nombre d'ufc à T_0 .

2.3. Électrophorèse bidimensionnelle

Le marquage et l'extraction des protéines totales, les conditions d'électrophorèse bidimensionnelle, l'analyse des gels et le séquençage de l'extrémité N-terminale des protéines ont été réalisés comme précédemment décrit [9].

2.4. Séquençage

Le génome de la souche de référence *L. bulgaricus* ATCC 11842 a été séquencé en

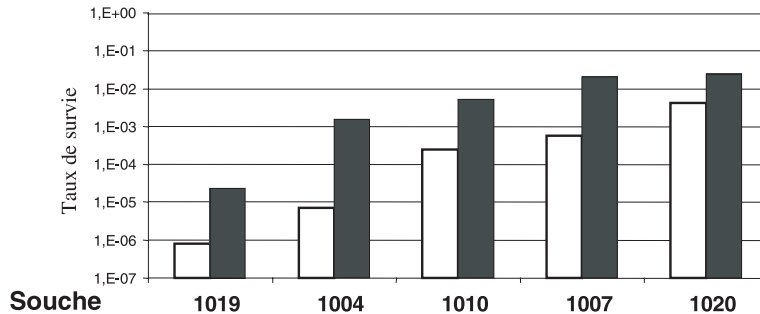


Figure 1. Tolérance et adaptation de différentes souches de *L. bulgaricus* à un choc acide. Les taux de survie ($\text{ufc à } T_{30 \text{ min}} / \text{ufc à } T_0$) au stress acide (30 min à pH 3,6) sont mesurés sur des cellules en phase de croissance exponentielle ($\text{OD}_{600} < 0,3$) non adaptées (rectangles blancs) ou adaptées pendant 30 min à pH 4,75 (rectangles noirs).

Figure 1. Acid stress tolerance and adaptation of several strains of *L. bulgaricus*. The survival rate ($\text{cfu at } T_{30 \text{ min}} / \text{cfu at } T_0$) of exponentially growing cells ($\text{OD}_{600} < 0,3$) exposed to acid stress (30 min at pH 3.6) was measured for non adapted cells (white bars) or adapted cells (black bars).

collaboration avec le Génoscope (V. Barbe, S. Oztas, S. Manganot, R. Eckenberg et J. Weissenbach) avec une approche par shot-gun.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Tolérance au stress acide de cinq souches de *L. bulgaricus*

Nous avons réalisé une étude comparative de la tolérance au stress acide de cinq souches de *L. bulgaricus*. Des cellules en croissance exponentielle en milieu MPL à 42 °C sont transférées de pH 6 à pH 3,6 pendant 30 min. Leur taux de survie à ce choc acide est alors mesuré (Fig. 1). Dans ces conditions, la souche VI-1020 est 5000 fois plus résistante à un choc acide que la souche VI-1019. Les souches VI-1004, VI-1010 et VI-1007 sont respectivement 10, 50 et 1500 fois plus résistantes à l'acidité que la souche VI-1019. Ces résultats montrent que la tolérance à l'acidité de *L. bulgaricus* est variable selon les souches.

3.2. Comparaison de la réponse adaptative au stress acide de cinq souches de *L. bulgaricus*

Chez plusieurs bactéries, l'exposition à un stress non léthal augmente la tolérance à un stress léthal et permet d'engendrer une réponse adaptative [1, 4, 8, 17]. Cette propriété est également trouvée pour au moins une souche de *L. bulgaricus* qui est capable de mieux survivre à un choc acide léthal si elle a été préalablement exposée à un stress acide modéré [9]. Nous avons comparé la capacité d'adaptation au stress acide des cinq souches de *L. bulgaricus*. Nous avons réalisé le test de survie précédemment décrit sur des cellules en phase de croissance exponentielle adaptées à pH 4,75 pendant 30 min (stress non léthal) puis soumises à un stress léthal à pH 3,6 pendant 30 min. Les bactéries adaptées sont, selon les souches, 5 à 200 fois plus tolérantes au stress acide que les bactéries non adaptées (Fig. 1).

Ces résultats montrent qu'il existe une grande variabilité entre les souches de

L. bulgaricus au niveau de la tolérance à un stress acide. Cependant, toutes ces souches sont capables de mettre en place une réponse adaptative à un stress modéré qui augmente sensiblement leur survie en condition de stress.

3.3. Analyse des protéines induites pendant l'adaptation à l'acidité par électrophorèse bidimensionnelle

Pour obtenir une vision globale des protéines induites pendant l'adaptation à l'acidité chez *L. bulgaricus*, nous avons entrepris une étude protéomique de l'une des cinq souches, VI-1010. Nous avons comparé les profils d'expression des protéines synthétisées à pH 6 (référence) et à pH 4,75 (adaptation).

Le marquage des protéines a été réalisé en milieu chimiquement défini (MPL) [2] contenant de la méthionine [³⁵S] [9]. Trois expériences indépendantes de marquage ont été réalisées et après préparation des extraits protéiques, plusieurs gels 2-D ont été analysés. Afin de repérer les protéines synthétisées lors de l'adaptation, le marquage a été réalisé pendant 15 min après différents temps d'adaptation à pH 4,75. La comparaison des quantités moyennes de protéines synthétisées à pH 6 et jusqu'à 45 min à pH 4,75 montre une synthèse significativement augmentée, d'un facteur supérieur à 2, pour environ 50 protéines (données non montrées).

3.4. Identification des protéines induites pendant l'adaptation à l'acidité par séquençage des acides aminés N-terminaux

Afin d'identifier les protéines induites pendant l'adaptation à pH 4,75, des gels bidimensionnels préparatifs ont été réalisés. Après transfert sur membrane, la séquence peptidique des extrémités N-terminales des protéines a été déterminée par micro-séquençage [16]. Parmi les 50 protéines induites en condition d'adaptation, 21 ont été potentiellement identifiées par séquen-

çage N-terminal. Une fonction leur a été attribuée sur la base d'homologie de séquences avec les protéines déjà connues. Ces protéines peuvent être regroupées en plusieurs catégories fonctionnelles :

- Trois protéines sont fortement induites en condition d'adaptation: GroES, GroEL et DnaK. Ces trois protéines appartiennent à la famille des protéines chaperonnes induites par le choc thermique (HSP) qui sont impliquées dans le repliement et/ou l'adressage aux protéases de protéines dénaturées [9, 20]. L'induction des HSPs en réponse à des conditions de stress variées, notamment le stress acide, a également été décrite chez d'autres bactéries à Gram positif comme *Lactococcus lactis* [6, 7], *Bacillus subtilis* [15] et *Listeria monocytogenes* [5].

- Nous avons observé qu'une des sous-unités de l'ATPase F₀F₁ était surexprimée lors de l'adaptation à l'acidité. Ce complexe protéique expulse les protons hors de la cellule en hydrolysant l'ATP. Son rôle essentiel dans la résistance au stress acide a déjà été établi chez plusieurs bactéries lactiques [13, 14, 19].

- Plusieurs protéines appartenant au métabolisme général sont induites pendant l'adaptation à l'acidité : trois protéines sont impliquées dans le métabolisme carboné dont la 1-phosphofructokinase qui convertit le fructose-1-phosphate en fructose-1,6-bisphosphate. Dix protéines jouent un rôle dans le métabolisme azoté. Parmi elles, la dihydrodipicolinate synthase est induite d'un facteur 10 environ en condition d'adaptation et participe à la biosynthèse de la lysine. Enfin, quatre protéines interviennent dans le métabolisme de l'enveloppe cellulaire. C'est le cas de l'alanine racémase qui participe à la biosynthèse de la paroi cellulaire.

Cependant, plus de la moitié des protéines induites en condition d'adaptation n'ont pas pu être identifiées sur la base des séquences N-terminales en particulier à cause du peu de données génomiques de *L. bulgaricus*.

3.5. Projet de séquençage de *L. bulgaricus*

Le séquençage du génome complet de la souche de référence de *L. bulgaricus* ATCC 11842 a été entrepris en collaboration avec le Génoscope. La séquence génomique a été obtenue en utilisant une stratégie de séquençage par shot-gun suivie de PCRs longue portée (Long range PCR) et de PCR combinatoires (Multiplex PCR [18]). *L. bulgaricus* possède un génome de taille 1,84 Mb et un contenu en GC de 49,8 %. L'analyse du GC skew [(G-C)/(G+C)] [11] donne un profil typique des chromosomes circulaires et permet de positionner une origine de réplication, *oriC*, associée à *dnaA* codant une protéine d'initiation de la réplication, ainsi que le terminus potentiel de réplication.

Chez *B. subtilis* et *Escherichia coli*, l'expression de nombreux gènes impliqués dans la tolérance aux stress est gouvernée par un facteur sigma alternatif (σ^B chez *B. subtilis* et σ^S chez *E. coli*). Aucun orthologue d'un tel facteur sigma n'a pu être identifié chez *L. bulgaricus*. C'est également le cas pour les Streptocoques et Enterocoques dont les génomes ont été séquencés. Ces observations soulèvent d'intéressantes questions quant à la régulation des réponses aux stress chez *L. bulgaricus* et chez les bactéries lactiques.

Les données de séquence nous seront très utiles pour la caractérisation des protéines de stress visibles sur les gels bidimensionnels. Une analyse préliminaire de 40 spots d'intensité variable sur le gel de référence à pH 6, nous a permis d'identifier 36 protéines en couplant la spectrométrie de masse aux données de séquence. Cette forte proportion d'identification nous laisse espérer une détermination rapide de l'ensemble des protéines d'adaptation à pH acide.

4. CONCLUSION

Les données acquises par les différentes approches, qui vont de la génomique à la

post-génomique en passant par le développement et l'utilisation d'outils génétiques, devraient permettre d'acquérir rapidement une meilleure connaissance de la physiologie de *L. bulgaricus*, et notamment de son comportement en réponse aux stress environnementaux. Elles fourniront également une base génétique pour évaluer la biodiversité au sein de l'espèce afin de mieux déterminer le potentiel des souches.

Remerciements: Nous remercions S. Bouddebouze pour son aide technique dans l'élaboration des gels d'électrophorèse bidimensionnelle, C. Chervaux et T. Smokvina pour leur intérêt pour ce travail. Ce travail a reçu le soutien financier de Danone Vitapole (E.-M. Lim, C. Grimaldi, et S. Penaud) et de Rhodia Food (E.-M. Lim).

RÉFÉRENCES

- [1] Belli W.A., Marquis R.E., Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture, Appl. Environ. Microbiol. 57 (1991) 1134–1138.
- [2] Chervaux C., Ehrlich S.D., Maguin E., Physiological study of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains in a novel chemically defined medium, Appl. Environ. Microbiol. 66 (2000) 5306–5311.
- [3] Conway P.L., Gorbach S.L., Goldin B.R., Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells, J. Dairy Sci. 70 (1987) 1–12.
- [4] Flahaut S., Hartke A., Giard J.C., Benachour A., Boutibonnes P., Auffray Y., Relationship between stress response toward bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*, FEMS Microbiol. Lett. 138 (1996) 49–54.
- [5] Hanawa T., Yamamoto T., Kamiya S., *Listeria monocytogenes* can grow in macrophages without the aid of proteins induced by environmental stresses, Infect. Immun. 63 (1995) 4595–4599.
- [6] Hartke A., Frere J., Boutibonnes P., Auffray Y., Differential induction of the chaperonin GroEL and the Co-chaperonin GroES by heat, acid, and UV-irradiation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, Curr. Microbiol. 34 (1997) 23–26.

- [7] Kilstrup M., Jacobsen S., Hammer K., Vogensen F.K., Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 1826–1837.
- [8] Kim W.S., Perl L., Park J.H., Tandianus J.E., Dunn N.W., Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Curr. Microbiol.* 43 (2001) 346–350.
- [9] Lim E.M., Ehrlich S.D., Maguin E., Identification of stress-inducible proteins in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Electrophoresis* 21 (2000) 2557–2561.
- [10] Lim E.M., Lafon A., Dridi L., Boudebouze S., Ehrlich D., Maguin E., Identification de protéines de stress chez *Lactobacillus bulgaricus* par électrophorèse bidimensionnelle, *Lait* 81 (2001) 317–325.
- [11] Lobry J.R., Asymmetric substitution patterns in the two DNA strands of bacteria, *Mol. Biol. Evol.* 13 (1996) 660–665.
- [12] Loones A., Lait fermentés par les bactéries lactiques, in: de Roissart H., Luquet F.M. (Eds.), *Bactéries lactiques*, Lorica, Uriage, France, 1994, pp. 135–154.
- [13] Nannen N.L., Hutkins R.W., Proton-translocation adenosine triphosphatase activity in lactic acid bacteria, *J. Dairy Sci.* 74 (1991) 747–751.
- [14] O’Sullivan E., Condon S., Relationship between acid tolerance, cytoplasmic pH, and ATP and H⁺-ATPase levels in chemostat cultures of *Lactococcus lactis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 2287–2293.
- [15] Petersohn A., Brigulla M., Haas S., Hoheisel J.D., Volker U., Hecker M., Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 5617–5631.
- [16] Ploug M., Jensen A.L., Barkholt V., Determination of amino acid compositions and NH₂-terminal sequences of peptides electroblotted onto PVDF membranes from tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: application to peptide mapping of human complement component C3, *Anal. Biochem.* 181 (1989) 33–39.
- [17] Rallu F., Gruss A., Maguin E., *Lactococcus lactis* and stress, *Antonie Van Leeuwenhoek* 70 (1996) 243–251.
- [18] Sorokin A., Lapidus A., Capuano V., Galleron N., Pujic P., Ehrlich S.D., A new approach using multiplex long accurate PCR and yeast artificial chromosomes for bacterial chromosome mapping and sequencing, *Genome Res.* 6 (1996) 448–453.
- [19] Yokota A., Amachi S., Ishii S., Tomita F., Acid sensitivity of a mutant of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2 with reduced membrane bound ATPase activity, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59 (1995) 2004–2007.
- [20] Yura T., Nagai H., Mori H., Regulation of the heat-shock response in bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.* 47 (1993) 321–350.