



**HAL**  
open science

# Post-genomic analysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus* cooperative growth in milk

Luciana Hervé-Jiménez

► **To cite this version:**

Luciana Hervé-Jiménez. Post-genomic analysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus* cooperative growth in milk. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2008. English. NNT : 2008AGPT0034 . pastel-00004080

**HAL Id: pastel-00004080**

**<https://pastel.hal.science/pastel-00004080>**

Submitted on 12 Feb 2009

**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.

# SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	iv
-----------------------------	----

INTRODUCTION GENERALE .....	1
-----------------------------	---

1. LES ASSOCIATIONS BACTERIENNES .....	3
--	---

1.1. LES BACTERIES VIVENT DANS DES ECOSYSTEMES .....	3
--	---

1.2. L'ASSOCIATION ENTRE <i>S. THERMOPHILUS</i> ET <i>L. BULGARICUS</i> : UNE PROTO-COOPERATION .....	12
---	----

## 2. LES DEUX BACTERIES LACTIQUES DU YAOURT:

<b>S. THERMOPHILUS ET L. BULGARICUS.....</b>	<b>16</b>
--	-----------

2.1. LES BACTERIES LACTIQUES : DES BACTERIES IMPLIQUEES DANS LES ALIMENTS FERMENTES .....	16
---	----

2.1.1. <i>Caractéristiques générales des bactéries lactiques</i> .....	16
--	----

2.1.2. <i>Utilisation industrielle des bactéries lactiques</i> .....	16
--	----

2.2. CLASSIFICATION ET TAXONOMIE.....	17
---------------------------------------	----

2.3. LES STREPTOCOQUES : PAS UNIQUEMENT DES ESPECES PATHOGENES .....	22
--	----

2.3.1. <i>Streptococcus thermophilus: un streptocoque atypique</i> .....	23
--	----

2.3.2. <i>Génome de S. thermophilus</i> .....	24
---	----

2.4. LES LACTOBACILLES : UN GENRE REPRESENTATIF DE LA DIVERSITE DES BL .....	25
--	----

2.4.1. <i>L. bulgaricus fait partie du groupe acidophilus</i> .....	27
---	----

2.4.2. <i>Génome de L. bulgaricus : un lactobacille adapté au lait</i> .....	28
--	----

## 3. METABOLISME ET REGULATION CHEZ S. THERMOPHILUS ET L.

<b>BULGARICUS .....</b>	<b>29</b>
-------------------------	-----------

3.1. LE METABOLISME CARBONE ET SA REGULATION : UNE PREFERENCE MARQUEE POUR LE LACTOSE	29
---	----

3.1.1. <i>Sucres et transport</i> .....	29
---	----

3.1.1.1. Le lactose .....	30
---------------------------	----

3.1.1.2. Les autres sucres .....	31
----------------------------------	----

3.1.2. <i>Métabolisme carboné central</i> .....	31
---	----

3.1.3. <i>Utilisation du pyruvate</i> .....	34
---	----

3.1.4. <i>Régulation du métabolisme carboné</i> .....	36
---	----

3.2. LE METABOLISME AZOTE ET SA REGULATION.....	37
---	----

3.2.1. <i>Exigences en acides aminés</i> .....	38
--	----

3.2.2. <i>Système protéolytique</i> .....	39
---	----

3.2.2.1. Protéases de paroi.....	39
----------------------------------	----

3.2.2.2. Les peptidases .....	41
-------------------------------	----

3.2.2.3. Systèmes de transport.....	42
-------------------------------------	----

3.2.3.	<i>Biosynthèse des acides aminés</i> .....	43
3.2.3.1.	Biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée (BCAA) chez <i>S. thermophilus</i> .....	44
3.2.3.2.	Biosynthèse de la méthionine et de la cystéine chez <i>S. thermophilus</i> .....	46
3.3.	BIOSYNTHESE DES BASES PURIQUES.....	48
3.3.1.	<i>Biosynthèse de purines de novo.</i> .....	49
3.3.2.	<i>Régulation</i> .....	52
3.3.3.	<i>Voies de transport de purines</i> .....	53
3.4.	ADAPTATION DE <i>S. THERMOPHILUS</i> ET <i>L. BULGARICUS</i> AUX CHANGEMENTS ENVIRONNEMENTAUX : IMPLICATION DE SYSTEMES DE REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE .....	55
3.4.1.	<i>Les facteurs <math>\sigma</math></i> .....	56
3.4.2.	<i>Les protéines Spx</i> .....	57
3.4.3.	<i>Les régulateurs transcriptionnels</i> .....	57
3.4.3.1.	Les régulateurs Rgg.....	59
3.4.4.	<i>Les systèmes à deux composants</i> .....	60
3.5.	LA REPONSE AU STRESS OXYDANT .....	61
3.5.1.	<i>L'oxygène et les ROS</i> .....	61
3.5.2.	<i>Réponse au stress oxydant chez <i>S. thermophilus</i> et <i>L. bulgaricus</i></i> .....	62
3.5.2.1.	Réponse au stress oxydant chez <i>S. thermophilus</i> .....	63
3.5.2.2.	Réponse au stress oxydant chez <i>L. bulgaricus</i> .....	65
3.5.3.	<i>Perception du stress oxydant et mécanismes de réponse globale chez <i>S. thermophilus</i> et <i>L. bulgaricus</i></i> .....	66
3.5.3.1.	Les systèmes « senseurs de peroxyde ».....	66
3.5.3.2.	Les systèmes à deux composants .....	66
3.5.3.3.	Les régulateurs Rgg.....	67

## **RESULTATS EXPERIMENTAUX ..... 68**

### **1. CHAPITRE I : CHOIX DU COUPLE DE SOUCHES ET DU MILIEU DE CULTURE ET CARACTERISTIQUES DE CROISSANCE.....71**

1.1.	CONTEXTE ET OBJECTIFS.....	71
1.2.	MATERIELS ET METHODES .....	73
1.2.1.	<i>Milieux de culture</i> .....	73
1.2.2.	<i>Paramètres technologiques</i> .....	73
1.3.	RESULTATS .....	76
1.3.1.	<i>Croissance en MFT supplémenté</i> .....	76
1.3.1.1.	Courbes d'acidification: temps de latence, vitesse moyenne d'acidification et vitesse d'acidification.....	76
1.3.1.2.	Dénombrement final en MFT supplémenté.....	76
1.3.2.	<i>Post-acidification en MFT supplémenté</i> .....	78

1.3.3.	<i>Dosage d'arômes</i> .....	78
1.3.4.	<i>Croissance en lait Marguerite®</i> .....	80
1.3.4.1.	Courbes d'acidification : temps de latence, vitesse moyenne d'acidification et vitesse d'acidification.....	80
1.3.4.2.	Dénombrement final.....	80
1.3.5.	<i>Post-acidification en lait Marguerite®</i> : .....	82
1.3.6.	<i>Dosage d'arômes en lait Marguerite®</i> .....	82
1.4.	CHOIX DU COUPLE ET DU MILIEU : DISCUSSION ET CONCLUSION.....	84
1.4.1.	<i>Conclusion</i> .....	88
<b>2.</b>	<b>CHAPITRE II : ANALYSES POST-GENOMIQUES.....</b>	<b>89</b>
2.1.	CONTEXTE ET OBJECTIFS.....	89
2.2.	CARACTERISTIQUES DE CROISSANCE DU COUPLE <i>S. THERMOPHILUS</i> LMG18311 ET <i>L. BULGARICUS</i> ATCC11842 EN LAIT MARGUERITE® .....	91
2.3.	MATERIELS ET METHODES COMPLEMENTAIRES.....	93
2.3.1.	<i>Transcriptomique</i> .....	93
2.3.2.	<i>Protéomique</i> .....	97
2.3.2.1.	Problème de <i>L. bulgaricus</i> .....	97
2.4.	RESULTATS .....	101
2.4.1.	<i>Comparaison des modifications observées en mono- et co-cultures entre 2h30 et 5h30 de fermentation</i> .....	101
2.4.2.	<i>Etude de la physiologie de S. thermophilus LMG 18311 lors de sa croissance dans le lait (Publication n°1)</i> .....	105
2.4.3.	<i>Analyse post-génomique de Streptococcus thermophilus co-cultivée avec Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus dans le lait : une nouvelle vision de cette association bactérienne (Publication n°2)</i> .....	147
	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>185</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>203</b>



## LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide aminé  
ABC : ATP Binding Cassette  
ADNc : ADN complémentaire  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
BL : Bactérie Lactique  
BSA : Sérum albumine bovine  
CDS : Séquence codante (Coding Sequence)  
CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1-propanesulfate  
Da : Dalton  
DTT : dithiothréitol  
EDTA : éthylène diamine tétra acétique  
E-2D : Electrophorèse bidimensionnelle  
IEF : isoélectrofocalisation  
IPG : gradient de pH immobilisé (immobilized pH gradient)  
*L. lactis* : *Lactococcus lactis*  
*L. bulgaricus* : *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*  
MALDI-TOF : matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight  
ORF: phase ouverte de lecture (open reading frame)  
PAGE: électrophorèse en gel acrylamide (polyacrylamide gel electrophoresis)  
pb : paire de bases  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
pI : Point Isoélectrique  
MM : Masse Moléculaire  
RT : Reverse Transcription  
SDS : sodium dodécil sulfate  
ssp. : sous-espèce  
*S. thermophilus* : *Streptococcus thermophilus*  
strip : bandelette d'acrylamide (première dimension)  
TCA : acide trichloroacétique  
Tris : Tris-(hydrométhyl)aminométhane  
UFC : Unité formant colonie

## INTRODUCTION GENERALE

Les premières preuves de l'existence des produits laitiers fermentés remontent à 8000 ans avant JC dans le croissant fertile au Moyen Orient (plaines du Nil, du Jourdain, de l'Euphrate et du Tigre), époque où les végétaux et les animaux sont domestiqués (Fox, 1993).

Il faudra attendre Pasteur et ses travaux sur la fermentation en 1857 (Pasteur, 1857) pour établir un lien entre la fermentation lactique et les bactéries. La première culture bactérienne pure sera d'ailleurs une culture de *Lactococcus lactis* obtenue et décrite par Joseph Lister en 1873 (Lister, 1873). Metchnikoff isole en 1904 le « bacille bulgare » (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) présent dans le yaourt. Il étudie les propriétés acidifiantes des bactéries du yaourt et il développera l'idée que les bactéries contenues dans les laits fermentés ont un effet bénéfique sur la santé (Metchnikoff, 1907). Il plaidera en faveur de l'introduction de produits laitiers fermentés dans le régime alimentaire et en 1905, les premières entreprises fabriquant du yaourt à partir des souches de l'Institut Pasteur voient le jour (Bibel, 1988). La dénomination « lait fermenté » est réservée, selon le décret n° 88-1203 du 30 décembre 1988 en France, aux produits qui ont subi une fermentation essentiellement lactique conduisant à la coagulation, c'est-à-dire à la formation d'un gel ou coagulum par modification de la structure des protéines du lait (micelles de caséines). Le lait fermenté le plus consommé et le plus connu est le yaourt mais on peut également citer le kéfir ou le lait ribot (du site [http://www.inra.fr/la\\_sciences\\_et\\_vous/](http://www.inra.fr/la_sciences_et_vous/)).

Depuis 1960, la production industrielle de yaourt connaît un développement international considérable et le yaourt est devenu aujourd'hui un produit de consommation courante en Occident. En 2006, la consommation de yaourts et de laits fermentés s'est élevée en France à 1,3 millions de tonnes, soit 20,7 kg par an et par habitant (contre 18,5 en 1996, source : [www.cniel.com](http://www.cniel.com)) et le chiffre d'affaire de ce secteur représente 2104 millions d'euros (source : [www.cidilait.com](http://www.cidilait.com)).

Le yaourt est un écosystème naturel qui fait intervenir deux bactéries lactiques. En France, il est défini comme un lait fermenté issu de la transformation du lait par les seules bactéries *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) et *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) (Article 1 du décret n°88-1203 du 30 décembre 1988). Selon Pette et Lolkema (Pette *et al.*, 1950) l'utilisation combinée de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* fait apparaître une interaction positive entre ces deux espèces.

Cette association est appelée proto-coopération lorsqu'elle est bénéfique mais pas indispensable au développement de chacune des espèces. Même si quelques facteurs impliqués dans cette coopération ont été identifiés (essentiellement des nutriments), ce phénomène reste encore peu connu au niveau moléculaire. Aujourd'hui, le séquençage des génomes de *S. thermophilus* (Bolotin *et al.*, 2004) et *L. bulgaricus* (van de Guchte *et al.*, 2006) étant achevé, l'étude de ces phénomènes au niveau moléculaire est envisageable par des approches génomiques et post-génomiques. Ainsi, notre objectif est d'identifier plus amplement les bases moléculaires de cette association, d'évaluer la nature et l'étendue des échanges bactériens et d'estimer les phénomènes de régulation d'expression de gènes qui interviennent.

Ce manuscrit est constitué de trois parties : une revue bibliographique, une partie expérimentale et une discussion générale et perspectives. La revue bibliographique est composée de trois chapitres. Le premier chapitre présente un état des lieux des connaissances sur l'étude des écosystèmes faisant intervenir deux bactéries et des connaissances acquises ces dernières années sur la proto-coopération. Le deuxième chapitre présente *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* au sein de la famille des bactéries lactiques. Dans le troisième chapitre nous décrivons quelques voies métaboliques de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* en détail. Etant donné que l'étude de cette association a été réalisée par des analyses globales (protéomique et transcriptomique), nous avons identifié des modifications dans plusieurs métabolismes que nous avons choisi de décrire: métabolisme carboné, azoté et des bases puriques. De plus un état de connaissances des systèmes de régulation impliqués dans l'adaptation de ces deux espèces aux changements environnementaux est rapporté. Finalement, nous avons fait un point sur la réponse au stress oxydant de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, qui pourrait être impliqué dans l'association entre ces deux bactéries.

La partie expérimentale est présentée sous forme de deux chapitres. Le premier chapitre présente le matériel, méthodes et résultats obtenus pour le choix d'un milieu laitier et d'un couple de souches présentant une interaction positive. Le second chapitre, présente l'étude des voies métaboliques et les régulations potentielles impliquées dans la croissance en lait de *S. thermophilus* en monoculture et en co-culture avec *L. bulgaricus*. Cette analyse a été réalisée par des analyses post-génomiques, la protéomique et la transcriptomique.

Enfin, dans la discussion générale de ce manuscrit nous proposons un nouveau modèle de proto-coopération entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* lors de leur co-culture dans le lait, d'après les apports de ce travail expérimental.

# 1. Les associations bactériennes

## 1.1. Les bactéries vivent dans des écosystèmes

Le terme écosystème a été défini par Arthur Georges Tansley comme « l'ensemble formé par une association ou communauté d'êtres vivants et son environnement géologique, pédologique et atmosphérique. » Les éléments constituant un écosystème développent un réseau d'interdépendances permettant le maintien et le développement de la vie. Un écosystème est la résultante d'interactions entre les facteurs biotiques et abiotiques (Tansley, 1958).

Dans l'environnement, les bactéries, comme tous les êtres vivants, co-habitent dans des écosystèmes où elles interagissent entre elles et avec le milieu. Des écosystèmes bactériens complexes existaient déjà il y a 3,4 milliards d'années. Dans les écosystèmes, de nombreuses interactions métaboliques et nutritionnelles entre les différents microorganismes ont lieu. Les répercussions de ces interactions sont positives ou négatives pour la croissance bactérienne (Tableau 1).

**Tableau 1: Les principales interactions microbiennes (d'après Corrieu et al., 1994). (0: neutre, +: positif, -: négatif).**

Interactions	Microorganisme 1/ Microorganisme 2
Neutralisme	0/0
Coopération, mutualisme, symbiose	+ /+
Compétition	-/-
Commensalisme	+ /0
Amensalisme	-/0
Parasitisme	+/-

Selon Frederickson (Frederickson, 1977) les interactions peuvent être classées selon leur caractère comme :

- directes, quand un contact physique est nécessaire entre les deux populations ou indirectes, par l'intermédiaire d'une substance produite ou dégradée, en absence de tout contact physique ;
- positives, indiquant une stimulation d'un microorganisme par l'autre (coopération, commensalisme) ou négatives, caractérisant le ralentissement ou l'inhibition d'un microorganisme par l'autre (compétition, amensalisme, parasitisme).

Etant donné le nombre de facteurs et d'interactions qui interviennent, l'étude de ces écosystèmes est assez complexe et la résultante (par exemple, en terme de croissance) n'indique pas nécessairement le nombre et le type d'interactions impliquées. C'est pour cela que l'utilisation de modèles plus simples, faisant intervenir par exemple deux bactéries (co-cultures) est un premier pas nécessaire vers la compréhension de ces systèmes. Nous disposons de peu de connaissances sur les interactions entre deux microorganismes, surtout au niveau des mécanismes et des régulations, mais des études de ce type commencent à émerger. Par la suite, nous présentons quelques exemples, parmi les peu d'exemples répertoriés dans la littérature, que nous avons classé en trois grands groupes :

**1 - Des interactions positives qui font intervenir des échanges de métabolites** entre les deux bactéries (avec ou sans contact) pouvant conduire à la complémentation de voies métaboliques. Nous citons ici trois exemples de co-cultures d'écosystèmes très divers comme les digesteurs anaérobies, les écosystèmes en relation avec la santé et une application dans l'industrie fromagère :

- ❖ l'échange d'H<sub>2</sub> nécessite un contact entre *Pelotomaculum thermopropionicum* (*P. thermopropionicum*) et *Methanothermobacter thermautotrophics* (*M. thermautotrophics*), deux bactéries faisant partie des digesteurs « anaérobies » utilisés pour traiter les déchets ménagers (Hofman-Bang *et al.*, 2003) ou du tractus digestif des mammifères (Morvan *et al.*, 1996). Dans les niches « anaérobies », la matière organique est transformée en méthane et CO<sub>2</sub> via différents intermédiaires. Parmi les métabolites intermédiaires les plus importants, on peut citer les acides gras volatiles (acétate, propionate et butyrate) (Schink, 1997) qui s'accumulent et diminuent la production de méthane. *P. thermopropionicum* est une bactérie capable d'oxyder les acides gras volatiles en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> mais en conditions de basse pression partielle de H<sub>2</sub> (inférieure à 10 Pa pour le propionate). *M. thermautotrophics* est une

bactérie productrice de méthane qui consomme l' $H_2$  ce qui favorise alors l'oxydation de ces acides gras volatiles. L'étude de cette association a permis de démontrer par microscopie, que les cellules de chaque organisme étaient dispersées dans les monocultures, indépendamment du substrat de croissance présent dans le milieu. Par contre, en co-culture, ces deux espèces co-agrègent ou non, selon le substrat de croissance utilisé. En effet, en milieu contenant du propionate, une co-agrégation est observée, effet moins marqué en milieu contenant de l'éthanol ou du 1-propanol (Ishii *et al.*, 2005). De plus, ces auteurs ont démontré par microscopie électronique, que des filaments de type flagelles ainsi que des exopolysaccharides étaient produits par *P. thermopropionicum* et impliqués dans la co-agrégation et le contact entre les deux espèces. La théorie de la diffusion suggère qu'à basse concentration de  $H_2$ , la distance entre les cellules productrices et les cellules consommatrices de  $H_2$  doit être très petite pour obtenir une vitesse du flux suffisante. En utilisant la loi de diffusion de Fick, permettant d'estimer la distance entre les deux espèces en utilisant les données de flux de  $H_2$ , l'aire de la surface des cellules, la constante de diffusion dans l'eau de  $H_2$  et la concentration de  $H_2$  à l'extérieur de la cellule, Ishii *et al.* (2005) ont déterminé que pour une oxydation efficace du propionate, la distance entre les deux espèces devait être de 2  $\mu\text{m}$ , alors que pour l'éthanol et le 1-propanol, les distances étaient de 16 et 32  $\mu\text{m}$  respectivement. Considérant que la distance moyenne entre deux espèces en culture liquide est de 30  $\mu\text{m}$  (en milieu de phase exponentielle et à  $5 \times 10^7$  ufc/ml), il paraît normal qu'un contact physique par co-agrégation soit nécessaire pour obtenir une oxydation du propionate et un flux de  $H_2$  efficace (Ishii *et al.*, 2005).

- ❖ la fourniture de fer par *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) à *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). *P. aeruginosa* est une bactérie pathogène pour l'homme. Une des infections les plus communes est celle de la colonisation chronique des poumons chez les individus atteints de mucoviscidose (Hoiby, 1998). Les infections sont pour la plupart, le résultat de la colonisation de plusieurs bactéries (Hoiby, 1998). C'est le cas de *P. aeruginosa* qui se retrouve souvent dans les poumons avec d'autres bactéries pathogènes comme *S. aureus* et *Streptococcus pneumoniae* (Hoiby, 1998). Dans les poumons, *P. aeruginosa* doit s'adapter à de faibles concentrations en oxygène et en fer. L'étude de la co-culture entre *P. aeruginosa* et *S. aureus* par analyse transcriptomique a démontré que la présence de

*S. aureus* augmentait la quantité de fer disponible dans le milieu, qui pouvait alors être utilisé par *P. aeruginosa*, ce qui favorisait ensuite la colonisation des poumons par cette bactérie (Mashburn *et al.*, 2005).

- ❖ la complémentation de voies métaboliques des souches utilisées dans l'industrie fromagère dans le but d'améliorer les arômes, le goût et la texture des produits. Les BL ont la capacité de produire des composés aromatiques à partir des acides aminés libres dans le lait ou libérés lors de la protéolyse des caséines (Yvon *et al.*, 2001). La conversion des acides aminés en composés aromatiques commence par une transamination de l'acide aminé en cétoacide, par des aminotransférases. Au cours de cette réaction l' $\alpha$ -cétoglutarate intervient comme accepteur préférentiel du groupe aminé ce qui conduit à la formation de glutamate. Les cétoacides produits, sont ensuite dégradés spontanément ou enzymatiquement pour former des aldéhydes ou des acides carboxyliques, dont certains sont des composés aromatiques (Yvon *et al.*, 2001). Pendant l'étape de maturation des fromages, les enzymes protéolytiques des BL jouent un rôle important dans la dégradation de caséines du lait, libérant des peptides et des acides aminés qui seront ensuite utilisés pour la formation de composés aromatiques (Engels *et al.*, 1996). La complémentation avec des souches possédant des activités métaboliques différentes a été utilisée pour favoriser la production d'arômes. Nous citons l'exemple de l'utilisation de deux souches de *Lactococcus lactis* (*L. lactis*), la souche SK110 qui possède une activité protéolytique très importante et qui libère des peptides et des acides aminés dans le milieu avec la souche B1157 qui possède une activité décarboxylase très importante et qui dégrade efficacement les cétoacides en composés aromatiques (3-methylbutanal ; 2-methylbutanal et 2-methylpropanal) (Ayad *et al.*, 2001). Un autre exemple est l'utilisation d'une souche de *L. lactis* avec un lactobacille mésophile. La combinaison d'une souche de lactobacille, *L. paracasei* ssp. *paracasei* INF15D ou *L. casei* 2756, possédant une activité glutamate-déshydrogénase (Gdh) (produit de  $\alpha$ -cétoglutarate à partir du glutamate) et de la souche de *L. lactis* ssp. *cremoris* NCD0763, produit un effet bénéfique dans la formation de composés aromatiques. Le lactobacille est capable de produire l' $\alpha$ -cétoglutarate nécessaire à la transamination des acides aminés en cétoacides, qui sont ensuite convertis en acides carboxyliques par le lactocoque (Ayad *et al.*, 2001, Kieronczyk *et al.*, 2003).

2 - **Des interactions négatives, avec la formation de métabolites toxiques** par un ou les deux protagonistes. C'est le cas par exemple de l'acide lactique produit par les bactéries lactiques, qui inhibe la croissance d'autres espèces et d'elles-mêmes. C'est également le cas de la production de molécules inhibitrices. Cela concerne principalement la production de bactériocines, mais aussi d'autres molécules comme le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nous pouvons citer l'exemple de la plaque dentaire, un écosystème très étudié. La plaque dentaire est composée de plusieurs dizaines d'espèces qui forment un biofilm et peuvent être séparées en deux groupes : les colonisateurs précoces et les colonisateurs tardifs (Figure 1). Les colonisateurs précoces se lient *via* leurs adhésines aux récepteurs de la salive présents dans la pellicule formée à la surface des dents. Les colonisateurs tardifs se lient à l'agrégat formé par les colonisateurs précoces. Plusieurs études de co-cultures entre bactéries de biofilms dentaires ont été réalisées dans le but de mieux comprendre les mécanismes d'adaptation et de colonisation des dents. Ces études ont mis en évidence des interactions négatives:

- ❖ La production de métabolites toxiques par les deux protagonistes est l'exemple de *Streptococcus mutans* et *Streptococcus sanguinis*, tous les deux des colonisateurs précoces. Les analyses génétiques et biochimiques ont révélé que l'interaction entre ces deux espèces était réalisée par une production de produits chimiques bien régulée, comme des bactériocines par *Streptococcus mutans* et du peroxyde d'hydrogène par *Streptococcus sanguinis* (Kreth *et al.*, 2005).
- ❖ La « contre-attaque » d'une bactérie envers l'autre a été observée dans le cas du couple formé par *Streptococcus mutans* et *Streptococcus oligofermentans*, deux bactéries colonisateurs précoces. Ainsi *Streptococcus oligofermentans* est capable d'utiliser l'acide lactique produit par *Streptococcus mutans* comme substrat pour la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, molécule inhibitrice de *Streptococcus mutans* (Tong *et al.*, 2007).

3 - **Des interactions qui font intervenir les phénomènes de régulation *via* des molécules diffusibles, en particulier le quorum-sensing**, pour lequel des interactions négatives ou positives peuvent avoir lieu. Le quorum-sensing est le phénomène par lequel l'accumulation de petites molécules de signalisation (ou autoinducteurs) permet aux bactéries de percevoir quand une population minimale est atteinte pour initier une réponse concertée. Trois groupes de signaux impliqués dans ces phénomènes sont décrits chez les bactéries : les



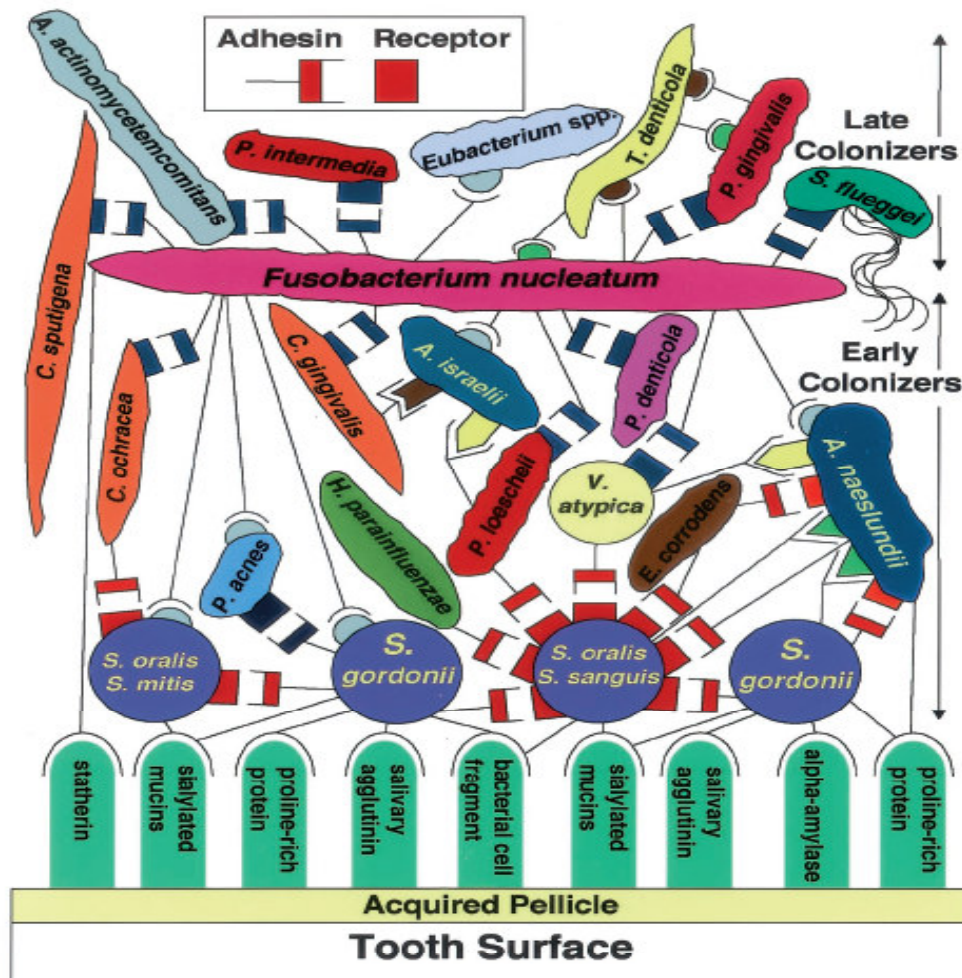


Figure 1. Modèle spatio-temporel de la colonisation orale bactérienne, montrant la reconnaissance des récepteurs salivaires par colonisateurs précoces (« early colonizers ») et la co-agrégation entre les colonisateurs précoces et les colonisateurs tardifs (« late colonizers ») à la surface des dents. L'ensemble de ces interactions a proposé comme représentant le développement de la plaque dentaire (selon (Kolenbrander et al., 2002). Les récepteurs salivaires sont représentés en colonnes verticales arrondies au sommet bleu-vertes. Les adhésines figurées en rouge-blanc avec une queue, représentent des composants de la surface de la cellule qui peuvent être inactivés par la chaleur (85°C, 30 min) et sensibles aux protéases, les récepteurs complémentaires (sans la queue) ne sont pas affectés par la chaleur ou par les protéases. Des symboles identiques représentent de composants qui sont fonctionnellement similaires mais de structure différente. Les symboles rectangulaires (rouges, noirs et gris) représentent des co-agrégations inhibées par le lactose, les autres symboles (triangles, flèches semi-cercles) ne possèdent pas d'inhibiteur connu.

N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) décrits chez les bactéries Gram<sup>-</sup>, des oligopeptides, parfois modifiés, chez les bactéries Gram<sup>+</sup> et l'autoinducteur 2 produit par LuxS qui est commun aux bactéries Gram<sup>-</sup> et Gram<sup>+</sup> (Bassler *et al.*, 2006). Ce mode de communication est essentiellement décrit pour des phénomènes de communication intra-espèces, cependant quelques études de communication inter-espèces ont été menées.

Phénomènes de communication intra-espèces:

En co-culture, des phénomènes de régulation *via* le quorum-sensing ont été observés. Nous citons ci-dessous un exemple d'interaction positive, pour laquelle la stimulation de croissance d'une bactérie grâce à son partenaire lui permet d'atteindre des densités cellulaires importantes et de déclencher de phénomènes de quorum-sensing. Nous citons en deuxième exemple, une interaction négative pour laquelle les phénomènes de quorum-sensing déclenchés par une bactérie lui permettent d'être plus compétitive envers son compétiteur :

- ❖ la stimulation de la croissance de *Thermotoga maritima* (*T. maritima*) par *Methanococcus jannaschii* (*M. jannaschii*) et la mise en place de phénomènes de régulation de type quorum-sensing par *T. maritima*. C'est un autre exemple de bactéries productrices de H<sub>2</sub> et consommatrices de ce composé comme source d'énergie pour la production de méthane (Muralidharan *et al.*, 1997). Différentes études ont été réalisées dans le but d'identifier les mécanismes moléculaires qui décrivent cette association microbienne. *T. maritima* est une bactérie capable de fermenter une variété de sucres produisant de l'H<sub>2</sub> comme produit auto-inhibiteur. Sa co-culture avec *M. jannaschii* permet de lever cette inhibition et également d'augmenter sa biomasse cellulaire (Muralidharan *et al.*, 1997). *T. maritima* produit aussi des EPS impliqués dans la formation de biofilms (Rinker *et al.*, 2000). En effet, quand *T. maritima* est co-cultivée avec *M. jannaschii*, elle produit des EPS à haute densité cellulaire, permettant la formation d'agrégats cellulaires stables et facilitant le transfert de H<sub>2</sub> entre les deux espèces (Muralidharan *et al.*, 1997). L'agrégation cellulaire aurait lieu en milieu de phase exponentielle à hautes densités cellulaires. Une analyse transcriptomique réalisée en phase exponentielle révèle en effet l'induction d'une voie putative de biosynthèse d'exo-polysaccharides régulée par des niveaux intracellulaires de diguanosine 3',5'-(cyclic)phosphate cyclique (di-GMP cyclique). L'analyse transcriptomique a aussi montré que le gène *tm0504*, codant pour un polypeptide était sur-exprimé dans la co-culture. De plus, l'ajout

d'un peptide synthétique de séquence identique à la protéique de TM0504, à la culture de *T. maritima* induit la production d'EPS, même à de basses densités cellulaires. Ces résultats montrent l'existence d'une régulation de type quorum-sensing chez *T. maritima* impliqué dans la formation d'EPS en présence de *M. jannaschii* (Johnson *et al.*, 2005).

- ❖ Dans l'environnement, la plupart des bactéries sont en compétition pour des ressources nutritionnelles. Elles sont souvent associées physiquement sous forme de biofilms. C'est le cas de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) et de *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*), un modèle de co-culture qui a été développé dans le but d'identifier les mécanismes moléculaires qui décrivent cette association microbienne. Ces deux bactéries utilisent des systèmes de régulation de type quorum-sensing *via* la production de molécules AHLs (Miller *et al.*, 2001). Ainsi, par la construction de mutants chez *P. aeruginosa* dans la synthèse des acyl-HSL, les auteurs ont démontré en milieu planctonique et en biofilm, que *P. aeruginosa* mettait en place des phénomènes de régulation de type quorum-sensing lui permettant d'être plus compétitif vis-à-vis de *A. tumefaciens* grâce à la production de molécules antimicrobiennes et l'acquisition des nutriments (An *et al.*, 2006). Ainsi, *P. aeruginosa* sécrète des facteurs de virulence incluant des exo-protéases, sidérophores, exotoxines et lipases régulés par quorum-sensing (Parsek *et al.*, 2000). Ces protéases pourraient dégrader les exo-produits de *A. tumefaciens*, afin d'être utilisés comme source de nutriments. De plus, ils ont démontré qu'en biofilms, *P. aeruginosa* recouvrait les micro-colonies de *A. tumefaciens*, grâce à la mobilité faisant intervenir des pili de type-IV, des flagelles et des surfactants sécrétés appelés rhamnolipides, aussi régulés par un système de quorum-sensing (Kohler *et al.*, 2000).

#### Phénomènes de communication inter-espèces:

- ❖ Il a été démontré que des AHL d'une espèce pouvaient être perçues par une autre espèce. *P. aeruginosa* et *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*) forment des biofilms mixtes dans les poumons des personnes atteints de mucovicirose. Ces deux bactéries utilisent des systèmes de quorum-sensing *via* les AHLs comme molécules signal, pour la coordination de l'expression de facteurs de virulence et la formation de

biofilms. Il a été démontré *in vitro* que *B. cepacia* était capable de percevoir et répondre aux molécules AHLs produites par *P. aeruginosa*; par contre, *P. aeruginosa* n'est pas capable de percevoir celles produites par *B. cepacia* (communication unidirectionnelle) (Riedel *et al.*, 2001). Nous pouvons aussi citer l'exemple de *Salmonella enterica*, qui possède un récepteur de signal de la famille LuxR; SdiA, qui est capable de détecter et de répondre à des signaux générés par d'autres espèces microbiennes, comme *Yersenia enterocolitica* (Ahmer, 2004).

#### Des phénomènes de « quorum-quenching »:

Dans des niches écologiques où les populations entrent en compétition pour des ressources limitantes, la capacité des bactéries d'une espèce à déorganiser le quorum-sensing des bactéries d'une autre espèce peut leur conférer un sérieux avantage. Ainsi, il n'est pas surprenant d'observer chez diverses bactéries, les réactions interférant avec le quorum-sensing d'une autre espèce, dans un processus défini par le terme « quorum-quenching ». Le cas le plus étudié concerne la compétition de *Bacillus subtilis* avec des bactéries Gram<sup>-</sup>. Dans le cas des bactéries Gram<sup>+</sup>, peu d'études ont été décrites.

- ❖ De nombreuses espèces de *Bacillus* sécrètent une lactonase, AiiA, qui clive les cycles lactone des AHLs et rendent ainsi l'AHL inactif pour la traduction du signal. AiiA est très peu spécifique, ce qui suggère que cette lactonase peut interférer dans la communication inter-espèces de plusieurs bactéries à Gram<sup>-</sup> (Dong *et al.*, 2001).
- ❖ Des phénomènes de « quorum quenching » ont été décrits notamment dans le cas du couple formé par *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) et *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*), bactéries de la plaque dentaire. Il a été démontré chez *S. mutans* que la formation de biofilms, la tolérance à l'acide et la compétence naturelle étaient régulés par un système de quorum-sensing. Ce système dépend d'un peptide (le « competence-stimulating peptide », CSP) et d'un système à deux composants, codés par les gènes *comCDE* et correspondant au précurseur de CSP, l'histidine kinase (récepteur de CSP) et le réponse régulateur (Cvitkovitch *et al.*, 2003). Wang *et al.* (2005) ont démontré que la production de bactériocines chez *S. mutans* était aussi régulée par le système de quorum-sensing dépendant du peptide CSP. Ils ont observé que l'interaction de *Streptococcus mutans* avec *Streptococcus gordonii* conduisait à une diminution de la production de bactériocines, diminution plus forte en biofilms

qu'en milieu liquide chez *S. mutans*. Les auteurs ont identifié que l'interruption du gène *sgc* de *S. gordonii* atténuait l'inhibition de la production de bactériocines chez *S. mutans*. Le gène *sgc* codant pour une sérine protéase est capable de dégrader le peptide CSP et d'interférer alors avec le système de quorum-sensing de *S. mutans* (Wang *et al.*, 2005).

- ❖ Un autre exemple de « quorum-quenching » est le cas du couple formé par *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Il avait été démontré que *Lactobacillus reuteri* inhibait l'infection par *S. aureus* dans un modèle d'implant chirurgical chez le rat (Gan *et al.*, 2002). Laughton *et al.* (2006) étudièrent la cause de cette inhibition par analyse protéomique de cultures pures de *S. aureus* et de la co-culture avec *L. reuteri*. Une protéine, identifiée comme la « staphylococcal superantigen-like » protéine, SSL11, était produite en quantité inférieure en présence de *L. reuteri*. Il a été démontré, que le surnageant de *L. reuteri* contenaient des petites molécules non identifiées, capables de réprimer SSL11. Cela suggère que cette bactérie peut altérer la virulence de *S. aureus* via la sécrétion de molécules signal (Laughton *et al.*, 2006).

## ***1.2. L'association entre S. thermophilus et L. bulgaricus : une proto-coopération***

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'association bactérienne composée par *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) et *Lactobacillus delbruekii bulgaricus* (*L. bulgaricus*) impliqués dans l'écosystème yaourt.

La fabrication du yaourt repose sur les interactions prenant place entre deux espèces de bactéries lactiques: *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* (Tamine *et al.*, 1999). Souvent, l'association entre ces deux espèces est appelée proto-coopération car elle est bénéfique mais pas indispensable à la croissance de chaque espèce dans le lait (Tamine *et al.*, 1999).

Bien que souvent favorable, cette co-culture peut poser des problèmes, tels que la maîtrise de la croissance de chaque espèce et de la qualité finale du produit suivant le mélange de souches sélectionnées. Les associations des souches sont donc testées pour en choisir les

meilleurs couples. La proto-coopération recherchée, entraîne une stimulation mutuelle qui, se traduit par:

- Un accroissement de la vitesse d'acidification (Amoroso *et al.*, 1998, Bautista *et al.*, 1966, Béal *et al.*, 1991, El-Soda, 1986, Moon, 1976, Pette *et al.*, 1950),
- Un accroissement des niveaux de populations bactériennes finales (Moon, 1976, Pette *et al.*, 1950, Rajagopal *et al.*, 1990),
- Une diminution du pH final du produit (valeur de post-acidification) (Moon, 1976, Rajagopal *et al.*, 1990),
- Une stimulation de la production de composés aromatiques notamment de l'acétaldéhyde (Bottazzi *et al.*, 1973, El-Abbassy *et al.*, 1993, Hamdan, 1971),
- Une meilleure stabilité du produit fini (El-Abbassy *et al.*, 1993),
- Une production plus importante de certains composés comme des polysaccharides extracellulaires (EPS) (Bouzar, 1997).

L'impact technologique de la proto-coopération a déjà motivé plusieurs études visant à identifier les mécanismes impliqués dans ce phénomène. Les facteurs décrits dans la littérature jusqu'à présent sont essentiellement d'ordre nutritionnel (Tableau 2).

Plus précisément, *L. bulgaricus* présente une activité protéolytique plus élevée que celle de *S. thermophilus*, qui lui permet de libérer des acides aminés comme la valine, l'histidine, la glycine, la leucine, l'isoleucine, la méthionine et des di-peptides qui stimulent la croissance de *S. thermophilus* (Accolas, 1971, Bautista *et al.*, 1966, Bracquart *et al.*, 1978, Bracquart *et al.*, 1979, Courtin *et al.*, 2004, El-Soda, 1986, Pette *et al.*, 1950, Rajagopal *et al.*, 1990, Shankar, 1978). Cette forte activité protéolytique fait intervenir la protéase de paroi de *L. bulgaricus* (PrtB) et ceci est confirmé par (Courtin *et al.*, 2002) qui démontrent que la protéase de paroi PrtB de *L. bulgaricus* permet de fournir aux streptocoques les composés azotés nécessaires à leur croissance. Ces auteurs suggèrent, en outre, que PrtB est plus efficace que PrtS, la protéase de *S. thermophilus*.

*S. thermophilus* stimule la croissance de *L. bulgaricus* par la production de certains métabolites comme l'acide formique, le CO<sub>2</sub>, l'acide pyruvique et l'acide folique.

La production d'acide formique par *S. thermophilus* dépend de la souche, du milieu de culture et de la température (Perez *et al.*, 1991, Veringa *et al.*, 1968). Le formate est nécessaire à la synthèse des bases puriques (xanthine, adénine et guanine), précurseurs pour la synthèse des acides nucléiques (Suzuki *et al.*, 1986).

**Tableau 2. Récapitulatif des principales études effectuées sur les facteurs stimulant *L. bulgaricus* ou *S. thermophilus*, d'après Juillard *et al.* (1987).**

Référence	Facteur stimulant <i>L. bulgaricus</i>	Facteur stimulant <i>S. thermophilus</i>	Méthode de mesures
Galesloot <i>et al.</i> (1968)	Formate		Vitesse moyenne d'acidification
Veringa <i>et al.</i> (1971)			
Accolas <i>et al.</i> (1971)	Surnageant de cultures de streptocoques (formiate, adénine)	Surnageant de cultures de lactobacilles	"
Higashio <i>et al.</i> (1978)	Formate et pyruvate	Val, Glys, His, Glu, Leu	Taux de croissance (estimé en culture continue)
Driessen <i>et al.</i> (1982)	Formiate, CO <sub>2</sub> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		Numérations et activité acidifiante
Pette et Lolkema (1950)		Acides aminés (Valine)	"
Bautista <i>et al.</i> (1966)		Activité protéolytique	"
Desmazeaud et Hermier (1973)		Peptides exogènes	"
Moon et Reinbold (1976)		Filtrats de cultures de <i>Lb. bulgaricus</i>	"
Shankar et Davies (1978)		Protéase de <i>Lactobacillus</i>	"
Bracquart <i>et al.</i> (1978)		Glu, Met, Tyr, Cys, Phe, His, Arg	Vitesse d'acidification
Bracquart et Lorient (1979)		Glu-His, His-Glu, Met-His-Glu, Glu-His-Met	"
Radke-Mitchell et Sandine (1984)		Complémentarité entre protéase de <i>Lactobacillus</i> et aminopeptidase de <i>Streptococcus</i>	"

Selon des études portant sur des souches différentes de *L. bulgaricus*, la stimulation de croissance se produit pour des concentrations en acide formique comprises entre 20 et 600 mg/L (El-Abbassy *et al.*, 1993, Galesloot *et al.*, 1968).

*S. thermophilus* produit également du dioxyde de carbone (Ascon-Reyes *et al.*, 1995, Driessen, 1982, Spinnler *et al.*, 1987, Tinson *et al.*, 1982) qui stimule la croissance de *L. bulgaricus*. Ce CO<sub>2</sub> est issu de la décarboxylation de l'urée catalysée par l'uréase (Tinson *et al.*, 1982), présente chez la majorité des souches de *S. thermophilus* (Juillard *et al.*, 1988) mais peu fréquente chez les autres bactéries lactiques. L'uréase est codée par 8 gènes organisés en un seul opéron : *ureIABCEFGD* (Mora *et al.*, 2004). Si le mécanisme d'action du CO<sub>2</sub> sur la croissance du lactobacille n'est pas clairement établi, il a été démontré qu'une des fonctions de l'uréase pour *S. thermophilus* est de fournir de l'ammoniaque pour la synthèse de la glutamine (Monnet *et al.*, 2005). L'activité de l'uréase est modulée par la concentration d'aspartate dans le lait (Arioli *et al.*, 2007), elle atteint son maximum à pH plutôt acide (pH 5,5 – 5,8) (Spinnler *et al.*, 1989). Cette activité a pour conséquence de ralentir la vitesse d'acidification du lait, un effet indésirable en industrie laitière.

Enfin, deux autres facteurs de stimulation de *L. bulgaricus* par *S. thermophilus* ont été mis en évidence. Il s'agit de l'acide pyruvique (Higashio *et al.*, 1978) et de l'acide folique (Rao *et al.*, 1984), cependant, leurs modes d'action ne sont pas encore élucidés.

D'autres facteurs sont impliqués dans la régulation de cette association. On peut citer l'acide lactique, considéré comme le facteur déterminant le rapport entre streptocoques et lactobacilles. En effet, l'acidité du milieu inhibe la croissance de *S. thermophilus* alors que la croissance de *L. bulgaricus* ne s'arrête qu'autour de pH 4,4. Mais cette évolution a également été observée à pH régulé, ce qu'indique que d'autres effecteurs que l'acide lactique interviennent. Il a été établi qu'outre le pH, la température de culture et le niveau relatif d'innoculation des deux espèces modifient la dynamique d'évolution des équilibres de populations (Béal *et al.*, 1991). Cependant, en fin de fermentation les streptocoques dominent quasi systématiquement. En effet, *S. thermophilus* est toujours le principal bénéficiaire de la proto-coopération dont un des effets est d'augmenter la biomasse finale par rapport aux monocultures (Béal *et al.*, 1994, Courtin *et al.*, 2004, Courtin *et al.*, 2002, Pette *et al.*, 1950).



## **2. Les deux bactéries lactiques du yaourt: *S. thermophilus* et *L. bulgaricus***

### **2.1. Les bactéries lactiques : des bactéries impliquées dans les aliments fermentés**

#### **2.1.1. Caractéristiques générales des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques (BL) sont regroupées dans un ensemble dont le nom lui-même est évocateur de leur caractéristique métabolique principale: la production d'acide lactique. Cette capacité est associée à la production majeure d'énergie par fermentation des sucres mais elle confère aussi à ces espèces leur intérêt principal pour la transformation et la conservation des aliments. Les BL peuvent avoir un métabolisme homofermentaire (plus de 90% des produits de fermentation est de l'acide lactique), hétérofermentaire facultatif (production d'acide lactique ou d'acide lactique et d'acide acétique) ou hétérofermentaire strict (production d'acide lactique, d'acide acétique ou d'éthanol et de CO<sub>2</sub>) (Vandamme *et al.*, 1996).

Les BL sont des bactéries à Gram positif qui convertissent le pyruvate en acide lactique pour régénérer le NAD<sup>+</sup> utilisé au cours de la glycolyse. A quelques exceptions près, elles partagent les caractéristiques suivantes : elles sont généralement immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotolérantes et se présentent sous forme de coques ou de bacilles. Elles ne possèdent ni catalase (à l'exception de *L. sakei* et *L. plantarum*), ni nitrate réductase (Vandamme *et al.*, 1996). Pour se développer, elles ont besoin de sources de carbone organique (glucides fermentescibles) et de nombreuses BL ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les vitamines et les acides gras (Prescott *et al.*, 1999).

#### **2.1.2. Utilisation industrielle des bactéries lactiques**

Les BL sont très utilisées dans l'industrie agroalimentaire. Elles peuvent fermenter une grande variété de substrats comme le lait, la viande, les végétaux et les céréales pour produire des aliments très divers: laits fermentés, fromages, saucissons et jambons secs, choucroute, olives, pain au levain, bières (Tableau 3).

**Tableau 3. Principaux produits alimentaires issus de la fermentation par les BL et autres micro-organismes (d'après Corrieu et al., 1994)**

Produits alimentaires	Micro-organismes
Laits fermentés (yaourt, kéfir, koumis...)	Bactéries lactiques, bifidobactéries, levures
Fromages affinés	Bactéries lactiques, micrococcacées, bactéries corynéformes et propioniques, levures, champignons filamenteux
Produits carnés (saucissons secs, saucisses)	Bactéries lactiques, levures, micrococcacées
Produits panifiés (pain au levain...)	Bactéries lactiques, levures
Produits orientaux et exotiques: koji (riz), saké (riz), tempeh (soja jaune)	Bactéries lactiques, levures, champignons filamenteux
Légumes fermentés (chou, concombre, olive)	Bactéries lactiques
Boissons fermentées (vin, cidre, bière)	Bactéries lactiques, levures

Les BL ont plusieurs rôles dans la production d'aliments fermentés. Elles modifient la saveur et la texture de l'aliment du fait de la production d'acide lactique au cours de leur croissance mais aussi celle de composés aromatiques comme l'acétoïne, l'acétaldéhyde, le diacétyle. Elles inhibent également le développement de la flore microbienne indésirable qu'elle soit pathogène ou d'altération, grâce à l'acidification du milieu et à la production de molécules bactéricides (comme les bactériocines), voire antifongiques.

## 2.2. Classification et taxonomie

La première classification des BL a été établie en 1919 par Orla-Jensen, elle réunissait dans un même groupe, des bactéries à Gram<sup>+</sup>, non mobiles, non sporulantes, avec une morphologie bacille ou coque et produisant de l'acide lactique à partir de la fermentation anaérobie des sucres (Stiles *et al.*, 1997). Par la suite, d'autres propositions de classification ont été proposées, notamment celle de Lancefield (1933) proposant des différenciations sérologiques et celle de Sherman (1937) basé sur des caractéristiques physiologiques (Stiles *et al.*, 1997). Ces classifications étaient basées sur des critères phénotypiques, utilisés traditionnellement. Les critères phénotypiques étant la morphologie, l'étude des protéines et leurs fonctions, la gamme de sucres métabolisés, les analyses de la composition de la paroi, le type d'acides gras cellulaires, le type de quinones (accepteur d'électrons) (Vandamme *et al.*, 1996). La détermination de la gamme de sucres métabolisés (tests biochimiques) est encore aujourd'hui très utilisée et répandue grâce aux galeries API<sup>®</sup>. Le principe d'identification par galeries API<sup>®</sup> consiste à identifier les microorganismes par leur capacité à fermenter des

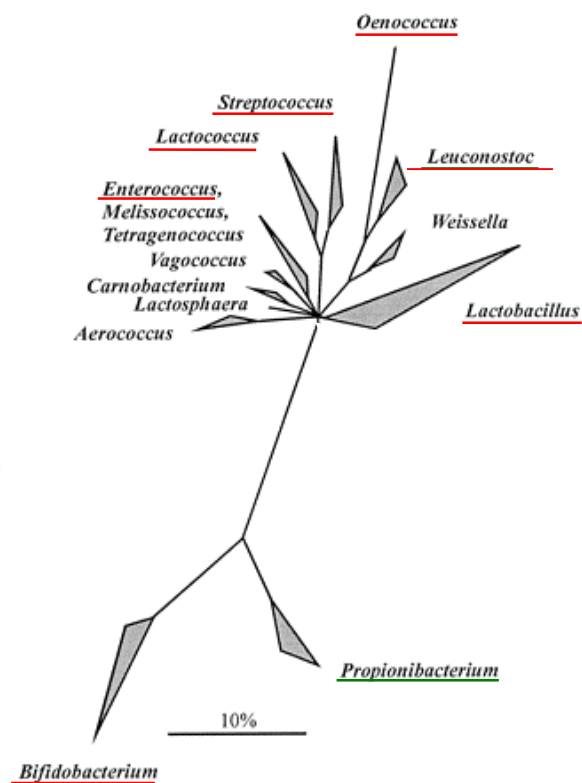
sucres, capacités différentes en fonction des espèces, ce qui permettra ensuite de les identifier par rapport à une base de données établie.

Les approches moléculaires ou l'information génotypique ont révolutionné drastiquement la classification des bactéries lactiques. L'information génotypique provient de l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN), et le pourcentage en G+C ou l'hybridation ADN:ADN sont devenus des méthodes classiques de classification et sont applicables à des analyses taxonomiques de toutes les bactéries. En 1977, Woese et Fox introduisent la phylogénie moléculaire basée sur la séquence des ARN ribosomiques. Cette méthode va révolutionner la taxonomie des bactéries et la classification des BL va être profondément modifiée. La limite de la méthode des ARN ribosomiques est la classification de souches d'une même espèce ou d'espèces très proches. D'autres méthodes sont alors employées : MLST, RAPD, ribotypage, comparaison de profils d'électrophorèse en champs pulsés (ECF ou PFGE pour « pulsed-field gel electrophoresis »).

La technique de MLST (pour Multi Locus Sequence Typing), basée sur la divergence nucléique de gènes de ménage, a été utilisée pour la classification des BL pathogènes, notamment les streptocoques (Enright *et al.*, 1999), mais est maintenant généralisée à d'autres bactéries lactiques. La technique de RAPD (pour Random Amplification of Polymorphic DNA) est une réaction de PCR dans laquelle les segments d'ADN amplifiés ne sont pas choisis à partir de séquences de gènes particuliers mais choisi par l'expérimentateur pour amplifier des séquences génomiques « au hasard ». L'analyse, par électrophorèse des fragments amplifiés donnera un profil particulier, caractéristique de l'ADN de départ. Cette technique permet de comparer les ADN de systèmes biologiques pour lesquels on dispose de peu d'informations, ADN d'espèces peu étudiées ou ADN pour lesquels on dispose de peu de séquences (Williams *et al.*, 1990). La technique de ribotypage est basée sur l'analyse de l'ADN bactérien et permet de faire correspondre à chaque souche son empreinte génétique sous forme d'un simple code-barre. L'ADN est coupé par une enzyme (endonucléase de restriction) choisie selon le germe étudié, pour donner une série de fragments dont le nombre et la taille sont caractéristiques de l'isolat analysé. Ces fragments sont alors séparés en fonction de leur taille, transférés sur une membrane en Nylon et mis en présence d'une sonde nucléique marquée présentant des séquences complémentaires à celles des ADNs transférés sur la membrane. Après détection du marqueur couplé à la sonde, seuls les fragments hybridant à la sonde sont visualisés, générant une empreinte visible sous forme de code-barre. La technique d'électrophorèse en champs pulsés (ECP) est similaire à celle du ribotypage. La différence réside au niveau du choix de l'enzyme, l'ECP étant basée sur l'utilisation

d'enzymes de restriction reconnaissant des sites de coupure « rares », générant un nombre restreint de fragments d'ADN de très grande taille. Après digestion par une endonucléase de l'ADN, les fragments résultant sont séparés selon une technique particulière d'électrophorèse basée sur l'application d'un champ électrique alterné multidirectionnel. Les fragments séparés sont alors révélés par simple coloration pour donner le pulsotype (empreinte génétique) caractéristique de chaque isolat analysé.

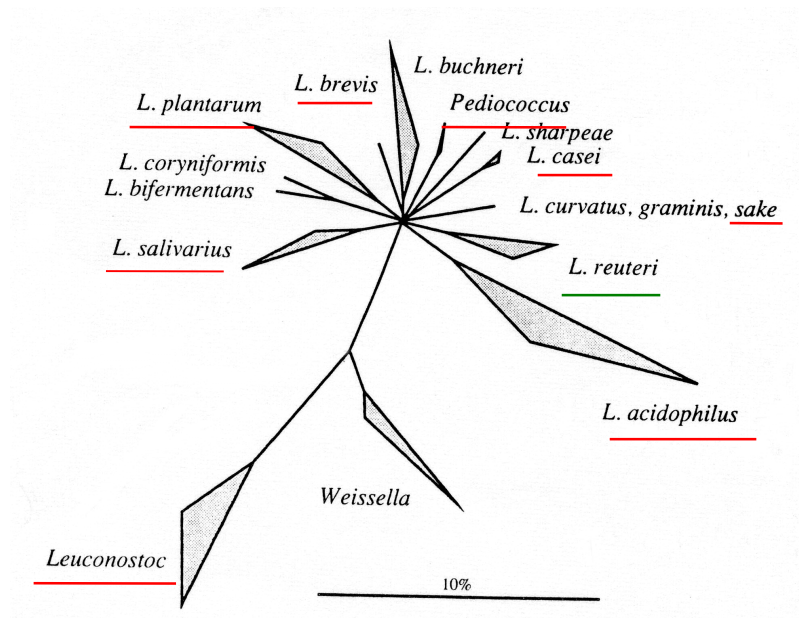
En 1997, Stiles *et al.* (Stiles *et al.*, 1997) proposent une nouvelle classification (figure 2) des bactéries lactiques *sensu stricto* ou l'on peut distinguer quatre groupes phylogénétiques principaux:



**Figure 2: Distances phylogénétiques entre les genres principaux constituant les BL basées sur les séquences des ARNr 16S. Adapté de Schleifer et Ludwig, 1995. (Stiles *et al.*, 1997). La barre indique une divergence de séquence estimée de 10%. Les bactéries à bas G+C (en haut) sont phylogénétiquement éloignées des bactéries à haut G+C (en bas). Sont soulignés en rouge les genres pour lesquels la séquence d'au moins un génome est disponible, en vert ceux pour lesquels au moins un génome est en cours de séquençage.**

- ❖ Le premier groupe est celui des *Enterococcus*. Il comprend les genres *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* et *Aerococcus*. La taxonomie de ce groupe est assez vague et comprend des genres assez divers avec des habitats très différents : des genres isolés des infections chez les humains et les animaux (poules et poissons) et de l'eau d'Antarctique, d'autres utilisés pour la fermentation de sauce de soja (*Tetragenococcus*). Dans ce groupe, l'effort de séquençage des génomes a porté sur les espèces pathogènes opportunistes de l'homme, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*, utilisés comme marqueurs de contamination fécale de l'eau.
- ❖ Les genres *Streptococcus* et *Lactococcus* constituant le deuxième groupe n'ont été séparés qu'en 1985 avec l'apparition du genre *Lactococcus* (Schleifer *et al.*, 1985); ils sont phylogénétiquement proches. *Lactococcus lactis* est une bactérie très utilisée en fermentation fromagère. Le premier génome de BL disponible a été celui d'une souche de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* en 2001 (Bolotin *et al.*, 2004). Dans le genre *Streptococcus*, *S. thermophilus* est la seule espèce utilisée comme ferment dans l'industrie alimentaire, notamment pour la production de yaourt avec *L. bulgaricus*. Ce genre contient un grand nombre d'espèces plus ou moins pathogènes (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. mutans*, *S. agalactiae*...) pour lesquels 26 séquences génomiques sont d'ores et déjà disponibles (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>) (Janvier 2008).
- ❖ Le troisième groupe est formé des genres *Oenococcus*, *Leuconostoc* et *Weissella* (Collins *et al.*, 1993). Dans ce groupe, on retrouve des bactéries très utilisées dans l'industrie agroalimentaire comme *Oenococcus oeni*, bactérie importante dans la production de vin pour la fermentation malolactique ou *Leuconostoc citreum* utilisé pour la fermentation de certains légumes et *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* utilisé dans la production de choucroute et de dextrane.
- ❖ Le quatrième groupe phylogénétique est constitué des genres *Lactobacillus* et *Pediococcus*. Dans le passé ces genres étaient considérés comme très éloignés, mais des études phylogénétiques et chemotaxonomiques ont montré des liens entre eux. Une première classification des lactobacilles a été établie selon le profil fermentaire : homofermentaire strict (groupe I), hétérofermentaire facultatif (groupe II) et hétérofermentaire strict (groupe III). Cependant, cette classification ne permet pas de rendre compte des relations phylogénétiques entre espèces (Schleifer *et al.*, 1995). Les

études basées sur les ARN 16S ont permis de mettre en évidence l'existence de différents groupes phylogénétiques au sein des lactobacilles qui ne se recoupent pas systématiquement avec la classification basée sur les profils fermentaires et divisent les genres *Lactobacillus* en 5 sous-groupes portant le nom de l'espèce type considérée comme la plus représentative du groupe : *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. buchneri* et *L. plantarum* (figure 3) (Schleifer *et al.*, 1995). Le genre *Pediococcus* ne peut pas être différencié du genre *Lactobacillus* par ce type de classification (Collins *et al.*, 1991), et est donc compris dans le groupe *Lactobacillus*.



**Figure 3 : Arbre phylogénétique des groupes principaux du genre *Lactobacillus* basé sur les ARNr 16S. Sont soulignés en rouge les groupes pour lesquels la séquence d'au moins un génome est disponible, en vert ceux pour lesquels au moins un génome est en cours de séquençage. La barre indique une divergence de séquence 16S de 10%. Selon Schleifer et Ludwig (1995).**

Le groupe des BL n'est pas considéré comme un groupe phylogénétique en tant que tel. En effet, ce groupe ne comprend que des bactéries à Gram<sup>+</sup>, mais si la plupart d'entre elles ont de génomes à bas pourcentage en G + C (phylum des Firmicutes), les genres *Bifidobacterium*, *Brevibacterium* et *Propionibacterium* ont des génomes à haut pourcentage en bases G et C.

Ces trois derniers genres ont été ajoutés au groupe de BL en raison de leur utilisation dans le domaine alimentaire. Cet ajout donne une certaine hétérogénéité au groupe des BL dont les membres sont davantage reliés par leur capacité à produire de l'acide lactique et leurs applications alimentaires (Holzapfel *et al.*, 2001, Vandamme *et al.*, 1996).

### **2.3. Les streptocoques : pas uniquement des espèces pathogènes**

Au cours de ces vingt dernières années, plusieurs changements ont été effectués concernant la taxonomie et la nomenclature du genre *Streptococcus* (*S.*). Ces changements résultent des résultats d'expériences d'hybridation ADN/ADN, d'analyses comparatives des régions correspondants aux ARNr 16S et d'autres techniques moléculaires utilisées (Bentley *et al.*, 1991, Schleifer *et al.*, 1991). En 1995, les relations phylogénétiques établies d'après les séquences de l'ARN 16S, proposent au sein du genre *Streptococcus* six groupes : *mutans*, *anginosus*, *pyogenes*, *mitis*, *bovis* et *salivarius* englobant 34 espèces (Kawamura *et al.*, 1995). Des études prenant en compte d'autres critères génétiques, comme l'analyse du polymorphisme du gène de ménage *sodA* (Poyart *et al.*, 1998) et le système Lancefield basé sur le pouvoir hémolytique (Facklam, 2002), ont permis de mieux comprendre la relation phylogénétique très proche existant entre ces différentes espèces. Le système Lancefield pour l'identification de streptocoques est basé sur les différences immunologiques des polysaccharides de la paroi cellulaire (groupes A, B, C, F et G) ou des acides lipotechoïques (groupe D). Parmi ces groupes, les groupes A et B présentent un intérêt spécial du à leur caractère pathogène. *S. pyogenes* est connu comme le beta-hémolytique groupe A *Streptococcus* (GAS). C'est la bactérie la plus pathogène du genre *Streptococcus* et la cause d'une variété d'infections impliquées dans les membranes muqueuses, la peau et des tissus plus profonds incluant la pharyngite, impétigo, pyodermie, syndrome streptococcal toxique, fièvre scarlatine, septicémie, pneumonie et méningite (Cunningham, 2000). *S. pyogenes* n'est pas le seul *Streptococcus* à avoir l'antigène du groupe A, deux autres espèces *S. dysgalactiae* spp. *equisimilis* et *S. anginosus* possèdent des souches avec cet antigène. *S. agalactiae* est le représentant des *Streptococcus* groupe B (GBS). Il est la cause la plus commune d'infection néonatale (Facklam, 2002).

Finalement, en regroupant différents critères, une nouvelle classification des streptocoques du groupe *viridans* a été proposée, avec 26 espèces réparties en 5 sous-groupes: *mutans*, *anginosus*, *sanguinis*, *mitis*, et *salivarius* (Facklam, 2002).

### 2.3.1. *Streptococcus thermophilus*: un streptocoque atypique

*S. thermophilus* appartient au groupe *salivarius* qui comprend aussi les espèces de *S. salivarius* et *S. vestibularis*. Récemment, la diversité génétique de 27 souches de *S. thermophilus* isolées à partir de différentes sources laitières a été déterminée. Grâce à la technique de MLST basée sur la variation de la séquence des nucléotides de 8 gènes de ménage (*ilvC*, *pepO*, *pyrE*, *grcK*, *ddlA*, *thrS*, *dnaE* et *tkl*), il a été démontré une très faible divergence des séquences entre les souches de *S. thermophilus* (en moyenne 0,19%), qui suggère que cette espèce représente une population qui a émergé récemment (Delorme, 2007). De la même façon, 22 souches de *S. salivarius* et 9 souches de *S. vestibularis* isolées à partir de la cavité orale et du sang humain ont été étudiées. Cette étude suggère que des échanges génétiques fréquents entre *S. salivarius* et *S. vestibularis* ont lieu (Delorme *et al.*, 2007). En comparaison avec *S. thermophilus*, la divergence de séquences intra-espèces, c'est-à-dire entre les souches de *S. salivarius* ou entre les souches de *S. vestibularis*, est plus importante (6,6% et 3,6%, respectivement).

*S. thermophilus* est le seul streptocoque isolé des produits laitiers présentant un intérêt industriel au sein du genre *Streptococcus*. *S. thermophilus* est le seul streptocoque du groupe *viridans* à être reconnu comme GRAS (Generally Recognized As Safe). Les autres espèces du groupe *viridans* sont des bactéries commensales de la cavité orale, du tractus gastro-intestinal et des tractus génitaux des mammifères. Les espèces du sous-groupe *salivarius* étaient considérées comme non pathogènes jusqu'à l'implication récente de *S. vestibularis* et *S. salivarius* dans des cas d'endocardite et de méningite (Doyuk *et al.*, 2002, Idigoras *et al.*, 2001); seul *S. thermophilus* n'a pas été impliqué, jusqu'à présent, dans des maladies infectieuses. Le séquençage complet des génomes de trois souches de *S. thermophilus* et leur analyse révèlent l'absence ou l'inactivation des gènes liés à la virulence chez les streptocoques pathogènes (Bolotin *et al.*, 2004, Makarova *et al.*, 2006).

Dans l'industrie agroalimentaire, *S. thermophilus* occupe une place majeure, arrivant en deuxième position après *L. lactis*, dans le classement des bactéries lactiques les plus utilisées. Il est utilisé en industrie laitière en tant que ferment dans la fabrication de produits laitiers tels que le yaourt et les fromages, dont la valeur économique est estimée à 40 milliards de dollars par an (Chausson *et al.*, 2002). *S. thermophilus* est une bactérie homofermentaire stricte, exigeante nutritionnellement, microaérophile et dont la température optimale de croissance est de 42°C, mais elle est capable de croître à une température plus haute (45°C) utilisée dans certains processus de production.



### 2.3.2. Génome de *S. thermophilus*

Les génomes de trois souches de *S. thermophilus*, la souche CNRZ1066, la souche LMG18311 et la souche LMD9 ont été séquencés (Bolotin *et al.*, 2004, Makarova *et al.*, 2006).

Les deux génomes des souches CNRZ1066 et LMG18311 (Bolotin *et al.*, 2004) sont très similaires. Leur chromosome est unique et circulaire et d'une taille de 1,8 Mbp, avec pourcentage en bases G + C de 39%. Chacun de ces génomes code approximativement 1900 CDS dont plus de 90% sont identiques entre les deux souches. Les différences principales concernent les gènes impliqués dans la biosynthèse de polysaccharides extracellulaires (*eps*, *rgp*), la synthèse d'une bactériocine et les gènes d'immunité associés (Bolotin *et al.*, 2004). Les analyses comparatives des deux génomes ont montré que 80% des gènes de *S. thermophilus* sont des orthologues de gènes d'autres streptocoques, ce qui confirme bien la proximité génétique existant entre les différentes espèces de streptocoques (Hols *et al.*, 2005). L'évolution de *S. thermophilus* par la perte de gènes notamment ceux reconnus comme importants pour le pouvoir pathogène de *S. pneumoniae* ou *S. pyogenes* est reflétée par la présence de ces gènes sous une forme non fonctionnelle (pseudogènes) ou par leur absence dans les génomes connus. Au final, la proportion relativement élevée (10-11%) des gènes de *S. thermophilus* correspondant à des pseudogènes, pourrait résulter de l'adaptation de *S. thermophilus* à l'environnement laitier. Ces pseudogènes sont, entre autres, homologues à des gènes impliqués dans le métabolisme carboné, dans le transport et la régulation. Mais cette dégénérescence ne semble pas s'appliquer de la même façon à toutes les souches. Ainsi, la souche LMD9 possède un gène codant pour une protéase de surface, PrtS. Cette protéase, une sérine protéinase de la famille de subtilisines est ancrée à la surface de la paroi via un motif LPXTG (Fernandez-Espla *et al.*, 2000). Cette protéase est similaire à la peptidase C5a retrouvé dans la surface des streptocoques du groupe A qui serait nécessaire à leur virulence via la dégradation du complément C5 du système immunitaire de l'hôte (Cunningham, 2000). Chez *S. thermophilus*, même si cette protéase est similaire à la protéase des streptocoques pathogènes elle n'a pas gardé la même fonction. Elle n'est pas associée à la virulence mais plutôt avec une croissance et un taux d'acidification du lait rapide grâce à l'hydrolyse des caséines du lait en apportant des peptides et acides aminés.

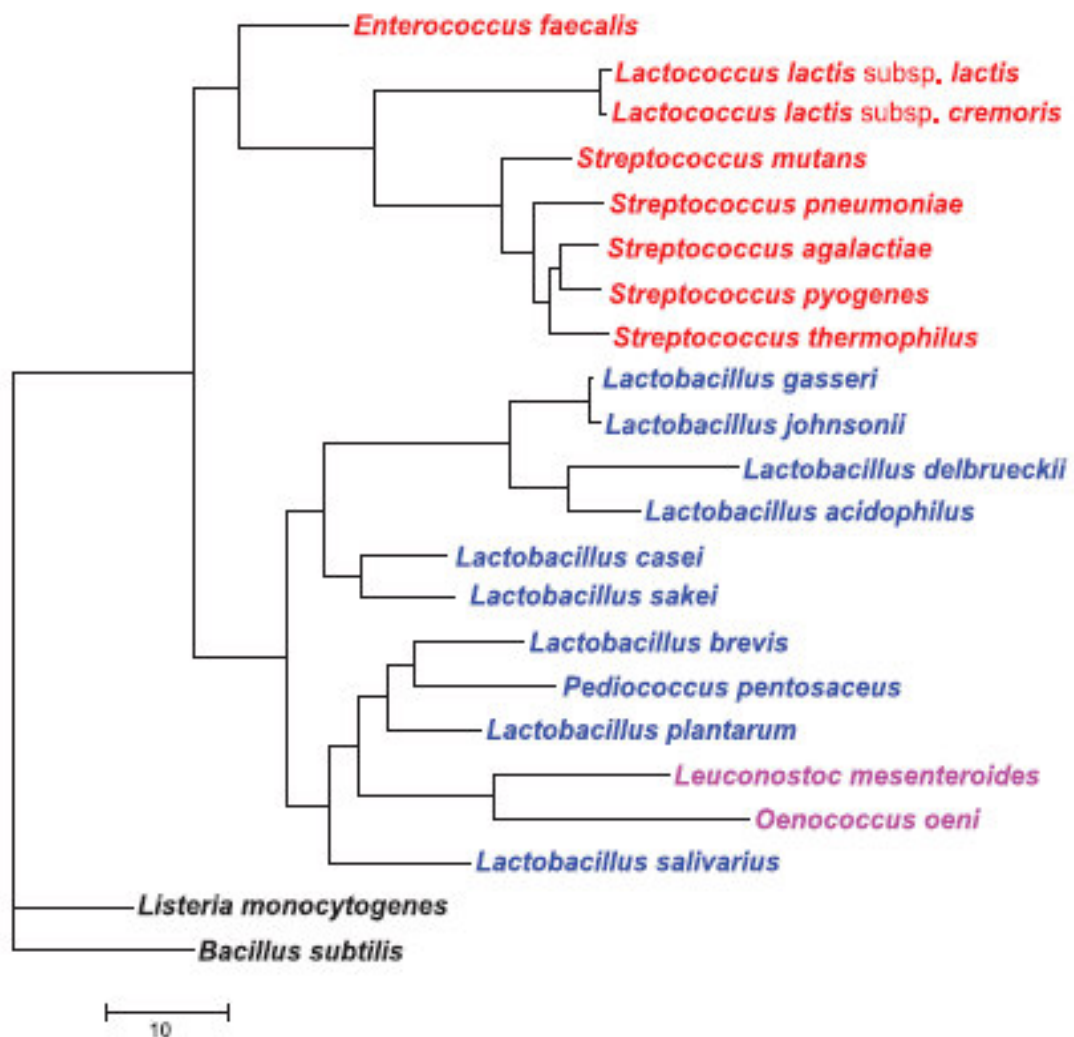
## 2.4. Les lactobacilles : un genre représentatif de la diversité des BL

Les lactobacilles représentent un genre important des BL tant au niveau industriel qu'au niveau de la flore commensale intestinale. Ce genre est très hétérogène, aussi bien sur le plan génétique que sur le plan des habitats colonisés. La grande diversité d'habitats explique que les lactobacilles sont utilisés pour la production de nombreux produits fermentés traditionnels. Ils sont notamment utilisés pour les fermentations lactiques du lait (*L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, ), de la viande (*L. sakei*, *L. plantarum*, *L. curvatus*) ou de produits végétaux (*L. plantarum*, *L. kefir*, *L. brevis*, *L. fermentum*). Certains lactobacilles peuvent être isolés de plusieurs niches écologiques. *L. plantarum*, par exemple se retrouve dans un grand nombre de produits fermentés soit comme levain soit comme contaminant (lait, viandes, légumes) ainsi que dans le tractus digestif humain et dans la salive. Certaines espèces de lactobacilles sont des bactéries commensales de l'Homme. Elles se situent au niveau de la cavité buccale, du tractus digestif et du tractus uro-génital, notamment dans le vagin. Ces bactéries sont importantes pour le maintien de l'équilibre de la flore commensale et donc pour la santé de l'hôte. Un des effets majeurs des lactobacilles sur la santé humaine décrit dans la littérature est leur rôle antagoniste vis-à-vis des bactéries pathogènes (Servin, 2004). Les mécanismes impliqués dans cet antagonisme ont été mis en évidence pour certaines souches de lactobacilles commensaux ou ayant des propriétés probiotiques. Les probiotiques sont définis par la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) comme des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, confèrent un bénéfice pour la santé, au-delà de l'effet nutritionnel. Au sein d'une même espèce, les propriétés probiotiques de souches différentes peuvent être très variables (Isolauri *et al.*, 2004).

Le genre *Lactobacillus* a été proposé par Beijerinck en 1901. Les critères phénotypiques restent encore très importants aujourd'hui pour leur classification (Schleifer *et al.*, 1995). Le genre est composé de plus de 60 espèces et est génétiquement assez divers. Le pourcentage en bases G + C dans leurs génomes varie entre 32 et 54 %.

Plusieurs génomes de lactobacilles ont été séquencés et de nombreux projets de séquençage sont en cours (Liu *et al.*, 2005). Parmi les lactobacilles, la taille du génome varie entre 1,86 Mb à 3,31 Mb pour *L. bulgaricus* et pour *L. plantarum*, respectivement (Liu *et al.*, 2005). En 2007, avec le séquençage de 9 génomes de bactéries lactiques, Makarova *et al.*

proposent une nouvelle classification des lactobacilles en se basant sur l'analyse comparative de génomes (Makarova *et al.*, 2007) (figure 4). Le nouvel arbre phylogénétique a été construit en se basant sur les alignements des 4 sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  et  $\delta$ ) de l'ARN polymérase ADN-dépendante. Cette étude suggère que *Pediococcus* et *Leuconostoc* sont proches et se retrouvent insérés dans le groupe *Lactobacillus*, contrairement à la classification proposée antérieurement où *Leuconostoc* faisait partie du groupe *Oenococcus*.



**Figure 4 :** Arbre phylogénétique du groupe Lactobacilles basé sur des alignements concaténés de quatre sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  et  $\delta$ ) de l'ARN polymérase ADN-dépendante. L'arbre a été construit en utilisant le programme MOLPHY (Adachi *et al.*, 1992). Les espèces sont colorées selon la taxonomie : *Lactobacillaceae*, bleu ; *Leuconostocaceae*, violet, *Streptococcaceae*, rouge. Selon Makarova *et al.* (2007).

### 2.4.1. *L. bulgaricus* fait partie du groupe *acidophilus*

Parmi les différents groupes constituant le genre *Lactobacillus*, le groupe *acidophilus* nous intéresse particulièrement puisqu'il contient l'espèce *L. delbrueckii*, ainsi que *L. acidophilus* et *L. johnsonii*.

*L. bulgaricus* appartient à l'espèce *L. delbrueckii* qui compte trois sous-espèces: *delbrueckii*, *lactis* et *bulgaricus*. *L. delbrueckii* ssp. *lactis* a le spectre fermentaire le plus large et se retrouve chez les végétaux et les animaux (lait, salive, intestin...). Les sous-espèces *delbrueckii* et *bulgaricus* ont des niches écologiques plus spécialisées : les plantes fermentées pour la sous-espèce *delbrueckii* (par exemple, céréales fermentées ou moût de malt) et le lait pour la sous-espèce *bulgaricus* (Tamine *et al.*, 1999).

*L. bulgaricus* est une espèce atypique car elle est particulièrement riche en G + C (49-51%), par rapport aux autres espèces du groupe *L. acidophilus* (34.7%), (Altermann *et al.*, 2005) et *L. johnsonii* (34.6%), (Pridmore *et al.*, 2004). Cette différence est principalement due aux différences du codon en position 3 (GC3) qui est de 65% en bases G et C pour *L. bulgaricus* comparé à 25% et 24,4% respectivement pour *L. acidophilus* et *L. johnsonii*. Il a été démontré que ce groupe est composé d'un squelette structurel assez conservé ce qui indique une relation proche entre ces trois espèces (van de Guchte *et al.*, 2006). Une étude basée sur l'analyse des séquences des ARN ribosomiaux et des certaines protéines, suggère que *L. bulgaricus* et *L. acidophilus* sont phylogénétiquement les plus proches entre les trois espèces, ce qui confirme des analyses des ARN 16S. De plus, cette même suggère que des événements de transferts horizontaux se sont produits entre *L. acidophilus* et *L. johnsonii*, probablement dans le tractus intestinal, habitat commun à ces deux espèces (Nicolas *et al.*, 2007). Plus récemment, avec le séquençage de quelques BL, une nouvelle espèce a été ajoutée à ce groupe, *L. gasseri* qui est plus proche phylogénétiquement de *L. johnsonii* (Makarova *et al.*, 2006) que de *L. acidophilus* et *L. bulgaricus*.

En comparaison avec *L. acidophilus* et *L. johnsonii*, *L. bulgaricus* n'avait pas été considéré comme une espèce probiotique. Le yaourt est à l'origine du concept de probiotique avec le premier effet probiotique avéré : la consommation du yaourt augmente la digestibilité du lactose, notamment chez les personnes intolérantes (Guarner *et al.*, 2005). Cependant, la survie de *L. bulgaricus* dans le tractus digestif reste controversée. Bien que des études montrent qu'il survivrait au transit intestinal (Elli *et al.*, 2006, Lick *et al.*, 2001, Mater *et al.*, 2005) d'autres études ne le confirment pas (del Campo *et al.*, 2005, Pedrosa *et al.*, 1995). Certaines souches de *L. bulgaricus* ont une activité immuno-modulatrice qui a été décrite *in*

*vitro* et *in vivo* (dans un modèle de souris à flore humaine) et, comme pour d'autres espèces probiotiques, varie selon les souches étudiées (Nagafuchi *et al.*, 1999).

Dans l'industrie agroalimentaire, *L. bulgaricus* est utilisée pour la fabrication du yaourt en association avec *S. thermophilus*, et dans la fabrication de fromages tels que la mozzarella. *L. bulgaricus* est une bactérie homofermentaire stricte, exigeante nutritionnellement, microaérophile et dont la température optimale de croissance se situe entre 42 - 45°C. Son pH optimum de croissance se situe autour de 5,5.

#### **2.4.2. Génome de *L. bulgaricus* : un lactobacille adapté au lait**

Récemment, les génomes de deux souches de *L. bulgaricus* ont été séquencés: la souche ATCC11842 originalement isolée d'un yaourt bulgare et la souche BA365 isolée d'un yaourt.

Nous détaillons ci-dessous les caractéristiques de la souche ATCC11842, qui est la souche « type » et pour laquelle une étude approfondie a été réalisée (van de Guchte *et al.*, 2006). Cette souche présente un chromosome unique et circulaire d'une taille de 1.8 Mbp. L'étude réalisée suggère que *L. bulgaricus* est une espèce en évolution et probablement en cours de spécialisation par une adaptation au milieu laitier. Par exemple, le génome de *L. bulgaricus* présente une grande quantité de phases codantes (CDS) annotées comme « fragments ». Ces fragments correspondent à 270 pseudogènes différents, incluant des transposases. Les 227 pseudogènes restants correspondent à 12% du nombre total de séquences codantes. Le grand nombre de pseudogènes, suggère que le génome est en phase active de perte de gènes et donc de réduction de taille du génome. Comme pour *S. thermophilus* il pourrait s'agir d'un processus de spécialisation : l'adaptation au milieu laitier. Les fonctions qui ont été perdues incluent des gènes impliqués dans le métabolisme carboné, la biosynthèse d'acides aminés et de cofacteurs, et dans la compétence naturelle (van de Guchte *et al.*, 2006).

De plus, approximativement 55 à 60% des gènes de *L. bulgaricus* possèdent des homologues chez *L. acidophilus* et *L. johnsonii* et constituent le squelette commun de ces trois génomes proches. Entre 25 et 35% des gènes apparaissent uniques chez *L. bulgaricus*. Par exemple, *L. bulgaricus* possède toutes les enzymes nécessaires à la biosynthèse des purines et la plupart de celles requises pour la biosynthèse des pyrimidines, des fonctions nécessaires pour la croissance en lait alors que la plupart, sont absentes chez *L. acidophilus* et *L. johnsonii*. Inversement, des gènes codant des protéines de fonctions connues comme des systèmes de transport et de métabolisme de sucres sont présentes chez *L. acidophilus* et *L.*

*johnsonii* mais absentes chez *L. bulgaricus* ce qui suggère une adaptation au lactose, le sucre majoritaire du lait (caractéristiques expliqués en section 3).

### ***3. Métabolisme et régulation chez S. thermophilus et L. bulgaricus***

Les BL sont considérées comme l'un des groupes microbiens les plus exigeants du point de vue nutritionnel, car elles requièrent non seulement des substrats complexes carbonés, azotés, phosphatés et soufrés, des acides gras ou des esters d'acides gras, mais aussi des facteurs de croissance comme les vitamines, les bases azotés et les minéraux (Desmazeaud *et al.*, 1994). Parmi les BL, *S. thermophilus* se caractérise par ses relativement faibles exigences nutritionnelles, contrairement à *L. bulgaricus*, considéré comme l'un des plus exigeant (Zourari *et al.*, 1992). Ce chapitre fait le point sur les connaissances acquises jusqu'à aujourd'hui sur le métabolisme carboné et azoté, deux des principaux métabolismes cellulaires qui régissent la croissance de ces deux micro-organismes. De plus, une partie est consacrée à l'implication de systèmes de régulation transcriptionnelle dans l'adaptation de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* aux changements environnementaux, ainsi qu'un point sur le métabolisme de purines et les stress oxydant, phénomènes identifiés au cours de ce travail. L'ensemble de ces données nous permettra de mieux comprendre le comportement individuel ou en association de ces deux espèces

#### ***3.1. Le métabolisme carboné et sa régulation : une préférence marquée pour le lactose***

##### ***3.1.1. Sucres et transport***

La caractéristique principale des BL est la production d'acide lactique à partir d'une source de carbone. Les carbohydrates fermentés en acide lactique par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides tels que des hexoses (glucose, galactose), des pentoses (xylose, ribose, arabinose), des hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccharides (lactose, saccharose, cellobiose, maltose, tréhalose). Le catabolisme du sucre fournit de l'énergie sous forme d'ATP et génère des coenzymes réduits sous forme de NADH

essentiellement. Cependant la quantité d'acide lactique produite est variable en fonction des souches et de l'environnement et d'autres métabolites tels que le formate, l'acétate, l'éthanol et le CO<sub>2</sub> peuvent aussi s'accumuler au cours de la fermentation selon que les souches sont homofermentaires ou hétérofermentaires (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996).

Pour pénétrer dans la cellule, les sucres doivent d'abord franchir la membrane cellulaire qui possède une perméabilité sélective : elle laisse passer les composés apolaires par diffusion mais se révèle imperméable aux composés polaires hydratés. Deux systèmes de transport actifs des sucres sont présents chez les BL: le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant (PTS), qui couple le transport et la phosphorylation du glucide (phosphorylation en cascade), et le système perméase énergie-dépendant, qui fait pénétrer les glucides sous forme de sucres libres (Konings *et al.*, 1994, Thompson, 1987).

#### 3.1.1.1. *Le lactose*

Dans le lait, le lactose est le principal sucre fermentescible utilisable par les BL ; il y est présent à une concentration d'environ 49 g/L et est en excès (Desmazeaud, 1990). La fermentation du lactose fournit l'énergie nécessaire à la croissance des cellules. Elle dépend du métabolisme central qui est essentiel au maintien de l'homéostasie de la cellule bactérienne. Trois étapes sont nécessaires pour l'utilisation du lactose par les bactéries lactiques: i) le transport du sucre (hydrophile) à travers la barrière hydrophobe de la membrane cellulaire, ii) le catabolisme intracellulaire du sucre et iii) la formation et l'expulsion hors de la cellule des métabolites terminaux (Thompson *et al.*, 1994).

Des nombreuses activités PTS sucre-spécifiques ont été mises en évidence chez les BL. Chez *L. lactis*, des gènes codant pour des perméases spécifiques EII<sup>Sucré</sup> ont pu être identifiés sur le chromosome (Bolotin *et al.*, 2001) ou sur des plasmides dans le cas du lactose (de Vos *et al.*, 1990). Chez *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* le système PTS est absent et un système de transport *via* une perméase, LacS, est présent. Ces deux bactéries sont hautement adaptées au lactose comme source carbonée. Le système lactose perméase a d'abord été identifié chez *S. thermophilus* (Benateya *et al.*, 1987) puis chez *L. bulgaricus* (Schmidt *et al.*, 1989). LacS, est une perméase membranaire dépendante de la force promotrice (Poolman *et al.*, 1989). Les gènes de *lacS* de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* présentent plus de 60% d'homologie (Poolman *et al.*, 1989) et codent une protéine transmembranaire de 69 kDa environ. Tous deux appartiennent à la famille des transporteurs du type galactoside-pentose-hexuronique. Ils permettent un transport très efficace du lactose et avec une affinité beaucoup plus faible, du galactose, du raffinose et du mellibiose (Poolman *et al.*, 1992, Poolman *et al.*, 1995).

*In vivo*, LacS catalyse une réaction d'échange lactose/galactose quand les concentrations en galactosides de part et d'autre de la membrane sont élevées. Quand la concentration en lactose est limitante, LacS catalyse la réaction de symport lactose/H<sup>+</sup> dépendante de la force promotrice, du gradient de pH transmembranaire et de la concentration de solutés à l'extérieur de la cellule (galactose) (Foucaud *et al.*, 1992). Des études *in vitro*, ont mis en évidence une différence d'affinité des sites de liaison aux sucres de LacS. En effet, le site de liaison du côté extracellulaire présente une forte affinité pour le lactose et faible pour le galactose. A l'inverse, le site de liaison cytoplasmique présente une forte affinité pour le galactose (Veenhoff *et al.*, 1999).

### 3.1.1.2. Les autres sucres

A part le lactose, ces deux espèces de BL ne sont capables de fermenter qu'un nombre limité de sucres : saccharose, glucose, galactose et fructose pour *S. thermophilus* (les deux derniers seulement par un nombre limité de souches) et glucose, fructose et mannose pour *L. bulgaricus*. Même si des transporteurs potentiels pour le ribose sont présents, *L. bulgaricus* ne peut pas pousser en présence de ce sucre comme seule source carbonée, probablement en raison de la voie des pentoses-phosphates qui est incomplète alors qu'elle est nécessaire pour métaboliser ce sucre.

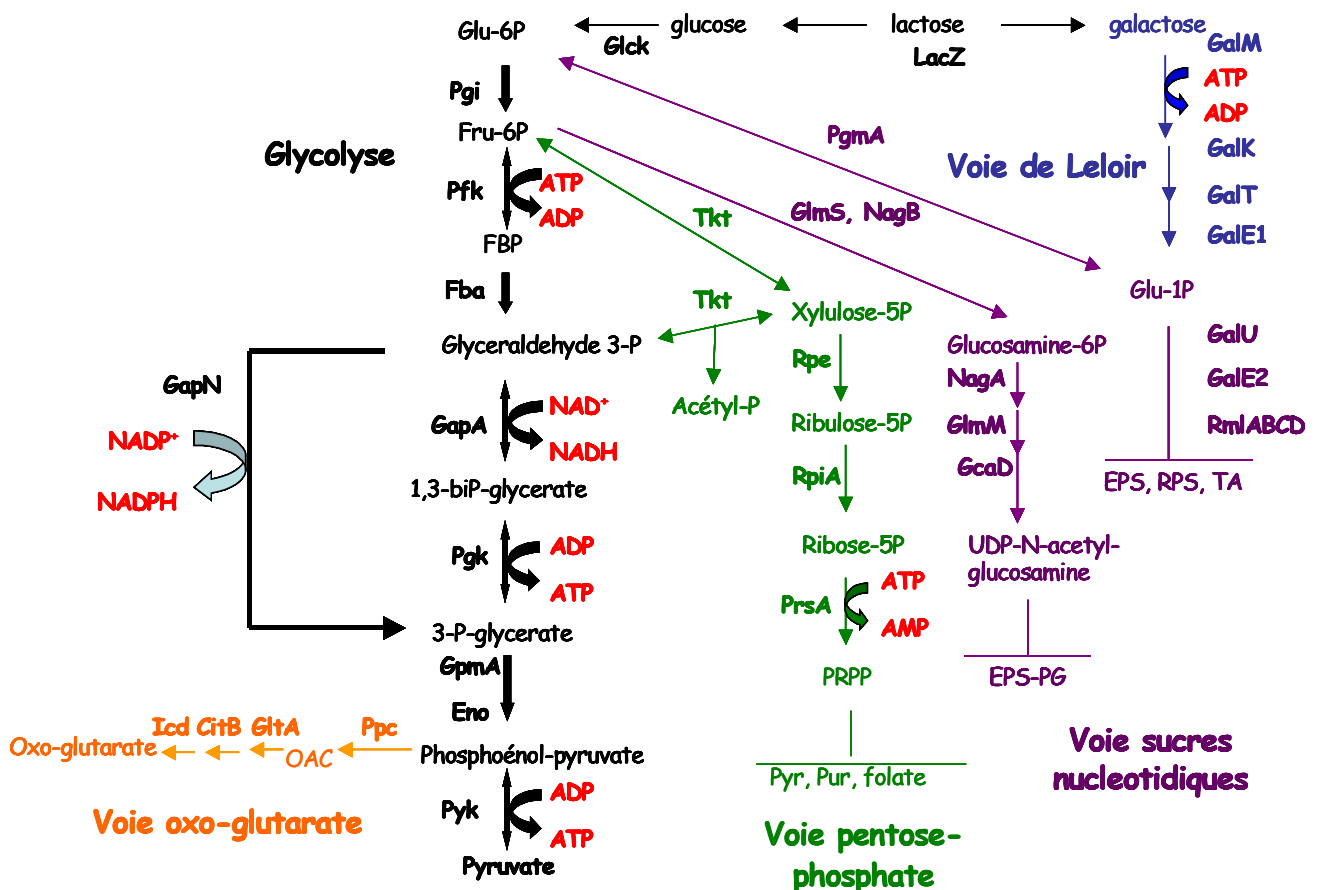
Le saccharose et le fructose sont transportés chez *S. thermophilus* par des systèmes PTS mais avec une moindre efficacité que le lactose, alors que le glucose est un sucre non-PTS et un substrat pauvre pour sa croissance. L'entrée de ces sucres dans la voie glycolytique inclut probablement, une saccharose-6P hydrolase/fructokinase (ScrB, ScrK) pour le saccharose, une fructose-1-P kinase (FruB) pour le fructose et une glucokinase (GlcK) pour le glucose. Chez *L. bulgaricus*, des transporteurs pour le mannose/glucose (PTS IIABCD), le fructose (PTS IIABC), et le glycérol (« glycerol uptake facilitator ») sont présents. En revanche, la plupart des systèmes de transport de sucres apparaissent incomplets chez les deux espèces (cellobiose, maltose, polymères complexes et autres systèmes sans spécificité) ce qui illustre clairement l'évolution de ces deux espèces vers une adaptation au milieu lait via l'utilisation préférentielle du lactose.

### 3.1.2. Métabolisme carboné central

Le lactose entrant dans la cellule par le système LacS, comme chez *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, est hydrolysé en glucose et galactose grâce à l'enzyme  $\beta$ -galactosidase (LacZ). Le lactose entrant dans la cellule par le système PTS comme dans le cas de *L. lactis*, utilisera



une phospho- $\beta$ -galactosidase. Le glucose est catabolisé par les enzymes de la glycolyse (ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas) et le galactose est soit rejeté à l'extérieur de la cellule, soit métabolisé par la voie de Leloir générant du glucose-1-phosphate qui après conversion en glucose-6-phosphate peut être utilisé par la voie de la glycolyse (figure 5).



**Figure 5. Métabolisme carboné central chez *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* (selon Hols et al. (Hols et al., 2005) et Penaud (Penaud, 2006)).**

**Glycolyse** (en noir): Eno: 2-phosphoglycerate deshydratase enolase, Fba: fructose diphosphate aldolase, GapA: glyceraldehyde-3-P déshydrogénase, GapN: NADP- dépendante glyceraldehyde-3-P déshydrogénase, GpmA: phosphoglycerate mutase, Pfk: 6-phosphofructokinase, Pgi: glucose 6-phosphate isomerase, Pkg: phosphoglycerate kinase, Pyk: pyruvate kinase. **Voie pentose-phosphate** (en vert): PrsA1: ribose-phosphate pyrophosphokinase, Rpe: ribulose-phosphate, RpiA: ribose-5-phosphate isomerase, Tkt: transketolase. **Voie de Leloir** (en bleu): GalM: aldose 1-épimérase; GalK: galactokinase, GalT: galactose 1-phosphate uridylyltransferase, GalE1: UDP-glucose 4-épimérase. **Biosynthèse d'oxoglutarate** (orange): CitB: aconitase hydratase, GltA: citrate synthase, Icd: isocitrate deshydrogenase, Ppc: phosphoénolpyruvate carboxylase. **Biosynthèse des sucres et aminosucres nucléotidiques** (violet) : GalE2: UDP-glucose 4-épimérase, GalU: UDP-glucose pyrophosphorylase, PgmA: phosphoglucomutase, RmlA: glucose-1-phosphate thymidyl transferase, RmlB: dTDP-glucose-4,6-dehydratase, RmlC: dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-épimérase, RmlD: dTDP-4-keto-L-rhamnose reductase, GcaD: UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase, GlmM: phosphoglucoamine mutase, GlmS: glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransférase, NagA: N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase, NagB: glucosamine-6-phosphate isomérase.

*S. thermophilus* et *L. bulgaricus* empruntent la glycolyse dans sa totalité, du glucose-6-P jusqu'au pyruvate en 9 étapes enzymatiques. La glycolyse conduit, en condition optimale de croissance, à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose (Thompson, 1987). Deux isomères de lactate, le L ou le D-lactate peuvent exister, synthétisés par une L ou une D-LDH. *S. thermophilus* possède une L-LDH alors que *L. bulgaricus* ATCC11842 possède deux gènes codant pour une L-LDH (*ldh*, Ldb0120) et pour une D-LDH (*ldhA*, Ldb0101) pour régénérer le NAD<sup>+</sup>. La souche BA365 de *L. bulgaricus* possède seulement le gène *ldh*.

Les deux espèces, possèdent l'enzyme GapN, qui est courante chez les Streptocoques mais pas chez les Lactobacilles. GapN catalyse la formation de 3-P-glycérate à partir du glycéraldéhyde-3-P sans passer par l'intermédiaire 1,3-diphosphoglycérate. Cela conduit à une production de NADPH sans production d'ATP (figure 5). Chez *S. mutans*, il a été suggéré que le rôle de GapN serait de produire du NADPH car cette bactérie ne possède pas les autres enzymes appartenant à la voie des pentoses-phosphates (Boyd *et al.*, 1995). GapN pourrait aussi être impliquée dans un niveau additionnel de régulation de la glycolyse, pour l'ajustement des flux métaboliques et énergétiques (Arutyunov *et al.*, 2003).

*S. thermophilus* possède un gène codant pour une transketolase (*tkt*, figure 5), qui connecte la glycolyse à la voie des pentoses-phosphates. Cette voie permet la production de 5-phosphoribosyl diphosphate (PRPP), le précurseur de la biosynthèse *de novo* des purines, pyrimidines et folate. *L. bulgaricus* ne possède pas cette enzyme, même si les gènes de la voie des pentoses-phosphates sont présents et intacts. En revanche, deux gènes codant pour des enzymes appartenant à cette voie, la *gpd* (glucose-6-phosphate 1-déshydrogénase, E.C. 1.1.1.49) qui catalyse la production de gluco-1,5-lactone 6P à partir du glucose 6-P, et la *gnd* (phosphogluconate déshydrogénase, E.C. 1.1.1.44) qui catalyse la production de ribulose 5-P à partir de 6-phospho-D-gluconate sont présents chez *L. bulgaricus* mais absentes chez *S. thermophilus*. Ces deux enzymes produiront du NADPH.

Le galactose est métabolisé par la voie de Leloir. Quatre enzymes permettent la conversion du galactose en glucose-1-phosphate, métabolite intermédiaire de la glycolyse (de Vos, 1996, Poolman *et al.*, 1990) : GalM (aldose 1-épimérase), GalK (galactokinase), GalT (galactose-1-phosphate-uridyl-transférèse) et GalE (UDP-galactose-4-épimérase). Les quatre gènes codent 4 enzymes formant un opéron (*galKTEM*) qui se trouve en aval des gènes d'utilisation du lactose, *lacS* et *lacZ*. Le glucose-1-phosphate est le précurseur des sucres nucléotidiques (UDP-glucose, UDP-galactose et TDP-rhamnose) nécessaires à la biosynthèse

des exo-polysaccharides (EPS) et des rhamnose-polysaccharides (RPS), via l'activité de GalU (UDP-glucose pyrophosphorylase), GalE et RmlABCD. Alors que les deux espèces utilisent le glucose, le galactose est généralement non métabolisé et excrété dans le milieu extracellulaire par LacS (Hutkins *et al.*, 1985). *L. bulgaricus* ne possède pas les enzymes nécessaires pour l'utilisation du galactose. En revanche certaines souches de *S. thermophilus* peuvent métaboliser le galactose et même, il a été remarqué que des souches de *S. thermophilus* Gal<sup>-</sup> (ne métabolisant pas le galactose) possédaient les gènes de la voie de Leloir. Pour ces dernières souches, il a été établi qu'une trop faible activité de la galactokinase (GalK) pourrait être la cause d'une utilisation inefficace du galactose (van den Bogaard *et al.*, 2004, Vaughan *et al.*, 2001).

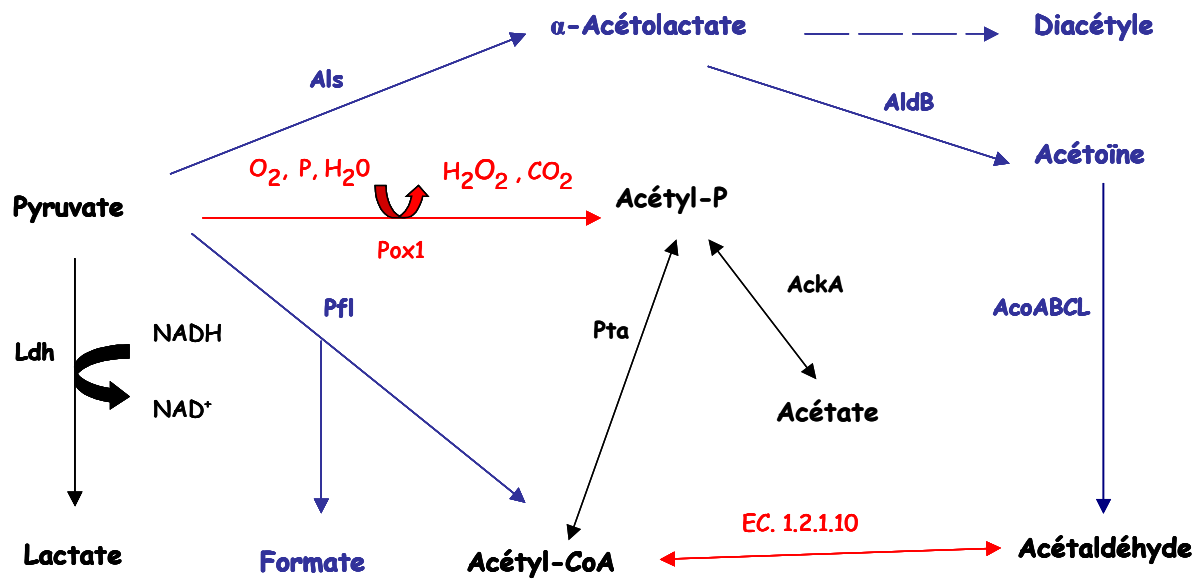
Deux autres voies métaboliques sont présentes (figure 5). La voie de la conversion du phosphoénol-pyruvate en 2-oxo-glutarate, composé clé dans la biosynthèse de nombreux acides aminés, fait intervenir, chez les streptocoques une phosphoenolpyruvate carboxylase potentielle (Ppc) et trois gènes du cycle TCA (*glTA*, *citB*, *icd*) (Hols *et al.*, 2005). La voie de production de la UDP-N-acetyl glucosamine, précurseur du peptidoglycane et des EPS, fait intervenir *nagA*, *glmM* et *gcaD* (Hols *et al.*, 2005). *L. bulgaricus* possède le gène *ppc*, mais les trois gènes du cycle TCA sont absents. Par contre, les gènes nécessaires pour la production de UDP-N-acetyl glucosamine sont présents.

### 3.1.3. Utilisation du pyruvate

Trois enzymes impliquées dans l'utilisation du pyruvate sont présentes chez *S. thermophilus* : la L-lactate dehydrogenase (Ldh), la pyruvate-formate lyase (Pfl et son enzyme activatrice PflA) et l'alpha-acétolactate synthase (Als). Chez *L. bulgaricus*, à part la Ldh, une pyruvate oxydase (Pox1) est présente et produit de l'acétyl-phosphate à partir du pyruvate, en générant de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub> (figure 6).

La lactate déshydrogénase catalyse la conversion du pyruvate en lactate et permet l'oxydation d'un NADH en NAD<sup>+</sup>. En condition de métabolisme homolactique, cette voie permet aussi de ré-oxyder la majeure partie du NADH. L'inactivation du gène *ldh* chez *S. thermophilus* a été testée par différentes approches, mais sans succès. Son inactivation est probablement létale pour la cellule, étant donné qu'il n'existe pas de voie alternative pour la régénération du NAD<sup>+</sup> à partir du pyruvate (Hols *et al.*, 2005).

La pyruvate formate lyase (Pfl) catalyse le clivage non oxydatif du pyruvate en formate et en acétyl-CoA selon un mécanisme radicalaire (Knappe *et al.*, 1990).



**Figure 6.** Dissipation du pyruvate par *S. thermophilus* (en bleu) et *L. bulgaricus* (en rouge). En noir les voies de dissipation utilisées par les deux bactéries, selon Hols *et al.* (Hols *et al.*, 2005) et van de Guchte *et al.* (van de Guchte *et al.*, 2006). Ldh: lactate déshydrogénase; Pta : phosphate acétyltransférase; AckA : acétate kinase; Als: acétolactate synthase; Pfl: pyruvate-formate lyase; AldB :  $\alpha$ -acétolactate décarboxylase; AcoABCL : complexe acétoïne déshydrogénase; 1.2.3.3 : Pox1 pyruvate oxydase; 1.2.1.10 : acétaldéhyde déshydrogénase

L'activité de la pyruvate formate lyase est très fortement inhibée par l'oxygène (Takahashi *et al.*, 1987), qui dénature irréversiblement l'enzyme par clivage de la protéine (Melchiorson *et al.*, 2000). Il a été démontré récemment que la Pfl est fortement induite lors de la croissance en lait de *S. thermophilus* (Derzelle *et al.*, 2005). Le formate produit est probablement impliqué dans la biosynthèse des purines. De plus, le formate stimule la croissance de *L. bulgaricus* et pourrait intervenir lors de la proto-coopération (Galesloot *et al.*, 1968).

L'acétolactate synthase catalyse la conversion du pyruvate en  $\alpha$ -acétolactate, probablement impliqué dans la production de diacétyle, acétoïne et acétaldéhyde chez *S. thermophilus*, des composés impliqués dans la flaveur des yaourts. Chez *L. bulgaricus*, la production d'acétaldéhyde est réalisée à partir de l'acétyl-CoA. L'acétaldéhyde est le composant principal de la flaveur du yaourt et est produit particulièrement par le lactobacille (Pette *et al.*, 1950). Il a été décrit que l'association entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* stimule la production de composés aromatiques, notamment l'acétaldéhyde (Bottazzi *et al.*, 1973, El-Abbassy *et al.*, 1993, Hamdan, 1971).

En présence d'oxygène, aucune des deux espèces ne pourra produire de l'acétyl-CoA à partir du pyruvate car ni *S. thermophilus*, ni *L. bulgaricus* possèdent l'enzyme pyruvate déshydrogénase (Pdh) qui catalyse la réaction de décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA. *L. bulgaricus*, qui ne possède aucun moyen direct pour la production d'acétyl-CoA, pourrait emprunter des voies alternatives, comme la production d'acétyl-P qui subséquentement pourra être converti en acétyl-CoA. L'acétyl-P pourrait être produit par la pyruvate oxydase ou à partir d'acétate par l'acétate kinase (Chervaux *et al.*, 2000) (figure 6).

### 3.1.4. Régulation du métabolisme carboné

La régulation du transport des sucres et le flux glycolytique mettent en jeu la phosphorylation de la protéine HPr ainsi que le régulateur de transcription CcpA (catabolite control protein). HPr et CcpA ont surtout été étudiées chez *B. subtilis* mais semblent être conservées chez toutes les bactéries à Gram<sup>+</sup>. La protéine CcpA interagit avec une séquence d'ADN appelée *cre* (élément de répression catabolique) en présence de la protéine HPr phosphorylée sur la sérine 46 et de fructose-1,6-bisphosphate (FDP) (Hueck *et al.*, 1995, Stulke *et al.*, 2000, Weickert *et al.*, 1990). La phosphorylation différentielle de HPr en histidine (His15) HPr(his)P et/ou en sérine (Ser46) HPr(ser)P représente la clé déterminante dans le métabolisme carboné chez la plupart des bactéries Gram<sup>+</sup>. En effet, ces 2 formes différentes de HPr ne sont pas présentes au même moment durant la croissance car l'une dépend de la concentration intracellulaire de certains intermédiaires de la glycolyse et l'autre de la concentration en ATP. Le complexe CcpA-HPr(ser)P est stabilisé par le FDP (Deutscher *et al.*, 1995) et se fixe sur les sites *cre* provoquant ainsi la répression, l'avortement ou l'activation de la transcription du gène selon que le site *cre* est dans, en aval ou en amont du promoteur. Chez *S. thermophilus*, le gène *lacS*, est réprimé par CcpA (Gunnawijk *et al.*, 2000). De même, Luesink et coll. (Luesink *et al.*, 1998) ont mis en évidence chez *L. lactis*, un contrôle négatif de l'expression de l'opéron *gal*, responsable de l'assimilation du galactose, par CcpA, alors qu'elle active l'opéron *las* codant pour des enzymes glycolytiques (*pfk-pyk-ldh*).

Plusieurs niveaux de régulation du transport du lactose chez *S. thermophilus* existent. D'une part une régulation de l'activité du transporteur lui-même et d'autre part une régulation transcriptionnelle modulée entre autres par les protéines CcpA et GalR. L'expression des gènes de l'opéron lactose est induite quand les cellules poussent dans un milieu contenant du glucose ou du galactose. En particulier la transcription de l'opéron *lacSZ* est activée par

l'activateur GalR (Vaughan *et al.*, 2001). Ces gènes *lacSZ* sont également réprimés par CcpA au niveau transcriptionnel (van den Bogaard *et al.*, 2000). Cette régulation implique donc la voie de la glycolyse et la voie de Leloir et est associée aux performances du mécanisme de transport du lactose. En excès de lactose, il est toujours observé une utilisation complète du glucose issu de l'hydrolyse du lactose alors que le galactose n'est utilisé qu'en faible partie (voie plus lente) et rejeté dans le milieu de croissance, même si la souche est Gal<sup>+</sup>. Au contraire, quand le lactose est limitant, le glucose et le galactose issus de l'hydrolyse du lactose sont utilisés dans les mêmes proportions. Cela résulte de l'action de GalR et de la régulation catabolique exercée par CcpA (Vaughan *et al.*, 2001)

Chez *L. bulgaricus* les gènes codant Hpr et CcpA sont présents dans le génome de la souche ATCC 11842 et des sites *cre* putatifs sont détectés en amont de différents gènes associés au métabolisme carboné et notamment dans les promoteurs de *pfk*, *pyk*, *eno*, *gpmA*, codant des enzymes de la glycolyse, de *ccpA*, de l'opéron formé par *ptsH* codant pour la protéine Hpr, et *ptsI* codant pour la protéine phospho-énolpyruvate phosphotransférase HprK, et en amont d'un gène codant une sous-unité IIA du système de transport PTS  $\beta$ - glucoside (Penaud, 2006). Par contre, l'absence de séquence *cre* en amont du gène *lacS* de *L. bulgaricus* expliquerait que ce système soit constitutivement exprimé en présence ou non de lactose contrairement à *S. thermophilus* (Poolman, 1993).

### 3.2. Le métabolisme azoté et sa régulation

Contrairement au métabolisme carboné, le métabolisme azoté de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* n'est que partiellement connu. Les nombreuses études réalisées dans ce domaine chez *L. lactis* ont permis de définir les fonctions essentielles à la nutrition azotée de ces micro-organismes dans le lait (den Hengst *et al.*, 2005, Foucaud *et al.*, 1992, Guedon *et al.*, 2001, Hagting *et al.*, 1994, Juillard *et al.*, 1998, Tynkkynen *et al.*, 1993).

Le lait de vache contient en moyenne 34 g/L de composants azotés répartis en deux fractions suivant leur solubilité dans l'acide trichloracétique à 12%. La fraction soluble correspond à la fraction azotée non protéique: acides aminés libres et petits peptides, vitamines du groupe B, bases azotées et urée. La fraction insoluble est constituée de molécules azotées de haut poids moléculaire: peptides de tailles supérieures à huit résidus d'acides aminés, caséines et protéines solubles passées dans le lait lors de la sécrétion par les glandes mammaires (Desmazeaud, 1990). Les sources azotées du lait utilisées par les BL comprennent les acides aminés, les peptides et les caséines. Les acides aminés (sont les

composants des protéines) non seulement participent à de nombreuses fonctions cellulaires (Saier, 2000), mais ils sont aussi des précurseurs de composés aromatiques d'importance dans les produits laitiers (Yvon *et al.*, 1997).

Le lait comprend de la majorité des facteurs de croissance nécessaires aux BL mais parfois en quantités limitantes pour la croissance des BL qui n'est donc pas toujours optimale dans le lait (Desmazeaud, 1990). Les BL sont auxotrophes pour plusieurs acides aminés (selon les souches et les espèces). Le lait étant pauvre en acides aminés libres et petits peptides, leur croissance optimale repose sur leurs capacités de biosynthèse *de novo* des acides aminés et d'hydrolyse des caséines en peptides et acides aminés (Savijoki *et al.*, 2006).

### 3.2.1. Exigences en acides aminés

Chez les BL, les exigences en acides aminés sont très variables suivant les espèces et les souches. L'inactivation de certains gènes de la biosynthèse d'acides aminés pourrait résulter de l'adaptation des BL à leur environnement (Chopin, 1993, Morishita *et al.*, 1981). Cette hypothèse expliquerait au moins en partie pourquoi les exigences en acides aminés varient d'une souche ou d'une espèce à l'autre, étant donné leurs utilisations très variées. Par exemple, l'acide glutamique est l'acide aminé présent en plus grande quantité dans le lait, et aucune souche de BL isolée du lait n'est capable de croître en absence d'acide glutamique et de glutamine. De même, la plupart des BL exige pour se développer la présence des trois acides aminés à chaîne ramifiée, qui sont présents en faible quantité sous forme libre dans le lait mais très fréquents dans les caséines.

Quelques études ont permis de cerner les exigences en acides aminés de BL thermophiles. La prototrophie apparente pour un acide aminé en présence de tous les autres ne signifie pas pour autant que les gènes codant pour la biosynthèse de cet acide aminé soient fonctionnels. En effet, un acide aminé peut provenir de la conversion d'un autre acide aminé grâce à la dégradation de ce dernier et de l'utilisation des composés carbonés issus du métabolisme central (Bracquart *et al.*, 1978). Chez *S. thermophilus*, la glutamine peut remplacer l'acide glutamique alors que l'absence des deux ne permet plus la croissance. De façon similaire, la méthionine peut être omise en présence de cystéine alors qu'il n'y a plus de croissance quand les deux sont absents du milieu de culture (Bracquart *et al.*, 1979, Neviani *et al.*, 1995). Les besoins en acides aminés peuvent résulter de l'absence de gènes fonctionnels de biosynthèse mais aussi de mécanismes de régulations spécifiques. Bracquart *et al.* (Bracquart *et al.*, 1979) ont observé de forts effets antagonistes entre les trois acides aminés à chaîne ramifiée sur la croissance de *S. thermophilus* CNRZ302. Alors que la croissance de la

souche était possible en l'absence de ces trois acides aminés, elle n'était plus observée en absence de valine. Cela résultait d'une inhibition forte par l'isoleucine de la biosynthèse de la valine et dans une moindre mesure de celle de la leucine. Cela a été aussi démontré pour la souche de *S. thermophilus* St18, pour laquelle l'ajout de isoleucine et/ou leucine dans le milieu comme seuls acides aminés branchés diminue le taux de croissance de la bactérie (Garault *et al.*, 2000).

Les souches de *S. thermophilus* présentent généralement moins d'exigences en acides aminés que *L. bulgaricus*. Alors que quelques souches de *S. thermophilus* sont prototrophes pour les acides aminés, d'autres souches sont auxotrophes pour au moins quatre d'entre eux. Différentes expériences d'omission d'acides aminés ont montré que l'absence de glutamate et glutamine (en même temps) ou des deux acides aminés soufrés arrête la croissance de *S. thermophilus*, montrant que ces voies de biosynthèse ne sont pas complètement fonctionnelles (Letort *et al.*, 2001). De plus, il a été démontré que des acides aminés comme la leucine, la valine, la méthionine et la cystéine stimulent la croissance de *S. thermophilus* (Garault *et al.*, 2000, Letort *et al.*, 2001, Monnet *et al.*, 2003, Neviani *et al.*, 1995). Chez *L. bulgaricus*, l'omission de la glutamine, l'asparagine et la thréonine conduit à une réduction significative de la croissance. Cet effet est aussi observé dans une moindre mesure après omission de l'acide aspartique, l'acide glutamique et la glycine. Le reste des acides aminés est essentiel pour sa croissance (Chervaux *et al.*, 2000, Grobber *et al.*, 1998).

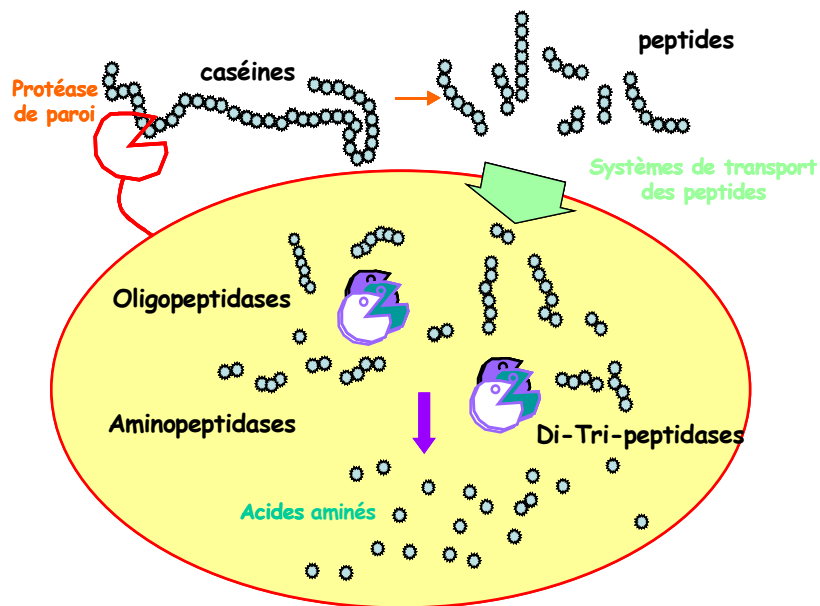
### 3.2.2. *Système protéolytique*

*S. thermophilus* et *L. bulgaricus* possèdent un système protéolytique similaire à celui rencontré chez d'autres BL (figure 7) utilisées en industrie laitière. Il est composé i) d'une protéase extracellulaire capable de dégrader les caséines, ii) d'un ensemble de systèmes de transport pour des acides aminés et des peptides, iii) d'une série de peptidases intracellulaires nécessaires à la dégradation de peptides et de peptides dérivés des caséines (Hols *et al.*, 2005, van de Guchte *et al.*, 2006).

#### 3.2.2.1. *Protéases de paroi*

Les caséines constituent la source d'acides aminés la plus importante du lait, puisqu'elles représentent 80% des protéines du lait. Elles sont organisées en micelles qui sont des composés solubles complexes associant les caséines et des ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Quatre types de caséines ont été identifiés:  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ , elles diffèrent par leur tailles (Schmidt, 1982).





**Figure 7. Système protéolytique des bactéries lactiques.**

Ces macromolécules sont trop grandes pour pouvoir être internalisées par un système de transport et une étape préalable d'hydrolyse extracellulaire effectuée par des protéases de surface doit être réalisée.

La plupart des souches de *S. thermophilus*, contrairement à *L. bulgaricus*, ne possèdent pas de protéase extracellulaire capable de dégrader les caséines du lait (Shahbal *et al.*, 1991). Quand elle est présente, comme dans le cas de la souche LMD9, la protéase de paroi PrtS est une protéine appartenant à la sous-famille de protéases à serine de la famille des subtilines (Fernandez-Espla *et al.*, 2000). PrtS est liée de façon covalente au peptidoglycane grâce au motif LPxTG reconnu par la sortase chez les bactéries à Gram positif.

La protéase de *L. bulgaricus*, PrtB, appartient à la sous-famille de protéases à serine de la famille des subtilines (Gilbert *et al.*, 1996). Contrairement à PrtS de *S. thermophilus*, son maintien à la surface cellulaire est assuré par un domaine traversant la paroi, riche en acide aminés basiques, permettant des interactions électrostatiques avec le peptidoglycane (Laloi *et al.*, 1991).

En co-culture *S. thermophilus* / *L. bulgaricus*, il a été démontré que quand les deux espèces possèdent une protéase de paroi, c'est celle du lactobacille qui se met en place. Un mutant négatif PrtS<sup>-</sup> de *S. thermophilus* présente une croissance similaire en co-culture par rapport à la souche sauvage en co-culture. Par contre un mutant négatif de la protéase de paroi PrtB<sup>-</sup> de *L. bulgaricus* affecte la croissance de la co-culture. Cela suggère que la protéase de paroi PrtB est probablement plus efficace que la protéase PrtS de *S. thermophilus* (Courtin *et al.*, 2002).

### 3.2.2.2. Les peptidases

Les peptides sont internalisés par de systèmes de transport appropriés et dégradés par des peptidases à l'intérieur de la cellule. L'utilisation des peptides par les BL thermophiles dépend donc de la nature de leur systèmes de transport de peptides et de leur équipement peptidasique.

Une grande diversité de peptidases est retrouvée chez les BL. Elles peuvent être classées en exopeptidases ou endopeptidases. Les exopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques à partir des extrémités amino (N)- ou carboxy (C-) terminales de chaînes polypeptidiques et permettent de libérer un à deux acides aminés (désignées aussi comme des aminopeptidases et carboxypeptidases respectivement). Les dipeptidases ou tripeptidases sont donc des exopeptidases de type aminopeptidases. Les endopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques à l'intérieur de l'oligopeptide. Sur la base de leur spécificité, on distingue les endopeptidases générales dont la spécificité est large (PepN, PepC, PepV et PepD) et les endopeptidases spécifiques dont la spécificité de substrat est plus étroite (PepS, PepL, PepG, PepW et PepT) voire spécifique d'un acide aminé comme de la proline (PepX, PepI, PepQ et PepR) ou des acides aminés acides (PepA).

*S. thermophilus* et *L. bulgaricus* possèdent chacun, une vingtaine de peptidases (Hols *et al.*, 2005, Penaud, 2006).

Même si quinze peptidases différentes de *S. thermophilus* ont été détectés par chromatographie (Rul *et al.*, 1997), seul un nombre limité d'endo- et aminopeptidases ont été caractérisées (PepA, PepC, PepN, PepO, PepS et PepX) (Chapot-Chartier *et al.*, 1994, Chavagnat *et al.*, 2000, Rul *et al.*, 1997, Rul *et al.*, 1994, Tsakalidou *et al.*, 1997). Ces peptidases ont des orthologues chez d'autres streptocoques et chez *L. lactis*, à l'exception de PepS absente dans cette espèce. Chez *L. bulgaricus*, PepC, PepN, PepX, PepIP, PepQ and PepV (Atlan *et al.*, 1989, Atlan *et al.*, 1990, Atlan *et al.*, 1994, Gilbert *et al.*, 1994, Morel *et al.*, 1999, Rantanen *et al.*, 1997, Wohlrab *et al.*, 1992, Wohlrab *et al.*, 1994) ont été

caractérisées. Il est important de remarquer qu'il existe, chez *L. bulgaricus* et par rapport aux autres espèces de BL, un plus grand nombre de peptidases spécifiques de la proline, ce qui participe à son caractère plus protéolytique, car il existe un fort pourcentage de proline dans les caséines de lait de vache. La proline iminopeptidase PepIP et la dipeptidase PepV ne sont pas présentes chez *S. thermophilus*.

### 3.2.2.3. Systèmes de transport

Des gènes codant potentiellement des systèmes de transport d'acides aminés, de peptides et d'oligopeptides ont été identifiés chez *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, mais peu d'entre eux ont été caractérisés au niveau fonctionnel. Chez les BL, trois modes de transport différents sont impliqués dans la translocation des acides aminés (Konings et al, 1989):

- ❖ Le transport dépendant des liaisons phosphates énergétiques, qui permet le transport unidirectionnel et l'accumulation intracellulaire des acides aminés par couplage à l'hydrolyse de l'ATP ou de composés phosphorylés riches en énergie (Driessen et al, 1987). Les acides aminés à chaînes ramifiées sont transportés chez *S. thermophilus* par un transporteur ATP-dépendant, ainsi que la glutamine, la méthionine et des acides aminés polaires (Hols *et al.*, 2005, Juillard, 2007). Chez *L. bulgaricus*, des transporteurs dépendants d'ATP sont présents. De Giori *et al.* ont caractérisé chez la souche ATCC11842 de *L. bulgaricus*, un transporteur de glutamate, capable de transporter la glutamine et l'aspartate (de Giori *et al.*, 2002). Des transporteurs de la méthionine et d'acides aminés polaires ATP-dépendants sont aussi présents (Penaud, 2006).
- ❖ Le transport mû par la force proton-motrice (fpm-dépendant), qui permet le transport simultané d'acides aminés et de H<sup>+</sup> (ou d'autres cations comme le Na<sup>+</sup>). Ce système réversible utilise la force proton motrice comme moteur énergétique. C'est un système de transport secondaire comme dans le cas du transport du lactose en symport avec H<sup>+</sup>. Chez *S. thermophilus*, l'alanine, la glycine et la serine seraient transportés par ce type de transporteur (H<sup>+</sup> symport), ainsi que la thréonine (H<sup>+</sup> ou Na<sup>+</sup> symport) (pour une revue voir (Juillard, 2007)).
- ❖ L'antiport ou échange, où l'entrée d'un acide aminé précurseur est couplée à la sortie d'un produit de ce précurseur, comme dans les cas de arginine/ornithine, histidine/histamine et tyrosine/tyramine. Les deux espèces de BL présentent des transporteurs arginine/ornithine. Au contraire des deux systèmes précédents, cet échange ne nécessite pas d'énergie, puisque le moteur de l'échange est constitué par

les gradients transmembranaires de concentrations des deux composés (Poolman, 1993).

Des systèmes de transport spécifiques des peptides ont été identifiés génétiquement chez *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*. Le seul système caractérisé en détail chez une souche industrielle de *S. thermophilus* est le système Ami, un ABC transporteur d'oligopeptides essentiel pour la croissance en lait (Garault *et al.*, 2000). Ce système est composé de trois protéines affines pour les oligopeptides (AmiA1, 2, 3), deux protéines membranaires formant une perméase (AmiC, D) et deux ATPases (AmiE, F). *amiA1* et *amiCDEF* sont organisés en opéron, alors que les gènes *amiA2* et *amiA3* sont séparés. Il a été démontré par ces auteurs, que la spécificité des trois AmiA1, 2 et 3 se chevauche et que l'ensemble du système permet le transport de peptides contenant de 3 à 23 résidus.

Un système de transport d'oligopeptides a été caractérisé chez la souche B14 de *L. bulgaricus* (Peltoniemi *et al.*, 2002). Ce système, Opp, composé de 5 gènes en opéron (*oppD*, *oppF*, *oppC*, *oppB* et *oppA*) présente une forte similarité au système de transport Opp de *L. lactis*. Aucun système de transport de di-tripeptides n'a été caractérisé chez ces deux espèces. Chez *S. thermophilus*, un homologue de *dtpT*, un di-tripeptide transporteur de *L. Lactis*, est présent dans le génome. Par contre, chez *L. bulgaricus* ce gène n'est pas présent.

### 3.2.3. Biosynthèse des acides aminés

*In silico*, la prédiction des voies de biosynthèse des acides aminés a été réalisée pour ces deux espèces (Hols *et al.*, 2005, Penaud, 2006). Alors que *L. bulgaricus* ATCC11842 a perdu la capacité de synthétiser la plupart des acides aminés, deux souches de *S. thermophilus* (CNRZ1066 et LMG18311) possèdent la plupart des gènes nécessaires à la synthèse des acides aminés (Bolotin *et al.*, 2004). Cette différence peut être expliquée par le fait que *S. thermophilus* ne possède généralement pas de protéase de paroi PrtS nécessaire à l'hydrolyse des caséines alors la biosynthèse *de novo* d'acides aminés sera donc nécessaire pour sa croissance en lait (Hols *et al.*, 2005).

Les deux génomes de *S. thermophilus*, CNRZ1066 et LMG18311, possèdent seulement un gène impliqué dans la voie de la biosynthèse de l'histidine. Ces deux souches ne possèdent pas non plus de gène codant pour la glutamate synthétase, ce qui expliquerait l'absence de croissance quand le glutamate et la glutamine sont omis en même temps (Letort *et al.*, 2001). Un autre gène, *dapE*, nécessaire pour la biosynthèse de lysine est trunqué, ce

qu'implique que probablement ces deux souches ne pourront pas le synthétiser (Hols *et al.*, 2005).

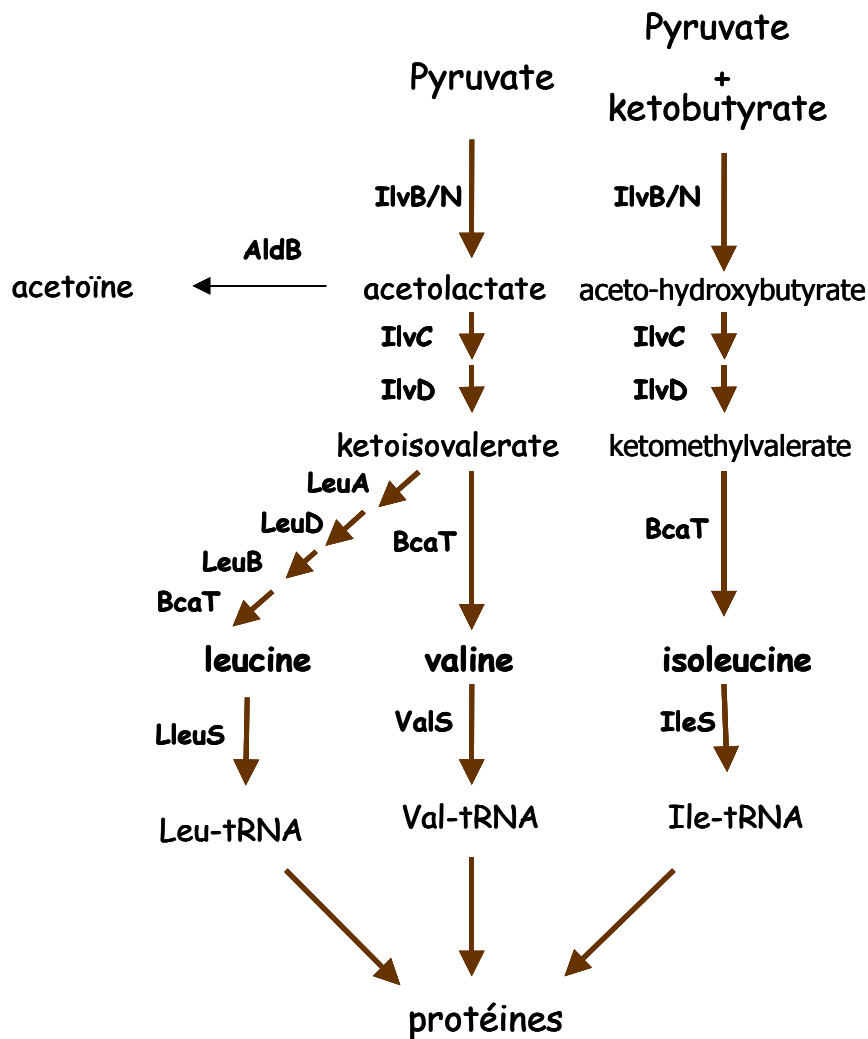
La reconstruction des voies métaboliques à partir de la séquence génomique révèle que la souche ATCC 11842 de *L. bulgaricus* ne dispose d'aucun gène nécessaire à la biosynthèse *de novo* de l'alanine, de la glycine, de l'histidine, de l'isoleucine, de la leucine, de la proline ou de la valine. Huit autres voies de biosynthèse d'acides aminés sont partielles, du fait de la présence de pseudogènes (2 cas) ou de gènes manquants (6 cas); ce sont les voies conduisant à l'arginine, la cystéine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la sérine, le tryptophane et la tyrosine. Au total, la souche serait donc incapable de synthétiser 15 acides aminés. Les voies de biosynthèse potentiellement fonctionnelles sont celles de l'aspartate, de l'asparagine et de la thréonine, et cette souche pourrait aussi synthétiser de la glutamine lorsque du glutamate est présent dans le milieu de culture et inversement (Penaud, 2006).

Je me focaliserais par la suite sur la voie de biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée et la voie de biosynthèse de la méthionine et de la cystéine de chez *S. thermophilus* dont la mesure où ce sont les deux principales voies de biosynthèse des acides aminés que nous avons identifié comme impliquées dans la croissance en lait de la monoculture et co-culture.

### 3.2.3.1. Biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée (BCAA) chez *S. thermophilus*

Les BCAA (isoleucine, leucine et valine) représentent un groupe important quantitativement chez les BL puisqu'ils représentent 20% du total des acides aminés constitutifs des protéines chez *L. lactis* (Mills *et al.*, 1981) et 24.4% chez *S. thermophilus* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/GenomeAtlas/> Janvier 2008). Leur voie de biosynthèse a été très étudiée et bien caractérisée chez de nombreuses bactéries: elle fait intervenir trois enzymes communes (IlvB/N, IlvC et IlvD) aux trois acides aminés dans un premier temps puis impliquent des enzymes spécifiques pour chacun d'entre eux (figure 8). Quelques intermédiaires métaboliques sont liés à d'autres voies comme l'acétoïne, le butanediol et le Coenzyme A (figure 8). Chez *S. thermophilus* LMG18311 et CNRZ1066, *ilvC*, *ilvN* et *ilvB* se retrouvent en opéron, *ilvD* est monocistronique.

Chez les souches de *L. lactis* d'origine laitière, la voie de biosynthèse des BCAA n'est pas fonctionnelle (Godon *et al.*, 1993), contrairement à *S. thermophilus* chez qui elle est fonctionnelle et essentielle à la croissance en lait (Garault *et al.*, 2000).



**Figure 8. Biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée (BCAA).** IlvBN: acétolactate synthase, IlvC: acide keto réductoisomerase, IlvD: acide dihydroxy déshydratase, AldB: alpha-acétolactate décarboxylase, BcaT: Aminotransférase des acides aminés à chaîne ramifiée, LeuA: isopropyl malate synthase, LeuB: isopropyl malate deshydrogenase, LeuC : isopropyl malate deshydrogenase.

Les avantages possibles de maintenir cette voie active peuvent être liés à l'adaptation de *S. thermophilus* au lait et son absence (le plus souvent) de protéase de paroi. Elle pourrait jouer aussi un rôle dans la maintenance du pH interne comme cela a été démontré chez *S. mutans* dans une étude de tolérance à l'acide (Len *et al.*, 2004). Garault *et al.* (Garault *et al.*, 2000) ont démontré que le gène *ilvC* codant pour une keto-acide réductoisomérase est transcrit indépendamment des 2 autres gènes et qu'il intervient dans la jonction entre la voie de biosynthèse des acides aminés branchés (au niveau de l'acétolactate) et la voie de la

biosynthèse de l'acétoïne. La production d'acétoïne permettrait le maintien du pH intracellulaire.

La régulation de la biosynthèse des BCAA chez *S. thermophilus* fait probablement intervenir l'inhibition par des produits finaux comme cela a été observé chez *L. lactis* (Godon *et al.*, 1992). Ainsi, l'excès d'isoleucine ou de leucine dans le milieu réprime la synthèse des enzymes communes à la biosynthèse des BCAA. De ce fait, plus aucune synthèse n'a lieu et la croissance est inhibée en absence des autres acides aminés à chaîne ramifiée, tandis que la présence de valine seule ou en excès n'a que peu d'effet sur la croissance de *L. lactis* (Godon *et al.*, 1993). Chez *S. thermophilus*, le même effet d'inhibition par la présence d'isoleucine ou de leucine a été observé (Garault *et al.*, 2000). Chez *L. lactis*, cette régulation a lieu au niveau transcriptionnel et l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans les voies de biosynthèses des acides aminés et des fonctions liées à l'approvisionnement d'azote est négativement contrôlée par *codY* (den Hengst *et al.*, 2005, Guédon *et al.*, 2005). CodY est un régulateur transcriptionnel qui est présent dans plusieurs espèces de bactéries à Gram<sup>+</sup> aux génomes à bas pourcentage en bases G et C. Des voies de biosynthèse d'acides aminés que CodY régule, la voie des BCAA est une des voies les plus fortement régulée et les BCAA sont les effecteurs intracellulaires qui activent la répression par CodY chez *L. lactis* (Guedon *et al.*, 2001, Petranovic *et al.*, 2004). En effet, l'isoleucine augmente fortement l'affinité de CodY pour les promoteurs des gènes qu'il contrôle (Guédon *et al.*, 2005).

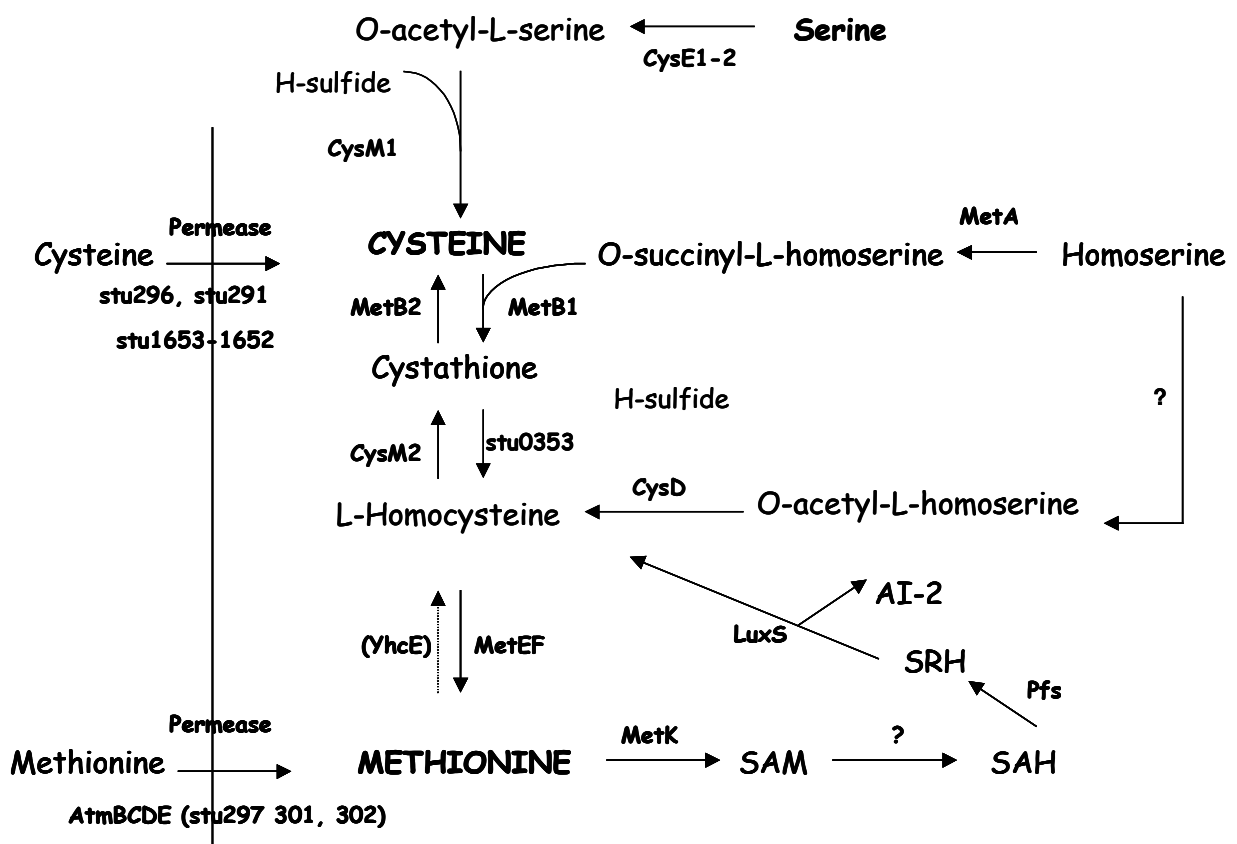
L'analyse des génomes de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* indique des homologues de CodY.

#### 3.2.3.2. Biosynthèse de la méthionine et de la cystéine chez *S. thermophilus*

Le soufre fait partie d'un grand nombre de molécules indispensables de la cellule, comme la cystéine, la méthionine, la thiamine, la biotine, l'acide lipoïdique, le coenzyme A, entre autres. Parmi ces composants, la cystéine a un rôle central, car sa synthèse *de novo* représente la voie centrale d'acquisition de soufre chez les microorganismes et les plantes. Le soufre fait partie aussi du domaine catalytique des protéines universelles qui contiennent des clusters fer-soufre, comme les cytochromes et l'aconitase. Il joue un rôle dans le repliement, l'assemblage et la stabilité des protéines via la formation de ponts di-sulfure, et finalement il intervient dans la protection contre le stress oxydant. La méthionine est un composant clé et essentiel pour l'initiation de la traduction.

Dans le lait, la cystéine et la méthionine sont présents en quantité limitante aussi bien sous forme libre que dans les caséines (Letort, 2001).

D'après l'analyse *in silico* du génome de *S. thermophilus*, les voies de biosynthèse de la cystéine et de la méthionine peuvent être représentées en se basant sur la voie de biosynthèse proposée par Sperandio *et al.* (Sperandio *et al.*, 2007) pour *L. lactis* (figure 9). En effet, *S. thermophilus* possède tous les gènes de cette voie à l'exception du gène *yhcE* (présent sous forme de pseudogène) dont le produit de traduction est la L-homocystéine formée à partir de la méthionine.



**Figure 9. Biosynthèse des acides aminés sulfurés (méthionine et cystéine). Modèle pour *S. thermophilus* par homologie de la voie proposée pour *L. Lactis* selon Sperandio *et al.* (Sperandio *et al.*, 2005).** CysD: O-acétyl-homoserine sulphydrylase, CysE1-2: sérine acétyl transférse, CysM1-2: cystéine synthase, MetA: homoserine O- succinyltransférase, MetB1: cystathionine gamma-synthase, MetB2: cystathionine beta-liase, Stu03533: aminotransférase, MetE: 5-méthyl tetrahydropteroyltriglutamate- homocystéine méthyltransferase, MetF: 5,10-méthylentetrahydrofolate reductase, MetK: S-adenosylmethionine synthase, LuxS: autoinducer-2 production protéine, Pfs: 5'-méthylthioadenosine/S-adenosylhomocystéine nucléosidase, YhcE, gène présent chez *L. lactis* mais sous forme de pseudogène chez *S. thermophilus* ; AtmBCDE: système ABC transporter pour D-méthionine pour *S. mutans*. SAM : S-adenosyl-méthionine, SAH : S-adenosylhomocystéine, SRH : S-ribosylhomocystéine.



Chez *L. lactis*, 18 gènes, appartenant à 7 unités transcriptionnelles, sont impliqués dans la biosynthèse de la méthionine et de la cystéine. Leur expression est contrôlée par un activateur transcriptionnel de la famille LysR, FhuR. FhuR se lie à une séquence conservée de 13 pb centré entre les nucléotides -46 à -53 en amont du démarrage des unités transcriptionnelles des ces 7 promoteurs (boîte FhuR). L'O-acétyl sérine augmente l'affinité de FhuR à ces boîtes et l'enzyme CysE pourrait être la clé du contrôle de l'activité de FhuR (Sperandio *et al.*, 2005). Dans le génome de *S. thermophilus* LMG18311, trois homologues de FhuR sont présents (stu0520, stu0452 et stu0872). Récemment, l'homologue stu0872, annoté MetR chez *L. lactis* a été étudié chez *S. thermophilus*. Il a aussi été démontré que MetR contrôlait la régulation de deux opérons, l'un impliqué dans la biosynthèse de la méthionine (*metEF*) et l'autre dans le transport de cet acide aminé (*atmBDE*). L'homocystéine serait le co-effecteur de MetR *in vivo* (Sperandio *et al.*, 2007).

### 3.3. Biosynthèse des bases puriques

Les nucléotides dérivés des bases puriques (adénine, guanine) et des bases pyrimidiques (thymine, cytosine et uracile) sont des métabolites obligatoires de tous les organismes. Ils sont les substrats pour la biosynthèse de l'ARN et l'ADN et sont les principaux donneurs d'énergie pour les procédés cellulaires. La plupart des bactéries sont capables de synthétiser les nucléotides *de novo*, mais quelques unes ont besoin d'une source de purines ou de pyrimidines dans leur milieu de croissance.

*S. thermophilus* et *L. bulgaricus* semblent posséder tous les gènes nécessaires à la synthèse de bases azotées sauf *L. bulgaricus* qui ne possède pas d'homologue au gène (*ndk*) codant la nucléoside diphosphate kinase, responsable de la synthèse de dNTP à partir de dNDP. Néanmoins, cette réaction enzymatique pourrait être assurée par l'adénylate kinase codé par le gène *adk*, comme cela a été montré chez *Escherichia coli* (Willemoes *et al.*, 2005). Cependant, les tests de croissance montrent que *L. bulgaricus* ATCC 11842, comme 3 autres souches de *L. bulgaricus* précédemment testées (Letort, 2001), ne se développent pas en absence d'uracile (van de Guchte, communication personnelle), ce qui impliquerait qu'une enzyme dans la voie de biosynthèse de l'UMP à partir de L-glutamine est inactive.

L'intermédiaire commun de la biosynthèse des purines et des pyrimidines est le 5-phosphoribosyl- $\alpha$ -1-pyrophosphate, PRPP, formé à partir du ribose 5-phosphate (voie des pentoses-phosphates) et d'ATP via la PRPP synthétase (PrsA). PRPP est aussi l'inducteur de l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse *de novo* des purines chez *L. lactis*.

### 3.3.1. Biosynthèse de purines de novo.

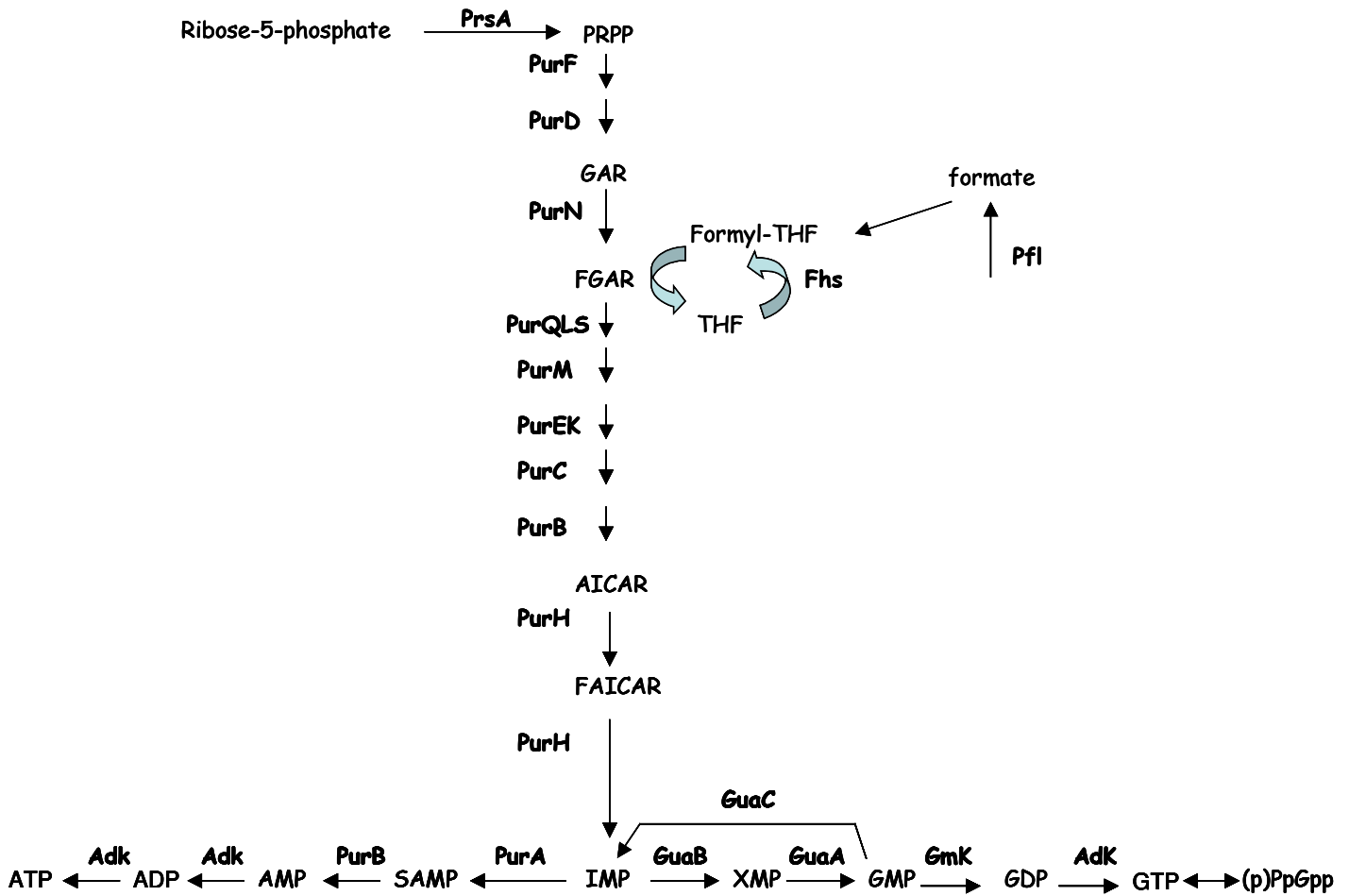
Les nucléotides puriques sont synthétisés *de novo* par une voie unique conduisant à la formation de l'intermédiaire IMP (inosine mono-phosphate), à partir duquel la voie se sépare en deux branches, pour la formation d'AMP et de GMP (figure 10). Dix étapes sont nécessaires pour la formation d'IMP à partir du PRPP. Même si les enzymes pour la biosynthèse d'IMP sont très similaires chez les BL, l'organisation des gènes codant pour ces enzymes diffère (figure 11). Chez *L. lactis*, les gènes sont organisés en trois opérons, *purCSQLF*, *purMN*, *purDEK* et le gène monocistronique *purH*. *S. thermophilus* est intermédiaire entre l'arrangement des gènes *pur* de chez *L. lactis* et celui de *L. bulgaricus* et *E. faecalis*. Notons que *purL*, de grande taille chez *S. thermophilus* est typique des *purL* des bactéries à Gram<sup>-</sup>.

L'AMP est synthétisé à partir de l'IMP en deux étapes enzymatiques catalysées par PurA et PurB (figure 10). PurA catalyse la condensation du groupe amine de l'aspartate de l'IMP formant le succinyl-AMP (sAMP). PurB catalyse la production de l'AMP à partir du sAMP.

Pour la synthèse du GMP, l'IMP est transformé en XMP par GuaB puis il gagne un groupe amide (glutamine et ATP comme donneurs), via la protéine GuaA. Chez *S. thermophilus*, comme chez *L. lactis* les gènes *purA* et *purB* sont probablement transcrits indépendamment. Chez *L. bulgaricus* le gène *purB* est probablement en opéron avec les gènes *purEK*. Les gènes *guaA* et *guaB* sont aussi transcrits indépendamment. Un autre gène, *guaC*, absent chez *S. thermophilus* mais présent chez d'autres espèces comme *L. bulgaricus* et *L. plantarum*, catalyse la déamination du GMP pour former de l'IMP, réaction contraire de celle de GuaA et GuaB.

L'ADP et le GDP sont formés à partir du nucléotide mono-phosphate correspondant par l'action de kinases spécifiques. L'adénylate kinase (Adk) produit de l'ADP à partir d'AMP et d'ATP, alors que la guanylate kinase (Gmk) produira du GDP à partir de GMP et ATP.

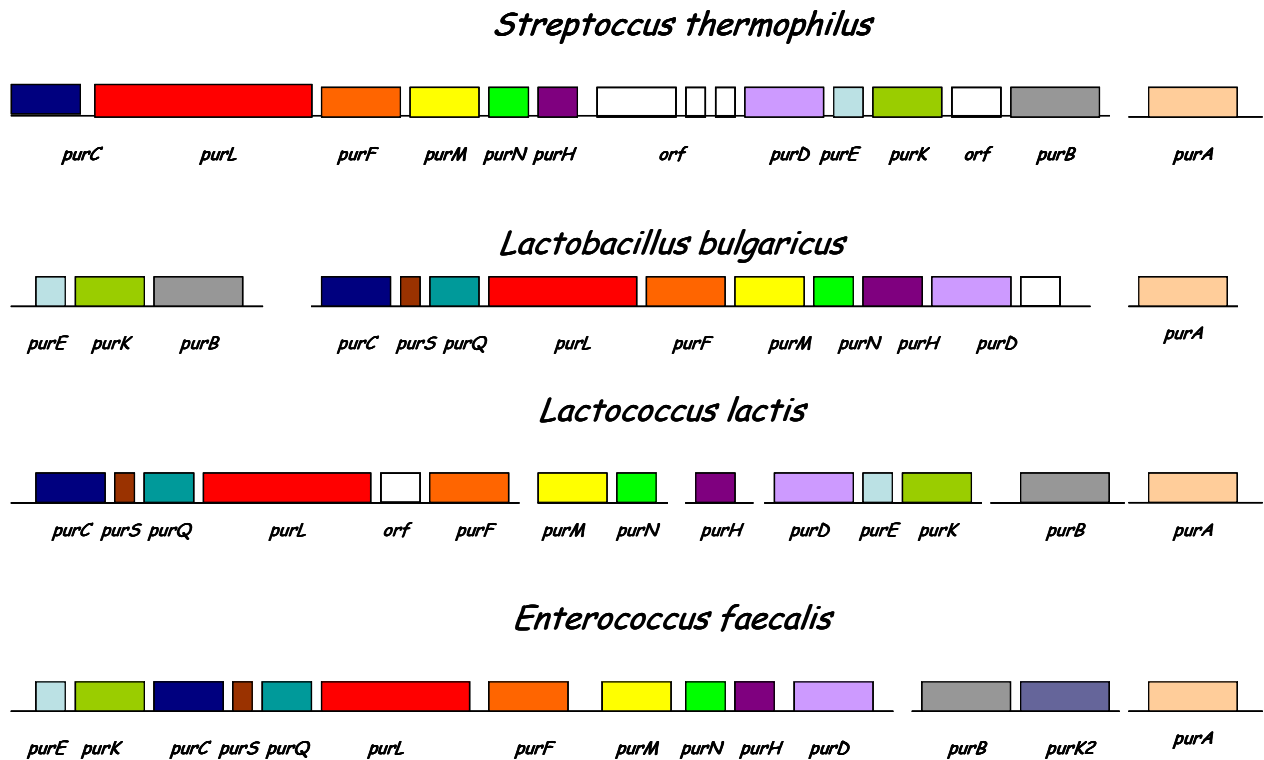
L'ATP est aussi formé à deux étapes de la glycolyse, à travers l'action de la phosphoglycerate kinase (Pgk) et de la pyruvate kinase (Pyk). Dans des conditions normales, ces réactions sont la principale source d'ATP. Il a été démontré chez *Escherichia coli* (Saeki *et al.*, 1974) et chez *L. lactis* (Crow *et al.*, 1982) que la formation d'ATP à partir d'ADP peut aussi être réalisé par Pyk, au lieu de l'enzyme Adk, enzyme qui est absente chez *Escherichia coli* et *L. lactis*.



**Figure 10. Voie de biosynthèse des purines chez *L. lactis* adapté de Kilstrup *et al.***

(Kilstrup *et al.*, 2005) PurA: adenylosuccinate synthétase; PurB : adenylosuccinate lyase; PurC: phosphoribosylaminoimidazole - succinocarboxamide synthétase; PurD: phosphoribosylamine-glycine ligase; PurE: phosphoribosylaminoimidazole carboxylase I; PurK: phosphoribosylaminoimidazole carboxylase II; PurF: amidophosphoribosyltransferase; PurH: phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase; PurM : phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase; PurN: phosphoribosylglycinamide (GAR) formyltransferase; PurQSL: phosphoribosylformylglycinamidine synthase II; PrsA1: ribose-phosphate pyrophosphokinase, GuaA: GMP synthase, GuaB: inosine monophosphate dehydrogenase, GuaC: GMP reductase, Gmk: guanylate kinase, Adk: adenylate kinase, PRPP : phosphoribosyl pyrophosphate; GAR : glycinamide ribonucleotide ; FGAR : formylglycinamide ribonucleotide; AICAR: aminoimidazole; FAICAR: formaminoimidazole; AMP: adénine mono-phosphate; SAMP: adenylosuccinate; IMP: Inosine mono-phosphate; XMP : xanthine mono-phosphate; GMP: guanine mono-phosphate , GDP: guanine di-phosphate, ADP: alanine di-phosphate, GTP: guanine tri-phosphate, ATP: alanine tri-phosphate.

Par la suite, l'ATP et le GTP sont utilisés dans de nombreuses réactions enzymatiques, comme donneurs d'énergie, de phosphate et comme substrats pour la polymérisation. Lorsque l'ATP et le GTP sont utilisés comme donneurs d'énergie ou de phosphate, les nucléotides mono- et diphosphate produits reviennent dans le pool pour être phosphorylés de nouveau.



**Figure 11. Organisation des gènes de biosynthèse des purines *de novo* chez *E. faecalis* OG1RF (selon Kilstrup), *L. bulgaricus* ATCC11842, *S. thermophilus* CNRZ 1066 et *L. lactis* spp. *cremoris* MG1363. Adapté Kilstrup *et al.* (Kilstrup *et al.*, 2005) *purA*: adenylosuccinate synthétase ; *purB*: adenylosuccinate lyase ; *purC*: phosphoribosylaminoimidazole - succinocarboxamide synthétase ; *purD*: phosphoribosylamine-glycine ligase ; *purE*: phosphoribosylaminoimidazole carboxylase I ; *purK*: phosphoribosylaminoimidazole carboxylase II ; *purF*: amidophosphoribosyltransferase ; *purH*: phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase ; *purM*: phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase ; *purN*: phosphoribosylglycinamide formyltransferase ; *purQSL*: phosphoribosylformylglycinamide synthase II .**

### 3.3.2. Régulation

Le PRPP est l'inducteur de la transcription des gènes *pur* chez *B. subtilis*, le modèle des microorganismes à Gram<sup>+</sup>. Il est supposé avoir la même fonction chez toutes les BL. Le senseur de la disponibilité en PRPP chez *B. subtilis* est le répresseur PurR (Ebbole *et al.*, 1989) qui possède un domaine conservé de liaison avec le PRPP. PurR se lie à la région promotrice de l'opéron *pur* en absence de PRPP, ce qui empêche la liaison de l'ARN polymérase à ce promoteur et la transcription de l'opéron. En présence de PRPP, celui-ci se lie à PurR et en change la conformation protéique permettant ainsi la reconnaissance et le positionnement correct de l'ARN polymérase à la région -10 du promoteur, ce qui conduit à l'initiation de la transcription (Weng *et al.*, 1995). L'addition de purines dans le milieu de croissance chez *B. subtilis*, conduit à une répression de la voie de biosynthèse des purines par PurR due à la diminution du pool de PRPP qui peut s'expliquer par i) la consommation efficace et la transformation en nucléosides mono-phosphate des purines ajoutées et ii) l'inhibition de la PRPP synthétase (*prsA*) par l'ADP (Weng *et al.*, 1995).

Chez *L. lactis*, contrairement à *B. subtilis*, PurR a été identifié comme un activateur. Il a été suggéré qu'un complexe PurR-PRPP est nécessaire pour l'interaction avec l'ARN polymérase, conduisant à une activation transcriptionnelle aux concentrations élevées de PRPP (Kilstrup *et al.*, 1998). Chez *S. pneumoniae* (Ng *et al.*, 2003) et *L. plantarum*, PurR a été décrit comme répresseur. Chez *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, un gène homologue à PurR est présent et la protéine PurR présente des domaines de liaison au PRPP et à l'ADN très similaires à ceux de *B. subtilis* et *L. lactis*.

En comparant les promoteurs des opérons *purDEK* et *purCSQLF* chez *L. lactis*, une séquence consensus baptisée « PurBox » a été détectée : WWCCGAACWWW (Kilstrup *et al.*, 1998). D'autres PurBox ont été détectées, au niveau des promoteurs de *purMN*, *purH* mais aussi de la formate-tetrahydrofolate ligase (*fhs*) et de la serine hydroxymethyltransferase (*glyA*), gènes impliqués dans l'apport d'unités carbone, alimentant la voie de biosynthèse des purines (Beyer *et al.*, 2003). Chez *S. thermophilus* LMG18311, des « PurBox » ont été identifiés au niveau des promoteurs *purCLFMNH*, *purDEKB* et *fhs* (Derzelle *et al.*, 2005).

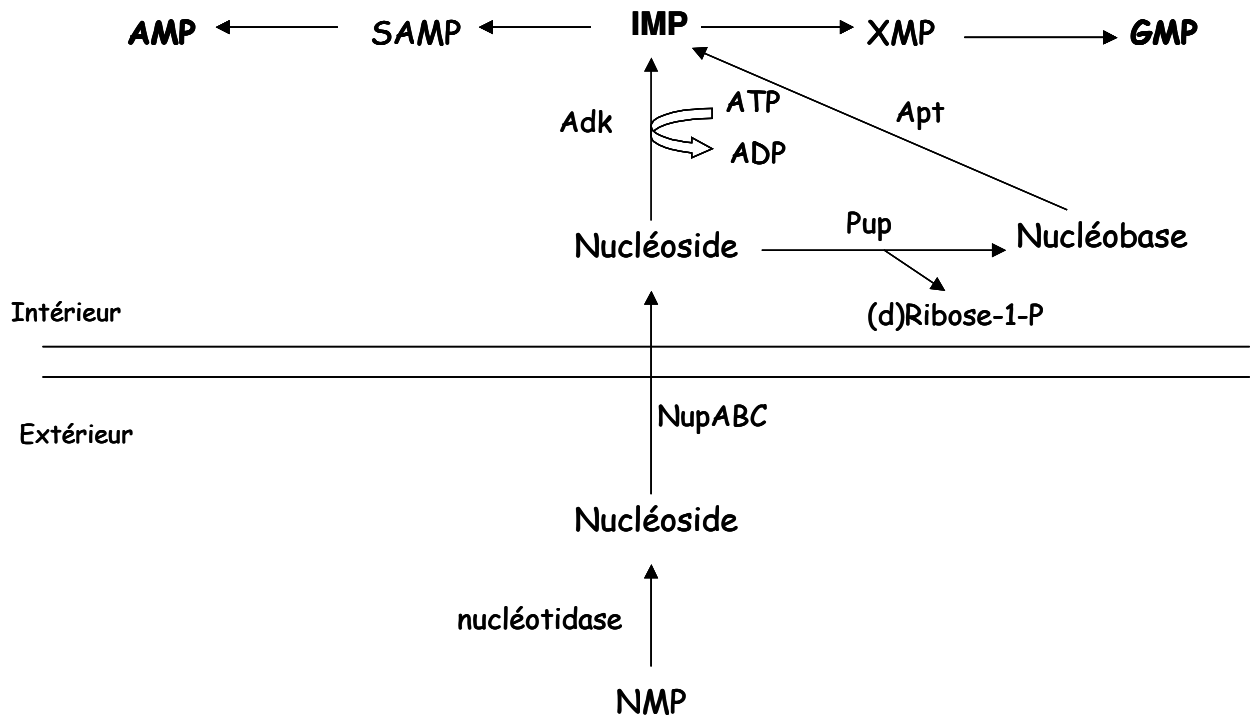
Plus récemment, une étude bioinformatique a montré que deux PurBox en répétitions inversées et espacées par 16-17 pb, étaient nécessaires pour la répression par PurR chez *B. subtilis*. En plus des opérons *pur*, 6 autres gènes ou opérons présentaient des PurBox. Ces opérons codent des enzymes ou transporteurs jouant un rôle dans le métabolisme des purines : *glyA*, *yumD* codant une GMP réductase (*guaC*), *yebB* (*pbuG*) et *ytiP* (*pbuO*) codant des

hypoxanthine-guanine perméases, *xpt-pbuX* codant une xanthine perméase et *yqhZ-fold* codant pour un facteur transcriptionnel de couplage (transcription coupling factor) (Saxild *et al.*, 2001).

### 3.3.3. Voies de transport de purines

La récupération de nucléotides externes, provenant du milieu, peut se réaliser de deux façons différentes:

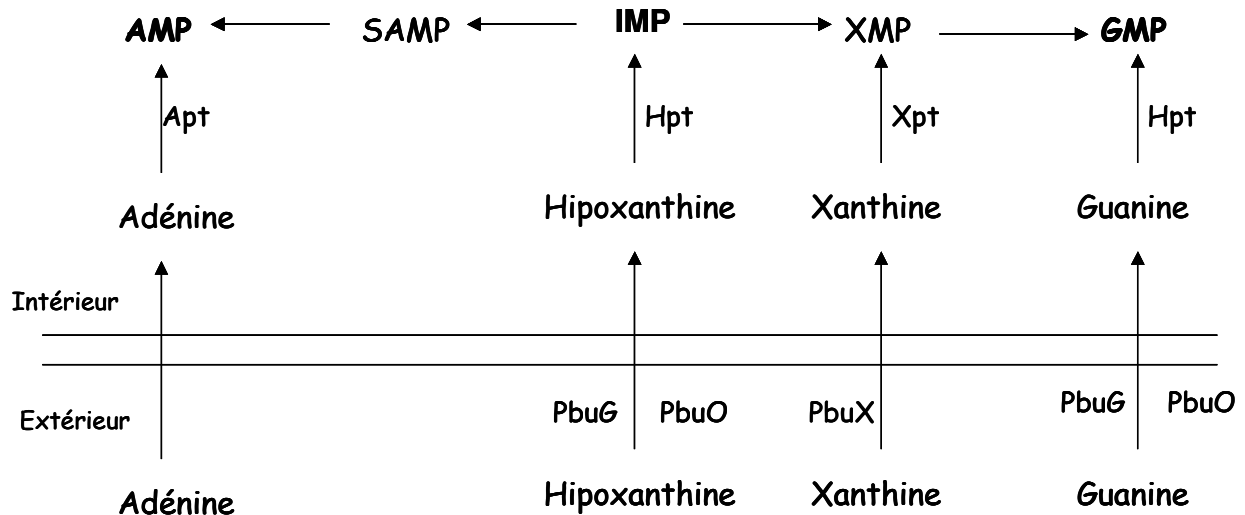
- ❖ La première façon consiste à déphosphoryler, à l'extérieur de la cellule, les nucléotides qui ne peuvent pas traverser la membrane directement, par une nucléotidase formant le nucléoside correspondant (figure 12). Les nucléosides sont ensuite transportés à l'intérieur de la cellule puis phosphorylés par une kinase ou dégradés pour former la nucléobase et le sucre pentose par une nucléoside phosphorylase. Finalement, la base est convertie en NMP grâce aux phosphoribosyltransferases. Au moins deux types de systèmes de transport de nucléoside ont été identifiés chez *L. lactis*. Un système nommé *nupABC* est responsable du transport de la cytidine, deoxycytidine (pyrimidines) et tous les nucléosides puriques communs. L'autre est responsable du transport de l'uridine et la deoxyuridine (Martinussen *et al.*, 2003). Chez *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* des systèmes homologues à *nupABC* sont présents dans le génome, suggérant que ces deux bactéries puissent transporter des nucléosides. Les nucléosides phosphorylases sont des enzymes retrouvées dans la plupart des organismes. Chez *L. lactis* MG1363 une enzyme Pup ayant une activité de production d'inosine, d'adenosine, de guanosine et les deoxyribonucleases correspondantes est présente (Kilstrup *et al.*, 2005). Chez *B. subtilis*, deux enzymes Pup sont présentes, comme dans le cas de *S. thermophilus*, où elles sont nommées DeoD et PunA. Par contre, *L. bulgaricus* ATCC11842 semble n'avoir aucun gène avec cette fonction. Chez *S. thermophilus* LMG18311, nous retrouvons aussi 2 gènes codant pour des phosphoribosyltransferases, homologues aux gènes de *L. lactis* et *B. subtilis*: *hpt* et *apt*. Par contre deux gènes codant pour *xpt* apparaissent tronqués. Chez *L. bulgaricus* ATCC11842, les gènes présents sont *apt*, *xpt* et *hprT*. *L. lactis* ne possède pas de purine ribonucleoside kinase qui transforme le nucléoside en NMP. La seule voie pour récupérer les nucléosides sera alors celle de l'utilisation de Pup pour la formation de la nucléobase. Par contre, *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* possèdent l'enzyme Adk nécessaire pour cette réaction.



**Figure 12. Voies de récupération par *L. lactis* de purines exogènes selon Kilstrup *et al.* (2005)** AMP : Adénine Mono-Phosphate; SAMP: adenylosuccinate; IMP: Inosine mono-phosphate; XMP: Xanthine Mono-Phosphate; GMP: Guanine Mono-Phosphate; Apt : adenine phosphoribosyltransferase; Adk : adénine kinase, Pup: purine nucléoside phosphorylase; NupABC: purines nucléoside ABC transporteur, NMP: Nucléotide Mono-Phosphate

- ❖ La deuxième façon consiste à transporter les nucléobases par des transporteurs spécifiques puis à les convertir en NMP par des phosphoribosyltransferases (figure 13). Quelques transporteurs impliqués dans la récupération de nucléobases ont été identifiés. Chez *L. lactis* IL1403, les gènes *pbuX* and *pbuO* sont possiblement impliqués dans le transport de xanthine et guanine ou hypoxanthine respectivement (Kilstrup *et al.*, 2005), comme dans le cas de *pbuX* et *pbuO* de *B. subtilis* (Christiansen *et al.*, 1997). *In silico*, l'analyse de la séquence du génome de *S. thermophilus*, montre des transporteurs potentiels de nucléobases. Les gènes *stu1339* et *stu1340* codant pour des xanthines perméases potentielles, homologues au gène *pbuX*, apparaissent tronqués. Par contre, le gène *stu0336* codant pour un xanthine/uracile perméase putative est complet. Chez *L. bulgaricus* ATCC1182 deux

gènes, *Ldb0295* et *Ldb2200* codant pour des xanthine/uracile perméase putatives sont complets.



**Figure 13. Voies de récupération de purines de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule pour *B. subtilis* selon Saxild *et al.* (2001)** AMP: Adénine Mono-Phosphate; SAMP: adenylosuccinate ; IMP : Inosine Mono-Phosphate; XMP: Xanthine Mono-Phosphate ; GMP: Guanine Mono-Phosphate; apt : adenine phosphoribosyltransferase ; hpt : hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase ; xpt : xanthine phosphoribosyltransferase ; pbuG : hypoxanthine-guanine perméase ; pbuO : guanine perméase ; pbuX : xanthine perméase.

Récemment, une analyse protéomique portant sur la souche de *S. thermophilus* LMG18311 a démontré que l'ajout de purines au milieu de croissance provoquait une forte réduction dans l'abondance de protéines PurM, PurH, et Fhs (Derzelle *et al.*, 2005), suggérant que *S. thermophilus* est capable de transporter des purines.

### ***3.4. Adaptation de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* aux changements environnementaux : implication de systèmes de régulation transcriptionnelle***

*S. thermophilus* et *L. bulgaricus* ont la capacité de s'adapter aux différents changements du milieu qui se produisent au cours de la fermentation: augmentation de l'acidité au cours du temps, présence d'oxygène, consommation de nutriments au cours du temps et aussi la



présence dans le milieu de son partenaire. Pour s'adapter et/ou se développer dans ces conditions, ces deux espèces possèdent non seulement des systèmes de perception des variations des conditions environnementales mais également des systèmes d'adaptation. Les systèmes de régulation transcriptionnelle sont très importants pour l'adaptation de la bactérie aux changements de son environnement. L'analyse *in silico* des génomes de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* nous permet d'identifier les types de régulateurs agissant au niveau transcriptionnel: les facteurs  $\sigma$ , les protéines Sp<sub>x</sub>, et les régulateurs transcriptionnels en particulier les systèmes à deux composants; qui pourraient intervenir dans leur adaptation au milieu lait et à la présence de son partenaire.

### 3.4.1. Les facteurs $\sigma$

Les facteurs  $\sigma$  sont des sous-unités de l'ARN polymérase qui lui permettent de reconnaître et de se fixer sur les promoteurs des gènes. La plupart des bactéries synthétisent divers facteurs  $\sigma$  capables de reconnaître différentes séquences consensus. Cette variété de facteurs  $\sigma$  permet à la bactérie de maintenir un niveau basique d'expression de gènes ainsi que la régulation de l'expression de gènes en réponse à un changement environnemental. Il existe 14 types différents de facteurs  $\sigma$ . Le facteur  $\sigma$  primaire est le facteur sigma de la phase végétative. Il est essentiel à la survie des bactéries et reconnaît des séquences consensus situées à 35 (TTGACA) et 10 (TATAAT) bases en amont du site d'initiation de la transcription. L'association du  $\sigma$  primaire avec l'ARN polymérase est réversible. Les autres facteurs  $\sigma$  sont non essentiels à la survie cellulaire en condition de croissance favorable et sont appelés facteurs  $\sigma$  alternatifs. Ces facteurs  $\sigma$  peuvent aussi interagir avec l'ARN polymérase et ainsi induire la transcription des gènes appartenant à leur régulon (Wosten, 1998). Les facteurs  $\sigma$  alternatifs sont impliqués dans des fonctions diverses comme par exemple la régulation de l'expression de gènes des cellules exposés à divers stress, à la sporulation, la compétence, la production d'antibiotiques, des facteurs de virulence.

*In silico*, le génome de *S. thermophilus* possède seulement deux gènes codant pour deux facteurs  $\sigma$ : *comX*, un facteur de compétence et *rpoD*, un facteur  $\sigma$  primaire. L'analyse du génome de *L. bulgaricus* ATCC11842, révèle cinq facteurs sigma dont deux facteurs  $\sigma$  primaires (Ldb1245 et Ldb1246), deux facteurs  $\sigma^{\text{ECF}}$  (Ldb1881 et Ldb 0066) de fonction inconnue et Ldb1677 qui présente des homologues avec  $\sigma^{\text{H}}$  de *Listeria monocytogenes* (43% de similarité, 22% d'identité) et de *B. subtilis* (40% de similarité, 21% d'identité) qui pourrait être impliqué dans la compétence (Penaud, 2006).

### 3.4.2. Les protéines Spx

Un autre système de régulation fait intervenir la protéine Spx, qui va se lier à l'ARN polymérase (RNA polymerase-binding protein, RNAP). Cette protéine est très conservée parmi les bactéries Gram<sup>+</sup> dont les génomes ont un faible pourcentage de bases G et C. Elle va interagir avec le domaine C-terminal (CTD) de la sous-unité  $\alpha$  de la RNAP et interférer donc dans l'activation de la transcription médiée par certains « réponse régulator » de systèmes à deux composants (Zuber, 2004). Chez *B. subtilis* il a été démontré que Spx est indispensable pour la survie de cette bactérie lors de stress oxydant. Son interaction avec la sous-unité  $\alpha$  de la RNAP est nécessaire pour l'induction de la transcription de gènes comme la thioredoxine (*trxA*) et la thioredoxine reductase (*trxB*) mais uniquement en condition oxydante, car l'activation de Spx nécessite la formation d'un pont disulfure intramoléculaire entre deux résidus de cystéine du motif Cys-X-X-Cys N-terminal (cible de changements redox) (Nakano *et al.*, 2005). Veiga *et al.* (2007) ont étudié la protéine SpxB chez *L. lactis*. Cette protéine SpxB est impliquée dans la résistance à l'hydrolyse de la paroi cellulaire par le lysozyme. Le lysozyme est une hydrolase d'origine animale capable de dégrader le peptidoglycane de la paroi cellulaire des bactéries et ayant donc un rôle antimicrobien. Ces auteurs ont démontré chez *L. lactis* que la capacité à résister à l'hydrolyse du peptidoglycane dépend de son degré d'acétylation. En présence de lysozyme, le système à deux composants CesS/R activerait le gène *spxB*, qui à son tour se lierait à la ARN polymérase et activerait l'expression du gène *oatA* (PG O-acetylase), impliqué dans l'acétylation du peptidoglycane et donc dans la résistance à l'hydrolyse par le lysozyme (Veiga *et al.*, 2007).

*In silico*, chez les souches de *S. thermophilus* CNRZ 1066 et LMG18311, deux gènes (*spxA*, *stu0061* et *stu0997*) codant potentiellement des protéines Spx sont présents et un gène pour la souche LMD9 (*ster 0078*). L'analyse du génome de *L. bulgaricus* ATCC11842 ne révèle aucun gène codant potentiellement une protéine Spx connue.

### 3.4.3. Les régulateurs transcriptionnels

Les régulateurs transcriptionnels sont des protéines se liant à l'ADN et permettant soit d'activer soit de réprimer la transcription du gène cible en réponse à un changement environnemental. Il existe différentes familles de régulateurs transcriptionnels qui sont définies par homologie de séquence de la région de liaison à l'ADN (composée du motif hélice-tour-hélice) (Aravind *et al.*, 2005). Certaines familles peuvent réguler un large éventail

de fonctions (LysR par exemple), d'autres sont plus spécialisées (famille ArsR par exemple, spécialisée dans la réponse à des stress induits par des métaux lourds) (tableau 4).

**Tableau 4 : Différentes familles de régulateurs transcriptionnels et leur présence chez *S. thermophilus* LMG18311 et *L. bulgaricus* ATCC11842.**

Famille	<i>S. thermophilus</i> *	<i>L. bulgaricus</i> selon Penaud (2006)	Exemples de fonctions régulées par certains régulateurs de cette famille
AraC	1	2	Catabolisme des sucres, résistance au stress et virulence
ArsR	0	1	Résistance aux métaux lourds
AsnC	1		Métabolisme des acides aminés
Crp/Fnr	0	3	Variées
DeoR	2	4	Catabolisme d'hydrates de carbone
GntR	3	4	Variées
LacI	3	1	Métabolisme carboné
LysR	3	8	Variées
LytR		4	Synthèse EPS et bactériocines, protéines extracellulaires...
MarR	3	3	Résistance aux composés toxiques, virulence, dégradation de composés aromatiques
MerR	2	2	Résistance aux métaux et composés toxiques
NagC		0	
MutR	7	0	Stress oxydant
Prt			Biosynthèse purines et pyrimidines
RpiR		0	Systèmes PTS
Xre		3	
TetR	3	5	Synthèse d'antibiotiques, résistance aux composés toxiques et au stress osmotique
Autres	12	9	
Total	40	49	

\* Information de régulateurs transcriptionnel obtenus pour *S. thermophilus* du site web <http://www.era7.com/ExtraTrain/reguIndex.cfm> (Janvier, 2008).

Certains régulateurs peuvent être activateurs pour certains gènes et répresseurs pour d'autres : les régulateurs de la famille LysR par exemple, activent en général la transcription de leurs gènes cibles et répriment leur propre expression (Schell, 1993). Les répresseurs ont leurs sites de fixation (opérateurs) dans la région promotrice du gène régulé. Une fois le répresseur fixé, l'encombrement stérique empêche l'ARN polymérase de se fixer sur le promoteur, le gène ne peut être transcrit. Un activateur fixé sur son opérateur aura un effet

inverse, son interaction avec l'ARN polymérase va augmenter l'affinité de celle-ci pour le promoteur du gène régulé, qui sera transcrit de manière plus efficace.

Les génomes de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* présentent une variété de régulateurs transcriptionnels (tableau 4). Les fonctions régulées par ces régulateurs sont très variables telles que la résistance au stress et la virulence, les métabolismes carboné, des acides aminés, des purines, des pyrimidines et de synthèse d'antibiotiques.

#### 3.4.3.1. Les régulateurs Rgg

Quelques régulateurs Rgg, des régulateurs de la famille MutR, ont été étudiés chez *S. thermophilus*. Ils ont été impliqués dans la réponse au stress chez *S. thermophilus* (Fernandez *et al.*, 2006)(voir section 4.3.3). Et récemment un régulateur Rgg a été impliqué dans un cas de quorum-sensing (Ibrahim *et al.*, 2007).

Chez les bactéries à Gram<sup>+</sup>, deux types de communication par quorum-sensing ont été identifiés : la communication *via* les oligopeptides et la communication *via* le furanosyl borate diester (AI-2). La communication *via* des peptides utilise des petits peptides appelés autoinducteurs ou phéromones. Ces peptides sont synthétisés dans le cytoplasme sous forme de précurseurs puis sont clivés, sécrétés et parfois modifiés. Après avoir été sécrétés, ces peptides peuvent exercer leur fonction soit à l'extérieur de la cellule soit à l'intérieur après avoir été ré-importés. Dans le premier cas, ils interagissent avec le récepteur membranaire d'un système à deux composants déclenchant ainsi une cascade de signalisation. Dans le deuxième cas, ils interagissent avec divers régulateurs intracellulaires après avoir été internalisés activement à l'intérieur de la cellule par le transporteur d'oligopeptides (Opp : OligoPeptidePermease).

Le travail réalisé par Ibrahim *et al.* (2007) décrit un autre locus chez la souche LMD9 de *S. thermophilus* qui pourrait être régulé par quorum-sensing. Dans ce travail, les auteurs ont mis en évidence que la production d'un petit peptide cyclique et sécrété, nommé Pep1357C, dépend du milieu et de la phase de croissance. Après avoir analysé la transcription du gène *ster1357* (codant le peptide Pep1357C) dans différents mutants, les auteurs suggèrent que la transcription de ce peptide est probablement régulée par quorum-sensing faisant intervenir un régulateur transcriptionnel, Rgg, un petit peptide hydrophobe (SHP) et le système de transport d'oligopeptides (Opp). SHP serait exporté, et à partir d'une certaine concentration, perçu par Opp qui le ré-importerait à l'intérieur de la cellule. A l'intérieur, SHP activerait le régulateur transcriptionnel, Rgg1358, qui à son tour activerait la transcription du gène *ster1357*. Ensuite, le peptide pourrait être modifié et exporté par les protéines Rsp (radical SAM enzyme) et Ptr

(potential protein transporter) respectivement. Le rôle de ce petit peptide n'a pas encore été identifié, mais il pourrait s'agir d'une phéromone (Ibrahim *et al.*, 2007).

Il est intéressant de remarquer que d'autres régulateurs de la famille Rgg (Regulator gene of glucosyltransferase) présents chez *S. thermophilus*, possèdent en amont des petits peptides hydrophobes (SHP) (Ibrahim *et al.*, 2007) qui pourraient être impliqués de la même façon, dans de phénomènes de quorum-sensing. Par exemple, 7 gènes codant pour des régulateurs transcriptionnels Rgg sont présents dans la souche LMG18311 de *S. thermophilus*, dont 5 présentent un SHP en amont.

#### 3.4.4. Les systèmes à deux composants

La transduction d'un signal et la régulation des gènes correspondants est généralement considérée comme le mécanisme principal d'adaptation bactérienne aux changements environnementaux. Les systèmes à deux composants (TCS), comme leur nom l'indique, sont constitués de deux composants : un senseur ou protéine histidine kinase (HK) et un effecteur ou « réponse régulator » (RR) (Stock *et al.*, 2000). Ces systèmes jouent des rôles importants dans la virulence, la compétence naturelle, la production de bactériocines, la formation de biofilm, la réponse au stress et d'autres réponses adaptatives (Hoch, 2000).

Le génome de *S. thermophilus* contient onze systèmes à deux composants, dont trois ne sont pas complets : les TCS03, 10 et 11 car les gènes *hk03*, *rr03*, *hk10* et *rr11* apparaissent comme des pseudogènes (Hols *et al.*, 2005). Le génome de *L. bulgaricus* contient sept systèmes à deux composants, dont deux sont inactivés (un dans l'histidine kinase, l'autre dans le régulateur de réponse). Sur les cinq systèmes à deux composants restant, quatre (Ldb2045/2046, Ldb1492/1493, Ldb0688/0689 et Ldb0135/0136) sont conservés chez autres lactobacilles et un (Ldb0878/0879) est conservé seulement chez les lactobacilles du groupe *L. acidophilus*, ainsi que chez *S. pyogenes* (Penaud, 2006). Les TCS complets de ces deux espèces et leurs homologues sont présentés dans le tableau 5.

Chez *S. thermophilus*, seul le TCS09 a été caractérisé. Il est impliqué dans la production de bactériocines chez la souche LMD9 (Fontaine *et al.*, 2007).

Plus spécifiquement, Fontaine *et al.* (2007) décrivent la production d'une bactériocine via une régulation de type quorum-sensing chez la souche LMD9 de *S. thermophilus*. Chez cette souche, le locus *blp<sub>St</sub>* contient toute l'information génétique nécessaire pour la production de bactériocine et l'immunité. Il est régulé au niveau transcriptionnel par un mécanisme de

quorum-sensing qui fait intervenir une phéromone (BlpC<sub>St</sub>) mature et le système à deux composants BlpRH<sub>St</sub> (Fontaine *et al.*, 2007).

**Tableau 5. Récapitulatif des systèmes à deux composants présents chez *S. thermophilus* LMG18311 et chez *L. bulgaricus* ATCC11842 selon (Hols *et al.*, 2005, Penaud, 2006).**

<i>St. thermophilus</i> LMG18311	<i>Lb. bulgaricus</i> ATCC11842	Similarité avec d'autres bactéries et leurs fonctions identifiés
TCS01	Ldb1492/1493	CovRS décrit pour d'autres streptocoques et bactéries. Régulation de la réponse au stress général
TCS02		<i>Enterococcus faecalis</i> Fonction inconnue.
TCS04		SpaK/SpaR ( <i>B. subtilis</i> ), NisK/NisR ( <i>L. lactis</i> ) et DvnK/DvnR ( <i>Carnobacterium divergens</i> ) Régulation de la production de bactériocines.
TCS05	Ldb0135/0136	YycG/YycF ( <i>B. subtilis</i> ), MicB/MicA ou Vick/VicR ( <i>S. pneumoniae</i> ) et TCS-C ( <i>L. lactis</i> ) Rôle essentiel à la viabilité.
TCS06 et TCS07		TCS11 ( <i>S. pneumoniae</i> ) et TCS-G ( <i>L. lactis</i> ) Fonction inconnue.
TCS08		TCS03 ( <i>S. pneumoniae</i> ) et TCS-D ( <i>L. lactis</i> ) Possiblement réponse au stress salin et osmotique.
TCS09		BlpH/BlpR et ComD/ComE de <i>S. pneumoniae</i> . Régulation de la biosynthèse de bactériocine et de la compétence respectivement.
	Ldb0688/0689	YclJ/K de <i>B. subtilis</i> Induit en condition d'anaérobiose mais son régulon n'est pas déterminé.
	Ldb2045/2046	Ne présente pas d'homologie connue
	Ldb0878/0879	Ne présente pas d'homologie connue

### 3.5. La réponse au stress oxydant

#### 3.5.1. L'oxygène et les ROS

La présence d'oxygène peut s'avérer délétère pour certains organismes qui n'y sont pas ou peu adaptés. L'oxygène est une molécule plutôt stable, incapable d'oxyder spontanément acides nucléiques et acides aminés (Imlay, 2003). Par contre ses dérivés, les ROS (Reactive

Oxygen Species) pour « espèces oxygénées réactives », qui sont le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\circ-}$ ) et le radical hydroxyle ( $\text{HO}^\circ$ ), sont bien connues pour perturber la physiologie cellulaire (Halliwell, 1990). Ces espèces sont produites spontanément par réaction entre des éléments réducteurs (flavines, quinones) et l'oxygène ou par le biais de réactions enzymatiques.

L' $\text{H}_2\text{O}_2$ , comme l'oxygène, est une molécule neutre qui diffuse librement à travers la membrane cellulaire; elle est peu réactive vis-à-vis des composants cellulaires. Le danger provient de la présence des métaux comme le fer ou le cuivre. Le fer catalyse, par la réaction de Fenton, la réduction de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en anion superoxyde et radical hydroxyle, qui sont des molécules très délétères pour la cellule réagissant sur de nombreux composants cellulaires essentiels (ADN, protéines, lipides) (Halliwell, 1990). Réaction de Fenton:



L'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\circ-}$ ), de par sa charge ne traverse pas les membranes; il s'accumule dans le cytoplasme. Peu réactif vis-à-vis de la plupart des macromolécules, il est néanmoins dangereux car il réagit facilement avec les protéines contenant des clusters [Fer-Soufre] (Liochev, 1996). Une fois oxydé, le centre [Fer-Soufre] perd un atome de fer ce qui va augmenter le pool de fer libre dans la cellule. De plus,  $\text{O}_2^{\circ-}$  se transforme en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , qui pourra réagir avec le fer libre (réaction de Fenton). La présence de fer dans le cytoplasme et le besoin en fer chez les bactéries lactiques semble faible et varie selon les espèces (Elli *et al.*, 2000, Imbert *et al.*, 1998).

### 3.5.2. Réponse au stress oxydant chez *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*

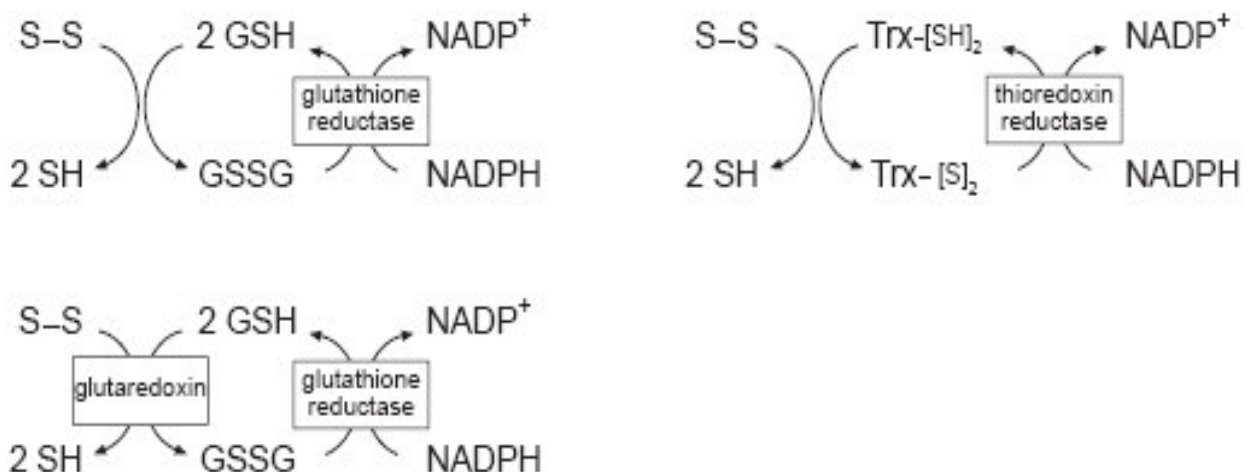
*S. thermophilus* et *L. bulgaricus* sont des micro-organismes micro-aérophiles qui peuvent se développer en présence de faibles quantités d'oxygène. Cette caractéristique physiologique semble être concordante avec les données génomiques, qui indiquent que ces deux bactéries possèdent peu de systèmes de détoxification des dérivés oxygénés ce qui les rendraient sensibles aux ROS mais qu'ils possèdent différents systèmes de protection contre les effets de ces composés (Hols *et al.*, 2005, Penaud, 2006, Thibessard *et al.*, 2004). Voyons brièvement les systèmes de protection au stress oxydant identifiés chez *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*.

### 3.5.2.1. Réponse au stress oxydant chez *S. thermophilus*

Les bactéries peuvent faire face au stress oxydant en conservant d'une part un potentiel redox intracellulaire approprié et, d'autre part, en contrecarrant l'effet toxique des ROS avec des enzymes antioxydantes.

➤ Conservation d'un potentiel redox approprié.

Chez de nombreux organismes, deux systèmes, la glutathione réductase et la thioredoxine réductase, ont été identifiés comme responsables du maintien de l'état redox de la cellule (Carmel-Harel *et al.*, 2000). Le tripeptide glutathione (GSH) réduit les ponts di-sulfure intracellulaires, la plupart du temps conjointement avec les glutaredoxines. Similairement, les protéines thioredoxines agissent comme des di-sulfure oxydoréductases et sont les donneurs d'électrons pour les thioredoxines peroxydases (figure 14).



**Figure 14. Rôles du glutathione (GSH) et de la thioredoxine (Trx) dans la réduction des ponts di-sulfure intracellulaires. Selon Carmel-Harel *et al.* (2000).**

Le glutathione di-sulfure qui est formé après oxydation est réduit par la glutathione réductase en utilisant du NADPH. La thioredoxine oxydée sera réduite par la thioredoxine réductase en utilisant aussi du NADPH. Dans les deux cas, le NADPH sera régénéré par la glucose-6-P déshydrogénase. Chez de nombreuses espèces, le tripeptide glutathione est synthétisé par l'action consécutive de la  $\gamma$ -glutamate-cystéine (codé par *gshA*) et de la GSH

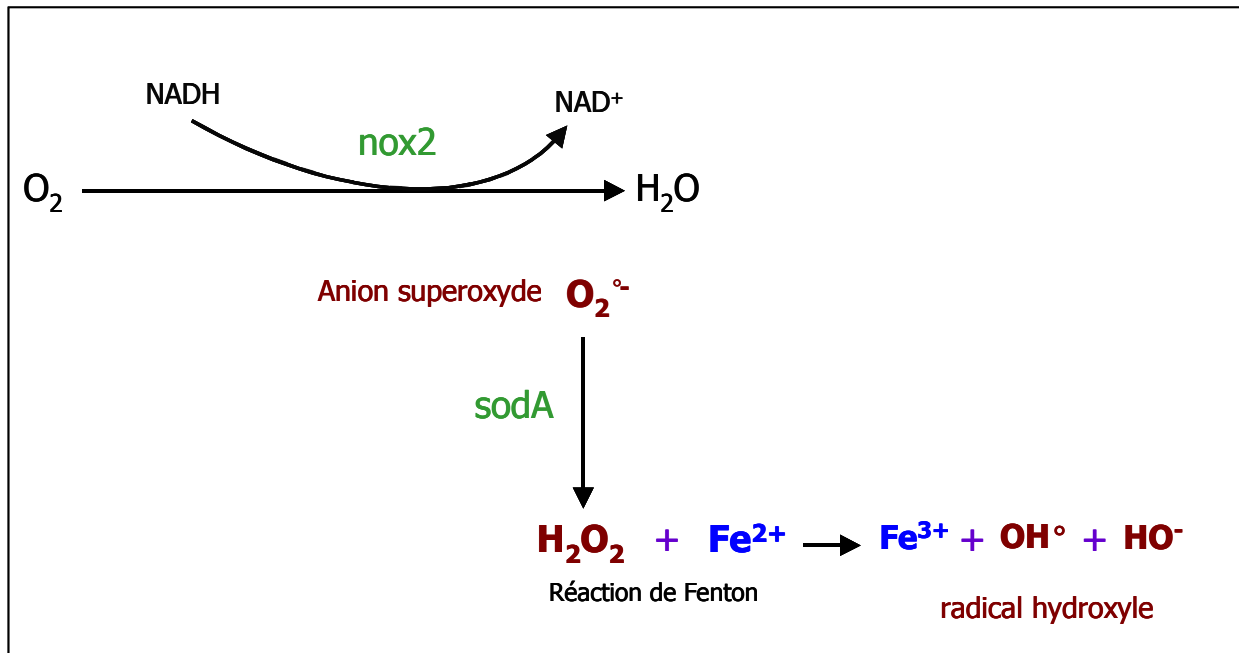


synthétase (*gshB*). *In silico*, un orthologue du gène *gshA* de *S. agalactiae* est observé chez les souches CNRZ1066 et LMG18311 de *S. thermophilus* (Hols *et al.*, 2005). De plus, le gène qui code pour une GSH réductase (*gor*) nécessaire à la réduction du glutathione di-sulfure (GSSG) est présent chez ces deux souches. Le génome de *S. thermophilus* code aussi pour deux thioredoxines (*trxA1*, *trxA2*) et deux thioredoxine réductases (*trxB1*, *trxB2*) (Bolotin *et al.*, 2004, van de Guchte *et al.*, 2006). Un gène codant une glutaredoxine (*nrdH*) est présent chez *S. thermophilus* et probablement impliqué dans la défense contre le stress oxydant (Hols *et al.*, 2005).

#### ➤ Défense contre les ROS

*S. thermophilus* possède une unique « H<sub>2</sub>O-forming NADH oxydase », codée par *nox2* (Bolotin *et al.*, 2004) (figure 15), qui catalyse la réduction de l'oxygène en eau. Une manganèse-superoxyde dismutase, codée par *sodA*, dont l'activité n'est pas régulée par l'O<sub>2</sub> (Chang *et al.*, 1997), convertit les anions superoxydes en oxygène moléculaire et en peroxyde d'hydrogène. Cet organisme ne possède pas de catalase, de NADH-peroxydase ou d'alkyl hydroperoxydase. Par contre, il possède aussi un système de défense contre l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui implique probablement la thiol-peroxydase PsaD et la protéine Dpr (iron-binding protein) qui en liant le fer intracellulaire limite probablement la réaction de Fenton (Yamamoto *et al.*, 2004). Le rôle de cette protéine dans la réponse au stress oxydant a été établi chez d'autres bactéries telles que *S. mutans* (Yamamoto *et al.*, 2002) et *S. suis* (Pulliainen *et al.*, 2003).

D'autres gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant chez la souche CNRZ368 de *S. thermophilus* ont été décrits (Thibessard *et al.*, 2004). En réalisant une mutagèneses par insertion, Thibessard *et al.* ont analysé dix mutants sensibles à la menadione (un agent superoxyde). Ces mutants ont été exposés à un choc thermique et à partir de ces expériences, les gènes qui étaient induit spécifiquement par un stress oxydant ont été identifiés : le gène *ossH* (codant pour un ABC transporteur), *sufD* et *iscU* (tous les deux codant des protéines impliquées dans l'équilibre de fer intracellulaire, en participant dans l'assemblage des groupements [Fe-S]). La région *suf* chez cette souche de *S. thermophilus* a été caractérisée par ces mêmes auteurs : elle contient 5 gènes (*sufCDS*, *iscU* et *sufB*) (Thibessard *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent la protection de la cellule contre les ROS chez *S. thermophilus* est liée à l'homéostasie du fer.



**Figure 15.** Réaction de lutte contre l'oxygène et ses espèces réactives chez *S. thermophilus*.

### 3.5.2.2. Réponse au stress oxydant chez *L. bulgaricus*

Comme chez *S. thermophilus*, l'analyse du génome de *L. bulgaricus* ATCC11842 révèle la présence de 4 gènes codant pour deux thioredoxines (*trxA1*, *trxA2*) et deux thioredoxine réductases (*trxB1*, *trxB2*) (van de Guchte *et al.*, 2006) probablement impliquées dans la conservation du potentiel redox du milieu. Par contre, les enzymes principales de détoxification de l'oxygène et de ses dérivés toxiques (enzymes de type peroxydase, superoxide dismutase, catalase ou NADH oxydase) sont absentes (Penaud, 2006) contrairement à la souche B107 de *L. bulgaricus* dans laquelle une activité NADH oxydase est décrite (Marty-Teyssset *et al.*, 2000).

Une pyruvate oxydase (*pox1*) est présente dans le génome de *L. bulgaricus* ATCC11842. Cette enzyme produit de l'acétyl-P à partir du pyruvate en présence d'oxygène, résultant en une production d' $H_2O_2$ . Néanmoins, le génome d'ATCC 11842 ne contient pas de gène susceptible d'éliminer l' $H_2O_2$  ainsi produit. Des études rapportent la production d' $H_2O_2$  par les souches de *L. bulgaricus*, ce qui peut sembler paradoxal puisque *L. bulgaricus* est également décrit comme une espèce assez sensible à cette molécule (Marty-Teyssset *et al.*,

2000, van de Guchte *et al.*, 2001). Dans leur étude, Kot *et al.* (1996) ont démontré que la souche ATCC11842 de *L. bulgaricus* produit de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  à pH 6.5 et pH 5.0 en présence de glucose et d'air.

### 3.5.3. Perception du stress oxydant et mécanismes de réponse globale chez *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*

L'exposition de bactéries à des faibles quantités d'agents oxydants conduit au déclenchement d'une réponse adaptative. Cette adaptation est coordonnée grâce à l'action de facteurs de transcription qui sont capables de détecter les stress oxydants et de réguler l'expression de fonctions de défense et de réparation appropriées. Le stress oxydant est perçu par les cellules grâce aux modifications qu'il induit, telles que la formation de ponts disulfures, le déséquilibre dans l'état redox intracellulaire, l'état des centres Fer-Soufre des protéines ou encore les modifications des acides nucléiques.

#### 3.5.3.1. Les systèmes « senseurs de peroxyde »

Trois classes de régulateurs “senseur de peroxyde” ont été caractérisées chez plusieurs organismes: OxyR, PerR et OhrRA (Mongkolsuk *et al.*, 2002), des régulateurs transcriptionnels de la famille Fur. Chez *B. subtilis*, PerR a été identifié comme le régulateur majeur de la réponse au stress oxydant et le régulon PerR inclut la catalase (KatA), l'alkyl hydroperoxyde réductase (AhpCF), un homologue de Dpr (MrgA), les enzymes de biosynthèse de l'hème (HemAXCDBL) et le transporteur de Zn(II) (ZosA) (Helmann *et al.*, 2003). Chez *S. pyogenes*, PerR réprime la transcription de Dpr (MrgA) (Brenot *et al.*, 2005). Chez *S. thermophilus*, un gène homologue à un régulateur transcriptionnel de la famille Fur est retrouvé.

#### 3.5.3.2. Les systèmes à deux composants

Outre les systèmes senseurs, la cellule possède des systèmes à deux composants capables de percevoir le stress environnemental et d'y répondre en déclenchant des réactions intracellulaires adaptées. Les TCS pour lesquels une régulation de la réponse au stress général ou stress oxydante, ont été décrits et qui sont présents dans les génomes de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* sont:

- TCS01 de *S. thermophilus* et Ldb1492/1493 de *L. bulgaricus* présentent une homologie significative avec le système CovRS décrit pour d'autres

streptocoques et bactéries. Ce système est impliqué dans la régulation de la réponse au stress général chez *S. mutans* (Dalton *et al.*, 2006) et la virulence chez *S. pyogenes* (Graham *et al.*, 2002) et *S. agalactiae* ((Lamy *et al.*, 2004). Chez *L. acidophilus*, l'inactivation de l'histidine kinase de ce système à deux composants conduit à une diminution de la résistance à l'acidité du mutant par rapport à la souche sauvage. L'adaptation de la souche permet néanmoins de restaurer une tolérance au stress acide proche de celle de la souche sauvage (Azcarate-Peril *et al.*, 2005).

- TCS05 de *S. thermophilus* et Ldb0135/0136 de *L. bulgaricus* sont similaires aux TCS présents dans plusieurs bactéries Gram<sup>+</sup>. Ce système a été impliqué chez *S. pneumoniae* comme faisant partie d'un ensemble de fonctions impliquées dans le stress oxydant et le contrôle de la compétence (Echenique *et al.*, 2001)

#### 3.5.3.3. Les régulateurs Rgg

D'autres régulateurs impliqués dans la réponse au stress oxydant sont les régulateurs Rgg. Chez *S. thermophilus*, deux gènes *rgg* (*rgg0182* et *rgg1950*) ont été identifiés par l'analyse des mutants résistants au stress oxydant. En présence d'agent oxydant, des simples mutants délétés de ces gènes présentent une survie accrue par rapport à la souche sauvage suggérant que les gènes *rgg* régulent négativement l'expression de gènes de réponse au stress oxydant (Fernandez *et al.*, 2004).



## *Avant propos*

Le yaourt est un écosystème naturel qui fait intervenir deux BL en co-culture: *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*. Outre l'importance économique associée à ce produit, l'étude de cette co-culture est un premier pas dans la compréhension de systèmes bactériens plus complexes. Même si quelques facteurs impliqués dans cette coopération ont été identifiés (essentiellement des nutriments), ce phénomène reste encore peu connu au niveau moléculaire. Aujourd'hui, le séquençage des génomes de trois souches de *S. thermophilus* et deux souches de *L. bulgaricus* étant achevé, l'étude de ces phénomènes est envisageable par des approches génomiques et post-génomiques. Ainsi, l'objectif de cette thèse est d'identifier les bases moléculaires de cette association, d'évaluer si d'autres échanges nutritionnels non décrits jusqu'à présent existent et d'identifier les phénomènes de régulation d'expression de gènes qui interviennent entre les deux espèces quand elles sont cultivées ensemble en milieu laitier.

Pour atteindre cet objectif, nous avons i) déterminé les conditions de milieu de culture ainsi que le couple de souches (dont les génomes sont séquencés) conduisant à un effet coopératif le plus marqué, ii) réalisé une étude transcriptomique et protéomique de la monoculture de *S. thermophilus* en lait ainsi que de la co-culture avec son partenaire bactérien, *L. bulgaricus*. Ainsi, nous avons comparé l'expression des gènes (par des puces à ADN) et les profils protéomiques (2-DE) de la mono-culture de *S. thermophilus* après croissance dans le lait pendant 2h30 avec ceux de la mono-culture après 5h30 de croissance. Une analyse similaire a été réalisée pour *S. thermophilus* en co-culture avec *L. bulgaricus*. De plus, nous avons pu obtenir, grâce à une identification exhaustive de toutes les protéines du gel d'électrophorèse, une carte protéomique de *S. thermophilus* lors de sa croissance dans le lait. Cela nous a permis de compléter une étude protéomique réalisée précédemment au laboratoire sur l'adaptation en lait de *S. thermophilus*, au cours de laquelle les profils protéomiques de cette bactérie cultivé en lait, en première phase de croissance (2h00) avec celle de sa culture en M17 avaient été comparés (Derzelle *et al.*, 2005).

Les travaux expérimentaux de cette thèse sont présentés en deux chapitres. Dans le premier chapitre, nous décrivons le choix du couple de souches et du milieu laitier utilisés pour la suite de l'étude. Nous avons utilisé des analyses physiologiques et biochimiques pour comparer les trois souches de *S. thermophilus* (CNRZ 1066, LMG18311 et LMD9), dont les séquences génomiques sont disponibles, en mono-culture et en co-culture avec *L. bulgaricus*

ATCC11842 (une des souches dont le génome est séquencé). De plus, nous avons comparé les résultats des trois couples avec un ferment industriel fourni par la société Danisco.

Le deuxième chapitre de cette partie expérimentale se divise en trois sections. Une première partie qui décrit les mises au point réalisées lors des analyses post-génomiques, une deuxième partie qui décrit l'évolution de la croissance en lait de *S. thermophilus* en monoculture et une dernière partie qui décrit l'évolution de la croissance en lait de *S. thermophilus* en co-culture avec *L. bulgaricus*. Les résultats obtenus dans ce chapitre font l'objet de deux articles soumis dans *Proteomics*.

Cette thèse a été réalisée en collaboration entre deux unités de l'INRA de Jouy-en-Josas: l'unité de Biochimie Bactérienne (BioBac) et l'unité de Génétique Microbienne (GM). L'analyse transcriptomique a été menée à bien grâce à une collaboration avec Pascal Hols (Université Catholique de Louvain, Belgique) et Eric Guédon (Unité de Génétique Microbienne, INRA, Jouy-en-Josas).

Seules les techniques concernant les résultats complémentaires, non décrits dans les articles, ont été détaillées dans la partie méthodologie des résultats.

# ***1. Chapitre I : Choix du couple de souches et du milieu de culture et caractéristiques de croissance.***

## ***1.1. Contexte et objectifs***

Même si un effet positif de type « proto-coopération » entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* a été observé pour beaucoup de couples de souches, il reste difficile à l'heure actuelle de prédire le comportement des souches de chacune de ces deux espèces lorsqu'elles sont en co-culture dans le lait.

Les premiers mois de cette thèse ont été consacrés au choix d'un couple de souches présentant une interaction positive. Nous avons choisi de travailler avec les trois souches de *S. thermophilus* (CNRZ 1066, LMG 18311 et LMD9) dont les génomes sont séquencés et l'une des deux souches de *L. bulgaricus*, la souche ATCC 11842 dont le génome a été séquencé à l'unité de Génétique Microbienne de l'INRA de Jouy-en-Josas. L'intérêt d'utiliser de telles souches est de faciliter les analyses post-génomiques, de type transcriptomique et protéomique, grâce à la connaissance de la séquence du génome. Nous avons choisi de tester deux milieux laitiers. Utiliser un milieu laitier comme milieu de culture a pour but d'être dans des conditions très proches du yaourt.

*S. thermophilus* et *L. bulgaricus* sont des BL homofermentaires qui produisent de l'acide lactique à partir du lactose du lait, leur taux de croissance est lié à la production d'acide dans leur milieu. Pour le choix des souches utilisées en industrie, le test le plus répandu est la mesure de l'acidification (Tamine *et al.*, 1999). D'autres critères sont recherchés, comme la production d'arômes (Marshall, 1987) et une bonne texture. Nous nous sommes basés sur ces critères pour étudier le comportement des différentes cultures. Nous avons choisi : la croissance, la valeur de post-acidification et le potentiel aromatique. Nous avons aussi utilisé le ferment commercial MYE 95 (Danisco) pour le comparer aux trois couples de souches testés. Ce ferment possède de très bonnes caractéristiques technologiques : acidification rapide, faible post-acidification et production d'une texture ferme. Voyons ci-dessous, les méthodes employées pour mesurer ces paramètres (figure 16).



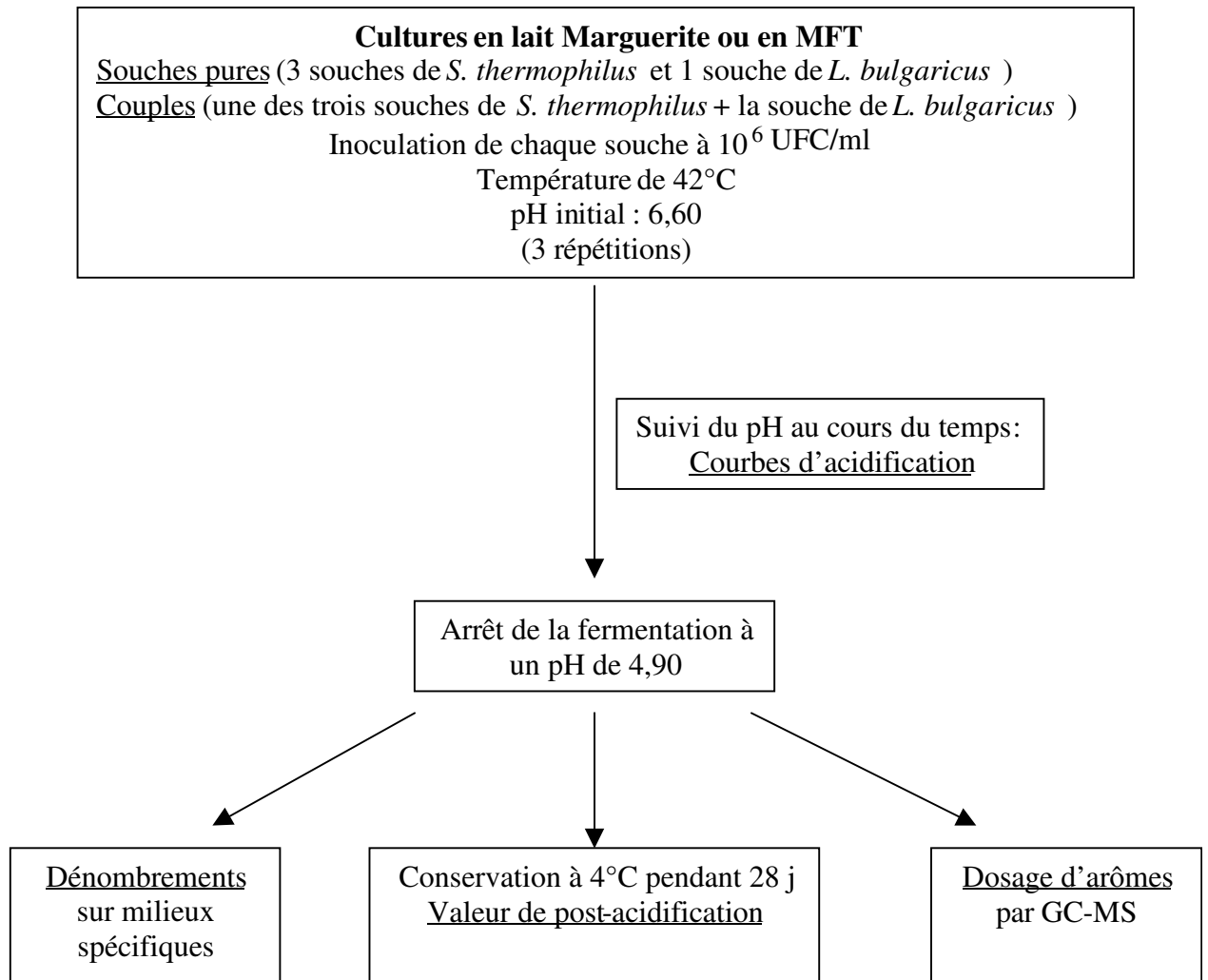


Figure 16: Plan expérimental suivi pour le choix du couple de souches et du milieu laitier.

## 1.2. Matériels et méthodes

### 1.2.1. Milieux de culture

Nous avons comparé le comportement des mono-cultures, des trois couples de souches, et du ferment Danisco cultivés dans deux milieux laitiers différents :

- ❖ le premier milieu laitier utilisé est le lait Marguerite<sup>®</sup>, un lait commercial stérilisé par micro filtration et n'ayant donc pas subi de traitement thermique.
- ❖ le deuxième milieu laitier utilisé est un microfiltrat de lait (MFT), qui est un lait décaséiné par ultrafiltration et qui, grâce à sa transparence (du fait de son absence de caséines), facilite de nombreuses expériences. Ce milieu a été validé comme modèle laitier chez *Lactococcus lactis* (Gitton *et al.*, 2005). En raison d'une faible croissance dans ce milieu des deux espèces considérées dans cette étude, il a été supplémenté en acides aminés et bases nucléotidiques. Le choix de ces composés ainsi que leur concentration a été basé sur la composition du milieu MPL (milieu proche du lait), milieu chimiquement défini et proche du lait, défini pour *L. bulgaricus* et qui permet également la croissance de *S. thermophilus* (Chervaux *et al.*, 2000).

### 1.2.2. Paramètres technologiques

Méthodes de suivi de croissance. Pour évaluer la croissance, nous avons réalisé i) les courbes d'acidification (suivi de pH au cours de la fermentation) qui reflète en partie la croissance des bactéries, et ii) un dénombrement final des populations bactériennes.

i) Le suivi de pH a été réalisé en continu pendant 24 h et à température constante (42°C) grâce au système CINAC (Ysebaert, Frépillon, France). Deux paramètres technologiques ont été utilisés pour décrire et comparer les courbes d'acidification des différentes cultures: le temps de latence et la vitesse d'acidification.

- ❖ le temps de latence est défini comme le temps qui s'écoule entre le moment où commence à s'appliquer un stimulus et le moment où apparaît la réponse. En technologie laitière, le temps de latence d'une souche est le temps qui s'écoule entre le moment où elle est ensemencée dans le milieu laitier et le moment où un changement d'acidification (de pH) est mesuré. Cette valeur varie suivant les

souches et en industrie, l'utilisation de souches présentant un temps de latence court est recherchée. Cela implique que les souches s'adaptent rapidement aux conditions industrielles (d'inoculation et de culture). Pour évaluer ce temps de latence, nous avons comparé pour les différentes souches, la variation de pH ( $\Delta\text{pH}$ , valeur absolue) entre le pH initial et le pH après 4 h de croissance. Les souches qui s'adaptent rapidement au milieu vont acidifier plus vite, ainsi la valeur  $\Delta\text{pH}$  sera élevée et le temps de latence faible.

- ❖ le deuxième paramètre que nous avons utilisé en conséquence, est la vitesse moyenne d'acidification ( $\Delta\text{pH}/\Delta t$ ). Cette valeur est calculée à partir de la courbe d'acidification et est exprimée en unité de pH/min. Nous avons choisi de comparer la vitesse moyenne d'acidification des différentes mono- et co-cultures entre les pH 6,2 et pH 5,2 (une unité de pH), cela correspond à la pente de la courbe. Le pH 5,2 est le pH où commence la coagulation de certaines cultures. Nous avons aussi déterminé la courbe de vitesse d'acidification, première dérivée de l'évolution du pH au cours du temps ( $\Delta\text{pH}/\Delta t$ ).

ii) le dénombrement final a été réalisé lorsque les cultures avaient atteint un pH de 4,9. Ce pH est la valeur choisie fréquemment en industrie pour arrêter la fermentation par passage du produit à 4°C. Pour réaliser les dénombrements spécifiques de chaque espèce, nous avons cassé mécaniquement les chaînes de cellules de *S. thermophilus* pendant 40s à l'aide d'un Turax (Turax X620, Labo-Moderne, France). Ensuite, les dilutions des différentes cultures ont été étalées sur des boîtes M17-agar + 1% lactose pour *S. thermophilus* et MRS-agar + 2% lactose acidifié à pH 5,2 pour *L. bulgaricus*. Les colonies ont été dénombrées après 16 h d'incubation (*S. thermophilus*) et 36 h (*L. bulgaricus*) à 42°C dans des conditions anaérobies (Anaerocult A, Merck, Darmstadt, Germany).

Méthode de mesure de la valeur de post-acidification. C'est la mesure du pH de la culture maintenue à 4°C pendant 28 jours après la fin de la fermentation. Mentionnons ici que 28 jours correspond à la date limite de consommation (DLC) des yaourts. Cette valeur de pH est importante car le pH influence la flaveur et la texture finales du produit et reflète donc la qualité du produit final. Si la valeur de post-acidification est très basse, nous aurons un yaourt très acide avec des problèmes de séparation d'eau (synérèse), et si elle est haute, la flaveur sera affectée en raison d'une manque d'acidité (Tamine *et al.*, 1999). Lorsque les différentes cultures ont atteint un pH de 4,9, elles ont été stockées 28 jours à 4°C, puis le pH a été de nouveau mesuré.

Méthode de mesure du potentiel aromatique. Pour déterminer le potentiel aromatique des cultures réalisées, nous avons dosé les molécules les plus représentatives de la saveur du yaourt : l'acétaldéhyde, l'acétoïne et le diacétyl. Le dosage des molécules volatiles a été effectué par GC-MS (« Gas chromatography and mass spectrometry ») en mode SPME (« solid phase micro extraction ») qui consiste à chauffer les échantillons à 60°C pour volatiliser les molécules aromatiques et les greffer par adsorption sur une fibre en carboxen/ polydiméthylsiloxane. La désorption des molécules se réalise dans l'injecteur à très haute température (240°C). Les molécules sont ensuite séparées dans une colonne (non-polar capillary column, HP-5MS, 30.0m x 0.25 mm) grâce à un flux d'hélium. Leur identification est réalisée à partir de leur temps de rétention et de leur spectre de masse. Nous avons utilisé la méthode proposée par Kieronczyk *et al.* (Kieronczyk *et al.*, 2004) avec les modifications suivantes: 5 ml de chaque culture ont été acidifiés à pH 1,0. La longueur de la colonne utilisée était de 60,0 m. Le flux d'hélium a été maintenu à 0,5 ml/min pendant 10 min, et a ensuite été augmenté jusqu'à 1,4 ml/min et maintenu constant pendant les mesures. La température du four a été maintenue à 40°C pendant 40 min, augmentée ensuite jusqu'à 150°C avec des incréments de 10°C/min, puis jusqu'à 240°C avec les mêmes incréments. Chaque composé a été détecté et identifié par son temps de rétention et son spectre de masse comparé avec ceux de la bibliothèque NIST98 (John Wiley & Sons Inc., New York, USA). Leur concentration a été calculée par la calibration de leurs ions spécifiques: 29 pour l'acétaldéhyde, 86 pour le diacétyl (2,3 butanedione) et 88 pour l'acétoïne. Un contrôle avec le lait a été effectué et la soustraction des valeurs obtenues a été réalisée pour chaque échantillon.

Analyse statistique. Trois répétitions biologiques indépendantes ont été réalisées pour chaque culture. Une analyse statistique, analyse de variance (logiciel Statgraphics Plus 5, Manugistics Inc., Rockville, U.S.A.) a été réalisée pour déterminer les différences significatives entre les différentes cultures (95% de confiance).

## 1.3. Résultats

Les résultats obtenus ont été très différents en fonction du milieu utilisé. Nous présenterons premièrement les résultats obtenus pour le milieu MFT supplémenté en acides aminés et bases et ensuite les résultats obtenus en Lait Marguerite®.

### 1.3.1. Croissance en MFT supplémenté

#### 1.3.1.1. Courbes d'acidification: temps de latence, vitesse moyenne d'acidification et vitesse d'acidification

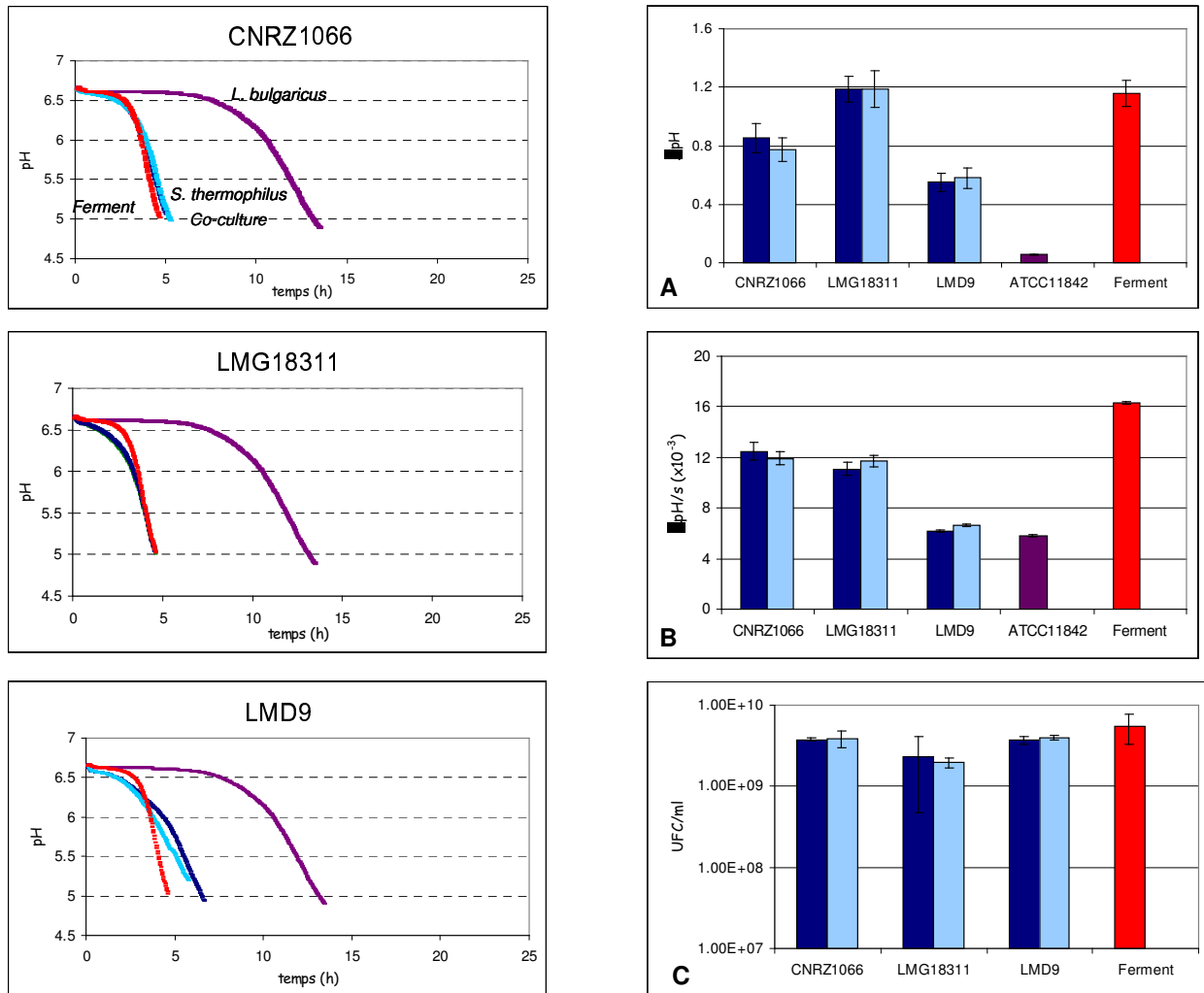
Nous avons comparé les courbes d'acidification des différentes cultures : les monocultures pour les 4 souches pures, les co-cultures des 3 couples et la culture du ferment industriel dans le milieu MFT supplémenté. Nous observons que:

- il n'y a pas d'effet de la co-culture sur l'acidification du streptocoque quelque soit le couple de souches utilisé (figure 17, colonne gauche).
- il n'y a pas d'effet de la co-culture sur le streptocoque en terme de temps de latence (figure 17, A) ni de la vitesse moyenne d'acidification quelque soit le couple de souches utilisé (figure 17, B)
- la vitesse d'acidification dans ce milieu (figure 18) est très prononcée pour les souches de *S. thermophilus* CNRZ1066 et LMG18311, ainsi que pour le ferment, avec un maximum de vitesse avant 5h. Par contre la souche de *S. thermophilus* LMD9 et la souche de *L. bulgaricus* ATCC11842 présentent des vitesses d'acidification très réduites au cours de la fermentation.

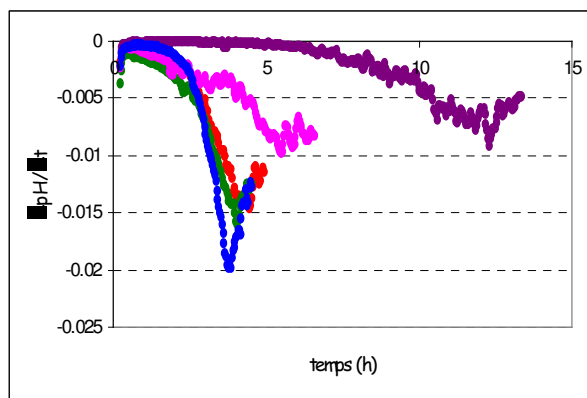
#### 1.3.1.2. Dénombrement final en MFT supplémenté

Nous avons déterminé les populations finales de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* en monoculture et en co-culture (figure 17, C). Nous observons que:

- il n'y a pas d'effet de la co-culture sur les populations finales des streptocoques qui atteignent  $10^9$  UFC/ml en co-culture comme en monoculture.
- le ferment atteint la même population que les streptocoques.



**Figure 17 :** Courbes d'acidification (colonne gauche) et valeurs (colonne droite) des  $\Delta\text{pH}$  à 4h (figure A) , des vitesses moyennes d'acidification ( $\Delta\text{pH/s}$ ) (figure B) et des dénombrements (figure C) des trois souches de *S. thermophilus* (CNRZ 1066, LMG18311 et LMD9) en monoculture (bleu) et en co-culture (bleu clair) ainsi que de la souche de *L. bulgaricus* ATCC11842 (violet) et du ferment (rouge) en MFT supplémenté en acides aminés et bases.



**Figure 18.** Evolution de la vitesse d'acidification ( $\Delta\text{pH}/\Delta t$ ) des trois souches de *S. thermophilus* (CNRZ 1066 en bleu, LMG18311 en vert et LMD9 en rose) et de la souche de *L. bulgaricus* ATCC11842 (en violet) et du ferment (en rouge) en MFT supplémenté en acides aminés et bases (courbe représentative de 3 expériences indépendantes).

### 1.3.2. *Post-acidification en MFT supplémenté*

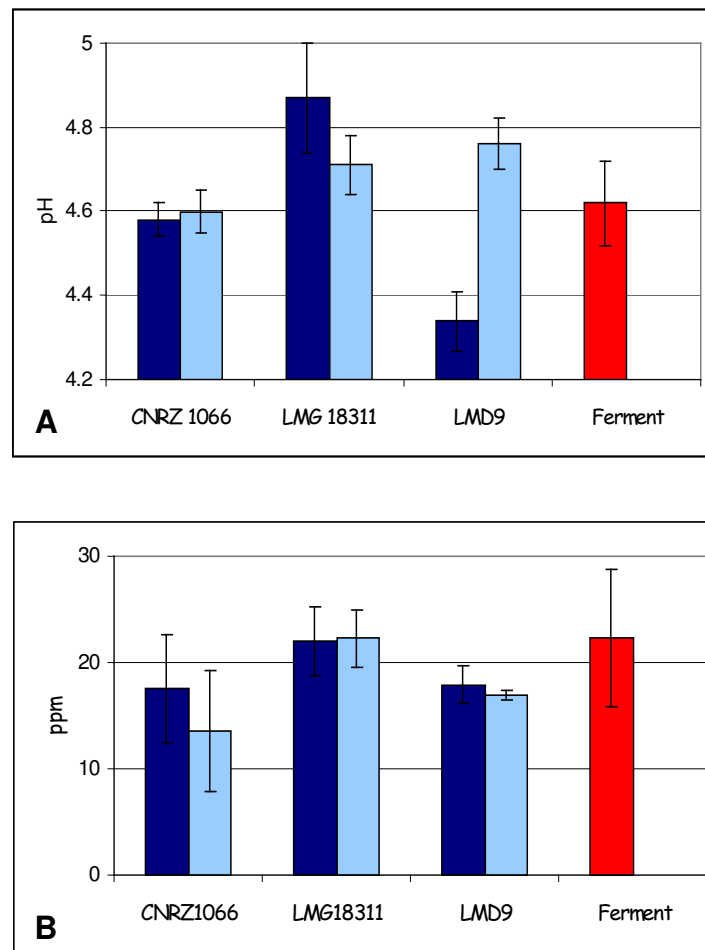
Les mesures de pH ont été réalisées 28 jours après conservation des cultures à 4°C. (figure 19, A) :

- aucune différence significative n'a été remarquée entre les monocultures des souches de *S. thermophilus* CNRZ1066 et LMG18311 avec leurs co-cultures. Pour la souche de *S. thermophilus* LMD9 nous observons que la co-culture conduit à une valeur de pH inférieure à celle de la monoculture.
- la monoculture de *L. bulgaricus* est celle qui présente la valeur de post-acidification la plus basse, avec un pH après 28j de conservation à 4°C de 4,03 (pas représenté dans la figure 19A).
- le ferment possède une valeur de pH similaire à celles des autres cultures, sauf pour la monoculture de LMD9.

### 1.3.3. *Dosage d'arômes*

Pour déterminer le potentiel aromatique des différentes cultures réalisées, nous avons dosé l'acétaldéhyde, une des molécules aromatiques les plus représentatives de la flaveur du yaourt (Pette *et al.*, 1950) mais aussi l'acétoïne et le diacétyle.

- aucune culture ne présentait une production d'acétaldéhyde mesurable dans nos conditions d'analyse. Deux hypothèses sont émises : soit les souches en question ne sont pas productrices d'acétaldéhyde dans les milieux testés, soit au pH 4,9, le moment d'arrêt des cultures et donc de dosage des molécules, l'acétaldéhyde n'était pas encore formé comme le rapportent Rasic *et al.* (Rasic *et al.*, 1978) qui proposent un pH optimal de formation de 4,40. Nous avons également dosé un yaourt nature commercial et obtenu une valeur de concentration en acétaldéhyde de 12 ppm. La valeur optimale retrouvée dans la littérature varie entre 10 et 15 ppm (Schmidt *et al.*, 1983).
- de la même façon, aucune culture ne présentait de production de diacétyle y compris le yaourt commercial.
- toutes les cultures présentaient une production d'acétoïne (figure 19,B). Aucune différence significative n'a été observée entre les souches de *S. thermophilus* en mono-cultures et les souches en co-culture avec *L. bulgaricus*.



**Figure 19:** Valeurs de post-acidification (figure A) et dosage d'acétoïne (figure B) des souches de *S. thermophilus* en monoculture (bleu foncé) et en co-culture (bleu clair) avec *L. bulgaricus* ATCC11842 et du ferment (rouge) dans du MFT supplémenté avec des acides aminés et bases.



### 1.3.4. Croissance en lait Marguerite®

#### 1.3.4.1. Courbes d'acidification : temps de latence, vitesse moyenne d'acidification et vitesse d'acidification

- la co-culture favorise l'acidification du lait pour les trois couples étudiés (figure 20, gauche).
- la mono-culture de *L. bulgaricus* présente une acidification du lait très faible, avec un pH de 4,9 atteint à plus de 20 h de culture.
- la souche de *S. thermophilus* LMD9, qui possède une protéase de paroi, présente l'acidification du lait la plus importante des trois souches testées.
  
- la co-culture est favorable aux trois couples, avec des temps de latence inférieurs (figure 20, A) et des vitesses moyennes d'acidification supérieures (figure 20, B).
- parmi les différents monocultures, c'est celle de *L. bulgaricus* qui présente le  $\Delta$ pH le plus faible, et donc le temps de latence le plus important.
- la souche LMD9 présente la valeur de vitesse moyenne d'acidification la plus importante.
  
- les trois souches de *S. thermophilus* présentent une vitesse d'acidification similaire (figure 21): nous observons une diminution de la vitesse en début de fermentation, suivie d'une augmentation de la vitesse avec un maximum vers 8h. *L. bulgaricus* par contre, présente un maximum de vitesse plus tardif que les streptocoques, vers 17h.

#### 1.3.4.2. Dénombrement final

- la co-culture est toujours favorable aux streptocoques dont les niveaux de population (figure 20, C) sont 2 à 10 fois plus élevés qu'en mono-culture et atteignent  $5 \times 10^8$  UFC/ml en lait.
- la co-culture est particulièrement favorable aux souches CNRZ1066 et LMG18311 qui n'ont pas de protéase de paroi.
- le lactobacille en monoculture n'atteint que  $10^7$  UFC/ml (pas représenté dans la figure 20C).

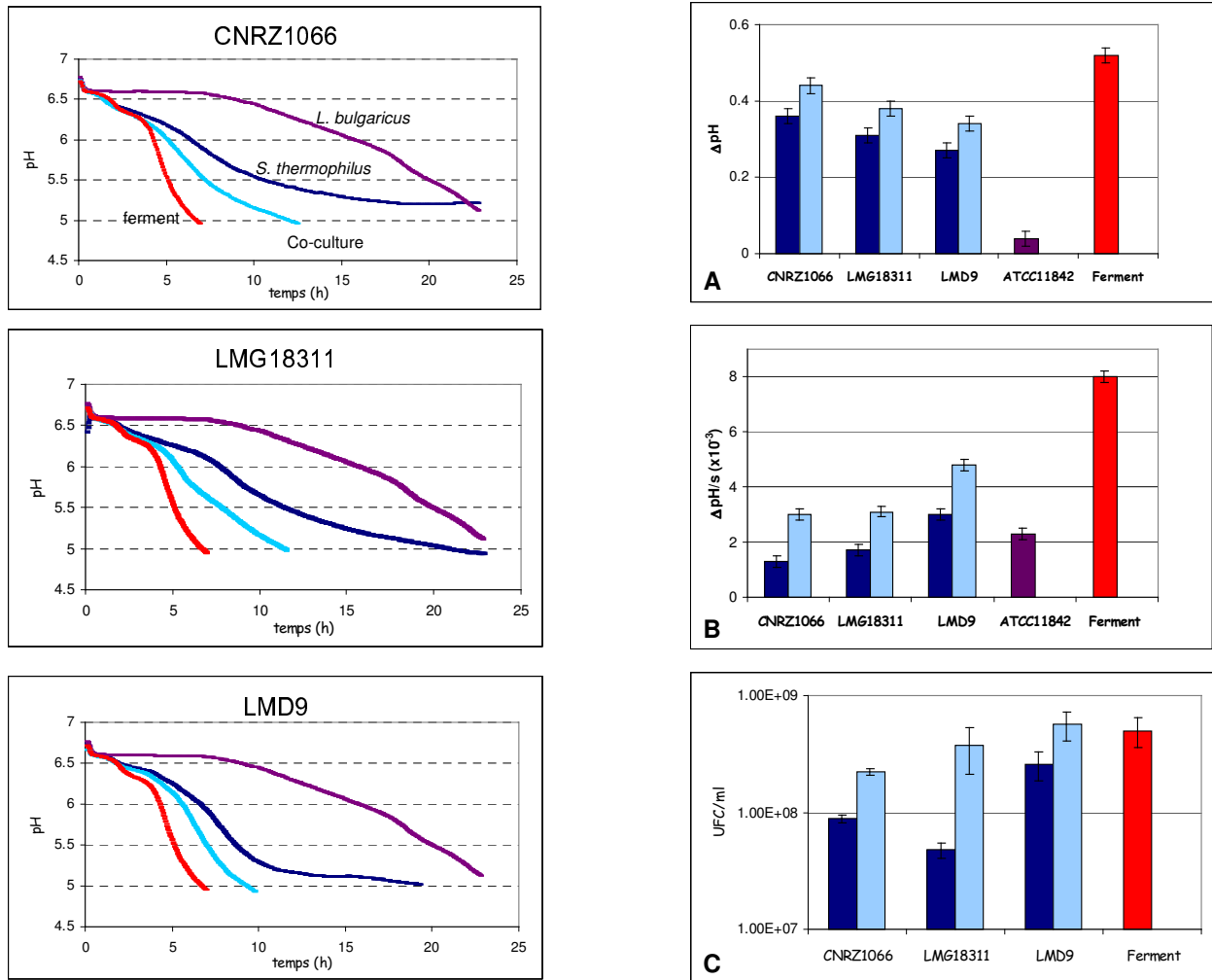


Figure 20 : Courbes d'acidification (colonne gauche) et valeurs (colonne droite) des  $\Delta pH$  à 4h (figure A) ; des vitesses moyennes d'acidification ( $\Delta pH/s$ ) (figure B) et des dénombrements (figure C) des trois souches de *S. thermophilus* (CNRZ 1066, LMG18311 et LMD9) en monoculture (bleu) et en co-culture (bleu clair) ainsi que de la souche de *L. bulgaricus* ATCC11842 (violet) et du ferment (en rouge) en lait Marguerite®.

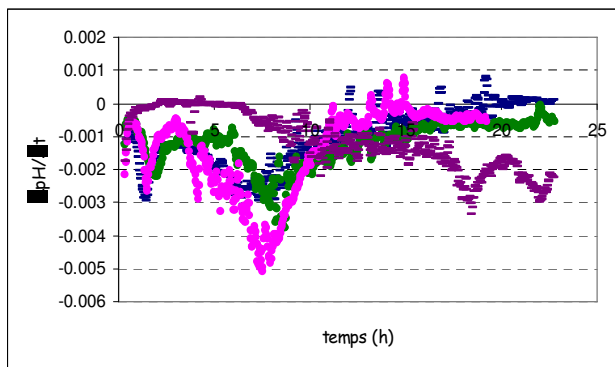


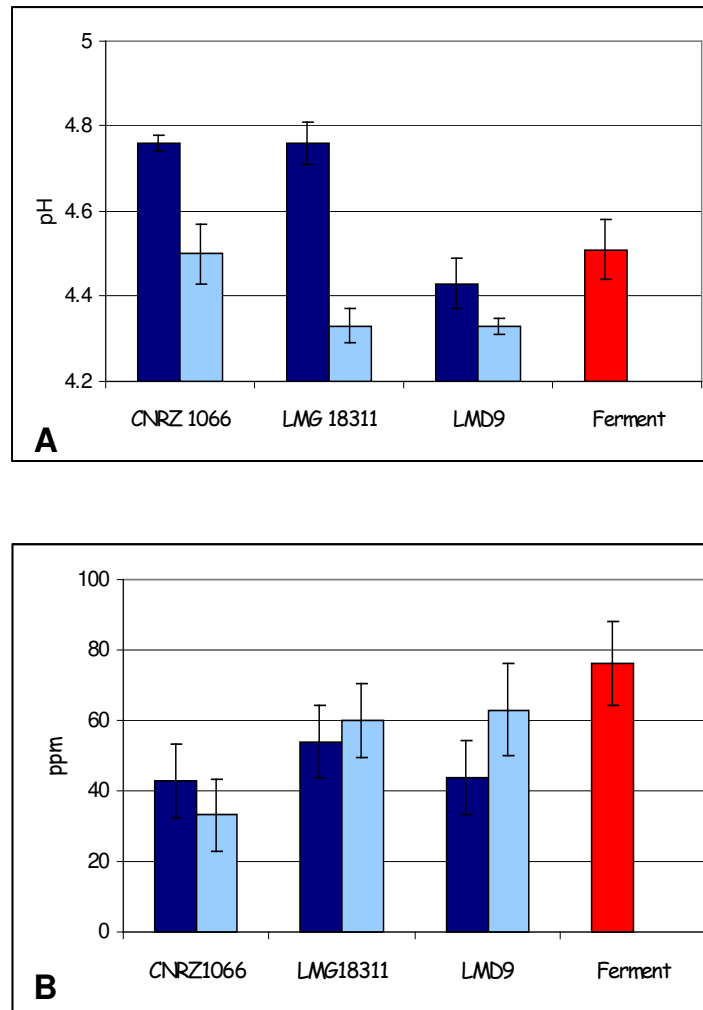
Figure 21 : Evolution de la vitesse d'acidification ( $\Delta pH/\Delta t$ ) des trois souches de *S. thermophilus* (CNRZ 1066 en bleu, LMG18311 en vert et LMD9 en rose) et de la souche de *L. bulgaricus* ATCC11842 (en violet) en lait Marguerite® (courbe représentative de 3 expériences indépendantes).

### 1.3.5. *Post-acidification en lait Marguerite® :*

- la valeur de post-acidification (figure 22, A) des co-cultures avec les souches de *S. thermophilus* CNRZ1066 et LMG18311 était inférieure à celle des mono-cultures, en revanche, pour la souche LMD9, aucune différence significative entre la mono-culture et la co-culture n'a été observée.

### 1.3.6. *Dosage d'arômes en lait Marguerite®*

- aucune culture ne présentait de production d'acétaldéhyde ni de diacétyl.
- toutes les cultures présentaient une production d'acétoïne (figure 22, C). Aucune différence significative n'a été observée entre les souches de *S. thermophilus* en mono-cultures et les souches en co-culture avec *L. bulgaricus*.



**Figure 22:** Valeurs de post-acidification (figure A) et dosage d'acétoïne (figure B) des souches de *S. thermophilus* en monoculture (bleu foncé) et en co-culture (bleu clair) avec *L. bulgaricus* ATCC11842 et du ferment (rouge) dans du lait Marguerite®.

## 1.4. Choix du couple et du milieu : discussion et conclusion

Le choix de souches à utiliser en industrie laitière est d'une grande importance pour l'obtention des produits de bonne qualité et de qualité reproductible. Plusieurs paramètres technologiques sont déterminés pour pouvoir discriminer parmi les différentes souches celles qui présentent des caractéristiques appropriées, c'est-à-dire un pouvoir acidifiant important, une production d'arômes et une texture appropriées. L'association des deux BL, *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* peut entraîner une stimulation mutuelle des deux espèces, comme nous l'avons décrit antérieurement, mais les effets observés varient selon les souches. Puisque nous souhaitons travailler avec des souches dont le génome a été séquencé pour faciliter les analyses post-génomiques, nous avons déterminé si pour un couple de souches (dont les génomes sont séquencés) un effet de proto-coopération était effectif, en étudiant les paramètres technologiques de pouvoir d'acidification en lien avec la croissance, la post-acidification et la production d'arômes.

Nous avons observé que le comportement des différentes cultures dans les deux milieux laitiers utilisés n'était pas le même. L'absence de caséines dans le milieu MFT et l'enrichissement de celui-ci par des acides aminés et des bases nucléotidiques induit des différences de comportement des bactéries par rapport au lait Marguerite<sup>®</sup>. Ainsi, dans un milieu enrichi en acides aminés et bases, la croissance des bactéries est stimulée, ce qui se traduit par une acidification plus rapide et des populations finales supérieures.

Dans le milieu MFT supplémenté, aucune stimulation de croissance due à la co-culture n'a été observée. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le lait est un milieu qui dispose des facteurs de croissance nécessaires aux BL en qualité mais pas toujours en quantité (Desmazeaud, 1990). Ainsi, dans le lait certains nutriments notamment les acides aminés et les bases sont en quantités inférieures à celles présentés en MFT supplémenté et *S. thermophilus* en co-culture sera favorisé par la présence de *L. bulgaricus* en lait. D'autre part, il faut prendre en compte les différences de populations entre les deux espèces: en lait Marguerite<sup>®</sup>, il y avait en fin de fermentation en moyenne 40 fois plus de *S. thermophilus* que de *L. bulgaricus*, alors qu'en MFT supplémenté, il y avait en moyenne 300 fois plus de *S. thermophilus* que de *L. bulgaricus*. Cette grande différence entre les deux espèces dans le milieu MFT supplémenté, nous laisse supposer que l'apport de *L. bulgaricus* à la co-culture dans ce milieu est plus réduit. Il est intéressant de remarquer qu'en milieu MFT supplémenté avec des acides aminés, c'est la souche LMD9 qui présente la vitesse d'acidification la plus faible. On peut imaginer que le fait de posséder une protéase de paroi pour la dégradation des

caséines lui permet de s'adapter rapidement au lait mais ne lui donne pas d'avantage dans un milieu où les protéines sont quasiment absentes.

Comparaison de souches :

Pour *S. thermophilus*, la ressemblance génétique entre les souches CNRZ1066 et LMG18311 est plus importante qu'avec la souche LMD9 (Bolotin *et al.*, 2004). Une différence majeure entre ces trois souches est la présence de la protéase de paroi, PrtS, présente uniquement chez la souche LMD9. La présence de PrtS est bénéfique pour LMD9 qui présente une vitesse moyenne d'acidification et une population finale supérieure à celles des deux autres souches. D'autre part, même si les deux autres souches se ressemblent génétiquement, nous observons des comportements différents en lait. La souche CNRZ1066 présente un temps de latence plus faible et une population finale supérieure, de l'ordre de  $10^8$  UFC/ml, par rapport à la souche de *S. thermophilus* LMG18311. Nous avons déterminé la courbe de vitesse d'acidification des trois souches de *S. thermophilus* en lait Marguerite®. Dans ce milieu et dans les premières heures de fermentation (avant 5h), une diminution de la vitesse d'acidification suivie d'une augmentation a été observée pour les trois souches. *S. thermophilus* présente la particularité de dégrader l'urée en produisant du CO<sub>2</sub> et du NH<sub>3</sub> dans le milieu de croissance (Juillard *et al.*, 1988), particularité qui a pour conséquence de ralentir la vitesse d'acidification du lait (Mora *et al.*, 2002). Notre hypothèse est que les trois souches présentent une activité uréasique en milieu lait Marguerite®, ce qui se traduit par une production de NH<sub>3</sub> dans les premières heures de fermentation, ayant pour conséquence une augmentation du pH.

La souche de *L. bulgaricus* que nous avons choisi, contrairement aux souches de *S. thermophilus*, présente un temps de latence très important en lait Marguerite®, ce qui indique qu'elle a des difficultés à s'adapter à ce milieu. Même si elle possède le gène codant pour une protéase de paroi PrtB, cette espèce a des besoins plus importants que *S. thermophilus* pour croître rapidement dans ce milieu (Zourari *et al.*, 1992). Le lait Marguerite® est un lait stérilisé à froid, n'ayant donc pas subi de traitement thermique. Le chauffage du lait induit la production de certains molécules qui peuvent stimuler l'activité des bactéries (Tamine *et al.*, 1999) : libération de cystéine, glutathione, thioglycolate, d'oxygène et formation d'acide formique. Nous pouvons supposer que la présence d'oxygène dans ce milieu et le manque d'acide formique empêche la bonne croissance de *L. bulgaricus* étant donné que cette souche, comme cela a été décrit dans la revue bibliographique, est d'une part très sensible à l'oxygène

et d'autre part, ne possède pas l'enzyme Pfl, pyruvate formate lyase, nécessaire à la production du formate à partir du pyruvate.

Proto-coopération :

L'ensemble des résultats indiquent que, quel que soit le couple de souches considéré, la co-culture a un effet positif sur la croissance de *S. thermophilus*, avec des temps de latence plus faibles, des vitesses d'acidification plus importantes et des populations finales de *S. thermophilus* supérieures en co-culture qu'en mono-culture, en lait Marguerite<sup>®</sup>. La présence de *L. bulgaricus* stimule la croissance des trois souches de *S. thermophilus* dans le lait, dans une moindre mesure pour la souche LMD9. Nous savons que la protéase de paroi PrtB de *L. bulgaricus* intervient dans la proto-coopération (Courtin *et al.*, 2002). Le fait que la souche LMD9 qui possède une protéase de paroi, PrtS, soit stimulée par la présence de *L. bulgaricus* suggère que cette dernière stimule la croissance de *S. thermophilus* via également d'autres composés que ceux provenant des caséines, les substrats des protéases de paroi des bactéries lactiques. C'est la souche de *S. thermophilus* LMG18311 qui présente la plus grande stimulation avec une population finale 10 fois plus importante en co-culture qu'en mono-culture.

Pour le dernier critère technologique que nous avons étudié, la production d'arômes, nous avons pu remarquer que seule l'acétoïne a été détectée dans les différentes cultures. L' $\alpha$ -acétolactate est le précurseur du diacétyl et de l'acétoïne (figure 23 A). Ce composé est produit par l'enzyme acétolactate synthétase, *als* ou *ilvB* (deux gènes différents), à partir du pyruvate. Le diacétyl est produit par la décarboxylation chimique oxydante de l' $\alpha$ -acétolactate, alors que l'acétoïne est produit grâce à l'enzyme  $\alpha$ -acétolactate décarboxylase, *aldB*, par une décarboxylation non oxydante de l' $\alpha$ -acétolactate. La production de diacétyl et d'acétoïne va dépendre de la quantité d'oxygène du milieu mais aussi du pH. Monnet *et al.* (Monnet *et al.*, 1994) ont déterminé chez *S. thermophilus*, qu'à pH 4,0 40% de l' $\alpha$ -acétolactate était transformé en diacétyl et 60% en acétoïne, alors qu'à pH 7,0, seulement 6% de diacétyl est produit. De plus, ils ont déterminé que la production de diacétyl était minime dans des milieux dégazés ou dans des milieux avec un bas potentiel redox (dû à la consommation d'O<sub>2</sub> par les bactéries). Les trois souches de *S. thermophilus* testées possèdent les gènes nécessaires (*als*, *ilvB* et *aldB*) à la production de diacétyl et d'acétoïne, ce qui n'est pas le cas de *L. bulgaricus* ATCC11842, cela suggère donc que ce dernier n'est probablement pas capable de produire de diacétyl ni d'acétoïne par cette voie là. Dans nos conditions de dosage, à pH 4,9, on pouvait s'attendre à avoir une production de diacétyl, mais comme les cultures n'étaient pas agitées, les bactéries ont dû consommer l'oxygène du milieu, ce qui a

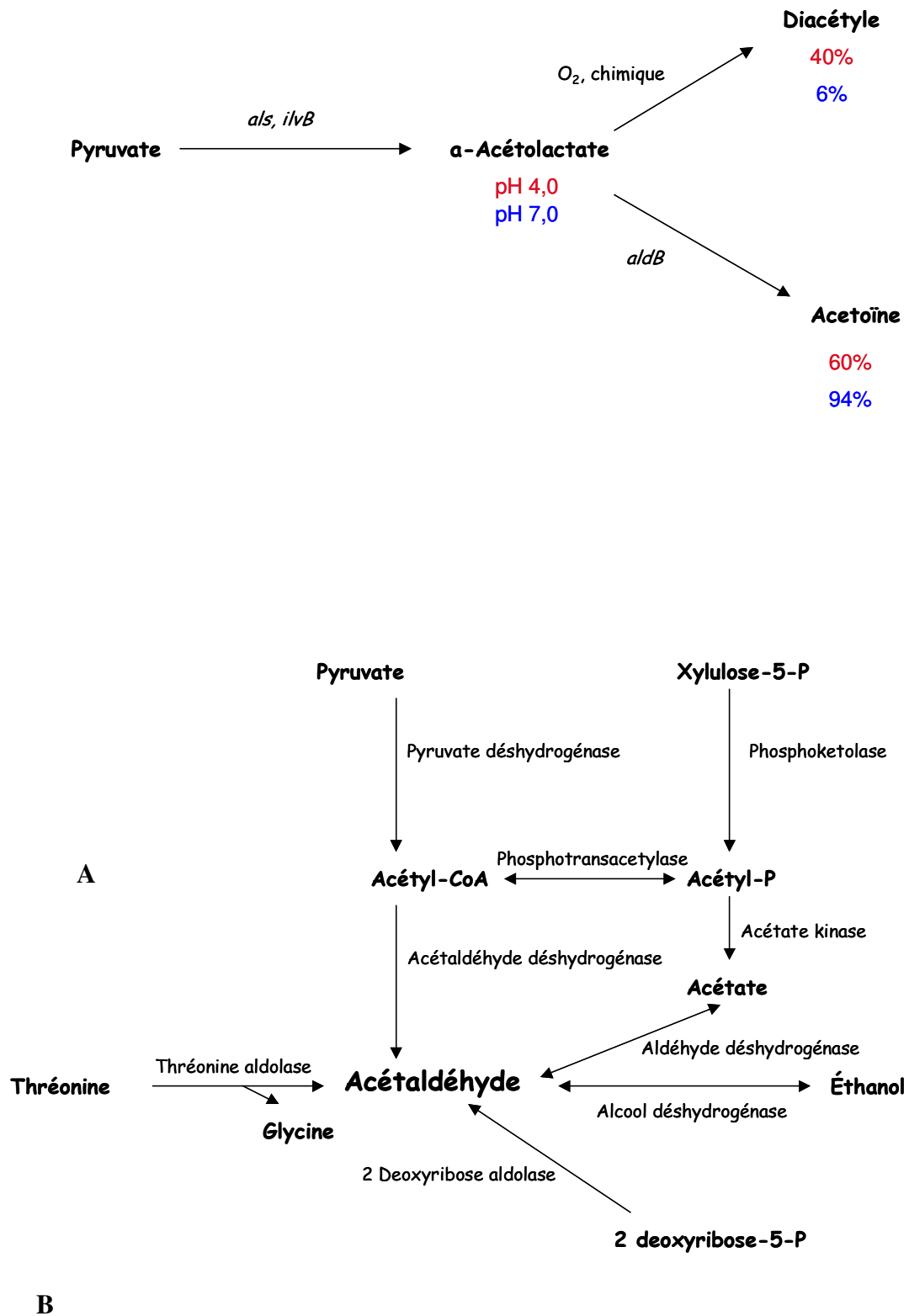


Figure 23: Proportion de diacétyle et d'acétoïne formés à partir du pyruvate selon le pH (A). (Monnet *et al.*, 1994). Voies possibles de formation d'acétaldéhyde (B) par les bactéries lactiques selon Raya *et al.* (Raya *et al.*, 1986)



empêché la production de diacétyle et favorisé celle de l'acétoïne. D'autre part, nous n'avons observé aucune différence entre la production d'acétoïne des mono-cultures et celles des co-cultures. Ce qui peut être expliqué par le fait que la souche de *L. bulgaricus* ATCC11842 n'est probablement pas capable de produire ces composés, et donc leur production ne dépend probablement que de *S. thermophilus*.

Dans le cas de la production d'acétaldéhyde, cinq voies de formation possibles de ce composé ont été décrites chez les BL (figure 23 B) (Raya *et al.*, 1986). Ainsi, les trois souches de *S. thermophilus* présentent potentiellement deux de ces voies: la voie de la thréonine aldolase (*glyA*) à partir de la thréonine et celle de l'alcool déshydrogénase (*aldh*) à partir de l'éthanol. Chez *L. bulgaricus* ATCC11842 une étude a montré que cette bactérie possède une activité thréonine aldolase (Raya *et al.*, 1986). Dans notre cas, nous n'avons pas dosé d'acétaldéhyde alors que les souches utilisés pouvaient en produire, ce qui suggère qu'à pH 4,9, le moment d'arrêt des cultures et donc de dosage des molécules, l'acétaldéhyde n'était pas encore formé comme le rapportent Rasic *et al.* (Rasic *et al.*, 1978).

### 1.4.1. Conclusion

Ainsi, nous avons choisi de travailler avec le milieu lait Marguerite<sup>®</sup>, milieu pour lequel une stimulation de la croissance de *S. thermophilus* est observée. Parmi les trois souches de *S. thermophilus* testées, nous avons choisi la souche de *S. thermophilus* LMG18311 pour laquelle l'effet positif sur la croissance était le plus marqué, ainsi qu'une amélioration de la valeur de post-acidification en co-culture.

De plus, nous disposions des données concernant l'adaptation au milieu lait Marguerite<sup>®</sup> de cette souche, grâce à l'analyse protéomique précédemment réalisée dans notre laboratoire (Derzelle *et al.*, 2005). Finalement, nous disposions de puces à ADN de *S. thermophilus* LMG18311 qui nous ont servi à réaliser l'étude de l'analyse globale en transcriptomique. En résumé, nous avons choisi par la suite de notre étude le couple *S. thermophilus* LMG18311 / *L. bulgaricus* ATCC 11842 cultivé en lait Marguerite<sup>®</sup>.

## 2. Chapitre II : Analyses post-génomiques

### 2.1. Contexte et objectifs

L'association entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* a été étudiée depuis plusieurs décennies et ces études ont montré que la production de certains métabolites par l'une ou l'autre espèce stimulait la croissance de son partenaire, démonstration réalisée grâce à des analyses physiologiques. Aujourd'hui, avec le séquençage de génomes de quelques souches des deux espèces, nous avons voulu caractériser plus globalement et à un niveau moléculaire cette association en utilisant des analyses post-génomiques.

L'analyse transcriptomique fournit de l'information sur la présence et l'abondance des ARN transcrits, ce qui est indicatif des gènes exprimés à un moment donné dans une cellule (Joyce *et al.*, 2006). L'analyse protéomique permet d'examiner les changements de profil protéique d'une bactérie en réponse à un stimulus ou à des modifications de conditions environnementales (VanBogelen *et al.*, 1999). L'ensemble de ces deux analyses nous permettra d'étudier les variations de l'expression de gènes et de la synthèse protéique de *S. thermophilus* en présence ou en absence de *L. bulgaricus*, entre deux stades de croissance différents. Nous avons choisi d'étudier cette interaction en utilisant ces deux approches pour essayer de comprendre au niveau transcriptionnel et traductionnel l'interaction entre ces deux bactéries. Ces deux approches sont complémentaires mais pas comparables, c'est-à-dire que la transcription de gènes n'implique pas nécessairement une synthèse de sa protéine et inversement la synthèse d'une protéine n'est pas nécessairement régulée au niveau transcriptionnel.

Avant la réalisation de cette thèse, quelques études protéomiques sur *S. thermophilus* et sur *L. bulgaricus* avaient été réalisées. Nous pouvons citer l'étude chez *S. thermophilus* d'Arena *et al.* (Arena *et al.*, 2006). Cette étude a comparé la carte obtenue en M17-lactose, avec les profils protéiques obtenus après un stress chaud, froid, acide, oxydant et de carence nutritionnelle. Les résultats montrent que l'adaptation aux différents stress implique l'augmentation dans l'abondance des protéines de stress général et commune à la plupart des conditions, mais aussi l'augmentation dans l'abondance des protéines uniques et spécifiques à chacune des conditions. Une autre étude sur l'adaptation au lait a été effectuée chez *S. thermophilus* LMG18311. Le profil protéomique de la bactérie cultivée en M17-lactose a été comparé à celui de la bactérie cultivée en lait. Il a été mis en évidence notamment le rôle

de la pyruvate formate lyase (Pfl) dans cette adaptation (Derzelle *et al.*, 2005). Quelques études protéomiques sur *L. bulgaricus* ont été publiées. Une première étude a démontré que la souche VI1010 induit fortement trois protéines chaperones (GroES, GroEL et DnaK) en situation de stress acide (Gouesbet *et al.*, 2002, Lim *et al.*, 2000). Cette étude a été réalisée grâce à un système de marquage de protéines avec de la méthionine [<sup>35</sup>S]. Une autre étude sur le stress thermique a révélé une augmentation dans l'abondance des protéines HSP (« heat shock proteins ») (Gouesbet *et al.*, 2002). Récemment, une étude protéomique complétée avec des données transcriptomiques sur la souche ATCC11842 et son adaptation au milieu acide montre que trois systèmes d'adaptations majeurs sont observés. Un premier système est l'induction des protéines chaperones (GroES, GroEL, HrcA, GrpE, DnaK, DnaJ, ClpE, ClpP et ClpL) et la répression de ClpC. Le deuxième système est l'induction de gènes impliqués dans la biosynthèse d'acides gras (*fabH*, *accC*, *fabI*) et finalement, le troisième système est la répression des gènes impliqués dans la voie du mevalonate et la synthèse d'isoprenoïde (*mvaC*, *mvaS*), des composants de la membrane cellulaire (Fernandez A. publication en cours).

En revanche, aucune étude transcriptomique globale sur ces deux espèces n'avait été rapportée. De plus, aucune analyse transcriptomique et protéomique sur leur co-culture n'avait été effectuée.

Ainsi, les travaux présentés dans cette partie ont eu pour objectif de déterminer au niveau de l'expression des gènes et des protéines, l'évolution au cours de la croissance de *S. thermophilus* en mono-culture en lait Marguerite<sup>®</sup> dans un premier temps puis en présence de *L. bulgaricus*.

## 2.2. Caractéristiques de croissance du couple *S. thermophilus* LMG18311 et *L. bulgaricus* ATCC11842 en lait Marguerite®

Nous avons caractérisé plus en détails la croissance du couple de souches choisi: LMG1811 et ATCC11842. Comme nous l'avons remarqué précédemment en utilisant le système de suivi de pH en continu (CINAC), les courbes d'acidification (figure 24, A) montrent ici que la co-culture conduit à une meilleure acidification. De plus, elles nous permettent d'observer que *L. bulgaricus* ATCC11842 est une souche qui a un temps de latence très long, avec une diminution de pH ne débutant qu'à partir de 5h de culture.

Les dénombrements (au cours du temps), réalisés sur milieux spécifiques de chaque espèce (figure 24, B), nous ont permis d'observer en détail le comportement de chacune des espèces en mono-culture et en co-culture. Nous observons que pendant les deux premières heures de croissance, les courbes de croissance des mono-cultures et des co-cultures sont superposées (pour *S. thermophilus* ainsi que pour *L. bulgaricus*). A partir de 2h30 de croissance, une divergence est observée: la co-culture est favorable pour les deux espèces mais dans le cas de *L. bulgaricus* l'effet de stimulation est plus faible et transitoire avec un arrêt de croissance après 4h30. La croissance de *S. thermophilus* est stimulée jusqu'à la fin de la fermentation quand il est co-cultivé avec *L. bulgaricus*. Cette stimulation résulte en un dénombrement final 10 fois plus élevé de *S. thermophilus* ( $3.7 \times 10^8$  UFC/mL) en co-culture qu'en mono-culture ( $3.9 \times 10^7$  UFC/mL). Pour *L. bulgaricus*, la co-culture conduit à un dénombrement final trois fois inférieur ( $6.0 \times 10^6$  UFC/mL) à celui de la mono-culture ( $2.0 \times 10^7$  UFC/mL). A la fin de la fermentation de la co-culture, *S. thermophilus* domine significativement sur *L. bulgaricus* avec 60 fois plus de cellules ( $3.7 \times 10^8$  UFC/mL et  $6.0 \times 10^6$  UFC/mL, respectivement).

La caractérisation des mono-cultures et de les co-cultures nous a permis de déterminer les temps de fermentation où nous souhaitons mener les analyses post-génomiques (figure 24). Il s'agit des temps :

- ❖ 2h30 (pH 6,26), à ce stade de fermentation les mono-cultures et les co-cultures ont poussé de façon similaire et ont un pH similaire. Ces échantillons nous servirons de référence.

- ❖ 5h30 (pH 5,35 de la co-culture), à ce stade, l'effet bénéfique de la proto-coopération est net pour *S. thermophilus* comme le montre la comparaison entre pH et dénombrement

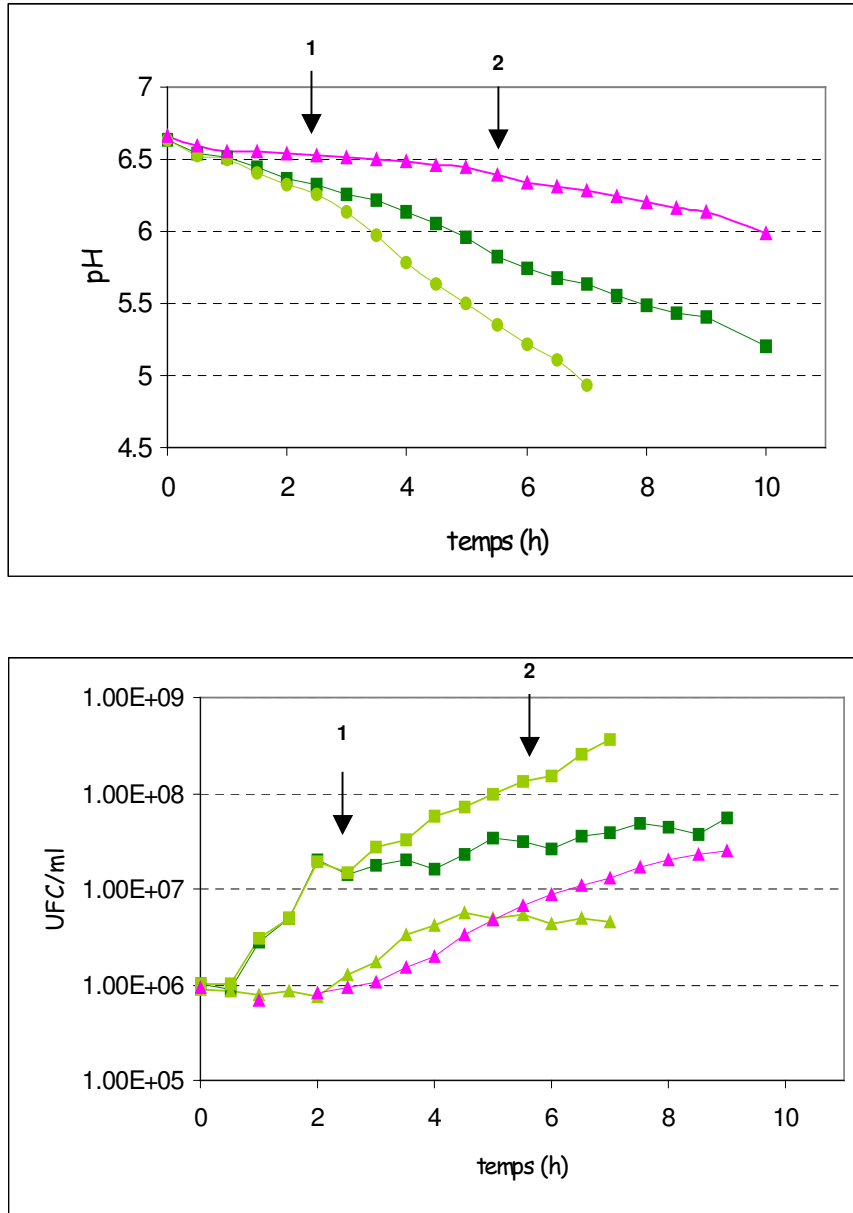


Figure 24: Courbes d'acidification (A) et de croissance (B) de *S. thermophilus* LMG18311 et *L. bulgaricus* ATCC11842 en lait Marguerite®. En rose, *L. bulgaricus* ATCC11842 en monoculture, en vert foncé *S. thermophilus* LMG18311 en monoculture et en vert clair leur co-culture. En B, les carreaux correspondent aux dénombrements du streptocoque alors que les triangles correspondent aux numérations du lactobacille. Les flèches correspondent aux deux temps choisis pour la réalisation des analyses post-génomiques (1 : 2h30 et 2 : 5h30). (Courbes représentatives de 3 expériences indépendantes)

de la co-culture par rapport à la mono-culture. Ce prélèvement se réalise avant la coagulation du lait.

Ainsi, nous avons comparé l'évolution des ARNm et les profils protéomiques de la mono-culture de *S. thermophilus* en lait entre 2h30 et 5h30, et de la même façon pour *S. thermophilus* en co-culture avec *L. bulgaricus*.

### 2.3. Matériels et méthodes complémentaires

Cette partie est dédiée à la description des mises au point des techniques utilisées et les matériels et méthodes qui ne sont pas décrits dans les deux articles.

Dans un premier temps, nous avons adapté la technique d'extraction des ARN et des protéines à partir des bactéries cultivées dans du lait. En effet, le lait, utilisé pour la production du yaourt et où les interactions entre ces deux bactéries sont les mieux représentées, pose des problèmes expérimentaux de manipulation. La présence de caséines et de la matière grasse (même si le lait a été écrémé) sont les principaux problèmes qui interfèrent dans les extractions d'ARN et de protéines.

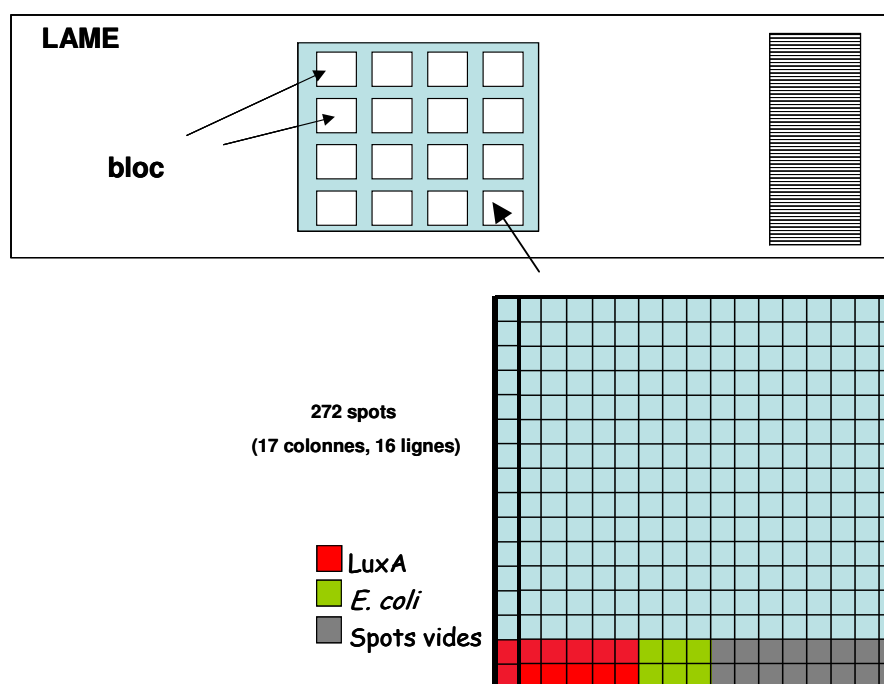
#### 2.3.1. Transcriptomique

Pour déterminer les variations d'expression des gènes lors de la croissance dans le lait de *S. thermophilus* LMG18311 en mono-culture et en co-culture, nous avons utilisé des puces à ADN commerciales fournies par Eurogentec (EG-K40C), grâce à une collaboration avec Pascal Hols de l'Université Catholique de Louvain et Eric Guédon de l'unité de Génétique Microbienne (INRA, Jouy-en-Josas).

Les puces à ADN étaient incomplètes, avec 130 gènes absents, correspondant à 8% du génome (tableau 4). Les lames (puces à ADN) étaient composées de 16 blocs qui représentaient le set de sondes (figure 25). Chaque bloc contenait 272 spots (16 lignes x 17 colonnes). Les sondes étaient des produits PCR d'approximativement 500 pb, et chaque gène était représenté en double. Des sondes de contrôle étaient incluses dans les deux premières lignes : LuxA en 6 dilutions (contrôle externe de luciférase de *Coleoptera*), 3 gènes de *E. coli* (contrôles négatifs) et des spots « vides ».

**Tableau 4. Liste des gènes absents de la puce à ADN commerciale fournie par Eurogentec (EG-K40C) de *S. thermophilus* LMG18311 utilisée dans l'analyse transcriptomique.**

Gènes absents									
<i>acoA</i>	<i>cspA</i>	<i>groES</i>	<i>rpmGB</i>	<i>stu0219</i>	<i>stu0676</i>	<i>stu1176</i>	<i>stu1493</i>	<i>stu1682</i>	<i>stu1948</i>
<i>acpP1</i>	<i>cspB</i>	<i>hom</i>	<i>rpmH</i>	<i>stu0295</i>	<i>stu0681</i>	<i>stu1194</i>	<i>stu1498</i>	<i>stu1683</i>	<i>stu1959</i>
<i>acyP</i>	<i>cycA</i>	<i>int-tr</i>	<i>rpmI</i>	<i>stu0347</i>	<i>stu0716</i>	<i>stu1208</i>	<i>stu1508</i>	<i>stu1684</i>	<i>stu1960</i>
<i>argF</i>	<i>eps10</i>	<i>leuC</i>	<i>rpsJ</i>	<i>stu0370</i>	<i>stu0730</i>	<i>stu1286</i>	<i>stu1518</i>	<i>stu1692</i>	<i>stu1977</i>
<i>aroH</i>	<i>eps11</i>	<i>livJ</i>	<i>rr10-tr</i>	<i>stu0446</i>	<i>stu0824</i>	<i>stu1369</i>	<i>stu1595</i>	<i>stu1707</i>	<i>stu1984</i>
<i>atpC</i>	<i>eps12</i>	<i>llalM-tr</i>	<i>secE</i>	<i>stu0510</i>	<i>stu0890</i>	<i>stu1370</i>	<i>stu1597</i>	<i>stu1709</i>	<i>stu1996</i>
<i>atpD</i>	<i>eps13</i>	<i>phaB</i>	<i>stu0096</i>	<i>stu0529</i>	<i>stu0891</i>	<i>stu1371</i>	<i>stu1612</i>	<i>stu1747</i>	<i>tgt</i>
<i>atpE</i>	<i>eps9</i>	<i>phnA</i>	<i>stu0097</i>	<i>stu0568</i>	<i>stu0913</i>	<i>stu1379</i>	<i>stu1613</i>	<i>stu1755</i>	<i>tnp1191</i>
<i>atpG</i>	<i>ftsW</i>	<i>proWZ</i>	<i>stu0106</i>	<i>stu0586</i>	<i>stu0914</i>	<i>stu1382</i>	<i>stu1649</i>	<i>stu1759</i>	<i>tnp1216</i>
<i>blpK-tr</i>	<i>galE3-tr</i>	<i>ptpS</i>	<i>stu0157</i>	<i>stu0587</i>	<i>stu0915</i>	<i>stu1383</i>	<i>stu1664</i>	<i>stu1831</i>	<i>tnpSth2-tr</i>
<i>cbpD3</i>	<i>gapA</i>	<i>rplS</i>	<i>stu0209</i>	<i>stu0604</i>	<i>stu0949</i>	<i>stu1384</i>	<i>stu1670</i>	<i>stu1850</i>	<i>tnpSth3-tr</i>
<i>comEB</i>	<i>gloA</i>	<i>rpmB</i>	<i>stu0217</i>	<i>stu0653</i>	<i>stu1093</i>	<i>stu1449</i>	<i>stu1674</i>	<i>stu1859</i>	<i>trxB1</i>
<i>comFC</i>	<i>gltX</i>	<i>rpmF</i>	<i>stu0218</i>	<i>stu0675</i>	<i>stu1101</i>	<i>stu1486</i>	<i>stu1681</i>	<i>stu1947</i>	<i>umuC1</i>



**Figure 25: Puce à ADN commerciale fournie par Eurogentec (EG-K40C) de *S. thermophilus* LMG18311 : 16 blocs contenant chacun 272 spots (chaque gène en double).**

Des ARN des deux bactéries ont été extraits à deux stades de croissance (2h30 et 5h30) en monoculture et en co-culture. Trois fermentations indépendantes ont été réalisées.

Dans un premier temps, nous avons adapté la technique d'extraction des ARN à nos cultures en lait. Nous avons donc traité les cultures avec du trisodium de citrate pour éliminer les caséines du lait puis extrait les ARN à l'aide du Trizol (mélange de phénol et de guanidine isothiocyanate) et enfin traité les échantillons d'ARN à la DNase pour éliminer toute contamination d'ADN.

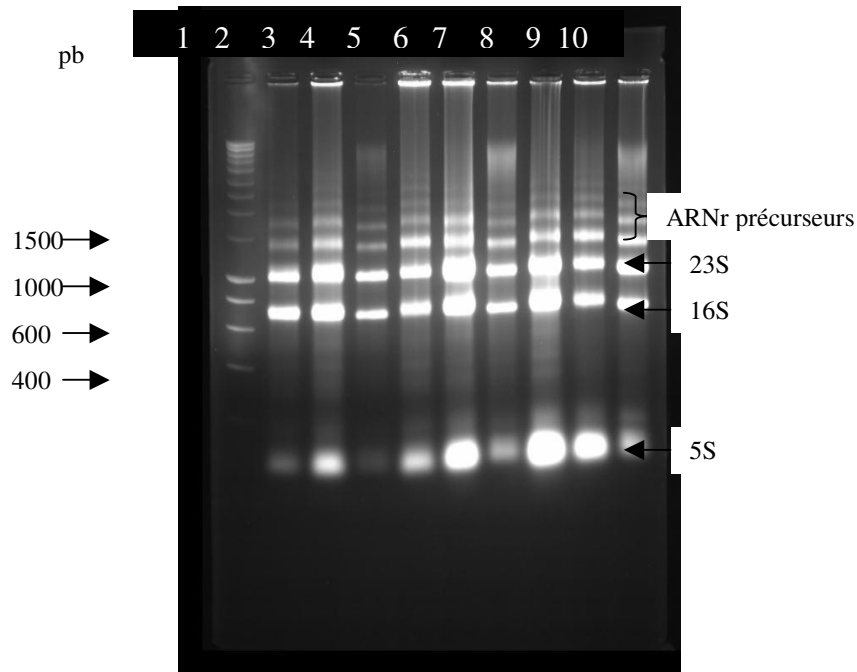
La qualité des ARN extraits a été validée par trois méthodes différentes :

- le profil électrophorétique des ARN en gel d'agarose a permis de visualiser chacun des ARNr 5S, 16S, 23S ainsi que les précurseurs de haut poids moléculaire, ce qui nous indique une bonne qualité de la préparation (figure 26).
- nous avons vérifié par PCR l'absence de contamination d'ADN dans les échantillons d'ARN en utilisant des couples d'oligonucléotides spécifiques de chacune des espèces et hybridant seulement sur l'ADN non transcrit (région intergénique).
- finalement, en utilisant nos préparations d'ARN comme matrice, nous avons mesuré le « RNA Integrity Number » (RIN) avec l'appareil Agilent 2100 bioanalyser (Waldbroon, Germany). Cet appareil permet de mesurer le ratio ARN 23S/ARN 16S, la concentration des ARN (ng/μl) ainsi que l'aire des courbes. L'ensemble de toutes ces données permet d'obtenir la valeur RIN, comme valeur de qualité. Des ARN de bonne qualité présentent un RIN supérieur à 9 (figure 27).

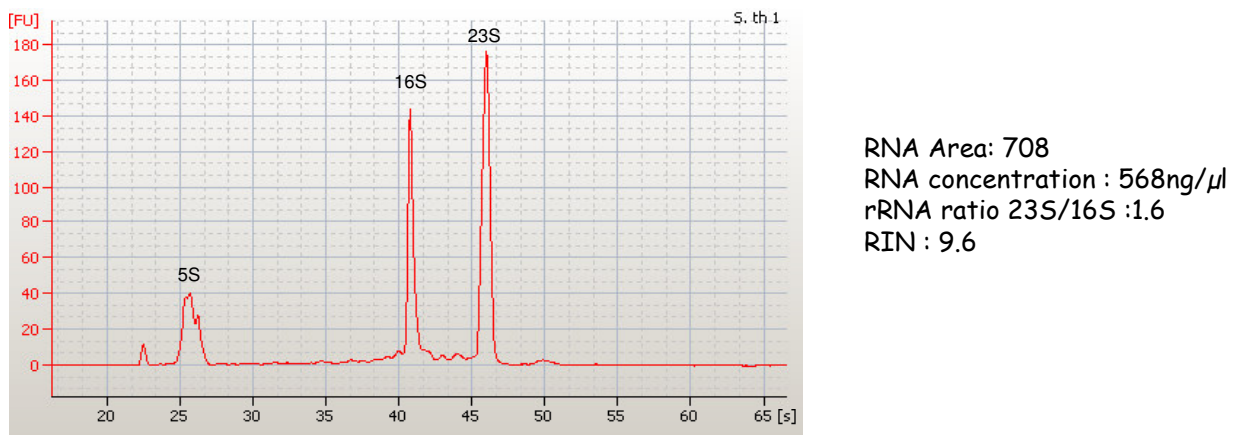
Ces tests de qualité nous ont permis de vérifier que l'ensemble des ARN extraits à partir des bactéries cultivées en lait était de bonne qualité.

Pour confirmer la présence des ARN de chaque espèce dans les échantillons extraits de la co-culture, nous avons utilisé des oligonucléotides spécifiques des ARN 16S de chacune des espèces (Furet *et al.*, 2004). Pour comparer l'expression de gènes de la co-culture à 2h30 avec celles de la co-culture à 5h30, nous avons déterminé la quantité des ARN de *S. thermophilus* à ces deux temps. Pour cela, nous avons utilisé les ARN 16S de *S. thermophilus* et nous avons mesuré la quantité d'ARN par PCR quantitative. Nous avons obtenu des quantités d'ARN 16S identiques pour cette bactérie entre ces deux conditions ce qui nous a permis de les comparer.





**Figure 26 :** Profils électrophorétiques sur gel d'agarose à 1% des ARN extraits de cultures en lait : mono-cultures de *S. thermophilus* LMG 18311 à 2h30 (puit 2), 4h00 (puit 5) et 5h30 (puit 8) de croissance; mono-cultures de *L. bulgaricus* ATCC11842 à 2h30 (puit 4), 4h00 (puit 7) et 5h30 (puit 10) de croissance; *S. thermophilus* LMG 18311 en co-culture avec *L. bulgaricus* ATCC11842 à 2h30 (puit 3), 4h00 (puit 6) et 5h30 (puit 9) de croissance Puit 1 : marqueur de poids moléculaire.



**Figure 27 :** Courbe obtenue pour un ARN de *S. thermophilus* LMG 18311 en monoculture avec l'appareil Agilent 2100 bioanalyser (Waldbroon, Germany). La valeur de l'aire des pics, la concentration des ARN, le ratio 23S/16S et la valeur RIN sont affichés.

➤ Test d'absence de cross-hybridation dans nos conditions

Dans un premier temps nous avons vérifié l'absence de cross-hybridation des cDNA provenant des ARN de *L. bulgaricus* sur les lames de *S. thermophilus*. Pour représenter des conditions proches de la réalité (un déséquilibre de la population entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*), nous avons mélangé des ARN de *S. thermophilus* avec 1/10 d'ARN de *L. bulgaricus*. Nous nous sommes posé deux questions: (i) si dans nos conditions (un mélange de 10/1) le lactobacille hybridait dans les puces et (ii) si la présence du lactobacille avait un impact sur l'hybridation du streptocoque.

Pour cela nous avons réalisé deux lames: une dans laquelle nous avons hybridé *S. thermophilus* (condition 1, marqué avec cyanine Cy3) et *S. thermophilus* (condition 2, marqué avec une cyanine Cy5), cette lame nous servant de contrôle; et une deuxième lame dans laquelle nous avons hybridé *S. thermophilus* (condition 1, Cy3) et le mélange de *S. thermophilus* + *L. bulgaricus* (condition 2, Cy5). Nous avons déposé 90 pmol de chaque échantillon sur les lames. Et nous avons obtenu qu'aucun gène n'avait un ratio supérieur à 2.0 ou inférieur à 0.5 dans les deux lames. Cela nous a indiqué que dans nos conditions, les cDNA de *L. bulgaricus* n'avaient pas hybridé de façon significative sur la puce, ni affecté l'hybridation du streptocoque.

### 2.3.2. *Protéomique.*

Nous avons cultivé les bactéries dans le lait, extrait et séparé les protéines cytoplasmiques par électrophorèse bi-dimensionnelle (l'étape d'isofocalisation a été réalisée entre pH 4 et 7 et la séparation des protéines selon leur masse moléculaire de 15 à 120 kDa), par gel SDS-PAGE.

Nous avons utilisé le protocole suivi par Derzelle *et al.* (Derzelle *et al.*, 2005) dans lequel du trisodium de citrate ainsi que différents lavages ont été effectués pour éliminer complètement les caséines avant le cassage de cellules. Malheureusement, ce protocole n'était pas adapté au *L. bulgaricus* et même les co-cultures, ne contenant que peu de *L. bulgaricus*, conduisaient à des « traînées » dans les gels électrophoretiques.

#### 2.3.2.1. *Problème de L. bulgaricus*

Avec la souche de *L. bulgaricus* ATCC11842, nous avons rencontré des difficultés dans l'étape d'iso-focalisation peut-être en raison de la production de molécules extracellulaires (EPS ?) qui co-précipitent avec les protéines rendant les gels inexploitable. Nous avons testé différents paramètres

dans le but d'améliorer la qualité de ces gels à partir du protocole utilisé par Derzelle *et al* (Derzelle *et al.*, 2005). La figure 28 résume les différents essais réalisés et les étapes que nous avons testées.

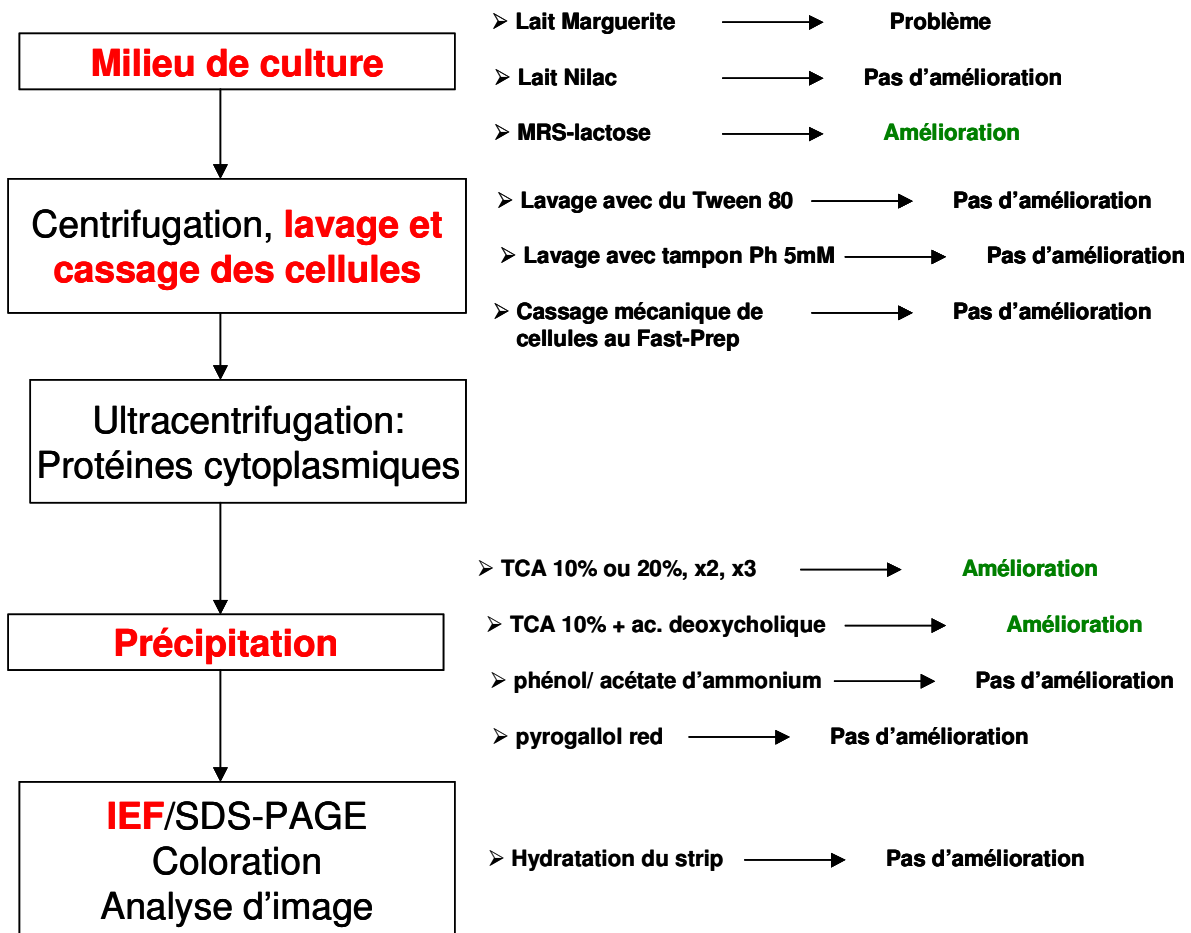


Figure 28: Tests des différents paramètres du protocole d'extraction des protéines cytoplasmiques et séparation des protéines par 2DE obtenus pour *L. bulgaricus* ATCC11842. Extraction des protéines à partir de cellules provenant d'une culture de 2h30. En rouge, les paramètres testés.

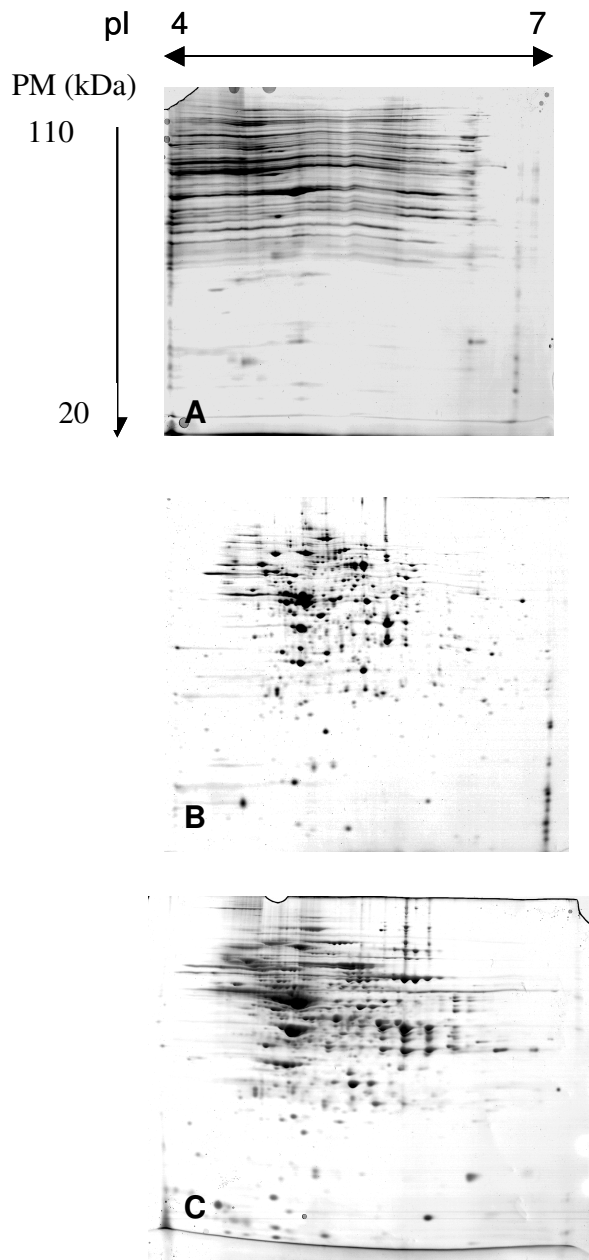
Ainsi, nous avons utilisé d'autres milieux de culture que le lait Marguerite<sup>®</sup>, comme le lait Nilac (lait reconstitué à 10%, NIZO, Ede, The Netherlands, et autoclavé à 112°C/ 15 min) et le milieu de laboratoire MRS-lactose. Des lavages de cellules avec du Tween 80 (un détergent doux) et du tampon

phosphate de sodium à 5mM au lieu du tampon à 20mM. Nous avons surtout essayé différents composés utilisés dans la précipitation des protéines : de l'acide trichloracétique (TCA) à différentes concentrations qui est un très bon agent précipitant des protéines et surtout utilisé dans des échantillons présentant des exopolysaccharides (Hwang *et al.*, 1996, Sivaraman *et al.*, 1997), du phénol acétate d'ammonium utilisé pour des échantillons dont lesquels des grandes quantités de substances qui interfèrent sont présentes, surtout utilisés pour l'extraction des protéines de plantes (Granier, 1988, Hurkman *et al.*, 1986), et du pyrogallol red-molybdate-methanol utilisé pour des petites protéines et des protéines sécrétées (Caldwell *et al.*, 2004). Finalement nous avons réalisé un temps de réhydratation active plus long (20h au lieu de 11h à 50V) dont le but est de donner du temps aux protéines d'arriver à leur pI au cours de l'électrophocalisation.

Nous avons pu obtenir des gels d'électrophorèse 2D pour des cultures dans le lait de *L. bulgaricus* correspondant à un pH maximal de 6.26 avec une précipitation des protéines au TCA (figure 29, C); dès que le pH des cultures diminuait, une mauvaise focalisation de l'ensemble du gel est obtenue (figure 29, A). Les essais en MRS lactose ont été réalisés avec succès (figure 29, B), nous montrant que le problème était lié à la croissance de *L. bulgaricus* dans le lait.

Par ailleurs, étant donné le déséquilibre des populations entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* en co-culture (60 fois plus de *S. thermophilus* que de *L. bulgaricus* en fin de fermentation), la plupart (95%) des protéines présentes dans les gels de co-culture correspondaient à des protéines de *S. thermophilus*. Nous nous sommes donc focalisé sur la comparaison des profils protéomiques de *S. thermophilus* en mono-culture à deux stades de croissance (2h30 et 5h30) et à la comparaison des profils protéomiques de *S. thermophilus* en présence de *L. bulgaricus* à ces mêmes stades. Nous avons réalisé au total 12 gels d'électrophorèse 2D correspondant aux différentes conditions de culture (mono-culture et co-culture) aux deux stades de croissance (2h30 et 5h30) et avec 3 répétitions.

Les résultats protéomiques obtenus pour les stades de croissance 2h30 et 5h30, correspondant au mêmes temps de comparaison pou les puces à ADN ont été analysés et commentés dans les deux articles.



**Figure 29: Protéome cytoplasmique de la monoculture de *L. bulgaricus* ATCC11842 cultivé en lait Marguerite<sup>®</sup> (A) en MRS lactose (B) et en lait Marguerite<sup>®</sup> avec précipitation de protéines au TCA 10% (C). Extraction des protéines à partir de cellules provenant d'une culture de 2h30.**

## 2.4. Résultats

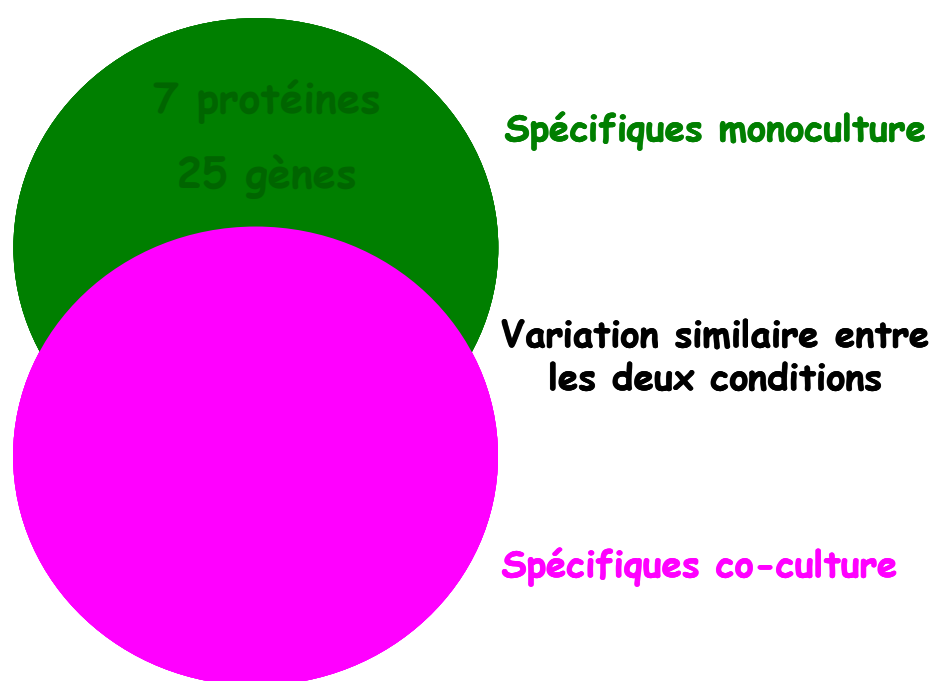
### 2.4.1. Comparaison des modifications observées en mono- et co-cultures entre 2h30 et 5h30 de fermentation

Entre 2h30 et 5h30 de fermentation en mono-culture, nous avons observé des variations significatives d'expression pour 60 gènes et d'abondance pour 27 protéines de *S. thermophilus* LMG 18311. Pour les échantillons de la co-culture prélevés aux mêmes temps, des variations significatives affectent l'expression de 101 gènes et l'abondance de 43 protéines. Cette comparaison simple révèle que la proto-coopération observée par des variations physiologiques (pH, dénombrements) reflète des modifications d'expression de gènes et du protéome. La comparaison entre les observations en mono- et co-culture montre que 35 gènes et 20 protéines évoluent dans chacune de ces conditions de façon similaire (figure 30). La variation de ces protéines et gènes est probablement liée à la croissance en lait de *S. thermophilus*, indépendamment de la présence de *L. bulgaricus*. Le reste des variations est spécifique de chaque condition : l'expression de 25 gènes et l'abondance de 11 protéines dans le cas de la mono-culture et, l'expression de 66 gènes et l'abondance de 23 protéines dans le cas de la co-culture.

Nous avons observé des protéines qui variaient de la même façon au niveau transcriptionnel. Dans le cas de la monoculture, 9 gènes ainsi que les protéines pour lesquelles ils codent varient de la même façon entre 2h30 et 5h30. Seul le gène *nrdE* codant pour une ribonucleotide-diphosphate reductase, augmente son expression au cours de ces deux stades de croissance alors que sa protéine respective diminue. De ces 9 gènes ou protéines, 7 étaient impliqués dans la voie de biosynthèse des acides aminés soufrés. Pour la co-culture, 12 gènes ainsi que les protéines pour lesquelles ils codent varient de la même façon entre 2h30 et 5h30. Seul le gène *rr01* codant pour un réponse régulateur faisant partie d'un système à deux composants, diminue son expression au cours de ces deux stades de croissance alors que sa protéine augmente. De ces 12 gènes ou protéines, 8 étaient impliqués dans la voie de biosynthèse des purines.

Nous avons classé ces variations en 9 groupes métaboliques (tableau 5). Nous pouvons observer une très bonne corrélation entre les deux approches. Des 8 groupes métaboliques retrouvés à partir de l'analyse transcriptomique en mono-culture, nous retrouvons 7 de ces groupes par analyse protéomique. Il en est de même façon pour la co-culture (7 groupes sur 9 sont représentés en

protéomique). Entre les deux conditions, la mono-culture et la co-culture, même s'il existe des différences au niveau des pourcentages, une grande similitude est retrouvée concernant les groupes métaboliques affectés. L'effet le plus marquant est le grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des acides aminés, surtout dans le cas de la mono-culture où 50% des gènes variants appartiennent à cette catégorie. Ce résultat confirme clairement l'importance du métabolisme des acides aminés et leur transport dans la croissance en lait de *S. thermophilus*. Au niveau protéique, le pourcentage de ce groupe reste majoritaire dans la mono-culture et la co-culture. A part les transporteurs d'acides aminés, peptides et oligopeptides (non détectables dans nos gels cytoplasmiques), ces résultats indiquent une bonne corrélation entre variations transcriptionnelles et protéomiques.



**Figure 30: Distribution de variations obtenues (entre 2h30 et 5h30) par les deux approches post-génomiques : protéomique et transcriptomique.**

**Tableau 5. Répartition (en %) des gènes de *S. thermophilus* LMG 18311 dont l'expression variait<sup>a</sup> et des protéines dont l'abondance variait<sup>a</sup> au cours du temps en monoculture et en co-culture avec *L. bulgaricus* dans le lait. (Classification selon <http://www.biol.ucl.ac.be/gene/genome/strategy.html>)**

Groupe métabolique	Mono-culture		Co-culture	
	Transcriptome	Protéome	Transcriptome	Protéome
Biosynthèse et métabolisme acides aminés	49,2	38,7	38,1	22,7
Biosynthèse et métabolisme nucléotides	6,3	3,2	14,4	20,6
Métabolisme carboné	4,8	19,4	4,1	13,6
Traduction	9,5	6,5	7,2	6,8
Biosynthèse de membrane et paroi	1,6	0	1,1	0
Modifications post-traductionnelles et chaperons	0	0	2,1	0
Transcription	4,8	0	7,2	4,5
Autres	7,9	16,1	18,6	29,5
Fonction inconnue	15,9	16,1	7,2	2,3

<sup>a</sup> Variations d'au moins deux fois entre 5h30 et 2h30 de croissance (p-value < 0.05).

Dans le cas du transport et du métabolisme carboné, nous observons des variations plus importantes au niveau protéique que transcriptomique, ce qui suggère que des variations post-traductionnelles ont eu lieu. Ces protéines appartiennent à la voie de Leloir et au transporteur de sucres autres du lactose, comme ça a été décrit dans l'article 1.

Nous observons aussi une augmentation des gènes impliqués dans le métabolisme et transport de nucléotides, avec une plus forte variation en co-culture par rapport à la mono-culture. La plupart des



gènes appartenant à la voie de la biosynthèse des purines dont l'expression variait, variait également au niveau protéique.

Un groupe qui présente des variations entre les deux conditions est le groupe « autres », présentant une plus forte variation en co-culture qu'en mono-culture. Ce groupe inclut de gènes de régulation et des gènes impliqués dans l'homéostasie et le transport de fer. Un dernier groupe, le groupe « modification post-traductionnelle et chaperons » apparaît représenté que dans le cas de la co-culture, ces variations seront détaillées dans l'article 2.

### 2.4.2. Etude de la physiologie de *S. thermophilus* LMG 18311 lors de sa croissance dans le lait (Publication n°1).

#### Objectif

Nous nous proposons d'identifier les bases moléculaires de la croissance en lait de *S. thermophilus* LMG1831. La compréhension de la croissance dans le lait de cette bactérie nous permettra de mieux comprendre son association avec son partenaire dans le yaourt : *L. bulgaricus* ainsi que son adaptation dans ce milieu. Peu d'études globales (protéomique et transcriptomique) sur la physiologie en lait de *S. thermophilus* ont été réalisées, surtout ce qui concerne la deuxième partie de croissance de cette bactérie dans le lait.

#### Méthode d'étude

Nous avons comparé la variation d'expression des gènes et de l'abondance protéique de *S. thermophilus* LMG18311 en monoculture dans le lait entre deux stades de croissance (2h30 et 5h30). Nous avons utilisé des puces à ADN pour déterminer les variations d'expression des gènes, ainsi que la PCR quantitative pour vérifier un certain nombre d'entre eux. Pour compléter cette étude, nous avons construit un mutant négatif pour le gène *metR* un régulateur transcriptionnel impliqué dans le métabolisme de la méthionine et nous en avons étudié sa physiologie. De plus nous avons réalisé des analyses biochimiques avec le dosage des acides aminés libres et d'acides organiques (HPLC), nous permettant de compléter les analyses post-génomiques.

#### Principaux résultats

Nous avons obtenu la variation de 78 gènes ou protéines différents (4.3% des CDS) de *S. thermophilus* entre 2h30 et 5h30 de croissance. La principale variation correspond à des gènes ou protéines impliqués dans le métabolisme azoté (50% du total), en particulier la voie de biosynthèse des acides aminés soufrés augmente au cours de la croissance. L'étude de la physiologie (croissance en lait) du mutant *metR*, régulateur transcriptionnel qui contrôle l'expression de gènes impliqués dans le

transport de la méthionine ainsi que sa synthèse à partir de la cystéine, nous a permis de confirmer l'importance de la biosynthèse de la méthionine pour la croissance de *S. thermophilus* LMG18311 dans le lait. De plus, les dosages d'acides aminés au cours de la croissance de *S. thermophilus*, confirment que le lait est pauvre en acides aminés soufrés et que l'adaptation de cette bactérie dans ce milieu dépend fortement de leur biosynthèse *de novo*. Par ailleurs, ces analyses montrent qu'en deuxième partie de croissance, *S. thermophilus* consomme les acides aminés libres disponibles dans le milieu.

D'autres résultats ont été obtenus à partir des analyses post-génomiques. Nous avons observé une augmentation des gènes et/ou protéines impliqués dans le métabolisme d'autres sucres que le lactose (voie de Leloir et transport de sucrose) qui augmentaient au cours de la croissance dans le lait de *S. thermophilus*. Chez *L. lactis*, il a été suggéré que la diversification de la source carbonée pourrait être liée à une limitation du lactose dans le milieu (Redon *et al.*, 2005), mais aussi à d'autres types de stress comme l'acidification (Raynaud *et al.*, 2005). Notre hypothèse est que la diversification de sucres chez *S. thermophilus* pourrait être liée à l'acidification du lait. Nous avons aussi observé au cours de la croissance, l'induction du gène *sufD* et le gène codant pour son transporteur. Il a été démontré chez *S. thermophilus*, que le gène *sufD* est impliqué dans la défense contre le stress superoxyde (Thibessard *et al.*, 2004). Notre hypothèse est que *S. thermophilus* consomme l'oxygène du milieu et le transforme en ion superoxyde, capable de détruire les clusters Fer-S. SufD serait nécessaire pour l'équilibre de ces clusters. Finalement, nous avons observé la diminution de la protéine et gène d'une réponse régulateur faisant partie d'un système à deux composants (RR05). Ce système à deux composants est similaire à des systèmes à deux composants présents chez plusieurs bactéries Gram<sup>+</sup>. Il a été décrit comme ayant un rôle essentiel à la viabilité (Hols *et al.*, 2005). Chez *B. subtilis*, YycG/YycF, il a été impliqué dans la régulation du métabolisme de la paroi cellulaire (Bisicchia *et al.*, 2007, Szurmant *et al.*, 2005) et chez *Staphylococcus aureus* dans la perméabilité cellulaire (Martin *et al.*, 1999). Chez *S. pneumoniae*, MicB/MicA ou VicK/VicR, pourrait réguler des fonctions importantes dans la protection de la cellule contre le stress oxydant, ainsi que le contrôle de la compétence (Echenique *et al.*, 2001) et dans la biosynthèse des acides gras (Mohedano *et al.*, 2005). Finalement, chez *L. lactis*, TCS-C, il est exprimé constitutivement à un haut niveau et il est nécessaire pour la croissance et survie de cellules (O'Connell-Motherway, 2000). Chez *S. thermophilus*, ce système à deux composants n'a pas été étudié. Il serait intéressant de déterminer quels sont les gènes qu'il contrôle dans le but de comprendre plus profondément quels sont les mécanismes que *S. thermophilus* met en place pour s'adapter au milieu lait.

**Physiology of *S. thermophilus* during the late stage of milk fermentation, with special regard to sulphur amino-acid metabolism**

Luciana HERVE-JIMENEZ<sup>1,2</sup>, Isabelle GUILLOUARD<sup>2</sup>, Eric GUEDON<sup>2</sup>, Céline GAUTIER<sup>2</sup>, Samira BOUDEBBOUZE<sup>2</sup>, Pascal HOLS<sup>3</sup>, Véronique MONNET<sup>1</sup>, Françoise RUL<sup>1\*</sup> and Emmanuelle MAGUIN<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>INRA, UR477 Biochimie Bactérienne, F-78350 Jouy-en-Josas, France, <sup>2</sup>INRA, UR895 Génétique Microbienne, F-78350 Jouy-en-Josas, France, <sup>3</sup> Unité de Génétique, Institut des Sciences de la Vie, Université Catholique de Louvain, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

\*corresponding author. Address: Unité de Biochimie Bactérienne, INRA, 78350 Jouy-en-Josas, France.

Fax : 33 (0)1 34 65 21 63 ; Email : [françoise.rul@jouy.inra.fr](mailto:françoise.rul@jouy.inra.fr)

**Keywords:** *Lactobacillus bulgaricus* / proteomic reference map / *protocooperation* /sulphur AA / sugar metabolism

## ABSTRACT

*Streptococcus thermophilus* is a thermophilic lactic acid bacterium (LAB) widely used as starter in the manufacture of dairy products in particular in yoghurt manufacture in combination with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. However, in spite of its massive use, the physiological state of *S. thermophilus* in milk has hardly been investigated. We established the first map of the cytosolic proteome of *S. thermophilus* LMG18311 grown in milk. It comprises 203 identified proteins corresponding to 32% of theoretical proteome. In addition, using proteomic and transcriptomic approaches, we analysed the physiology of LMG18311 during its late stage of growth in milk (between 2h30 and 5h30). It revealed the up-regulation of i) peptides and amino acids transporters and of specific amino acid biosynthetic pathways notably for sulphur amino acids and ii) genes and proteins involved in the metabolism of various sugars. These two effects were also observed in LMG18311 grown in milk in co-culture with *L. bulgaricus* although the effect on sugar metabolism was less pronounced. It suggests that the stimulatory effect of *Lactobacillus* on the *Streptococcus* growth is more complex than amino acids or peptides supply.

## 1 INTRODUCTION

*Streptococcus thermophilus* is a thermophilic lactic acid bacterium (LAB) widely used as starter in the manufacture of dairy products; it is the second most important industrial dairy starter after *Lactococcus lactis*. For cheese-making, *S. thermophilus* is used alone or in combination with several lactobacilli or mesophilic starters while in yoghurt it is always co-cultured with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) (Tamime *et al.*, 1999). *S. thermophilus* is closely related to *L. lactis*, but it is even more closely related to other streptococcal species including several pathogens (Mitchell, 2003). Recently, the complete genome sequence of three strains became available (Bolotin *et al.*, 2004, Makarova *et al.*, 2006). Comparison of *S. thermophilus* genome sequences with published genomes of streptococcal pathogens reveals that the most important determinants for pathogenicity are either absent or present as pseudogenes and that *S. thermophilus* has followed an evolutionary path divergent to that of pathogenic species due to its adaptation to milk (Bolotin *et al.*, 2004).

*S. thermophilus* is highly adapted to grow on lactose, the main carbon source in milk and rapidly converts it into lactate during growth. Lactose is transported into the cell by a lactose permease (LacS), which operates as a galactoside-proton symport system or as a lactose-galactose antiporter (Foucaud *et al.*, 1992). Lactose is efficiently transported into the cell and subsequently hydrolyzed by an intracellular  $\beta$ -galactosidase. The vast majority of *S. thermophilus* strains only metabolized the glucose moiety of lactose, while galactose is excreted into the medium (Hutkins *et al.*, 1985).

The milk is poor in free amino acids (AA) and short peptides (Desmazeaud, 1990), therefore for optimal growth, *S. thermophilus* requires either hydrolysis of caseins followed by the internalization and the degradation of the resulting peptides or *de novo* AA biosynthesis (Hols *et al.*, 2005). For many LAB including *S. thermophilus*, the hydrolysis of milk caseins (i.e., the amino acids supply) mostly depends on the activity of a cell-wall-anchored proteinase. Few strains of *S. thermophilus* possess this

proteinase (Shahbal *et al.*, 1991); they grow rapidly in milk and reach up to  $10^9$  cell/ml, when they are proteinase-minus, they only reach a cell density of about  $10^8$  cell/ml (Letort *et al.*, 2002). For the internalization and degradation of peptides, *S. thermophilus* posses an efficient oligopeptide transport system, Ami (Garault *et al.*, 2002) and a set of intracellular peptidases (Rul *et al.*, 1997). Although, some strains of *S. thermophilus* are prototroph for amino acids, others are auxotrophs for given AA. For example, the analysis of LMG18311 genome sequence (the strain used in this work) suggests auxotrophies for His, Lys, and Glu or Gln while all other biosynthesis pathways appear functional. The importance of amino acid biosynthesis for the growth in milk was established (Hols *et al.*, 2005) and the branched-chain AA biosynthesis pathway was identified as a key pathway for optimal growth of *S. thermophilus* in milk (Garault *et al.*, 2000).

Only few proteomic studies were so far performed on *S. thermophilus* and most of them were done on bacteria grown in rich laboratory medium (M17). A *S. thermophilus* reference map was established from exponential phase culture in M17 (Salzano *et al.*, 2007) and stress-responsive proteins were identified in various conditions (heat, cold, acid or oxidative stress and starvation) (Arena *et al.*, 2005, Auffray *et al.*, 1995, Gonzalez-Marquez *et al.*, 1997, Perrin *et al.*, 1999, Perrin *et al.*, 2000, Wouters *et al.*, 1999). The first proteomic study of *S. thermophilus* in milk demonstrated that in comparison with M17, the main differences observed after the first 1h30 of fermentation affected the pyruvate formate lyase and proteins involved in the supply and biosynthesis of AA and purines (Derzelle *et al.*, 2005). The objective of the present study was to investigate the physiology of *S. thermophilus* during late stage of growth in milk. By combining proteomic and transcriptomic approaches, we revealed a diversification of carbon metabolism as well as an up-regulation of nitrogen uptake and amino acid biosynthesis and thus evidenced factors that may hamper *S. thermophilus* late growth in milk.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Strains and culture conditions

*S. thermophilus* LMG18311 was obtained from the BCCM collection (Belgium), and *L. bulgaricus* ATCC11842 from ATCC (USA). Bacteria stocks were prepared in 10% (wt/vol) Nilac skim milk (NIZO, Ede, The Netherlands) autoclaved 15 min at 112 °C. At a pH value of 5.4-5.5, cultures were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Before use, the micro-filtrated Marguerite<sup>®</sup> milk (La Laiterie, Villefranche sur Saône, France) was skimmed by centrifugation (4°C, 5000 g, 30 min). 500 ml of milk were inoculated at 10<sup>6</sup> CFU/ml with each bacteria stock (monoculture and co-culture) and incubated at 42 °C. pH and cell counts were monitored every 20 min. For enumeration, the bacterial chains were disrupted with a mechanical blender (Turax X620, Labo-Moderne, France) for 40 s (for *S. thermophilus*) and dilutions were then plated with an automatic spiral platter (AES Laboratoires, Combourg, France) on M17 agar lactose (1%) or MRS agar lactose (2%) acidified to pH 5.2 (for *L. bulgaricus*). Colonies were counted after 16h incubation (*S. thermophilus*) or 36h (*L. bulgaricus*) at 42°C in anaerobiosis (Anaerocult A, Merck, Darmstadt, Germany). Cultures were prepared in three independent experiments. When required, the medium was supplemented with AA as previously described (Letort *et al.*, 2001).

### 2.2 Extraction of proteins and two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)

Proteins were extracted from 300 mL cultures in milk at early (2h30) and late exponential (5h30) phases according to (Derzelle *et al.*, 2005) with modifications: cells were harvested by centrifugation at 20°C and the cell pellet washed three times with extraction buffer. Cell lysates were centrifuged (5000 g, 15 min, 4°C), the supernatant collected and centrifuged (200000 g, 30 min, 4°C) to remove cell debris.



2-DE was performed as described in (Guillot *et al.*, 2003) with modifications: 300 µg of proteins were precipitated with the 2-D Clean-Up Kit at 10% TCA (GE Healthcare, Saclay, France), IEF was carried out for 60000 V/h at a maximum of 10 000 V using an Ettan IPGphor (GE Healthcare), and 10 % SDS PAGE was used for the 2nd migration. Gels were digitized using an Epson Expression 1640XL scanner set (at 256 grey levels) controlled by the Silver Fast software and analyzed using the Phoretix 2D software package (GE Healthcare). The gel images were calibrated for Mw (molecular weight) and pI using the theoretical values of a set of identified proteins: DnaK, Eno, Fba, Ldh, Pfl, GapA. The relative volume of each spot was obtained from its spot intensity and normalized with the intensity of all spots. 3 independent samples were analysed for each condition. An analysis of variance was performed using R (<http://www.R-project.org>) after logarithmic transformation of the data. Only differences with p-value < 0.05 and at least 2 fold volume variations between the 2 conditions were further analysed. When a data was missing for 1 of triplicates, it was set to the mean value of the 2 other values, as proposed in (Chich *et al.*, 2006). MS analyses were performed using a Voyager-DE-STR (Applied Biosystems, Framingham, USA) on our PAPSS proteomic platform (<http://www.jouy.inra.fr/unites/proteines/papss/>) (Guillot *et al.*, 2003). The proteins were identified using MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu>).

### 2.3 RNA isolation and transcriptomics

Bacteria were harvested from 300 ml culture. The RNA extraction was carried out as described in (Derzelle *et al.*, 2005) with modifications: cells were harvested by centrifugation (10000 g, 10 min, room temperature) and frozen pellets were resuspended in 400 µl of Tris (10 mM pH 7) and 60 µl EDTA (0.5 M pH 8). The protocol of Sperandio *et al.* (Sperandio *et al.*, 2005) was then followed. The expression profiles were obtained using the EGT-K40C microarray (Eurogentec, Liège, Belgium) containing 92% of the LMG18311 genes. RNA from *L. bulgaricus* was labeled using the protocols

described above and, by hybridizing the labeled samples to the *S. thermophilus* microarray, we verified that *L. bulgaricus* RNA did not cross-hybridize.

10 µg of total RNA were reverse-transcribed by random priming, using the Pronto!<sup>TM</sup> Plus Direct System (Corning-Promega, USA), and labelled by incorporation of Cy3- or Cy5-dCTP nucleotides (Amersham Biosciences, UK). 100 pmoles of each labelled cDNA was used for overnight hybridisation at 42°C. The arrays were scanned on a microarray scanner (Agilent, USA). The statistical analysis was based on one dye-swap. For each array, the raw data comprised the logarithm of median feature pixel intensity at wavelengths 635 nm and 532 nm. No background was subtracted. Arrays were normalized with the Anapuce package (<http://cran.r-project.org/web/packages/anapuce/>) in using general loess and a block effect correction. In order to determine differentially expressed genes, we used the Varmixt method, which is based on a variance mixture analysis [26]. Finally, the raw *p*-values were adjusted by the Bonferroni method and we considered as being differentially expressed the genes with a *p*-value ≤ 0.05 and a difference higher than 2 (up regulated) or lower than 0.5.

The quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR) was carried out using cDNA synthesized from 3 µg of RNA samples by the PowerScript reverse transcriptase (Clontech, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) according to the supplier protocol. All gene specific primers were designed using primer3 (Rozen *et al.*, 2000). PCR was carried as described in (Ibrahim *et al.*, 2007). For each condition, the measures triplicated with cDNA synthesized from 2 independent RNA samples. The results were normalized using *stu1254* (*murE*) as reference.

#### **2.4 Analysis of milk compounds**

Free amino acids (AA) were quantified in milk supernatant at various times (means of the three values obtained for three independent cultures). Supernatants were recovered after precipitation with 3% sulfosalicylic acid, 15 min on ice and centrifugation (13000 g, 10 min, 4°C). AA were then analysed by ion-exchange chromatography, followed by ninhydrin post-column derivatization and detected at 570

and 440 nm on a Waters 2487 dual absorbance detector (Grunau *et al.*, 1992). A PCX5200 post-column derivatizer (Pickering Laboratories, USA) was connected to a Waters 626 HPLC system (Waters, USA).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Growth of LMG18311 in milk

In agreement with previous work (Derzelle *et al.*, 2005), LMG18311 presented two growth phases in milk (Fig.1). The first growth phase was characterized by a generation time of  $31.6 \pm 0.9$  min which lasted until 2 h. It corresponded to a rapid growth phase during which both the LMG18311 monoculture and the LMG18311-*L. bulgaricus* ATCC11842 co-culture exhibited similar acidification curves and numerations (Hervé *et al.*, joint submission). After 2h30, the growth phase slowed down with a generation time of  $314 \pm 25$  min. At this stage a clear difference between the mono- and co-cultures existed suggesting that, in the monoculture, LMG18311 encountered condition(s) that hampered its growth whereas in the co-culture, *L. bulgaricus* overcame directly or indirectly this effect. We therefore analyzed by transcriptomic and proteomic approaches the physiological state of LMG18311 at 2h30 and 5h30 of growth i.e., during the late phase of growth.

#### 3.2 Transcriptome analysis during growth in milk

Statistical analysis of the transcriptome data revealed that 60 genes (~ 3.4 % of the tested genes) varied at least two-fold between 2h30 and 5h30 of growth; 3 and 57 genes were down-regulated and up-regulated, respectively. For 15 of these genes, we also performed specific RT-qPCR measurements; the modifications of expression were confirmed for 11 of them.

For 42 genes out of 60 (70%), a consistent pattern of expression was observed for several genes clustered next to each other in the chromosome, suggesting the existence of 15 operons (Table 1). The location of rho-independent terminators in the LMG18311 genome sequence fitted the expression

cluster in 9 cases. An additional RT-qPCR was performed on *livJ* (not spotted on the microarray) to confirm that it belongs to the same expression cluster and operon than the other *liv* genes. For the other 5 clusters, further analyses would be required to define the operons. (1) The mRNA of *eetB* (*stu0650*) supposedly in operon with *stu0652-stu0651* was not detected on microarrays, (2) the *stu0164-sufD* and the downstream *stu0166-nifS1-nifU-sufB* genes displayed different expression patterns despite the absence of a putative terminator, (3) the mRNA of *stu1283* and *cysE2* - supposedly in operon with *stu1285-pdxK* and *cysM2-metB2*, respectively - did not vary on microarrays, and (4) the expression of only 2 genes over 8 in the *trp* putative operon increased. In these cases, either the genes do not really belong to the same transcriptional units or additional regulation mechanisms decreased the levels of some transcripts.

The 60 genes over- or down- expressed during the growth of LMG18311 belong to various functional classes: amino acid (AA) and peptides transport (19 genes), AA biosynthesis (13), functions dependent on the availability of AA (5), carbon metabolism (4), DNA metabolism (3), base metabolism (2), iron homeostasis (2), transcriptional regulation (1), protease adaptor protein (*mecA*) and other or unknown functions (10). It is obvious from these expression data that nitrogen metabolism and more specifically AA supplying pathways were highly regulated during the growth in milk.

### 3.3 Reference map and proteomic analysis during growth in milk

The total number of different protein spots in all 2-DE gels was 336. They were all excised and characterized by MS analysis allowing the identification of 203 proteins (Table S2).

The 1.8 Mb genome sequence of LMG18311 contains 1889 ORFs corresponding to 1529 putative proteins (pseudogenes excluded) (Bolotin *et al.*, 2004). According to predictions (<http://www.jvirgel.de/index.html>, (Hiller *et al.*, 2003)), 852 of these proteins have a pI between 4 and 7 and a Mw ranging from 15 to 120 kDa i.e. visible in our 2-DE conditions. Considering that 183 of these proteins have at least one transmembrane domain and that 34 exhibited a peptide signal, our

LMG18311 theoretical proteome comprised 635 proteins, and we identified 32% of this proteome (Table S2). High codon adaptation indexes (CAI) often indicate genes which are highly expressed (Ikemura, 1985, Sharp *et al.*, 1987). For 89% of the proteins identified by 2-DE, the corresponding genes presented a CAI above >0.5. The genes coding for glycolytic enzymes and elongation factors presented the highest values (> 0.675) and they corresponded to the major proteins in the 2-DE map. In a previous study (Derzelle *et al.*, 2005), 46 proteins of LMG18311 whose abundance varied between exponential growth in milk and in a rich laboratory medium were identified. Most of them were included in the 203 proteins that constitute the first reference map of *S. thermophilus* in milk (Fig. 2 & <http://migale.jouy.inra.fr/herve-paris/>). This map gives an overview of the functions required for the growth in milk; the main categories are AA transport and metabolism (20 %), translation (14 %), nucleotides transport and metabolism (12%), unknown functions (9 %), energy production (8 %), and carbohydrate transport and metabolism (7 %).

Comparison of the proteomes revealed that 27 proteins (44 spots) varied significantly between the 2 growth stages: 13 and 14 proteins were down- and up- regulated, respectively (Table 2). These proteins are distributed in at least 8 functional classes (<http://www.biol.ucl.ac.be/gene/genome>). Despite the impossibility to detect the AA and peptide transporters by 2-DE, we observed, as in the transcriptome, a strong effect on the AA biosynthesis pathways (11 proteins) or on other processes dependent on AA availability (PepX, Stu0671, HisS, ThrS, and Rrf). The other altered functional classes were carbon metabolism (6), purine-pyrimidine metabolism (1), a response regulator and other or unknown functions (7).

### **3.4 Comparison of transcriptomic and proteomic data**

Comparison of the transcriptome and proteome analysis data revealed a concordance of the observed effect for 9 proteins (Table 2, underlined). For the other 21 proteins, the mRNA was either not detected or did not vary in the tested conditions. The expression of 18 genes coding these proteins was

re-evaluated using RT-qPCR (Table 2); in 15 cases it confirmed that the gene expression did not significantly vary between 2h30 and 5h30 in contrast to the protein amounts. These observations evidenced either i) a transient transcriptional regulation or ii) a post-transcriptional regulation altering directly the protein turn-over. With respect to this data, it is noteworthy to mention here the 4 fold induction of the *mecA* gene, known in *B. subtilis* as an adaptor protein modulating the substrate preference of the ClpCP protease (Schlothauer *et al.*, 2003).

### 3.5 Diversification and alteration of the carbon metabolism

Both transcriptomic and proteomic data indicated that *S. thermophilus* diversified its carbon sources during the late stage of growth in milk. Various genes/proteins (*fruB* and *rpe* genes, ScrB and GlmS protein) involved in sugar catabolism as well as in galactose utilization (Leloir pathway; GalE1, GalK proteins) were significantly up-regulated. It is noteworthy that the *gal* genes were expressed in the LMG18311 strain under these conditions, although this strain does not grow on galactose as sole carbon source. One may hypothesize that, at the end of the fermentation, *S. thermophilus* no longer imported lactose and concomitantly no longer exported galactose, and /or reimports galactose from the medium as it is the case for several strains of *S. thermophilus* (de Vin *et al.*, 2005). The intracellular galactose may then be metabolized by the Leloir pathway involving the *galkTEM* operon. In *L. lactis*, the diversification of carbon sources was shown to be a general response to carbon limitation (Redon *et al.*, 2005) but also to other stresses such as acidification (Raynaud *et al.*, 2005). At the opposite, all the pyruvate formate lyase isoforms decreased (Fig.2) including one with a lower Mw, probably corresponding, to a derivative of the active form as described for *L. lactis* (Melchiorsen *et al.*, 2000) and *S. bovis* (Asanuma *et al.*, 2000).

### 3.6 Up-regulation of nitrogen uptake and biosynthesis during late growth

Variation of the expression or abundance of 84 genes or proteins was observed between the late and early exponential phase of *S. thermophilus* in milk. Interestingly, 51% of them are involved in AA or

peptides transport and metabolism, and functions dependent upon AA availability in the cell (t-RNA synthetases and ribosomal proteins).

Many genes encoding peptide and AA transporters were over-expressed during the late phase of growth (Table 1). They encode the two peptide transporters of *S. thermophilus*: the di-tripeptide transporter DtpT and the Ami oligopeptide transport system (*ami AICDEF* operon constituted of 4 genes and a pseudogene *amiA1*) working with two oligopeptides binding proteins AmiA2 and AmiA3. In addition, four AA transporters were also up-regulated: a putative Ser/Thr:Na<sup>+</sup> symporter (DctA), a polar AA transporter (Stu1161-1164), the only putative branched-chain AA transporter (LivJHMGF), and a probable methionine uptake system (AtmABDE) [39].

18 genes or proteins putatively involved in the AA biosynthesis exhibited altered expression during the growth of LMG18311 (Tables 1 and 2). Interestingly, 55% of them are directly involved in cysteine and methionine metabolism (Fig. 3). The over-expression affected most all steps of these biosynthetic pathways: the synthesis of cysteine from glyceraldehydes 3-P (SerA, CysE2, CysM1), the transsulfuration and sulfhydrylation pathways (MetA, MetB1, Stu0353, CysD), the conversion of homocysteine to methionine (MetE, MetF), and the conversion of methionine in cysteine (MetK, CysM2, MetB2) (Fig. 3). Complementary analysis with RT-qPCR confirmed that pathways leading to threonine (*thrB*) and lysine (*dapA*) biosynthesis were not up-regulated while the complete sulfur AA biosynthetic pathway was fully induced at the transcriptional level except for i) *mmuM* which is a putative functional orthologue of *metE*, ii) genes involved in the SAM recycling pathway (*pfs*, *luxS*) (Fig. 3). The up-regulation of *metK* which is involved in the synthesis of S-Adenosyl Methionine (SAM), the major biological donor of methyl for methylation reactions, was also confirmed at the transcriptional level. Note however that at the protein level, the spot intensity did not significantly increase between 2h30 and 5h30. The *pdxK* gene, coding the pyridoxine kinase, which is involved in

the synthesis of pyridoxal phosphate, the cofactor of the cysteine  $\beta$ -lyase MetB1 and the cystathionine  $\gamma$ -lyase MetB2 was also over-expressed. These observations confirmed that the complete Met-Cys biosynthesis pathway was fully induced during the late stage of the *S. thermophilus* growth in milk.

### 3.7 Sulfur AA and growth in milk

Considering the above data, we analysed the milk composition in free AA (Table 3). It revealed that Asp, Cys, Met and Trp were present at very low amounts at the beginning of the culture and that LMG18311 growth led to undetectable amounts of Ala, Arg, Leu, Ile, Val at 5h30. In order to determine to which extent the AA starvation impaired growth, milk was supplemented and the LMG18311 growth monitored. The addition of Met and Ser had a stimulatory effect on growth (Fig. 4). It indicates that Met and Ser can be transported, possibly via the Atm and the Ser/Thr:Na<sup>+</sup> systems and can fulfil the strain requirement for sulfur AA. On contrast, Cys had no effect suggesting that the putative Cys transporter may be inefficient or that an increase of the intracellular Cys pool could lead to a down regulation of the whole Cys-Met pathway. As expected, the addition of aspartate in milk reduced LMG18311 growth probably through competition with glutamic acid for transport as previously shown (Arioli *et al.*, 2007).

The regulation of the Ser and Cys pathways is not established in *S. thermophilus* but it was shown that MetR is the transcription activator of *metEF* and *atmBDE* (Sperandio *et al.*, 2007). Furthermore, JIM8315, a *metR*-minus mutant of CNRZ1066 (Sperandio *et al.*, 2007) exhibited a retarded growth in milk compared to the wild type strain (data not shown), highlighting the importance of methionine for *S. thermophilus* growth in milk.

### 3.8 Other modifications potentially linked to the slow growth of LMG18311 in milk



During late growth of LMG18311, additional genes/proteins were affected. Some of them may be markers of late exponential phase and/or poor growth conditions. Here, we highlight two of them that would need further attention. (1) The RR05 response regulator, part of a two component system (TC05), decreased during the late phase of growth indicating that a regulatory event took place. The orthologs of TCS05 are conserved in several Firmicutes. They were shown to be i) essential for cell viability, notably in *L. lactis* (O'Connell-Motherway, 2000), ii) involved in the regulation of cell wall metabolism (Bisicchia *et al.*, 2007, Dubrac *et al.*, 2007, Szurmant *et al.*, 2005), and iii) involved in cell permeability (Martin *et al.*, 1999). In *S. pneumoniae*, this TCS could regulate a set of functions involved in oxidative stress protection (Echenique *et al.*, 2001) and the expression of fatty acid biosynthesis (Mohedano *et al.*, 2005). Although our data are not sufficient for assigning a function to RR05, it is noteworthy that its abundance decrease in condition of harsh growth condition suggesting that in *S. thermophilus*, the activity of TCS05 may be required for rapid/normal growth. (2) The *stu0292-294* operon is over-expressed at 5h30; it comprises a gene coding a non ribosomal peptide synthase gene potentially involved in the production of antimicrobial peptides is over-expressed at 5h30. For bacteria, the production of antimicrobials is an efficient response to increase their fitness in harsh environments (Reva *et al.*, 2008).

### **3.9 *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* association**

We observed that *L. bulgaricus* improved the growth of LMG18311 in milk. Comparison of the transcriptomic and proteomic analysis of LMG18311 in mono-culture or co-culture revealed similar modifications in both conditions (Fig. 5 & Table S3). As detailed below, these common modifications concerned 1) the sugar metabolism, 2) the biosynthesis of Fe-S clusters and 3) the AA transport and metabolism.

(1) Regarding the carbon diversification in the mono-culture, including two proteins of the Leloir pathway (GalE1, GalK), GlmS and the *rpe* gene (involved in the pentose phosphate pathway) were

over expressed in both conditions whereas *fruB*, *ScrB* and *PtsI* were specifically induced in the monoculture (Fig. 5). Taking into account the difference of generation times between the 2 cultures, this observation may indicate that only the 3 later genes/proteins respond to slow growth. The other modifications are likely to reflect a physiological modification related to the growth in milk and not involved in the proto-cooperation with *L. bulgaricus*. The Leloir pathway leads to the production of glucose-1 phosphate, the precursor of nucleotide sugars involved in polysaccharides biosynthesis [exopolysaccharides (EPS) and rhamnose polysaccharides (RPS)]. In the same way, *GlmS* is involved in the biosynthesis of nucleotide sugars and nucleotide aminosugars from fructose-6P. To date, no clear biological function could be assigned to EPS and RPS production in *S. thermophilus* and the production of EPS does not confer any obvious advantage for the growth or survival of *S. thermophilus* in milk (Broadbent *et al.*, 2003). However, it is noteworthy that the induction of these 2 genes related to EPS or RPS production are not affected by the presence of the *Lactobacillus*.

(2) the *stu0164-sufD* genes were up-regulated in both conditions. In *S. thermophilus* CNRZ368, *sufD* gene is involved in the biosynthesis of [Fe-S] clusters (Thibessard *et al.*, 2004). The presence of O<sub>2</sub> leads to the production of superoxide, which is harmful for [Fe-S] clusters. The up-regulation of this gene may be related to some level of oxidative stress although other protective functions are not induced in the mono-culture. (3) The AA and peptide transporters and the sulfur AA metabolism were not only induced in the mono-culture but also in the co-culture. This observation contradicts one of the main hypothesis of the literature concerning the stimulatory effect of *L. bulgaricus* on the *S. thermophilus* growth that is the fulfillment by the lactobacilli of the peptides/AA requirements of *S. thermophilus*. The fact that the sulfur AA biosynthesis pathways was switch on in LMG18311 during the co-culture indicates that although *L. bulgaricus* ATCC11842 may supply LMG18311 with peptides/AA, their amounts are not covering all the streptococcal needs for optimal growth. It strongly

suggests that the stimulatory effect of *L. bulgaricus* ATCC11842 is likely to result from other and more complex exchanges between the two species.

#### **4 Concluding remarks**

The picture of *S. thermophilus* during its late growth phase in milk revealed a laborious late growth in milk probably due to several nutritional limitations. We observed a diversification of carbon sources utilization as observed in other LAB under starvation or stress conditions. Lactose is probably not exhausted in our conditions as lactose is the main C-source in milk and is able to sustain the better growth of LMG18311 in co-culture. Therefore, this diversification is likely to indicate the harsh condition encountered in the monoculture. In addition, the AA and peptide transport systems as well as some AA biosynthesis pathways were switched on during growth. This observation is in agreement with the limited concentration of free AA or peptides in milk and the necessity for *S. thermophilus* to synthesize its AA. The reason why the sulfur AA biosynthesis is more affected than the biosynthetic pathways of other AA present at low concentration in milk remains to be further investigated.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors wish to thank C. Gitton for proteomics advice, C. Henry for MALDI-TOF assistance, P. Courtin for AA analysis, K. Grznarova for RT-qPCR analysis and her work on *metR*, S. Pollet and J. Y. Coppée for the open access to scanners, D. Olivier and B. Schaeffer for statistical advice. L. H-J was supported by the MICA department of INRA and Ile-de-France Region. P. H. is Research Associate at FNRS.

## REFERENCES

- [1] Tamime, A.Y., Robinson, R.K., *Yoghurt. Science and technology*. 1999, Woodhead publishing limited: Cambridge.
- [2] Mitchell, T.J., The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol* 2003, *1*, 219-230.
- [3] Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., *et al.*, Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat Biotechnol* 2004, *22*, 1554-1558.
- [4] Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., *et al.*, Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, *103*, 15611-15616.
- [5] Foucaud, C., Poolman, B., Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. Functional reconstitution of the protein and characterization of the kinetic mechanism of transport. *J Biol Chem* 1992, *267*, 22087-22094.
- [6] Hutkins, R., Morris, H.A., McKay, L.L., Galactokinase activity in *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* 1985, *50*, 777-780.
- [7] Desmazeaud, M.J., Le lait milieu de culture. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 1990, *8*, 313-325.
- [8] Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., *et al.*, New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev* 2005, *29*, 435-463.
- [9] Shahbal, S., Hemme, D., Desmazeaud, M.J., High cell wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus thermophilus* strains (H-strains) correlated with a high acidification rate in milk. *Lait*. 1991, *71*, 351-357.

- [10] Letort, C., Nardi, M., Garault, P., Monnet, V., *et al.*, Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Appl Environ Microbiol* 2002, 68, 3162-3165.
- [11] Garault, P., Le Bars, D., Besset, C., Monnet, V., Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. *J Biol Chem* 2002, 277, 32-39.
- [12] Rul, F., Monnet, V., Presence of additional peptidases in *Streptococcus thermophilus* CNRZ 302 compared to *Lactococcus lactis*. *J Appl Microbiol* 1997, 82, 695-704.
- [13] Garault, P., Letort, C., Juillard, V., Monnet, V., Branched-chain amino acid biosynthesis is essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. *App. Enviro. Microbiol* 2000, 66, 5128-5133.
- [14] Salzano, A.M., Arena, S., Renzone, G., D'Ambrosio, C., *et al.*, A widespread picture of the *Streptococcus thermophilus* proteome by cell lysate fractionation and gel-based/gel-free approaches. *Proteomics* 2007, 7, 1420-1433.
- [15] Perrin, C., Guimont, C., Bracquart, P., Gaillard, J.L., Expression of a new cold shock protein of 21.5 kDa and of the major cold shock protein by *Streptococcus thermophilus* after cold shock. *Curr Microbiol* 1999, 39, 342-0347.
- [16] Perrin, C., Gonzalez-Marquez, H., Gaillard, J.L., Bracquart, P., *et al.*, Reference map of soluble proteins from *Streptococcus thermophilus* by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 2000, 21, 949-955.
- [17] Wouters, J.A., Rombouts, F.M., de Vos, W.M., Kuipers, O.P., *et al.*, Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. *Appl Environ Microbiol* 1999, 65, 4436-4442.

- [18] Gonzalez-Marquez, H., Perrin, C., Bracquart, P., Guimont, C., A 16 kDa protein family overexpressed by *Streptococcus thermophilus* PB18 in acid environments. *Microbiol* 1997, 143, 1587-1594.
- [19] Auffray, Y., Lecesne, E., Hartke, A., Boutibonnes, P., Basic features of the *Streptococcus thermophilus* heat shock response. *Curr Microbiol* 1995, 30, 87-91.
- [20] Arena, S., D'Ambrosio, C., Renzone, G., Rullo, R., *et al.*, A study of *Streptococcus thermophilus* proteome by integrated analytical procedures and differential expression investigations. *Proteomics* 2005, 6, 181-192.
- [21] Derzelle, S., Bolotin, A., Mistou, M.Y., Rul, F., Proteome analysis of *Streptococcus thermophilus* grown in milk reveals pyruvate formate-lyase as the major upregulated protein. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71, 8597-8605.
- [22] Letort, C., Juillard, V., Development of a minimal chemical defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *J Appl Microbiol* 2001, 91, 1023-1029.
- [23] Guillot, A., Gitton, C., Anglade, P., Mistou, M.Y., Proteomic analysis of *Lactococcus lactis*, a lactic acid bacterium. *Proteomics* 2003, 3, 337-354.
- [24] Chich, J.F., David, O., Villers, F., Schaeffer, B., *et al.*, Statistics for proteomics: Experimental design and 2-DE differential analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007, 849, 261-72.
- [25] Sperandio, B., Polard, P., Ehrlich, D.S., Renault, P., *et al.*, Sulfur amino acid metabolism and its control in *Lactococcus lactis* IL1403. *J Bacteriol* 2005, 187, 3762-3778.
- [26] Delmar, P., Robin, S., Daudin, J.J., VarMixt: efficient variance modelling for the differential analysis of replicated gene expression data. *Bioinformatics* 2005, 21, 502-508.
- [27] Rozen, S., Skaletsky, H., Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000, 132, 365-386.

- [28] Ibrahim, M., Guillot, A., Wessner, F., Algaron, F., *et al.*, Control of the transcription of a short gene encoding a cyclic peptide in *Streptococcus thermophilus*: a new quorum-sensing system? *J Bacteriol* 2007, *189*, 8844-8854.
- [29] Grunau, J.A., Swiader, J.M., Chromatography of 99 amino acids and other ninhydrin-reactive compounds in the Pickering lithium gradient system. *J Chromatogr* 1992, *594*, 165-171.
- [30] Hiller, K., Schobert, M., Hundertmark, C., Jahn, D., *et al.*, JVirGel: Calculation of virtual two-dimensional protein gels. *Nucleic Acids Res* 2003, *31*, 3862-3865.
- [31] Ikemura, T., Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol Biol Evol* 1985, *2*, 13-34.
- [32] Sharp, P.M., Li, W.H., The codon adaptation index - a mesure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic acids Research* 1987, *15*, 1281- 295.
- [33] Schlothauer, T., Mogk, A., Dougan, D.A., Bukau, B., *et al.*, MecA, an adaptor protein necessary for ClpC chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, *100*, 2306-2311.
- [34] de Vin, F., Radstrom, P., Herman, L., De Vuyst, L., Molecular and biochemical analysis of the galactose phenotype of dairy *Streptococcus thermophilus* strains reveals four different fermentation profiles. *Appl Environ Microbiol* 2005, *71*, 3659-3667.
- [35] Redon, E., Loubiere, P., Coccagn-Bousquet, M., Transcriptome analysis of the progressive adaptation of *Lactococcus lactis* to carbon starvation. *J Bacteriol* 2005, *187*, 3589-3592.
- [36] Raynaud, S., Perrin, R., Coccagn-Bousquet, M., Loubiere, P., Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. *Appl Environ Microbiol* 2005, *71*, 8016-8023.

- [37] Melchiorson, C.R., Jokumsen, K.V., Villadsen, J., Johnsen, M.G., *et al.*, Synthesis and posttranslational regulation of pyruvate formate-lyase in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* 2000, 182, 4783-4788.
- [38] Asanuma, N., Hino, T., Effects of pH and energy supply on activity and amount of pyruvate formate-lyase in *Streptococcus bovis*. *Appl Environ Microbiol* 2000, 66, 3773-3777.
- [39] Sperandio, B., Gautier, C., McGovern, S., Ehrlich, D.S., *et al.*, Control of methionine synthesis and uptake by MetR and homocysteine in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 2007, 189, 7032-7044.
- [40] Arioli, S., Monnet, C., Guglielmetti, S., Parini, C., *et al.*, Aspartate biosynthesis is essential for the growth of *Streptococcus thermophilus* in milk, and aspartate availability modulates the level of urease activity. *Appl Environ Microbiol* 2007, 73, 5789-5796.
- [41] O'Connell-Motherway, M., van Sinderen, D., Morel-Deville, F., Fitzgerald, G. F., Ehrlich, S. D., and Morel, P., Six putative two-component regulatory systems isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Microbiol* 2000, 146, 935-947.
- [42] Szurmant, H., Nelson, K., Kim, E.J., Perego, M., *et al.*, YycH regulates the activity of the essential YycFG two-component system in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 2005, 187, 5419-5426.
- [43] Bisicchia, P., Noone, D., Lioliou, E., Howell, A., Quigley, S., Jensen, T., Jarmer, H., and Devine, K. M., The essential YycFG two-component system controls cell wall metabolism in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 2007, 65, 180–200.
- [44] Dubrac, S., Boneca, I.G., Poupel, O., Msadek, T., New insights into the WalK/WalR (YycG/YycF) essential signal transduction pathway reveal a major role in controlling cell wall metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2007, 189, 8257-8269.
- [45] Martin, P.K., Li, T., Sun, D., Biek, D.P., *et al.*, Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1999, 181, 3666-3673.



- [46] Echenique, J.R., Trombe, M.C., Competence repression under oxygen limitation through the two-component MicAB signal-transducing system in *Streptococcus pneumoniae* and involvement of the PAS domain of MicB. *J Bacteriol* 2001, 183, 4599-4608.
- [47] Mohedano, M.L., Overweg, K., de la Fuente, A., Reuter, M., *et al.*, Evidence that the essential response regulator YycF in *Streptococcus pneumoniae* modulates expression of fatty acid biosynthesis genes and alters membrane composition. *J Bacteriol* 2005, 187, 2357-2367.
- [48] Reva, O., Tumbler, B., Think big-giant genes in bacteria. *Environ Microbiol* 2008, 10, 768-777.
- [49] Broadbent, J.R., McMahon, D.J., Welker, D.L., Oberg, C.J., *et al.*, Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review. *J Dairy Sci* 2003, 86, 407-423.
- [50] Thibessard, A., Borges, F., Fernandez, A., Gintz, B., *et al.*, Identification of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 genes involved in defense against superoxide stress. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70, 2220-2229.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Enumeration of *S. thermophilus* viable counts (cfu/ml) during growth in milk either in mono- ( $\Delta$ ) or co-culture ( $\blacktriangle$ ) with *L. bulgaricus* ATCC11842. The curves are representative of 3 independent experiments. At early (E, 2h30), and late (L, 5h30) exponential phases (arrows), bacteria were harvested for proteomic and transcriptomic analysis..

**Figure 2.** Reference map of LMG18311 cytosolic proteins. Zoom: protein Pfl, the circle indicates the possible active form and the arrows show the different isoforms. 300  $\mu$ g of proteins were loaded in the first dimension and 2-DE was performed with a pH gradient of 4-7.

**Figure 3.** Effect of the late growth stage on the sulfur AA biosynthesis pathway. Variation in gene expression (microarrays, dotted symbols; RT-qPCR, open symbols) and protein abundance (2DE, black symbols) between 2h30 and 5h30. Triangles and rectangles indicate up and invariant regulation, respectively. A missing symbol indicates that the measurement was not performed or not possible (e.g., protein not detected on 2DE). The pathway representation is derived from (Sperandio *et al.*, 2005). See tables 1 and 2 for description of *cysD*, *cysE1*, *cysE2*, *cysM1*, *cysM2*, *metA*, *metB*, *stu0353*, *metE*, *metF*, *metK* and *atmABDE*. *hom*, homoserine dehydrogenase; *luxS*, autoinducer-2 production protein; *pfs*, 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase; *thrB*, homoserine kinase; *dapA*; dihydrodipicolinate synthase. SAM : S-adenosyl-methionine, SAH : S-adenosylhomocysteine, SRH : S-ribosylhomocysteine.

**Figure 4.** pH evolution in a milk culture of LMG18311 without ( $\diamond$ ) and with methionine (31.25 mg/L,  $\blacksquare$ ), serine (56.25 mg/L,  $\blacklozenge$ ), cysteine (62,5 mg/L,  $\blacktriangle$ ) or aspartate (113,75 mg/L,  $\bullet$ ). These curves are representative of data obtained in three independent experiments.

**Figure 5.** Schematic representation of the common modifications of the LMG18311 transcriptome (dotted symbols) and proteome (black symbols) during the mono-culture and the co-culture with *L. bulgaricus*. Triangle and rectangle indicate an over-expression or the absence of variation between 2h30 and 5h30, respectively. A missing bar indicates that the measurement was not possible (e.g., protein not detected on 2DE). See tables 1 and 2 for the description of *atm-like*, *liv*, *stu1161-1164*, *dtpT*, *Ami*, *metB1*, *stu0353*, *cysM2*, *metE*, *metF*, *metB2*, *metK*, *cysM1*, *cysD*, *metA*, *serA*, *trpE*, *trpB*, *trpC*, *fruB*, *rpe*, *scrB*, *ptsI*, *glmS*, *rgpG*, *galE1*, *galK*, *stu0164*, *sufD*.

**Table 1.** Gene differentially expressed during the late phase of LMG18311 growth in milk.

Locus ( <i>stu</i> #)	Gene name	Description	Fold change L vs E		Putative Operon structure <sup>b</sup>
			μArray <sup>a</sup>	RT-qPCR	
<b>AA and peptide transporter</b>					
0296	<i>atmA</i>	polar AA ABC transporter, substrate binding protein	5.4		<i>stu0296-297-fragmented gene-stu0301-0302-dctA</i>
0297	<i>atmB</i>	methionine ABC transporter, substrate binding protein	4.6	3.4 +/-1	<i>stu0296-297-fragmented gene-stu0301-0302-dctA</i>
0301	<i>atmD</i>	methionine ABC transporter, ATP-binding protein	6.9		<i>stu0296-297-fragmented gene-stu0301-0302-dctA</i>
0302	<i>atmE</i>	methionine ABC transporter, permease	5.5		<i>stu0296-297-fragmented gene-stu0301-0302-dctA</i>
0303	<i>dctA</i>	serine-threonine:Na+symporter	2.6 <sup>c</sup>		<i>stu0296-297-fragmented gene-stu0301-0302-dctA</i>
0359	<i>livJ</i>	branched-chain AA transporter, substrate binding protein	np <sup>d</sup>	2.4 +/-0.2	<i>livJHMGF</i>
0360	<i>livH</i>	branched-chain AA transporter, permease	3.0		<i>livJHMGF</i>
0361	<i>livM</i>	branched-chain AA transporter, permease	3.1 <sup>c</sup>		<i>livJHMGF</i>
0362	<i>livG</i>	branched-chain AA transporter, ATP-binding protein	3.8		<i>livJHMGF</i>
0363	<i>livF</i>	branched-chain AA transporter, ATP-binding protein	3.3 <sup>e</sup>		<i>livJHMGF</i>
1161		polar AA transporter, ATP-binding protein	3.5	2.6 +/-0.4	<i>stu1161-1162-1163-1164</i>
1162		polar AA transporter, substrate binding protein	nv <sup>e</sup>		<i>stu1161-1162-1163-1164</i>
1163		polar AA transporter, permease	2.7 <sup>c</sup>		<i>stu1161-1162-1163-1164</i>
1164		polar AA transporter, permease	2.7 <sup>c</sup>		<i>stu1161-1162-1163-1164</i>
0970	<i>dtpT</i>	di/tripeptide transporter	3.5	2.7 +/-1	
1438	<i>amiF</i>	oligopeptide ABC transporter, ATP-binding protein	13.2	13 +/-4	<i>amiA<sub>1</sub>CDEF</i>
1439	<i>amiE</i>	oligopeptide ABC transporter, ATP-binding protein	10.2		<i>amiA<sub>1</sub>CDEF</i>
1440	<i>amiD</i>	oligopeptide ABC transporter, permease	9		<i>amiA<sub>1</sub>CDEF</i>
1441	<i>amiC</i>	oligopeptide ABC transporter, permease	7.8		<i>amiA<sub>1</sub>CDEF</i>
1442	<i>amiA<sub>1</sub></i>	oligopeptide ABC transporter, substrate binding protein pseudogene	3.5		<i>amiA<sub>1</sub>CDEF</i>
1445	<i>amiA<sub>3</sub></i>	oligopeptide ABC transporter, substrate binding protein	3.6		
0125	<i>amiA<sub>2</sub></i>	oligopeptide ABC transporter, substrate binding protein	nd <sup>f</sup>	8.89 +/-5	
<b>AA metabolism</b>					
1527	<i>serA</i>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase hypoxanthine	3.3	2.8 +/-0.1	
0366	<i>cysM<sub>1</sub></i>	cysteine synthetase&	10.7		
0352	<i>metB<sub>1</sub></i>	cystathionine gamma-synthase	nv <sup>e</sup>	4.7 +/-0.9	<i>metB<sub>1</sub>-stu0353</i>
0353		aminotransferase (classII)	3.9	2.3 +/-0.3	<i>metB<sub>1</sub>-stu0353</i>
0846	<i>cysM<sub>2</sub></i>	cysteine synthetase	3.7	2.8 +/-1	<i>cysM<sub>2</sub>-metB<sub>2</sub>-cysE<sub>2</sub></i>
0847	<i>metB<sub>2</sub></i>	cystathionine beta-lyase	3.3		<i>cysM<sub>2</sub>-metB<sub>2</sub>-cysE<sub>2</sub></i>
0848	<i>cysE<sub>2</sub></i>	serine acetyltransferase, putative	nv <sup>e</sup>	nv <sup>e</sup>	
0785	<i>metE</i>	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate	4.3	2.6 +/-0.1	<i>metE-metF</i>
0786	<i>metF</i>	5,10-methyltetrahydrofolate reductase	3.4		<i>metE-metF</i>
0987	<i>cysD</i>	O-acetyl homoserine sulphhydrylase	4.5		
0378	<i>lysC</i>	aspartate kinase	5.1		
1172	<i>metK</i>	S-adenosylmethionine synthetase	3.2 <sup>c</sup>	nv <sup>e</sup>	

1588	<i>trpB</i>	tryptophan synthase, beta subunit	2.6 <sup>c</sup>		<i>stu1594-trpEGDCFBA</i>
1593	<i>trpE</i>	anthranilate synthase, component I	6.9		<i>stu1594-trpEGDCFBA</i>
0463	<i>aspC<sub>3</sub></i>	aminotransferase	6.4		
<b>tRNA synthetase</b>					
1043	<i>tyrSE</i>	tyrosyl-tRNA synthetase	7.5	nv <sup>e</sup>	
<b>Protease</b>					
0721		peptidase family S1	0.3		
<b>Ribosome and translation</b>					
0592	<i>rpsA</i>	30S ribosomal protein S1	3.8		
1817	<i>rplA</i>	50S ribosomal protein L1	3.1 <sup>c</sup>		<i>rplK-rplA</i>
1818	<i>rplK</i>	50S ribosomal protein L11	3.5		<i>rplK-rplA</i>
<b>C-metabolism</b>					
0163	<i>rgpG</i>	glycosyl transferase	3.6		<i>mecA-rgpG</i>
0400	<i>fruB</i>	fructose 1-phosphate kinase	7.9		
1657	<i>pfl</i>	pyruvate formate lyase	0.2		
1797	<i>rpe</i>	ribulose phosphate 3-epimerase	8.7		
<b>Purine &amp; pyrimidine metabolism</b>					
0355	<i>upp</i>	uracile phosphoribosyl transferase	4.2	nv <sup>e</sup>	
1270	<i>nrpE</i>	ribonucleoside-diphosphate reductase, alpha chain	3.6		
<b>Fe-S cluster metabolism</b>					
0164		Fe-S cluster assembly, ATP binding protein	3.9	6.5 +/- 0.8	<i>stu0164-sufD-nifS<sub>1</sub>-nifU-sufB</i>
0165	<i>sufD</i>	Fe-S cluster assembly protein	4.2		
<b>Trancription regulator</b>					
1044		transcriptional regulator MutR family	3.6		
<b>DNA metabolism</b>					
1761	<i>polA</i>	DNA polymerase I	8.5		<i>polA-mutS2</i>
1762	<i>mutS2</i>	DNA mismatch repair protein	9.5		<i>polA-mutS2</i>
1845	<i>ssbA</i>	single-strand binding protein	3.7		
<b>Other</b>					
0162	<i>mecA</i>	protease adaptor protein	4.1		<i>mecA-rgpG</i>
0292	<i>pps</i>	non-ribosomal peptide synthetase	3.0 <sup>c</sup>		<i>pps-stu0293-stu0294</i>
0293		hypothetical protein	4.5		<i>pps-stu0293-stu0294</i>
0294		drug:H+ antiporter-3 family	3.4		<i>pps-stu0293-stu0294</i>
0651		hypothetical protein	5.9		<i>mip-stu0651-eetB</i>
0652	<i>mip</i>	mutative macrophage infectivity potentiator-related protein	3.4		<i>mip-stu0651-eetB</i>
0748		hypothetical protein	0.3		
1283		hypothetical protein	nv <sup>e</sup>		
1284	<i>pdxK</i>	pyridoxine kinase	3.0 <sup>c</sup>		<i>stu1285- pdxK-stu1283</i>

1285		predicted membrane protein	3.1 <sup>c</sup>	<i>stu1285- pdxK-stu1283</i>
1633		hypothetical protein (putative lipoprotein)	4.3	
1634	<i>entB</i>	pyrazinamidase/nicotinamidase	4.0	<i>entB</i>

<sup>a</sup> L/E ratio: ratio between the relative mRNA levels at 5h30 and 2h30; <sup>b</sup>: determined with ProFinder software (<http://www.softberry.com/all.htm>) ; <sup>c</sup> Significantly differentiated genes without Bonferonni correction belonging to the putative operons identified; <sup>d</sup>np: not spotted on the microarray; <sup>e</sup> no variation; <sup>f</sup> nd: not detected.

**Table 2.** Protein altered during the late phase of growth of LMG18311 in milk.

Locus ( <i>stu</i> #)	Gene name	Description	Fold change L vs E			
			CAI	Spot #	2-DE	RT-qPCR
<b>AA metabolism</b>						
<u>1527</u>	<u>serA</u>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase hypoxanthine	0.567	261	4.8	
<u>0366</u>	<u>cysM<sub>1</sub></u>	cysteine synthetase	0.680	289	6.9	
				290 <sup>a</sup>	3.3	
				307	nv <sup>b</sup>	
<u>0353</u>		aminotransferase (class II)	0.521	230	4.1	
<u>0987</u>	<u>cysD</u>	O-acetyl homoserine sulphhydrylase	0.578	182 <sup>a</sup>	2.7	
				396	18	
				181, 183, 374	nv <sup>b</sup>	
<u>1222</u>	<u>metA</u>	homoserine O-succinyltransferase	0.522	403	5.7	1.1 +/-0.5
<u>0785</u>	<u>metE</u>	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate	0.656	21, 56	3.4	
				44	5	
				46	3.1	
				48 <sup>a</sup>	4.2	
				381	33	
				387	24	
				397	31	
<u>0846</u>	<u>cysM2</u>	cysteine synthetase	0.394	256	2.9	
<u>0847</u>	<u>metB2</u>	cystathionine beta-lyase	0.398	222	1.7	2.8 +/-0.8
<u>0463</u>	<u>accC3</u>	aminotransferase	0.421	223	1.8	
<u>1776</u>	<u>glnA</u>	glutamine synthetase	0.675	177 <sup>a</sup>	0.47	1.71 +/-0.34
				195	nv <sup>b</sup>	
<u>0641</u>	<u>aroF</u>	chorismate synthase	0.509	217	0.11	1.05 +/-0.26
<u>1873</u>	<u>ilvB</u>	acetolactate synthase, large subunit	0.528	92	2.8	
<b>tRNA synthetase</b>						
<u>1971</u>	<u>hisS</u>	histidyl-tRNA synthetase	0.525	128	0.011	1.5 +/-0.5
				157 <sup>a</sup>	0.48	
<u>0572</u>	<u>thrS</u>	threonyl- tRNA synthetase	0.691	51	0.25	0.93 +/-0.16
<b>Peptidase, protease</b>						
<u>0671</u>		protease	0.557	259	0.21	0.9 +/- 0.5
<u>1672</u>	<u>pepX</u>	X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase	0.451	54	0.16	0.89 +/-0.15
<b>Ribosome and translation</b>						
<u>0439</u>	<u>rrf</u>	ribosome releasing factor	0.699	342 <sup>a</sup>	1.8	1.05 +/-0.5
				349	nv	
<b>C-metabolism</b>						
<u>1264</u>	<u>ptsI</u>	phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system enzyme I	0.727	84 <sup>a</sup>	2.0	1.21 +/-0.36
				86	0.014	
<u>1735</u>	<u>scrB</u>	sucrose-6-phosphate hydrolase	0.657	119	2.0	0.81 +/-0.32

<u>0873</u>	<u>glmS</u>	D-fructose-6-phosphate amidotransferase	0.612	399 <sup>a</sup>	4.7	2.9 +/-0.8
				79, 81	nv <sup>b</sup>	
1400	galE1	UDP-galactose epimerase	0.648	251	2.0	1.48 +/-0.33
1402	galK	galactokinase	0.631	234	2.5	0.82 +/-0.53
<u>1657</u>	<u>pfl</u>	pyruvate formate lyase	0.756	39 <sup>a</sup>	0.001	
				49	0.06	
				36	0.008	
				50, 35	nv <sup>b</sup>	
<b>Purine &amp; pyrimidine metabolism</b>						
1270	nrdE	ribonucleoside-diphosphate reductase, alpha chain	0.624	58	0.037	
<b>Trancription regulator</b>						
1160	rr05	response regulator	0.531	323	0.531	0.47 +/-0.1
<b>Other</b>						
0092	panE	dehydropantoate 2-reductase (ketopantoate reductase (ketopantoate reductase)	0.498	279	5.0	
				292 <sup>a</sup>	1.8	
0195		hypothetical protein	0.702	285	0.43	1.18 +/-0.24
0283	ureC	urea amidohydrolase (urease), alpha subunit	0.624	80 <sup>a</sup>	0.16	0.90 +/-0.1
				87	0.52	
0334		hypothetical protein		318	8.8	
0554	hipO1	aminoacylase/N-acyl-L-amino acid amidohydrolase /hippurate hydrolase	0.416	219	3.0	
0735	ftsZ	cell division protein	0.652	138	0.17	0.70 +/- 0.03
1820		hypothetical protein	0.467	363 <sup>a</sup>	0.37	
				365	nv <sup>b</sup>	

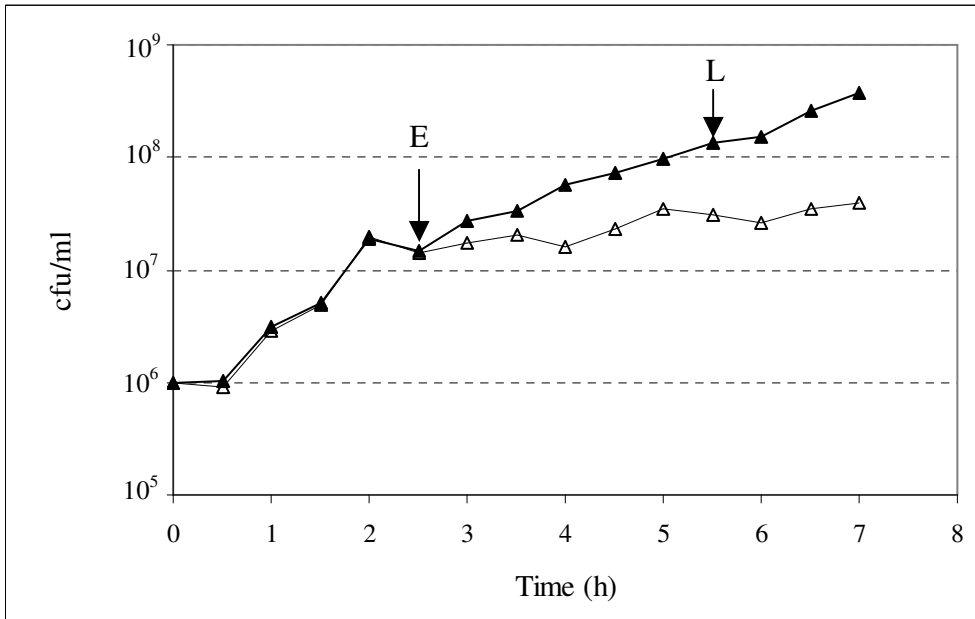
Gene & protein were underlined when their expression and amount varied similarly; <sup>a</sup> Most abundant protein. <sup>b</sup> nv: no variation.

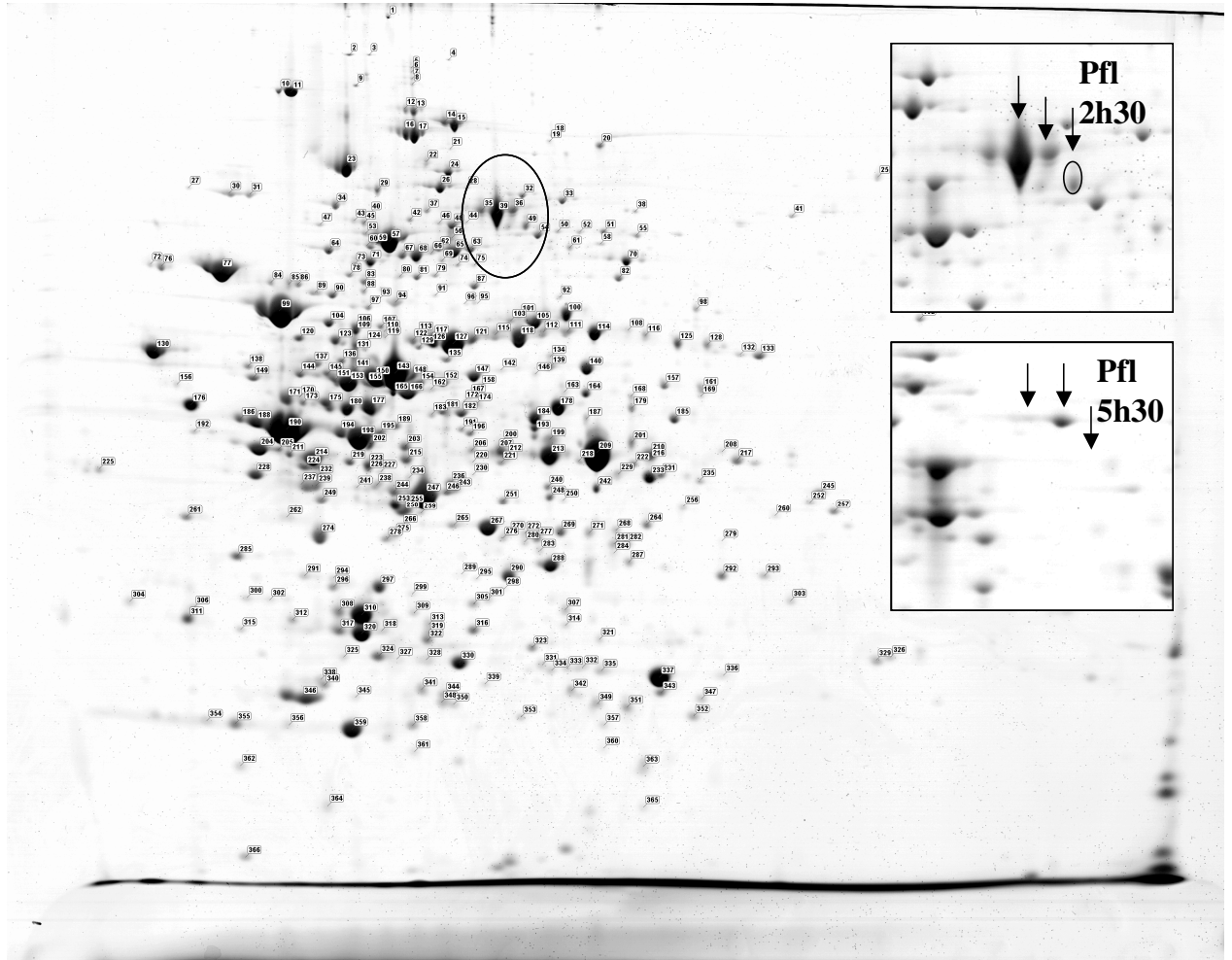


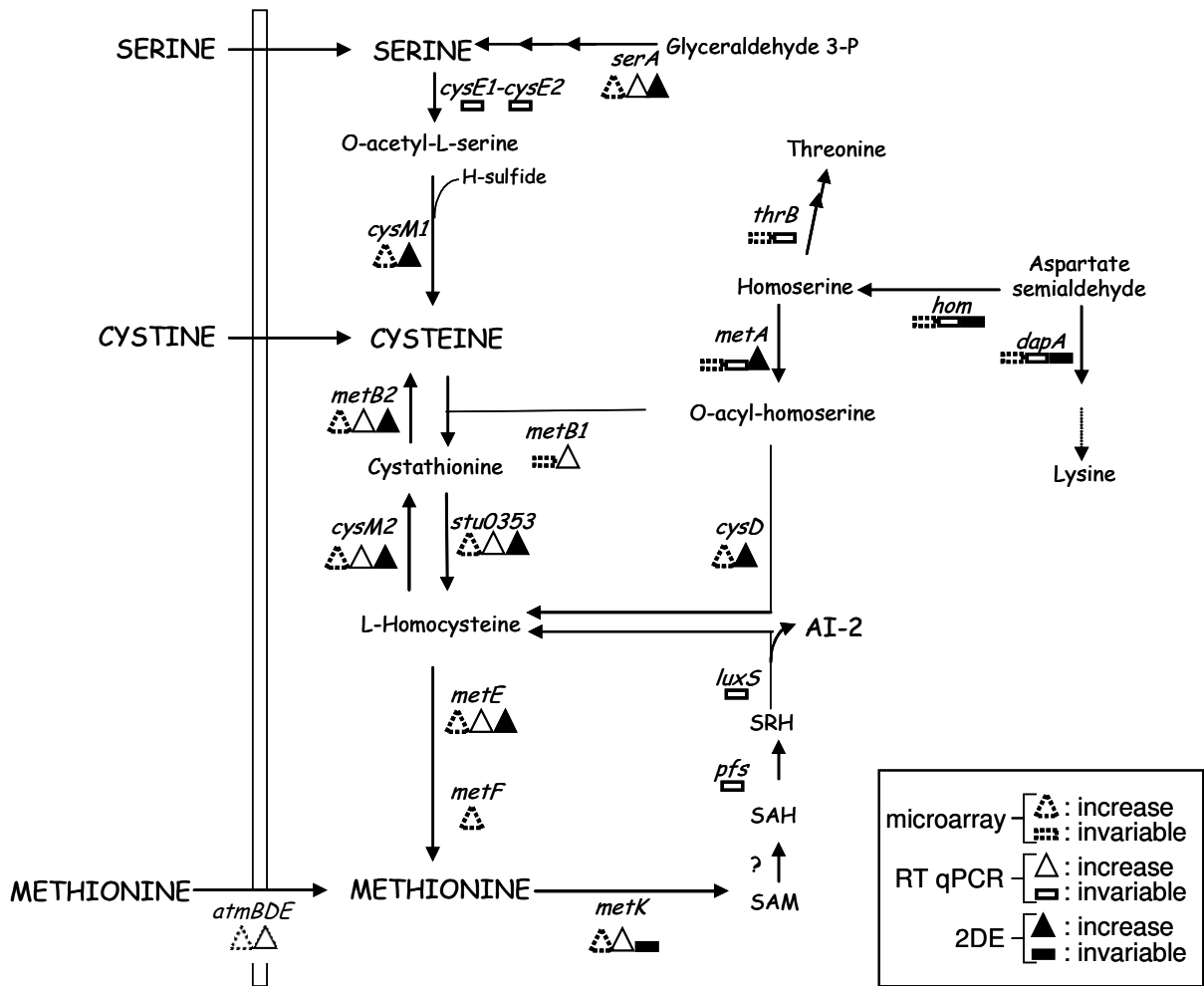
**Table 3.** Free AA concentrations during growth of *S. thermophilus* LMG18311 in milk.

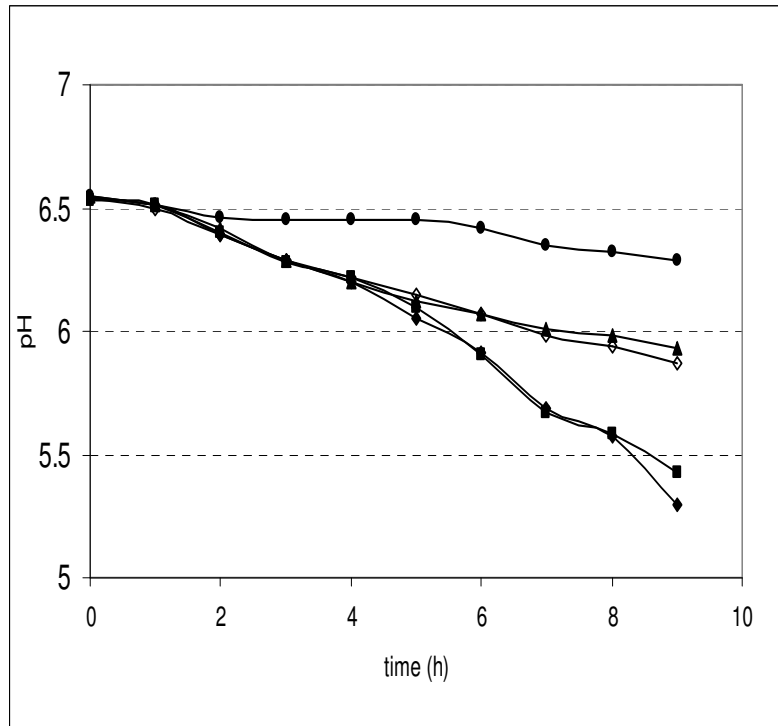
AA	Mean (SD) AA concentration ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>		
	0	2h30	5h30
Asp	ND	ND	ND
Glu	666.4 (4.5)	602.8(32.2)	296.8(4.5)
Thr + Ser	58.0 (0.6)	29.6(1.1)	15.2(0.6)
Pro	41	68.4(0.6)	94.4(2.3)
Gly	203.2(2.2)	144.8(6.8)	102.0(1.7)
Ala	61.2(0.6)	30.0(0.6)	ND
Cys	ND	ND	ND
Met	ND	ND	ND
Leu	9.2(1.7)	6.8(2.8)	ND
Ile	6.8(1.7)	5.2(3.9)	ND
Val	22.0	21.2(0.6)	ND
Tyr	6.0	12.4(1.7)	7.2(0.1)
Phe	3.2(1.1)	7.6(0.6)	8.0(1.1)
Trp	ND	ND	ND
His	10.4(0.1)	13.6(2.3)	9.6(2.3)
Arg	98.4 <sup>b</sup>	48.8 <sup>b</sup>	ND
Lys	20.8 <sup>b</sup>	17.6 <sup>b</sup>	8.0 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> From 3 independent experiences. <sup>b</sup> Not detected in 2 of 3 cultures. <sup>c</sup> ND, below the detection threshold (250 pmoles).









<b>AA &amp; peptides transporter</b>	<b>Mono-culture</b>	<b>Co-culture</b>	<b>C-metabolism</b>	<b>Mono-culture</b>	<b>Co-culture</b>
<i>atm-like</i>	▲△	▲△	<i>fruB</i>	▲△	■△
<i>liv</i>	▲△	▲△	<i>ptsI</i>	▲	■
<i>stu1161-1164</i>	▲△	▲△	<i>scrB</i>	▲	■
<i>dtpT</i>	▲△	▲△	<i>rpe</i>	▲△	▲△
<i>Ami</i>	▲△	▲△	<i>glmS</i>	▲	▲
<b>AA metabolism</b>			<i>rgpG</i>	▲△	▲△
<i>stu0353</i>	▲△	▲△	<i>galE1</i>	▲	▲
<i>cysM2</i>	▲△	▲△	<i>galK</i>	▲	▲
<i>metE</i>	▲△	▲△	<b>Fe-S cluster metabolism</b>		
<i>metF</i>	▲△	▲△	<i>stu0164</i>	▲△	▲△
<i>metB2</i>	▲△	▲△	<i>sufD</i>	▲△	▲△
<i>metK</i>	■△	▲△			
<i>cysM1</i>	▲△	▲△			
<i>cysD</i>	▲△	▲△			
<i>metA</i>	▲■	▲■			
<i>serA</i>	▲△	▲△			
<i>trpE</i>	▲△	▲△			
<i>trpB</i>	▲△	▲△			
<i>trpC</i>	■△	▲△			

2DE { ▲ : increase  
■ : invariable

microarray { ▲△ : increase  
■△ : invariable

**Table S1.** Primers used for the RT-qPCR study

Target Gene (stu#)	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')	Amplicon length (bp)
<i>stu0297</i>	GAATTGGCTAAAGACAAGGGTG	GGAAAGCATTAAACGTCGATTC	91
<i>livJ (0359)</i>	GTTGCGGCCTATGGTAAGTC	ATCTTTTTGCCGTCAACACC	89
<i>stu1161</i>	GAAATGGGCTTTGCTCGTAG	GGTTTGTCTGAAGAAGCCATC	101
<i>amiF1 (1438)</i>	CGTGCCCAAGTTTTGAATTT	TGAAACGGACCACTGACAAA	94
<i>dtpT (0970)</i>	TCATGGCAATTTACGCTTCA	ACACCACCCCAGAATACAGC	109
<i>amiA2 (0125)</i>	GGCGATAAGACCTTTGGTGA	CCGCATTCGTTCATAACCTC	93
<i>metB<sub>1</sub> (0352)</i>	TTGCGACAAGTTCAGGAATG	TTGAACCAACGGAAAGAACC	112
<i>stu0353</i>	TGAAGGGGTTGTTCCAGCTA	TGCGATTATTCAAGCGAACA	122
<i>cysM2 (0846)</i>	CATAATCCGGCGACTCAAAC	AATCAACACCGATGCCTTC	101
<i>metE (0785)</i>	AGATTACACACGTTTACCGGCT	CTTAGTTGAGGGAATGAACCG	109
<i>metK (1172)</i>	TGCCGCTTCCAGTTAGTCTT	GCATCTGGACGAAGGTAGGA	91
<i>cysD (0987)</i>	TGACGAGGACCCATCTTACC	CCTGTGTCACGCAAAAGTTG	99
<i>serA (1527)</i>	GGGTAGCGAGATTGCAGGTA	TTCATTCCCAAACGATAGGC	101
<i>metB2 (0847)</i>	TAAAGCAACCGGAGCAGTTT	GTTGGGTTTCCAGAACGAGA	105
<i>metA (1222)</i>	CCTGCCAATAATCAACTTCCTC	CGCTGAACATATGGAAACCTTC	125
<i>tyrES (1043)</i>	TGCAGACAGCTTACATTTAGGG	TCCCCTACCAATGCAGTAGC	114
<i>upp (0355)</i>	GTAATGGACCCAATGCTTGC	TGGTGCGGCAACTAAACATA	108
<i>stu0164</i>	CACGTAATGATGGAGGGTCA	CAGCGATTTTCGCATAACCT	88
<i>rr05 (1160)</i>	ATCCGTAACGAGCCACAC	TAGTCGTCTGCCCAATTTTC	95
<i>hom (0469)</i>	TGGCTGTTGCTCAAGAATTG	TTTGGCAAGAATGTTGGTGA	103
<i>dapA (1297)</i>	AGTTGGACCACTTCGTTTGC	CGTGTTCCTCGACATCTTC	96
<i>mmuM (0584)</i>	CGAAACTTATGTGGCTGCTG	CGCTGCTTTCTCGGTAAGTC	100
<i>thrB (0470)</i>	CAAGGCGAATACGTTGACCT	ATTTCCACGCCAGTAAGCAC	91
<i>ptsI (1264)</i>	TGCTGATGGAAAACACTTCG	CTGCTTCTGCACCATTATCG	86
<i>scrB (1735)</i>	CCAAGATTTGACCCCTGAGA	TAACAATAAGCGCACGACCA	85
<i>glmS (0873)</i>	GCGGAACTTGCTGCTAAAAC	TTCTGTTTCTGAGCGGTGTG	120
<i>galE1 (1400)</i>	TCACTTTGCGGCCTATTCTT	TTAACACCGCATTTCGTTCA	118
<i>galK (1402)</i>	AACGGATCAGGCTTGTTCATC	TTAACCAAGTCCAGGCGTTC	101
<i>glnA (1776)</i>	AGGTGAACCATTTCAGGAG	TCTGGCTCTGGTCCAAGATT	102

<i>aroF</i> (0641)	TGCTGACTTGGTTGGTGGTA	TGCCACACGCATAGTTGTTT	94
<i>hisS</i> (1971)	GCGGGTGGTCGTTATGATAG	AGAACC AAAAGCAAGCGTTC	98
<i>thrS</i> (0572)	CAAGGCGAATACGTTGACCT	ATTTCCACGCCAGTAAGCAC	105
<i>pepX</i> (1672)	AGGGAGACTTGCTCGTCAAA	GCCTTTGTGACAGGGTTGAT	103
<i>stu0671</i>	GCCCTCATGCACCAAAGTAT	AAACTCCTGCATCACCAACC	100
<i>rrf</i> (0439)	ATTTGGAGCTATCCGTGCAG	AATTGGTTAAGCGGTGTTGG	93
<i>ftsZ</i> (0735)	TTGGCTTGGTACATCAATCG	ACTTTGCGTGGTTGAGCTTT	123
<i>hipO1</i> (0554)	TCGCAGAAGTGATTGAAACG	ACCATTAGTGCCGACAAAGG	101
<i>stu0334</i>	TGGTGTT CAGCAAAGTCCTG	CAAAGTCTCATGCCCCACT	92
<i>ureC</i> (0283)	ATGTTTCTTTTGCGGTCCAC	GAACGGTACGACCTTGAAA	87
<i>stu1820</i>	CTTGGCGTTGACGTATCTGA	GCGACTGACGAAGAATAGCC	91
<i>stu0195</i>	GTGCTAAACAAGCGCAAGTG	CGTTAGGTCCAAATCCCTCA	114



**Table S3.** Fold changes in transcript levels (arrays) and protein abundance (2DE) of *S. thermophilus* LMG18311 between early (2h30) and late (5h30) phases in monoculture and co-culture with *L. bulgaricus* ATCC11842 in milk (p-value<0.05).

locus stu #	Gene name	Description	Array		Spot	2DE	
			Mono- culture	Co- culture		Mono- culture	Co-culture
<b>AA &amp; peptide transporter</b>							
0296	<i>atmA</i>	Polar AA, ATP-binding protein	5.4	nv			
0297	<i>atmB</i>	Methionine ABC Tporter, substrate-binding	4.6	1.8			
0301	<i>atmD</i>	methionine ABC Tporter, ATP-binding protein	6.9	7.0			
0302	<i>atmE</i>	methionine ABC Tporter, permease	5.5	6.0			
0303	<i>dctA</i>	serine/threonine: Na+ symporter	2.6*	nv			
0360	<i>livH</i>	branched chain aa tporter, permease	3.0*	nv			
0361	<i>livM</i>	branched chain aa tporter, permease	3.1*	2.8*			
0362	<i>livG</i>	branched chain aa tporter, ATP binding prot	3.8	2.8*			
0363	<i>livF</i>	branched chain aa tporter, ATP-binding prot	3.3*	2.8*			
1161		polar aa ABC tporter,ATP-binding	3.5	2.9*			
1162		polar aa ABC tporter,substrate-binding	nv	3.7			
1163		polar aa ABC tporter,permease	2.7*	4.8			
1164		polar aa ABC tporter, permease	2.7*	2.6*			
0970	<i>dtpT</i>	di/tripeptides tporter	3.5	6.4			
1438	<i>amiF1</i>	oligopeptide ABC tporter, ATP binding	13.2	16.5			
1439	<i>amiE</i>	oligopeptide ABC tporter, ATP binding	10.2	11.8			
1440	<i>amiD</i>	oligopeptide ABC tporter, permease	9.0	6.9			
1441	<i>amiC</i>	oligopeptide ABC tporter, permease	7.8	3.2*			
1442	<i>amiA1</i>	oligopeptide ABC tporter, substrate binding; truncated	3.5	nv			
1445	<i>amiA3</i>	oligopeptide ABC tporter, substrate binding	3.6	nv			
<b>AA metabolism</b>							
1873	<i>ilvB</i>	Acetolactate synthase, large subunit	nv	nv	92	2.8	4.5
0353		aminotransferase (class II)	3.9	1.7	230	4.1	4.3
0846	<i>cysM2</i>	cysteine synthetase	3.7	3.4*	256	2.9	2.3
0847	<i>metB2</i>	cystathionine beta-lyase	3.3	2.4*	222	1.7	1.9
0785	<i>metE</i>	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate	4.3	3.3*	21	3.4	1.4
					44	5.0	7.0
					46	3.1	10
					48*	4.2	38
					56	3.3	32
					381	33	nv
					387	24	nv
					397	31	1.4
0786	<i>metF</i>	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	3.4	3.5			

1172	<i>metK</i>	S-adenosylmethionine synthetase	3.2*	6.1	136	nv	2.8
0366	<i>cysM1</i>	cysteine synthetase	10.7	11.7	289	6.9	2.7
					290*	3.3	4.4
					307	nv	nv
0987	<i>cysD</i>	O-acetyl homoserine sulfhydrylase	4.5	3.0*	182*	2.7	6.3
					374	nv	nv
0463		aminotransferase	6.4	8.0	223	1.8	nv
1593	<i>trpE</i>	anthranilate synthase component I	6.9	7.9			
1588	<i>trpB</i>	tryptophan synthase subunit beta	2.6*	nv			
1590	<i>trpC</i>	indole 3-glycerol phosphate synthase	nv	3.5			
1527	<i>serA</i>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase hypoxanthine	3.3	nv	261	4.8	2.0
0378	<i>lysC</i>	aspartate kinase	5.1	nv			
1222	<i>metA</i>	homoserine o-succinyltransferase			403	5.7	8.3
0641	<i>aroF</i>	chorismate synthase			217	0.11	nv
1776	<i>glnA</i>	glutamine synthase			195	nv	nv
					177*	0.47	nv
<b>t-RNA synthetase</b>							
0572	<i>thrS</i>	threonyl-tRNA synthetase			51	0.25	0.20
1043	<i>tyrSE</i>	tyrosyl-tRNA synthetase	7.5	nv			
1971	<i>hisS</i>	histidyl-tRNA synthetase			128	0.01	0.47
					157*	0.48	0.59
<b>Protease</b>							
0162	<i>mecA</i>	protease adaptor protein	4.1	8.5			
0671		protease			259	0.21	0.25
0721		peptidase family S1	0.3	nv			
1672	<i>pepX</i>	X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase			54	0.16	0.12
<b>Ribosome &amp; translation</b>							
0417	<i>rrf</i>	Ribosome releasing factor			342*	1.8	2.0
0592	<i>rpsA</i>	30S ribosomal protein S1	3.8	2.3*			
1817	<i>rplA</i>	50S ribosomal protein L1	3.1*	4.4			
1818	<i>rplK</i>	50S ribosomal protein L11	3.5	6.4			
<b>C-metabolism</b>							
0400	<i>fruB</i>	Fructose 1-phosphate kinase	7.9	nv			
1797	<i>rpe</i>	Ribulose phosphate 3-epimerase	8.7	3.8			
0163	<i>rgpG</i>	glycosyltransferase	3.6	13.9			
1735	<i>scrB</i>	sucrose-6-phosphate			119	2.0	nv
1657	<i>pfl</i>	pyruvate formate lyase	0.2	0.2	39*	0.001	0.001
					49	0.06	0.005
					36	0.008	0.008
					50, 35	nv	nv
0873	<i>glmS</i>	D-fructose-6-phosphate kinase			399	4.7	4.7
					79, 81	nv	nv
1264	<i>ptsI</i>	Phosphopyruvate sugar phosphotransferase system enzyme I			84*	2.8	nv

					86	0.014	nv
1400	<i>galE1</i>	UDP-galactose epimerase			251	2.0	1.8
1402	<i>galK</i>	galactokinase			234	2.5	3.0
		<b>Purine &amp; pyrimidine metabolism</b>					
1270	<i>nrdE</i>	ribonucleoside-diphosphate reductase alpha chain	3.6	nv			
0355	<i>upp</i>	uracile phosphoribosyl transferase	4.2	nv			
		<b>Fe-S cluster metabolism</b>					
0164		Fe-S cluster assembly, ATP-binding protein	3.9	15.1			
0165	<i>sufD</i>	Fe-S cluster assembly	4.2	6.1			
		<b>Transcription regulator</b>					
1044		Transcriptional regulator, MutR family	3.6	nv			
1160	<i>rr05</i>	Response regulator	nv	nv	323	0.5	nv
		<b>DNA metabolism</b>					
1761	<i>polA</i>	DNA polymerase I	8.5	13.1			
1762	<i>mutS2</i>	DNA mismatch repair protein	9.5	10			
1845	<i>ssbA</i>	single strand binding protein	3.7	nv			
		<b>Other</b>					
0732	<i>fstZ</i>	cell division protein			138	0.17	nv
0092	<i>panE</i>	2-degrydropantoate 2-reductase (ketopantoate reductase)	nv	nv	292*	1.8	2.0
0283	<i>ureC</i>	Urea amidohydrolase, alpha subunit			80*	0.16	4.4
					87	0.52	3.8
0292	<i>pps</i>	Non-ribosomal peptide synthetase	3.0*	nv			
0293		hypothetical protein	4.5	nv			
0294		drug:H+ antiporter-3 family	3.4	nv			
0334		cyclase-like hypothetical protein			318	8.8	13.5
0554	<i>hipO1</i>	Amidohydrolase/ hippurate hydrolase			219	3.0	6.0
0651		hypothetical protein	5.9	nv			
0652	<i>mip</i>	putative macrophage infectivity potentiator-related protein	3.4	nv			
1284	<i>pdxK</i>	pyridoxine kinase	3.0*	nv			
1285		hypothetical protein	3.1*	nv			
1820		carbonic anhydrase-like hypothetical protein			363*	0.37	0.31
1633		hypothetical protein	4.3	6.2			
1634	<i>entB</i>	pyrazinamidase/nicotinamidase	4.0	5.6			
0195		hypothetical protein			285	0.43	nv

nv: no variation

**2.4.3. Analyse post-génomique de *Streptococcus thermophilus* co-cultivée avec *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* dans le lait : une nouvelle vision de cette association bactérienne (Publication n°2)**

**Objectif**

Nous nous proposons d'identifier les bases moléculaires de l'association entre les bactéries lactiques du yaourt, *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, d'évaluer si d'autres échanges nutritionnels non décrits jusqu'à présent existent et d'identifier les phénomènes de régulation d'expression de gènes qui interviennent entre les deux espèces quand elles sont cultivées ensembles en milieu laitier.

**Méthode d'étude**

Nous avons comparé la variation d'expression des gènes et de l'abondance protéique de *S. thermophilus* LMG18311 en présence de *L. bulgaricus* ATCC11842 entre deux stades de croissance. Les variations spécifiques de la co-culture (obtenues grâce à la comparaison avec les variations obtenues pour la monoculture, cf. 2.4.2) sont reportées dans cette publication. Nous avons utilisé des puces à ADN pour déterminer les variations d'expression des gènes, ainsi que la PCR quantitative pour vérifier un nombre d'entre eux. Pour compléter cette étude, nous avons déterminé le potentiel redox au cours de la croissance de chacune de deux espèces et la variation d'expression de deux gènes (*dpr* et *feoA*) a été comparée entre les milieux avec et sans catalase.

**Principaux résultats**

Nous avons obtenu la variation de 77 différents gènes ou protéines (4.1% des CDS) de *S. thermophilus* qui variaient en présence de *L. bulgaricus*. Ces variations représentent des gènes ou protéines impliqués principalement dans le métabolisme azoté (24% du total), le métabolisme des purines (21%) et dans le métabolisme du fer (20%).

Ainsi les deux analyses post-génomiques complémentaires permettent de mettre en évidence en co-culture des changements métaboliques encore non décrits jusqu'à présent: une diminution de la biosynthèse des purines et une augmentation de la biosynthèse des acides aminés branchés pour les effets les plus marqués. Notre hypothèse est que *L. bulgaricus* fournit des purines à *S. thermophilus*. De plus, la co-culture conduit à des changements de régulation chez *S. thermophilus* avec la variation d'un réponse régulateur, faisant partie d'un système à deux composants homologue aux réponse régulateurs CovR des streptocoques.

Par ailleurs, par analyse transcriptomique, la présence de *Lb. bulgaricus* induit une réponse au stress oxydant de la part de *S. thermophilus* avec la variation d'expression des gènes impliqués dans le transport et la chélation du fer intracellulaire. Notre hypothèse est que *L. bulgaricus* produit de l' $H_2O_2$ , et que *S. thermophilus* diminuerait son fer intracellulaire pour éviter la réaction de Fenton.

Finalement, cette étude révèle des échanges nutritionnels inattendus et des relations de régulation entre *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* offrant de nouveaux indices pour la compréhension du comportement proto-coopératif entre ces deux bactéries.

**Post-genomic analysis of *Streptococcus thermophilus* co-cultivated in milk with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*: involvement of nitrogen, purine and iron metabolisms.**

Luciana HERVE-JIMENEZ<sup>1,2</sup>, Isabelle GUILLOUARD<sup>2</sup>, Eric GUEDON<sup>2</sup>, Samira BOUDEBBOUZE<sup>2</sup>, Pascal HOLS<sup>3</sup>, Véronique MONNET<sup>1</sup>, Emmanuelle MAGUIN<sup>2</sup> and Françoise RUL<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>INRA, UR477 Biochimie Bactérienne, F-78350 Jouy-en-Josas, France, <sup>2</sup>INRA, UR895 Génétique Microbienne, F-78350 Jouy-en-Josas, France, <sup>3</sup>Unité de Génétique, Institut des Sciences de la Vie, Université Catholique de Louvain, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

\*corresponding author. Address: Unité de Biochimie Bactérienne, INRA, 78350 Jouy-en-Josas, France. Fax : 33 (0)1 34 65 21 63 ; Email : [françoise.rul@jouy.inra.fr](mailto:françoise.rul@jouy.inra.fr)

**Keywords:** hydrogen peroxide response/ iron metabolism / proto-cooperation / purine metabolism.

## ABSTRACT

*Streptococcus thermophilus* is one of the most widely used lactic acid bacteria in the dairy industry, in particular in yogurt manufacture where it is associated with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. This bacterial association, known as a proto-cooperation, is poorly documented at the molecular and the regulatory levels. We thus investigate the kinetics of the transcriptomic and proteomic modifications of *S. thermophilus* LMG18311 in response to the presence of *L. bulgaricus* ATCC11842 during growth in milk at 2 growth stages. Seventy-seven different genes or proteins (4.1 % of total CDS), mainly implicated in the metabolism of nitrogen metabolism (24%), nucleotide base (21%), and iron (20%), varied specifically in co-culture. One of the most unpredicted results was a significant decrease of most of the transcripts and enzymes involved in purine biosynthesis. Interestingly, the expression of nearly all genes potentially coding iron transporters of *S. thermophilus* decreased whereas that of iron-chelating *dpr* as well as *fur/perR* regulator genes increased, suggesting a reduction in the intracellular iron concentration probably in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *L. bulgaricus*. The present study reveals undocumented nutritional exchanges and regulatory relationships between the two yoghurt bacteria, which provide new molecular clues for the understanding of their associative behaviour.

## 1. INTRODUCTION

*Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) is one of the most widely used lactic acid bacteria (LAB) in the dairy fermentation industry. This bacterium is traditionally used in combination with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) for the manufacture of yoghurt. When both bacteria gain a mutual benefit, this association is known as proto-cooperation (Tamime, 1999) and it often results in higher acidification rates (Amoroso, 1988, Bautista, 1966, Beal, 1991, El-Soda, 1986, Moon, 1976, Pette, 1950), a lower final pH (Moon, 1976, Rajagopal, 1990), a more abundant *S. thermophilus* population (Bottazzi, 1973, Moon, 1976, Rajagopal, 1990), stimulation of aromatic compound production (Bottazzi, 1973, Courtin, 2004, El-Abbassy, 1993, Hamdan, 1971), improved stability of the final product (El-Abbassy, 1993), and increased of exopolysaccharide production (Bouzar, 1997) compared to monocultures. This cooperation effect improves the yield of fermentation and is therefore of industrial interest. The characterization of this phenomenon so far evidenced that it depends on the strains of each species which are associated and is, at least, partly based on nutritional exchanges. In milk, the amounts of several free amino acids (AA) are growth-limiting for LAB such as *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* which have to degrade caseins into peptides and amino acids in order to fulfill their AA requirements. *L. bulgaricus* has a cell wall proteinase, PrtB, enabling the degradation of caseins whereas only few strains of *S. thermophilus* exhibit PrtS, an extracellular protease ortholog of PrtB (Shahbal, 1991). The peptides and amino-acids released from caseins by *L. bulgaricus* (Accolas, 1971, Bautista, 1966, El-Soda, 1986, Pette, 1950, Rajagopal, 1990) stimulate the growth of *S. thermophilus* and PrtS does not play a significant role in presence of PrtB<sup>+</sup> *L. bulgaricus* (Courtin, 2002). In turn, *S. thermophilus* stimulates the growth of *L. bulgaricus* by the production of formic acid under anaerobic conditions (Bottazzi, 1973, Veringa, 1968) and of carbon dioxide (Driessen, 1982). Carbon



dioxide results from the decarboxylation of urea catalyzed by urease, present and widely distributed only in *S. thermophilus* among LAB which are generally recognized as safe (GRAS) (Juillard, 1988, Mora, 2002). This association has thus mainly been studied in terms of nutritional exchanges but it remains poorly documented at the global level.

It is only recently and in a very limited number of studies that post-genomic approaches were used for the analysis of simple ecosystems such as bacteria co-cultures. A first work on *Pseudomonas aeruginosa* revealed that, in presence of *Staphylococcus aureus*, the transcription of iron regulated genes decreased in co-culture indicating that the presence of *S. aureus* increased iron availability for *P. aeruginosa* in this environment (Mashburn, 2005). More recently, a transcriptomic analysis on the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* demonstrated that 15.5% of its genome was differentially expressed in co-culture with *Methanococcus jannaschii* compared to mono-culture (Johnson, 2006). The only study on a dual bacterial culture by combining transcriptomics and proteomics reported up to now described the interactions of two dental plaque bacteria, *S. mutans* and *Veillonella parvula* (Kara, 2007). This study pointed out that growth in a biofilm together with a non-pathogenic bacterium such as *V. parvula* changes the physiology of *S. mutans*, and gives this bacterium an advantage in surviving antimicrobial treatment.

The recent completion of the genome sequences of both *S. thermophilus* (Bolotin, 2004) and *L. bulgaricus* (van de Guchte, 2006) allows to re-examine the association between these bacteria at a molecular level. In this work, we investigated the proteome and transcriptome modifications of *S. thermophilus* LMG18311 cultivated with *L. bulgaricus* ATCC11842 during growth in milk. This study revealed an ambiguous relationship providing evidences that *S. thermophilus* benefits but also protects itself from compounds produced by *L. bulgaricus*. In addition, undocumented nutritional exchanges and hints on regulators altered

during the co-culture growth were evidenced, which provide new molecular clues for the understanding of this dairy ecosystem.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Bacterial strains, media and culture conditions

*S. thermophilus* LMG18311 was obtained from the BCCM collection (Belgium), and *L. bulgaricus* ATCC11842 from ATCC (USA). Stock cultures were prepared in reconstituted low-heat 10% as described before (Hervé-Jimenez *et al.*, joint submission). Co-cultures of *S. thermophilus* with *L. bulgaricus* (ratio of 1:1 CFU/ml) were grown at 42°C in Marguerite<sup>®</sup> milk (La Laiterie, Villefranche sur Saône, France) sterilized by microfiltration. Before use, the milk was skimmed by centrifugation (4°C, 5000 x g, 30 min). 500 ml of milk were then inoculated with 10<sup>6</sup> CFU/ml of stock cultures of each strain and incubated at 42 °C.

The pH was measured until it reached a value of 4.9; the acidification rate was calculated as  $\Delta\text{pH}/\Delta t$  between pH 6.2 and 5.2, i. e. before milk coagulation. Every 20 min, cell chains of *S. thermophilus* were disrupted by a 40 s treatment with a mechanical blender (Turax X620, Labo-Moderne, France), and culture dilutions were plated on M17agar lactose (1% ) (for *S. thermophilus* counts) or MRSagar lactose (2%) acidified to pH 5.2 (for *L. bulgaricus*) with an automatic spiral platter (AES Laboratoires, Combourg, France). Colonies were counted after 16h incubation (*S. thermophilus*) or 36h (*L. bulgaricus*) in anaerobic conditions (Anaerocult A, Merck, Darmstadt, Germany) at 42°C. All cultures were prepared in three independent experiments.

### 2.2. Transcriptomic analysis

Total RNA were extracted from Marguerite milk co-cultures with the Trizol method as described before (Hervé-Jiménez *et al.*, joint submission). For co-cultures, assays in presence of catalase, bovine catalase (1000 U/ml; Sigma) was added to cultures after 2h30 of growth. RNA were extracted at 2h30 (as a control) and at 5h30 (with or without catalase).

Genome-wide expression profiles were established using a commercial DNA microarray (EGT-K40C, Eurogentec) containing 92% of *S. thermophilus* LMG18311 genes (spotted in duplicate) according to Hervé-Jiménez *et al.* (joint submission) The cross-hybridization of *L. bulgaricus* ATCC11842 labeled cDNA with the *S. thermophilus* LMG18311 microarray was expected to be minimal, since *L. bulgaricus* RNA comprised a small fraction of the co-culture total RNA (less than 10%, check by real-time quantitative RT-PCR). RNA from *L. bulgaricus* was labeled using the protocols described above and, by hybridizing the labeled samples to the *S. thermophilus* microarray, we verified that *L. bulgaricus* RNA did not cross-hybridize. The reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR) approach was carried out as described before (Hervé-Jiménez *et al.*, joint submission). Specific primers for each gene of *S. thermophilus* LMG18311 were designed using Primer3 software (Rozen, 2000) with no cross-hybridization with *L. bulgaricus* ATCC11842 (Table S1).

### **2.3. Proteomic analysis**

Cytoplasmic proteins were extracted from 300 mL of milk co-cultures at two different growth stages [early (2h30) and late exponential (5h30)] and separated by 2-DE as described before (Hervé-Jiménez *et al.*, joint submission). The 2D images obtained at the two growth stages and from three independent experiments were compared and an analysis of variance was performed using the statistical software R as described before (Hervé-Jiménez *et al.*, joint submission). Proteins that were significantly altered in abundance between the two growth stages were identified by MS analyses using Voyager-DE-STR mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, USA) on our proteomic platform (<http://www.jouy.inra.fr/unites/proteines/papss/>) according to Guillot *et al.* (Guillot, 2003), except that the monoisotopic mass lists were search against local *S. thermophilus* LMG18311 (Bolotin, 2004) and *L. bulgaricus* ATCC11842 (van de Guchte, 2006) databases using a local version of the MS-FIT program (<http://prospector.ucsf.edu>).

Codon Adaptation Index (CAI) was calculated for all ORFs of *S. thermophilus* LMG18311 genome with the program “Synonymous codon usage analysis” with Codonmixture 1.0 (P. Nicolas, personal communication).

#### 2.4. Determination of the Eh and partial pressure of dissolved O<sub>2</sub>

Monocultures of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* were cultivated in the Biostat Q fermentor (B. Braun Biotech International, Melsunge, Germany) in 1-L vessels with a working volume of 500 mL skim Marguerite<sup>®</sup> milk. The temperature was set at 42°C and the cultures stirred at 22 rpm. Em (redox electrode –Einstabmesskelte, EasyFerm plus K8RX, Hamilton, Switzerland), partial pressure of dissolved O<sub>2</sub> (Oxyferm O<sub>2</sub> sensor FDA 160, Hamilton, Switzerland), pH (pH sensor EasyFerm Plus K8, Hamilton, Switzerland) and temperature were continuously monitored as previously reported (Kieronczyk, 2006) with the software MFCS Shell/ win 2.0 (B. Braun Biotech, International Sartorius Group). Correction of pH and temperature of Em measures were performed with hydrogen electrode as reference. The final value of Eh (mV) was expressed as  $E_h = E_m + E_{ref}$ , where  $E_{ref} = +198$  mV at 37°C.

### 3. RESULTS

#### 3.1 The co-culture in milk of *S. thermophilus* LMG18311 and *L. bulgaricus* ATCC11842 favors *S. thermophilus* growth

We first characterized the growth of both LAB in mono- and co-cultures in milk by monitoring the pH and species-specific bacterial counts. Compared to the monocultures, the acidification of milk was enhanced when the two LAB were cultivated together (Fig. 1A). The co-culture presented significantly higher  $\Delta$ pH values ( $0.38 \pm 0.02$ ) (between 0 and 4h) than *S. thermophilus* ( $0.31 \pm 0.02$ ) and *L. bulgaricus* monocultures ( $0.11 \pm 0.02$ ). Similarly, the acidification rate ( $\Delta$ pH/ $\Delta$ t) of the co-culture ( $0.31 \text{ h}^{-1} \pm 0.02$ ) was 1.8- and 1.3-fold higher

than that of *S. thermophilus* ( $0.17 \text{ h}^{-1} \pm 0.02$ ) and of *L. bulgaricus* ( $0.23 \text{ h}^{-1} \pm 0.02$ ) mono-cultures, respectively.

Consistently, species-specific bacterial counts differed between the mono- and the co-cultures (Fig. 1B). During the first 2h-2h30, the growth curves of the mono- or the co-cultures superimposed. After 2h30, the co-cultures resulted in higher bacterial counts than each of the mono-cultures. The bacterial counts revealed that the stimulatory effect was transitory for *L. bulgaricus* which stopped growing after 4h30 but last until the end of the fermentation for *S. thermophilus*. For *L. bulgaricus*, the co-culture resulted in a 3-fold decrease of the final bacterial counts  $6.0 \times 10^6$  CFU/mL as compared to  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL in monoculture. For *S. thermophilus*, the association with *L. bulgaricus* resulted in a 10-fold higher final population ( $3.7 \times 10^8$  CFU/mL) than in the monoculture ( $3.9 \times 10^7$  CFU/mL). At the end of the fermentation (5h30), LMG18311 significantly dominated over *L. bulgaricus* ATCC11842 in the co-culture with 60-fold more cells. The effects of *L. bulgaricus* on the physiology of LMG18311 were further analyzed using transcriptomics and proteomics on samples harvested at two stages of growth where *S. thermophilus* was stimulated by the presence of *L. bulgaricus*: early (2h30) and late (5h30) exponential phase.

### **3.2. Transcriptome and proteome analysis of LMG18311 cultivated in milk with ATCC11842**

To investigate the physiology of *S. thermophilus* during growth in milk, in presence or not of its yogurt partner *L. bulgaricus*, we performed comparative post-genomic analyses at two growth stages. The evolution of gene expression and protein abundance of *S. thermophilus* at these two stages in mono-culture as well as in co-culture was thus established. The variations that were observed in mono-culture only or both in mono- and co-cultures were attributed to milk adaptation of *S. thermophilus* and are described by Hervé-Jimenez *et al.* (joint submission). On the other hand, the variations that were strictly obtained in co-

culture and not in mono-culture were considered as specifically related to the presence of *L. bulgaricus* and are reported in the present work (Tables 1 and 2).

First, to identify *S. thermophilus* genes differentially expressed during the co-culture in milk, the expression of 1759 CDS (92% of the genome) was assessed with LMG18311 microarrays before and during the stimulatory effect of *L. bulgaricus* i.e. at 2h30 and 5h30 of co-culture, respectively. Prior to this study, the absence of hybridization of the *L. bulgaricus* ATCC11842 cDNA on the LMG18311 microarrays was established. A total of 66 genes of *S. thermophilus* LMG18311 (3.8% of the spotted genes) showed more than a twofold alteration in transcript level in the presence of *L. bulgaricus* at 5h30 of growth compared to 2h30. 42 and 24 genes corresponding to 42 putative transcriptional units were up-regulated and down-regulated, respectively. Of these, approximately 47% showed more than a 4-fold alteration in transcript levels, indicating a tight control. In order to independently confirm microarrays results, the transcript levels of 21 genes, representatives of the main pathways modulated during *S. thermophilus* growth with *L. bulgaricus*, were measured by RT-qPCR. For 13 of them, RT-qPCR results confirmed microarrays data (underlined in Table 1) while for the other 8 genes, RT-qPCR data showed significant variations not detected by microarrays; *feoC* was not spotted on the microarray and expression of *mntH* did not significantly vary in RT-qPCR. These discrepancies probably reflect differences in the relative sensitivity and specificity of the two methods.

In parallel, a proteomic analysis based on 2-DE was performed on the same samples than those used for transcriptomics. The proteomes of 3 independent cultures at 2h30 and 5h30 of growth in milk were compared. The statistical analysis revealed that 23 proteins were significantly altered between the two growth stages (p-value < 0.05 and at least two fold volume variations): 10 and 13 became more and less abundant, respectively (Table 2 and Fig.

2). Of these proteins, approximately 50 % were detected as differentially in the transcriptome analysis, indicating a coregulation between mRNA and protein data.

Taken together, the proteomic and transcriptomic analyses revealed 77 different genes or proteins (= 4.1 % of total CDS) that significantly varied during the growth of *S. thermophilus* in co-culture with *L. bulgaricus*. These variations mostly triggered the nitrogen metabolism (24% of the altered genes/proteins), the nucleotide base metabolism (21%) and the iron metabolism (20%) (see below). The other modifications affected nucleic acid metabolism (9%), translation (6%), stress-responses (6%) and carbon metabolism (mannose metabolism) (3%).

### **3.3. Main modifications in LMG18311 during growth with ATCC11842**

**Nitrogen metabolism** In the co-culture between 2h30 and 5h30, the amino acids (AA) transport systems and biosynthesis pathways were up-regulated. Although the specificities of the four polar AA transporters which were over-expressed were not experimentally established, one of them, coded by *stu0158-0159* and sharing homologies with a *S. sanguinis* Arg/His transporter, could be involved in the transport of arginine.

Regarding the AA biosynthesis, the branched-chain AA (BCAA) and Arg pathways were massively altered while the over-expression of the *thrB* gene indicated that the Thr biosynthesis may also be modified. Concerning the BCAA, 4 enzymes (IlvBN, IlvC, IlvD1 and BcaT) are needed to produce Val and Ilv from pyruvate while to produce Leu, the LeuA, LeuD and LeuB enzymes are required. The transcription of *ilvC* and *ilvD1* and the abundance of IlvC, IlvB and LeuB increased between 2h30 and 5h30 suggesting a higher production of BCAA in the cells. Interestingly, we observed a concomitant increase of IleS and ValS proteins (tRNA synthetases), necessary to load Ilv and Val AA on their respective tRNA during translation.

Several evidences indicated that the requirement for *de novo* Arg biosynthesis increased during LMG18311 growth in co-culture. From glutamate, 4 enzymes, ArgJ-B-C-D, are involved in the biosynthesis of ornithine which is then transformed into Arg by 3 enzymes, ArgF-G and H. Note that the later co-produces fumarate and Arg from arginosuccinate. During the growth of LMG18311, the transcription of *argC-J-B-D* and *argH* increased and RT-qPCR confirmed a 57-fold over-expression of *argH*. Consistently, fumarate was produced in the co-culture medium: we measured 45  $\mu$ M of fumarate at time 0 and 131  $\mu$ M after 5 h growth. We also observed a 3.7-fold increased expression of *argR*, the putative Arg regulator, suggesting an activator role for ArgR.

**Nucleic base metabolism.** In all organisms, nucleotides are essential; they are substrates for RNA and DNA synthesis, and are the main energy donors for cellular processes. In milk, purine nucleotides are growth-limiting for *S. thermophilus* and purine biosynthesis pathway is essential for its optimal growth (Garault, 2001). Thus, one of the most unexpected results of our analysis was the down-regulation of the vast majority of the genes and corresponding enzymes involved in the purine biosynthesis. *In silico* analysis of LMG18311 indicated that the purine nucleotides are synthesized from PRPP (5-phosphoribosyl- $\alpha$ -1-pyrophosphate) to IMP (inosine monophosphate) via 9 different enzymes; the pathway then split in two leading to AMP or GMP thanks to two enzymes for each of them (Fig. 3). Between 2h30 and 5h30 of growth, 10 genes and 7 proteins involved in this pathway were down-regulated. Importantly, we also observed a decrease in the transcription of *prsA1* and *fhs* and of the Fhs protein which are required for the purine biosynthesis for the supply of PRPP and formyl groups, respectively. Altogether these results show that during the growth of LMG18311 with *L. bulgaricus* in milk, the biosynthesis of purines was switch off at the transcription level. Consistently, a 14-fold increase of PurR, the putative purine regulator was observed. It is



noteworthy that the expression of *stu0336*, an homolog of the nucleobase transporter *pbuX* of *Lactococcus lactis*, increased 2.4 fold.

**Iron metabolism.** The transcription of 6 over the 7 genes of LMG18311 potentially involved in iron transport were down-regulated between 2h30 and 5h30 of growth: an ABC transporter of iron complexes (*fatA,B,C*), a ferrous iron transporter (*feoA*), and a putative high-affinity iron permease (*stu1022*). Interestingly, the *dpr* gene, which codes an intracellular ferritin (i.e. an iron chelator) and is involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance in *Streptococci* (Pulliainen, 2003), was the highest induced gene between 2h30 and 5h30 with an induction factor of ~18. In LMG18311, *dpr* forms a putative operon with a *perR*-like gene homolog (annotated *fur*), the putative regulator of iron transport which is induced ~8 fold. Altogether our data establish that at the late growth stage LMG18311 induced several systems to limit its intracellular iron concentration. It was previously reported that *L. bulgaricus* ATCC11842 can produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during its growth in M17 (van de Guchte, 2001). We therefore wondered whether the observed modification of the LMG18311 iron metabolism could be a coordinated response aimed at limiting the production of damageable reactive oxygen species by the Fenton reaction which happens with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of an iron catalyst.

**Redox potential of the milk cultures and effect of catalase addition on the *dpr* and *feoA* expression.** Since the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by ATCC11842 was too low to be directly measured in milk by classical means, we monitored the oxido-reduction potential (Eh) of mono-cultures in milk. Contrary to *S. thermophilus* mono-culture, *L. bulgaricus* mono-culture presented an increase of Eh from 2 to 5h indicating the production of a molecule more oxidant than O<sub>2</sub> that is likely to be H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (data not shown). To test our hypothesis which links the down-regulation of iron transporters and the induction of *dpr* observed in co-culture to the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the medium, the co-culture was supplemented with catalase, an enzyme which converts H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O. The expression of *dpr* and *feoA* genes was measured

by RT-qPCR at 2h30 and 5h30 in presence or not of catalase. As expected in the control without catalase, *dpr* and *feoA* were up- and down- regulated between the two growth stages, respectively. However, when catalase was added to the co-culture at 2h30, the transcription of *dpr* and *feoA* stayed constant during the growth [ratio between 2h30 and 5h30 equaled 0.92 ( $\pm 0.2$ ) for *dpr* and 0.8 ( $\pm 0.5$ ) for *feoA*]. This observation established that the modulation of expression of these genes correlated with the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> thereby confirming our hypothesis.

**Stress adaptation.** It is obvious that among the genes or proteins altered during the LMG18311 growth in co-culture, several are involved in stress adaptation. Intriguingly, several were up-regulated while others were down-regulated (detailed below). It is therefore difficult to conclude whether LMG18311 is at least partly stress adapted or not at 5h30 of growth. Beyond *dpr*, the upregulation of the *mutS*, *mutY*, *ung* genes could be related to stress adaptation as the corresponding proteins are DNA glycosylases involved in DNA repair notably the repair of oxidative stress damages (Delaney, 2007, Zhao, 2000). In the same way, the up-regulation of *htrA* (serine protease) and *htpX* (heat shock protein) could be related to stress. However, the down-regulation of *Gor*, the glutathione reductase, and *radA* which were previously reported to belong to the oxidative stress response of *S. thermophilus* is intriguing. Moreover, the transcription of *hrcA* and *grpE*, coding for stress responsive proteins decreased 3 fold between 2h30 and 5h30. In many Firmicutes, HrcA is the repressor of the *hrcA-grpE-dnaK* and *groEL-groES* operons which encode chaperonins involved in different stress responses (heat shock, acid stress, salt stress and oxidative stress) (Arena, 2006, van de Guchte, 2002). The expression of *rr01* also decreased ~3.8 fold whereas the corresponding protein increased 2.2 fold. This two-component response regulator is homologous to the CovR protein described in other streptococci (Graham, 2002, Lamy, 2004) and that may be involved in the regulation of general stress responses (Dalton, 2006).

## 4. DISCUSSION

The proto-cooperation between *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* has been so far described in terms of nutritional exchanges with *L. bulgaricus* supplying peptides and amino acids to *S. thermophilus* and, in turn, the production by *S. thermophilus* of formic acid and carbon dioxide which stimulate the *L. bulgaricus* growth. In this work, this phenomenon was analysed for the first time through a global monitoring of transcription and of protein abundance at 2 stages of the growth of the LMG18311 and ATCC11842 co-culture. It revealed an alteration of 4.1% of the *S. thermophilus* transcriptome and proteome triggering modifications of specific cellular metabolisms. These modifications can result from i) the stage of growth and ii) the presence of and the cooperation with *L. bulgaricus*. For each experiment, a LMG18311 mono-culture was grown in parallel to the co-culture, the samples were harvested at the same times, and analysed via the same methods (Hervé et al., joint submission). Comparison of the modifications observed in the co-culture and in the mono-culture revealed common transcriptomic and proteomic modifications. The main similarity was that Cys and Met metabolisms were stimulated in both types of cultures as well as galactose metabolism. However, in co-cultures, two other AA biosynthetic pathways were up-regulated (Arg and BCAA), which is consistent with previous studies establishing that for an optimal growth in milk, *S. thermophilus* required BCAA and arginine (Bracquart, 1977, Garault, 2000). These observations suggest that the AA requirement differed between the two cultures and establish that the effects on the purine pathway and the iron metabolism reported in this study are specific of the co-culture and therefore related to the association with *L. bulgaricus*.

**4.1. Up-regulation of BCAA and Arg biosynthesis in the presence of *L. bulgaricus*.** Since we showed that the co-culture of *S. thermophilus* LMG18311 and *L. bulgaricus* ATCC11842 improved the growth of LMG18311 (Fig. 1), we propose that the increased requirement for Arg and BCAA observed for LMG18311 in the co-culture reflects a higher level of protein

synthesis. Indeed, BCAA and Arg are the most abundant AA in the predicted proteins of LMG18311 as they account for 24.4% and 7.38% of the residues, respectively (<http://www.cbs.dtu.dk/services/GenomeAtlas/>). On the other hand, we can not rule out that *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* compete in co-culture in particular for these AA, which would led to the induction of Arg and BCAA pathways in *S. thermophilus*. It is noteworthy that several genes involved in nucleic acid metabolism (*polC*, *ssbB*) as well as in translation (ribosomal proteins, tRNA synthetases and *gatB*, a subunit of the Glu-tRNA<sup>Gln</sup> amidotransferase) were over-expressed in the co-culture which possibly attested for the better growth of *S. thermophilus*.

**4.2. Purine down-regulation in the presence of *L. bulgaricus*.** All the enzymes needed for the purine biosynthesis are present in the genome of *S. thermophilus* (Bolotin, 2004). However, it is well established that for the optimal growth of *S. thermophilus* in milk, supplementation with purines is required (Derzelle, 2005, Garault, 2001). In the co-culture, LMG18311 grew better than in the mono-culture but paradoxically, the purine biosynthesis pathway was down-regulated. We propose that *L. bulgaricus* ATCC11842 provided purines or their precursors to LMG18311. Several evidences support this hypothesis: (1) ATCC11842 possesses a complete purine biosynthesis pathway and grows in a purine free medium (van de Guchte, 2006), (2) the LMG18311 genome encodes putative transporters for purines or purine precursors such as the putative xanthine/uracil permease (*stu0336*) that was over-expressed in the co-culture but also the 4 phosphoribosyl transferases (Hpt, Apt, Xpt and HprT) involved in the phosphorylation of the nucleobases, (3) the addition of purines to a culture of LMG18311 in milk caused a down regulation of PurM, PurH, and Fhs (Derzelle, 2005) demonstrating that exogenous purines are internalized and down-regulate the corresponding biosynthesis pathway and (4) we observed an over-expression of PurR and a down-regulation of *prsA1* during the growth of LMG18311 with *L. bulgaricus*.

The increase of PurR is consistent with a repressor activity as in *Bacillus subtilis* (Ebbole, 1989) and *S. pneumoniae* (Ng, 2003). In *B. subtilis*, the addition of purines in the medium results in an inhibition of PrsA1, the PRPP synthase (Arnvig, 1990), leading to a decrease of the intracellular PRPP pool which is perceived by the PurR repressor and lead to the repression of purine biosynthesis (Ebbole, 1989). The PurR protein of LMG18311 possesses PRPP and DNA binding domains highly similar to its *B. subtilis* and *L. lactis* homologs (Kilstrup, 1998). We propose that a similar regulatory scheme could be involved during the growth of LMG18311 in co-culture. This hypothesis is strengthened by the presence of the PurR-box motif (WWCCGAACWWW) which is involved in the PurR-dependent activation in *L. Lactis* in the promoter regions of the *S. thermophilus purC*, *purD* and *fhs* clusters

**4.3. Reduction of the intracellular iron in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production.** We propose that in co-culture, LMG18311 encountered H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by *L. bulgaricus* ATCC11842 (as previously reported (van de Guchte, 2001)) probably via its pyruvate oxidase protein (Pox1) which is induced in acid conditions (Fernandez *et al.*, personal communication). As *S. thermophilus* (as other streptococci) lacks H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-degrading enzymes such as catalase and NADH peroxidase, it developed other means of protection against the membrane diffusible H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> which lead through the Fenton reaction ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \Rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$ ) to the production of ROS, highly damageable notably for DNA. Our data show that *S. thermophilus* avoids these damageable reactions by inducing the gene encoding Dpr which sequesters iron and is involved in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance (Antelmann, 1997, Higuchi, 2000, Yan, 2007) and down-regulating almost all of the genes potentially involved in iron import in LMG18311 (*feoA*, *fatABC*, *stu1022*). In addition, we established that the modulation in expression of at least *feoA* and *dpr* correlated with the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as it disappeared after the addition of catalase in the co-culture medium. Uncommonly among bacteria, *S. thermophilus dpr*

constitutes an operon with *fur* (*perR*), the putative ferric transport regulator which was also up-regulated during the co-culture as in *E. coli* (Zheng, 2001) and in *B. subtilis* (Helmann, 2003) in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Here, we observed that *S. thermophilus* Fur shared high homologies with PerR from *B. subtilis* (55% identity and presence of the signature of the PerR-like metalloregulators in bacteria (Mostertz, 2004)); PerR is the major regulator of the inducible peroxide stress response in *B. subtilis*, in particular of the *dps/dpr* gene (Helmann, 2003). We propose that *S. thermophilus* LMG18311 Fur-annotated protein is a PerR protein and that *fatD* and *dps* genes would be under its transcriptional control since their promoter regions contain a PerR-like box (TTANAAWNATTNTWA; <http://weblogo.berkeley.edu/>; WebLogo: A Sequence Logo Generator).

On the other hand, in enteric bacteria, peroxide stress induce the transcription of a Mn(II) transporter, MntH (Kehres, 2000), which was also the case for *S. thermophilus mntH* in co-culture, and higher intracellular Mn concentrations have been involved in oxidative stress resistance (Archibald, 1981). In addition, the RR01 protein, a CovR homolog, could be part of the probable *S. thermophilus* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response as recently demonstrated in *S. mutans* (Deng, 2007).

Finally, we did not observed any up-regulation of several genes usually involved in oxidative stress response and in particular in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response (*gor*, *trxA/B*, *recA*, *uvrA/B/C*, *clpC*, *radA*) (Mostertz, 2004) but, on the contrary, a down-regulation of some of them (*radA*, *gor*).

Overall from the present results, one can hypothesize that *S. thermophilus* possesses, as previously suggested (Thibessard, 2001), an inducible and efficient defence system based on iron homeostasis which avoid the potential damageable effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and would provide an indirect system for this microaerophilic catalase-negative bacterium to tolerate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

In conclusion, the present study enlightens specific physiological changes in *S. thermophilus* during the growth-stimulation due to the presence of *L. bulgaricus*. The

combination of transcriptomic and proteomic analyses not only revealed undocumented nutritional effects on the BCAA, Arg and purine metabolisms but evidenced also other unexpected effects such as the adaptation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indicating that this bacterial proto-cooperation is more complex and much more ambiguous than previously reported.

### **Acknowledgements**

The authors wish to thank C. Gitton for proteomics advice, C. Henry for MALDI-TOF assistance, S. Tachon for redox measurements assistance, S. Pollet and J. Y. Coppée for open access to scanners, D. Olivier and B. Schaeffer for statistical advice, V. Loux for CAI calculation and P. Nicolas for Codonmixture 1.0 software. We acknowledge M. van de Guchte, M.-Y. Mistou, and R. Gardan for fruitful discussions. L. H-J was supported by the MICA department of INRA and Ile-de-France Region. P. H. is Research Associate at FNRS.

## REFERENCES

1. Tamime, A.Y., and Robinson, R. K., in: Robinson, R. K., Tamime, A . Y. (Eds), *Yoghurt. Science and technology*, Woodhead publishing limited, Cambridge 1999, pp. 389-431.
2. Amoroso, M.J., Manca de Nadra, M. C., Oliver, G., Glucose, galactose, fructose, lactose and sucrose utilization by *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* isolated from commercial yoghurt. *Milchwiss.* 1988, 43, 626-631.
3. Bautista, E.S., R. S. Dahiya, M. L. Speck, Identification of compounds causing symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk. *J Dairy Res*, 1966, 33, 299-307.
4. Beal, C., Corrieu, G., Influence of pH, temperature, and inoculum composition on mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus* 398. *Biotechnol Bioeng*, 1991, 38, 90-98.
5. El-Soda, M.A., Abou-Donia, S. A., El-Shafy, H. K., Mashaly, R. Ismail, A. A., Metabolic activities and symbiosis in zabady isolated cultures. *Egyptian J Dairy Sci* 1986, 14, 1-10.
6. Moon, N.J., Reinbold, G. W., Commensalism and competition in mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *J Milk Food Technol*, 1976, 39, 337-341.
7. Pette, J.W., Lolkema, H., Symbiosis and antibiosis in mixed cultures *Lb. bulgaricus* and *S. thermophilus*. *Neth Milk Dairy J*, 1950, 4, 197-208.
8. Rajagopal, S.N., Sandine, W. E., Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. *J Dairy Sci*, 1990, 73, 894-899.



9. Bottazzi, V., Battistotti, B., Montescani, G., Influence des souches seules et associées de *L. bulgaricus* et *Str. thermophilus* ainsi que des traitements du lait sur la production d'aldéhyde acétique dans la yaourt. *Lait*, 1973, 525-526, 295-308.
10. Courtin, P., Rul, F., Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Lait* 2004, 84, 125-134.
11. Hamdan, I.Y., Kunsman, J. E., Deane, D. D., Acetaldehyde production by combined yogurt cultures. *J Dairy Sci*, 1971, 54, 1080-1082.
12. El-Abbassy, M.Z., Siohy, M., Metabolic interaction between *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in single and mixed starter yoghurts. *Nahrung*, 1993, 37, 53-58.
13. Bouzar, F., Cerning, J., Desmazeaud, M., Exopolysaccharide Production and Texture-Promoting Abilities of Mixed-Strain Starter Cultures in Yogurt Production. *J Dairy Sci*, 1997, 80, 2310-2317.
14. Shahbal, S., Hemme, D., Desmazeaud, M., High cell wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus thermophilus* strains (H-strains) correlated with a high acidification rate in milk. *Lait*, 1991, 71, 351-357.
15. Accolas, J.P., Veaux, M., Auclair, J., Etude des interactions entre diverses bactéries lactiques thermophiles et mésophiles, en relation avec la fabrication des fromages à pâte cuite. *Lait*, 1971, 505-506, 249-272.
16. Courtin, P., Monnet, V., Rul, F., Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiol*, 2002, 148, 3413-3421.
17. Veringa, H.A., Galesloot, T. E., Davelaar, H., Symbiosis in yoghourt (II). Isolation and identification of a growth factor for *Lactobacillus bulgaricus* produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth Milk Dairy J*, 1968, 22, 114-120.

18. Driessen, F.M., Kingma, F., Stadhouders, J., Evidence that *Lactobacillus bulgaricus* in yogurt is stimulated by carbon dioxide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth Milk Dairy J*, 1982, 36, 135-144.
19. Juillard, V., Desmazeaud, M. J., Spinnler, H. E., Mise en évidence d'une activité uréasique chez *Streptococcus thermophilus*. *Can J Microbiol*, 1988, 34, 818-822.
20. Mora, D., Fortina, M. G., Parini, C., Ricci, G., Gatti, M., Giraffa, G., Manachini, P. L., Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *J Appl Microbiol*, 2002, 93, 278-287.
21. Mashburn, L.M., Jett, A. M., Akins, D. R., Whiteley, M., *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during *in vivo* coculture. *J Bacteriol*, 2005, 187, 554-566.
22. Johnson, M.R., Conners, S. B., Montero, C. I., Chou, C. J., Shockley, K. R., Kelly, R. M., The *Thermotoga maritima* Phenotype Is Impacted by Syntrophic Interaction with *Methanococcus jannaschii* in Hyperthermophilic Coculture. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72, 811-818.
23. Kara, D., *Interactions between oral biofilm bacteria*, PhD thesis, Academic Centre for Dentistry, 2007 Amsterdam, the Netherlands.
24. Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., *et al.*, Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat Biotechnol*, 2004, 22, 1554-1558.
25. van de Guchte, M., Penaud, S., Grimaldi, C., Barbe, V., *et al.*, The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc Natl. Acad Sci. U S A*, 2006, 103, 9274-9279.

26. Rozen, S., Skaletsky, H. J., in: Krawetz, S., Misener, S. (Eds), Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa 2000, pp. 365-386.
27. Guillot, A., Gitton, C., Anglade, P., Mistou, M.-Y., Proteomic analysis of *Lactococcus lactis*, a lactic acid bacterium. *Proteomics*, 2003, 3, 337-354.
28. Kieronczyk, A., Cachon, R., Feron, G., Yvon, M., Addition of oxidizing or reducing agents to the reaction medium influences amino acid conversion to aroma compounds by *Lactococcus lactis*. *J Appl Microbiol*, 2006, 101, 1114-1122.
29. Garault, P., Letort, C., Juillard, V., Monnet, V., Branched-chain amino acids and purine biosynthesis: two pathways essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. *Lait*, 2001, 81, 83-90.
30. Pulliainen, A.T., Haataja, S., Kähkönen, S., Finne, J., Molecular basis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance mediated by Streptococcal Dpr. Demonstration of the functional involvement of the putative ferroxidase center by site-directed mutagenesis in *Streptococcus suis*. *J Biol Chem*, 2003, 278, 7996-8005.
31. van de Guchte, M., Ehrlich, S. D., Maguin, E., Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *J Appl Microbiol*, 2001, 91, 147-153.
32. Delaney, S., Neeley, W. L., Delaney, J. C., Essigmann, J. M., The substrate specificity of MutY for hyperoxidized guanine lesions *in vivo*. *Biochemistry*, 2007, 46, 1448-1455.
33. Zhao, J., Winkler, M. E., Reduction of GC --> TA transversion mutation by overexpression of MutS in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 2000, 182, 5025-5028.
34. van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., *et al.*, Stress responses in lactic acid bacteria. *Ant. Leeuwenhoek*, 2002, 82, 187-21.

35. Arena, S., D'Ambrosio, C., Renzone, G., Rullo, R., *et al.*, A study of *Streptococcus thermophilus* proteome by integrated analytical procedures and differential expression investigations. *Proteomics*, 2006, 6, 181-92.
36. Graham, M.R., Smoot, L. M., Migliaccio, C. A. L., Virtaneva, K., *et al.*, Virulence control in group A *Streptococcus* by a two-component gene regulatory system: global expression profiling and *in vivo* infection modeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99, 13855-13860.
37. Lamy, M.C., Zouine, M., Fet, J., Vergassola, M., *et al.*, CovS/CovR of group B *Streptococcus* : a two-component global system involved in virulence. *Mol Microbiol*, 2004, 54,1250-1268.
38. Dalton, T.L., Hobb, R.I., Scott, J. R., Analysis of the role of CovR and CovS in the dissemination of *Streptococcus pyogenes* in invasive skin disease. *Microb Pathog*, 2006, 40, 221-227.
39. Bracquart, P., Lorient, D., Effet des acides aminés sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*. *Milchwiss*, 1977, 32, 221-224.
40. Garault, P., Letort, C., Juillard, V., Monnet, V., Branched-chain amino acid biosynthesis is essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66, 5128-5133.
41. Derzelle, S., Bolotin, A., Mistou, M.-Y., Rul, F., Proteome analysis of *Streptococcus thermophilus* grown in milk reveals pyruvate formate-lyase as the major upregulated protein. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71, 8597-605.
42. Ebbole, D.J., Zalkin, H., Interaction of a putative repressor protein with an extended control region of the *Bacillus subtilis pur* operon. *J Biol Chem*, 1989, 264, 3553-3561.
43. Ng, W.-L., Kazmierczak, K. M., Robertson, G. T., Gilmour, R., *et al.*, Transcriptional Regulation and Signature Patterns Revealed by Microarray Analyses of *Streptococcus*

- pneumoniae* R6 Challenged with Sublethal Concentrations of Translation Inhibitors. *J Bacteriol*, 2003, 185, 359-370.
44. Arnvig, K., Hove-Jensen, B., Switzer, R. L., Purification and properties of phosphoribosyl-diphosphate synthetase from *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem*, 1990, 192, 195-200.
45. Kilstrup, M., Martinussen, J., A Transcriptional Activator, Homologous to the *Bacillus subtilis* PurR Repressor, Is Required for Expression of Purine Biosynthetic Genes in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*, 1998, 180, 3907-3916.
46. Higuchi, M., Yamamoto, Y., Kamio, Y., Molecular biology of oxygen tolerance in lactic acid bacteria: Functions of NADH oxidases and Dpr in oxidative stress. *J Biosci Bioeng*, 2000, 90, 484-493.
47. Antelmann, H., Engelmann, S., Schmid, R., Sorokin, A., *et al.*, Expression of a stress- and starvation-induced *dps/pexB*-homologous gene is controlled by the alternative sigma factor sigma B in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1997, 179, 7251-7256.
48. Yan, Z.Y., Xu, Z. J., Xu, G. Z., Tian, B., Hua, Y.J., Construction of a *dps* mutant and its functional analysis in *Deinococcus radiodurans*. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2007, 47, 610-615.
49. Zheng, M., Wang, X., Templeton, L. J., Smulski, D. R., *et al.*, DNA Microarray-Mediated Transcriptional Profiling of the *Escherichia coli* Response to Hydrogen Peroxide. *J Bacteriol*, 2001, 183, 4562-4570.
50. Helmann, J.D., Wu, M. F., Gaballa, A., Kobel, P. A., *et al.*, The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors. *J Bacteriol*, 2003, 185, 243-53.

51. Mostertz, J., Scharf, C., Hecker, M., Homuth, G., Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression in response to superoxide and peroxide stress. *Microbiol*, 2004, 150, 497-512.
52. Kehres, D.G., Zaharik, M. L., Finlay, B. B., Maguire, M. E., The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol Microbiol*, 2000, 36, 1085-1100.
53. Archibald, F.S., Fridovich, I., Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *J Bacteriol*, 1981, 146, 928-36.
54. Deng, D.M., Liu, M. J., ten Cate, J. M., Crielaard, W., The VicRK system of *Streptococcus mutans* responds to oxidative stress. *J Dent Res*, 2007, 86, 606-610.
55. Thibessard, A., Fernandez, A., Gintz, B., Leblond-Bourget, N., *et al.*, Hydrogen peroxide effects on *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 cell viability. *Res Microbiol*, 2001, 152, 593-596.

**LEGENDS TO FIGURES**

**Figure 1.** Milk growth of *S. thermophilus* LMG18311 in mono- and co-cultures with *L. bulgaricus* ATCC11842. **A.** pH evolution of mono-cultures of *S. thermophilus* LMG18311 ( $\Delta$ ) and *L. bulgaricus* ATCC11842 ( $\square$ ) and of co-culture ( $\blacklozenge$ ). **B.** Evolution of bacteria counts of *S. thermophilus* ( $\Delta$ ) and *Lb. bulgaricus* ( $\square$ ) in mono-culture, and of *S. thermophilus* ( $\blacktriangle$ ) and *L. bulgaricus* ( $\blacksquare$ ) in co-culture. These graphs are representative of the curves obtained in three independent experiments. At early (E, 2h30), and late (L, 5h30) exponential phases (arrows), bacteria were harvested for proteomic and transcriptomic analysis.

**Figure 2.** 2-DE (pH gradient 4-7) of cytosolic proteins of a *S. thermophilus* LMG18311 co-cultivated in milk with *L. bulgaricus* at early (2h30, A) and late (5h30, B) exponential phase. 300  $\mu$ g of proteins were loaded in the first dimension. Proteins whose abundance significantly varied between the two conditions are shown by the arrows as well as the name of their corresponding genes (proteins whose abundance decrease or increase at L vs E stage are underlined and not underlined, respectively).

**Figure 3.** Comparative protein abundance (black) and gene expression (dots for microarrays analysis and hatching for RT-qPCR analyses) for the purine biosynthesis pathway between 2h30 and 5h30 of growth of *S. thermophilus*.

\* stands for: not detected on 2-DE gels or on microarrays, or not measured by RT-qPCR.

# stands for: quantification not possible because of the presence of two proteins in the same spot.

*purA*: adenylosuccinate synthetase; *purB*: adenylosuccinate lyase; *purC*: phosphoribosylaminoimidazole - succinocarboxamide synthetase; *purD*: phosphoribosylamine-glycine ligase; *purE*: phosphoribosylaminoimidazole carboxylase I; *purF*: amidophosphoribosyltransferase; *purH*: phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase; *purM*: phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase; *purN*: phosphoribosylglycinamide (GAR) formyltransferase; *purL*: phosphoribosylformylglycinamide synthase II; *prsA*: ribose-phosphate pyrophosphokinase, *purR*: purine operon repressor, *guaA*: GMP synthase, *guaB*: inosine monophosphate dehydrogenase, *fhs*: formate-tetrahydrofolate ligase, PRPP: phosphoribosyl pyrophosphate; GAR: glycinamide ribonucleotide; FGAR: formylglycinamide ribonucleotide; AICAR: aminoimidazole; AMP: adenine mono-phosphate; SAMP: adenylosuccinate; IMP: Inosine mono-phosphate; XMP: xanthine mono-phosphate; GMP: guanine mono-phosphate.

**Table 1.** Changes in *S. thermophilus* mRNA levels in co-culture with *L. bulgaricus* between early (E, 2h30) and late (L, 5h30) exponential phases.

Locus ( <i>stu</i> #)	Gene name	Description	Fold change L vs E		Putative Operon structure <sup>b</sup>
			$\mu$ Array <sup>a</sup>	RT-qPCR	
<b>C-metabolism</b>					
0808 0808-		simple sugar transport system, substrate-binding protein	0.3	<u>0.11 +/-0.01</u>	<i>stu0806-0807-</i>  <i>0809-0810-0811</i>
0331	<i>manN</i>	mannose PTS system, component IID	4.4		<i>manLMN-stu0330</i>
0332	<i>manM</i>	mannose PTS system, component IIC	nv <sup>c</sup>		<i>manLMN-stu0330</i>
0333	<i>manL</i>	mannose PTS system, component IIAB	3.6		<i>manLMN-stu0330</i>
<b>Purine &amp; pyrimidine metabolism</b>					
0336		putative MFS transporter, xanthine/uracil permease	2.4 <sup>d</sup>	<u>1.8 +/-0.40</u>	<i>stu0336</i>
0023	<i>prsA1</i>	ribose-phosphate pyrophosphokinase	0.24	<u>0.14 +/-0.05</u>	<i>prsA1</i>
0030	<i>purC</i>	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	0.12	<u>0.39 +/-0.10</u>	<i>purCLFMNH</i>
0031	<i>purL</i>	phosphoribosylformylglycinamide synthase II	0.14	<u>0.03 +/- 0.01</u>	<i>purCLFMNH</i>
0032	<i>purF</i>	amidophosphoribosyltransferase	0.19		<i>purCLFMNH</i>
0033	<i>purM</i>	phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	0.36 <sup>d</sup>		<i>purCLFMNH</i>
0034	<i>purN</i>	phosphoribosylformylglycinamide formyl transferase	0.3 <sup>d</sup>		<i>purCLFMNH</i>
0035	<i>purH</i>	phosphoribosylaminoimidazole carboxamide formyl transferase	0.26 <sup>d</sup>		<i>purCLFMNH</i>
0040	<i>purD</i>	phosphoribosylamine-glycine lyase	0.3 <sup>d</sup>		<i>purDEK</i>
0041	<i>purE</i>	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase I	0.36 <sup>d</sup>		<i>purDEK</i>
0045	<i>purB</i>	adenylosuccinate lyase	0.59	<u>0.22 +/- 0.08</u>	<i>purB</i>
1940	<i>purA</i>	adenylosuccinate synthetase	nv	0.40 +/-0.14	<i>purA</i>
1793	<i>purR</i>	purine operon repressor	nv	1.90 +/- 0.40	<i>purR</i>
1054 <i>pyrC</i>	<i>pyrC</i>	dihydroorotase	5.8		<i>ung-</i>
<b>DNA &amp; RNA metabolism</b>					
0050	<i>mutS1</i>	DNA mismatch repair protein	2.4 <sup>d</sup>		<i>argR-stu0049-mutS1</i>
0062	<i>polC</i>	DNA polymerase III	5.0		<i>polC</i>
1055	<i>ung</i>	uracyl DNA glycosylase	8.7		<i>ung-pyrC</i>
1568	<i>rhe</i>	ATP-dependent RNA helicase	6.0		<i>rheA</i>
1753	<i>ssbB</i>	single-strand binding protein	3.5		<i>rpsF-ssbB-rpsR</i>
1757	<i>mutY</i>	A/G-specific adenine glycosylase	13.2		<i>mutY</i>
1823	<i>radA</i>	DNA repair protein	0.3		<i>radA</i>
<b>Stress</b>					
0118	<i>hrcA</i>	heat-inducible transcription repressor	nv	0.16 +/-0.07	<i>hrcA-grpE-dnaK</i>
0119	<i>grpE</i>	heat shock protein, chaperonine	0.3		<i>hrcA-grpE-dnaK</i>
0120	<i>dnaK</i>	molecular chaperone	nv		<i>hrcA-grpE-dnaK</i>
0715	<i>htpX</i>	heat shock protein	4.5		<i>htpX</i>
2024	<i>htrA</i>	exported serine protease	4		<i>htrA</i>
<b>Metal ion metabolism</b>					



0607	<i>feoA</i>	ferrous iron uptake transporter, protein A	nv	0.33 +/- 0.15	<i>feoABC</i> <sup>b</sup>
0608	<i>feoB</i>	ferrous iron uptake transporter, protein B	nv		<i>feoABC</i> <sup>b</sup>
	<i>feoC</i>	hypothetical protein	np <sup>c</sup>	0.43 +/- 0.2	<i>feoABC</i> <sup>b</sup>
0677	<i>mntH</i>	Mn2+ transporter	3.6	1.7 +/-0.2	<i>mntH</i>
0723	<i>dpr</i>	peroxide resistance protein, non-heme containing ferritin	18.3	<u>13.7 +/-4.0</u>	<i>dpr-fur</i>
0724	<i>fur</i>	ferric transport regulator protein	8.1		<i>dpr-fur</i>
1020	<i>tatA</i>	sec-independent protein translocase	nv	0.14+/-0.02	<i>stu1024-1023-1022- tatC-tatA</i>
1021	<i>tatC</i>	sec-independent protein translocase	0.4 <sup>d</sup>		<i>stu1024-1023-1022-</i>
1022	<i>tatC-tatA</i>	predicted membrane protein of the lead (Pb <sup>2+</sup> )	0.3		<i>stu1024-1023-1022-tatC-</i>
		uptake porter (PbrT) family			
1023	<i>tatA</i>	hypothetical protein, putative iron dependent peroxydase	0.4 <sup>d</sup>		<i>stu1024-1023-1022-tatC-</i>
1024	<i>tatA</i>	hypothetical protein (predicted lipoprotein)	0.4 <sup>d</sup>		<i>stu1024-1023-1022-tatC-</i>
1025	<i>fatB</i>	iron complex ABC transporter, substrate binding protein	0.4 <sup>d</sup>		<i>fatDCAB</i>
1026	<i>fatA</i>	iron complex ABC transporter, ATP binding protein	0.2		<i>fatDCAB</i>
1027	<i>fatC</i>	iron complex ABC transporter, permease	0.4 <sup>d</sup>		<i>fatDCAB</i>
<b>AA and peptide transporter</b>					
0158		polar AA ABC transporter, ATP binding protein	3.9		<i>stu0159-0158</i>
0159		polar AA ABC transporter, permease	2.4 <sup>d</sup>		<i>stu0159-0158</i>
0605		polar AA ABC transporter, permease	4.6		<i>stu0605-0606</i>
1579		polar AA ABC transporter, substrate binding protein	2.7 <sup>d</sup>		<i>stu1582-1581-1580-</i>
1579					
1580		polar AA ABC transporter, ATP binding protein	4.4		<i>stu1582-1581-1580-</i>
1579					
1652		polar AA ABC transporter, ATP binding protein	3.5		<i>stu1653-1652</i>
1653		polar AA ABC transporter, permease	3.9		<i>stu1653-1652</i>
<b>AA metabolism</b>					
0048	<i>argR</i>	arginine repressor	3.7		<i>argR-stu0049-</i>
	<i>mutS1</i>				
0464	<i>argC</i>	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	2.7 <sup>d</sup>		<i>argCJBD</i>
0465	<i>argJ</i>	bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase protein	6.3		<i>argCJBD</i>
0466	<i>argB</i>	acetylglutamate kinase	4.5		<i>argCJBD</i>
0467	<i>argD</i>	acetylornithine aminotranferase	4.9		<i>argCJBD</i>
1604	<i>ilvD</i>	dihydroxy-acid dehydratase	3.0 <sup>d</sup>	<u>2.0 +/-0.2</u>	<i>ilvD</i>
1812	<i>argH</i>	arginosuccinate lyase	3.2 <sup>d</sup>	<u>57.5 +/-10</u>	<i>argH</i>
1871	<i>ilvC</i>	ketol-acid reductoisomerase	5.6	<u>2.1 +/-0.4</u>	<i>ilvC</i>
1873	<i>ilvB</i>	acetolactate synthase, large subunit	nv	<u>nv</u>	<i>ilvBN</i>
0470	<i>thrB</i>	homoserine kinase	2.8 <sup>d</sup>		<i>thrB-rarD</i>
0924	<i>aldB</i>	alpha-acetolactate decarxylase	nv	<u>nv</u>	<i>als-aldB</i>
1202	<i>leuB</i>	3-isopropylmalate dehydrogenase	nv	<u>nv</u>	<i>leuAB</i>
1413		bi-functional glutamate-cysteine ligase	6.6		<i>stu1413</i>
<b>Ribosome and translation</b>					
0417	<i>rplU</i>	50S robosomal protein L21	4.2		<i>rplU-rpmA</i>
0418	<i>rpmA</i>	50S ribosomal protein L27	5.8		<i>rplU-rpmA</i>
1625	<i>gatB</i>	glutamyl-tRNA Gln amidotransferase, subunit B	10.5		<i>gatCAB</i>
1754	<i>rpsF</i>	30S ribosomal protein S6	3.4		<i>rpsF-ssbB-rpsR</i>
<b>Other</b>					
0049	<i>mutS1</i>	hypothetical protein	5.6		<i>argR-stu0049-</i>
0103		hypothetical protein	3.6		<i>stu0103</i>

0110		hypothetical protein	0.2		<i>stu0110-0112-</i>
0113					
		poly-gama glutamate synthesis (capsule biosynthesis)			
0161		hypothetical protein	5.0		<i>stu0110</i>
0317	<i>rr01</i>	response regulator	nv	0.26 +/- 0.18	<i>rr01-hk01</i>
0417	<i>rarD</i>	chloramphenicol sensitivity protein	3.5		<i>thrB-rarD</i>
0791	<i>fhs</i>	formate-tetrahydrofolate ligase	0.44 <sup>d</sup>		<i>fhs</i>
0800		methyl transferase	0.3		<i>stu0800-0801</i>
0912		hypothetical protein	4.1		<i>stu0912</i>
1450	<i>oxIT</i>	oxalate/formate antiporter	0.2		<i>oxIT</i>
1799	<i>ksgA</i>	dimethyladenosine transferase	4.9		<i>tatD-stu1800-</i>
<i>ksgA</i>					
1896		predicted membrane protein	4.5		<i>stu1896</i>

<sup>a</sup> L/E ratio: ratio between the relative mRNA levels at 5h30 and 2h30; <sup>b</sup>: determined with ProFinder software (<http://www.softberry.com/all.htm>) ; <sup>c</sup> No variation; <sup>d</sup> Significantly differentiated genes without Bonferonni correction belonging to the putative operons identified. <sup>e</sup> np: not spotted on the microarray.

**Table 2.** Changes in *S. thermophilus* protein abundance in co-culture with *L. bulgaricus* between early (E, 2h30) and late (L, 5h30) exponential phases.

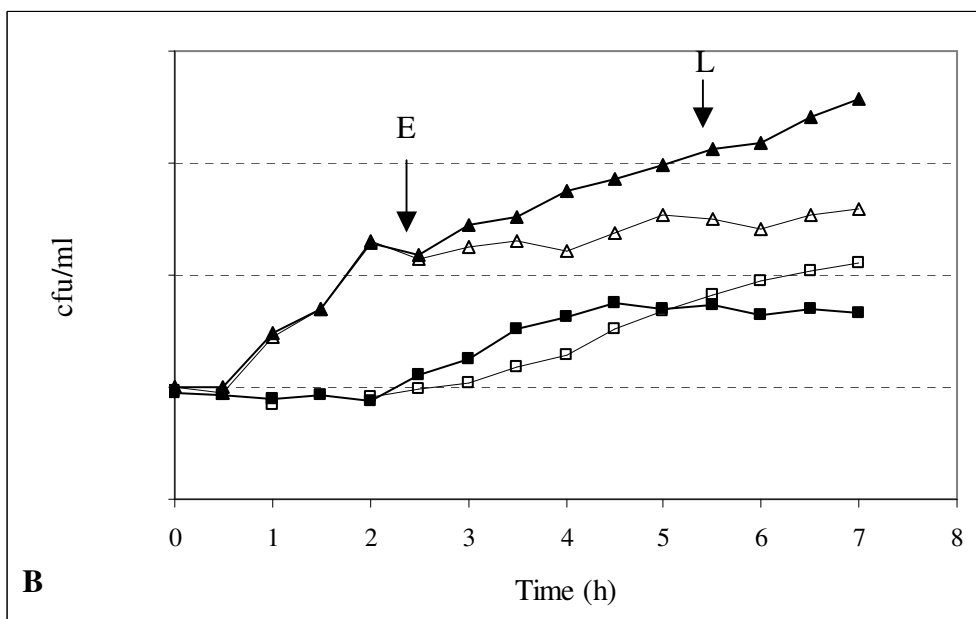
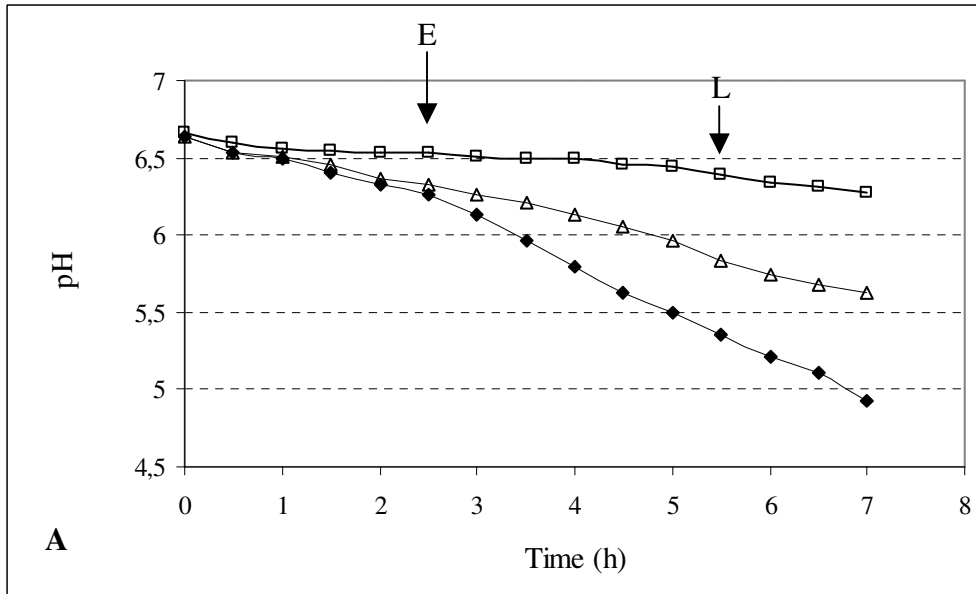
Locus qPCR	Gene ( <i>stu</i> #) name	Description	Spot	Fold change		
				2DE	L vs E Array	RT-
(p-value<0.05)						
<b>C-metabolism</b>						
1832	<i>gpsA</i>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+]	242	0.42	nv <sup>a</sup>	
1833	<i>galU</i>	UDP-glucose pyrophosphorylase	264	0.24	nv <sup>a</sup>	
<b>Purine &amp; pyrimidine metabolism</b>						
0030 +/- 0.10	<i>purC</i>	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	330	0.5	0.12	0.39
0031 0.01	<i>purL</i>	phosphoribosylformylglycinamide synthase II	12	nv <sup>a</sup>	0.14	0.03 +/-
			13	nv <sup>a</sup>		
			16	0.48		
			17 <sup>b</sup>	0.46		
0035	<i>purH</i>	phosphoribosylaminoimidazole carboxamide formyl transferase	103	0.24	0.26	
			105 <sup>b</sup>	0.18		
0040	<i>purD</i>	phosphoribosylamine-glycine lyase	205	0.5	0.3	
			204 <sup>b</sup>	0.45		
0045 +/- 0.08	<i>purB</i>	adenylosuccinate lyase	178	0.26	0.59	0.22
1940	<i>purA</i>	adenylosuccinate synthetase	179 <sup>b</sup>	0.21		
			201	nv <sup>a</sup>		0.40 +/-
0.14						
1793 +/- 0.40	<i>purR</i>	purine operon repressor	303	14	nv <sup>a</sup>	1.90
0886	<i>guaA</i>	GMP synthase	106	0.37	nv <sup>a</sup>	
			109 <sup>b</sup>	0.5		
			131	0.56		
1054	<i>pyrC</i>	dihydroorotase	191b	1.7	5.8	
			206	nv		
<b>DNA &amp; RNA metabolism</b>						
1550	<i>exoA</i>	3' exo deoxyribonuclease III	293	3.3	nv <sup>a</sup>	
<b>Transcriptional regulator</b>						
0317 0.18	<i>rr01</i>	response regulator	341	2.0	nv <sup>a</sup>	0.26 +/-
<b>Stress</b>						
0408	<i>gor</i>	glutathione reductase	172	0.35	nv <sup>a</sup>	
<b>AA metabolism</b>						
1871 0.4	<i>ilvC</i>	ketol-acid reductoisomerase	232	2.4	5.6	2.1+/-
			239 <sup>b</sup>	1.7		
1873 0.4	<i>ilvB</i>	acetolactate synthase, large subunit	92	4.8	nv <sup>a</sup>	1.6+/-
1202 0.2	<i>leuB</i>	3-isopropylmalate dehydrogenase	227	2.0	nv <sup>a</sup>	1.4+/-

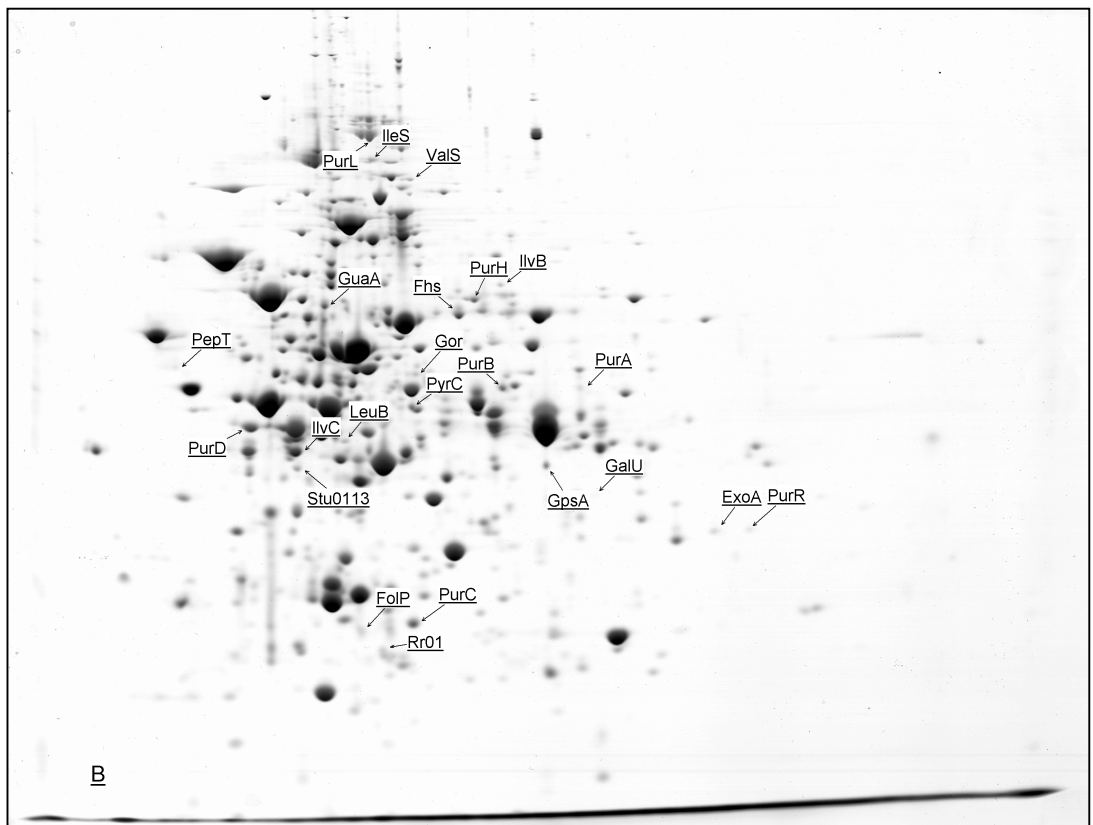
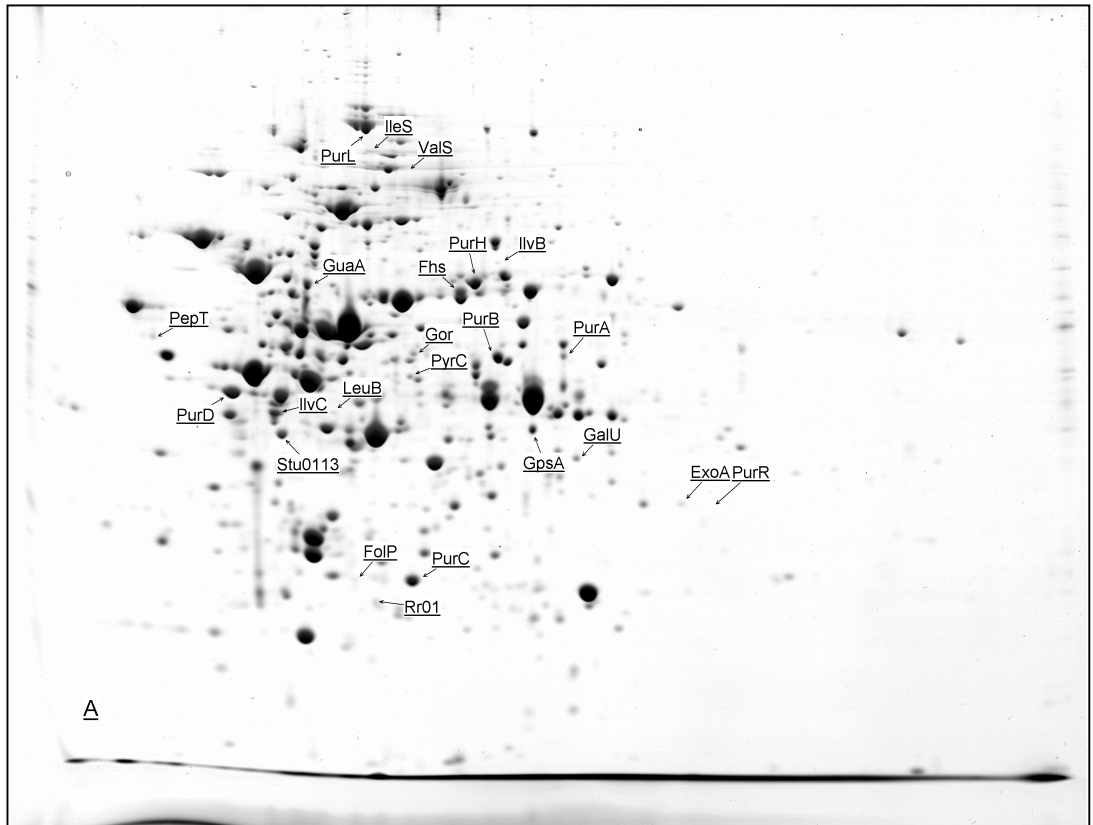
<b>t-RNA synthetase</b>					
0741	<i>ileS</i>	isoleucyl-tRNA synthetase	22	5.3	nv <sup>a</sup>
0477	<i>valS</i>	valyl-tRNA synthetase	28	6.9	nv <sup>a</sup>
<b>Peptidase, protease</b>					
1139	<i>pepT</i>	peptidase T	156	0.33	nv <sup>a</sup>
<b>Other</b>					
1543	<i>folP</i>	dyhydropteroate synthase	327	2.7	nv <sup>a</sup>
0791	<i>fhs</i>	formate-tetrahydrofolate ligase	115	0.38	0.44
			118 <sup>b</sup>	0.48	
0113		hypothetical protein	249 <sup>b</sup>	0.13	0.43
			274	nv <sup>a</sup>	

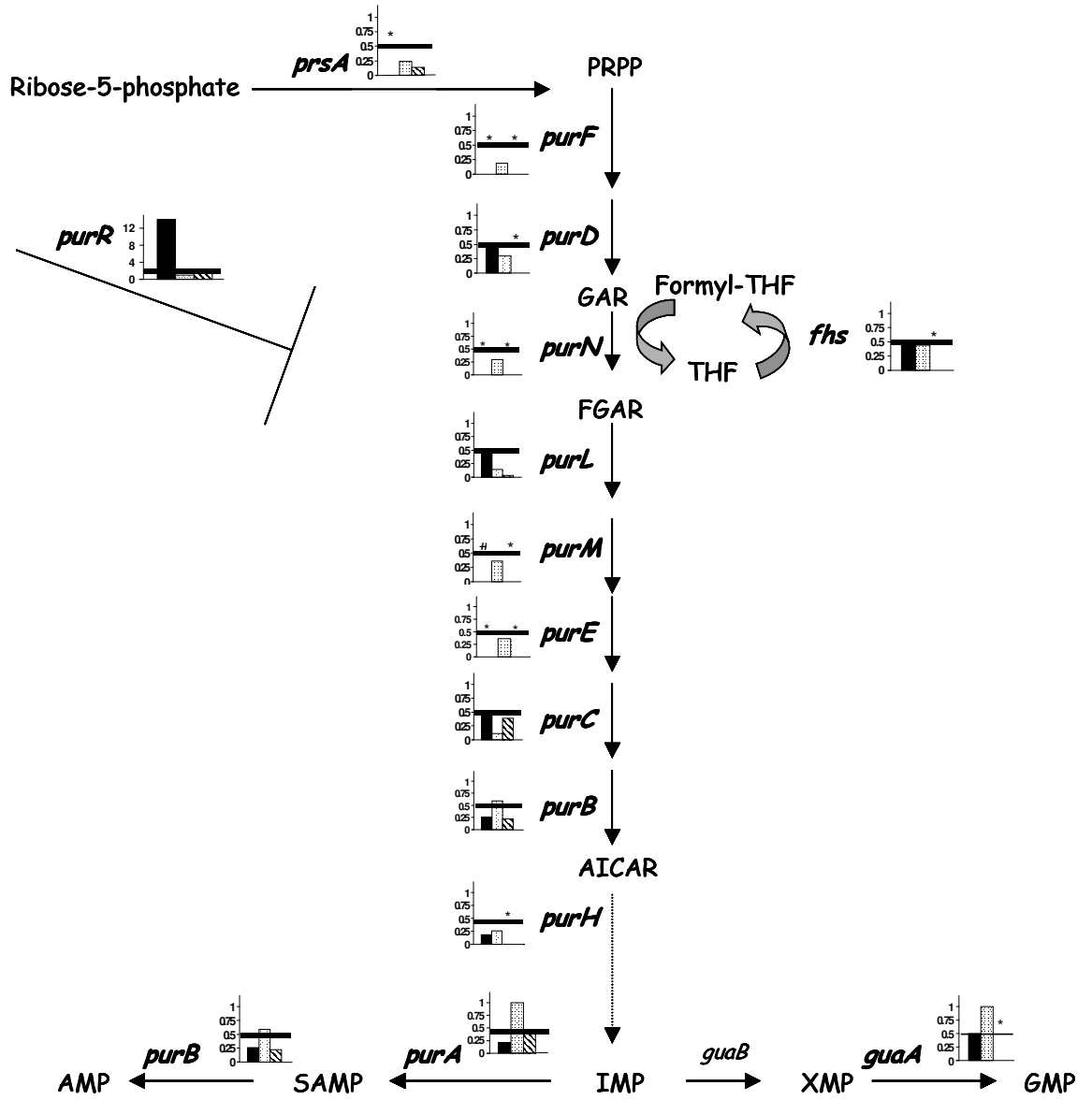
---

<sup>a</sup> nv: no variation

<sup>b</sup> : form of the most abundant protein







**Table S1.** Primers used for the RT-qPCR analysis.

<b>Target Gene (stu#)</b>	<b>Forward primer (5'–3')</b>	<b>Reverse primer (5'–3')</b>	<b>Amplicon length (bp)</b>
<i>rr01 (0317)</i>	TCGCGACTCAATCATGGATA	ACGGAAGGTTGCACGAATAC	112
<i>prsA1(0023)</i>	ATGGTTGATGCGCTAAAAC	GTGAACGTGCCTTTCGATCT	79
<i>purC (0030)</i>	CGGGTGTGGCTACTCATT	TTTGAGAAAGAACCCGCAGT	118
<i>purL (0031)</i>	CGGCTACTTGTATCGGTGGT	TCACTGGCACCTGAAATACG	88
<i>purB (0045)</i>	GCGAAGGAACACAAGTTTACG	AACGCTCGATATTACGCTTCA	106
<i>purA (1940)</i>	AGCCTTGAGCAATTGAAACG	TTACGGGCATTTTCAGGAAG	110
<i>purR (1793)</i>	CAGTGGCTCAAGCAATCGTA	GCCGCCACCTTTAAGAAAAT	103
<i>hrcA (0118)</i>	AGATGTGGAACCGACCAAAC	TGGCAAACCTGAACTGTCACC	119
<i>stu0336</i>	CCATTGCAGGGACTTCAAAT	GCAACCACAAGAGCTGTCAA	94
<i>stu0808</i>	ATCAAGCTGCTGGTGGAAC	TCACGGTCAACACCGATTAC	113
<i>dpr(0723)</i>	AAGCGGAGACACCAACAAAC	ACCAGGACCACGCATATAACC	116
<i>tatA (1020)</i>	CCTAGGAGCCCTCCTCATCT	GGCTGCTTTAAATTCGGCTA	88
<i>feoA (0607)</i>	GCATTGACCTCCCTAAG	CCTCTTCCTCGTCCAAC	478
<i>argH (1812)</i>	CATGCTCAGCCGATTTCTTT	CACCAAGTGGGGAAATATCG	115
<i>ilvC (1871)</i>	GCATTTTCTTGAATCCACCTC	ATGCACCAGAATTGGCTTACTT	90
<i>ilvB (1873)</i>	ACTGGGAAACTTGGTGTTC	CCTGACCCGTAAAGACCAGA	115
<i>ilvD (1604)</i>	AAGAAGCAGGTCGTGCAGTT	CGCCATTGTAACCTGTGATGG	104
<i>aldB (0924)</i>	TGCGGACATTAAGTTTGCTG	CACACCGTGGAACATTTAG	109
<i>leuB (1202)</i>	ATATCCGTCCTGTTTCGCATC	GCTCACGAACAACGACAAAA	96
<i>mntH (0677)</i>	TTGTGGTGAACCTCCCTCCTC	GCACCGCAATCTTAGAGTC	118





Nous avons étudié l'association de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, les deux bactéries lactiques du yaourt. Cette étude présente deux intérêts, d'une part l'intérêt cognitif qui nous permettra d'approfondir nos connaissances sur les interactions bactériennes et d'autre part un intérêt appliqué car le yaourt est un produit de consommation courant en France, avec une consommation en 2003 de 21,9 kg par an et par habitant (contre 17,7 en 1994, source : [www.cniel.com](http://www.cniel.com)) et un chiffre d'affaire représentant 2 milliards d'euros (source : [www.cidilait.com](http://www.cidilait.com)).

Cette association est appelée proto-coopération quand elle est bénéfique pour les deux espèces. Néanmoins, l'obtention de ce bénéfice va dépendre des souches utilisées et, à l'inverse, pour certains couples de souches, l'association aura des effets négatifs. La proto-coopération a un impact technologique qui a motivé plusieurs études visant à identifier certains métabolites impliqués dans ce phénomène. Plus précisément, *L. bulgaricus* présente une activité protéolytique plus élevée que celle de *S. thermophilus*, qui lui permet de libérer des acides aminés et des peptides qui stimulent la croissance de *S. thermophilus*. A son tour, *S. thermophilus* stimule la croissance de *L. bulgaricus* par la production de certains métabolites comme l'acide formique, le CO<sub>2</sub>, l'acide pyruvique et l'acide folique.

L'objectif de cette thèse était d'identifier les bases moléculaires de cette association, d'évaluer si d'autres échanges non décrits jusqu'à présent existent et d'identifier d'éventuels phénomènes de régulation d'expression de gènes qui interviennent entre les deux espèces quand elles sont cultivées ensemble en milieu laitier. Grâce à cette étude, nous avons révélé des échanges inattendus entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* et certains des régulateurs impliqués offrant de nouvelles pistes pour la compréhension de cette association. Nous proposons un nouveau modèle d'échanges entre *S. thermophilus* LMG18311 et *L. bulgaricus* ATCC11842 (figure 31) qui révèle une relation ambiguë basée sur des interactions positives et négatives.

Cette discussion propose d'évaluer les observations obtenues dans ce travail pour déterminer i) si nous pouvons confirmer ou non ce qui a déjà été décrit dans la littérature et, ii) ce que ce travail a apporté de nouveau avec d'une part des nouveaux échanges et d'autre part les éventuels phénomènes de régulation d'expression de gènes que nous avons observé quand ces deux espèces sont cultivées ensemble dans le lait.

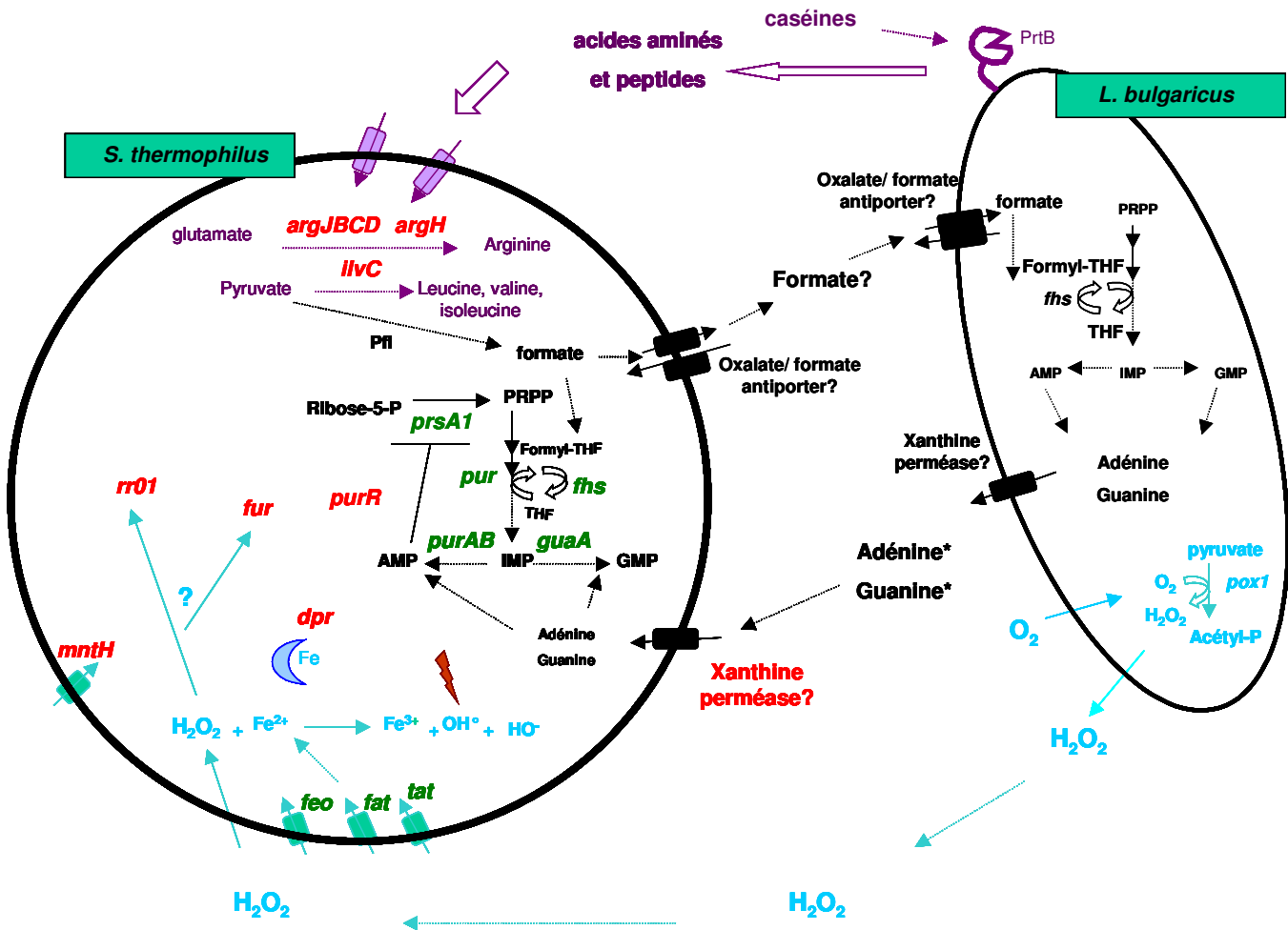


Figure 31: Modèle proposé de proto-coopération entre *S. thermophilus* LMG18311 et *L. bulgaricus* ATCC11842. Interactions proposées : i) interactions positives avec le métabolisme azoté (violet) et le métabolisme des purines (noir), ii) interactions négatives avec la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par *L. bulgaricus* et effet sur *S. thermophilus* (en bleu clair) et iii) des phénomènes de régulation avec la représentation de la protéine RR01 (réponse régulateur du TCS01). Les gènes qui étaient sur-exprimés sont présentés en rouge, les sous-exprimés en vert entre les deux phases de croissance étudiées (2h30 vrs 5h30).

➤ Des interactions précédemment décrites dans la littérature :

1. Apport de *L. bulgaricus* à *S. thermophilus*

D'après la littérature, *L. bulgaricus* apporte à *S. thermophilus* des peptides et des acides aminés par l'hydrolyse des caséines du lait. *S. thermophilus* présente une croissance supérieure en co-culture par rapport à la monoculture, cela indique qu'il est capable de venir à bien de ses synthèses protéiques soit grâce à ses propres moyens (voies de biosynthèse) soit

avec l'apport de *L. bulgaricus* (transport d'acides aminés et peptides et leur hydrolyse). D'après nos résultats, nous ne pouvons pas confirmer l'apport des acides aminés et peptides par *L. bulgaricus* car i) malgré la capacité protéolytique de *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* en monoculture ainsi qu'en co-culture induit les voies de biosynthèse de certains acides aminés (Met, Cys, Trp et probablement Asp), acides aminés pas abondantes dans le lait sous forme libre ou sous forme de caséines, ii) la plupart des transporteurs d'acides aminés, di-peptides et oligopeptides sont induits en monoculture comme en co-culture (3 transporteurs uniquement observé en co-culture) ce qui nous indique que l'induction des transporteurs se réalise quelque soit la disponibilité en acides aminés ou peptides dans le milieu et iii) nous avons observé une augmentation des voies de biosynthèse des acides aminés branchés (BCAA) et de l'arginine (Arg) en co-culture, l'effet inverse de ce que nous attendions, c'est à dire un ralentissement des voies de biosynthèse des acides aminés en présence de *L. bulgaricus*. L'augmentation des voies de biosynthèse des acides aminés est d'autant plus surprenante que ces acides aminés (BCAA et Arg) ne sont pas limitant dans les caséines. Cependant ceci peut s'expliquer par la meilleure croissance de *S. thermophilus* en co-culture qu'en monoculture, ce qui nécessite des besoins en acides aminés accrus. *L. bulgaricus* consommera aussi des acides aminés au cours de sa croissance et nous ne pouvons pas exclure qu'un effet de compétition apparaît entre ces deux espèces pour les nutriments du milieu, en particulier pour les peptides et acides aminés disponibles.

L'analyse de l'évolution des acides aminés provenant de peptides pendant la croissance dans le lait de *S. thermophilus* LMG18311 en monoculture (tableau 6) nous montre que cette bactérie ne consomme pas ou très peu les peptides dans nos conditions et consomme seulement les acides aminés libres présents dans le lait au cours de sa croissance. Cette observation pose la question de savoir si, par contre, cette bactérie consomme les peptides fournis par *L. bulgaricus*. Avec ce travail nous n'avons pas confirmé l'apport de peptides et d'acides aminés par *L. bulgaricus* et il faudrait utiliser d'autres techniques pour pouvoir confirmer ce point. Le dosage des acides aminés et peptides en co-culture au cours du temps pourraient nous donner des indices sur cet aspect. De plus la détermination de la taille et la nature des peptides fournis par *L. bulgaricus* pourraient nous indiquer si ces peptides sont mieux adaptés (taille et hydrophobicité) aux transporteurs de *S. thermophilus* que ceux qui sont présents dans le lait, en sachant que la spécificité de la plupart des transporteurs de *S. thermophilus* reste à déterminer.

**Tableau 6. Dosage d'acides aminés provenant des peptides au cours de la croissance de *S. thermophilus* LMG18311 dans le lait.**

Acide aminé	Moyenne (DS) de la concentration d'acide aminé ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>		
	Initial	2h30	5h30
Asp	666.6 (20.8)	732.5 (56.9)	540.0 <sup>b</sup>
Glu	4106.9 (136.1)	4030.5 (49.3)	5943.2 (1450.0)
Thr + Ser	2865.0 (125.0)	2777.1 (35.1)	2890 <sup>b</sup>
Pro	1455.1 (35.1)	1391.6 (0.1)	1392.3 (32.1)
Gly	660.1 (49.3)	928.5 (433.6)	804.7 (153.7)
Ala	2206.7 (97.1)	2273.3 (55.1)	2070.0 (72.1)
Cys	63.3 (5.8)	90.0 (10.0)	65.0 (7.0)
Met	490.0 (70.0)	446.7 (92.9)	370.0 (28.2)
Leu	3800.8 (113.6)	3639.9 (35.1)	3615.0 (106.1)
Ile	1603.2 (69.3)	1554.8 (26.5)	1565.0 (35.3)
Val	1448.0 (62.4)	1462.1 (25.2)	1476.7 (83.3)
Tyr	154.0 (17.3)	147.6 (55.7)	92.8 (14.1)
Phe	833.5 (133.2)	802.4 (26.5)	772.0 (141.4)
Lys	2490.0 (80.0)	2340.0 (50.0)	2310.0 (14.4)
Trp	ND <sup>c</sup>	ND	ND
His	366.3 (20.8)	329.7 (25.2)	330.4 (0.1)
Arg	610.0 <sup>b</sup>	563.3 (350.0)	185.0 (21.2)

<sup>a</sup> A partir de trois expériences indépendantes

<sup>b</sup> Pas détecté dans 2 sur 3 cultures

<sup>c</sup> ND, non détecté

La précipitation des surnageants a été réalisée avec de l'acide sulfosalicylique (concentration finale de 3%) comme décrit dans l'article 1 pour les acides aminés libres.

## 2. Apport de *S. thermophilus* à *L. bulgaricus*

D'après la littérature, *S. thermophilus* apporte à *L. bulgaricus* de l'acide formique, du CO<sub>2</sub>, de l'acide folique et de l'acide pyruvique.

Nos résultats expérimentaux ne nous donnent pas assez d'information pour confirmer que *S. thermophilus* produit du formate et que *L. bulgaricus* en consomme. D'une part, nous avons observé par protéomique deux isoformes de la Pfl, présentant une différence de poids moléculaire compatible avec ce qui a été reporté pour une Pfl activée, suggérant qu'elle était active dans nos conditions à 2h30. Par contre il reste difficile à expliquer pourquoi nous n'avons pas dosé de formate dans le milieu, en monoculture comme en co-culture. Cela suggère que soit le formate produit n'est pas exporté, soit en co-culture, il est rapidement consommé par *L. bulgaricus*. D'autre part, nous avons observé une diminution en co-culture

du gène *oxIT* de *S. thermophilus*, codant pour un antiport oxalate/formate, suggérant qu'avant 2h30 il était induit. Le gène codant pour cet antiport est également présent chez *L. bulgaricus*. Par contre il reste à déterminer si cet antiport est impliqué dans l'export/import de formate chez ces bactéries.

Pour le reste de métabolites, nous avons obtenu peu d'information par les approches post-génomiques utilisées. Nous avons détecté seulement deux protéines, UreC, pour l'opéron *ureIABCEFGD* (codant pour l'uréase, impliqué dans la décarboxylation de l'urée avec la production de CO<sub>2</sub>), et FolP (dihydroptéroate synthétase) impliqué dans la formation de folate. Des analyses complémentaires seraient nécessaires pour pouvoir confirmer les données présentées dans la littérature, notamment l'étude du métabolome pourrait nous donner plus d'indices sur ce point.

➤ **Des interactions non décrites dans la littérature :**

**1. Nouveaux échanges : métabolismes des purines et du fer**

1.1. Effet sur le métabolisme de purines

Un effet nouveau de la co-culture de LMG18311 et ATCC11842 concerne la répression du métabolisme des purines chez *S. thermophilus*. Ces résultats expérimentaux suggèrent que *S. thermophilus* n'a plus besoin de synthétiser des purines et nous proposons que *L. bulgaricus* fournisse des purines à *S. thermophilus*. Il a été déjà démontré (Derzelle *et al.*, 2005) que la souche de *S. thermophilus* LMG18311 est capable d'importer des purines ce qui conduit à la diminution des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des purines, de Fhs et de GlyA. En co-culture, nous avons remarqué l'augmentation de l'expression du gène codant pour une xanthine/uracile perméase potentielle, homologue à *pbuX* de chez *L. lactis* (Kilstrup *et al.*, 2005) et probablement impliquée dans le transport de nucléobases (purines). Néanmoins, il est difficile de dire à présent, pourquoi *L. bulgaricus* exporterait des purines ou des précurseurs dans le milieu ? Notre hypothèse est qu'un différentiel de concentration entre l'intérieur de la cellule et l'extérieur pourrait conduire à l'expulsion des purines dans le milieu. D'après l'analyse *in silico*, le gène codant pour la xanthine/uracile perméase chez *S. thermophilus* LMG18311 (*stu0336*) ainsi que le gène homologue chez *L. bulgaricus* ATCC11842 (*Ldb2200*), sont classés dans la famille des MFT transporteurs. Les MFT (pour Major Facilitator Superfamily), aussi nommés « uniport –symport -antiport family ». Ce sont des transporteurs secondaires capables de transporter des petites molécules

chargées en réponse à des changements chimio-osmotiques (Pao *et al.*, 1998). Les purines produites par *L. bulgaricus* pourraient être exportées grâce à ce type de transporteur et *S. thermophilus* pourrait les importer grâce à ce même transporteur. De plus, il a été proposé que le formate stimule la biosynthèse des purines chez *L. bulgaricus*. C'est difficile avec nos résultats de prédire, si l'apport de formate par *S. thermophilus* stimulerait cette biosynthèse chez *L. bulgaricus* et d'autres analyses sont nécessaires pour confirmer notre hypothèse.

## 2. Effet sur le métabolisme du fer chez *S. thermophilus*

Nous avons observé chez *S. thermophilus* un effet sur le métabolisme de fer avec la diminution des transporteurs de fer (*feoAB*, *fatABCD* et une protéine membranaire à grande affinité pour le fer) et d'une augmentation de sa chélation (*dpr*) et le régulateur transcriptionnel *fur*, suggérant une réduction de la concentration du fer intracellulaire pour éviter la réaction de Fenton. Nous avons proposé que ces variations étaient liées à la présence d' $H_2O_2$  produit par *L. bulgaricus*, mais nous ne pouvons pas exclure qu'il pourrait être aussi produit par *S. thermophilus* lui-même. De plus, l'acidification du milieu plus importante en co-culture pourrait impliquer une diminution du pH intracellulaire pouvant induire le passage de la forme ferrique du fer à la forme ferreuse, forme impliquée dans la réaction de Fenton, ce qui pourrait accentuer l'effet observé en co-culture.

## **2. Phénomènes de régulation**

Ce travail nous a surtout apporté des pistes sur les phénomènes de régulation potentiellement impliqués dans l'association entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*. Des phénomènes de régulation ont été peu documentés dans les études de co-culture, et nous avons pu, grâce à cette étude, identifier certains régulateurs transcriptionnels et des systèmes à deux composants qui interviennent dans la croissance en lait de *S. thermophilus* en présence ou non de *L. bulgaricus*.

Nous avons classé les régulateurs identifiés en i) régulateurs déjà caractérisés chez d'autres bactéries et ii) les régulateurs dont les cibles sont encore à déterminer.

### Des régulateurs transcriptionnels déjà caractérisés chez d'autres bactéries

Nous avons pu mettre en évidence certains régulateurs transcriptionnels soit par analyse transcriptomique (*argR*, *galR*, *hrcA* et *fur*) soit par analyse protéomique (PurR). Ces régulateurs transcriptionnels n'ont pas été étudiés chez *S. thermophilus*, mais nous disposons de données sur leurs fonctions et régulon chez d'autres bactéries. Nous nous sommes intéressés dans cette discussion à *argR* que nous n'avons pas discuté dans les articles et à *fur* pour lequel nous proposons qu'il est un *perR*-like.

#### *argR*

Chez *L. lactis*, l'expression des gènes *arg* est contrôlée par deux régulateurs transcriptionnels, ArgR et AhrC. En absence d'arginine, ArgR possède une haute affinité pour le promoteur de l'opéron *arcABD1C1C2TD2yvaD* et réprime la dégradation de l'arginine via la voie de l'arginine désiminase (ADI). En présence d'arginine, un complexe entre ArgR et AhrC se forme, avec une haute affinité pour les boîtes Arg, réprimant l'expression des gènes de la voie de biosynthèse de l'arginine (opérons *argCJBDF*, *gltSargE* et *argGH*) (Larsen *et al.*, 2004). Nous avons observé par analyse transcriptomique, l'induction des gènes *argCJBD* et *argH* en co-culture avec l'induction en plus de *argR*, normalement un répresseur. *In silico*, un homologue de *ahrC* (*stu1214*) est présent dans le génome de *S. thermophilus* LMG18311, par contre cette bactérie ne possède pas la voie ADI. Une boîte ARG a été décrite pour *E. coli* (TNTGNATWWWATNCANA) et pour *L. lactis* (AWWGWATAAWWATRCWWW) (Larsen *et al.*, 2004), mais nous n'avons pas trouvé des boîtes potentielles dans l'ensemble du génome de *S. thermophilus* LMG18311 (programme i-Momi, (Pons *et al.*, 2008). L'ensemble de nos résultats suggère que probablement la régulation de l'arginine chez *S. thermophilus* est différente de celle de *L. lactis*, et selon nos observations *argR* serait plutôt un activateur de la voie de biosynthèse de l'arginine.

#### *fur*

Par analyse transcriptomique, nous avons observé une augmentation de l'expression du gène codant le régulateur transcriptionnel *fur* (putative régulateur transcriptionnel du transport de fer). Contrairement à la majorité des bactéries, chez *S. thermophilus* le gène *fur* se trouve en opéron avec le gène *dpr*. Nous proposons que le gène *fur* est plutôt un *perR*-like, d'une part par la forte identité de Fur de *S. thermophilus* avec les protéines PerR de *S. pyogenes* (55%) et *B. subtilis* (39%), et d'autre part par la présence de la région conservée de



12 acides aminés (positions 57-68) caractéristique des protéines PerR et non conservée chez la protéine Fur (figure 32) (Bsat *et al.*, 1998).

		37		57	68																																		
Fur_ <i>S. thermophilus</i>	K	A	I	V	R	Y	L	M	M	S	D	Q	H	P	S	A	D	V	I	Y	Y	P	D	N	P	G	M	S	L	A	T	V	Y	N	N	L	K		
PerR_ <i>B. subtilis</i>	H	A	I	E	Y	L	V	N	S	M	A	H	P	T	A	D	D	I	Y	K	Y	G	K	F	P	N	M	S	V	A	T	V	Y	N	N	L	R		
PerR_ <i>S. pyogenes</i>	K	A	I	S	Y	M	I	Q	S	T	E	H	P	S	A	D	K	I	Y	R	Y	P	N	F	P	N	M	S	L	A	T	V	Y	N	N	L	K		
Fur_ <i>B. subtilis</i>	A	T	V	R	V	L	L	E	N	E	E	D	H	L	S	A	E	D	V	Y	L	Y	E	K	S	P	E	I	G	L	A	T	V	Y	R	T	E	L	
		85		91	93	96	99		104		136	139																											
Fur_ <i>S. thermophilus</i>	Y	D	F	M	G	H	D	H	L	N	I	V	C	E	K	C	G	Q	I	T	D	M	I	L	H	G	V	C	P	N	C	Q							
PerR_ <i>B. subtilis</i>	F	D	F	V	T	S	D	H	Y	H	A	I	C	E	N	C	G	K	I	V	D	L	E	I	Y	G	V	C	Q	E	C	S	K						
PerR_ <i>S. pyogenes</i>	Y	D	F	M	G	H	Q	H	V	N	V	V	C	E	I	C	G	K	I	A	D	V	I	A	Y	G	I	C	P	D	C	Q	A	K	D	Q	P	D	F
Fur_ <i>B. subtilis</i>	Y	D	L	R	K	E	G	A	A	H	F	H	H	L	V	C	M	E	C	G	L	T	F	H	G	I	C	H	R	C	N	G							

**Figure 32. Alignements des protéines Fur de *S. thermophilus* LMG18311, PerR de *B. subtilis* et *S. pyogenes* et Fur de *B. subtilis*. La zone conservée chez les protéines PerR est encadrée. Les résidus marqués en jaune ont été décrits nécessaires aux protéines PerR et Fur pour la liaison aux métaux ( $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  ou  $Mn^{+2}$ ) selon (Herbig *et al.*, 2001).**

En comparant les régions promotrices des gènes *dpr* et *fatD* avec celles des gènes régulés par PerR de *S. pyogenes* et *B. subtilis*, nous avons trouvé un consensus commun (TTANAAWNATTNTWA; <http://weblogo.berkeley.edu/>; WebLogo: A Sequence Logo Generator). Grâce au programme i-Momi (Pons *et al.*, 2008), nous avons trouvé 11 gènes de *S. thermophilus* LMG18311 qui possèdent ce consensus (figure 33). Trois de ces gènes sont directement impliqués dans le métabolisme de fer : *dpr* (en opéron avec *perR*), *fatD* et *stu0164*. Ce dernier est d'ailleurs en opéron avec *sufD*, *nifS1*, *nifU* et *sufB*, impliqués chez *S. thermophilus* dans la réponse au stress oxydant avec un rôle dans la formation des clusters [Fe-S] (Thibessard *et al.*, 2004). Parmi ces gènes, *dpr* et *stu0164* sont sur-exprimés dans nos conditions alors que *fatD* est réprimé au cours du temps. Chez *B. subtilis*, la présence d' $H_2O_2$  lève la répression par PerR (Bsat *et al.*, 1998). Le fait d'observer une répression du gène *fatD* suggère que d'autres mécanismes doivent intervenir chez *S. thermophilus*. Parmi les autres gènes présentant cette boîte, notons la présence de *oxlT* codant pour l'antiport formate/oxalate et *argG* (codant pour l'arginosuccinate synthétase, en opéron avec *argH*) et bien qu'il n'y ai à priori pas de lien direct avec le métabolisme de fer ou la tolérance au stress oxydant, ces gènes sont effectivement réprimé ou sur-exprimé respectivement dans nos conditions. Néanmoins, des gènes identifiés et probablement impliqués dans cette réponse à l' $H_2O_2$ ,

comme l'opéron *feoABC*, *mntH* et l'opéron *stu1020-stu1024* qui inclut la protéine membranaire à grande affinité pour le fer (*stu1023*), ne possèdent pas cette séquence consensus. D'autre part, nous ne pouvons pas exclure que d'autres systèmes de régulation puissent être impliqués dans la réponse à l' $H_2O_2$  comme les systèmes à deux composants.

		Position relative/ Codon start
<i>dpr</i>	TTATAAATATTTTAA	-59
<i>stu0164</i>	TTATAATGATTATAA	-96
<i>fatD</i>	TTAGAATGATTCTTA	-136
<i>oxlT</i>	TTAAAAACATTTTAA	-224
<i>argG</i>	TTAAAAACATTTTTA	-198
<i>eps11</i>	TTAAAAATATTTTTA	-54
<i>stu0155</i>	TTATAAAAATTGTTA	-168
<i>stu0326</i>	TTAAAATAATTATAA	-248
<i>stu0552</i>	TTATAATGATTCTAA	-30
<i>stu0670</i>	TTAAAAAGATTGTAA	-94
<i>stu0870</i>	TTATAAAAATTATAA	-30
<b>PerR consensus</b>	<b>TTANAAWNATTNTWA</b>	

**Figure 33.** Séquences consensus de type PerR-box des régions promotrices de gènes de *S. thermophilus* LMG18311 (N= A/T/G/C ; W= A/T). Gènes : *dpr* protéine de résistance au peroxyde ; *stu0164* : ABC transporteur, protéine de liaison ; *fatD* : ABC transporteur de fer (protéine membranaire) ; *oxlT* : antiport formate/oxalate ; *argG* : arginosuccinate synthétase ; *eps11* : protéine de biosynthèse d'exopolysaccharides ; *stu0155*, *stu0552*, et *stu0670* : protéines hypothétiques, *stu0326* et *stu0870*: transposases.

Des régulateurs transcriptionnels dont les cibles sont souvent inconnues : les systèmes à deux composants

Les systèmes à deux composants perçoivent les signaux extérieurs et interviennent dans l'activation ou la répression de la transcription de gènes nécessaires à l'adaptation des changements de conditions environnementales.

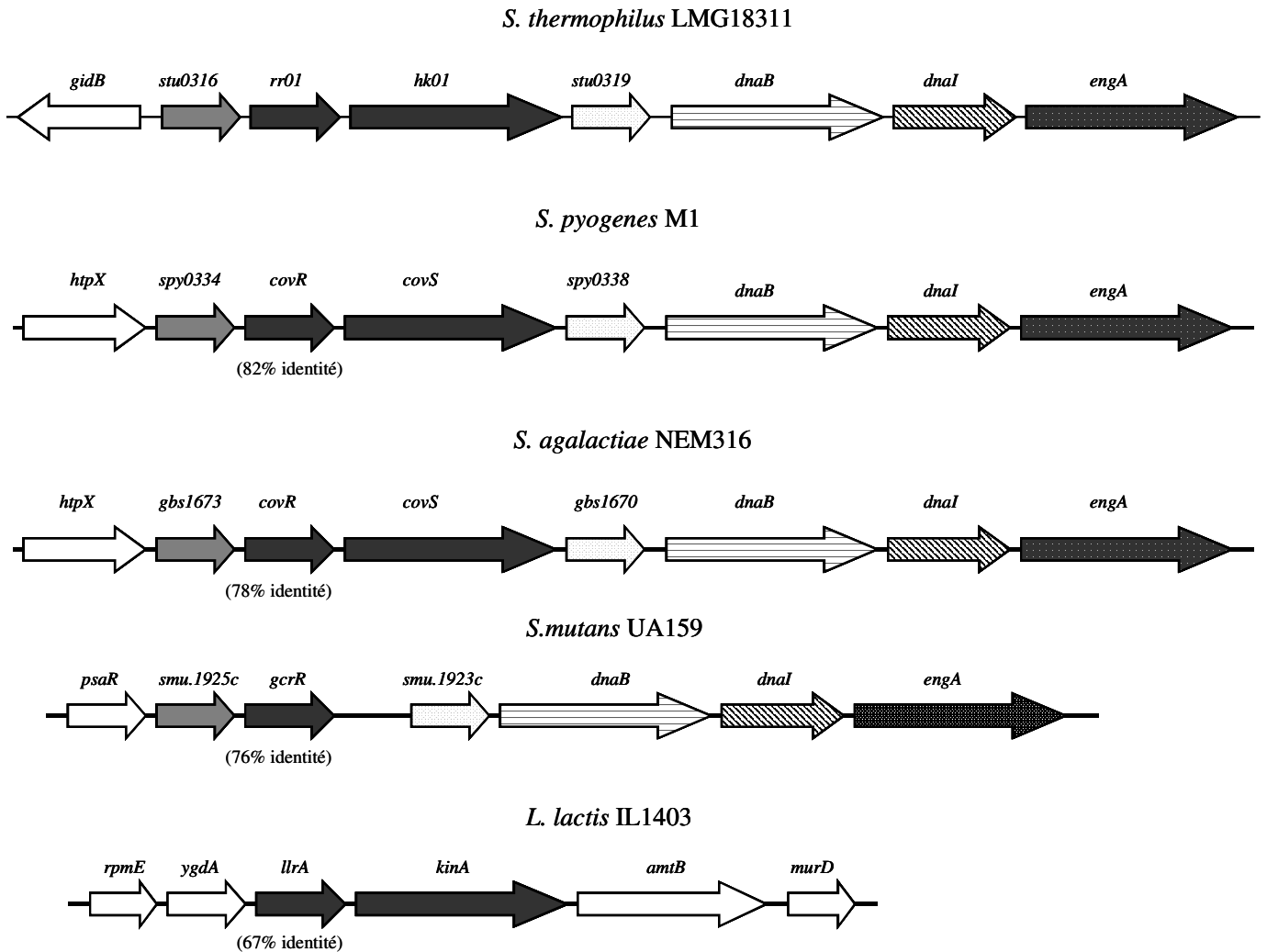
Par analyse protéomique, nous avons observé une variation en co-culture du « régulateur de réponse » RR01, faisant partie du système à deux composants TCS01 de *S. thermophilus*. Les régulateurs de réponse ne sont pas toujours faciles à visualiser dans les gels 2DE car ce sont des protéines peu abondantes et ayant des CAI bas. Parmi les régulateurs de réponse de *S. thermophilus*, RR01 et RR05 possèdent les CAI les plus élevés (0.604 et 0.531) et sont les seuls à avoir été identifiés dans nos analyses protéomiques. Nous avons déterminé par RT-qPCR la variation de l'expression de *rr01*, et nous avons observé une diminution du transcrit entre les deux phases de croissance étudiées (5h30 par rapport à 2h30).

Le système à deux composants TCS01 a été décrit chez d'autres streptocoques, notamment chez *S. pyogenes*, *S. agalactiae* et chez *S. mutans*, mais pas chez *S. thermophilus*.

**Homologie.** *In silico*, nous observons que les deux gènes codant pour le « response regulator » (*rr01*) et l'histidine kinase (*hk01*) font partie d'un opéron de 7 gènes très similaires à ceux de *S. pyogenes*, *S. agalactiae* et *S. mutans* (figure 34). Nous avons trouvé un seul terminateur potentiel (<http://www.softberry.ru/berry.phtml>) en aval du dernier gène de l'opéron, suggérant que chez *S. thermophilus* la structure opéronique est la même que celle des autres streptocoques. La protéine RR01 est hautement homologue à la protéine CovR de *S. pyogenes* (82% d'identité), *S. agalactiae* (78% d'identité) et *S. mutans* (76% d'identité). Chez *L. lactis*, le gène codant pour le « response regulator » *llrA* est homologue à 67%, ce qui indique que la protéine CovR de *S. thermophilus* est plus proche de celles des autres streptocoques que de celle de *L. lactis*.

**Régulon.** Selon les espèces, le système CovRS est un répresseur ou un activateur. Chez *S. pyogenes*, le système CovRS régule négativement des gènes impliqués dans la virulence, la réponse au stress (*dnak*, *dnaJ*, *grpE*, *groEL* et *clp*), ainsi que d'autres régulateurs transcriptionnels. Mais active également des gènes impliqués dans le métabolisme carboné, les acides nucléiques, le transport et la synthèse de protéines et peptides (Graham *et al.*, 2002). Chez *S. agalactiae*, contrairement à CovRS de *S. pyogenes* où il a été décrit essentiellement comme un répresseur, ce système peut fonctionner comme un activateur (63 gènes) ou un répresseur (76 gènes). De plus, certains facteurs de virulence décrits chez *S.*

*agalactiae* sont activés par CovR, contrairement à ce qui se passe chez *S. pyogenes* où ils sont réprimés.



**Figure 34.** Organisation des opérons *covRS* de *S. thermophilus* LMG18311, *S. pyogenes* M1, *S. agalactiae* NEM316, *S. mutans* UA159 et *L. lactis* IL1403 (d'après Lamy *et al.*, 2004). *gidB* : protéine de division glucose-inhibited, *rr01* : régulateur de réponse homologue à *covR*, *hk01* : histidine kinase homologue à *covS*, *dnaB* : protéine membranaire chromosomique impliquée dans réplication/initiation, *dnaI* : protéine de réplication d'ADN, *engA* : protéine de liaison de GTP, *htpX* : protéine de choc thermique, *psaR* : régulateur transcriptionnel putatif, *gcrR* : régulateur de réponse homologue à *covR*, *rpmE* : protéine ribosomale 50S, *ygdA* : protéine hypothétique, *llrA* : régulateur de réponse homologue à *covR*, *kinA* : histidine kinase homologue à *covS*, *amtB* : transporteur d'ammonium, *murD* : UDP-N-acetylmuramoylalanine D-glutamate ligase.

**Signal.** Chez *S. pyogenes* il a été suggéré que l’histidine kinase, CovS, capte le signal du changement de structure et de fluidité de la membrane lié à des conditions de stress (diminution du pH, augmentation de la température et de l’osmolarité). CovS inactive CovR; à son tour CovR dérègle les gènes qu’il régule (Dalton *et al.*, 2004). L’histidine kinase CovS possède une activité phosphatase capable de catalyser la libération du groupe phosphate de CovR sous certaines conditions, ayant pour conséquence son inactivation (Churchward, 2007). Une autre étude a démontré que ce système répondait au  $Mg^{+2}$  environnemental. La liaison du  $Mg^{+2}$  à CovS augmente la répression des gènes de virulence contrôlés par CovR, probablement par une augmentation de la phosphorylation de CovR (Gryllos *et al.*, 2003). Par approche transcriptomique, ces mêmes auteurs ont démontré qu’il y existe des gènes qui sont réprimés en présence de  $Mg^{+2}$  et d’autres indépendamment de sa présence, indiquant que d’autres signaux environnementaux peuvent intervenir (Gryllos *et al.*, 2007).

Des études chez *S. agalactiae* montrent que ce système est induit en réponse à 10 mM de  $H_2O_2$  pendant 1h (Poyart, 2006).

**Boîte de consensus.** La boîte de consensus est variable d’une espèce à l’autre. Chez *S. pyogenes*, un consensus « CovR-box » a été proposé : DDHHATTARAR (Federle *et al.*, 2002), bien que peu de gènes chez cette bactérie possèdent cette boîte (Graham *et al.*, 2002). Chez *S. agalactiae*, le consensus CovR proposé est RTATTTAAT (Lamy *et al.*, 2004), motif très différent de celui proposé pour *S. pyogenes*.

Par analyse *in silico* (programme i-Momi), avec la « CovR-box » de *S. pyogenes* nous avons identifié 83 gènes pour lesquels une boîte CovR potentielle est présente chez *S. thermophilus*. Ce grand nombre de gènes (4,4 % du génome) n’est pas surprenant, puisqu’il a été démontré que ce système régule 15% du génome de *S. pyogenes* (Graham *et al.*, 2002) et 7% de celui de *S. agalactiae* (Lamy *et al.*, 2004). De ces 83 gènes, 34% représentent des protéines hypothétiques pour lesquelles nous ne connaissons pas la fonction. D’autres gènes ayant une « CovR-box » sont impliqués dans la réponse au stress, la glycolyse, le métabolisme azoté et 4 régulateurs transcriptionnels (*fruR*, *stu917*, *stu1044* et *stu1435*).

Nous observons, tout d’abord, que dans la région promotrice du premier gène (*stu0316*) de l’opéron contenant *rr01/hk01* une boîte CovR est présente (figure 35). Cela suggère que ce système est auto-régulé comme cela est le cas chez *S. pyogenes* chez qui la transcription de l’opéron *covRS* est elle-même réprimée par CovR (Federle *et al.*, 1999). Ainsi quand CovR est active, peu de protéine CovR est synthétisée. Au contraire quand elle est inactive, une synthèse de protéine CovR est observée car une quantité basale de la protéine CovR est toujours disponible dans le but de répondre rapidement à un signal environnemental

(Federle *et al.*, 1999). Par analyse protéomique nous avons observé une augmentation de la protéine RR01 au cours de la croissance en lait de *S. thermophilus* en co-culture. Par RT-qPCR, nous avons observé que la transcription du gène (*rr01*) diminue au cours de cette deuxième phase de croissance. Par homologie avec *S. pyogenes*, nous proposons qu'en co-culture *covRS* est inactive (diminution du transcrit) et alors la présence de la protéine CovR est observée.

		Position relative/ Codon start
<i>stu0316</i> (opéron de <i>rr01</i> )	TAAT <u>ATTA</u> AAG	-151
<i>atpE</i> (opéron <i>atpEBFHAGDC</i> )	AATA <u>ATTA</u> AAA	-24
<i>relA</i> ( <i>relA-dtd</i> )	GTTA <u>ATTA</u> AAA	-29
<i>clpL</i>	AATT <u>ATTAG</u> AA	-127
<i>luxS</i>	AGAT <u>ATTA</u> AAA	-121
<i>amiA3</i>	TGTA <u>ATTA</u> AAA	-174
<b>CovR consensus (<i>S. pyogenes</i>)</b>	<b>DDHH<u>ATTAR</u>AR</b>	

**Figure 35. Séquences consensus de type CovR-box des régions promotrices de gènes de *S. thermophilus* LMG18311 (D= A/T/G ; H= A/T/C ; R=A/G). Gènes : *stu0316* : protéine hypothétique, *atpE* : ATP-ase proton translocation, *relA* : (p)ppGpp synthétase, *clpL* : protéinase ATP-dépendante, *luxS* : S-ribosylhomocysteinase, *amiA3* : ABC transporteur d'oligopeptides, protéine de liaison de substrat.**

Par la suite, nous nous sommes focalisé sur les gènes qui ont été décrits chez *S. thermophilus* ou d'autres LAB comme faisant partie des gènes de réponse au stress et ayant une boîte CovR potentielle (figure 35). Nous citons l'opéron *atp* (*atpEBFHAGDC*, système H<sup>+</sup>-ATPase), le gène *relA* (codant pour une pppGpp synthétase), et le gène *clpL* (codant pour une protéinase ATP dépendante). L'étude protéomique réalisée par Arena *et al* (2005) sur l'adaptation aux différents stress par la souche de *S. thermophilus* ATCC19258 montre que le

système H<sup>+</sup>-ATPase est induit en réponse au stress acide. Cela suggère que *S. thermophilus* expulse des ions H<sup>+</sup> en conditions acides dans le but de maintenir son pH intracellulaire. Ces auteurs ont réalisé une recherche *in silico* des boîtes CovR potentielles dans les régions promotrices des protéines qui étaient plus abondantes en conditions de stress acide. Ils ont trouvé des séquences consensus en amont des gènes *divIVA*, *gpm*, *atpE*, *ldh*, *tufA* et *fus* (Arena *et al.*, 2005). Néanmoins, à part l'opéron *atp*, nous n'avons pas trouvé de boîtes CovR pour les autres gènes chez la souche LMG18311. De l'opéron *atpEBFHAGDC*, les gènes *atpEGDC* n'étaient pas présents dans nos puces à ADN. Par contre les gènes *atpBFHA* étaient présents et présentaient une réduction d'expression entre 5h30 et 2h30 de 0.53, 0.39, 0.51 et 0.9 (p-value < 0.05). Ce résultat peut paraître étonnant car l'acidification est plus importante en co-culture. Nous pouvons penser que i) *S. thermophilus* LMG18311 possède un autre système pour maintenir son pH intracellulaire (cette espèce ne possède pas le système de l'arginine désiminase décrit pour d'autres LAB) et que ii) soit RR01 est un activateur de cet opéron, iii) soit ce système n'est pas impliqué dans la réponse au stress acide dans nos conditions.

RelA est l'enzyme qui produit le (p)ppGpp à partir de GTP. Chez *L. lactis*, il a été démontré que l'augmentation de la concentration en (p)ppGpp était liée à une réponse de cette bactérie aux carences nutritionnelles, à une réponse au stress acide ou au passage de phase exponentielle à la phase stationnaire (Rallu *et al.*, 1996, Rallu *et al.*, 2000). ClpL, la protéinase ATP dépendante (subunité de liaison), est nécessaire à la dégradation des protéines endommagées en conséquence de divers stress. Chez *S. thermophilus*, cette protéine est induite en conditions de stress thermique, froid, oxydant et en carence de lactose (Arena *et al.*, 2005). D'autres gènes possédant le consensus CovR dans sa région promotrice sont les gènes *luxS* (qui code pour la S-ribosylhomocystéinase) et le gène *amiA3* (ABC transporteur d'oligopeptides, protéine de liaison). Ces gènes sont intéressants car ils pourraient être associés à des phénomènes de quorum-sensing dans la mesure où l'autoinducteur 2 produit par LuxS et les oligopeptides sont des signaux impliqués dans le quorum-sensing.

Finalement, ce système à deux composants TCS01, pourrait intervenir dans la réponse au stress oxydant chez *S. thermophilus*. Néanmoins nous n'avons pas trouvé de boîtes CovR dans les régions promotrices des gènes que nous avons identifiés comme potentiellement induits dans cette réponse (*dpr*, *fur*, *feoA*, *fatD*, *stu0164*) comme c'est le cas chez *S. pyogenes* (Graham *et al.*, 2002). Notre hypothèse est que ce système à deux composants pourrait être impliqué dans un réseau de régulation faisant intervenir aussi d'autres régulateurs comme PerR.

## 2.5. Perspectives

Ce travail a apporté une contribution conséquente sur les connaissances de l'écosystème yaourt. De plus, il ouvre de nouvelles voies d'étude qui nous permettront de mieux comprendre l'adaptation des bactéries impliquées à leur milieu et à leur association.

### Confirmation de nouvelles interactions.

Pour confirmer notre hypothèse sur l'apport des purines par *L. bulgaricus*, des expériences complémentaires sont nécessaires. Le dosage des purines en monoculture et en co-culture pourrait nous donner des indices à ce sujet. De plus, la délétion du gène xanthine perméase chez *S. thermophilus* permettrait de savoir si ce transporteur est actif et s'il est impliqué dans le transport de nucléobases. Inversement, la délétion du gène homologue chez *L. bulgaricus* pourrait nous indiquer si la stimulation de *S. thermophilus* est encore effective en co-culture avec le mutant.

Pour confirmer que les variations obtenues sur le métabolisme du fer sont liées à la présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provenant de *L. bulgaricus*, nous proposons le dosage du fer intracellulaire en monoculture et en co-culture qui pourrait nous permettre de déterminer si les changements observés au niveau transcriptionnel sur le transport et la chélation du fer ont un effet direct sur la quantité de fer intracellulaire et nous donner des indices sur cette réponse à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De plus, la délétion du gène *perR* chez *S. thermophilus* avec, d'une part, la caractérisation de ce mutant en présence/absence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'analyse transcriptomique (avec des puces à ADN) du mutant versus la souche sauvage et finalement la purification de la protéine PerR, nous permettra de déterminer si PerR est impliquée chez *S. thermophilus* dans la réponse au stress oxydant et donc quels sont les gènes potentiels constituant son régulon.

Finalement, l'étude du système à deux composants TCS01 avec la mutation du gène *rr01* ou *hk01* ou un double mutant serait d'une grande importance pour déterminer quels sont les gènes régulés par ce système chez *S. thermophilus*. De plus, la purification de la protéine RR01, pourrait nous donner des indices sur sa liaison dans les régions promotrices de certains gènes. L'étude des signaux potentiellement perçus par l'histidine kinase est aussi d'un grand intérêt pour mieux comprendre l'adaptation de cette bactérie aux différents stress. Nous suggérons pour commencer, l'étude de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme signal. Ainsi, la détermination de l'induction ou de la répression de *rr01* en présence de différentes concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> serait un premier pas dans l'étude de l'implication de ce système dans la réponse au stress oxydant.



*L. bulgaricus.*

L'étude de *L. bulgaricus* (l'autre partenaire de l'association), et pour lequel nous n'avons pas de données, permettrait d'une part de valider les résultats obtenus dans ce travail et d'autre part, de mieux connaître l'adaptation de cette bactérie dans le lait. D'après l'analyse *in silico*, la souche ATCC11842 possède tous les gènes nécessaires à la biosynthèse des purines. Par contre, la deuxième souche dont le génome est séquencé, la souche BCAA 365, ne possède pas le gène codant pour l'adenylosuccinate synthétase (*purA*), ce qui suggère que cette bactérie ne peut pas synthétiser l'adénine. Il serait intéressant de déterminer chez les souches de *L. bulgaricus* utilisées en industrie si elles possèdent cette voie complète. De plus, une étude plus approfondie sur la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les souches de *L. bulgaricus* permettrait de déterminer quel est l'impact sur la croissance de *S. thermophilus* et quelles souches de *L. bulgaricus* ne l'affectent pas.

Apport technologique.

Chez *S. thermophilus*, les séquences divergent très faiblement (en moyenne 0,19%), suggérant que cette espèce représente une population qui a émergé récemment (Delorme, 2007). Néanmoins, nous avons observé des différences au niveau technologique des trois souches dont les génomes sont séquencés. Il serait intéressant de déterminer si les résultats obtenus pour ce couple sont généralisables à d'autres couples de souches. L'étude de la réponse au stress oxydant chez *S. thermophilus* ainsi que l'étude des systèmes à deux composants nous permettra d'avoir plus des connaissances sur l'adaptation de cette bactérie et de pouvoir mieux rationaliser le choix des souches et couples pour une utilisation industrielle.

## 2.6. Conclusion

Ce travail nous a permis de révéler des nouvelles interactions entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* et d'autres techniques doivent être utilisées, notamment la métabolome, qui pourrait compléter nos données.

L'étude de cette association nous montre d'autre part que les interactions bactériennes sont très complexes, car différents phénomènes ont lieu (interactions positives et négatives, phénomènes de régulation). L'étude d'une co-culture est un premier pas pour la compréhension de systèmes plus complexes ou l'intervention de plusieurs bactéries ont lieu. Aujourd'hui avec la disponibilité de plusieurs génomes bactériens de diverses communautés

microbiennes, il est possible d'appliquer des techniques post-génomiques à des écosystèmes et des études meta-génomiques commencent à émerger. De plus, le développement des programmes informatiques capables de traiter une très grande quantité de données permettra d'aller plus loin dans l'étude de ces écosystèmes.



Accolas, J. P., Veaux, M. and Auclair, J. 1971. Etude des interactions entre diverses bactéries lactiques thermophiles et mésophiles, en relation avec la fabrication des fromages à pâte cuite. *Lait*. **51** 249-272.

Adachi, J. and Hasegawa, M. 1992. MOLPHY: programs for molecular phylogenetics. *Computer Science Monographs 27. Institute of Statistical Mathematics, Tokyo, Japan*.

Ahmer, B. M. 2004. Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*. **52** (4), 933-945.

Altermann, E., Russell, W. M., Azcarate-Peril, M. A., Barrangou, R., Buck, B. L., McAuliffe, O., Souther, N., Dobson, A., Duong, T., Callanan, M., Lick, S., Hamrick, A., Cano, R. and Klaenhammer, T. R. 2005. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102** (11), 3906-3912.

Amoroso, M. J., Manca de Nadra, M. C. and Oliver, G. 1998. Glucose, galactose, fructose, lactose and sucrose utilization by *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* isolated from commercial yoghurt. *Milchwissenschaft*. **43** (10), 626-631.

Amoroso, M. J., Manca de Nadra, M. C., Oliver, G. 1988. Glucose, galactose, fructose, lactose and sucrose utilization by *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* isolated from commercial yoghurt. *Milchwiss.* **43** 626-631.

An, D., Danhorn, T., Fuqua, C. and Parsek, M. R. 2006. Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103** (10), 3828-3833.

Antelmann, H., Engelmann, S., Schmid, R., Sorokin, A., *et al.* 1997. Expression of a stress- and starvation-induced *dps/pexB*-homologous gene is controlled by the alternative sigma factor sigma B in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. **179** 7251-7256.

Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M. M. and Iyer, L. M. 2005. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev*. **29** (2), 231-262.

Archibald, F. S., Fridovich, I. 1981. Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *J Bacteriol*. **146** 928-936.

Arena, S., D'Ambrosio, C., Renzone, G., Rullo, R., Ledda, L., Vitale, F., Maglione, G., Varcamonti, M., Ferrara, L. and Scaloni, A. 2005. A study of *Streptococcus thermophilus* proteome by integrated analytical procedures and differential expression investigations. *Proteomics*. **6** (1), 181-192.

Arena, S., D'Ambrosio, C., Renzone, G., Rullo, R., Ledda, L., Vitale, F., Maglione, G., Varcamonti, M., Ferrara, L. and Scaloni, A. 2006. A study of *Streptococcus thermophilus* proteome by integrated analytical procedures and differential expression investigations. *Proteomics*. **6** (1), 181-192.

Arena, S., D'Ambrosio, C., Renzone, G., Rullo, R., *et al.* 2006. A study of *Streptococcus thermophilus* proteome by integrated analytical procedures and differential expression investigations. *Proteomics*. **6** 181-192.

- Arioli, S., Monnet, C., Guglielmetti, S., Parini, C., De Noni, I., Hogenboom, J., Halami, P. M. and Mora, D. 2007. Aspartate biosynthesis is essential for the growth of *Streptococcus thermophilus* in milk, and aspartate availability modulates the level of urease activity. *Appl Environ Microbiol.* **73** (18), 5789-5796.
- Arnvig, K., Hove-Jensen, B., Switzer, R. L. 1990. Purification and properties of phosphoribosyl-diphosphate synthetase from *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem.* **192** 195-200.
- Arutyunov, D. Y. and Muronetz, V. I. 2003. The activation of glycolysis performed by the non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the model system. *Biochem Biophys Res Commun.* **300** (1), 149-154.
- Asanuma, N. and Hino, T. 2000. Effects of pH and energy supply on activity and amount of pyruvate formate-lyase in *Streptococcus bovis*. *Appl Environ Microbiol.* **66** (9), 3773-3777.
- Ascon-Reyes, D. B. and Ascon-Cabrera, M. A. 1995. Indirect conductance for measurements of carbon dioxide produced by *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus* TJ 160 in pure and mixed cultures. *J. Dairy Sci.* **78** (1), 8-16.
- Atlan, D., Laloi, P. and Portalier, R. 1989. Isolation and Characterization of Aminopeptidase-Deficient *Lactobacillus bulgaricus* Mutants. *Appl Environ Microbiol.* **55** (7), 1717-1723.
- Atlan, D., Laloi, P. and Portalier, R. 1990. X-Prolyl-Dipeptidyl Aminopeptidase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: Characterization of the Enzyme and Isolation of Deficient Mutants. *Appl Environ Microbiol.* **56** (7), 2174-2179.
- Atlan, D., Gilbert, C., Blanc, B. and Portalier, R. 1994. Cloning, sequencing and characterization of the pepIP gene encoding a proline iminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397. *Microbiology.* **140** ( Pt 3) 527-535.
- Auffray, Y., Lecesne, E., Hartke, A. and Boutibonnes, P. 1995. Basic features of the *Streptococcus thermophilus* heat shock response. *Curr Microbiol.* **30** 87-91.
- Ayad, E. H., Verheul, A., Engels, W. J., Wouters, J. T. and Smit, G. 2001. Enhanced flavour formation by combination of selected lactococci from industrial and artisanal origin with focus on completion of a metabolic pathway. *J Appl Microbiol.* **90** (1), 59-67.
- Ayad, E. H. E., Verheul, A., Engels, W. J. M., Wouters, J. T. M. and Smit, G. 2001. Enhanced flavour formation by combination of selected lactococci from industrial and artisanal origin with focus on completion of a metabolic pathway. *Journal of Applied Microbiology.* **90** 59-67.
- Azcarate-Peril, M. A., McAuliffe, O., Altermann, E., Lick, S., Russell, W. M. and Klaenhammer, T. R. 2005. Microarray analysis of a two-component regulatory system involved in acid resistance and proteolytic activity in *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol.* **71** (10), 5794-5804.
- Bassler, B. L. and Losick, R. 2006. Bacterially speaking. *Cell.* **125** (2), 237-246.

- Bautista, E. S., Dahiya, R. S. and Speck, M. L. 1966. Identification of compounds causing symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk. *Journal of Dairy Research*. **33** 299.
- Bautista, E. S., R. S. Dahiya, M. L. Speck. 1966. Identification of compounds causing symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk. *J Dairy Res*. **33** 299-307.
- Béal, C. and Corrieu, G. 1991. Influence of pH, temperature, and inoculum composition of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Biotechnology and Bioengineering*. **38** 90- 98.
- Béal, C., Spinnler, H. E. and Corrieu, G. 1994. Comparison of growth, acidification and productivity of pure and mixed cultures of *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* 404 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 398. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41** 95-98.
- Beal, C., Corrieu, G. 1991. Influence of pH, temperature, and inoculum composition on mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus* 398. *Biotechnol Bioeng.* **38** 90-98.
- Benateya, A., Bracquart, P. and Linden, G. 1987. Perméation des glucides chez *Streptococcus thermophilus*. Caractérisation des systèmes de prise du lactose: adaptation au lactose et au glucose. *Microbiol. Aliments Nutr.* **4** 253-264.
- Bentley, R. W., Leigh, J. A. and Collins, M. D. 1991. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol.* **41** (4), 487-494.
- Beyer, N. H., Roepstorff, P., Hammer, K. and Kilstrup, M. 2003. Proteome analysis of the purine stimulon from *Lactococcus lactis*. *Proteomics.* **3** (5), 786-797.
- Bibel, D. J. 1988. Elie Metchnikoff's bacillus of long life. *ASM News.* **54** 661-665.
- Bisicchia, P., Noone, D., Lioliou, E., Howell, A., Quigley, S., Jensen, T., and Jarmer, H., and Devine, K. M. 2007. The essential YycFG two-component system controls cell wall metabolism in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* **65** (1), 180–200.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. and Sorokin, A. 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* **11** (5), 731-753.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., Ehrlich, S. D., Kulakauskas, S., Lapidus, A., Goltsman, E., Mazur, M., Pusch, G. D., Fonstein, M., Overbeek, R., Kyprides, N., Purnelle, B., Prozzi, D., Ngui, K., Masuy, D., Hancy, F., Burteau, S., Boutry, M., Delcour, J., Goffeau, A. and Hols, P. 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat Biotechnol.* **22** (12), 1554-1558.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., *et al.* 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat Biotechnol.* **22** 1554-1558.

- Bottazzi, V., Battistotti, B. and Montescani, G. 1973. Influence des souches seules et associées de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* ainsi que des traitements du lait sur la production d'aldéhyde acétique dans le yaourt. *Le lait*. **Mai- Juin** 525- 526.
- Bottazzi, V., Battistotti, B., Montescani, G. 1973. Influence des souches seules et associées de *L. bulgaricus* et *Str. thermophilus* ainsi que des traitements du lait sur la production d'aldéhyde acétique dans la yaourt. *Lait*. **525-526** 295-308.
- Bouzar, F., Cerning, J., and Desmazeaud, M. 1997. Exopolysaccharide Production and Texture-Promoting Abilities of Mixed-Strain Starter Cultures in Yogurt Production. *J. Dairy Sci.* **80** (10), 2310-2317.
- Boyd, D. A., Cvitkovitch, D. G. and Hamilton, I. R. 1995. Sequence, expression, and function of the gene for the nonphosphorylating, NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* **177** (10), 2622-2627.
- Bracquart, P. and Lorient, D. 1978. Effet des acides aminés sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*. II. Etude sur cinq souches. *Milchwissenschaft.* **33** 341-344.
- Bracquart, P. and Lorient, D. 1979. Effet des acides aminés sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*. III. Peptides comportant Glu, His et Met. *Milchwissenschaft.* **34** 676-679.
- Bracquart, P., Lorient, D. 1977. Effet des acides aminés sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*. *Milchwiss.* **32** 221-224.
- Brenot, A., King, K. Y. and Caparon, M. G. 2005. The PerR regulon in peroxide resistance and virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol.* **55** (1), 221-234.
- Broadbent, J. R., McMahon, D. J., Welker, D. L., Oberg, C. J. and Moineau, S. 2003. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review. *J Dairy Sci.* **86** (2), 407-423.
- Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P. and Helmann, J. D. 1998. *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol Microbiol.* **29** (1), 189-198.
- Caldwell, R. B. and Lattemann, C. T. 2004. Simple and reliable method to precipitate proteins from bacterial culture supernatant. *Appl Environ Microbiol.* **70** (1), 610-612.
- Carmel-Harel, O. and Storz, G. 2000. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu Rev Microbiol.* **54** 439-461.
- Chang, S. K. and Hassan, H. M. 1997. Characterization of superoxide dismutase in *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol.* **63** (9), 3732-3735.
- Chapot-Chartier, M. P., Rul, F., Nardi, M. and Gripon, J. C. 1994. Gene cloning and characterization of PepC, a cysteine aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus*, with sequence similarity to the eucaryotic bleomycin hydrolase. *Eur J Biochem.* **224** (2), 497-506.

- Chausson, F. and Maurisson, E. 2002. L'économie Laitière en Chiffres. Centre Natinal Inter-Professionnel de L'Economie Laitière, Paris, France.
- Chavagnat, F., Meyer, J. and Casey, M. G. 2000. Purification, characterisation, cloning and sequencing of the gene encoding oligopeptidase PepO from *Streptococcus thermophilus* A. *FEMS Microbiol Lett.* **191** (1), 79-85.
- Chervaux, C., Ehrlich, S. D. and Maguin, E. 2000. Physiological study of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains in a novel chemically defined medium. *Appl Environ Microbiol.* **66** (12), 5306-5311.
- Chich, J. F., David, O., Villers, F., Schaeffer, B., Lutomski, D. and Huet, S. 2006. Statistics for proteomics: Experimental design and 2-DE differential analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*
- Chopin, A. 1993. Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* **12** (1-3), 21-37.
- Christiansen, L. C., Schou, S., Nygaard, P. and Saxild, H. H. 1997. Xanthine metabolism in *Bacillus subtilis*: characterization of the xpt-pbuX operon and evidence for purine- and nitrogen-controlled expression of genes involved in xanthine salvage and catabolism. *J Bacteriol.* **179** (8), 2540-2550.
- Churchward, G. 2007. The two faces of Janus: virulence gene regulation by CovR/S in group A streptococci. *Mol Microbiol.* **64** (1), 34-41.
- Cocaign-Bousquet, M., Garrigues, C., Loubiere, P. and Lindley, N. D. 1996. Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **70** (2-4), 253-267.
- Collins, M. D., Samelis, J., Metaxopoulos, J. and Wallbanks, S. 1993. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J Appl Bacteriol.* **75** (6), 595-603.
- Collins, M. D., Rodrigues, U. M., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J. A. E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B. A., Williams, A. M. and Wallbanks, S. 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of the 16S rRNA. *FEMS Microbiol Lett.* **77** 5-12.
- Courtin, P. and Rul, F. 2004. Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Lait.* **84** 125-134.
- Courtin, P., Monnet, V. and Rul, F. 2002. Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus* / *Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology.* **148** 3413-3421.
- Courtin, P., Monnet, V., Rul, F. 2002. Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus*/*Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiol.* **148** 3413-3421.



- Courtin, P., Rul, F. 2004. Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Lait*. **84** 125-134.
- Crow, V. L. and Pritchard, G. G. 1982. Pyruvate kinase from *Streptococcus lactis*. *Methods Enzymol.* **90** 165-170.
- Cunningham, M. W. 2000. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev.* **13** (3), 470-511.
- Cvitkovitch, D. G., Li, Y. H. and Ellen, R. P. 2003. Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *J Clin Invest.* **112** (11), 1626-1632.
- Dalton, T. L. and Scott, J. R. 2004. CovS inactivates CovR and is required for growth under conditions of general stress in *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol.* **186** (12), 3928-3937.
- Dalton, T. L., Hobb, R. I. and Scott, J. R. 2006. Analysis of the role of CovR and CovS in the dissemination of *Streptococcus pyogenes* in invasive skin disease. *Microb Pathog.* **40** (5), 221-227.
- Dalton, T. L., Hobb, R.I., Scott, J. R. 2006. Analysis of the role of CovR and CovS in the dissemination of *Streptococcus pyogenes* in invasive skin disease. *Microb Pathog.* **40** 221-227.
- de Giori, G. S., Foucaud-Scheunemann, C., Ferchichi, M. and Hemme, D. 2002. Glutamate uptake in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 208 and its enhancement by a combination of Mn<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. *Lett Appl Microbiol.* **35** (5), 428-432.
- de Vin, F., Radstrom, P., Herman, L. and De Vuyst, L. 2005. Molecular and biochemical analysis of the galactose phenotype of dairy *Streptococcus thermophilus* strains reveals four different fermentation profiles. *Appl Environ Microbiol.* **71** (7), 3659-3667.
- de Vos, W. M. 1996. Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **70** (2-4), 223-242.
- de Vos, W. M., Boerrigter, I., van Rooyen, R. J., Reiche, B. and Hengstenberg, W. 1990. Characterization of the lactose-specific enzymes of the phosphotransferase system in *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem.* **265** (36), 22554-22560.
- del Campo, R., Bravo, D., Canton, R., Ruiz-Garbajosa, P., Garcia-Albiach, R., Montesi-Libois, A., Yuste, F. J., Abaira, V. and Baquero, F. 2005. Scarce evidence of yogurt lactic acid bacteria in human feces after daily yogurt consumption by healthy volunteers. *Appl Environ Microbiol.* **71** (1), 547-549.
- Delaney, S., Neeley, W. L., Delaney, J. C., Essigmann, J. M. 2007. The substrate specificity of MutY for hyperoxidized guanine lesions *in vivo*. *Biochemistry.* **46** 1448-1455.
- Delorme, C. 2007. Contribution to the safety assessment of technological microflora found in fermented dairy products Part XX *Streptococcus thermophilus*. *Int J Food Microbiol.*
- Delorme, C., Poyart, C., Ehrlich, S. D. and Renault, P. 2007. Extent of horizontal gene transfer in evolution of Streptococci of the salivarius group. *J Bacteriol.* **189** (4), 1330-1341.

- den Hengst, C. D., van Hijum, S. A., Geurts, J. M., Nauta, A., Kok, J. and Kuipers, O. P. 2005. The *Lactococcus lactis* CodY regulon: identification of a conserved cis-regulatory element. *J Biol Chem.* **280** (40), 34332-34342.
- Deng, D. M., Liu, M. J., ten Cate, J. M., Crielaard, W. 2007. The VicRK system of *Streptococcus mutans* responds to oxidative stress. *J Dent Res.* **86** 606-610.
- Derzelle, S., Bolotin, A., Mistou, M. Y. and Rul, F. 2005. Proteome analysis of *Streptococcus thermophilus* grown in milk reveals pyruvate formate-lyase as the major upregulated protein. *Appl Environ Microbiol.* **71** (12), 8597-8605.
- Derzelle, S., Bolotin, A., Mistou, M.-Y., Rul, F. 2005. Proteome analysis of *Streptococcus thermophilus* grown in milk reveals pyruvate formate-lyase as the major upregulated protein. *Appl Environ Microbiol.* **71** 8597-8605.
- Desmazeaud, M. J. 1990. Le lait milieu de culture. *Microbiologie-Aliments-Nutrition.* **8** 313-325.
- Desmazeaud, M. J. and Roissart, H. 1994. Métabolisme général des bactéries lactiques. *Bactéries lactiques, 1 ed. de Roissart, H. et Luquet F.M. Lorica.* 169-207.
- Deutscher, J., Kuster, E., Bergstedt, U., Charrier, V. and Hillen, W. 1995. Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* **15** (6), 1049-1053.
- Dong, Y. H., Wang, L. H., Xu, J. L., Zhang, H. B., Zhang, X. F. and Zhang, L. H. 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature.* **411** (6839), 813-817.
- Doyuk, E., Ormerod, O. J. and Bowler, I. C. 2002. Native valve endocarditis due to *Streptococcus vestibularis* and *Streptococcus oralis*. *J Infect.* **45** (1), 39-41.
- Driessen, F. M., Kingma, F. and Stadhouders, J. 1982. Evidence that *Lactobacillus bulgaricus* in yogurt is stimulated by carbon dioxide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth. Milk Dairy J.* **36** 135-144.
- Dubrac, S., Boneca, I. G., Poupel, O. and Msadek, T. 2007. New insights into the WalK/WalR (YycG/YycF) essential signal transduction pathway reveal a major role in controlling cell wall metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* **189** (22), 8257-8269.
- Ebbole, D. J. and Zalkin, H. 1989. Interaction of a putative repressor protein with an extended control region of the *Bacillus subtilis* pur operon. *J Biol Chem.* **264** (6), 3553-3561.
- Ebbole, D. J., Zalkin, H. 1989. Interaction of a putative repressor protein with an extended control region of the *Bacillus subtilis* pur operon. *J Biol Chem.* **264** 3553-3561.

- Echenique, J. R. and Trombe, M. C. 2001. Competence repression under oxygen limitation through the two-component MicAB signal-transducing system in *Streptococcus pneumoniae* and involvement of the PAS domain of MicB. *J Bacteriol.* **183** (15), 4599-4608.
- El-Abbassy, M. Z. and Sitohy, M. 1993. Metabolic interaction between *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in single and mixed starter yoghurts. *Die Nahrung.* **37** (1), 53-58.
- El-Abbassy, M. Z., Sitohy, M. 1993. Metabolic interaction between *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in single and mixed starter yoghurts. *Nahrung.* **37** 53-58.
- Elli, M., Zink, R., Rytz, A., Reniero, R. and Morelli, L. 2000. Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. *J Appl Microbiol.* **88** (4), 695-703.
- Elli, M., Callegari, M. L., Ferrari, S., Bessi, E., Cattivelli, D., Soldi, S., Morelli, L., Goupil Feuillerat, N. and Antoine, J. M. 2006. Survival of yogurt bacteria in the human gut. *Appl Environ Microbiol.* **72** (7), 5113-5117.
- El-Soda, M. A., Abou-Donia, S. A., El-Shafy, H. K., Mashaly, R. and Ismail, A. A. 1986. Metabolic activities and symbiosis in zabady isolated cultures. *Egyptian J. Dairy Sci.* **14** 1-10.
- Engels, W. J. and Visser, S. 1996. Development of cheese flavour from peptides and amino acids by cell-free extracts of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 in a model system. *Neth. Milk Dairy J.* **50** 3-17.
- Enright, M. C. and Spratt, B. G. 1999. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* **7** (12), 482-487.
- Facklam, R. 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev.* **15** (4), 613-630.
- Federle, M. J. and Scott, J. R. 2002. Identification of binding sites for the group A streptococcal global regulator CovR. *Mol Microbiol.* **43** (5), 1161-1172.
- Federle, M. J., McIver, K. S. and Scott, J. R. 1999. A response regulator that represses transcription of several virulence operons in the group A streptococcus. *J Bacteriol.* **181** (12), 3649-3657.
- Fernandez, A., Borges, F., Gintz, B., Decaris, B. and Leblond-Bourget, N. 2006. The rggC locus, with a frameshift mutation, is involved in oxidative stress response by *Streptococcus thermophilus*. *Arch Microbiol.* **186** (3), 161-169.
- Fernandez, A., Thibessard, A., Borges, F., Gintz, B., Decaris, B. and Leblond-Bourget, N. 2004. Characterization of oxidative stress-resistant mutants of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. *Arch Microbiol.* **182** (5), 364-372.

- Fernandez-Espla, M. D., Garault, P., Monnet, V. and Rul, F. 2000. *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microbiol.* **66** (11), 4772-4778.
- Fontaine, L., Boutry, C., Guedon, E., Guillot, A., Ibrahim, M., Grossiord, B. and Hols, P. 2007. Quorum-sensing regulation of the production of Blp bacteriocins in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol.* **189** (20), 7195-7205.
- Foucaud, C. and Poolman, B. 1992. Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. Functional reconstitution of the protein and characterization of the kinetic mechanism of transport. *J Biol Chem.* **267** (31), 22087-22094.
- Fox, P. F. 1993. Cheese: an overview. In cheese: chemistry, physics and microbiology. 1-36.
- Frederickson, A. G. 1977. Behaviour of mixed cultures of microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **31** 63\_87.
- Furet, J. P., Quenee, P. and Tailliez, P. 2004. Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **97** (2), 197-207.
- Galesloot, T. H. E. and Hassing, F. 1968. Symbiosis in yoghurt (I). Stimulation of *Lactobacillus bulgaricus* by a factor produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth. Milk Dairy J.* **22** 50-63.
- Gan, B. S., Kim, J., Reid, G., Cadieux, P. and Howard, J. C. 2002. *Lactobacillus fermentum* RC-14 inhibits *Staphylococcus aureus* infection of surgical implants in rats. *J Infect Dis.* **185** (9), 1369-1372.
- Garault, P., Letort, C., Juillard, V. and Monnet, V. 2000. Branched-chain amino acid biosynthesis is essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (12), 5128-5133.
- Garault, P., Le Bars, D., Besset, C. and Monnet, V. 2002. Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. *J Biol Chem.* **277** (1), 32-39.
- Garault, P., Letort, C., Juillard, V., Monnet, V. 2000. Branched-chain amino acid biosynthesis is essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. *Appl Environ Microbiol.* **66** 5128-5133.
- Garault, P., Letort, C., Juillard, V., Monnet, V. 2001. Branched-chain amino acids and purine biosynthesis: two pathways essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. *Lait.* **81** 83-90.
- Gilbert, C., Atlan, D., Blanc, B. and Portalier, R. 1994. Proline iminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397: purification and characterization. *Microbiology.* **140** ( Pt 3) 537-542.

- Gilbert, C., Atlan, D., Blanc, B., Portailer, R., Germond, J. E., Lapierre, L. and Mollet, B. 1996. A new cell surface proteinase: sequencing and analysis of the *prtB* gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J Bacteriol.* **178** (11), 3059-3065.
- Gitton, C., Meyrand, M., Wang, J., Caron, C., Trubuil, A., Guillot, A. and Mistou, M.-Y. 2005. Proteomic Signature of *Lactococcus lactis* NCDO763 Cultivated in Milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** 7152-7163.
- Godon, J. J., Chopin, M. C. and Ehrlich, S. D. 1992. Branched-chain amino acid biosynthesis genes in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J Bacteriol.* **174** (20), 6580-6589.
- Godon, J. J., Delorme, C., Bardowski, J., Chopin, M. C., Ehrlich, S. D. and Renault, P. 1993. Gene inactivation in *Lactococcus lactis*: branched-chain amino acid biosynthesis. *J Bacteriol.* **175** (14), 4383-4390.
- Gonzalez-Marquez, H., Perrin, C., Bracquart, P. and Guimont, C. 1997. A 16 kDa protein family overexpressed by *Streptococcus thermophilus* PB18 in acid environments. *Microbiol.* **143** 1587-1594.
- Gouesbet, G., Jan, G. and Boyaval, P. 2002. Two-dimensional electrophoresis study of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thermotolerance. *Appl Environ Microbiol.* **68** (3), 1055-1063.
- Graham, M. R., Smoot, L. M., Migliaccio, C. A., Virtaneva, K., Sturdevant, D. E., Porcella, S. F., Federle, M. J., Adams, G. J., Scott, J. R. and Musser, J. M. 2002. Virulence control in group A Streptococcus by a two-component gene regulatory system: global expression profiling and in vivo infection modeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99** (21), 13855-13860.
- Graham, M. R., Smoot, L. M., Migliaccio, C. A. L., Virtaneva, K., *et al.* 2002. Virulence control in group A *Streptococcus* by a two-component gene regulatory system: global expression profiling and *in vivo* infection modeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99** 13855-13860.
- Granier, F. 1988. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* **9** (11), 712-718.
- Grobben, G. J., Chin-Joe, I., Kitzen, V. A., Boels, I. C., Boer, F., Sikkema, J., Smith, M. R. and de Bont, J. A. 1998. Enhancement of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 with a Simplified Defined Medium. *Appl Environ Microbiol.* **64** (4), 1333-1337.
- Grunau, J. A. and Swiader, J. M. 1992. Chromatography of 99 amino acids and other ninhydrin-reactive compounds in the Pickering lithium gradient system. *J. Chromatogr.* **594** 165-171.
- Gryllos, I., Levin, J. C. and Wessels, M. R. 2003. The CsrR/CsrS two-component system of group A *Streptococcus* responds to environmental Mg<sup>2+</sup>. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100** (7), 4227-4232.

Gryllos, I., Grifantini, R., Colaprico, A., Jiang, S., Deforce, E., Hakansson, A., Telford, J. L., Grandi, G. and Wessels, M. R. 2007. Mg(2+) signalling defines the group A streptococcal CsrRS (CovRS) regulon. *Mol Microbiol.* **65** (3), 671-683.

Guarner, F., Perdigon, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B. and Morelli, L. 2005. Should yoghurt cultures be considered probiotic? *Br J Nutr.* **93** (6), 783-786.

Guedon, E., Serror, P., Ehrlich, S. D., Renault, P. and Delorme, C. 2001. Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol.* **40** (5), 1227-1239.

Guédon, E., Sperandio, B., Pons, N., Ehrlich, S. D. and Renault, P. 2005. Overall control of nitrogen metabolism in *Lactococcus lactis* by CodY, and possible models for CodY regulation in Firmicutes. *Microbiol.* **151** 3895-3909.

Guillot, A., Gitton, C., Anglade, P. and Mistou, M. Y. 2003. Proteomic analysis of *Lactococcus lactis*, a lactic acid bacterium. *Proteomics.* **3** (3), 337-354.

Guillot, A., Gitton, C., Anglade, P., Mistou, M.-Y. 2003. Proteomic analysis of *Lactococcus lactis*, a lactic acid bacterium. *Proteomics.* **3** 337-354.

Gunnewijk, M. G. and Poolman, B. 2000. Phosphorylation state of HPr determines the level of expression and the extent of phosphorylation of the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J Biol Chem.* **275** (44), 34073-34079.

Hagting, A., Kunji, E. R., Leenhouts, K. J., Poolman, B. and Konings, W. N. 1994. The di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. A new type of bacterial peptide transporter. *J Biol Chem.* **269** (15), 11391-11399.

Halliwell, B. 1990. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun.* **9** (1), 1-32.

Hamdan, I. Y., Kunsman, J. E., and Deane, D. D. 1971. Acetaldehyde production by combined yogurt cultures. *J Dairy Sci.* **54** (7), 1080-1082.

Helmann, J. D., Wu, M. F., Gaballa, A., Kobel, P. A., Morshedi, M. M., Fawcett, P. and Paddon, C. 2003. The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors. *J Bacteriol.* **185** (1), 243-253.

Helmann, J. D., Wu, M. F., Gaballa, A., Kobel, P. A., *et al.* 2003. The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors. *J Bacteriol.* **185** 243-253.

Herbig, A. F. and Helmann, J. D. 2001. Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol Microbiol.* **41** (4), 849-859.

Higashio, K., Kikuchi, T. and Furuichi, E. 1978. Symbiose entre *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* dans le yoghourt. *paris.* p. 522.

- Higuchi, M., Yamamoto, Y., Kamio, Y. 2000. Molecular biology of oxygen tolerance in lactic acid bacteria: Functions of NADH oxidases and Dpr in oxidative stress. *J Biosci Bioeng.* **90** 484-493.
- Hiller, K., Schobert, M., Hundertmark, C., Jahn, D. and Munch, R. 2003. JVirGel: Calculation of virtual two-dimensional protein gels. *Nucleic Acids Res.* **31** (13), 3862-3865.
- Hoch, J. A. 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol.* **3** (2), 165-170.
- Hofman-Bang, J., Zheng, D., Westermann, P., Ahring, B. K. and Raskin, L. 2003. Molecular ecology of anaerobic reactor systems. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* **81** 151-203.
- Hoiby, N. 1998. *Pseudomonas* in cystic fibrosis: past, present and future. *Cystic Fibrosis Trust.* (Kent, United Kingdom),
- Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C. and Dusko Ehrlich, S. 2005. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews.* **29** (3), 435-463.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J. and Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr.* **73** (2 Suppl), 365S-373S.
- Hueck, C. J. and Hillen, W. 1995. Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the gram-positive bacteria? *Mol Microbiol.* **15** (3), 395-401.
- Hurkman, W. J. and Tanaka, C. K. 1986. Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Plant Physiol.* **81** (3), 802-806.
- Hutkins, R., Morris, H. A. and McKay, L. L. 1985. Galactokinase activity in *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol.* **50** (4), 777-780.
- Hwang, B. J. and Chu, G. 1996. Trichloroacetic acid precipitation by ultracentrifugation to concentrate dilute protein in viscous solution. *Biotechniques.* **20** (6), 982-984.
- Ibrahim, M., Nicolas, P., Bessieres, P., Bolotin, A., Monnet, V. and Gardan, R. 2007. A genome-wide survey of short coding sequences in *streptococci*. *Microbiology.* **153** (Pt 11), 3631-3644.
- Ibrahim, M., Guillot, A., Wessner, F., Algaron, F., Besset, C., Courtin, P., Gardan, R. and Monnet, V. 2007. Control of the transcription of a short gene encoding a cyclic peptide in *Streptococcus thermophilus*: a new quorum-sensing system? *J Bacteriol.* **189** (24), 8844-8854.
- Idigoras, P., Valiente, A., Iglesias, L., Trieu-Cout, P. and Poyart, C. 2001. Meningitis due to *Streptococcus salivarius*. *J Clin Microbiol.* **39** (8), 3017.
- Ikemura, T. 1985. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol Biol Evol.* **2** (1), 13-34.

- Imbert, M. and Blondeau, R. 1998. On the iron requirement of lactobacilli grown in chemically defined medium. *Curr Microbiol.* **37** (1), 64-66.
- Imlay, J. A. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol.* **57** 395-418.
- Ishii, S., Kosaka, T., Hori, K., Hotta, Y. and Watanabe, K. 2005. Coaggregation facilitates interspecies hydrogen transfer between *Pelotomaculum thermopropionicum* and *Methanothermobacter thermautotrophicus*. *Appl Environ Microbiol.* **71** (12), 7838-7845.
- Isolauri, E., Salminen, S. and Ouwehand, A. C. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* **18** (2), 299-313.
- Johnson, M. R., Montero, C. I., Conners, S. B., Shockley, K. R., Bridger, S. L. and Kelly, R. M. 2005. Population density-dependent regulation of exopolysaccharide formation in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Mol Microbiol.* **55** (3), 664-674.
- Johnson, M. R., Conners, S. B., Montero, C. I., Chou, C. J., Shockley, K. R., Kelly, R. M. 2006. The *Thermotoga maritima* Phenotype Is Impacted by Syntrophic Interaction with *Methanococcus jannaschii* in Hyperthermophilic Coculture. *Appl Environ Microbiol.* **72** 811-818.
- Joyce, A. R. and Palsson, B. 2006. The model organism as a system: integrating 'omics' data sets. Review. *Nature.* **7** 198-210.
- Juillard, V. 2007. Transport des acides aminés et des peptides. *Livre de bactéries lactiques.*
- Juillard, V., Desmazeaud, M. J. and Spinnler, H. E. 1988. Mise en évidence d'une activité uréasique chez *Streptococcus thermophilus*. *Canadian J. of Microbiol.* **34** 818-822.
- Juillard, V., Guillot, A., Le Bars, D. and Gripon, J. C. 1998. Specificity of milk peptide utilization by *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* **64** (4), 1230-1236.
- Juillard, V., Desmazeaud, M. J., Spinnler, H. E. 1988. Mise en évidence d'une activité uréasique chez *Streptococcus thermophilus*. *Can J Microbiol.* **34** 818-822.
- Kara, D. 2007. Interactions between oral biofilm bacteria. the Netherlands: Amsterdam.
- Kawamura, Y., Hou, X. G., Sultana, F., Miura, H. and Ezaki, T. 1995. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol.* **45** (2), 406-408.
- Kehres, D. G., Zaharik, M. L., Finlay, B. B., Maguire, M. E. 2000. The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol Microbiol.* **36** 1085-1100.
- Kieronczyk, A., Skeie, S., Langsrud, T. and Yvon, M. 2003. Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. *Appl Environ Microbiol.* **69** (2), 734-739.



- Kieronczyk, A., Skeie, S., Langsrud, T., Le Bars, D. and Yvon, M. 2004. The nature of aroma compounds produced in cheese model by glutamate dehydrogenase positive *Lactobacillus* INF15D depends on its relative aminotransferase activities towards the different amino acids. *Int Dairy J.* **14** 227-235.
- Kieronczyk, A., Cachon, R., Feron, G., Yvon, M. 2006. Addition of oxidizing or reducing agents to the reaction medium influences amino acid conversion to aroma compounds by *Lactococcus lactis*. *J Appl Microbiol.* **101** 1114-1122.
- Kilstrup, M. and Martinussen, J. 1998. A transcriptional activator, homologous to the *Bacillus subtilis* PurR repressor, is required for expression of purine biosynthetic genes in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol.* **180** (15), 3907-3916.
- Kilstrup, M., Hammer, K., Ruhdal Jensen, P. and Martinussen, J. 2005. Nucleotide metabolism and its control in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews.* **29** (3), 555-590.
- Kilstrup, M., Martinussen, J. 1998. A Transcriptional Activator, Homologous to the *Bacillus subtilis* PurR Repressor, Is Required for Expression of Purine Biosynthetic Genes in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol.* **180** 3907-3916.
- Knappe, J. and Sawers, G. 1990. A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev.* **6** (4), 383-398.
- Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C. and Pechere, J. C. 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol.* **182** (21), 5990-5996.
- Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N., Blehert, D. S., Eglund, P. G., Foster, J. S. and Palmer, R. J., Jr. 2002. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **66** (3), 486-505, table of contents.
- Konings, W. N., Lolkema, J. S., Bolhuis, H., van Veen, H. W., Poolman, B. and Driessen, A. J. M. 1994. Mécanismes du transport des nutriments dans les bactéries lactiques. *Bactéries lactiques.* **1** (De Roissart, H. Luquet, F.M.), 209-238.
- Kreth, J., Merritt, J., Shi, W. and Qi, F. 2005. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol.* **187** (21), 7193-7203.
- Laloi, P., Atlan, D., Blanc, B., Gilbert, C. and Portalier, R. 1991. Cell-wall-associated proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397: differential extraction, purification and properties of the enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol.* **36** (2), 196-204.
- Lamy, M. C., Zouine, M., Fert, J., Vergassola, M., Couve, E., Pellegrini, E., Glaser, P., Kunst, F., Msadek, T., Trieu-Cuot, P. and Poyart, C. 2004. CovS/CovR of group B streptococcus: a two-component global regulatory system involved in virulence. *Mol Microbiol.* **54** (5), 1250-1268.

- Lamy, M. C., Zouine, M., Fet, J., Vergassola, M., *et al.* 2004. CovS/CovR of group B *Streptococcus* : a two-component global system involved in virulence. *Mol Microbiol.* **54** 1250-1268.
- Larsen, R., Buist, G., Kuipers, O. P. and Kok, J. 2004. ArgR and AhrC are both required for regulation of arginine metabolism in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol.* **186** (4), 1147-1157.
- Laughton, J. M., Devillard, E., Heinrichs, D. E., Reid, G. and McCormick, J. K. 2006. Inhibition of expression of a staphylococcal superantigen-like protein by a soluble factor from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology.* **152** (Pt 4), 1155-1167.
- Len, A. C., Harty, D. W. and Jacques, N. A. 2004. Proteome analysis of *Streptococcus mutans* metabolic phenotype during acid tolerance. *Microbiology.* **150** (Pt 5), 1353-1366.
- Letort, C. 2001. Relation entre croissance et nutrition azotée de deux bactéries lactiques thermophiles: *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *These pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Poitiers.*
- Letort, C. and Juillard, V. 2001. Development of a minimal chemical defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *J. Appl. Microbiol.* **91** (6), 1023-1029.
- Letort, C., Nardi, M., Garault, P., Monnet, V. and Juillard, V. 2002. Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Appl Environ Microbiol.* **68** (6), 3162-3165.
- Letort, C., and Juillard, V. 2001. Development of a minimal chemical defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *J. Appl. Microbiol.* **91** (6), 1023-1029.
- Lick, S., Drescher, K. and Heller, K. J. 2001. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the terminal ileum of fistulated Gottingen minipigs. *Appl Environ Microbiol.* **67** (9), 4137-4143.
- Lim, E. M., Ehrlich, S. D. and Maguin, E. 2000. Identification of stress-inducible proteins in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Electrophoresis.* **21** (12), 2557-2561.
- Liochev, S. L. 1996. The role of iron-sulfur clusters in in vivo hydroxyl radical production. *Free Radic Res.* **25** (5), 369-384.
- Lister, J. 1873. A further contribution to the natural history of bacteria and the germ theory of fermentative changes. *Quarterly Microbiological Sciences.* **13** 380-408.
- Liu, M., van Enkevort, F. H. and Siezen, R. J. 2005. Genome update: lactic acid bacteria genome sequencing is booming. *Microbiology.* **151** (Pt 12), 3811-3814.
- Luesink, E. J., van Herpen, R. E., Grossiord, B. P., Kuipers, O. P. and de Vos, W. M. 1998. Transcriptional activation of the glycolytic *las* operon and catabolite repression of the *gal* operon in *Lactococcus lactis* are mediated by the catabolite control protein CcpA. *Mol Microbiol.* **30** (4), 789-798.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar,

- D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D. M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J. H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B. and Mills, D. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103** (42), 15611-15616.
- Makarova, K. S. and Koonin, E. V. 2007. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J Bacteriol*. **189** (4), 1199-1208.
- Marshall, V. M. 1987. Lactic acid bacteria: starters for flavour. *FEMS Microbiol Rev*. **46** 327-336.
- Martin, P. K., Li, T., Sun, D., Biek, D. P. and Schmid, M. B. 1999. Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. **181** (12), 3666-3673.
- Martinussen, J., Wadskov-Hansen, S. L. and Hammer, K. 2003. Two nucleoside uptake systems in *Lactococcus lactis*: competition between purine nucleosides and cytidine allows for modulation of intracellular nucleotide pools. *J Bacteriol*. **185** (5), 1503-1508.
- Marty-Teyssset, C., de la Torre, F. and Garel, J. 2000. Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon aeration: involvement of an NADH oxidase in oxidative stress. *Appl Environ Microbiol*. **66** (1), 262-267.
- Mashburn, L. M., Jett, A. M., Akins, D. R., Whiteley, M. 2005. *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during *in vivo*. coculture. *J Bacteriol*. **187** 554-566.
- Mater, D. D., Bretigny, L., Firmesse, O., Flores, M. J., Mogenet, A., Bresson, J. L. and Corthier, G. 2005. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS Microbiol Lett*. **250** (2), 185-187.
- Melchiorsen, C. R., Jokumsen, K. V., Villadsen, J., Johnsen, M. G., Israelsen, H. and Arnau, J. 2000. Synthesis and posttranslational regulation of pyruvate formate-lyase in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*. **182** (17), 4783-4788.
- Metchnikoff, E. 1907. The prolongation of life.
- Miller, M. B. and Bassler, B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*. **55** 165-199.
- Mills, O. E. and Thomas, T. D. 1981. Nitrogen sources for growth of lactic streptococci in milk. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol*. **15** 43-55.
- Mitchell, T. J. 2003. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol*. **1** (3), 219-230.

- Mohedano, M. L., Overweg, K., de la Fuente, A., Reuter, M., Altabe, S., Mulholland, F., de Mendoza, D., Lopez, P. and Wells, J. M. 2005. Evidence that the essential response regulator YycF in *Streptococcus pneumoniae* modulates expression of fatty acid biosynthesis genes and alters membrane composition. *J Bacteriol.* **187** (7), 2357-2367.
- Mongkolsuk, S. and Helmann, J. D. 2002. Regulation of inducible peroxide stress responses. *Mol Microbiol.* **45** (1), 9-15.
- Monnet, C., Schmitt, P. and Divies, C. 1994. Method for assaying volatile compounds by headspace gas chromatography and application to growing starter cultures. *J. Dairy Sci.* **77** 1809-1815.
- Monnet, C., Mora, D. and Corrieu, G. 2005. Glutamine synthesis is essential for growth of *Streptococcus thermophilus* in milk and is linked to urea catabolism. *Appl Environ Microbiol.* **71** (6), 3376-3378.
- Monnet, C., Nardi, M., Hols, P., Gulea, M., Corrieu, G. and Monnet, V. 2003. Regulation of branched-chain amino acid biosynthesis by alpha-acetolactate decarboxylase in *Streptococcus thermophilus*. *Lett Appl Microbiol.* **36** (6), 399-405.
- Moon, N. J., and Reinbold, G. W. 1976. Commensalism and competition in mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *J. Milk Food Technol.* **39** (5), 337-341.
- Mora, D., Fortina, M. G., Parini, C., Ricci, G., Gatti, M., Giraffa, G. and Manachini, P. L. 2002. Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *J. Appl. Microbiol.* **93** 278-287.
- Mora, D., Maguin, E., Masiero, M., Parini, C., Ricci, G., Manachini, P. L. and Daffonchio, D. 2004. Characterization of urease genes cluster of *Streptococcus thermophilus*. *J Appl Microbiol.* **96** (1), 209-219.
- Mora, D., Fortina, M. G., Parini, C., Ricci, G., Gatti, M., Giraffa, G., Manachini, P. L. 2002. Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *J Appl Microbiol.* **93** 278-287.
- Morel, F., Frot-Coutaz, J., Aubel, D., Portalier, R. and Atlan, D. 1999. Characterization of a prolidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397 with an unusual regulation of biosynthesis. *Microbiology.* **145** ( Pt 2) 437-446.
- Morishita, T., Deguchi, Y., Yajima, M., Sakurai, T. and Yura, T. 1981. Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *J Bacteriol.* **148** (1), 64-71.
- Morvan, B., Bonnemoy, F., Fonty, G. and Gouet, P. 1996. Quantitative determination of H<sub>2</sub>-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea from digestive tract of different mammals. *Curr Microbiol.* **32** (3), 129-133.

- Mostertz, J., Scharf, C., Hecker, M., Homuth, G. 2004. Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression in response to superoxide and peroxide stress. *Microbiol.* **150** 497-512.
- Muralidharan, V., Rinker, K. D., Hirsh, I. S., Bouwer, E. J. and Kelly, R. M. 1997. Hydrogen transfer between methanogens and fermentative heterotrophs in hyperthermophilic cocultures. *Biotechnol. Bioeng.* **56** 268-278.
- Nagafuchi, S., Takahashi, T., Yajima, T., Kuwata, T., Hirayama, K. and Itoh, K. 1999. Strain dependency of the immunopotentiating activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **63** (3), 474-479.
- Nakano, S., Erwin, K. N., Ralle, M. and Zuber, P. 2005. Redox-sensitive transcriptional control by a thiol/disulphide switch in the global regulator, Spx. *Mol Microbiol.* **55** (2), 498-510.
- Neviani, E., Giraffa, G., Brizzi, A. and Carminati, D. 1995. Amino acid requirements and peptidase activities of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. *J Appl Bacteriol.* **79** (3), 302-307.
- Ng, W. L., Kazmierczak, K. M., Robertson, G. T., Gilmour, R. and Winkler, M. E. 2003. Transcriptional regulation and signature patterns revealed by microarray analyses of *Streptococcus pneumoniae* R6 challenged with sublethal concentrations of translation inhibitors. *J Bacteriol.* **185** (1), 359-370.
- Ng, W.-L., Kazmierczak, K. M., Robertson, G. T., Gilmour, R., *et al.* 2003. Transcriptional Regulation and Signature Patterns Revealed by Microarray Analyses of *Streptococcus pneumoniae* R6 Challenged with Sublethal Concentrations of Translation Inhibitors. *J Bacteriol.* **185** 359-370.
- Nicolas, P., Bessieres, P., Ehrlich, S. D., Maguin, E. and van de Guchte, M. 2007. Extensive horizontal transfer of core genome genes between two *Lactobacillus* species found in the gastrointestinal tract. *BMC Evol Biol.* **7** 141.
- O'Connell-Motherway, M., van Sinderen, D., Morel-Deville, F., Fitzgerald, G. F., Ehrlich, S. D., and Morel, P. 2000. Six putative two-component regulatory systems isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Microbiol.* **146** (4), 935-947.
- Pao, S. S., Paulsen, I. T. and Saier, M. H., Jr. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62** (1), 1-34.
- Parsek, M. R. and Greenberg, E. P. 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97** (16), 8789-8793.
- Pasteur, L. 1857. Mémoire sur la fermentation appelée lactique. *CR Séances Académiques de Sciences.* **45** 913-916.
- Pedrosa, M. C., Golner, B. B., Goldin, B. R., Barakat, S., Dallal, G. E. and Russell, R. M. 1995. Survival of yogurt-containing organisms and *Lactobacillus gasseri* (ADH) and their

- effect on bacterial enzyme activity in the gastrointestinal tract of healthy and hypochlorhydric elderly subjects. *Am J Clin Nutr.* **61** (2), 353-359.
- Peltoniemi, K., Vesanto, E. and Palva, A. 2002. Genetic characterization of an oligopeptide transport system from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Arch Microbiol.* **177** (6), 457-467.
- Penaud, S. 2006. Analyse de la séquence génomique et étude de l'adaptation à l'acidité de *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC11842. *Ph.D Thesis. Institut National agronomique de Paris-Grignon.*
- Perez, P. F. and De Antoni, G. L. 1991. Formate production by *Streptococcus thermophilus* cultures. *J. Dairy Sci.* **74** (9), 2850-2854.
- Perrin, C., Guimont, C., Bracquart, P. and Gaillard, J. L. 1999. Expression of a new cold shock protein of 21.5 kDa and of the major cold shock protein by *Streptococcus thermophilus* after cold shock. *Curr Microbiol.* **39** (6), 342-0347.
- Perrin, C., Gonzalez-Marquez, H., Gaillard, J. L., Bracquart, P. and Guimont, C. 2000. Reference map of soluble proteins from *Streptococcus thermophilus* by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* **21** (5), 949-955.
- Petranovic, D., Guedon, E., Sperandio, B., Delorme, C., Ehrlich, D. and Renault, P. 2004. Intracellular effectors regulating the activity of the *Lactococcus lactis* CodY pleiotropic transcription regulator. *Mol Microbiol.* **53** (2), 613-621.
- Pette, J. W. and Lolkema, H. 1950. Symbiosis and antibiosis in mixed cultures *Lb. bulgaricus* and *S.thermophilus*. *Neth. Milk Dairy J.* **4** 197-208.
- Pette, J. W., Lolkema, H. 1950. Symbiosis and antibiosis in mixed cultures *Lb. bulgaricus* and *S. thermophilus*. *Neth Milk Dairy J.* **4** 197-208.
- Pons, N., Batto, J. M., Ehrlich, S. D. and Renault, P. 2008. Development of software facilities to characterize regulatory binding motifs and application to streptococcaceae. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **14** (1-3), 67-73.
- Poolman, B. 1993. Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* **12** (1-3), 125-147.
- Poolman, B., Modderman, R. and Reizer, J. 1992. Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. The role of histidine residues. *J Biol Chem.* **267** (13), 9150-9157.
- Poolman, B., Knol, J. and Lolkema, J. S. 1995. Kinetic analysis of lactose and proton coupling in Glu379 mutants of the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J Biol Chem.* **270** (22), 12995-13003.
- Poolman, B., Royer, T. J., Mainzer, S. E. and Schmidt, B. F. 1989. Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*: a hybrid protein with homology to the melibiose carrier and enzyme III of phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems. *J Bacteriol.* **171** (1), 244-253.

- Poolman, B., Royer, T. J., Mainzer, S. E. and Schmidt, B. F. 1990. Carbohydrate utilization in *Streptococcus thermophilus*: characterization of the genes for aldose 1-epimerase (mutarotase) and UDPglucose 4-epimerase. *J Bacteriol.* **172** (7), 4037-4047.
- Poyart, C. 2006. Communication. *INRA, Jouy-en-Josas.*
- Poyart, C., Quesne, G., Coulon, S., Berche, P. and Trieu-Cuot, P. 1998. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J Clin Microbiol.* **36** (1), 41-47.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. and Klein, D. A. 1999. Microbiology, 4th edn. *New York: WCB/McGraw-Hill.*
- Pridmore, R. D., Berger, B., Desiere, F., Vilanova, D., Barretto, C., Pittet, A. C., Zwahlen, M. C., Rouvet, M., Altermann, E., Barrangou, R., Mollet, B., Mercenier, A., Klaenhammer, T., Arigoni, F. and Schell, M. A. 2004. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101** (8), 2512-2517.
- Pulliainen, A. T., Haataja, S., Kahkonen, S. and Finne, J. 2003. Molecular basis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance mediated by Streptococcal Dpr. Demonstration of the functional involvement of the putative ferroxidase center by site-directed mutagenesis in *Streptococcus suis*. *J Biol Chem.* **278** (10), 7996-8005.
- Pulliainen, A. T., Haataja, S., Kähkönen, S., Finne, J. 2003. Molecular basis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance mediated by Streptococcal Dpr. Demonstration of the functional involvement of the putative ferroxidase center by site-directed mutagenesis in *Streptococcus suis*. *J Biol Chem.* **278** 7996-8005.
- Rajagopal, S. N. and Sandine, W. E. 1990. Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. *J Dairy Sci.* **73** 894-899.
- Rajagopal, S. N., Sandine, W. E. 1990. Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. *J Dairy Sci.* **73** 894-899.
- Rallu, F., Gruss, A. and Maguin, E. 1996. Lactococcus lactis and stress. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **70** (2-4), 243-251.
- Rallu, F., Gruss, A., Ehrlich, S. D. and Maguin, E. 2000. Acid- and multistress-resistant mutants of Lactococcus lactis : identification of intracellular stress signals. *Mol Microbiol.* **35** (3), 517-528.
- Rantanen, T. and Palva, A. 1997. Lactobacilli carry cryptic genes encoding peptidase-related proteins: characterization of a prolidase gene (pepQ) and a related cryptic gene (orfZ) from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Microbiology.* **143** ( Pt 12) 3899-3905.
- Rao, D. R. and Reddy, A. V. 1984. Biosynthesis and utilization of folic acid and vitamine B12 by lactic acid cultures in skim milk. *J. Dairy Sci.* **67** 1169-1174.
- Rasic, J. and Kurmann. 1978. Flavour and aroma in yoghurt. p. 90-98.

- Raya, R. R., Manca de Nadra, M. C., Pesce de Ruiz Holgado, A. and Oliver, G. 1986. Acetaldehyde metabolism in lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft*. **41** (7), 397-399.
- Raynaud, S., Perrin, R., Cocaign-Bousquet, M. and Loubiere, P. 2005. Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Biovar *diacetylactis* in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. *Appl Environ Microbiol*. **71** (12), 8016-8023.
- Redon, E., Loubiere, P. and Cocaign-Bousquet, M. 2005. Transcriptome analysis of the progressive adaptation of *Lactococcus lactis* to carbon starvation. *J Bacteriol*. **187** (10), 3589-3592.
- Reva, O. and Tumbler, B. 2008. Think big--giant genes in bacteria. *Environ Microbiol*. **10** (3), 768-777.
- Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., Hoiby, N., Givskov, M., Molin, S. and Eberl, L. 2001. N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology*. **147** (Pt 12), 3249-3262.
- Rinker, K. D. and Kelly, R. M. 2000. Effect of carbon and nitrogen sources on growth dynamics and exopolysaccharide production for the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* and bacterium *Thermotoga maritima*. *Biotechnol Bioeng*. **69** (5), 537-547.
- Rozen, S. and Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*. **132** 365-386.
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Humana Press: Totowa, NJ. p. 365-386.
- Rul, F. and Monnet, V. 1997. Presence of additional peptidases in *Streptococcus thermophilus* CNRZ 302 compared to *Lactococcus lactis*. *J Appl Microbiol*. **82** (6), 695-704.
- Rul, F., Monnet, V. and Gripon, J. C. 1994. Purification and characterization of a general aminopeptidase (St-PepN) from *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* CNRZ 302. *J Dairy Sci*. **77** (10), 2880-2889.
- Saeki, T., Hori, M. and Umezawa, H. 1974. Pyruvate kinase of *Escherichia coli*. Its role in supplying nucleoside triphosphates in cells under anaerobic conditions. *J. Biochem*. **76** (631-637),
- Saier, M. H., Jr. 2000. Families of transmembrane transporters selective for amino acids and their derivatives. *Microbiology*. **146** ( Pt 8) 1775-1795.
- Salzano, A. M., Arena, S., Renzone, G., D'Ambrosio, C., Rullo, R., Bruschi, M., Ledda, L., Maglione, G., Candiano, G., Ferrara, L. and Scaloni, A. 2007. A widespread picture of the *Streptococcus thermophilus* proteome by cell lysate fractionation and gel-based/gel-free approaches. *Proteomics*. **7** (9), 1420-1433.



- Savijoki, K., Ingmer, H. and Varmanen, P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* **71** (4), 394-406.
- Saxild, H. H., Brunstedt, K., Nielsen, K. I., Jarmer, H. and Nygaard, P. 2001. Definition of the *Bacillus subtilis* PurR operator using genetic and bioinformatic tools and expansion of the PurR regulon with glyA, guaC, pbuG, xpt-pbuX, yqhZ-fold, and pbuO. *J Bacteriol.* **183** (21), 6175-6183.
- Schell, M. A. 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol.* **47** 597-626.
- Schink, B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol Mol Biol Rev.* **61** (2), 262-280.
- Schleifer, K. H. and Ludwig, W. 1995. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Syst Appl Microbiol.* **18** 461-467.
- Schleifer, K. H., Ehrmann, M., Krusch, U. and Neve, H. 1991. Revival of the species *Streptococcus thermophilus* (ex Orla-Jensen, 1919) nom. *Rev. System. Appl. Microbiol.* **14** 386-388.
- Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Balz, R., Collins, M. D. and Fischer, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. *Syst Appl Microbiol.* **6** 183-195.
- Schlothauer, T., Mogk, A., Dougan, D. A., Bukau, B. and Turgay, K. 2003. MecA, an adaptor protein necessary for ClpC chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100** (5), 2306-2311.
- Schmidt, B. F., Adams, R. M., Requadt, C., Power, S. and Mainzer, S. E. 1989. Expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus bulgaricus* beta-galactosidase gene cloned in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **171** (2), 625-635.
- Schmidt, D. G. 1982. Associations of caseins and casein micelle structure. *Developments in dairy chemistry.* **1** 61-68.
- Schmidt, R. H., Davidson, S. M. and Lowry, S. P. 1983. Determination of acetaldehyde in *S. lactis* cultures as 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives by high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **31** 978.
- Servin, A. L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* **28** (4), 405-440.
- Shahbal, S., Hemme, D. and Desmazeaud, M. J. 1991. High cell wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus thermophilus* strains (H-strains) correlated with a high acidification rate in milk. *Le lait.* **71** 351-357.
- Shahbal, S., Hemme, D., Desmazeaud, M. 1991. High cell wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus thermophilus* strains (H-strains) correlated with a high acidification rate in milk. *Lait.* **71** 351-357.

- Shankar, P. A. a. D., F. L. 1978. Relation entre *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* dans les levains du yoghourt. *XXeme Congrès International de Laiterie, Paris*. 521.
- Sharp, P. M. and Li, W. H. 1987. The codon adaptation index - a mesure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic acids Research*. **15** (3), 1281- 1295.
- Sivaraman, T., Kumar, T. K., Jayaraman, G. and Yu, C. 1997. The mechanism of 2,2,2-trichloroacetic acid-induced protein precipitation. *J Protein Chem*. **16** (4), 291-297.
- Sperandio, B., Polard, P., Ehrlich, D. S., Renault, P. and Guedon, E. 2005. Sulfur amino acid metabolism and its control in *Lactococcus lactis* IL1403. *J Bacteriol*. **187** (11), 3762-3778.
- Sperandio, B., Gautier, C., McGovern, S., Ehrlich, D. S., Renault, P., Martin-Verstraete, I. and Guedon, E. 2007. Control of methionine synthesis and uptake by MetR and homocysteine in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. **189** (19), 7032-7044.
- Spinnler, H. E. and Corrieu, G. 1989. Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. *J. Dairy Res*. **56** 755-764.
- Spinnler, H. E., Bouillanne, C., Desmazeaud, M. J. and Corrieu, G. 1987. Measurement of the partial pressure of dissolved CO<sub>2</sub> for estimating the concentration of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus bulgaricus*. *Appl Microbiol. Biotechnol*. **25** 464-470.
- Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol*. **36** (1), 1-29.
- Stock, A. M., Robeinson, V. L. and Goudreau, P. N. 2000. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem*. **69** 183-215.
- Stulke, J. and Hillen, W. 2000. Regulation of carbon catabolism in Bacillus species. *Annu Rev Microbiol*. **54** 849-880.
- Suzuki, I. and Kato, S. 1986. Growth of *Lactobacillus bulgaricus* in milk. 1. Cell elongation and the role of formic acid in boiled milk. *J. Dairy Sci*. **69** 311-320.
- Szurmant, H., Nelson, K., Kim, E. J., Perego, M. and Hoch, J. A. 2005. YycH regulates the activity of the essential YycFG two-component system in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. **187** (15), 5419-5426.
- Takahashi, N., Abbe, K., Takahashi-Abbe, S. and Yamada, T. 1987. Oxygen sensitivity of sugar metabolism and interconversion of pyruvate formate-lyase in intact cells of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Infect Immun*. **55** (3), 652-656.
- Tamime, A. Y. and Robinson, R. K. 1999. Yoghourt. Science and technology. Woodhead publishing limited: Cambridge.

- Tamime, A. Y., and Robinson, R. K. 1999. Yoghurt. Science and technology. Woodhead publishing limited: Cambridge.
- Tamine, A. Y. and Robinson, R. K. 1999. Yoghurt. Science and technology. Woodhead publishing limited: Cambridge.
- Tansley, A. G. 1958. Sir Arthur Georges Tansley, F.R.S. *The Journal of Ecology*. **46** (1), 1-8.
- Thibessard, A., Borges, F., Fernandez, A., Gintz, B., Decaris, B. and Leblond-Bourget, N. 2004. Identification of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 genes involved in defense against superoxide stress. *Appl Environ Microbiol*. **70** (4), 2220-2229.
- Thibessard, A., Fernandez, A., Gintz, B., Leblond-Bourget, N. , *et al.* 2001. Hydrogen peroxide effects on *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 cell viability. *Res Microbiol*. **152** 593-596.
- Thompson, J. 1987. Sugar transport in lactic acid bacteria. Sugar transport and metabolism in gram-positive bacteria. Editeurs Reizer J., Peterkofsky A., Ellis Horwood Ltd. , Chichester, Royaume-Uni. 15-38.
- Thompson, J. and Gentry, W. C. R. 1994. Métabolisme des sucres par les bacteries lactiques. Bactéries lactiques. De Roissart H. et Luquet F. M. Coord., Lorica, Uriage. **1** 239-290.
- Tinson, W., Broome, M. C., Hillier, A. J. and Jago, G. R. 1982. Metabolism of *Streptococcus thermophilus*. II. Production of CO<sub>2</sub> and NH<sub>3</sub> from urea. *Aust. J. Dairy Technol*. **37** 14-16.
- Tong, H., Chen, W., Merritt, J., Qi, F., Shi, W. and Dong, X. 2007. *Streptococcus oligofermentans* inhibits *Streptococcus mutans* through conversion of lactic acid into inhibitory H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: a possible counteroffensive strategy for interspecies competition. *Mol Microbiol*. **63** (3), 872-880.
- Tsakalidou, E., Anastasiou, R., Papadimitriou, K., Manolopoulou, E. and Kalantzopoulos, G. 1997. Purification and characterisation of an intracellular X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4. *J Biotechnol*. **59** (3), 203-211.
- Tynkkynen, S., Buist, G., Kunji, E., Kok, J., Poolman, B., Venema, G. and Haandrikman, A. 1993. Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*. **175** (23), 7523-7532.
- van de Guchte, M., Ehrlich, S. D. and Maguin, E. 2001. Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *J Appl Microbiol*. **91** (1), 147-153.
- van de Guchte, M., Penaud, S., Grimaldi, C., Barbe, V., Bryson, K., Nicolas, P., Robert, C., Oztas, S., Mangenot, S., Couloux, A., Loux, V., Dervyn, R., Bossy, R., Bolotin, A., Batto, J.-M., Walunas, T., Gibrat, J.-F., Bessières, P., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. and Maguin, E. 2006. The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **103** (24), 9274-9279.
- van de Guchte, M., Ehrlich, S. D., Maguin, E. 2001. Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *J Appl Microbiol*. **91** 147-153.

- van de Guchte, M., Penaud, S., Grimaldi, C., Barbe, V., *et al.* 2006. The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc Natl. Acad Sci. U S A.* **103** 9274-9279.
- van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., *et al.* 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Ant. van Loewenhoeck.* **82** 187-121.
- van den Bogaard, P. T., Kleerebezem, M., Kuipers, O. P. and de Vos, W. M. 2000. Control of lactose transport, beta-galactosidase activity, and glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus*: evidence for carbon catabolite repression by a non-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system sugar. *J Bacteriol.* **182** (21), 5982-5989.
- van den Bogaard, P. T., Hols, P., Kuipers, O. P., Kleerebezem, M. and de Vos, W. M. 2004. Sugar utilisation and conservation of the *gal-lac* gene cluster in *Streptococcus thermophilus*. *Syst Appl Microbiol.* **27** (1), 10-17.
- VanBogelen, R. A., Schiller, E. E., Thomas, J. D. and Neidhardt, F. C. 1999. Diagnosis of cellular states of microbial organisms using proteomics. *Electrophoresis.* **20** (11), 2149-2159.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. and Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.* **60** (2), 407-438.
- Vaughan, E. E., vandenBogaard, P. T. C., Catzeddu, P., Kuipers, O. P. and deVos, W. M. 2001. Activation of silent gal genes in the *lac-gal* regulon of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology.* **183** (4), 1184-1194.
- Veenhoff, L. M. and Poolman, B. 1999. Substrate recognition at the cytoplasmic and extracellular binding site of the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J Biol Chem.* **274** (47), 33244-33250.
- Veiga, P., Bulbarela-Sampieri, C., Furlan, S., Maisons, A., Chapot-Chartier, M. P., Erkelenz, M., Mervelet, P., Noirot, P., Frees, D., Kuipers, O. P., Kok, J., Gruss, A., Buist, G. and Kulakauskas, S. 2007. SpxB regulates O-acetylation-dependent resistance of *Lactococcus lactis* peptidoglycan to hydrolysis. *J Biol Chem.* **282** (27), 19342-19354.
- Veringa, H. A., Galesloot, T. E. and Davelaar, H. 1968. Symbiosis in yoghurt (II). Isolation and identification of a growth factor for *Lactobacillus bulgaricus* produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth. Milk Dairy J.* **22**
- Veringa, H. A., Galesloot, T. E., Davelaar, H. 1968. Symbiosis in yoghurt (II). Isolation and identification of a growth factor for *Lactobacillus bulgaricus* produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth Milk Dairy J.* **22**
- Wang, B. Y. and Kuramitsu, H. K. 2005. Interactions between oral bacteria: inhibition of *Streptococcus mutans* bacteriocin production by *Streptococcus gordonii*. *Appl Environ Microbiol.* **71** (1), 354-362.
- Weickert, M. J. and Chambliss, G. H. 1990. Site-directed mutagenesis of a catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87** (16), 6238-6242.

- Weng, M., Nagy, L. and Zalkin, H. 1995. Identification of the *Bacillus subtilis* pur Operon Repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92** 7455-7459.
- Willemoes, M. and Kilstrup, M. 2005. Nucleoside triphosphate synthesis catalysed by adenylate kinase is ADP dependent. *Arch Biochem Biophys.* **444** (2), 195-199.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18** (22), 6531-6535.
- Wohlrab, Y. and Bockelmann, W. 1992. Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Int Dairy J.* **2** 345-361.
- Wohlrab, Y. and Bockelmann, W. 1994. Purification and characterization of a new aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B.14. *Int Dairy J.* **4** 409-427.
- Wosten, M. M. 1998. Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev.* **22** (3), 127-150.
- Wouters, J. A., Rombouts, F. M., de Vos, W. M., Kuipers, O. P. and Abee, T. 1999. Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. *Appl Environ Microbiol.* **65** (10), 4436-4442.
- Yamamoto, Y., Poole, L. B., Hantgan, R. R. and Kamio, Y. 2002. An iron-binding protein, Dpr, from *Streptococcus mutans* prevents iron-dependent hydroxyl radical formation in vitro. *J Bacteriol.* **184** (11), 2931-2939.
- Yamamoto, Y., Fukui, K., Koujin, N., Ohya, H., Kimura, K. and Kamio, Y. 2004. Regulation of the intracellular free iron pool by Dpr provides oxygen tolerance to *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* **186** (18), 5997-6002.
- Yan, Z. Y., Xu, Z. J., Xu, G. Z., Tian, B., Hua, Y.J. 2007. Construction of a dps mutant and its functional analysis in *Deinococcus radiodurans*. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* **47** (4), 610-615.
- Yvon, M. and Rijnen, L. 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int. Dairy J.* **11** 185-201.
- Yvon, M., Thirouin, S., Rijnen, L., Fromentier, D. and Gripon, J. C. 1997. An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavor compounds. *Appl Environ Microbiol.* **63** (2), 414-419.
- Zhao, J., Winkler, M. E. 2000. Reduction of GC --> TA transversion mutation by overexpression of MutS in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* **182** 5025-5028.
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L. J., Smulski, D. R., et al. 2001. DNA Microarray-Mediated Transcriptional Profiling of the *Escherichia coli* Response to Hydrogen Peroxide. *J Bacteriol.* **183** 4562-4570.
- Zourari, A., Accolas, J. P. and Desmazeaud, M. J. 1992. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. *Le Lait.* **72** 1-6.

Zuber, P. 2004. Spx-RNA polymerase interaction and global transcriptional control during oxidative stress. *J Bacteriol.* **186** (7), 1911-1918.