



HAL
open science

Du génome à l'application

Pierre P. Renault, Sébastien Calero, Christine Delorme, Sophie Drouault,
Nathalie Goupil-Feuillerat, Eric Guédon, S. Dusko Ehrlich

► **To cite this version:**

Pierre P. Renault, Sébastien Calero, Christine Delorme, Sophie Drouault, Nathalie Goupil-Feuillerat, et al.. Du génome à l'application. *Le Lait*, 1998, 78 (1), pp.39-52. hal-00929583

HAL Id: hal-00929583

<https://hal.science/hal-00929583>

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.

Du génome à l'application

Pierre Renault*, Sébastien Calero, Christine Delorme,
Sophie Drouault, Nathalie Goupil-Feuillerat, Eric Guédon,
S. Dusko Ehrlich

Laboratoire de génétique microbienne, Inra, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France

Abstract — From genome to industrial application. The possibility to use modified microorganisms constructed by genetic engineering for food production in the next future will radically change our approach to optimize processes and improve the quality of the corresponding products. The research holding on this domain should allow the construction of strains more resistant to phage attack, producing new molecules (e.g. beneficial for health) or modified for their metabolism (growth, production of metabolites, resistance to stress, etc). The construction of such strains can be achieved by genetic engineering, either by modifying a pathway, or by expressing new genes. The engineering of known pathways allowed the development of new process and some of them are technically ready to be applied in the industry. For example, the expression of the anabolic acetolactate synthase, the inactivation of the LDH or of the acetolactate decarboxylase lead to the redirection of pyruvate to diacetyl instead of lactate. This might lead to a 10-fold increase in diacetyl production, and there are still some possibilities of improvement. Another project of metabolic engineering that is quite advanced, is the modification of proteolysis in *Lactococcus lactis*, including the degradation of casein, peptides and amino acids. Most genes involved in the assimilation of proteins have been characterized (cell-wall protease, peptides transporters, and peptidases). Isogenic strains with different level of peptidase activities are built in order to improve peptidolysis or change the pattern of its product. In addition to the modification of already existing pathways, the introduction of new pathways in a cell could brighten the metabolic possibilities of bacteria and lead to the construction of new strains, producing new aroma for example. Building a new pathway generally requires the expression of heterologous genes. However, the certitude that a gene is absent supposes that there is an exhaustive knowledge of the bacterial genome, as some genes may be cryptic or uninduced under the conditions tested in the laboratory. Although the important progresses in the research related to lactic acid bacteria in the last years, only few pathways have been well characterized, covering, in terms of genetic information, a small percentage of the real metabolic possibilities. The size of the chromosome of most lactic acid bacteria is usually 1.8–3.4 Mb, about the half of the one of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and of some soil bacteria which have broad metabolic possibilities. On the other side, it is 4–5 fold the size of the smallest known genome, suggesting that the metabolic potentialities of lactic acid bacteria are underestimated. An investigation of data present in databases

* Correspondance et tirés à part.

shows that only 6% of the genome of *L. lactis* are available. These data cover genes involved in amino acids and base biosynthesis (33%), degradation of peptides (17%), carbon catabolism (16%), stress responses (13%) and the remaining genes are related to the cell machinery (ribosome, replication, secretion, etc). The real potentialities of these bacteria remain to be estimated and exploited. © Inra/Elsevier, Paris.

metabolic engineering / lactic acid bacteria / *Lactococcus lactis* / food security / genetic modification

Résumé — La possibilité d'utiliser prochainement des micro-organismes perfectionnés par des modifications génétiques construites in vitro changera profondément les approches d'amélioration des procédés et des produits qui en découlent. Les recherches actuelles dans le domaine des bactéries lactiques devraient permettre de créer des souches plus résistantes aux phages, productrices de molécules nouvelles (à effet santé par exemple) ou bien modifiées pour leur métabolisme (croissance, production de métabolites, résistance aux stress...). L'ingénierie métabolique permet de construire ce type de souches, soit en modifiant des voies préexistantes, soit en introduisant l'ensemble des gènes nécessaire à l'expression de nouvelles voies. La modification de voies connues a permis de développer des procédés dont certains sont techniquement prêts à être appliqués au niveau industriel comme des souches qui surproduisent environ 10 fois le diacétyle. Un autre projet d'ingénierie métabolique très avancé vise à modifier la protéolyse, depuis la dégradation de la caséine jusqu'à la libération de peptides non utilisés et d'acides aminés, dont certains seraient impliqués dans la génération de composés aromatiques. Au-delà de la modification de voies préexistantes, l'introduction de nouvelles voies dans la cellule pourrait élargir les possibilités de construire des souches ayant des propriétés particulières, comme la production de nouveaux arômes. Il est en général admis que l'introduction d'une nouvelle voie nécessite l'expression de gènes étrangers à l'espèce dans l'hôte. Ce postulat suppose cependant une connaissance exhaustive des capacités métaboliques des bactéries. Malgré le travail considérable réalisé ces dernières années sur les bactéries lactiques, seules quelques voies métaboliques sont connues. Elles ne représentent, en terme d'information génétique, qu'une fraction minime des capacités potentielles de ces bactéries. Le chromosome des bactéries lactiques a une taille de 1,8 à 3,4 Mb, c'est-à-dire environ la moitié de celui de quelques bactéries du sol aux capacités métaboliques « étendues » et quatre à cinq fois la taille du plus petit génome bactérien connu. Un recensement récent de nos connaissances génétiques chez les lactocoques montre que seulement 6 % des informations ont été décryptées. Les potentialités réelles de ces bactéries restent donc à être estimées... et exploitées. © Inra/Elsevier, Paris.

ingénierie métabolique / bactérie lactique / *Lactococcus lactis* / sécurité alimentaire / modification génétique

1. INTRODUCTION

Les techniques de la biologie moléculaire ont fait des progrès impressionnants ces dernières années, avec le développement de méthodes in vitro (techniques de modification des gènes, kits de détection de plus en plus sophistiqués, PCR...) et in vivo (transferts de gènes). La puissance de ces techniques est prolongée par des outils d'analyses basés sur l'informatique

toujours plus sophistiqués. Ceux-ci permettent de modéliser de plus en plus précisément les effets des modifications possibles sur les être vivant par des prédictions structure/fonction des protéines, par la modélisation des flux métaboliques... À terme, les changements réalisables sur le vivant ne semblent plus limités que par l'acquisition des toutes les connaissances qui lui sont relative. La percée spectaculaire des techniques d'automatisation du

séquençage devrait mettre à notre portée la connaissance complète des informations contenues dans les génomes. Ainsi, au moins 16 génomes bactériens et celui d'un eucaryote inférieur ont été entièrement séquencés. Plus de 30 autres génomes bactériens, 8 d'eucaryote inférieur et 7 d'eucaryote supérieurs sont en cours de réalisation. L'exploitation de toutes ces informations nous fournira sans doute une nouvelle vision du vivant et entraînera le développement de nouveaux concepts de travail. Dans cette revue, nous allons faire un point, non exhaustif, des techniques disponibles pour l'étude du génome des bactéries lactiques. Nous donnerons quelques exemples de modifications qu'elles ont déjà permis de réaliser dans le but d'améliorer les souches industrielles. Enfin, nous présenterons les perspectives attendues d'une connaissance plus approfondie de leurs génomes.

2. LES STRATÉGIES D'INGÉNIERIE MÉTABOLIQUE CHEZ LES BACTÉRIES LACTIQUES

2.1. Les outils d'ingénierie métabolique

L'effort considérable de recherche sur la génétique des bactéries lactiques qui a été réalisé ces dix dernières années a permis de construire des outils très performants pour modifier le métabolisme de ces bactéries. Des techniques de transfert efficaces (transformation, conjugaison) sont maintenant disponibles pour la plupart des espèces [15, 30]. De nombreux vecteurs répliatifs et intégratifs ont été construits [29, 35]. Certains d'entre eux sont issus de réplicons et de marqueurs isolés chez les bactéries lactiques et pourrait donc être utiliser dans des souches destinées à la production de denrées consommables. Enfin, un système d'intégration chromosomique est disponible et permet d'échanger des allèles sans laisser d'autres traces que les modifications vou-

lues [4]. Les constructions ainsi obtenues sont stables et peu transférables à d'autres organismes, ce qui facilitera leur habilitation.

En plus des outils nécessaires à l'introduction de matériel génétique, il existe maintenant une panoplie de signaux d'expression permettant de produire des protéines à différents niveaux et éventuellement sous contrôle de facteurs environnementaux [26, 27]. Il devient donc possible d'inactiver certaines fonctions, d'en renforcer d'autres ou bien même d'en introduire de nouvelles.

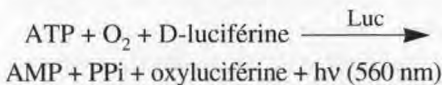
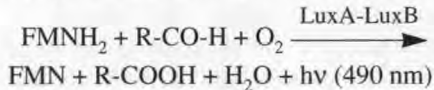
2.2. Suivre l'activité bactérienne de la production du levain au tractus digestif du consommateur

Les outils décrits ci dessus ont été mis au point sur des souches et des milieux de laboratoire, et bien peu d'études ont été réalisées pour vérifier si ces travaux pouvaient être transférés efficacement dans un contexte industriel. Par exemple, la production d'une protéine grâce à une construction génétique utilisant un nouveau promoteur pourrait s'avérer différente selon les souches. De plus, on ne connaît pas la fonctionnalité des systèmes optimisés en milieu de laboratoire dans les milieux réels d'utilisation des bactéries comme le lait dans le cadre de l'industrie laitière, ou le tractus digestif dans le cadre des nourritures fonctionnelles.

De manière générale, le niveau d'expression d'un gène peut avoir un impact important sur la qualité d'un produit fermenté lorsqu'il contrôle une voie métabolique importante dans le procédé de fabrication. La connaissance de ce niveau a donc un intérêt pour orienter le choix des souches. Pour être significative, cette mesure doit être réalisée dans le milieu de fermentation industriel. Or, jusqu'à présent, il n'existait pas d'outil commode pour évaluer ce niveau, en particulier dans

des milieux complexes comme le lait. Pour répondre à ce problème, nous avons développé des outils basés sur l'utilisation de gènes rapporteurs codant pour des luciférasas. Ceux-ci permettent de détecter avec une grande sensibilité l'activité de promoteurs dans des milieux opaques comme le lait ou le tractus digestif (Corthier et al., communication personnelle, 1998 ; [13, 35]). En effet, l'un des paramètres principaux déterminant l'expression d'un gène est l'activité de son promoteur.

Différentes architectures d'enzymes catalysant des réactions bioluminescentes ont été décrites [24]. Ces enzymes oxydent en général un substrat, ce qui s'accompagne de l'excitation d'un complexe émetteur de lumière. Nous avons développé des systèmes de gènes rapporteurs basés sur deux types d'enzymes luminescents, l'un issu de la bactérie *Vibrio harveyi* (LuxA-LuxB) et l'autre de la luciole (*Luc*). Ces réactions fonctionnent avec des substrats différents selon les équations suivantes :



La mesure de la lumière émise par ces enzymes peut se faire directement grâce à un luminomètre avec des cellules vivantes, donc sans extraction préalable. En effet les substrats (nonaldéhyde et luciférine) diffusent à travers les membranes. Le FMNH₂ ou l'ATP requis pour chacune des réactions est apporté par les cellules énergétiquement actives.

Ces deux types de luciférasas peuvent être utilisés comme gène rapporteur chez les bactéries lactiques. Le dosage de l'activité de cet enzyme est très sensible et les bactéries lactiques n'émettent pas de bioluminescence naturellement. Ainsi les gènes *luxAB* et *luc* permettent de mesurer

l'activité de promoteurs peu actifs, et surtout de mesurer des activités à des densités cellulaires faibles. Pour valider l'intérêt d'utiliser ces gènes, nous avons réalisé de nombreuses constructions qui ont été testées, dans des milieux comme le lait et le tractus digestif ([13], Corthier et al, communication personnelle). Dans tous les cas, nous avons pu détecter l'activité des luciférasas, ce qui confirme que ces rapporteurs sont adaptés à l'étude des écosystèmes complexes.

Un exemple de travail fondé sur l'utilisation de ces systèmes est présenté dans ce volume [13]. Sous contrôle de différents promoteurs répondant à la concentration en acides aminés, l'expression de ces deux luciférasas a permis de détecter des carences dans le milieu au cours de la croissance. Ces mesures ont été réalisées en culture pure mais aussi spécifiquement sur une souche poussant en association avec d'autres bactéries, ce qu'aucune méthode ne permettait jusqu'à présent. Étant donné la différence de réaction chimique des deux systèmes, ceux-ci peuvent être mesurés dans les mêmes cultures indépendamment l'un de l'autre, étendant ainsi nos possibilités d'investigations. Ainsi, un système à deux gènes rapporteurs a été mis au point et permet de suivre plusieurs paramètres (promoteurs, souches) dans des cultures mixtes.

2.3. Mesurer la variabilité de l'expression en fonction des souches

Au sein d'une même espèce, il existe une grande diversité de souches. Leur comportement peut différer significativement, ce qui peut provenir par exemple d'une différence de leur équipement enzymatique ou du niveau d'expression de ses composants. Il est donc important de connaître cette donnée pour les gènes codant pour des fonctions intéressantes.

Or en général les études d'expression de gènes ont été restreintes à un petit nombre de souches bien transformables. De plus, ces études sont souvent réalisées avec des plasmides facilement manipulables, bien que les promoteurs chromosomiques soient souvent régulés différemment

lorsqu'ils sont présents sur ces vecteurs. Nous avons donc construit des vecteurs intégratifs, qui permettent d'étudier la transcription de promoteurs caractérisés et peuvent se transférer aisément dans un grand nombre de souches de *L. lactis* (figure 1).

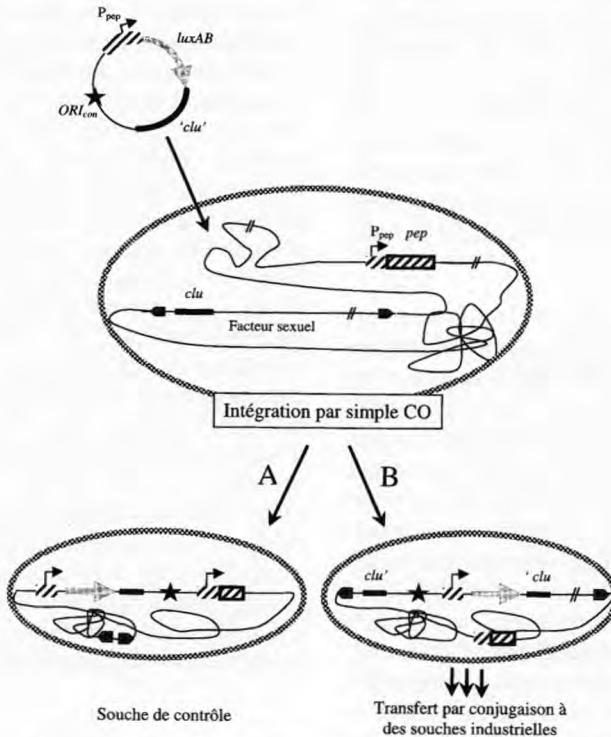


Figure 1. Un outil adapté à l'étude de la transcription de collections de souches industrielles de lactocoques. Le vecteur contenant une fusion entre le promoteur à étudier (ici P_{pep}) et le gène codant pour la luciférase bactérienne (*luxAB*, flèche grise) peut s'intégrer par recombinaison homologue dans le chromosome d'une souche de laboratoire en deux endroits : (A) celui correspondant au gène qu'il transcrit habituellement, et (B) dans le gène *cluA* du facteur sexuel (trait gras). Dans le premier cas, la mesure de l'activité permet de contrôler la validité de la construction, et dans le deuxième, il est possible de transférer à haute fréquence le facteur sexuel maintenant porteur de la construction à étudier. Ce transfert se fait à haute fréquence par conjugaison dans toutes les souches de *L. lactis*. L'étoile dans le vecteur symbolise la présence d'une origine de répliation conditionnelle qui facilite son intégration dans le chromosome.

Figure 1. Versatile tool to study gene transcription in collections of industrial lactococcal strains. The vector carrying a transcriptional fusion between the promoter under study (P_{pep}) and the *luxAB* genes encoding the bacterial luciferase (gray arrow) can be integrated by homologous recombination into two loci in the chromosome of a laboratory strain: (A) in front of the gene it uses to transcribe in the cell, and (B) in the *cluA* gene of the sex factor (black box). In the first case, the measure of the luminescence allows to check the fusion. In the second case, the construction can be easily transferred to any lactococcal strain by conjugation at high frequency. The star in the vector represent a conditional origin of replication facilitating the integration in the chromosome.

Ces vecteurs sont constitués d'une origine de répllication inactivée après intégration, d'un marqueur antibiotique et d'une partie du gène *cluA* [17]. Ce fragment permet au plasmide de s'intégrer par recombinaison homologue dans un facteur sexuel. Celui-ci est un élément conjugatif de 50 kb présent sous forme intégrée dans le chromosome. Il peut s'autotransférer par conjugaison à haute fréquence dans les bactéries de l'espèce *L. lactis* [18]. Les constructions portées par ces vecteurs, une fois intégrées dans le facteur sexuel au niveau du gène *cluA* dans une souche de laboratoire, peuvent être transférées dans de nombreuses souches de *L. lactis* par conjugaison.

Deux types de vecteurs ont été construits. Le premier contient un site multiple de clonage (SMC) en amont des gènes de la luciférase. Il permet de réaliser des études de transcription des promoteurs clonés dans le SMC. Le second contient un promoteur inductible en amont d'un SMC. Ce promoteur, régulé par le malate, permet une expression contrôlée de gènes clonés dans le SMC. Ces vecteurs constituent les premiers éléments d'un outil génétique adapté à l'étude de la variabilité de l'expression génétique des lactocoques et à l'étude de l'effet de l'expression d'un gène dans un grand nombre de souches.

Le développement de ces outils devrait donc permettre d'étendre des études jusqu'ici confinées à des souches très particulières, mieux adaptées à la vie en laboratoire qu'aux milieux dans lesquels elles ont un intérêt réel. Il est probable que ces outils évoluent encore pour remplir d'autres fonctions, comme par exemple permettre des essais suivis de dégustation. Pour cela, il faudra éliminer tous les fragments d'ADN non souhaitable pour obtenir un agrément pour leur consommation [40].

3. LES PREMIERS EXEMPLES D'INGÉNIERIE MÉTABOLIQUE CHEZ LES BACTÉRIES LACTIQUES

Nous avons vu précédemment qu'il était possible de changer par ingénierie métabolique l'expression d'enzymes de façon contrôlée. L'effet de ce type de modification est de modifier des voies de synthèses ou de dégradations et ainsi d'augmenter ou de supprimer la production de métabolites existants ou au contraire d'en produire de nouveaux. Cette technologie offre de nombreuses perspectives d'amélioration des procédés, pour peu que l'on ait une connaissance approfondie de la physiologie et de la génétique du micro-organisme considéré. Chez les bactéries lactiques, de nombreux gènes impliqués dans l'utilisation du lactose, dans la dégradation et l'assimilation des protéines du lait, dans la production d'arôme, de polysaccharides exocellulaires et de bactériocines ont été caractérisés. Dans quelques années, il est donc probable que des bactéries lactiques avec de nouvelles propriétés protéolytiques, ou bien productrices de nouvelles molécules à activité antimicrobienne, d'agents texturants ou aromatiques seront disponibles.

3.1. La redirection des flux carbonés

L'une des particularités les plus marquantes du métabolisme des bactéries lactiques concerne l'utilisation du carbone. Celui-ci est transformé principalement en lactate après la glycolyse, au lieu d'entrer dans le cycle de Krebs où, chez d'autres bactéries, il permet une récupération d'énergie supplémentaire. Il en résulte que ces bactéries sont très dépendantes des sucres comme source d'énergie, et qu'elles acidifient très rapidement le milieu, en raison de la transformation des sucres en acides. De plus, de nombreuses voies de synthèse se branchent à partir de diffé-

rents intermédiaires de la glycolyse. Certaines voies concernent des fonctions essentielles pour la cellule comme la construction de la paroi, d'autres ont une importance pour leur survie comme la synthèse de glycogène ; et enfin certaines voies ont un intérêt appliqué particulier comme la synthèse de polysaccharides, ou d'acides organiques, d'alcools... La modification des flux carbonés pourrait donc offrir de nombreuses perspectives appliquées.

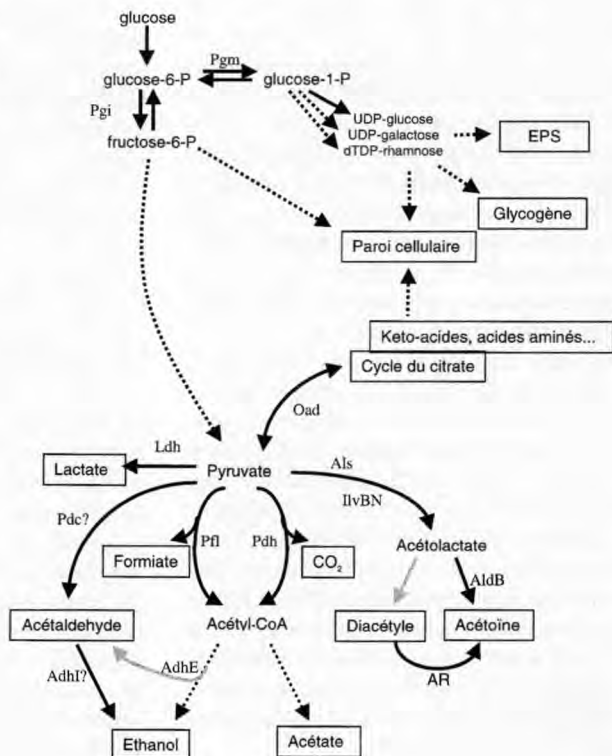
Les travaux les plus avancés dans ce domaine concernent le devenir du pyruvate. En effet, bien que décrit comme homofermentaire, *Lactococcus lactis* est capable de produire à partir de ce métabolite d'autres composés que le lactate comme le formate, le CO_2 , l'acétate, l'acé-

toïne et le 2-3 butanediol [5]. Pour une souche donnée, la distribution de ces produits dépend des conditions de croissance, en particulier des sources de carbone et de la présence d'oxygène. Certains intermédiaires de ces voies sont des précurseurs de composés aromatiques comme des aldéhydes, des alcools, des esters... Pour un de ces composés, le diacétyle, plusieurs stratégies d'ingénierie métabolique ont été mises en œuvre pour construire des souches surproductrices. Cet arôme recherché dans certains produits laitiers est fabriqué en deux étapes (*figure 2*). La première est une étape enzymatique où deux molécules de pyruvate sont transformées en acétolactate (AL), et la seconde est la décarboxylation oxydative chimique de l'AL en diacétyle. Mais

Figure 2. Métabolisme du carbone chez *Lactococcus lactis*. Les flèches en pointillé noir signifient que plusieurs étapes enzymatiques sont nécessaires, et celles en gris que l'étape n'est pas enzymatique.

Figure 2. Carbon metabolism in *Lactococcus lactis*. Dotted black arrows are steps where several enzymatic reactions occur, and in gray the non-enzymatic steps.

Ab, AldB, α -acétolactate decarboxylase; Als, catabolic α -acétolactate synthase; AR, diacetyl/acetoin reductase; IlvBN, anabolic α -aceto-hydroxy acid synthase; Ldh, lactate dehydrogenase; Oad, Oxaloacetate decarboxylase; Pdc?, putative pyruvate decarboxylase; Pfl, pyruvate formate lyase; AdhE, AdhE and I?, alcohols dehydrogenase E and I (potential); Pdh, pyruvate dehydrogenase complex; Pfl, pyruvate formate lyase; Pgi, Phosphoglucose isomerase; Pgm, Phosphoglucose mutase.



l'AL est en fait le premier intermédiaire de la voie du 2-3 butanediol, voie où il est transformé enzymatiquement en acétoïne puis en 2-3 butanediol. Une première approche pour augmenter la production de diacétyle consiste à augmenter le flux du pyruvate vers la voie du 2-3 butanediol. Une seconde serait de réduire la conversion de l'AL en acétoïne. Pour réaliser ce travail, les gènes codant pour les différents enzymes impliqués dans ces voies métaboliques ont été caractérisés, et selon les cas, leur niveau d'expression a été augmenté ou réduit. Parmi ces gènes, se trouvent ceux codant pour la lactico-déshydrogénase (*ldh*), l'AL synthase (*alsS*), l'acide acéto-hydroxylique synthase (*ilvBN*) et l'AL décarboxylase (*aldB*).

L'inactivation du gène *ldh*, dont le produit est responsable de la production du lactate à partir du pyruvate, modifie radicalement les produits majeurs de la fermentation des sucres [1, 34]. Ainsi, la quasi-totalité du pyruvate est convertie en formate, CO₂, acétate et acétoïne. La distribution entre ces produits dépend des conditions de croissance, en particulier du type de sucre assimilé et de l'oxygénation, et il est ainsi possible de convertir plus de 50 % du sucre en acétoïne. L'augmentation spécifique du flux du pyruvate vers l'acétolactate peut aussi être stimulée par l'expression accrue d'*AlsS* et d'*IlvBN*. Cependant, une très forte expression de *AlsS* ne permet pas de réaliser cet objectif en anaérobiose et un peu en aérobie, probablement parce que l'AL synthase de *L. lactis* a une faible affinité pour le pyruvate [38]. En revanche, une faible expression du produit d'*ilvBN* permet une augmentation d'un facteur trois du flux vers l'AL [1]. Cependant, l'effet de l'inactivation de *ldh* ou de l'expression accrue d'*IlvBN* sur la production de diacétyle reste limité à cause de la conversion enzymatique très rapide de l'AL en acétoïne par l'AL décarboxylase.

Pour favoriser la transformation chimique de l'AL en diacétyle, qui est lente par rapport à sa conversion enzymatique, le gène *aldB* codant pour l'AL décarboxylase responsable de cette étape a été inactivé [19, 39]. Les souches ainsi obtenues accumulent l'AL dans le milieu. Il en résulte une augmentation de la production de diacétyle d'un facteur 10. Il faut noter que dans ce cas, il y a d'abord une forte production d'AL, puis que celui-ci est lentement dégradé en diacétyle. En même temps, on note l'apparition d'acétoïne, qui résulte probablement de la dégradation du diacétyle, qui est un composé instable. L'AL décarboxylase est un enzyme qui joue un rôle clé dans la synthèse du diacétyle. Son rôle dans le métabolisme de l'AL chez *L. lactis* est double du fait que l'AL est à la fois un produit du catabolisme du pyruvate, et un intermédiaire dans la biosynthèse des acides aminés branchés [20]. Dans ce dernier cas, l'AL décarboxylase permet de gérer le surplus d'AL produit au cours de la synthèse par ses propriétés allostériques [33]. Ce double rôle a permis de mettre au point une méthode rapide de criblage de mutants dépourvus d'activité AL décarboxylase dont l'utilisation directe dans la production d'aliments est possible, puisqu'ils n'ont subi aucune transformation par les techniques de biologie moléculaire [19]. L'effet de la surproduction et de l'inactivation d'enzymes interférant avec le métabolisme du pyruvate a permis d'obtenir des souches surproductrices de diacétyle au détriment du lactate et de l'acétoïne. Notons que certaines combinaisons pertinentes n'ont pas encore été réalisées, comme par exemple l'inactivation conjointe de la LDH et de l'AL décarboxylase. Dans les mutants LDH, d'autres enzymes utilisent efficacement le pyruvate et pourraient aussi être inactivés (figure 2). Ainsi l'inactivation supplémentaire de la pyruvate formiate lyase en anaérobiose ou du complexe pyruvate déshydrogénase en aérobie devrait per-

mettre d'obtenir des bactéries dont le flux de pyruvate serait dirigé majoritairement vers la synthèse d'AL. Enfin, bien que cet enzyme ne semble pas très actif chez *L. lactis*, l'inactivation de l'acétoïne/diacétyl réductase pourrait diminuer la perte de diacétyl due à sa conversion enzymatique en acétoïne [25]. L'inactivation de plusieurs gènes devrait en théorie permettre d'obtenir des souches de bactéries lactiques spécialisées dans la production de diacétyl. Il est cependant probable que certaines combinaisons conduisent à l'obtention de cellules peu ou pas viables.

Le même type de méthode pourrait être appliqué à d'autres étapes de la glycolyse. Par exemple, il a été proposé d'augmenter l'activité de la phosphoglucomutase pour détourner une partie plus importante du flux glycolytique vers la production d'exopolysaccharides [11]. Le contrôle de la synthèse de précurseur de la paroi pourrait aussi avoir des applications pour obtenir des cellules se lysant plus rapidement au cours de l'affinage. Une meilleure connaissance des possibilités métaboliques des bactéries lactiques devrait encore élargir les possibilités d'ingénierie métabolique autour de cette voie centrale dans le métabolisme.

3.2. La protéolyse : la nutrition azotée, le recyclage des protéines et l'affinage

Une deuxième particularité de nombreuses bactéries lactiques est leur incapacité à produire certains acides aminés dont elles ont besoin [9, 16]. De plus, même si elles sont capables de les synthétiser un à un, elles ont une croissance très ralentie dès qu'elles doivent en fabriquer plusieurs. De ce fait, la bonne croissance de ces bactéries dans le milieu lait est conditionnée par la présence de tout un système protéolytique. Celui-ci est composé en général d'une protéase extra-

cellulaire, qui est ensuite relayée par une batterie de peptidases qui clivent les peptides jusqu'à obtenir les acides aminés nécessaires à la vie de la cellule [28].

La dégradation des protéines du lait, et principalement des caséines, mène à la production d'acides aminés assimilés par la cellule, mais aussi à l'accumulation de certains acides aminés présents en excès et de peptides non pris en charge par le système peptidasique. Certains de ces peptides peuvent conférer un goût amer aux produits, et d'autres, bien que cela n'ait pas été montré, pourraient avoir un rôle plus positif. Il semble cependant que l'impact de la protéolyse sur la production d'arômes résulte principalement de la dégradation de certains acides aminés produits en excès [21]. Un important travail est réalisé actuellement dans différents laboratoires pour modifier les activités protéolytiques des bactéries lactiques. Le but de ces travaux est d'augmenter certaines voies de dégradation aux dépens d'autres, ce qui pourrait favoriser l'accumulation d'acides aminés dont la dégradation mène à la production de produits aromatiques.

Pour atteindre ce but, la plupart des peptidases de *L. lactis* et certaines autres bactéries lactiques ont été caractérisées aux niveaux biochimique et génétique. Ce travail a permis de proposer un schéma de dégradation des peptides chez *L. lactis* [28]. Ce modèle ne permet cependant pas de prédire le résultat que l'on peut escompter lors de la modification de l'activité d'un enzyme du système. Les travaux expérimentaux en cours devraient permettre de mieux comprendre le rôle de chacun de ces enzymes dans la nutrition azotée ou le recyclage des protéines dans la cellule. Il sera alors possible de modifier en connaissance de cause le niveau d'expression de certains enzymes, leur spectre d'action, ou encore d'introduire des enzymes nouveaux, pour obtenir des

souches adaptées à la production d'arômes spécifiques issus de la dégradation des peptides ou des acides aminés. Des cribles pourront aussi être conçus pour rechercher des souches naturelles ayant ce type de propriété. L'aptitude technologique de ces souches sera testée dans un second temps.

3.3. Les bactériophages : contrôle et utilisation

L'un des problèmes les plus graves rencontré lors des fermentations est la destruction des ferments par les bactériophages. La maîtrise des procédés étant souvent conditionnée par un profil précis d'acidification, même une attaque partielle peut avoir des conséquences sur la qualité du produit. La recherche de souches résistantes a permis d'isoler des mécanismes naturels. De plus les connaissances sur les phages des bactéries lactiques évoluent rapidement et plusieurs génomes ont été caractérisés [7, 37]. De nombreuses études sont en cours pour connaître les interactions entre les bactéries et leurs bactériophages [3, 12, 32]. À partir de ces données, il sera possible de comprendre le développement des phages et les stratégies que les bactéries ont élaborées pour leur résister. Ces mécanismes pourront alors être combinés de manière efficace à court et moyen terme. Cependant, les phages évoluant très rapidement, il sera nécessaire de suivre constamment leur évolution en laiterie, de manière à anticiper le développement à grande échelle de nouveaux phages contre lesquels nous serions démunis.

Un progrès très attendu des recherches sur le génome des phages serait la conception dans les laboratoires de mécanismes nouveaux. Ce saut technologique permettrait de s'affranchir partiellement du nombre de systèmes naturels qui est probablement limité aux phages « actuels »

et de répondre ainsi plus rapidement à l'évolution prévisible de ces parasites.

4. LA CONNAISSANCE DU GÉNOME, UN OUTIL INDISPENSABLE ?

4.1. Connaître pour modifier

Malgré les travaux de physiologie et de génétique considérables réalisés ces dernières années sur les bactéries lactiques, seules quelques voies métaboliques sont connues. Elles ne représentent, en terme d'information génétique, qu'une fraction minime des capacités potentielles de ces bactéries. En effet, l'absence d'une activité enzymatique selon des méthodes biochimiques ne permet pas de conclure à l'absence du gène correspondant. La présence ou non d'une activité dépend de facteurs environnementaux qui ne sont pas forcément connus par l'expérimentateur. Par exemple, il a longtemps été supposé que les bactéries lactiques du lait telles que les lactocoques ne possédaient pas les gènes leur permettant de réaliser la synthèse de nombreux acides aminés et vitamines, ou de cataboliser certains sucres. L'étude d'isolats de ces espèces issus d'autres biotopes a permis de caractériser l'information génétique correspondant à ces voies, et de la retrouver dans les souches isolées du lait [9, 16].

Le chromosome des bactéries lactiques a une taille de 1,8 à 3,4 Mb [8], c'est-à-dire environ la moitié de celui de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et de quelques bactéries du sol aux capacités métaboliques « étendues ». De manière plus optimiste, cela représente quatre à cinq fois la taille du plus petit génome bactérien connu, ce qui laisse penser que les capacités métaboliques des bactéries lactiques sont sous-estimées. Un recensement récent de nos connaissances génétiques chez les lactocoques montre que seulement 6 % des informations ont été décryptées. Ces

données concernent des gènes impliqués dans la biosynthèse d'acides aminés et de bases (33 %), dans la dégradation des peptides (17 %), dans le catabolisme du carbone (16 %), dans la réponse à des stress (13 %), et le reste dans les fonctions cellulaires de base (ribosomes, réplication, sécrétion...). Les potentialités réelles de ces bactéries restent donc à être estimées et exploitées.

Les quelques exemples présentés précédemment montrent qu'avec une connaissance partielle du génome, nombre d'applications peuvent être conçues. La connaissance de l'ensemble des gènes d'un micro-organisme devrait encore faciliter le travail d'ingénierie métabolique. La première retombée d'un séquençage génomique est l'identification par leur homologie de gènes de plus en plus nombreux grâce aux connaissances acquises chez d'autres organismes. Ces gènes peuvent être impliqués dans le métabolisme ou la régulation de diverses fonctions cellulaires. Pour reprendre l'exemple du métabolisme carboné présenté plus haut, un sondage du génome d'une bactérie lactique par recherche d'homologie avec des protéines connues permettrait de caractériser l'ensemble des gènes impliqués dans la glycolyse, la synthèse de polymères (peptidoglycane, glycogène), la voie des pentoses-phosphate, ainsi que des voies permettant l'assimilation spécifique de sucres. L'inventaire de ces gènes nous informera sur les possibilités métaboliques théoriques de la bactérie, et sans doute de branchements métaboliques peu utilisés par la bactérie. Ces données *in silico* devront être confrontées aux possibilités réelles de la bactérie. La caractérisation biochimique des enzymes clés du métabolisme et leur modification permettront de conforter le modèle métabolique. Par la suite, il sera possible d'opérer des innovations dans des buts appliqués, par exemple en modifiant des étapes contrôlant la distribution de

métabolites dans les différentes voies de biosynthèse ou du catabolisme.

L'accès aux séquences permettra aussi une recherche informatique de séquences conservées ayant potentiellement un rôle dans la régulation de l'expression, par exemple en analysant systématiquement les promoteurs des gènes identifiés. Le rôle de ces « boîtes » conservées présentes de manière analogue chez d'autres bactéries (Ipr, IHF, CRE, CIRCE, nod, fru, crp, pur...) pourra alors être recherché, ainsi que les facteurs interagissant avec ces dernières. La recherche des facteurs impliqués dans la régulation de fonctions importantes peut être menée en criblant des mutants dérégulés dans l'expression de ces enzymes. Les cibles touchées doivent alors être caractérisées et leur rôle déterminé. L'effet de ces mutations sur l'expression d'autres enzymes de la voie, ou de voies parallèles, peut être mené pour distinguer les régulateurs pléiotropes des régulateurs spécifiques. Étant donné l'originalité du métabolisme des bactéries lactiques comparé à celui des autres bactéries Gram positives, il est possible que celles-ci aient des circuits de régulation nouveaux et caractéristiques. Enfin, et sans doute après des années d'efforts menées par l'ensemble des laboratoires travaillant sur ces bactéries, pourront être établis les premiers éléments d'un contrôle cellulaire global.

4.2. Connaître pour plus de sécurité

Au-delà de la pure connaissance scientifique et du problème de l'amélioration technologique des souches, se pose un problème lié à l'utilisation probable dans le futur de ces souches génétiquement modifiées, à grande échelle dans l'alimentation. Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont par elles-mêmes des organismes parfaitement inoffensifs. Elles sont consommées quotidiennement et en

grande quantité par des populations très importantes, dans les yaourts par exemple où deux espèces de bactéries lactiques sont présentes à 10^8 – 10^9 germes par gramme. Cependant, dans chaque genre de bactéries lactiques, il existe des espèces impliquées dans certaines pathologies. Par exemple, alors que *Lactococcus lactis* est utilisé à grande échelle comme ferment lactique, *Lactococcus garviae* est un agent responsable de mammites [6]. De plus, *Streptococcus thermophilus*, l'une des bactéries du yaourt, est génétiquement très proche des Streptocoques pathogènes et fut même longtemps classée comme une sous espèce de *S. salivarius*, un streptocoque du groupe « viridans » comprenant aussi *S. bovis*, et *S. equinus* [14]. Ces derniers sont responsables de pathologies allant de la carie à la méningite. Bien qu'actuellement il ait été reclassé dans une espèce à part [36], il reste très proche de *S. salivarius*, ces deux espèces ayant plus de 99 % d'homologie au niveau des ARNr 16S [2]. Il nous semble nécessaire de mieux connaître les ressources génétiques réelles de ces bactéries. En reprenant les streptocoques comme exemple, il serait utile et de comparer le génome de *S. thermophilus* à ceux des Streptocoques pathogènes dans un souci de prévention pour la santé publique. Il sera ainsi possible de confirmer (ou pas !) l'absence ou l'inactivation d'éventuels facteurs de pathogénicité. Cette préoccupation est d'autant plus importante que de l'ADN provenant de souches utilisées en co-culture dans les fabrications fromagères a été mis en évidence dans son chromosome [22, 23]. Le transfert de gènes chromosomiques est un événement qui peut aussi arriver dans d'autres espèces de bactéries lactiques [10, 31]. Il semble donc légitime de se poser la question, dans le cas où de tels transferts auraient lieu avec des espèces pathogènes proches, du type et du nombre de fonctions nécessaire à transférer pour rendre une souche alimentaire potentiellement pathogène. De plus, lors de la

construction de souches de levain modifiées pour améliorer la survie dans un environnement industriel ou pour produire de nouveaux polysaccharides « texturant », ne pourrait-on pas activer incidemment des fonctions potentiellement dangereuses pour la santé des consommateurs ?

A notre connaissance, le séquençage du génome de trois streptocoques pathogènes a été entrepris. La séquence de *S. pneumoniae* est terminée à The Institute for Genomic Research (TIGR) en liaison avec Genome Therapeutics Corporation (GTC) et devrait être publiée en 1997, selon le site Web de cet institut. L'université d'Oklahoma, avec le soutien du NIH a séquencé environ 95 % du génome de *S. pyogenes*. GTC semble aussi séquencer *S. epidermis*, mais aucune donnée n'est disponible actuellement. D'autres génomes de bactéries de genres apparentés sont aussi en cours de séquençage comme *L. lactis*, *Enterococcus faecalis* (TIGR et GTC) et *E. faecium* (GTC). Notons qu'à une exception près, les génomes séquencés sont ceux de bactéries pathogènes. Il est probable cependant que les génomes de quelques autres bactéries à usage alimentaire seront déterminés dans un futur proche.

5. CONCLUSION

La connaissance des génomes des bactéries lactiques devrait permettre de mieux connaître l'ensemble de leurs voies métaboliques. Les points où s'effectue le contrôle des flux métaboliques pourront être déterminés, ainsi que des cascades de régulations métaboliques qui en découlent. Ce raisonnement peut aussi être appliqué aux mécanismes de maintenance de la cellule, qui sont gouvernés par des gènes dont les produits lui permettent par exemple de résister aux stress de l'environnement. L'intégration des connaissances issues des programmes génomiques par des équipes de cultures

scientifiques complémentaires devrait permettre d'accéder à une compréhension globale du métabolisme bactérien et contribuer au développement de nouvelles souches utilisables en agro-alimentaire. Les possibilités métaboliques d'une bactérie sont limitées par les informations contenues dans leur génome. Il sera cependant possible d'introduire des gènes permettant d'exprimer de nouvelles fonctions ce qui repousse très loin, en théorie, les limites de leur potentialité. Cependant l'expression de gènes hétérologues pose parfois des problèmes techniques. Les gènes étrangers doivent être pourvus de signaux d'expression adéquats, incluant les promoteurs, les sites de fixation des ribosomes, les signaux d'exportation. La surexpression de ces gènes peut être limitée par la présence de codons correspondant à des ARN de transfert minoritaires, mais aussi à d'autres composants de la machinerie cellulaire. Ces données pourront encore être tirées d'une meilleure connaissance du génome de l'hôte. Enfin, certains gènes hétérologues requièrent une machinerie complexe pour être activés ; c'est la connaissance des autres génomes qui peut alors devenir limitante.

RÉFÉRENCES

- [1] Benson K.H., Godon J.J., Renault P., Griffin H.G., Gasson M.J., Effect of *ilvBN*-encoded alpha-acetolactate synthase expression on diacetyl production in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45 (1996) 107-111.
- [2] Bentley R.W., Leigh J.A., Collins M.D., Intragenic structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small subunit rRNA sequences, *Int. J. Syst. Bact.*, 41 (1991) 487-494.
- [3] Bidnenko E., Ehrlich S.D., Chopin M.C., Phage operon involved in sensitivity to the *Lactococcus lactis* abortive infection mechanism *AbiD1*, *J. Bacteriol.*, 177 (1995) 3824-3829.
- [4] Biswas I., Gruss A., Ehrlich S.D., Maguin E., High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 3628-3635.
- [5] Coccagn-Bousquet M., Garrigues C., Loubiere P., Lindley N.D., Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70 (1996) 253-267.
- [6] Collins M.D., Farrow J.A.E., Phillips B.A., Kandler O., *Streptococcus garvieae* sp nov and *Streptococcus plantarum* sp nov, *J. Gen. Microbiol.* 129 (1983) 3427-3431.
- [7] Daly C., Fitzgerald G.F., Davis R., Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance, *Antonie Van Leeuwenhoek* 70 (1996) 99-110.
- [8] Davidson B.E., Kordias N., Dobos M., Hillier A.J., Genomic organization of lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek* 70 (1996) 161-183.
- [9] Delorme C., Godon J.J., Ehrlich S.D., Renault P., Gene inactivation in *Lactococcus lactis* - histidine biosynthesis, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 4391-4399.
- [10] Delorme C., Godon J.J., Ehrlich S.D., Renault P., Mosaic structure of large regions of the *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* chromosome, *Microbiology* 140 (1994) 3053-3060.
- [11] de Vos W.M., Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek* 70 (1996) 223-242.
- [12] Dinsmore P.K., Klaenhammer T.R., Molecular characterization of a genomic region in a *Lactococcus* bacteriophage that is involved in its sensitivity to the phage defense mechanism *AbiA*, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 2949-2957.
- [13] Drouault S., Corthier G., Delorme C., Ehrlich S.D., Renault P., Régulations métaboliques de *Lactococcus lactis* en culture pure ou mixte dans le lait, *Lait* 78 (1998) 59-67.
- [14] Farrow J.A.E., Collins M.D., DNA base composition, DNA-DNA homology and long-chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*, *J. Gen. Microbiol.* 130 (1984) 357-362.
- [15] Gasson M.J., Fitzgerald G.F., Gene transfer systems and transposition. In: Gasson M.J. and De Vos W.M. (Ed), *Genetic and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, Blackie Academic & Professional, London (1994).
- [16] Godon J.J., Delorme C., Bardowski J., Chopin M.C., Ehrlich S.D., Renault P., Gene inactivation in *Lactococcus lactis* - branched-chain amino acid biosynthesis, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 4383-4390.
- [17] Godon J.J., Jury K., Shearman C.A., Gasson M.J., The *Lactococcus lactis* sex-factor aggregation gene *cluA*, *Mol. Microbiol.* 12 (1994) 655-663.
- [18] Godon J.J., Pillidge C.J., Jury K., Gasson M.J., Caractérisation d'un élément conjugatif original : le facteur sexuel de *Lactococcus lactis* 712, *Lait* 76 (1996) 41-50.

- [19] Goupil N., Corthier G., Ehrlich S.D., Renault P., Imbalance of leucine flux in *Lactococcus lactis* and its use for the isolation of diacetyl-overproducing strains, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 2636–2640.
- [20] Goupil-Feuillerat N., Godon J.J., Cocaign-Bousquet M., Ehrlich S.D., Renault P., Dual role of alpha-acetolactate decarboxylase in *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 6285–6293.
- [21] Gripon J.C., Flavour and texture in soft cheese, in: Law B.A. (Ed.), *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milks*, Blackie Academic & Professional, London, 1997.
- [22] Guédon G., Bourgoïn F., Pebay M., Roussel Y., Colmin C., Simonet J.M., Decaris B., Characterization and distribution of two insertion sequences, IS1191 and iso-IS981, in: *Streptococcus thermophilus*: Does intergeneric transfer of insertion sequences occur in lactic acid bacteria co-cultures? *Mol. Microbiol.* 16 (1995) 69–78.
- [23] Guédon G., Bourgoïn F., Decaris B., Does gene horizontal transfert occur in lactic acid bacteria cocultures? *Lait* 78 (1998) 73–78.
- [24] Hastings J.W., Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review, *Gene* 173 (1996) 5–11.
- [25] Hugenholtz J., Citrate metabolism in lactic acid bacteria, *FEMS. Microbiol. Rev.* 12 (1993) 165–178.
- [26] Kok J., Inducible gene expression and environmentally regulated genes in lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek* 70 (1996) 129–145.
- [27] Kuipers O.P., de Ruyter P.G., Kleerebezem M., de Vos W.M., Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria, *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 135–140.
- [28] Kunji E.R.S., Mierau I., Hagting A., Poolman B., Konings W.N., The proteolytic systems of lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek* 70 (1996) 187–221.
- [29] Leenhouts K.J., Integration strategies and vectors, in: *Genetics of Streptococci, Enterococci and Lactococci*. Ferretti J.J., Gilmore M.S., Klaenhammer T.R. and F Brown (Eds) *Dev Biol. Stand. Basel, Karger, S.W.*, 85 (1995) 523–530.
- [30] Mercenier A., Pouwels PH, Chassy BM, Genetic engineering of lactobacilli, leuconostocs and *Streptococcus thermophilus*, in: Gasson M.J., de Vos W.M. (Ed.), *Genetic and Biotechnology of Lactic Acid. Bacteria.*, Blackie Academic & Professional, London, 1994, 252–294.
- [31] Nardi M, Renault P, Monnet V, Duplication of the *pepF* gene and shuffling of DNA fragments on the lactose plasmid of *Lactococcus lactis*, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 4164–4171.
- [32] Parreira R., Ehrlich S.D., Chopin M.C., Dramatic decay of phage transcripts in lactococcal cells carrying the abortive infection determinant *AbiB*, *Mol. Microbiol.* 19 (1996) 221–230.
- [33] Phalip V., Monnet C., Schmitt P., Renault P., Godon J.J., Divies C., Purification and properties of the alpha-acetolactate decarboxylase from *Lactococcus lactis* subsp *lactis* NCDO 2118, *FEBS. Lett.* 351 (1994) 95–99.
- [34] Platteeuw C., Hugenholtz J., Starrenburg M., Vanalenboerrigter I., de Vos W.M., Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: Influence of the overproduction of alpha-acetolactate synthase in strains deficient in lactate dehydrogenase as a function of culture conditions, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 3967–3971.
- [35] Renault P., Corthier G., Goupil N., Delorme C., Ehrlich S.D., Plasmid vectors for Gram-positive bacteria switching from high to low copy number, *Gene* 183 (1996) 175–182.
- [36] Schleifer K.H., Ehrmann M., Krusch U., Neve H., Revival of the Species *Streptococcus thermophilus* (Ex Orla-Jensen, 1919) *Nom Rev, Syst. Appl. Microbiol.* 14 (1991) 386–388.
- [37] Schouler C., Genomic organization of lactic acid bacteria phages, *Lait* 76 (1996) 81–90.
- [38] Snoep J.L., de Mattos M.J.T., Starrenburg M.J.C., Hugenholtz J., Isolation, characterization, and physiological role of the pyruvate dehydrogenase complex and alpha-acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* b.v. diacetylactis, *J. Bacteriol.* 174 (1992) 4838–4841.
- [39] Swindell S.R., Benson K.H., Griffin H.G., Renault P., Ehrlich S.D., Gasson M.J., Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 2641–2643.
- [40] Verrips C.T., van den Berg D.J., Barriers to application of genetically modified lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek* 70 (1996) 299–316.