



**HAL**  
open science

**Modification de la composition lipidique membranaire  
chez les bactéries lactiques en conditions de stress :  
étude du rôle physiologique des Acides Gras Cycliques  
chez deux modèles : oenococcus oeni ATCC-BAA1163 et  
Lactococcus lactis MG1363**

Thi Mai Huong To

► **To cite this version:**

Thi Mai Huong To. Modification de la composition lipidique membranaire chez les bactéries lactiques en conditions de stress : étude du rôle physiologique des Acides Gras Cycliques chez deux modèles : oenococcus oeni ATCC-BAA1163 et Lactococcus lactis MG1363. Alimentation et Nutrition. Université de Bourgogne, 2010. Français. NNT : 2010DIJOS048 . tel-00605353

**HAL Id: tel-00605353**

**<https://theses.hal.science/tel-00605353>**

Submitted on 1 Jul 2011

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

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

**UNIVERSITE DE BOURGOGNE**  
**Institut Université de la Vigne et du Vin**

**THÈSE de Doctorat**

**Discipline : Sciences des Aliments**

**TO Thi Mai Huong**

**Modification de la composition lipidique membranaire chez les bactéries  
lactiques en conditions de stress**

**Etude du rôle physiologique des Acides Gras Cycliques chez deux modèles :  
*Oenococcus oeni* ATCC-BAA1163 et *Lactococcus lactis* MG1363**

**Direction de thèse :**

**Raphaëlle TOURDOT -MARECHAL – directrice**

**Cosette GRANDVALET – co-encadrante**

**Date de soutenance : le 17 décembre 2010**

**Membres du Jury**

<b>CAVIN Jean-François</b>	Professeur AgroSup Dijon	Examineur
<b>GARMYN Dominique</b>	Maître de conférences HDR – Université de Bourgogne	Examineur
<b>MAGUIN Emmanuelle</b>	Directrice de Recherche INRA INRA Jouy-en Josas	Examinatrice
<b>PICHEREAU Vianney</b>	Professeur Université Bretagne Occidentale	Rapporteur
<b>PLOUX Olivier</b>	Professeur Chimie Paris'Tech	Rapporteur

## REMERCIEMENTS

Dès les premières lignes de ce mémoire, je tiens à remercier tous ceux qui dès le début ont cru en moi et m'ont permis de démarrer et de mener à bien ce travail.

Je souhaiterais exprimer mes remerciements sincères envers l'Ambassade de France au Vietnam et le CROUS de Dijon qui m'ont donné l'opportunité de réaliser ce travail.

Je remercie également Monsieur Hervé ALEXANDRE pour m'avoir accueillie dans l'équipe du laboratoire ReVV et pour avoir accepté d'être membre invité lors de ma soutenance de thèse.

J'exprime ma profonde et respectueuse gratitude à ma directrice de thèse: Raphaëlle TOURDOT-MARECHAL et son mari : Pierre-André MARECHAL pour leur confiance, leur patience, leur soutien, leur disponibilité et leurs encouragements durant ces années. Merci aussi pour les nombreuses discussions de tout et de rien.

Je tiens à exprimer aussi ma profonde gratitude à ma co-encadrante : Mme Cosette GRANDVALET et tous les personnes qui sont intervenues dans mon travail : Dominique GARMYN, Laurent GAL, M. Olivier PLOUX qui m'ont éclairée et guidée par leurs avis éclairés et leur soutien scientifique au travers des discussions pendant ces trois années.

Mes remerciements s'adressent également à M. Joseph GRETI, M. Olivier BERDEAUX, M. Stéphane GREGOIRE, David CHASSAGNE, Yann ROCHE pour leur soutien technique concernant les analyses en CPG, Spectrométrie de Masse et en Fluidité membranaire ...

Je voudrais aussi avoir une pensée pour tous ceux qui, par leur présence et leur amitié, ont partagé leur joie et leur bonne humeur avec moi : Virginie, Florian, Magali, Said, Mohand, Lémia, Camélia, Mario, Joan, Mathildé, Vanessa, Laurence, Franck, Maxime ...

Mes remerciements s'adressent à mes amis Vietnamiens pour tous les bons moments passés ensemble. Enfin, une énorme pensée pour ma famille, ma petite Eck et mon Cuncon qui m'ont remonté le moral dans les moments difficiles et les moments d'incertitude. Merci de m'avoir soutenue et de me soutenir encore et toujours ...

## LISTE DES ABREVIATIONS

$\Delta\Delta C_T$  : Delta delta critical threshold

ACP : Acyl carrier protéines

AdoHcy : S-adenosyl homocysteine

AG : Acides Gras

ANOVA : Analyse des variances

ATP : Adenosine triphosphate

ATR : Acid Tolerance Response

BSA : Bovine Serum Albumin

CL : Cardiolipine

cycC19:0 n-7 : acide lactobacillique

cycC19:0 n-9 : acide dihydrosterculique

C18:1 n-7 : acide *cis*-vaccénique

C18:1 n-9 : acide *cis*-oléique

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CPG-MS : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

CFA : Cyclo Fatty Acid

DMPC : Dimethylpyrocarbonate

DGDG : Diglucosyldiglycéride

DPG : Diphosphatidylglycérol

DMOX : 4,4-Dimethyloxazoline

DPH : 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene

DTT : Dithiothreitol

EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique

FML : Fermentation Malolactique

GPI : Glycophosphatidylinositol

GC : Gaz Chromatography

IPTG : Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

KAS : 3-ketoacyl-acyl carrier protéines synthase

kDa : kilo Dalton

LB : Luria Broth

LPC : Lyso-phosphatidylcholine

MGDG : Monoglucoyldiglycérine

MES : 2-[N-Morpholino] ethanesulfonic acid

MOPS : 3-N-morpholino propane sulfonic acid

NEMRODW : New Efficient Methodology for research using Optimal Design

Ni-NTA : Nickel- Nitrilotriacetate

PC : Phosphatidylcholine

PE : Phosphatidyléthanolamine

PEG : Polyethylene glycol

PS: Phosphatidylsérine

PG: Phosphatidylglycérol

qRT-PCR : Réverse Transcription PCR quantitative

RT-PCR : Réverse Transcription PCR

SAM (ou AdoMet) : S-adénosyl-L-méthionine

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SD : Standard déviation

SFA : Saturated Fatty Acid

TCA : Tricloacetic acid

T<sub>LH</sub> : Température de transition de l'état lamellaire à l'état hexagonal

T<sub>M</sub> : Température de transition de phase de l'état gel à l'état liquide-cristallin

UFC (ou CFU) : Unité Formant Colonies

UFA : Unsaturated Fatty Acid

### **Antibiotiques :**

amp<sup>R</sup> : résistance à l'ampicilline

cm<sup>R</sup> : résistance au chloramphénicol

ery<sup>R</sup> : résistance à l'érythromycine

kan<sup>R</sup> : résistance à la kanamycine

mls<sup>R</sup> : résistance aux macrolides (érythromycine et lincomycine)

spec<sup>R</sup> : résistance à la spectinomycine

van<sup>R</sup> : résistance à la vancomycine

ori Ts : Origine de répllication thermosensible chez les Gram positifs

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Têtes polaires de phospholipides .....	6
<b>Figure 2</b> : Différentes conformations possibles des chaînes acylées dans les membranes bactériennes .....	7
<b>Figure 3</b> : Représentation schématique d'un glycolipide .....	8
<b>Figure 4</b> : Représentation schématique des sphingolipides .....	9
<b>Figure 5</b> : Types de protéines membranaires .....	10
<b>Figure 6</b> : Diffusion moléculaire dans la membrane .....	14
<b>Figure 7</b> : Mouvements possibles d'un PL dans une membrane .....	14
<b>Figure 8</b> : Perméabilité d'une double couche lipidique synthétique .....	15
<b>Figure 9</b> : Relation entre la forme structurale d'un lipide et son organisation dans une phase lipide/eau .....	16
<b>Figure 10</b> : Les différentes conformations d'un phospholipide dans une bicouche. ....	17
<b>Figure 11</b> : Les différentes configurations d'une chaîne hydrocarbonée .....	18
<b>Figure 12</b> : Modification des doubles liaisons des chaînes acylées des lipides bactériens.....	26
<b>Figure 13</b> : Structure des phospholipides contenant différentes têtes polaires .....	27
<b>Figure 14</b> : Biosynthèse des acides gras insaturés chez <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i> .....	30
<b>Figure 15</b> : Transduction des signaux conduisant à l'optimisation de la fluidité membranaire chez <i>B. subtilis</i> ..	31
<b>Figure 16</b> : Carte du vecteur pGC20 construit à partir de pDL278 .....	49
<b>Figure 17</b> : Analyse de la composition en résidus d'AG des souches de <i>L. lactis</i> lors de la phase exponentielle	50
<b>Figure 18</b> : Analyse de la composition en résidus d'AG des souches de <i>L. lactis</i> lors de la phase stationnaire ..	51
<b>Figure 19</b> : Résistance à l'acidité.....	52
<b>Figure 20</b> : Résistance à l'éthanol 15% (v/v).....	54
<b>Figure 21</b> : Composition en résidus d'AG à partir des cellules récoltées en fin de phase exponentielle. ....	55
<b>Figure 22</b> : Composition en résidus d'AG à partir des cellules récoltées en phase stationnaire .....	57
<b>Figure 23</b> : Résistance à l'acidité des souches après une adaptation préalable à l'acidité.. ..	59
<b>Figure 24</b> : Résistance à l'éthanol des souches après une adaptation préalable à l'acidité. ....	60
<b>Figure 25</b> : Relative mRNA levels of <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>cfa</i> gene in response to various conditions of growth as determinate by quantitative RT-PCR. ....	74
<b>Figure 26</b> : Survival of the <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> strains during acid challenge (pH 3.0) in function of the growth conditions .....	76
<b>Figure 27</b> : Purification of <i>O. oeni</i> Cfa synthase.....	101
<b>Figure 28</b> : Iso-response curve and response variations: CFA synthesis in function of the pH and the temperature.....	102
<b>Figure 29</b> : Rate of the Cfa synthase reaction in function of AdoMet concentration. ....	103

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Composition en phospholipides des membranes de bactéries à Gram positif et Gram négatif.....	5
<b>Tableau 2</b> : Souches utilisées.....	38
<b>Tableau 3</b> : Plasmides utilisés et construits .....	39
<b>Table 4</b> : Bacterial strains and plasmids used in this study.....	66
<b>Table 5</b> : Fatty acid compositions of <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363 strains grown at 30°C on M17/7 or in sub-lethal stress conditions.....	72
<b>Table 6</b> : Anisotropy values <i>r</i> of DPH in <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> strains grown at 30°C on M17/7 or in sub-lethal stress conditions .....	75
<b>Table 7</b> : Valeurs d'anisotropie <i>r</i> chez les souches de <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> .....	81
<b>Table 8</b> : Bacterial strains and plasmids used in this study.....	88
<b>Table 9</b> : Fatty acid compositions of <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363 strains grown at 30°C on M17/7 or in sub-lethal stress conditions.....	94
<b>Table 10</b> : Determination of the transcription level of the <i>L. lactis</i> and the <i>O. oeni</i> <i>cfa</i> genes by qRT-PCR.....	100

## LISTE DES TRAVAUX ET PUBLICATIONS

### I. PUBLICATIONS

#### ARTICLE 1

**Thi Mai Huong To**, Cosette Grandvalet, Raphaëlle Tourdot-Maréchal

“Cyclopropanation of membrane unsaturated fatty acids is not essential for acid adaptation in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*” *Soumis à Applied Environmental Microbiology (Octobre 2010)*

#### ARTICLE 2

**Thi Mai Huong To**, Cosette Grandvalet, Thu-Ha Nguyen, Raphaëlle Tourdot-Maréchal

“The *Oenococcus oeni* cyclopropane fatty acid synthase: heterologous expression and biochemical characterization” *Manuscrit en preparation*

### II. COMMUNICATION ORALE

**Thi Mai Huong To**, Cosette Grandvalet, Raphaëlle Tourdot-Maréchal

« Rôle des acides gras cycliques (CFAs) membranaires dans l’adaptation à l’acidité chez les bactéries lactiques. Etude du gène *cfa* codant pour la Cfa Synthase »

16<sup>th</sup> *Forum for Young Researchers*. June 2010. Besançon, France.

### III. COMMUNICATIONS AFFICHEES

1. **To Thi-Mai-Huong**, Grandvalet Cosette, Alexandre Hervé, Tourdot-Marechal Raphaëlle

“Cyclopropanation of membrane unsaturated fatty acids is not primordial in acid stress response of *Lactococcus lactis*”

*Club des Bactéries Lactiques CBL 2010*. 27-29 October 2010. Nancy, France

2. **To Thi-Mai-Huong**, Grandvalet Cosette, Alexandre Hervé, Tourdot-Marechal Raphaëlle:

“Membrane fatty acid cyclisation in relation with lactic acid bacteria stress response”

15<sup>th</sup> *Forum for Young Researchers*. 25-27 June 2009. Dijon, France.

3. **To Thi-Mai-Huong**, Grandvalet Cosette, Tourdot-Marechal Raphaëlle

“Modification of the membrane lipidic composition induced by a stress of *Oenococcus oeni* cells: Characterization of the *O. oeni cfa* gene by heterologous complementation of the *Lactococcus lactis cfa*-deficient strain”.

1<sup>st</sup> International conference on « *MICROBIAL STRESS From molecules to systems* ». May 7<sup>th</sup> to 10<sup>th</sup> 2009. Semmering, Austria

# TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>i</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTE DES TRAVAUX ET PUBLICATIONS</b> .....	<b>vii</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>4</b>
<b>1. Généralités : la membrane biologique bactérienne</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1 Composition de la membrane plasmique</b> .....	<b>5</b>
1.1.1 Lipides.....	5
1.1.2 Protéines membranaires.....	9
<b>1.2 Structure de la membrane plasmique</b> .....	<b>10</b>
1.2.1 Asymétrie de la bicouche lipidique .....	10
1.2.2 Fluidité bidimensionnelle de la bicouche et mouvement des lipides en phase lamellaire fluide .....	11
1.2.3 Perméabilité de la bicouche .....	14
<b>1.3 Effets physiques d'un stress sur la membrane</b> .....	<b>16</b>
1.3.1 Polymorphismes lipidiques et transition conformationnelle des phases .....	16
1.3.3 Effet des ions et du pH .....	19
1.3.4 Effet des alcools .....	19
1.3.5 Composés organiques.....	20
<b>2. Métabolisme bactérien et modification de la composition lipidique de la membrane en fonction des paramètres environnementaux</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1 Modification de la composition lipidique membranaire : approche physico-chimique</b> .....	<b>21</b>
2.1.1 Modification du ratio Acides Gras Saturés/Acides Gras Insaturés.....	21
2.1.2 Modification du ratio Acides Gras <i>cis</i> / Acides Gras <i>trans</i> .....	23
2.1.3 Modification du ratio Acides Gras <i>iso</i> / Acides Gras <i>anteiso</i> .....	24
2.1.4 Ajustement de la longueur des chaines lipidiques.....	24
2.1.5 Cyclopropanation des Acides Gras insaturés .....	25
2.1.6 Influence d'une modification des têtes polaires des phospholipides .....	26
<b>2.2 Modification de la composition lipidique membranaire : approche biochimique et moléculaire</b> .....	<b>28</b>
2.2.1 <i>Cis-trans</i> isomérase et le gène <i>cti</i> .....	28
2.2.2 Elongation des acides gras et les gènes <i>fab</i> .....	29
2.2.3 Désaturase et le gène <i>des</i> .....	30
2.2.4 Cfa synthase et gène <i>cfa</i> .....	32
<b>3 Les bactéries lactiques <i>Lactococcus lactis</i> et <i>Oenococcus oeni</i></b> .....	<b>33</b>
<b>3.1 Généralités</b> .....	<b>33</b>
3.1.1 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (MG1363).....	34
3.1.2 <i>Oenococcus oeni</i> (ATCC BAA-1163).....	34

<b>3.2 Modifications de la composition lipidique membranaire chez <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> et <i>O. oeni</i> en réponse à un stress</b> .....	<b>35</b>
3.2.1 Les gènes <i>fabF</i> et <i>cfa</i> chez <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> .....	35
3.2.2 Cyclopropanation des acides gras insaturés chez <i>O. oeni</i> et mise en évidence du gène <i>cfa</i> .....	36
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>38</b>
<b>1 Souches bactériennes, plasmides et conditions de cultures</b> .....	<b>38</b>
<b>1.1 Souches bactériennes utilisées</b> .....	<b>38</b>
<b>1.2 Plasmides</b> .....	<b>39</b>
<b>1.3 Application de chocs et mesure de la viabilité</b> .....	<b>40</b>
1.3.1 Chocs sans adaptation préalable des cellules .....	40
1.3.2 Chocs sur cellules pré-adaptées à l'acidité .....	40
1.3.3 Chocs sur cellules pré-adaptées à l'éthanol .....	40
1.3.4 Mesure de la viabilité .....	40
<b>2. Extraction et analyse des résidus d'acides gras membranaires</b> .....	<b>41</b>
<b>3. Détermination de la structure moléculaire des acides gras par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-MS)</b> .....	<b>42</b>
<b>4. Mesure instantanée de la variation de la fluidité membranaire</b> .....	<b>42</b>
<b>5. Techniques de manipulation des acides nucléiques</b> .....	<b>43</b>
5.1 Extraction de l'ADN total .....	43
5.2 Extraction de l'ARN total.....	43
5.3 Réverse Transcription PCR (RT-PCR) et Réverse Transcription PCR quantitative (qRT-PCR).....	44
5.4. Technique de transformation génétique.....	44
<b>6. Analyses statistiques</b> .....	<b>47</b>
<b>CHAPITRE 1 : Etude de l'enzyme Cfa synthase de <i>O. oeni</i> ATCC BAA-1163 en système d'expression hétérologue – Utilisation d'une souche mutante <i>cfa</i>-déficiente de <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363</b> .....	<b>49</b>
<b>1. Construction du vecteur pGC20</b> .....	<b>49</b>
<b>2. Culture des souches en conditions optimales (culture sur M17/7)</b> .....	<b>50</b>
2.1 Analyse du profil des Acides Gras membranaires .....	50
2.2 Résistance des souches aux stress environnementaux (acide et éthanolique) .....	52
<b>3. Culture des souches en condition acide (culture sur M17/5)</b> .....	<b>55</b>
3.1 Analyse du profil des Acides Gras membranaires .....	55
3.2 Résistance des souches adaptées à l'acidité aux stress environnementaux (acide et éthanolique) .....	58
<b>4. Conclusions</b> .....	<b>60</b>
<b>CHAPITRE 2 : Acides Gras cycliques membranaires et réponse au stress acide chez <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363 (Article 1)</b> .....	<b>62</b>
<b>CHAPITRE 3 : Caractérisation du gène <i>cfa</i> de <i>O. oeni</i> par complémentation hétérologue chez <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (Article 2)</b> .....	<b>83</b>

**CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....106**  
**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....108**

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. Généralités : la membrane biologique bactérienne

La cellule bactérienne est délimitée par une membrane cytoplasmique d'environ 7,5 nanomètres d'épaisseur qui joue un rôle fondamental chez tous les organismes vivants, en protégeant la cellule et lui permettant d'interagir avec le milieu extérieur. Le maintien de l'intégrité membranaire est donc essentiel pour garder une activité cellulaire optimale. La perméabilité sélective de la membrane cytoplasmique empêche la fuite ou l'entrée anarchique de molécules. Elle permet ou non le passage des ions et des molécules en contrôlant des flux entrant et sortant. Elle maintient donc les compositions différentes et les concentrations intracellulaires d'ions spécifiques entre le cytoplasme et le milieu externe (24, 102 )

La membrane permet aussi à la cellule de capter les éléments nutritifs dont elle a besoin et d'excréter les produits du métabolisme tout en maintenant la composition de son milieu intérieur (maintien de l'homéostasie). Sa surface externe comporte des sites de reconnaissances spécifiques qui permettent la réception de signaux moléculaires de différentes origines. Elle contient également des enzymes et des sites d'activités biochimiques (1).

La membrane a également un rôle dans l'énergétique cellulaire. Chez les bactéries aérobies, elle est le siège de la respiration cellulaire. Chez les bactéries, anaérobies préférentielles, telles les bactéries lactiques, l'énergie est produite en partie par des ATPases et des systèmes de transports générant des forces protons motrices situés au niveau membranaire (1, 74 ).

Ces structures sont loin d'être des enveloppes inertes. En effet, les membranes sont douées de fonctions dynamiques. Organisée en une double couche de phospholipides dans laquelle se trouvent insérées de nombreuses molécules, la structure des membranes biologiques provient de la nature amphiphile de ses principaux constituants, en particulier les phospholipides qui sont sensibles aux paramètres physiques et chimiques (74). Pour mieux cerner les mécanismes de ces fonctions complexes, il nous faut comprendre les interactions de leurs constituants, en particulier la nature des phospholipides existants ainsi que leurs propriétés.

## 1.1 Composition de la membrane plasmique

### 1.1.1 Lipides

#### 1.1.1.1 Phospholipides

Les phospholipides représentent l'espèce lipidique majoritaire des membranes biologiques. Il existe une grande variabilité de lipides membranaires. Ce sont des triesters de glycérol. Le glycérol est estérifié en position 3 par de l'acide phosphorique sur lequel est fixé un substituant qui définit la nature du phospholipide. En positions 1 et 2, sont greffées par estérification des chaînes hydrocarbonées d'acides gras. Les deux acides gras peuvent différer par leur taille, leur degré d'insaturation et leur configuration spatiale. La grande variété des parties polaires et apolaires est à l'origine de la forte diversité des phospholipides et explique leurs différences de propriétés physiques (1).

**Tableau 1** : Composition en phospholipides des membranes de quelques bactéries à Gram positif et Gram négatif

Bactérie	PE	DPG	PG	PC	Autres
<i>Bacillus stearothermophilus</i> (89)	58,8	26,1	5,6	----	9,5
<i>Lactobacillus plantarum</i> (68)	---	4	68	----	28
<i>Oenococcus oeni</i> (101)	38	---	16	2	44
<i>Escherichia coli</i> (98)	74,4	---	25	---	0,6
<i>Lactococcus lactis</i> (39)	---	4	65	---	23

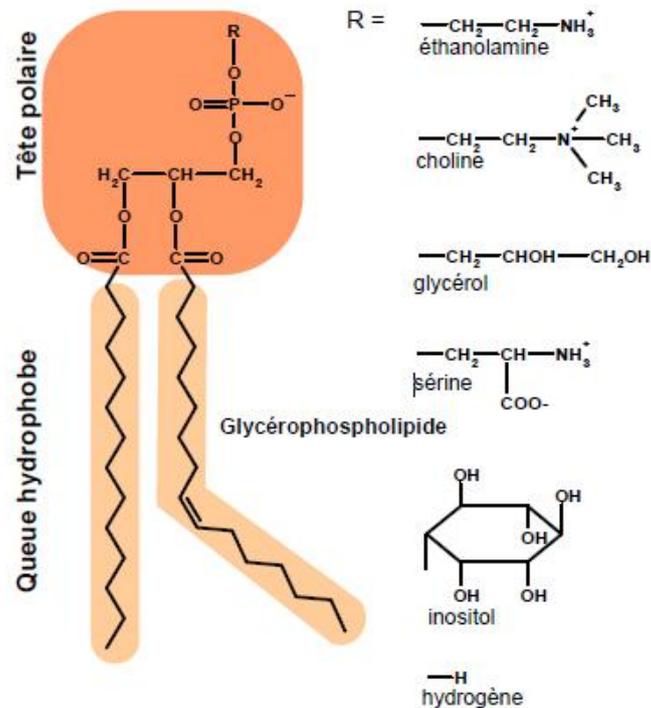
Présenté en pourcentage molaire. PE : phosphatidyléthanolamine, (DPG) : diphosphatidylglycérol, PC : phosphatidylcholine, PG : phosphatidylglycérol

Le phosphatidylglycérol (PG) et la phosphatidyléthanolamine (PE) sont les phospholipides les plus présents chez les bactéries. Chez *O. oeni*, 70% des phospholipides totaux sont représentés par les phosphatidyléthanolamine, phosphatidylglycérol et sphingomyéline (101). Chez *L. lactis*, les phospholipides sont représentés par 50% de phosphatidylglycérol (PG) et diphosphatidyl glycérol (DPG) et 50% de glycolipides (57).

#### 1.1.1.1.1 Têtes hydrophiles

Les phospholipides se différencient suivant le substituant fixé sur l'acide phosphorique. Ce substituant détermine la charge du phospholipide. L'encombrement stérique et la capacité d'hydratation de ce substituant permettent également de déterminer la forme du phospholipide. Par exemple, l'éthanolamine présente un faible encombrement stérique et une faible hydratation, ce qui confère au phosphatidyléthanolamine une tête polaire plus petite que le groupement choline, qui présente le même encombrement stérique mais qui est beaucoup

plus hydraté. Ainsi, la phosphatidyléthanolamine a une forme de cône et la phosphatidylcholine une forme cylindrique. Les principaux phospholipides sont présentés dans la Figure 1 (74).

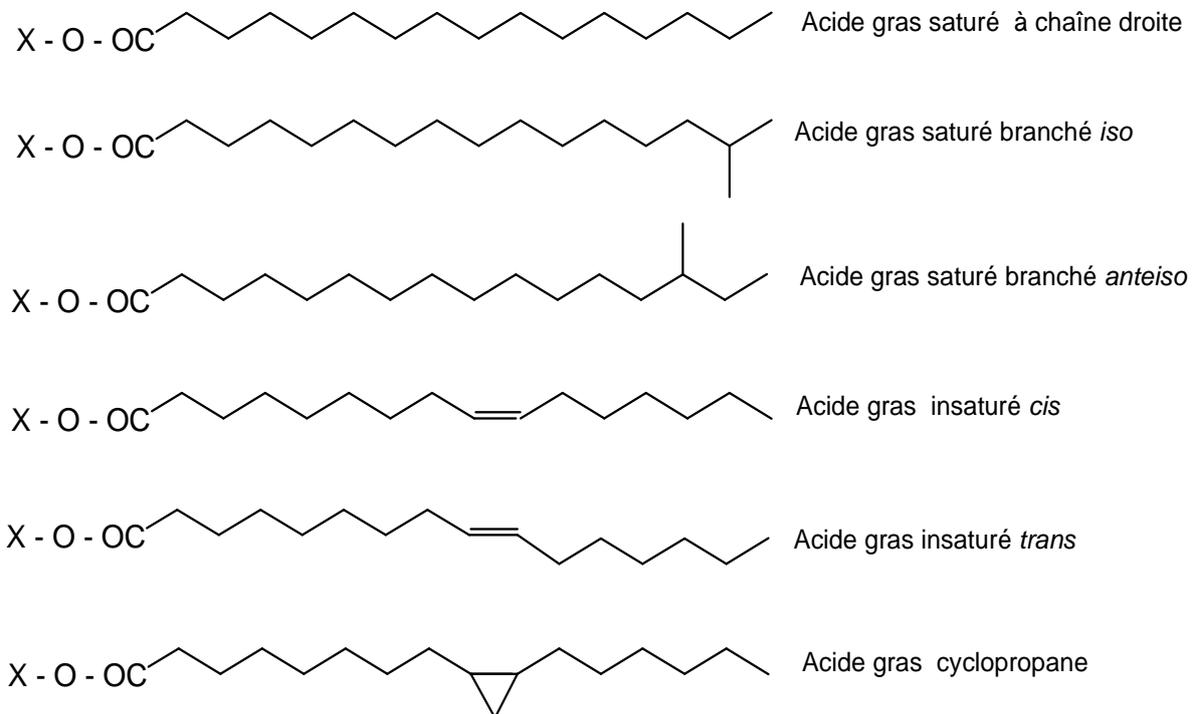


**Figure 1** : Têtes polaires de phospholipides (66).

### 1.1.1.1.2 Les Acides Gras

Les chaînes d'acides gras comportent en général de 14 à 20 carbones. Les acides gras peuvent être saturés ou insaturés, avec des ramifications ou un cycle propane (Figure 2). Ils peuvent avoir des structures variées suivant les différentes configurations de la chaîne acylée. La libre rotation autour des liaisons C-C permet d'orienter la chaîne acylée dans des directions différentes. La configuration des acides gras n'est parfois pas favorable au parallélisme des chaînes dans la bicouche lipidique (93). La composition lipidique peut varier entre différentes membranes, mais aussi au sein de la même membrane. Les deux feuillet d'une bicouche peuvent ne pas être symétriques dans les constituants lipidiques et leur distribution. La nature des chaînes acylées est liée au groupe bactérien et elle est déterminante dans le maintien de la

stabilité et de la fluidité membranaire. En général, les phospholipides ont un acide gras saturé et un insaturé. Les acides gras polyinsaturés sont rares dans les membranes bactériennes.

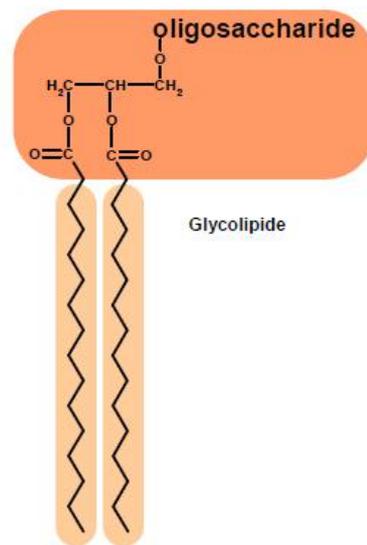


**Figure 2** : Différentes conformations possibles des chaînes acylées dans les membranes bactériennes [d'après Denich *et al.* (32)]

D'autres lipides sont aussi retrouvés dans la membrane bactérienne, comme les sphingolipides ou des lipides neutres tels les hopanoïdes et les caroténoïdes qui sont les équivalents des stérols présents uniquement dans les membranes eucaryotes. Ils ont le même rôle que les stérols, à savoir diminuer les variations de fluidité membranaire, suite à un stress (1).

### 1.1.1.2 Glycolipides et Sphingolipides

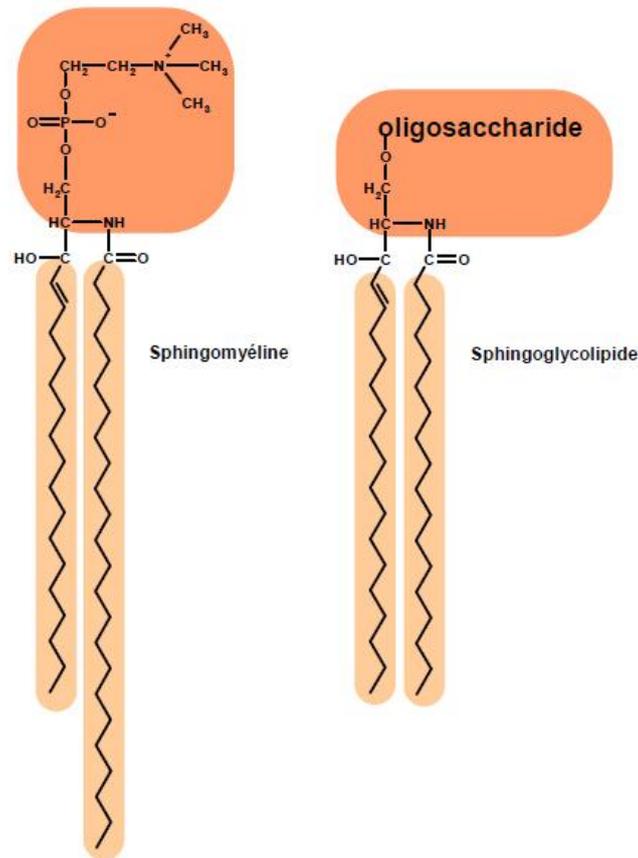
Les glycolipides (Fig. 3) représentent une autre classe de composés fortement amphiphiles dérivant du glycérol, estérifié en position 1 et 2 par un acide gras et connecté, par une liaison osidique en position 3, à un oligosaccharide au lieu d'un phosphate. Les glycolipides sont toujours associés au feuillet membranaire externe et appartiennent à un ensemble nommé le glycocalyx. Le glycocalyx est la zone périphérique cellulaire riche en glucides.



**Figure 3** : Représentation schématique d'un glycolipide (66)

Les résidus glucidiques liés aux protéines sont souvent impliqués dans les interactions de la cellule avec son environnement. Il est donc probable que les glycolipides jouent un rôle analogue au rôle joué par les protéines (66).

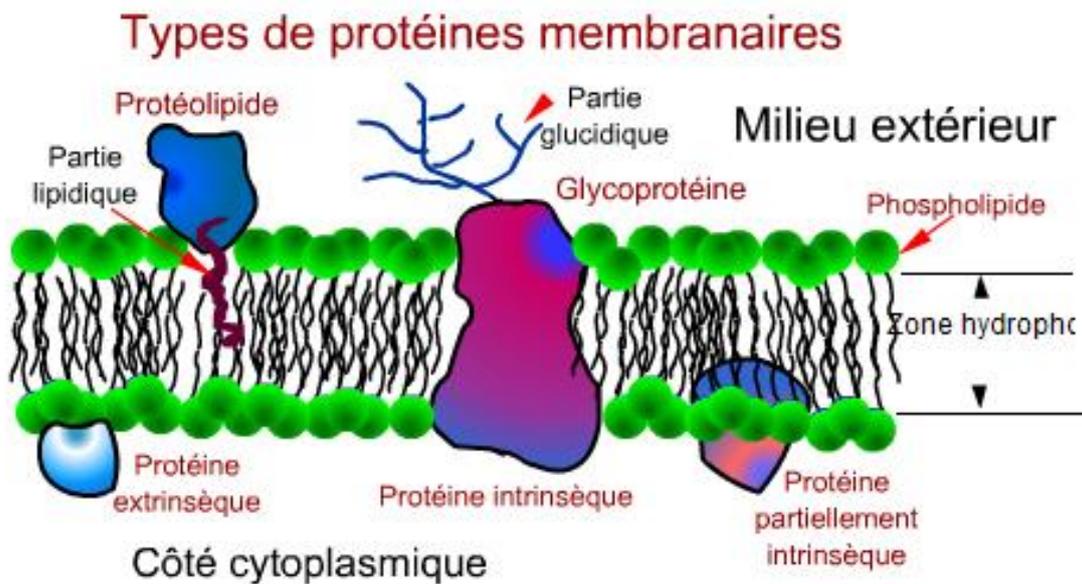
Les sphingolipides (Fig. 4) ont une base lipidique commune, appelée céramide, constituée d'une longue chaîne amino-alcool (2-amino-1,3-dihydroxy-octadec-4-ène dont le nom trivial est sphingosine) connectée à un acide gras par une liaison amide. La particularité de cette classe de lipides est de posséder à la fois un groupement hydroxyle et amide qui peuvent être donneur aussi bien qu'accepteur de liaisons hydrogène, et un groupement carboxyle (comme tous les glycérophospholipides) qui peut être accepteur de liaisons hydrogène. Les sphingomyélines ont dans la majorité des cas une géométrie conique inversée. La tête polaire peut également être un saccharide (cas des cérébrosides) ou un oligosaccharide (cas des gangliosides). La chaîne oligosaccharidique varie en fonction de la nature, de l'ordre d'enchaînement et du degré de ramification des différents sucres entre eux. Ainsi les sphingolipides ont une tête polaire bien plus volumineuse que la partie hydrophobe, ce qui leur confère une géométrie conique (66).



**Figure 4** : Représentation schématique des sphingolipides (66)

### 1.1.2 Protéines membranaires

Les protéines membranaires se classent en deux grandes catégories : les protéines intrinsèques (intégrales ou transmembranaires) et les protéines extrinsèques (ou périphériques) (Fig. 5). Les protéines intrinsèques traversent la membrane de part et d'autre. Leurs séquences hydrophobes leur permettent d'être dissoutes au cœur de la bicouche. Elles sont associées à la membrane de façon étroite par un ensemble d'interactions hydrophobes avec les parties apolaires des lipides. Ce sont des protéines transmembranaires dont la chaîne est accessible des deux côtés de la membrane. Leur disposition dans la membrane leur permet de participer à des transformations et des réactions qui s'effectuent de part et d'autre de la membrane. Ce sont ces protéines qui permettent le transport de matière, le couplage énergétique et le transfert d'informations. Elles peuvent également servir de liens structuraux entre le cytosquelette de la cellule et la matrice extracellulaire ou de récepteurs recevant et convertissant des signaux chimiques qui proviennent de l'environnement de la cellule (1, 24, 30).



**Figure 5** : Types de protéines membranaires (<http://www.espacesciences.com/BioMb/topo/ndev/cours.htm>)

Les protéines périphériques, ou extrinsèques, sont quant à elles associées à la membrane par des interactions électrostatiques faibles (hydrogène ou Van der Waals). Elles peuvent être également associées aux têtes polaires des phospholipides ou aux protéines intrinsèques sur l'une ou l'autre face de la membrane. Leur localisation leur permet de participer à des réactions qui s'effectuent à l'interface entre la membrane et le compartiment aqueux. Des protéines peuvent être également localisées à l'extérieur de la bicouche mais ancrées dans la membrane par liaison covalente à une molécule de glycosphosphatidylinositol (GPI) (24).

## 1.2 Structure de la membrane plasmique

### 1.2.1 Asymétrie de la bicouche lipidique

La structure en double couche est due aux propriétés amphiphiles des molécules lipidiques. Les molécules amphipathiques tels que phospholipides sont soumises à deux forces opposées : la tête hydrophile est attirée vers l'eau, alors que la queue hydrophobe cherche à s'associer à d'autres molécules hydrophobes. Ce conflit est résolu par la formation de la bicouche lipidique, un arrangement qui est favorable sur le plan énergétique. Les queues hydrophobes se font face en raison de leur affinité réciproque et dont les têtes sont dirigées vers l'eau, principal constituant des cellules et du milieu extracellulaire. Cet édifice est maintenu par des liaisons chimiques dites faibles (forces de Van der Waals). Ces forces

assurent une cohésion suffisante de l'édifice si la surface est importante et que ses molécules sont régulièrement alignées les unes contre les autres, comme c'est le cas dans les membranes. De plus, les protéines enchâssées dans la double couche lipidique contribuent à sa solidité. La charpente des membranes cellulaires est donc une construction supramoléculaire de lipides dont les molécules sont régulièrement orientées ce qui lui assure à la fois cohésion et souplesse. Leur architecture est conditionnée par les lois qui gouvernent le comportement des molécules lipidiques dans un environnement aqueux (1).

Comme toutes les membranes biologiques, la membrane plasmique est globalement organisée selon le modèle de la "mosaïque fluide" proposé dès 1972 par Singer et Nicholson (97). Il convient cependant de noter que ce modèle, basé sur une structure homogène des phases lipidiques apparaît aujourd'hui comme trop simplifié. Un grand nombre d'études réalisées depuis ont montré que les membranes biologiques présentent une structure beaucoup plus complexe et hétérogène.

Les membranes cellulaires sont en général asymétriques : leur face interne, à l'intérieur de la cellule ou de l'organite, est très différente de leur face externe. Les deux moitiés de la bicouche contiennent souvent des sélections très différentes de phospholipides et de glycolipides. De plus, les protéines sont incluses dans la bicouche avec une orientation particulière, essentielle pour leur fonction. Les protéines intrinsèques ne sont pas symétriques et les protéines extrinsèques sont différentes des deux côtés de la membrane. De même, les lipides polaires ne sont pas répartis de manière équivalente sur les deux couches de la membrane et on parle de l'asymétrie de distribution des lipides. Cette asymétrie des lipides s'établit dès leur synthèse. Le mécanisme de flip-flop, décrit dans le paragraphe suivant, est un processus trop lent pour pouvoir expliquer cette distribution asymétrique et d'autres mécanismes interviennent. Le mieux caractérisé est le transport spécifique des aminophospholipides (PE et PS) de la monocouche externe vers la monocouche interne par une protéine, l'aminophospholipide-translocase (92).

### **1.2.2 Fluidité bidimensionnelle de la bicouche et mouvement des lipides en phase**

#### **lamellaire fluide**

L'environnement aqueux à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule empêche les lipides de la membrane de s'échapper de la bicouche, mais rien n'empêche ces molécules de se déplacer et d'échanger leur place entre elles, dans le plan de la bicouche. La membrane se comporte donc comme un fluide bidimensionnel, d'une importance primordiale pour la fonction

membranaire. Cette propriété est différente de la flexibilité qui est la capacité de la membrane à se courber (74).

La fluidité des bicouches lipidiques peut être étudiée en utilisant des bicouches lipidiques synthétiques, qui sont facilement produites par l'agrégation des molécules de lipides amphipathiques dans l'eau. Ces bicouches artificielles simples permettent les mesures délicates des mouvements des molécules de lipides, montrant que certains de ces mouvements sont rares alors que d'autres sont fréquents et rapides. En raison de l'agitation thermique, les molécules de lipides à l'intérieur d'une monocouche changent sans arrêt de place avec les molécules adjacentes. Cet échange conduit à une molécule de lipide dans le plan de la membrane. Par exemple, une molécule de lipide dans une bicouche artificielle peut diffuser sur une longueur égale à celle d'une bactérie (2  $\mu\text{m}$ ), en environ une seconde. Si on baisse la température, la vitesse des mouvements des lipides diminue en raison de la chute d'énergie thermique et la bicouche devient moins fluide (1). Des observations semblables peuvent être faites quand on examine des membranes isolées ou des cellules entières, ce qui indique que la bicouche lipidique d'une membrane cellulaire se comporte aussi comme un fluide bidimensionnel dans lequel les molécules de lipides qui le constituent sont libres de se déplacer dans une monocouche, dans n'importe quelle direction par rapport au plan de la membrane. Ces études montrent également que les chaînes carbonées des lipides sont flexibles, et que les molécules de lipides au sein d'une monocouche tournent très rapidement autour de leurs grands axes, certaines atteignant des vitesses de 30 000 t/min. Il y a peu d'échanges de lipides d'une couche à l'autre de la membrane (mouvements verticaux ou flip-flop), ce qui permet l'obtention de distributions asymétriques des différents lipides et confère ainsi des fonctions différentes des feuilletts membranaires selon qu'ils sont orientés vers l'extérieur ou vers le cytosol (74).

La fluidité d'une membrane cellulaire est intimement liée à sa fonction. Elle permet aux protéines membranaires de diffuser rapidement dans le plan de la bicouche et d'interagir les unes avec les autres, ce qui est capital dans la signalisation cellulaire, par exemple. Elle permet aux lipides membranaires et aux protéines de diffuser des sites où ils sont insérés après leur synthèse vers d'autres. Elle permet également d'assurer que les molécules membranaires sont réparties de manière égale entre les cellules filles lors de la division cellulaire (74).

La fluidité d'une bicouche lipidique à une température donnée dépend de sa composition en phospholipides, et en particulier de la nature des queues hydrocarbonées. Plus ces queues sont

---

serrées et entassées de manière régulière, plus la bicouche sera visqueuse et moins elle sera fluide. L'empilement des queues hydrocarbonées dans la bicouche dépend de deux propriétés majeures : leur longueur et leur degré d'insaturation. Une chaîne plus courte réduit la tendance des queues hydrocarbonées à interagir les unes avec les autres, et donc augmente la fluidité de la bicouche. Les queues hydrocarbonées des molécules de phospholipides membranaires ont une longueur qui varie de 14 à 22 atomes de carbone, des longueurs de 18 à 20 atomes étant les plus fréquentes.

En ce qui concerne l'insaturation, la plupart des phospholipides contiennent habituellement une queue d'hydrate de carbone avec une double liaison ou plus entre des atomes adjacents, et une seconde queue ne contenant que des liaisons simples. Chaque double liaison dans une queue insaturée crée, dans cette queue, un petit coude qui rend plus difficile son alignement contre les autres. Pour cette raison, les bicouches lipidiques qui contiennent une grande proportion de queues hydrocarbonées insaturées sont plus fluides que celles qui en contiennent une proportion plus faible (1).

Les mouvements au sein d'une bicouche lipidique sont mesurés par le temps de corrélation  $\tau$ ,  $\tau$  étant le temps moyen pris par une molécule pour tourner de 1 radian. On distingue :

***Les mouvements intramoléculaires :***

- . Isomérisation *trans/cis* :  $\tau = 10^{-10}$  s
- . Rotation des liaisons carbone/carbone :  $\tau = 10^{-11}$  s

***Les mouvements moléculaires au sein de la membrane :***

*Diffusion rotationnelle* : Les lipides tournent fréquemment sur eux-mêmes autour de leur axe longitudinal.

- Perpendiculaire au plan de la bicouche :  $\tau_{\perp} = 10^{-9}$  s
- Oscillation de l'axe rotationnel :  $\tau_{\parallel} = 10^{-11}$  s

*Diffusion latérale* : Les mouvements de déplacement latéraux sont rapides (1  $\mu\text{m/s}$  à 37 °C soit environ  $10^7$  fois par seconde) (Fig. 6).

*Diffusion de bascule ou flip-flop* : Les lipides peuvent passer d'une bicouche à l'autre par un mouvement de bascule. Ce mouvement est lent : le groupement hydrophile du lipide doit traverser la couche hydrophobe interne de la membrane. Un tel mouvement de bascule est donc thermodynamiquement défavorisé (Fig. 7) (105).

### Mécanisme d'ondulation de la surface membranaire :

Mouvement collectif (vibration spontanée) :  $\tau_{\text{vibration}} = 10^{-3}$  à  $10^{-6}$  s.

#### • diffusion latérale

→  $\tau_{\text{diff}} 10^{-6}$  à  $10^{-7}$  s

$1 \mu\text{m}^2/\text{s}$  ( $=10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ ), vitesse de plusieurs  $\mu\text{m}/\text{s}$



#### • diffusion transversale (flip-flop) → $\tau_{\text{flip-flop}}$ heures ou même jours

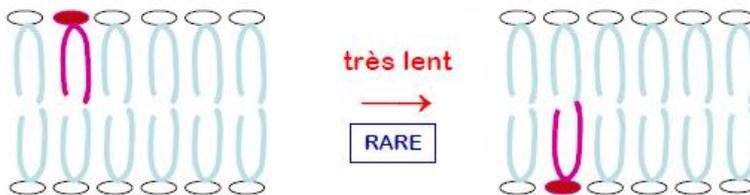


Fig.6 : Diffusion moléculaire dans la membrane { (105)

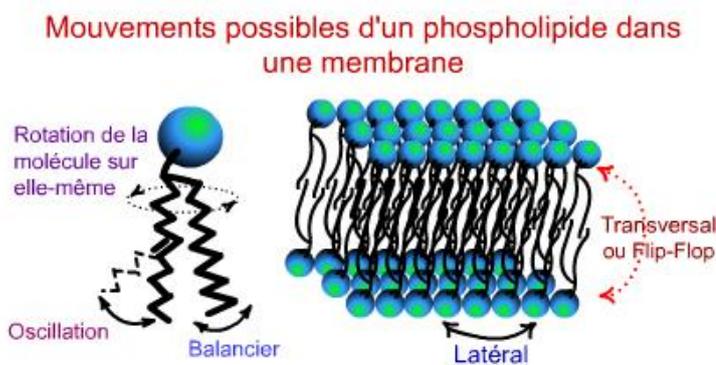
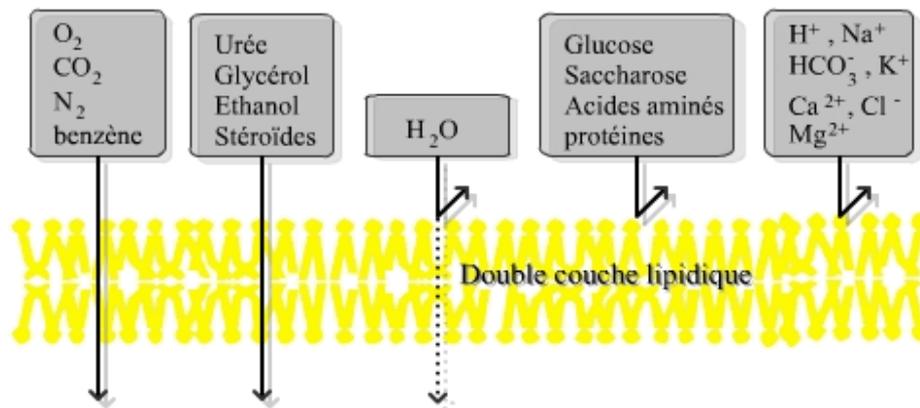


Fig. 7 : Mouvements possibles d'un PL dans une membrane  
(<http://www.espacesciences.com/BioMb/topo/ndev/cours.htm>)

### 1.2.3 Perméabilité de la bicouche

La perméabilité sélective des membranes biologiques aux petites molécules fait que la cellule peut ajuster et maintenir sa composition interne. Seules quelques petites espèces moléculaires peuvent diffuser librement à travers les bicouches phospholipidiques. Certaines molécules non polaires, comme  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$  sont solubles dans la bicouche lipidiques et passent rapidement d'une face à l'autre de la membrane. Certaines molécules polaires non chargées, si elles sont

de petites tailles, comme  $H_2O$ , diffusent également à travers la membrane. Les molécules chargées, notamment les ions, ne traversent jamais une membrane, quelle que soit leur taille, puisque même les ions  $H^+$  ne franchissent pas la bicouche lipidique par diffusion (Fig. 8). La membrane est donc une barrière très efficace. Mais elle peut facilement être franchie par des molécules hydrophobes telles que les alcools.



**Figure 8** : Perméabilité d'une double couche lipidique synthétique

([http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell\\_diffusion/gbb.cel.fa.101.b3/index.htm](http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion/gbb.cel.fa.101.b3/index.htm))

Si les ions et la plupart des molécules polaires ne diffusent pas à travers une bicouche lipidique, bon nombre d'entre eux sont capables de traverser les membranes grâce à des transporteurs, protéines intrinsèques particulières. Ceux-ci fixent la sélectivité de chaque type de membrane et jouent un rôle clé dans le fonctionnement d'une membrane. Ces transporteurs se composent de plusieurs régions transmembranaires, formant un tunnel au sein de la bicouche lipidique permettant aux molécules polaires ou chargées de franchir la membrane sans entrer au contact des chaînes d'acide gras hydrophobes des phospholipides membranaires.

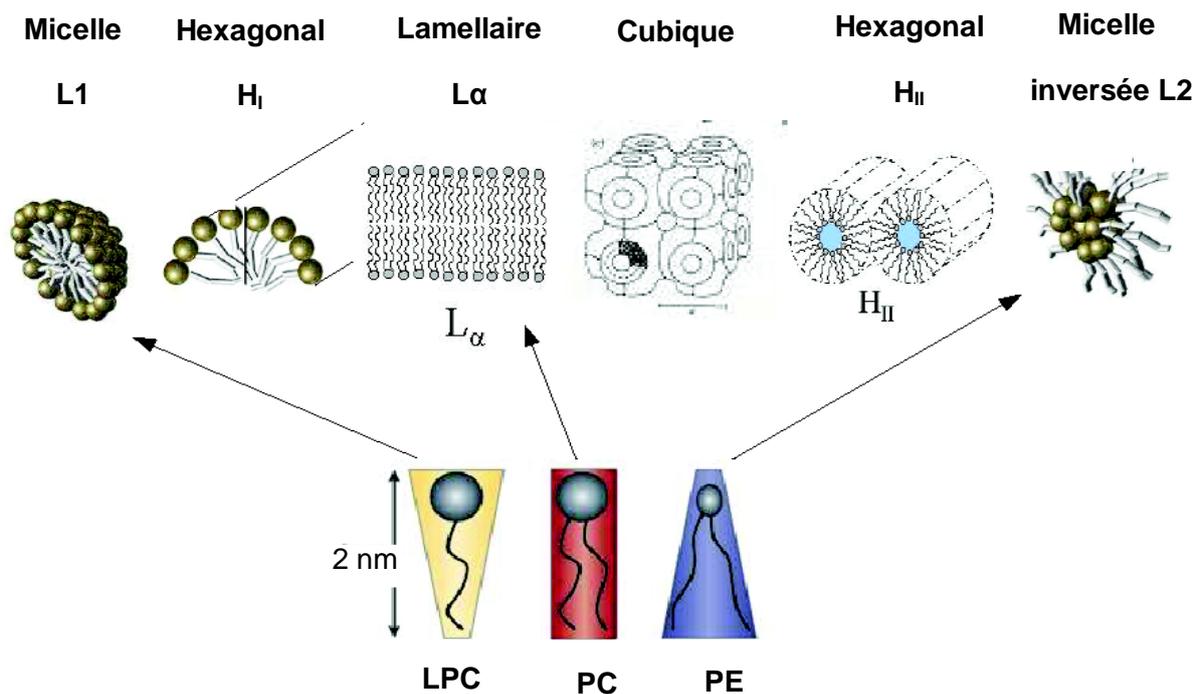
Il existe deux grandes classes de transporteurs membranaires. La première est celle des conducteurs protéiques ou conductines. Les conductines à ions, par exemple, sont perméables aux ions minéraux comme  $Na^+$ ,  $K^+$ ;  $Ca^{2+}$  et  $Cl^-$ . Une fois ouverts, ces conducteurs protéiques forment de petits pores que les ions de taille appropriée traversent par diffusion. Ces pores s'ouvrent et se ferment sélectivement, en réponse à des signaux extracellulaires, de sorte que la cellule peut ajuster le déplacement des ions à travers sa membrane.

La deuxième classe de transporteurs comprend les perméases protéiques, qui fixent sélectivement et transportent des molécules. Au lieu de former des pores ouverts, ces protéines agissent à la façon d'enzymes pour faciliter le passage des molécules à travers la membrane. En fait, elles capturent un type de molécules particulier, puis changent de conformation pour ménager un pore par lequel la molécule est déchargée sur l'autre face de la membrane..

### 1.3 Effets physiques d'un stress sur la membrane

#### 1.3.1 Polymorphismes lipidiques et transition conformationnelle des phases

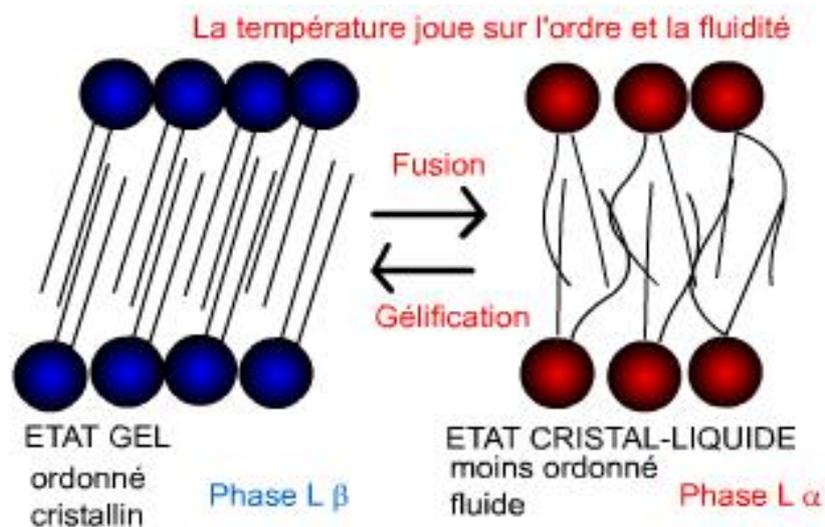
Les phospholipides peuvent présenter des organisations structurales différentes (lamellaire, hexagonale, micellaire, micellaire inversée) en fonction des conditions environnementales comme la température et le pH. On parle de polymorphisme lipidique en phase aqueuse. On note deux états lamellaires ( $L_\alpha$  et  $L_\beta$ ) et deux états hexagonaux ( $H_I$  et  $H_{II}$ ) (Fig. 9).



**Fig. 9** : Relation entre la forme structurale d'un lipide et son organisation dans une phase lipide/eau, [adaptée de Denich *et al.*] (32). LPC : lyso-phosphatidylcholine ; PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidyléthanolamine

Ces différentes organisations s'expliquent par le concept de forme, selon lequel l'organisation adoptée par un phospholipide particulier dépend des volumes respectifs de ses parties polaire et hydrophobe. Les phospholipides peuvent adopter différents états physiques ou phases. Ces

phases correspondent à des conformations plus ou moins ordonnées des chaînes d'acides gras du phospholipide. La phase lamellaire  $L\beta$  dite gel correspond à une conformation ordonnée du phospholipide, où l'orientation des chaînes d'acides gras est perpendiculaire ou inclinée par rapport au plan de la bicouche. Les chaînes sont parallèles les unes aux autres, en contact étroit et étirées au maximum (Fig. 10) (22).



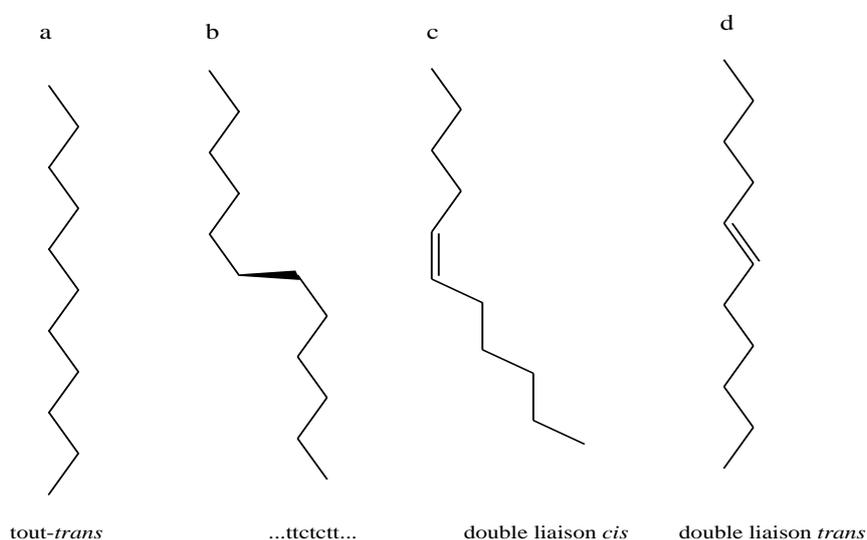
**Fig. 10** : Les différentes conformations d'un phospholipide dans une bicouche. La conformation  $L\beta$  (ordonnée) est appelée phase gel et la conformation  $L\alpha$  (désordonnée) est appelée phase liquide cristalline. (<http://www.espacesciences.com/BioMb/topo/ndev/cours.htm>)

La phase hexagonale  $H_I$  conduit à la formation de micelle (le phospholipide s'inscrit dans un cône inversé) et la phase  $H_{II}$  à la formation de micelle inversée (le phospholipide s'inscrit dans un cône) (Fig. 9).

Le passage d'un phospholipide d'une conformation à une autre est appelé transition de phase. La température à laquelle une bicouche lipidique va passer d'un état ordonné à un état désordonné (et réciproquement) est appelée température de transition de phase ( $T_M$ ). La transition de phase (transition du premier ordre) est un phénomène mettant en jeu les propriétés collectives (ou coopératives) de l'ensemble des lipides de la membrane. Pour un phospholipide pur, on peut établir un diagramme de phase déterminé suivant la température et la concentration de phospholipide. La température de transition de phase  $L\beta \rightarrow L\alpha$  ( $T_M$ ) ou  $L\alpha \rightarrow H_{II}$  ( $T_{LH}$ ) de chaque phospholipide dépend de la nature du substituant polaire, de la taille des chaînes d'acides gras, de leur degré d'insaturation et de la conformation de leur liaison (*cis* / *trans*)(93).

### 1.3.2 Effet de la température

Au sein d'une chaîne hydrocarbonée, il existe une libre rotation autour des liaisons C-C. La conformation potentiellement la plus stable est la conformation *trans* (t). Dans une situation où les conformations autour de toutes les liaisons sont de type *trans*, la chaîne est étirée au maximum (conformation « tout-*trans* ») (Fig. 11). Le passage d'une conformation *trans* à une conformation *cis* autour d'une liaison C-C nécessite de l'énergie (quelques kJ). L'agitation thermique peut suffire à y parvenir. Une séquence de conformation ...*trans-trans-cis-trans-cis-trans-trans*...entraîne, au-delà de la conformation *cis*, un changement de la direction de la chaîne. Dans une bicouche lipidique, ceci rend plus difficile un parallélisme des chaînes. Une double liaison en conformation *cis* conduit également à un changement de direction. Notons que ce n'est pas le cas d'une double liaison en conformation *trans* (93).



**Fig. 11** : Les différentes configurations d'une chaîne hydrocarbonée [d'après Shechter (93)]

A une température suffisamment basse, dans des conditions où l'agitation thermique est faible, toutes les chaînes des lipides membranaires ont une conformation tout-*trans*. Dans une organisation en bicouche lipidique, les chaînes sont parallèles les unes aux autres, en contact étroit et étirées au maximum. Cette conformation des chaînes acylées optimisent les attractions de Van der Waals logeant des mouvements moins rotationnels. On parle d'une conformation ordonnée des chaînes ou l'état gel (conformation  $\beta$ ) (5, 67, 93).

Une élévation de température entraîne une mobilité accrue autour des liaisons C-C. La probabilité d'une isomérisation *trans*  $\rightarrow$  *cis* augmente avec la température. Au-delà d'une température donnée, on observe une transition coopérative : les chaînes passent d'une

conformation ordonnée à une conformation désordonnée (conformation  $\alpha$  ou l'état liquide – cristallin). Les isomérisations autour des liaisons des chaînes résultent en une formation des isomères *cis* produisant des nœuds. Dans cette conformation, les chaînes oscillent autour d'une rotation moyenne perpendiculaire au plan de la membrane. Les chaînes ne sont plus tirées au maximum ; en conséquence, par rapport à une situation où la conformation est de type  $\beta$ , l'épaisseur de la bicouche lipidique diminue. Le contact entre les chaînes est moins étroit et les lipides sont plus séparés les uns des autres. Au cours de la transition, il y a une expansion latérale des lipides dans la membrane.

La fluidité membranaire dépend fortement de la conformation des chaînes. Lorsque les chaînes sont ordonnées, les interactions entre elles sont fortes, les mouvements sont limités et la fluidité est donc faible. Le passage à l'état désordonné s'accompagne d'une augmentation importante de la fluidité (93).

### 1.3.3 Effet des ions et du pH

Les cations divalents tels  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  peuvent favoriser la formation de la phase hexagonale inversée ( $\text{H}_{\text{II}}$ ) de certains lipides, comme le cardiolipide et l'acide phosphatidique. En effet, les ions calcium diminuent la répulsion électrostatique entre les têtes polaires chargées négativement du cardiolipide et réduisent ainsi l'aire de la tête polaire. Le phospholipide adopte alors la forme d'un cône, favorable à la formation de phase hexagonale inversée ( $\text{H}_{\text{II}}$ ) (32).

En ce qui concerne le pH, ses effets sur la membrane sont très peu documentés. La perméabilité aux protons est dépendante de l'état physique de la membrane (112). En effet, la fuite des protons, ainsi que le potentiel membranaire, diminuent dans une membrane lysosomale fluidifiée par le benzyl alcool et augmentent dans une membrane lysosomale rigidifiée par le cholesteryl hémisuccinate (112). Autrement dit, la perméabilité aux protons de la membrane lysosomale augmente ou diminue avec l'augmentation ou la diminution de la fluidité de cette membrane.

### 1.3.4 Effet des alcools

Les alcools aliphatiques provoquent une fluidification des membranes. Le pouvoir des alcools est corrélé à leur hydrophobicité, qui augmente avec la longueur de leurs chaînes aliphatiques (95 , 109). L'addition d'alcool dans le milieu augmente la liberté de mouvement à l'intérieur de la membrane (augmentation de la fluidité membranaire), diminue la température de transition de phase  $L\alpha \rightarrow L\beta$  de membranes modèles et diminue l'ordre moléculaire.

L'éthanol est une petite molécule amphiphile qui peut pénétrer et traverser les membranes. Il interagit dans la zone de la tête polaire du phospholipide et au niveau du glycérol. L'éthanol remplace l'eau dans l'établissement des liaisons hydrogènes et provoque une diminution de la force des interactions hydrophobes. L'augmentation de l'aire de surface occupée par chaque phospholipide et la diminution de l'épaisseur de la membrane conduisent à une augmentation de la perméabilité membranaire. Il y a seulement une petite proportion d'éthanol qui se répartit dans la membrane. Quand l'éthanol s'intercale au sein de la partie hydrophobe de la membrane, la polarité de cette zone augmente. Ceci autorise le passage d'autres molécules polaires à travers la barrière semi-perméable que constitue la membrane, ce qui l'affaiblit. L'éthanol augmente la température de transition de phase lamellaire - hexagonale ( $T_{LH}$ ), ce qui a tendance à stabiliser les membranes. En effet, lors de son insertion dans la bicouche au niveau des têtes polaires, l'éthanol augmente l'aire de la tête polaire ce qui va à l'opposé de la formation de phase  $H_{II}$  (109).

### 1.3.5 Composés organiques

Les solvants ou les acides organiques, entraînant une transition de phase de l'état gel à l'état liquide – cristallin, affectent les propriétés physico-chimiques des membranes. Quelques études ont montré qu'il existe une corrélation entre l'hydrophobicité et la partition d'un composé dans une bicouche lipidique et sa toxicité (109). L'hydrophobicité d'un composé est souvent exprimée en termes de  $P_{OW}$ , qui est la partition d'un composé à travers un système à deux phases octanol / eau. Les composés lipophiles, qui possèdent une affinité élevée vis-à-vis des membranes, sont plus toxiques que les composés moins lipophiles. Par exemple, l'éthanol ( $\log P_{OW} = -0,28$ ) est seulement toxique pour les microorganismes à des concentrations élevées (de l'ordre de la mole par litre) alors que les solvants comme le toluène ( $\log P_{OW} = 2,5$ ) sont toxiques même aux concentrations de l'ordre de la milli mole par litre. Cependant, cette corrélation ne s'applique pas aux solvants hydrophobes avec un  $\log P_{OW} > 4 - 5$  (86, 109). Ces solvants sont généralement non toxiques pour les microorganismes.

## **2. Métabolisme bactérien et modification de la composition lipidique de la membrane en fonction des paramètres environnementaux**

### **2.1 Modification de la composition lipidique membranaire : approche physico-chimique**

Bien que des conditions environnementales drastiques soient souvent toxiques pour les microorganismes, ces derniers sont capables de s'adapter et de se développer en présence des agents toxiques ou dans des conditions hostiles (32, 95, 109). Des changements de composition membranaire, induisant des changements de fluidité membranaire, peuvent se définir comme un mécanisme d'adaptation permettant le maintien de l'ordre optimal des lipides dans la membrane ou comme un moyen pour restaurer un équilibre entre des phospholipides lamellaires et non-lamellaires. En réponse à des perturbations, les structures des chaînes acylées des phospholipides membranaires peuvent être modifiées par une modification du ratio : acides gras saturés / acides gras insaturés ; acides gras insaturés *cis* / acides gras insaturés *trans*, acides gras branchés / acides gras non branchés. Il est observé également des modifications dans le type de branches, dans la longueur des chaînes hydrocarbonées et la formation d'acides gras cycliques (32, 109).

#### **2.1.1 Modification du ratio Acides Gras Saturés/Acides Gras Insaturés**

Une modification du ratio acides gras saturés / acides gras insaturés est un mécanisme répandu pour moduler la fluidité membranaire (90). Les membranes bactériennes contenant plus d'acides gras saturés présentent une température de transition de phase plus élevée que celles constituées principalement d'acides gras insaturés (83). Ce comportement peut être expliqué par le fait que la double liaison *cis* dans des acides gras insaturés introduit un nœud dans les chaînes hydrocarbonées, qui permet aux chaînes acylées de mieux s'étendre. Comme la surface transversale des chaînes acylées augmente, le lipide prend la forme conique typique de la phase  $H_{II}$  (48). Il en résulte une mobilité accrue des chaînes acylées qui défavorise les interactions de Van der Waals. La membrane est déstabilisée et change d'état (gel → liquide) à une température plus basse. Les membranes riches en acides gras saturés passent de l'état gel à l'état liquide à une température plus élevée lorsque leurs chaînes acylées linéaires peuvent se mettre « côte à côte » pour optimiser les interactions Van der Waals.

**Exemple : effets de l'éthanol**

Un des changements majeurs de la composition lipidique membranaire en réponse à la croissance en présence d'éthanol est l'augmentation de quantité d'acides gras insaturés observée chez *Escherichia coli* (35, 58) et *Saccharomyces cerevisiae* (2). Cependant, un effet opposé en réponse à l'éthanol est observé chez d'autres microorganismes : une augmentation des acides gras saturés est observée chez *Bacillus subtilis* (8) et *Clostridium acetobutylicum* (106). Apparemment, deux modes d'adaptation au niveau de la membrane se produisent chez les microorganismes : (i) l'incorporation des acides gras insaturés va contrebalancer l'effet de l'éthanol sur la stabilité des bicouches ; (ii) l'incorporation des acides gras saturés va compenser l'effet désordonné des lipides causé par l'éthanol.

Comme précédemment décrit, l'accumulation de l'éthanol et d'autres alcools à courtes chaînes ( $C \leq 3$ ) dans des bicouches lipidiques augmente la température de transition de l'état lamellaire à l'état hexagonal ( $T_{LH}$ ). Apparemment, l'éthanol aurait un effet stabilisant sur la structure de bicouches. Quelques études ont démontré que les microorganismes doivent maintenir un certain ratio de phospholipides en état lamellaire – hexagonal afin de rester viables (43, 88, 110). L'augmentation d'acides gras insaturés observée chez plusieurs microorganismes pourrait compenser l'augmentation de la  $T_{LH}$  induite par l'éthanol, puisque les acides gras insaturés diminuent la  $T_{LH}$  (32, 109).

Chez des microorganismes très résistants à l'éthanol comme *Lactobacillus heterohiochii* et *Lactobacillus homohiochii* qui sont capables de se développer en présence de 20% (v/v) d'éthanol, une augmentation des acides gras insaturés est observée en réponse à la présence de l'éthanol (109). Des changements similaires sont aussi observés chez *E. coli* et *S. cerevisiae* (58, 111).

Les expériences sur des mutants de *E. coli* déficients dans la synthèse d'un acide gras insaturé (C18:1 *cis*) ont démontré l'hypersensibilité à l'éthanol de ces mutants. L'apport de C18:1 *cis* rend ces mutants plus résistants à l'éthanol. Bien que l'incorporation de C18:1 *cis* diminue l'ordre des lipides, cette adaptation est apparemment bénéfique pour acquérir la résistance à l'éthanol puisqu'elle contrebalance l'augmentation de la  $T_{LH}$  due à l'accumulation d'éthanol dans la membrane. Ces résultats suggèrent que le maintien d'un ratio équilibré des phospholipides en état lamellaire - hexagonal joue un rôle primordial pour les cellules comme un mécanisme de défense contre l'éthanol (109).

Pour Silveira *et al.* (31), la réponse des cellules de *Oenococcus oeni* à la présence d'éthanol dans le milieu de culture est une augmentation de l'insaturation des acides gras et une diminution de la quantité totale de lipides. Des études menées sur des cellules de *O. oeni* cultivées en milieu vin ont montré que le rapport acides gras insaturés / saturés ainsi que le rapport protéine / phospholipide augmentent (73). Il est à noter que les études menées chez *O. oeni* sont réalisées dans des milieux de culture différents et ces résultats sont, par conséquent, difficilement comparables.

### **2.1.2 Modification du ratio Acides Gras *cis*/ Acides Gras *trans***

Il a été suggéré que la conformation *cis* est la forme unique des acides gras insaturés chez les microorganismes. Cependant, certaines bactéries contiennent les deux formes d'isomères *cis* et *trans* (54 , 62). Il a été précédemment souligné que les acides insaturés dans une conformation *cis* présentent un encombrement stérique plus important que ceux dans une conformation *trans*. Les acides gras insaturés dans la conformation *trans* se comportent donc comme des acides gras saturés qui se mettent « côte à côte » et occupent moins de volume en créant des membranes plus ordonnées.

Quelques bactéries peuvent isomériser leurs acides gras insaturés de la conformation *cis* à la conformation *trans* (62 , 70 , 71). L'isomérisation de la double liaison *cis* à *trans* est catalysée par une isomérase. En présence de phénol, *Pseudomonas putida* P8 réalise l'isomérisation *cis* à *trans* en l'absence de biosynthèse lipidique *de novo* (34 , 62). Le mode principal de régulation de la fluidité membranaire chez cette bactérie en croissance est dû au changement du ratio acides gras saturés / acides gras insaturés. Quand la croissance est interrompue, l'isomérisation *cis* / *trans* se produit. Ces résultats suggèrent que le changement du ratio d'isomères *cis* / *trans* est un processus énergétiquement économique. La bactérie peut donc utiliser ce mécanisme à court terme pour s'adapter avant que les changements à long terme puissent se mettre en place. Ceci permet aux cellules de se stabiliser, avant la biosynthèse *de novo* des constituants membranaires, un processus qui permet un « ajustement » plus précis de la fluidité membranaire pour différents stress spécifiques (62 , 86).

### 2.1.3 Modification du ratio Acides Gras *iso*/ Acides Gras *anteiso*

Les acides gras branchés augmentent la fluidité de la membrane cytoplasmique lorsqu'ils conservent la capacité de glisser les uns sur les autres car ils ne peuvent former des structures cristallines (32). Le changement des proportions ou de types d'acides gras branchés affecte la fluidité membranaire. Le branchement du groupe méthylé se produit chez des bactéries à Gram positif souvent à la position *iso* ou *anteiso*. La branche méthylée de l'acide gras *anteiso* est localisée au troisième atome de carbone à partir du terminal méthylé alors que la branche *iso*-méthylée est positionnée sur le deuxième carbone à la fin de la chaîne (voir Fig. 2). Ceci confère des propriétés fluidifiantes plus importantes pour les acides gras branchés *anteiso* car ces structures perturbent l'ordre des lipides à une échelle plus large (60). Les branchements *iso* et *anteiso* sont créés par la synthèse *de novo* et la position de branchements ne peut être changée après la synthèse. Suite à une diminution de la température de croissance, les bactéries du genre *Bacillus* augmentent leur proportion de phospholipides membranaires contenant des acides gras ayant une température de fusion plus faible (75). Ceci peut être accompli par une augmentation de la proportion des acides gras branchés *anteiso* (61). Les phospholipides ainsi formés présentent une température de transition de phase ( $T_M$ ) plus faible que ceux formés avec les acides gras correspondants *iso*. Ce mécanisme d'adaptation pourrait être important pour ajuster le niveau de fluidité membranaire permettant la croissance bactérienne à basse température (75). Les acides gras branchés *iso* jouent un rôle important pour des bactéries thermophiles à Gram positif. A hautes températures, en l'absence de ces acides gras, les acides gras saturés *anteiso* produits en large quantité entraînent une fluidité membranaire trop faible pour supporter la croissance cellulaire.

### 2.1.4 Ajustement de la longueur des chaînes lipidiques

Les acides gras à moyennes chaînes présentent des températures de fusion plus faibles que ceux à plus longues chaînes (83). Les chaînes plus longues « enjambent » plus facilement la largeur de la bicouche lipidique en promouvant l'ordre des chaînes acylées, rendant l'environnement membranaire plus rigide. Les chaînes courtes, spécialement celles qui ont moins de 12 carbones, sont incapables d'enjamber la bicouche et ne peuvent former des interactions hydrophobes avec d'autres lipides et protéines (32). Chez la bactérie *Streptococcus mutans*, un agent étiologique des caries dentaires, un changement majeur de la composition des acides gras membranaires a été observé sur cellules cultivées à pH 5,0 (84).

Une proportion d'acides gras à plus longues chaînes est produite en comparaison avec les cellules cultivées à pH 7,0. Les analyses de la composition des acides gras des cellules récupérées à partir des cultures traitées avec du chloramphénicol suggèrent que les changements des acides gras n'exigent pas de synthèse protéique *de novo*. Cependant, les cellules traitées avec un inhibiteur de biosynthèse d'acides gras (la cérulenine) sont incapables de changer le profil d'acides gras et incapables de survivre aux conditions acides de l'environnement.

### **2.1.5 Cyclopropanation des Acides Gras insaturés**

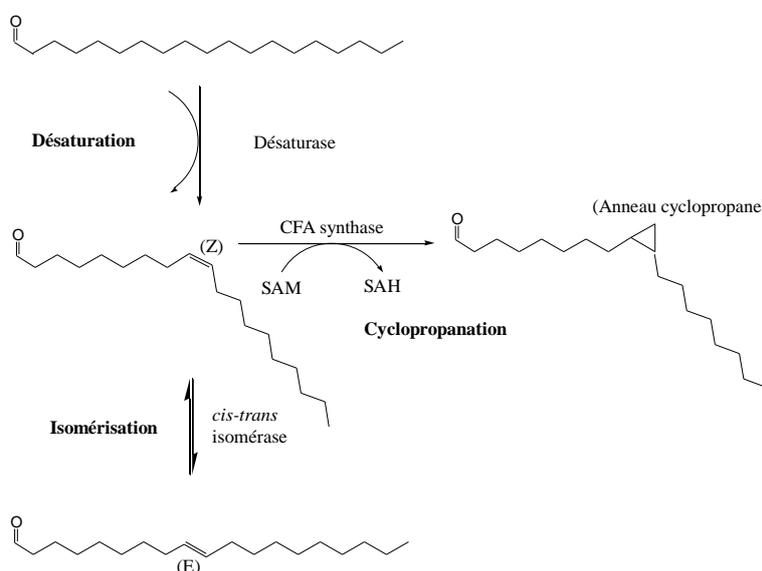
Les acides gras cyclopropanes (CFA pour *Cyclopropane Fatty Acids*) sont largement trouvés chez les bactéries et sont formés par l'addition d'un groupe méthylène, dérivée du groupe méthylé de S-adenosyl-L-méthionine (SAM) à la double liaison carbone-carbone des acides gras insaturés (UFA pour *Unsaturated Fatty Acids*) (47). L'addition de méthylène n'implique pas d'acides gras libres ou de produits intermédiaires de la biosynthèse des phospholipides mais elle utilise des molécules phospholipidiques matures précédemment incorporées dans les bicouches membranaires. Les CFA sont principalement produits au début de la phase stationnaire des cultures bactériennes et la formation des CFA peut être considérée comme une modification post synthétique et conditionnelle dans les bicouches lipidiques membranaires chez les bactéries.

Il a été reporté que les CFA membranaires sont un facteur majeur dans l'acido-tolérance chez *E. coli*. En effet, les cellules prélevées en début de phase stationnaire, en absence de CFA membranaires, sont anormalement acido-sensibles suite à une chute brutale du pH. Cette acido-sensibilité est dépendante des CFA, la résistance au choc acide étant restaurée chez les souches mutantes déficientes dans la synthèse des CFA par l'incorporation de CFA dans le milieu de croissance ou par complémentation des mutants avec un gène *cf*a fonctionnel (19). Les cellules de *E. coli*, prélevées en phase exponentielle de croissance, sont beaucoup plus sensibles à un choc acide que les cultures en phase stationnaire, mais la survie est considérablement augmentée si les cultures en phase exponentielle sont exposées au préalable à des conditions acides modérées (pH 5,0) avant le choc à pH 3,0. Cependant, la survie à un choc acide est fortement dépendante des souches.

Bien que cette modification lipidique ne soit pas le seul mécanisme pour assurer la survie bactérienne, la formation des CFA fournirait une meilleure protection contre les chocs acides. Quelques modèles peuvent être proposés afin d'expliquer le rôle des CFA dans l'acido-

résistance chez *E. coli*. Le rôle le plus important serait une diminution de la perméabilité aux protons de la membrane due à une conversion des acides gras insaturés en CFA (28). Ceci entraîne donc une diminution de la perméabilité aux protons et prévient la pénétration des molécules indésirables dans la cellule. Il est important de noter que les souches pathogènes de *E. coli* ayant une teneur plus importante en CFA sont plus résistantes à l'acidité que les souches non-pathogènes (13).

Okamoto *et al.* (80) ont trouvé une teneur importante de CFA (cycC19:0) chez la bactérie fermentant l'éthanol *Zymobacter palmae*. Le mécanisme de cyclopropanation a été également mis en évidence chez les bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *O. oeni*. Nous détaillerons l'ensemble des résultats obtenus chez ces deux bactéries dans la partie 3 de cette introduction bibliographique.



**Figure 12 :** Modification des doubles liaisons des chaînes acylées des lipides bactériens. La double liaison *cis* (Z) peut être formée par désaturation, isomérisée à une double liaison *trans* (E), ou méthylée pour former un anneau cyclopropane [d'après Cronan (28)]

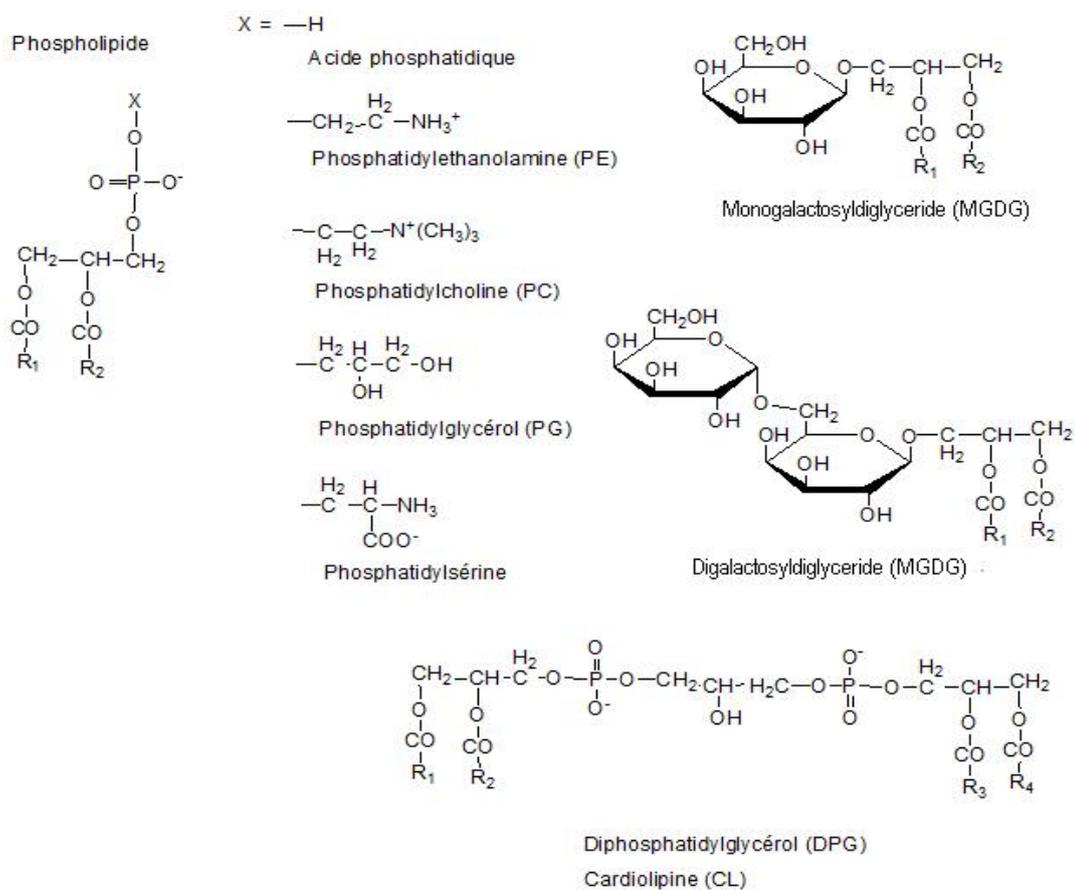
### 2.1.6 Influence d'une modification des têtes polaires des phospholipides

Les têtes polaires présentent aussi une importance majeure sur les propriétés des bicouches lipidiques. Cependant, peu de données sont disponibles sur la composition des têtes polaires en comparaison avec celles traitant de la composition en acides gras. Les têtes polaires des membranes microbiennes généralement déterminées par chromatographie sur couche mince comprennent la phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylglycérol (PG), le diphosphatidylglycérol (DPG) ou la cardiolipine (CL), le monoglucosyldiglycéride (MGDG)

et le diglucosyldiglycérade (DGDG) (109) (Figure 13).

L'implication des phospholipides dans l'adaptation de *E. coli* aux conditions acides a été mise en évidence (17). En phase stationnaire, un mutant PE-déficient de *E. coli* est plus sensible à un choc acide que la souche parentale. Chez les mutants déficients dans la synthèse de PE ou de PG et CL, l'exposition de la culture à un pH acide modéré n'augmente pas la survie au choc acide (17).

Les changements liés à la composition des têtes polaires des phospholipides ont un effet direct sur les propriétés physico-chimiques de la membrane. A un pH neutre, le PG possède la température de transition de phase de l'état gel à l'état liquide-cristallin ( $T_M$ ) la plus faible. Le DPG a la  $T_M$  la plus élevée (109). La différence de  $T_M$  de l'ordre de 25°C à 30°C entre PG et DPG pourrait être biologiquement importante pour compenser le changement de l'ordre des lipides. Cependant, le changement en composition des acides gras a un effet plus prononcé sur la  $T_M$  que le changement des têtes polaires. Par exemple, l'introduction d'une double liaison dans une chaîne d'un phospholipide réduit sa  $T_M$  de l'ordre de 50 – 60°C (109).



**Figure 13** : Structure des phospholipides contenant différentes têtes polaires [d'après Weber et de Bont (109)]

En dehors de l'effet sur la  $T_M$ , les modifications de composition des têtes polaires ont des effets sur la transition de la bicouche de la phase lamellaire à la phase hexagonale ( $T_{LH}$ ). Par exemple, chez la bactérie à Gram négatif *Acholeplasma laidlawii*, le MGDG et le DGDG sont deux (gluco) lipides majeurs et le ratio entre ces deux têtes polaires est affecté par les solvants. L'accumulation de l'éthanol dans la membrane résulte en une augmentation du ratio MGDG/DGDG. En effet, le MGDG a une tête polaire plus petite que le DGDG et le changement du ratio MGDG/DGDG compense l'augmentation de la surface de têtes polaires causée par l'éthanol (109). Le benzène a un effet opposé sur la membrane et entraîne la formation de la phase hexagonale, qui est contrecarrée chez *Acholeplasma laidlawii* par une diminution du ratio MGDG/DGDG (109).

Les mécanismes d'adaptation chez *Pseudomonas putida* (*P. putida*), une bactérie à Gram négatif qui peut se développer en présence de toluène, ont été étudiés (85). En dehors des changements de la composition en acides gras, les changements de la composition phospholipidique sont également observés quand cette bactérie est cultivée en présence de toluène. En fait, le toluène s'accumule près des têtes polaires de la membrane. Par conséquent, il induit la formation de la phase hexagonale inversée ( $H_{II}$ ). *P. putida* réagit à la présence de toluène en diminuant l'incorporation du PE à la membrane. Le PE est un phospholipide avec une surface de têtes polaires relativement petite en comparaison avec le PG et le DPG. La diminution de PE et l'augmentation concomitante de DPG augmentent donc la surface de têtes polaires qui doit compenser l'augmentation du volume lipidique causée par l'accumulation de toluène. Ceci permet de stabiliser la structure de la bicouche. Comme la  $T_M$  du DPG est environ 10 K plus élevée que celle du PE, l'incorporation accrue du DPG a un effet rigidifiant sur la membrane. Il est suggéré que cette incorporation compenserait la diminution de l'ordre des lipide induite par le toluène (85, 109).

## **2.2 Modification de la composition lipidique membranaire : approche biochimique et moléculaire**

### **2.2.1 *Cis-trans* isomérase et le gène *cti***

L'enzyme catalysant l'isomérisation *cis-trans* (Cti pour *cis-trans* isomérase) a été étudiée chez *Pseudomonas* et *Vibrio* (54, 81). Localisée au niveau du périplasma, l'enzyme est constitutive et agit en absence d'une synthèse *de novo* de lipides. Le gène *cti* code pour un polypeptide présentant une extrémité N-terminale hydrophobe, qui est clivée suite au transport de l'enzyme au travers de la membrane cytoplasmique jusqu'à l'espace

périplasmique. Il a été démontré que l'isomérisation n'induit pas de saturation transitoire de la double liaison (54). D'après Cronan (28), le gène *cti* n'est présent que chez les deux genres précédemment cités, ainsi que chez *Nitrosomonas europaea*. Aucun gène *cti* n'a été identifié à ce jour chez les deux bactéries lactiques que nous avons étudiées, *L. lactis* subsp. *cremoris* et *O. oeni*.

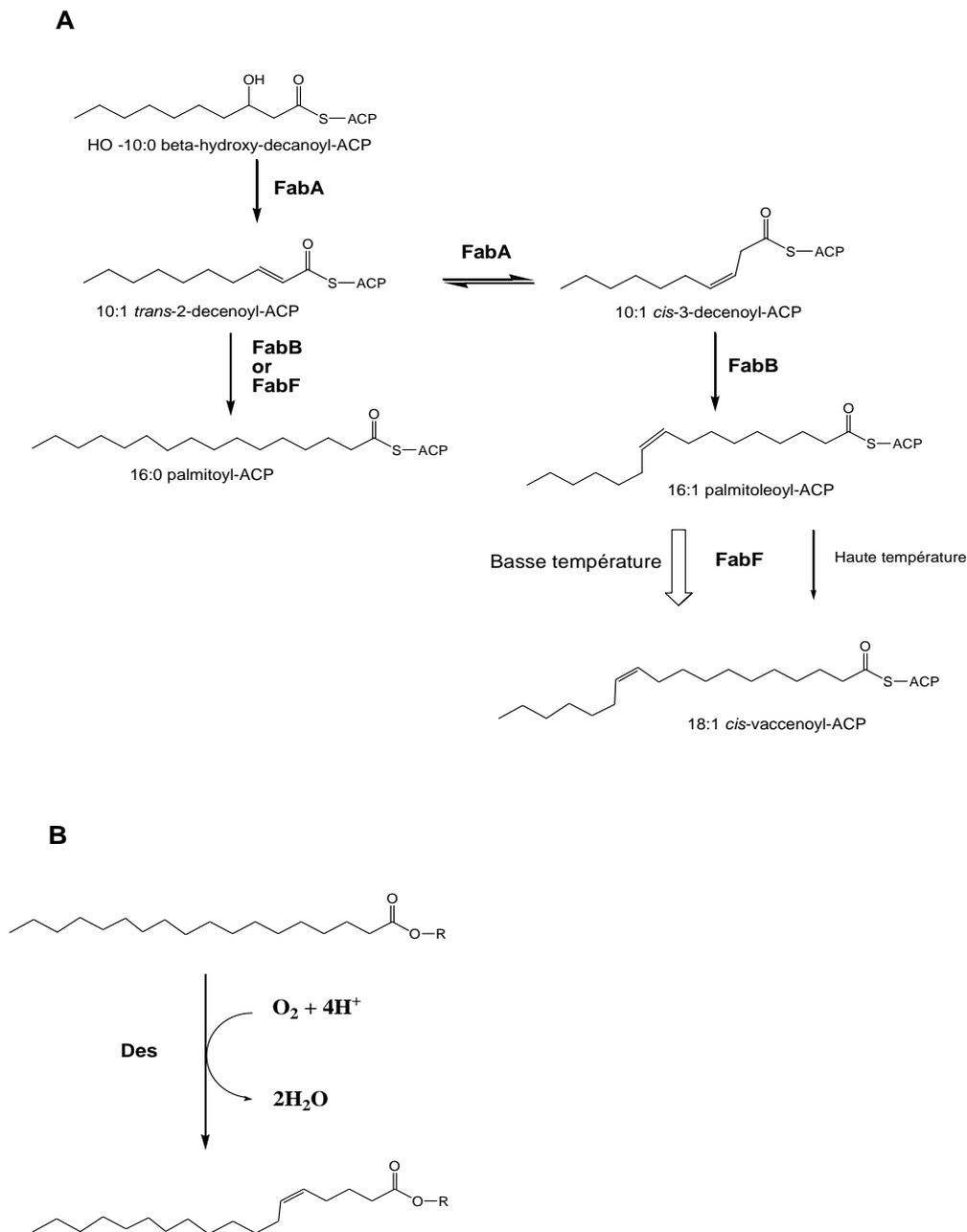
### 2.2.2 Elongation des acides gras et les gènes *fab*

Chez *E. coli*, la synthèse des acides gras insaturés requiert trois enzymes, les produits des gènes *fabA*, *fabB* et *fabF*. FabA,  $\beta$ -hydroxydécanoyl déshydrase, une enzyme clé de la voie anaérobie pour la synthèse des acides gras insaturés introduit une double liaison *cis* (ou *Z*) dans le composé intermédiaire de 10 C. Ce dernier composé est ensuite prolongé par FabB et FabF pour former les acides gras insaturés trouvés dans les lipides membranaires. FabB and FabF sont des 3-ketoacyl-acyl carrier proteins (ACP) synthase (KAS) (souvent considérées comme enzymes condensantes). Elles catalysent l'élongation des acides gras par l'addition d'unités de 2 C à la chaîne acylée (Figure 14).

Les souches de *E. coli* mutées au niveau du gène *fabF* sont incapables de réguler leur teneur en acides gras insaturés mais restent viables à basses températures. L'enzyme FabF est essentielle à la survie de la bactérie *Photobacterium profundus* SS9 à des pressions élevées trouvées dans les fonds sous-marins. Si cette souche présente une interruption du gène *fabF*, elle a une faible croissance à hautes pressions, en relation avec une production diminuée de l'acide *cis*-vaccénique. De plus, la croissance de la souche mutante est restaurée par l'addition d'acide *cis*-vaccénique dans le milieu de croissance (75).

Chez *E. coli*, bien que l'enzyme FabB, catalyse faiblement l'élongation de l'acide palmitoléique pour produire de l'acide *cis*-vaccénique, la surproduction de cette enzyme produit une quantité importante d'acide *cis*-vaccénique dans les lipides membranaires. La surexpression de *fabB* résulte en une accumulation d'acide *cis*-vaccénique même en absence de l'expression de *fabF*. Cependant, cette augmentation est dépendante de la température de culture, montrant que l'enzyme FabF est seule responsable de la modulation thermique de la fluidité membranaire chez *E. coli* (37).

Le gène *fabF* a été mis en évidence dans le génome de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (78). Les principaux résultats obtenus sur le lien entre la fonction de ce gène et la tolérance à l'acidité de la bactérie seront détaillés dans la partie 3 de ce chapitre.



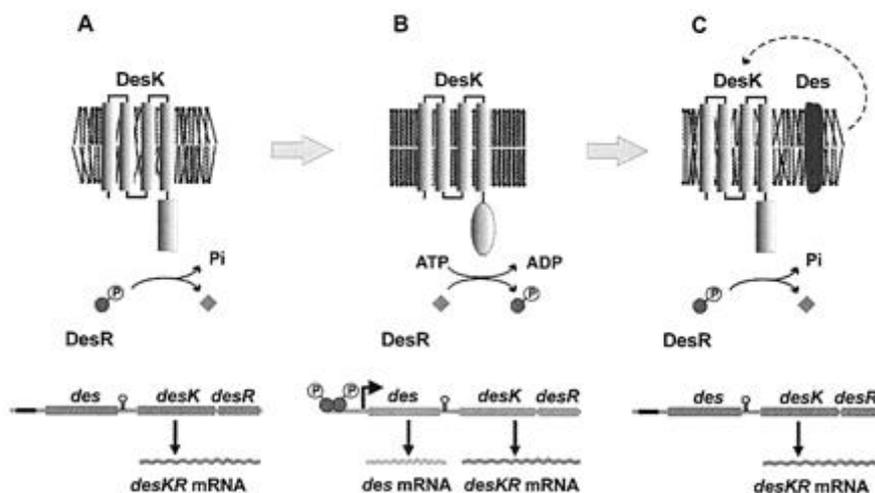
**Figure 14** : Biosynthèse des acides gras insaturés chez *E. coli* (A) et *B. subtilis* (B) [d'après Mansilla *et al.* (75)]

### 2.2.3 Désaturase et le gène *des*

Les cellules du genre *Bacillus* répondent à une baisse de température de croissance en augmentant la proportion des acides gras ayant une faible température de fusion au sein des phospholipides membranaires. Ceci peut être réalisé par la désaturation des acides gras de lipides membranaires ou par l'augmentation des acides gras branchés *anteiso* (75). Le gène *des* code la seule désaturase observée chez *B. subtilis*. Cette enzyme catalyse l'introduction

d'une double liaison à la position  $\Delta 5$  de différents acides gras saturés. Cette protéine est nommée  $\Delta 5$ -Des (75).

Un modèle proposé par Mansilla *et al.* (75) (Figure 15) permet d'expliquer la voie de transduction de signal contrôlant l'induction de  $\Delta 5$ -Des. Il a été suggéré qu'un ou plusieurs domaines de DesK servent de senseur d'un changement de l'ordre des chaînes acylées au sein des lipides membranaires et transmettent cette information au domaine cytoplasmique de la protéine. Ceci permettrait d'ajuster le ratio des activités kinase / phosphatase. Un état phosphatase-dominant est présent quand les lipides membranaires sont désordonnés, résultant en une déphosphorylation du régulateur DesR. Le régulateur non phosphorylé est incapable de se fixer sur le promoteur du gène *des* et, par conséquent, la transcription de *des* est stoppée. Lors que la proportion des lipides membranaires ordonnés est augmentée, l'état kinase-dépendant de DesK est favorisé. La protéine senseur réalise l'autophosphorylation et le groupe phosphorylé est transféré à DesR qui active la transcription de *des*. L'activation de *des* entraîne la synthèse de  $\Delta 5$ -Des qui introduit spécifiquement une double liaison dans les chaînes acylées des lipides membranaires. Ces acides gras insaturés nouvellement synthétisés augmentent la fluidité membranaire des lipides et diminuent l'initiation de la transcription du gène *des* en favorisant l'activité phosphatase de DesK qui déphosphoryle DesR, ce qui stoppe la transcription de *des*.



**Figure 15 :** Transduction des signaux conduisant à l'optimisation de la fluidité membranaire chez *B. subtilis* [d'après Mansilla *et al.* (75)]

#### 2.2.4 Cfa synthase et gène *cfa*

La cyclopropanation des acides gras insaturés est catalysée par une enzyme soluble, la Cfa synthase (Figure 12). Cette enzyme a été découverte dans les années 60 mais plus récemment purifiée chez *E. coli* en dépit de son instabilité. L'enzyme a une masse moléculaire approximative de 90 kD alors que le monomère Cfa a une masse moléculaire approximative de 44 kDa (47). Bien que l'enzyme soit une protéine soluble localisée dans le cytoplasme bactérien, elle catalyse l'addition d'un groupe méthylène de la molécule soluble SAM à la double liaison d'une chaîne d'acide gras insaturé estérifié. Elle agit directement sur les phospholipides au sein des bicouches membranaires. L'association de l'enzyme avec les bicouches phospholipidiques est réversible, nécessitant la présence des chaînes acylées qui ont une géométrie appropriée dans la bicouche. Cette combinaison des propriétés suggère des interactions topologiques lipides - protéines dans la biosynthèse des CFA (47).

La formation des CFA est endergonique. La synthèse d'une molécule S-adenosyl-L-méthionine (SAM) nécessite trois molécules d'ATP chez *E. coli* et la plupart des acides gras insaturés sont convertis en CFA. Les phospholipides contenant des CFA apparaissent généralement en début de phase stationnaire. Chez *E. coli* et d'autres bactéries, seule une petite fraction des acides gras insaturés est cyclisée au cours de la phase exponentielle. Cependant, quand les cultures atteignent la phase stationnaire, ils sont rapidement et presque totalement convertis en CFA. Une augmentation marquée de l'activité de la Cfa synthase est donc observée en début de la phase stationnaire et diminue rapidement ensuite (47).

Plusieurs facteurs environnementaux tels que le pH ou le degré d'aération peuvent influencer la synthèse des CFA. Il a été montré que l'expression du gène *cfa* codant pour la CFA synthase est régulée selon la phase de croissance et ceci est en corrélation avec l'activité de la protéine Cfa synthase. En effet, Wang et Cronan (107) ont montré que la transcription du gène *cfa* démarre à partir de deux promoteurs, P1 et P2. Le promoteur P1 est un promoteur reconnu par le facteur de transcription  $\sigma^{70}$  (RpoD), tandis que le promoteur P2 est reconnu par le facteur sigma de phase stationnaire  $\sigma^S$  (ou  $\sigma^{38}$ ) codé par le gène *rpoS*. Au cours de la phase exponentielle de croissance, la transcription du gène *cfa* est initiée au niveau du promoteur P1  $\sigma^{70}$ -dépendant et diminue lors de l'entrée en phase stationnaire. L'augmentation du taux de CFA observée pendant la phase stationnaire est liée à une augmentation du niveau de transcription du gène *cfa* à partir du promoteur P2 RpoS-dépendant.

La synthèse des CFA et leur rôle dans la réponse au stress acide ont été étudiés chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (63). Le mutant  $\Delta cfa$  est sensible à bas pH. Ce mutant complémenté avec un gène *cfa* fonctionnel peut convertir tous les acides gras insaturés en CFA mais l'acido-résistance du mutant complémenté n'est que partiellement restaurée. Des expériences de Western blots ont démontré que l'augmentation de la synthèse de la protéine Cfa synthase en début de phase stationnaire est due au facteur sigma alternatif RpoS (63).

Chez la bactérie à Gram positif *Clostridium acetobutylicum*, la fonction du produit du gène *cfa* a été confirmée par complémentation d'un mutant de *E. coli*  $\Delta cfa$  (113). La surexpression du gène *cfa* dans la souche parentale augmente la teneur en CFA au début de la phase exponentielle de croissance ainsi que sa résistance à l'acidité et au butanol. Cependant, la production des solvants (acétone et butanol) de la souche surexprimant le gène *cfa* diminue. Ces résultats suggèrent que la surexpression du gène *cfa* résulte en un changement de l'organisation membranaire qui affecte la production des solvants chez cette bactérie. De plus, le gène *cfa* de *Clostridium* est situé en aval d'un gène *marR*-like dont la surexpression entraîne une accumulation réduite de CFA. Ces résultats laissent suggérer que l'expression du gène *cfa* de *Clostridium acetobutylicum* est régulée par un autre mécanisme que celui décrit chez *E. coli* (113).

Le gène *cfa* a été identifié dans le génome des deux bactéries lactiques modèles de notre travail, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et *O. oeni*. Les données bibliographiques sont recensées dans la partie 3 de ce chapitre.

### **3 Les bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *Oenococcus oeni***

#### **3.1 Généralités**

De nombreuses des bactéries lactiques sont des organismes d'intérêt industriel. La particularité physiologique de ces bactéries est leur grande tolérance à l'acidité du milieu. Ainsi, leurs capacités à produire et à tolérer de fortes concentrations en acide lactique en font un bon outil de technologie industrielle. Elles sont utilisées pour la transformation et la conservation de nombreux produits alimentaires d'origine animale (lait, produits carnés et de la pêche) et végétale (pain, ensilage, bière, vin, ..). Elles confèrent à ces produits des qualités organoleptiques (arôme, saveur) et nutritionnelles tout en inhibant le développement de bactéries pathogènes.

Par leur capacité à pouvoir utiliser les différents constituants alimentaires, les bactéries lactiques peuvent aussi constituer des agents d'altération des aliments en modifiant leur goût, leur couleur ou encore leur texture. Certaines de ces bactéries constituent la flore naturelle de l'homme et des animaux et présentent des aspects bénéfiques pour la santé en tant que probiotiques.

### **3.1.1 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (MG1363)**

Les Lactocoques sont des bactéries lactiques mésophiles. Isolées des produits végétaux, les cellules bactériennes se regroupent généralement en paires ou en courtes chaînettes. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* est une bactérie homofermentaire, anaérobie-facultatif.

Cette bactérie a été sélectionnée pour être utilisée dans les fermentations des produits laitiers, en fonction de sa stabilité métabolique, de sa résistance aux bactériophages et de sa capacité à produire des métabolites d'intérêt à partir notamment de la caséine et du lactose.

Parmi les Lactocoques, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 est une souche modèle particulièrement étudiée, notamment en ce qui concerne les mécanismes moléculaires impliqués dans l'Acid Tolerance Response (16).

### **3.1.2 *Oenococcus oeni* (ATCC BAA-1163)**

Lors de la vinification, la bactérie lactique principalement majoritaire en fin de fermentation alcoolique est *Oenococcus oeni* (*O. oeni*) (77). Principale actrice de la fermentation malolactique (FML), cette bactérie, anaérobie facultative, se présente sous forme de coques associées en chaînettes. Hétérofermentaire, elle métabolise le glucose en éthanol, acide acétique, acide D-lactique et CO<sub>2</sub> par la voie des pentoses phosphates (40). C'est une bactérie acidophile, dont le pH optimal de croissance se situe entre 4,5 et 5,3. Certaines souches tolèrent des valeurs de pH de l'ordre de 3,0. *O. oeni* peut également se développer en présence de fortes concentrations en éthanol (14% v/v), ainsi qu'en présence de SO<sub>2</sub>, agent antioxydant utilisé en vinification (87).

La FML correspond à la transformation de l'acide L-malique (diacide) en acide L-lactique (monoacide), avec production de CO<sub>2</sub>. Cette étape importante influence la qualité du vin. Elle confère au vin de la souplesse par désacidification (72). De plus, l'appauvrissement du vin en sources carbonées de par le développement bactérien, assure la stabilité microbiologique du vin, après FML. Les propriétés organoleptiques du vin sont également améliorées par la production, par *O. oeni*, de métabolites issus du métabolisme du citrate (69, 77).

La souche *O. oeni* ATCC BAA-1163 a été isolée sur un vin de Bordeaux. Elle est la souche de référence au laboratoire.

## 3.2 Modifications de la composition lipidique membranaire chez *L. lactis* subsp. *cremoris* et *O. oeni* en réponse à un stress

### 3.2.1 Les gènes *fabF* et *cfa* chez *L. lactis* subsp. *cremoris*

Parmi les gènes *fab* impliqués dans la synthèse des acides gras et identifiés dans le génome de *L. lactis* subsp. *cremoris* (9), le gene *fabF*, codant pour la 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase FabF, a été plus particulièrement étudié. La protéine FabF est responsable de l'élongation du C16:1 n-7 (acide palmitoléique) en C18:1 n-7 (acide cis-vaccénique). En se basant sur la caractérisation protéomique de "l'Acid Tolerance Response (ATR)" chez *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (15), FabF n'apparaît pas surproduite lorsque les cellules sont cultivées en conditions acides (pH 5,0). Cependant, la synthèse de cette protéine est induite chez deux mutants acido-resistants de *L. lactis* subsp. *cremoris* (16), suggérant aux auteurs que le mécanisme d'élongation de l'acide palmitoléique serait impliqué dans l'adaptation de la bactérie à un environnement acide. Les travaux de Morgan-Kiss et Cronan (78) ont démontré que l'expression de FabF chez *L. lactis* subsp. *cremoris* peut remplacer fonctionnellement les protéines FabB et FabH de *E. coli*. Cependant, cette expression ne permet pas de restaurer la thermo-régulation de la composition en acides gras membranaires chez les mutants de *E. coli*  $\Delta fabF$ .

La prédominance des acides gras cycliques membranaires par rapport aux acides gras insaturés et saturés a précédemment été observée chez les bactéries soumises à un stress osmotique ou à un stress hypothermique (38, 99). Des expériences de Northern blots ont montré que le gène *cfa* de *L. lactis* subsp. *cremoris* était principalement exprimé sous forme d'un transcrite bicistronique avec le gène *metK* codant pour la synthase de S-adénosyl-L-méthionine. La transcription de l'opéron s'avère être fortement induite par l'acidité et lorsque les cellules entrent en phase stationnaire de croissance (14). De plus, l'analyse protéomique développée pour caractériser l'ATR chez *L. lactis* subsp. *cremoris* souligne que la Cfa synthase pourrait être considérée non seulement comme un facteur clé de la tolérance à l'acidité chez les Lactocoques, mais également comme une protéine générale de stress (16).

### 3.2.2 Cyclopropanation des acides gras insaturés chez *O. oeni* et mise en évidence du gène *cfa*

Teixeira *et al.* (101) ont observé une augmentation du pourcentage de l'acide lactobacillique (cycC19:0 n-7) aux dépens de l'acide *cis*-vaccénique (C18:1 n-7) lorsque la bactérie était cultivée en présence de 8% v/v d'éthanol. Dans ces conditions, la bactérie résiste mieux à une croissance en présence d'une forte concentration en éthanol. Les auteurs suggèrent donc que l'augmentation de la proportion d'acide lactobacillique dans la membrane de *O. oeni* protège la bactérie contre l'effet toxique de l'éthanol en contrecarrant l'augmentation de la fluidité membranaire attribuée à l'éthanol (101).

Les données obtenues au laboratoire (44) confirment ces données. De plus, les cellules de *O. oeni* prélevées en phase stationnaire de croissance sur milieu optimal ou prélevées en phase exponentielle de croissance à pH acide (3,5) augmentent leur concentration en CFA aux dépens de l'acide oléique, de la même manière que sur cellules cultivées en présence de 8% v/v d'éthanol.

La quantification des ARNm du gène *cfa* de *O. oeni* a été réalisée dans les conditions suivantes : phase exponentielle et stationnaire de croissance sur milieu optimal ; phase exponentielle sur milieu contenant 8% (v/v) d'éthanol ; phase exponentielle sur milieu acidifié à pH 3,5 (44). L'augmentation du taux de transcrits du gène *cfa* observée sur cellules en phase stationnaire, comme sur cellules cultivées en présence d'éthanol ou à pH acide peut être corrélée à l'augmentation de la synthèse de CFA précédemment observée. Ces résultats suggèrent que l'expression du gène *cfa* serait régulée au niveau transcriptionnel. La protéine Cfa synthase de *O. oeni* serait donc, comme chez *L. lactis*, une protéine clé dans la réponse au stress.

La fonction du gène *cfa* de *O. oeni* a été confirmée par complémentation hétérologue d'un mutant de *E. coli*  $\Delta cfa$  (44). Cependant, l'expression du gène *cfa* de *O. oeni* ne permet qu'une cyclisation partielle des acides gras insaturés chez la bactérie hôte, vraisemblablement due à une différence de pH intracellulaire chez les deux bactéries. L'hypothèse d'une spécificité de l'enzyme Cfa synthase de *O. oeni* vis-à-vis des acides oléique et *cis*-vaccénique est également posée.

Dans la perspective de mieux appréhender le rôle physiologique des acides gras cycliques membranaires chez les bactéries lactiques, en relation avec l'adaptation à leur environnement, nous avons choisi de poursuivre notre investigation en exprimant le gène *cfa* de *O. oeni* chez une bactérie lactique, plus proche phylogénétiquement. En effet, même si il existe à présent des outils pour transformer la bactérie (3), il nous est encore impossible d'envisager de façon réaliste une stratégie d'élaboration de mutants ciblés chez cette bactérie. Pour une approche en système hétérologue, notre choix s'est porté sur la bactérie lactique modèle *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 dont le génome est totalement séquencé et pour laquelle nous disposions d'un mutant *cfa*-déficient (14, 16).

Dans un premier temps, une étude physiologique de ce mutant complémenté a été réalisée (Chapitre 1 – Résultats-Discussion). Cependant, de part la stratégie de construction de la souche mutante, un effet polaire sur le gène *metK* situé en aval du gène *cfa* pouvait être supposé. Afin d'éviter tout effet pléiotropique de cette mutation, même après avoir complémenté ce mutant, nous avons choisi de générer un autre mutant, mutant  $\Delta cfa$  chez la bactérie hôte. Une première étude a porté sur l'analyse physiologique comparative entre la souche parentale, la souche mutée et la souche complémentée par le gène *cfa* de *L. lactis* subsp. *cremoris* (Chapitre 2 – Résultats-Discussion). Enfin, dans un troisième chapitre (Chapitre 3 – Résultats-Discussion), la complémentation hétérologue du mutant  $\Delta cfa$  de *L. lactis* subsp. *cremoris* a été réalisée. Une étude comparative de cette souche avec la souche parentale a été menée au niveau physiologique. La surproduction chez *E. coli* et la purification de la Cfa synthase de *O. oeni* ont permis de compléter cette étude par la caractérisation biochimique de cette enzyme *in vitro*.

## MATERIELS ET METHODES

### 1 Souches bactériennes, plasmides et conditions de cultures

#### 1.1 Souches bactériennes utilisées

Les souches bactériennes utilisées dans ce travail sont présentées dans le Tableau 2.

**Tableau 2** : Souches utilisées

Souches	Caractéristiques	Origine
<i>Oenococcus oeni</i>		
ATCC BAA-1163	Souche de laboratoire, van <sup>R(1)</sup>	Laboratoire ReVV, Dijon
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>		
MG1363	Souche parentale dérivée de <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NCDO 712 par curage plasmidique	INRA de Jouy en Josas
MG1363 $\Delta cfa$	Mutant <i>cfa</i> déficient, dérivé de MG1363 par délétion d'une région interne du gène <i>cfa</i>	Cette étude
MG1363 pDL278	Souche MG1363 recombinée avec le plasmide pDL278, spec <sup>R</sup>	Cette étude
MG1363 pGC20	Souche MG1363 recombinée avec le plasmide pGC20, spec <sup>R</sup>	Cette étude
MG1363 $\Delta cfa$ pDL278	Souche MG1363 $\Delta cfa$ recombinée avec le plasmide pDL278, spec <sup>R</sup>	Cette étude
MG1363 $\Delta cfa$ pGC20	Souche MG1363 $\Delta cfa$ recombinée avec le plasmide pGC20, spec <sup>R</sup>	Cette étude
MG1363 <i>cfa</i> <sup>-</sup>	Dérivée de MG1363 par intégration du vecteur pORI19 dans le gène <i>cfa</i> ( <i>cfa</i> ::pORI19), cm <sup>R</sup>	INRA de Jouy en Josas
MG1363 <i>cfa</i> <sup>-</sup> pDL278	MG1363 <i>cfa</i> <sup>-</sup> recombinée avec le plasmide pDL278, kan <sup>R</sup> , spec <sup>R</sup>	Cette étude
MG1363 <i>cfa</i> <sup>-</sup> pGC20	MG1363 <i>cfa</i> <sup>-</sup> recombinée avec le plasmide pGC20, kan <sup>R</sup> , spec <sup>R</sup>	Cette étude
<i>Escherichia coli</i>		
BL21 $\lambda$ DE3	<i>F</i> <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) <math>\lambda</math>(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Laboratoire ReVV, Dijon
K12 ER2738	<i>F</i> <sup>'</sup> <i>proA<sup>+</sup> B<sup>+</sup> lacI<sup>f</sup> <math>\Delta</math>(lacZ)M15 zcf::Tn10(Tet<sup>R</sup>)/ fhuA2 glnV <math>\Delta</math>(lac-proAB) thi-1 <math>\Delta</math>(hsdS-mcrB)5</i>	Laboratoire ReVV, Dijon
EC101	<i>E. coli</i> JM101 ( <i>supE thi (lacproAB) (F' traD36 proAB lacI<sup>f</sup> <math>\Delta</math>M15)</i> ) portant le gène <i>repA</i> de pWV01 intégré au chromosome	Laboratoire ReVV, Dijon
BL21 pMT2-ht	BL21 $\lambda$ DE3 recombinée avec le vecteur pMT2-ht	(103)

van<sup>R</sup> : résistance à la vancomycine

kan<sup>R</sup> : résistance à la kanamycine

spec<sup>R</sup> : résistance à la spectinomycine

cm<sup>R</sup> : résistance au chloramphénicol

La souche de *O. oeni* est cultivée en milieu FT80m à 30°C (18) en présence de vancomycine (15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Les souches de *L. lactis* subsp. *cremoris* sont cultivées en milieu M17/7 (14) consistant en la complémentation du milieu M17 par 0,5 % de glucose et le remplacement du  $\beta$ -disodium glycérophosphate par du MOPS (3-N-morpholino propane sulfonic acid) 200 mmol.L<sup>-1</sup>. Le pH est ajusté à 7,2 par NaOH 6N. Les souches sont cultivées à 30°C soit en milieu liquide,

soit en milieu gélosé en présence ou non d'antibiotique (spectinomycine 1 mg.mL<sup>-1</sup>, chloramphénicol 5 µg.mL<sup>-1</sup>).

Les souches de *E. coli* sont cultivées en milieu Luria Broth (6) à 37°C sous agitation (150 rpm), en présence ou non de l'antibiotique adéquate (kanamycine 50 µg.mL<sup>-1</sup>, ampicilline 100 µg.mL<sup>-1</sup> ou érythromycine 150 µg.mL<sup>-1</sup>). La souche BL21 a été utilisée pour la surproduction de protéines recombinantes *via* le système pET. Les souches K12 ER2738 et EC101 ont été utilisées pour les expériences de clonage, plus spécifiquement pour la construction de plasmides dérivés du pGID023 concernant la souche EC101.

## 1.2 Plasmides

Les plasmides employés dans ce travail sont décrits dans le tableau 3.

**Tableau 3** : Plasmides utilisés et construits

Plasmides	Taille	Caractéristiques	Origine
pDL278	6,6 kpb	Vecteur répliatif chez <i>L. lactis</i> , spec <sup>R</sup>	(21)
pGC20	8,0 kpb	Plasmide dérivé du pDL278 par clonage du gène <i>cfa</i> de <i>O. oeni</i> , spec <sup>R</sup>	(Grandvalet, personal communication)
pGID023	8,2 kpb	mls <sup>R</sup> , ori Ts	(55)
pTMH1	8,6 kpb	pGID023 dans lequel a été cloné le gène <i>cfa</i> de la souche MG1363 contenant une deletion de 28pb, ery <sup>R</sup>	Ce travail
pMT2-ht	6,77 kpb	pET28a(+) dans lequel la phase codante du gène <i>cfa</i> de <i>O. oeni</i> a été clonée aux sites NdeI/EcoRI pour la production d'une Cfa synthase fusionnée en C-terminal à 6 résidus histidine, kan <sup>R</sup>	(103)
pET28a(+)	5,37kpb	kan <sup>R</sup>	Novagen
pUC19	2,68kpb	amp <sup>R</sup>	Novagen

mls<sup>R</sup>: cassette de résistance aux macrolides (érythromycine et lincomycine à 10 µg.mL<sup>-1</sup> chez les Gram positifs ; 150 µg.mL<sup>-1</sup> chez *E. coli*).

kan<sup>R</sup>: cassette de résistance à la kanamycine (1mg.mL<sup>-1</sup>)

amp<sup>R</sup>: cassette de résistance à l'ampicilline (100 µg.mL<sup>-1</sup>)

ery<sup>R</sup>: cassette de résistance à l'érythromycine

spec<sup>R</sup>: cassette de résistance à la spectinomycine

ori Ts : Origine de répliation thermosensible chez les Gram positifs

## 1.3 Application de chocs et mesure de la viabilité

### 1.3.1 Chocs sans adaptation préalable des cellules

A partir de précultures, les souches de *L. lactis* subsp. *cremoris* sont ensemencées (absorbance initiale à 600 nm = 0,05) en milieu M17/7 puis incubées à 30°C. Les cellules sont prélevées à différents temps afin de réaliser le stress à différents stades de la croissance (voir partie Résultats-Discussion).

Deux types de chocs sont effectués : choc acide et choc éthanolique. Ils sont réalisés sur un volume de 10 ml de culture. Les cellules sont centrifugées à température ambiante puis resuspendues dans 10 ml de M17/3 ou 10 ml de M17/7 additionné de 15% v/v d'éthanol. Les suspensions cellulaires sont prélevées après différents temps de chocs : T = 0 min, T = 1,5 h et T=3 h. Des dilutions décimales de ces cultures sont réalisées en milieu M17/7 puis 10µl de chaque dilution sont étalés sur milieu gélosé M17/7 spectinomycine (1mg.mL<sup>-1</sup>).

### 1.3.2 Chocs sur cellules pré-adaptées à l'acidité

A partir de précultures en milieu M17/7, les souches de *L. lactis* subsp. *cremoris* sont ensemencées en milieu M17/7 ajusté à pH 5 (absorbance initiale à 600 nm = 0,05), puis incubées à 30°C. Les cellules sont prélevées en phase exponentielle de croissance (T = 150 min) ou en phase stationnaire (T = 400 min) avant de subir les chocs acide et éthanolique, comme décrit précédemment.

### 1.3.3 Chocs sur cellules pré-adaptées à l'éthanol

A partir de précultures en milieu M17/7, les souches de *L. lactis* subsp. *cremoris* sont ensemencées en milieu M17/7 enrichi avec 6 % (v/v) d'éthanol (absorbance initiale à 600 nm = 0,05), puis incubées à 30°C. Les cellules sont prélevées en phase exponentielle de croissance (T = 150 min) ou en phase stationnaire (T = 400 min) avant de subir les chocs acide et éthanolique, comme décrit précédemment.

### 1.3.4 Mesure de la viabilité

Les déterminations de la viabilité cellulaire sont réalisées par la méthode des UFC (Unité Formant Colonies). Les suspensions cellulaires sont prélevées après différents temps de traitement et diluées en eau physiologique selon des dilutions appropriées qui sont ensuite étalées sur boîtes de Pétri contenant du milieu gélosé M17/7 additionné du spectinomycine

(1000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Les boîtes sont incubées 24 h à 30°C. La viabilité est déterminée sur suspensions cellulaires choquées ou non choquées (témoin). Chaque expérience est réalisée en triplicat.

## 2. Extraction et analyse des résidus d'acides gras membranaires

Les lipides totaux sont extraits des souches de *L. lactis* subsp. *cremoris* à partir de cellules, adaptées ou non adaptées, récoltées en phase exponentielle ou en phase stationnaire de croissance.

Les lipides sont extraits au chloroforme/méthanol (1:2) selon la méthode de Bligh et Dyer (7) puis méthylés (méthanol à 3% d'acide sulfurique) pendant 2 h à 82°C. Les esters méthylés obtenus sont ensuite analysés par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG). Les analyses sont effectuées sur un chromatographe Chrompack CP 9001 équipé d'un injecteur et d'un détecteur à ionisation de flamme FID. Les échantillons sont analysés sur une colonne capillaire factor four Varian (30 m x 0,32 mm). La température du détecteur et de l'injecteur sont fixées à 230°C et 220°C, respectivement. La température initiale du four est de 160°C pendant 10 minutes et augmente ensuite à raison de 2°C /min jusqu'à 180°C. Les esters d'acides gras sont identifiés en comparant leur temps de rétention à ceux de composés standards (Nu Check Prep., Elysian, MN, USA). Le pourcentage de chaque constituant est calculé à partir de l'aire du pic obtenu (rapport aire du pic/ somme des aires de tous les pics) ou en relation avec un standard interne, l'acide pentadecanoïque (C15:0). Les résultats sont exprimés en % massique ou molaire. Chaque détermination a été réalisée en triplicat.

Afin de compléter la détermination de l'ensemble des pics obtenus, une estérification méthylique en condition basique a été réalisée, avant analyse en CPG (travaux réalisés sur la Plate-forme Lipides Arômes (CSGA – INRA Dijon). La dérivation des lipides complexes sous forme d'esters méthyliques est effectuée par trans-estérification directe des acides gras des phospholipides, triglycérides, diglycérides, monoglycérides par le méthoxyde de sodium. Les lipides totaux sont estérifiés dans une solution toluène - méthalonate de sodium 0,5 N pendant 30 minutes à 50°C. Les esters méthyliques sont ensuite lavés et récupérés dans la phase hexanique.

### **3. Détermination de la structure moléculaire des acides gras par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-MS)**

Les dérivations DMOX, ainsi que les analyses CPG-MS ont été réalisées en collaboration avec la Plate-forme Lipides Arômes (CSGA – INRA Dijon).

Les dérivés DMOX sont préparés par une simple réaction « one-pot ». Les lipides totaux sont convertis en dérivés DMOX par un traitement avec le 2-amino-2-méthylpropanol dans un tube fermé à 180°C pendant 18 h. Le mélange de réaction est ensuite refroidi, puis dissous dans le dichlorométhane, puis lavé deux fois avec 1 mL d'eau distillée. Après évaporation de la phase organique, le solvant est enlevé sous flux d'azote, puis l'échantillon est dissous dans l'hexane.

### **4. Mesure instantanée de la variation de la fluidité membranaire**

Les travaux précédemment menés au laboratoire ont permis de proposer un protocole de mesure de la fluidité membranaire sur cellules bactériennes entières par mesure d'anisotropie de fluorescence avec la sonde hydrophobe 1, 6-diphényl-1, 3, 5-hexatriène (DPH) (Molecular Probes, Oregon, USA). Ce protocole présente l'avantage de pouvoir mesurer les variations instantanées de fluidité sur cellules directement choquées au cours de la mesure. Le protocole initialement proposé a été adapté aux cellules de *L. lactis* subsp. *cremoris*. Les cellules cultivées sur milieu M17/7 sont récoltées en milieu de phase stationnaire (absorbance à 600 nm ( $Abs_{600} = 2,6 \sim 2,7$ )). La culture est centrifugée pendant 10 min à  $6300 \times g$ , à température ambiante. Le culot est ensuite lavé dans le tampon 2-[N-Morpholino] ethanesulfonic acid (MES) - KOH 50 mM contenant 10 mM glucose (pH 7,2) puis resuspendu dans le même tampon. La suspension cellulaire est ajustée à une  $Abs_{600}$  de 0,6 pour chaque mesure. La concentration finale de la sonde DPH est fixée à 3  $\mu M$ . Ce ratio cellules / sonde (0,24 mg poids sec / 3  $\mu M$ ) ainsi déterminé nous permet d'avoir un rapport approprié entre les intensités de fluorescence de la suspension cellulaire avec sonde ou sans sonde (rapport de l'ordre 8~10 / 1). La température est fixée à 30°C.

Les mesures sont réalisées sur le spectrofluoromètre (FLUOROLOG-3, Jobin Yvon, Inc. USA). Les valeurs d'anisotropie  $r$  sont automatiquement calculées, selon Shinitzky *et al.* (94). Elles sont mesurées toutes les 8 secondes. Les valeurs  $r$  sont inversement proportionnelles à la

fluidité membranaire. Ceci veut dire que la membrane plasmique est d'autant fluide que la valeur d'anisotropie est faible. Le temps total de mesure est fixé à 15 min. Sur cette durée, nous avons précédemment vérifié que les cellules bactériennes sont totalement viables dans la suspension en présence de la sonde DPH. Le glucose présent dans le tampon permet le maintien de la viabilité cellulaire. Chaque mesure est faite de manière indépendante au minimum cinq fois.

Les variations instantanées d'anisotropie de fluorescence ont également été mesurées en continu sur cellules traitées par l'éthanol. L'éthanol est en effet connu pour son effet instantanément fluidifiant sur la membrane. Dans ce cas, après 10 minutes d'incubation, un volume d'éthanol est directement ajouté dans la cuve, de manière à avoir une concentration finale de 18% éthanol (v/v).

## **5. Techniques de manipulation des acides nucléiques**

### **5.1 Extraction de l'ADN total**

Les cellules bactériennes, cultivées en milieu approprié (FT80m pour *O. oeni*, M17/7 pour *L. lactis* subsp. *cremoris*), sont récoltées par centrifugation au cours de la phase de croissance. Le culot cellulaire est lavé avec du Tris-HCL 10 mM, pH 8,0, puis repris dans 400 µl d'une solution de Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contenant 25 mM d'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA), 2% de glucose, 20 mg.ml<sup>-1</sup> de lysozyme. L'incubation est de 3 h à 37°C. Le mélange est ensuite placé 10 min à 60°C en présence de SDS (2% m/v). Après ajout de NaClO<sub>4</sub> 1 M, l'ADN est extrait au phénol-chloroforme et précipité par ajout d'éthanol pur à -20°C. L'ADN est ensuite resuspendu dans du Tris-HCl 100 mM, pH 8,5 et la concentration est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm (1 unité Abs<sub>260</sub> = 50 µg.ml<sup>-1</sup> d'ADN).

### **5.2 Extraction de l'ARN total**

Une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance est centrifugée puis lavée en eau DMPC (eau traitée avec 0,1% de diméthylpyrocarbonate avant autoclavage pour inactiver les RNases). Le culot cellulaire est repris dans 1 ml de Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) et les cellules sont cassées au disrupteur Precellys®24 (Bertin Technology) par deux 2 cycles de 30 secondes à 6 000 rpm, en présence de 200 mg de billes de verre (diamètre 70 / 100 µm). Les ARN sont ensuite extraits au phénol-chloroforme, précipités à l'isopropanol et resuspendus en eau DMPC. La concentration des ARN est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm. Une unité Abs<sub>260</sub> = 40 µg.ml<sup>-1</sup> d'ARN.

## 5.3 Réverse Transcription PCR (RT-PCR) et Réverse Transcription PCR quantitative (qRT-PCR)

### 5.3.1 RT-PCR

Deux  $\mu\text{g}$  d'ARN totaux sont traités à la désoxyribonucléase I (DNase I) dans un volume final de 30  $\mu\text{l}$ , pendant 30 min, à 37°C, suivant les recommandations du fournisseur (Invitrogen). De l'EDTA (2,5 mM) est ajouté et le mélange est placé 10 min à 65°C afin d'inactiver la DNase. Deux microlitres du mélange sont conservés pour vérifier par PCR que l'ADN a bien été digéré. Le reste est utilisé pour la réaction de transcription inverse, réalisée à l'aide de l'iScript<sup>TM</sup> reverse transcriptase (Bio-rad) selon les recommandations du fournisseur.

### 5.3.2 qRT-PCR

Les qRT-PCR sont réalisées sur un appareil BioRad-I-Cycler. Quatre dilutions en cascade d'ADNc sont réalisées puis 5  $\mu\text{l}$  d'ADNc sont ajoutés à 20  $\mu\text{l}$  de mélange de PCR (12,5  $\mu\text{l}$  de IQ<sup>TM</sup>SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (BioRad), 5,5  $\mu\text{l}$  d'eau, 1  $\mu\text{l}$  de chaque amorce à 7 mM). Le programme d'amplification est constitué d'une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 3min, suivie de 38 cycles composés d'une étape de dénaturation de 15 s à 95°C et d'une étape d'hybridation et d'élongation de 30 s à 60°C. La mesure de fluorescence par un agent fluorescent non spécifique qui se fixe à l'ADN (SYBR<sup>®</sup> Green I) se réalise à chaque étape d'hybridation. A la fin du programme, une étape supplémentaire de mesure de fluorescence entre 90°C et 60°C par incrément de 0,05°C est réalisée pour établir une courbe de fusion. La quantification des ARNm est calculée par la méthode du seuil critique ( $\Delta\Delta C_T$ ) dans laquelle la quantité d'ADNc cible est ajustée par rapport à une référence, constituée par la quantité d'ADNc du contrôle interne, pour *L. lactis* subsp. *cremoris* et dans les conditions testés, nous utilisons le gène *butB*.

## 5.4. Technique de transformation génétique

### 5.4.1 Technique au chlorure de calcium

Cette technique consiste à faire rentrer l'ADN *via* une co-précipitation  $\text{CaCl}_2/\text{ADN}$  qui adhère à la surface des cellules. Elle est basée sur le fait que les cations divalents tels que le calcium ou le magnésium favorisent la pénétration de l'ADN dans les cellules. Elle nécessite d'autre part d'utiliser des cellules adhérentes qui présentent une forte activité d'endocytose.

### **Préparation des souches de *E. coli* calcium-compétentes**

A partir d'une préculture, la souche de *E. coli* EC101 est ensemencée ( $Abs_{600}$  initiale = 0,05) dans 100 ml de milieu LB à 37 °C. La culture est mise sous agitation à 150 rpm. Le culot cellulaire est récupéré en début de phase exponentielle ( $Abs_{600}$  = 0,3 ~ 0,5) par centrifugation à froid. Puis, le culot est repris dans un demi volume de  $CaCl_2$  50mM froid en laissant 10 à 20 min dans la glace. Les cellules sont centrifugées et reprises en  $CaCl_2$  80mM + glycérol 15% dans 1/20 du volume de culture cellulaire initiale.

#### **5.4.2 L'électroporation**

Cette technique consiste à placer les cellules dans un champ électrique qui perturbe la membrane des cellules, permettant à l'ADN de rentrer au travers de pores par diffusion. Cette méthode s'applique aux cellules adhérentes ou en suspension.

### **Préparation des souches de *E. coli* électrocompétentes**

500ml de milieu LB sont ensemencés ( $Abs_{600}$  initiale = 0,05) et incubés à 37°C sous agitation (150 rpm). Prélevées en phase exponentielle ( $Abs_{600}$  = 0,5), les cellules sont centrifugées (5000 rpm à 4°C) et lavées 3 fois en eau stérile froide, puis en glycérol (10%). Les cellules sont ensuite resuspendues dans 0,5 ml de glycérol 10% et stockées à -80°C en fraction aliquotes de 100 µl. Les cellules sont électroporées à l'aide d'un électroporateur Biorad selon les paramètres suivants : 2,5 kV, 200 Ω, 25 µF. Après avoir administré la décharge électrique, 1 ml de milieu LB est ajouté aux cellules puis la suspension cellulaire est incubée 1 h à 37°C avant d'être étalée sur milieu sélectif.

### **Préparation des souches de *L. lactis* subsp. *cremoris* électrocompétentes**

Les bactéries cultivées dans 1 L de M17/7 (supplémenté en saccharose 0,8M et glycine 8%) sont récoltées en phase exponentielle et lavées en solution saccharose 0,5M – glycérol 10%. Après 3 lavages successifs à 4°C, les cellules sont resuspendus dans une solution PEG-glycérol (30% - 10%) est stockées à -80°C. Les cellules sont électroporées avec les paramètres suivants : 2,5 kV, 400 Ω, 25µF. Après l'électroporation, 1 ml de M17/7 supplémenté en saccharose 0,5 M est ajouté aux cellules. Les cellules sont incubées pendant 3h à 30°C avant d'être étalées sur milieu sélectif.

### 5.4.3 Technique de recombinaison homologue

Le vecteur recombinant pTMH1 est introduit par électroporation chez *L. lactis* subsp. *cremoris* et le double évènement de recombinaison est obtenu par repiquages successifs des souches recombinantes sur milieu non sélectif et en conditions non permissives, c'est-à-dire à une température ne permettant pas la réplication du vecteur. Après des centaines de générations, un mutant  $\Delta cfa$  déficient de *L. lactis* subsp. *cremoris* a été isolé. La mutation est confirmée par amplification par PCR du gène *cfa* et la mise en évidence du site BamHI créé (pour les détails, voir partie Chapitre 2 Résultats-Discussion).

### 5.4.4. Production et purification des protéines d'intérêt

#### 5.4.4.1 Culture de la souche recombinante

Des travaux précédents menés au laboratoire (103) ont permis d'exprimer le gène *cfa* de *O. oeni* dans la souche BL21 de *E. coli*. Cette stratégie d'expression fait appel à un vecteur d'expression de type pET.

A partir d'une préculture des souches BL21 (DE3) recombinantes, 500 mL de milieu LB supplémenté en kanamycine ( $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sontensemencés ( $\text{Abs}_{600} = 0,15$ ). Les cultures sont incubées à  $37^\circ\text{C}$  sous agitation (150 rpm). Lorsque l'absorbance à 600 nm atteint 0,8 – 0,9, l'expression du gène d'intérêt *cfa* est induite par ajout d'IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, 50 à 100  $\mu\text{M}$ ). La culture est incubée sous agitation (150 rpm) une nuit, à  $18^\circ\text{C}$ .

#### 5.4.4.2 Lyse cellulaire

Les cellules sont collectées par centrifugation (4000 g, 15 min), lavées une fois à  $20^\circ\text{C}$  en tampon phosphate de potassium de ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$  100 mM, pH 7,4). Le culot cellulaire est ensuite resuspendu à  $4^\circ\text{C}$  dans 15 mL de tampon de lyse cellulaire ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM pH 7,4 ; NaCl, 300 mM). Les cellules sont cassées par 3 passages (6 000 rpm, 20 sec) au disrupteur Precellys®24 (Bertin technologies). Les débris cellulaires, les membranes et les cellules non lysées sont éliminés par centrifugation (10 000 g, 20 min,  $4^\circ\text{C}$ ). Les surnageants, qui constituent l'extrait protéique cellulaire, sont conservés à  $4^\circ\text{C}$ .

#### **5.4.4.3 Purification de la Cfa synthase depar le système Ni-NTA agarose**

L'enzyme d'intérêt, la Cfa synthase de *O. oeni*, est purifiée à 4°C par chromatographie d'affinité sur colonne d'agarose nickel-nitrilotriacétate (Ni-NTA Agarose, Qiagen). Le détail des étapes de surproduction de l'enzyme en système hétérologue puis de purification est décrit dans le Chapitre 3 – Résultats-Discussion).

### **6. Analyses statistiques**

La signification des différences entre les pourcentages de viabilité, les valeurs d'anisotropie et les teneurs (% molaire) en acides gras membranaires est déterminée par l'analyse des variances (ANOVA). L'intervalle de confiance pour une différence de moyenne est fixé à 95% ( $p < 0,05$ ) pour toutes les comparaisons et le test de Tukey est réalisé pour localiser les différences en utilisant le logiciel SigmaStat.

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

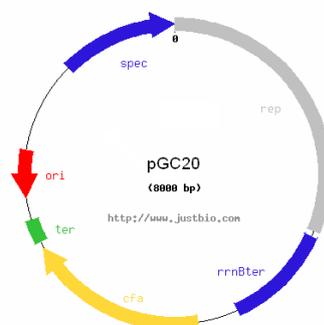
## CHAPITRE 1

### Etude de l'enzyme Cfa synthase de *O. oeni* ATCC BAA-1163 en système d'expression hétérologue – Utilisation d'une souche *cfa*-déficiente de *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363

Un des objectifs du travail de thèse était d'étudier la fonctionnalité du produit du gène *cfa* de *O. oeni* par la mise en œuvre de l'expression hétérologue de ce gène chez *L. lactis*. Une étude précédente a été réalisée au laboratoire en utilisant *E. coli* en tant que bactérie hôte (44). Cependant la présence d'une membrane externe, propre aux bactéries à Gram négatif a rendu difficile l'analyse des résultats. De plus, l'expression d'un gène issu d'une bactérie à Gram positif chez un hôte Gram négatif pouvait se révéler problématique. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi comme hôte la bactérie lactique *L. lactis* subsp. *cremoris*, pour laquelle il nous a été possible d'obtenir un mutant *cfa*<sup>-</sup> auprès d'Emmanuelle Maguin (UMR 1319 Micalis, INRA Jouy-en-Josas).

#### 1. Construction du vecteur pGC20

La complémentation de la souche *cfa*-déficiente de *L. lactis* subsp. *cremoris* a impliqué la construction du vecteur pGC20. Le gène *cfa* de *O. oeni*, comprenant sa propre région promotrice a été cloné dans le vecteur navette *E. coli*/*L. lactis*, pDL278. Le vecteur recombinant obtenu (Fig. 16) a été transféré dans la souche mutante de *L. lactis* subsp. *cremoris* par électroporation ainsi que dans la souche parentale MG1363. De manière à obtenir des témoins adéquats pour cette étude, le vecteur pDL278 a été introduit dans ces deux souches.

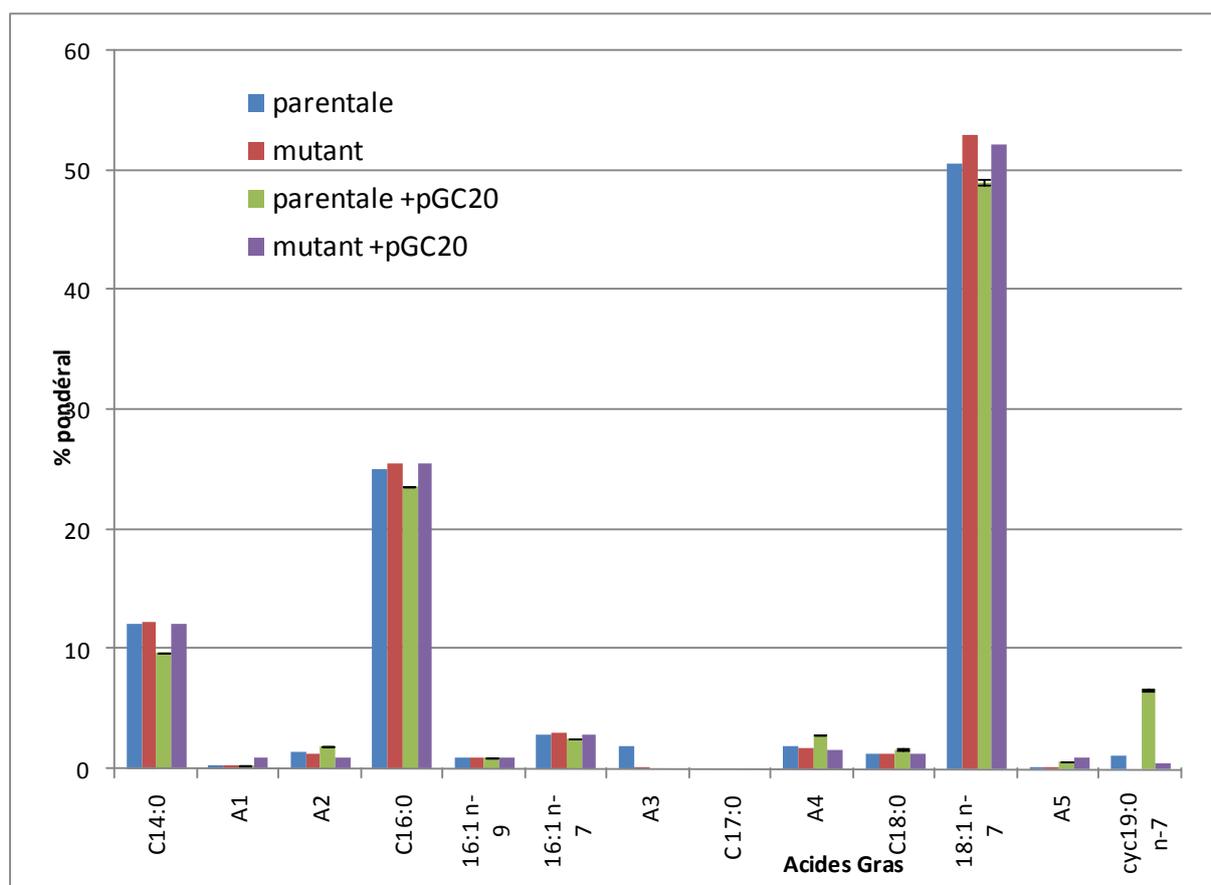


**Figure 16** : Carte du vecteur pGC20 dérivé du pDL278

## 2. Culture des souches en conditions optimales (culture sur M17/7)

### 2.1 Analyse du profil des Acides Gras membranaires

L'étude de la fonctionnalité du gène *cfa* de *O. oeni* a nécessité la détermination de la composition en Acides Gras (AG) des lipides membranaires des différentes souches de *L. lactis* subsp. *cremoris* recombinantes. Cette détermination a été réalisée à deux stades de la croissance : phase exponentielle (Fig. 17) et phase stationnaire (Fig. 18).

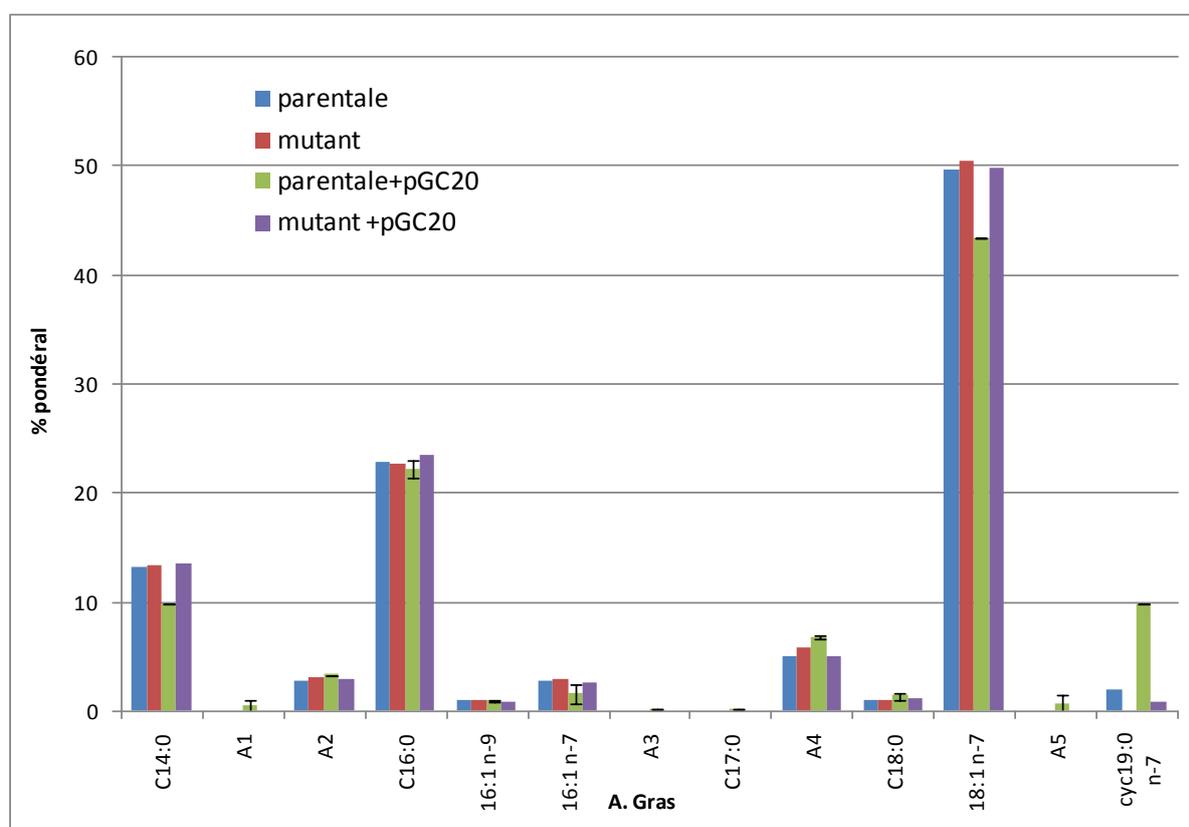


**Figure 17** : Analyse de la composition en résidus d'AG membranaires des souches de *L. lactis* subsp. *cremoris* lors de la phase exponentielle de croissance. Les souches de *L. lactis* subsp. *cremoris* parentales (MG1363pDL278, MG1363pGC20), mutant (MG1363 *cfa*/pDL278) et mutant complémenté (MG1363 *cfa* pGC20) sont cultivées en milieu M17/7. Les acides gras totaux sont extraits sur cellules récoltées en phase exponentielle et analysés par CPG. Les résultats sont exprimés en pourcentage pondéral. Les AG sont désignés par leur nombre de carbone suivi de leur nombre de double liaison.

L'analyse des cellules prélevées en phase exponentielle (Fig. 17) montre que les principaux acides gras saturés membranaires de *L. lactis* subsp. *cremoris* sont : les acides myristique (C14:0), palmitique (C16:0) et stéarique (C18:0), qui représentent environ 40% des AG totaux. Les AG monoinsaturés représentent environ 55% des AG totaux et sont représentés

pour l'essentiel (50%) par l'acide vaccénique (C18:1 n-7). Certains AG notés A<sub>x</sub> (X = 1, 2, 3, 4 ou 5) n'ont pas été identifiés. Ces AG sont cependant minoritaires (environ 10%) chez l'ensemble des souches testées.

On remarque pour les quatre souches une composition en AG comparable en ce qui concerne les AG saturés. Le taux d'AG insaturé C18:1 n-7 est aussi très proche pour les quatre souches. Cependant, on peut constater la présence plus élevée (environ 8%) de l'acide gras cyclique cycC19:0 n-7, ou acide lactobacillique, dans la souche parentale portant le pGC20 et l'absence totale d'acide gras cyclique chez le mutant MG1363 *cf*a<sup>-</sup> pDL278.



**Figure 18 :** Analyse de la composition en résidus d'AG membranaires des souches de *L. lactis* subsp. *cremoris* lors de la phase stationnaire de croissance. Les souches parentales (MG1363pDL278, MG1363pGC20), mutant (MG1363 *cf*a<sup>-</sup>pDL278) et mutant complété (MG1363 *cf*a<sup>-</sup>pGC20) sont cultivées en milieu M17/7. Les AG totaux sont extraits à partir de cellules récoltées en phase stationnaire de croissance (T = 400min) sur milieu M17/7 par CPG. Les résultats sont présentés en pourcentage pondéral. Les AG sont désignés par leur nombre de carbone suivi de leur nombre de double liaison.

L'analyse des cellules prélevées en phase stationnaire (Fig. 18) ne montre pas de différence marquante dans les compositions en AG par rapport à celles obtenues sur cellules

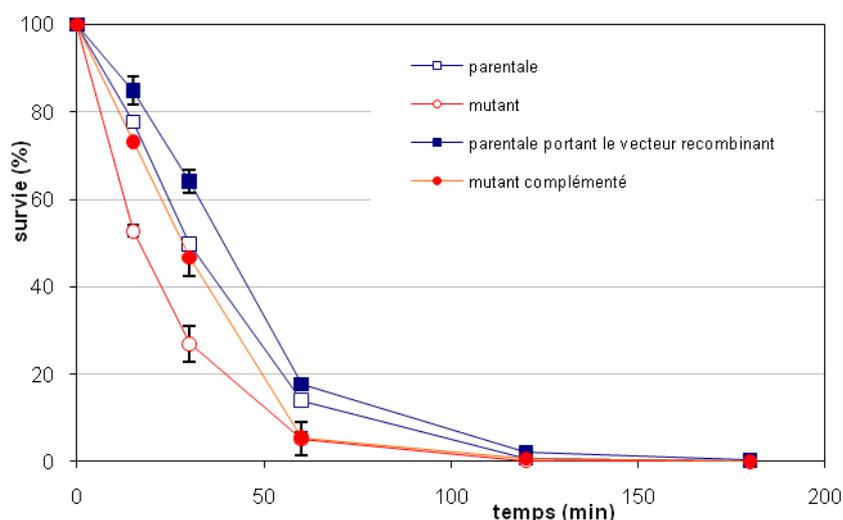
prélevées en phase exponentielle. De plus, nous pouvons constater pour la souche parentale un faible taux de conversion de C18:1 en cycC19:0 n-7. Cependant, nous remarquons une augmentation du cycC19:0 n-7 pour la souche parentale complémentée.

D'après la littérature, c'est en début de phase stationnaire que sont détectés les acides gras cycliques (CFA) (22). Ces premiers résultats laissent à penser d'une part que l'activité de la Cfa synthase de *L. lactis* subsp. *cremoris* reste faible, même en phase stationnaire. D'autre part, il semblerait qu'il n'y ait pas d'expression du gène *cfa* de *O. oeni* dans les conditions expérimentales testées.

## 2.2 Résistance des souches aux stress environnementaux (acide et éthanolique)

### 2.2.1 Résistance à un stress acide

La tolérance au stress des souches a été évaluée afin de déterminer si la présence de CFA confère un avantage pour la survie en condition de stress. Les stress acide et éthanolique sont les stress les plus souvent appliqués dans le cadre de la caractérisation physiologique de mutants *cfa*<sup>-</sup> (19, 45, 63, 101).



**Figure 19 :** Résistance à l'acidité des souches parentale (MG1363pDL278, MG1363pGC20), mutant (MG1363 *cfa*<sup>-</sup>pDL278) et mutant complémenté (MG1363 *cfa*<sup>-</sup>pGC20). Les souches de *L. lactis* sont cultivées en milieu M 17/7 jusqu'en phase stationnaire de croissance (T = 400 min). Les cellules sont récoltées par centrifugation et resuspendues en milieu M 17/3, 30°C. Le pourcentage de survie est défini par numération des UFC à différents temps en référence à la population au temps 0. Les valeurs représentées sont les valeurs moyennes obtenues après trois répétitions indépendantes.

Les souches de *L. lactis* sont cultivées en milieu M 17/7 jusqu'en phase stationnaire de croissance (T = 400 min). Les cellules sont récoltées par centrifugation et resuspendues en

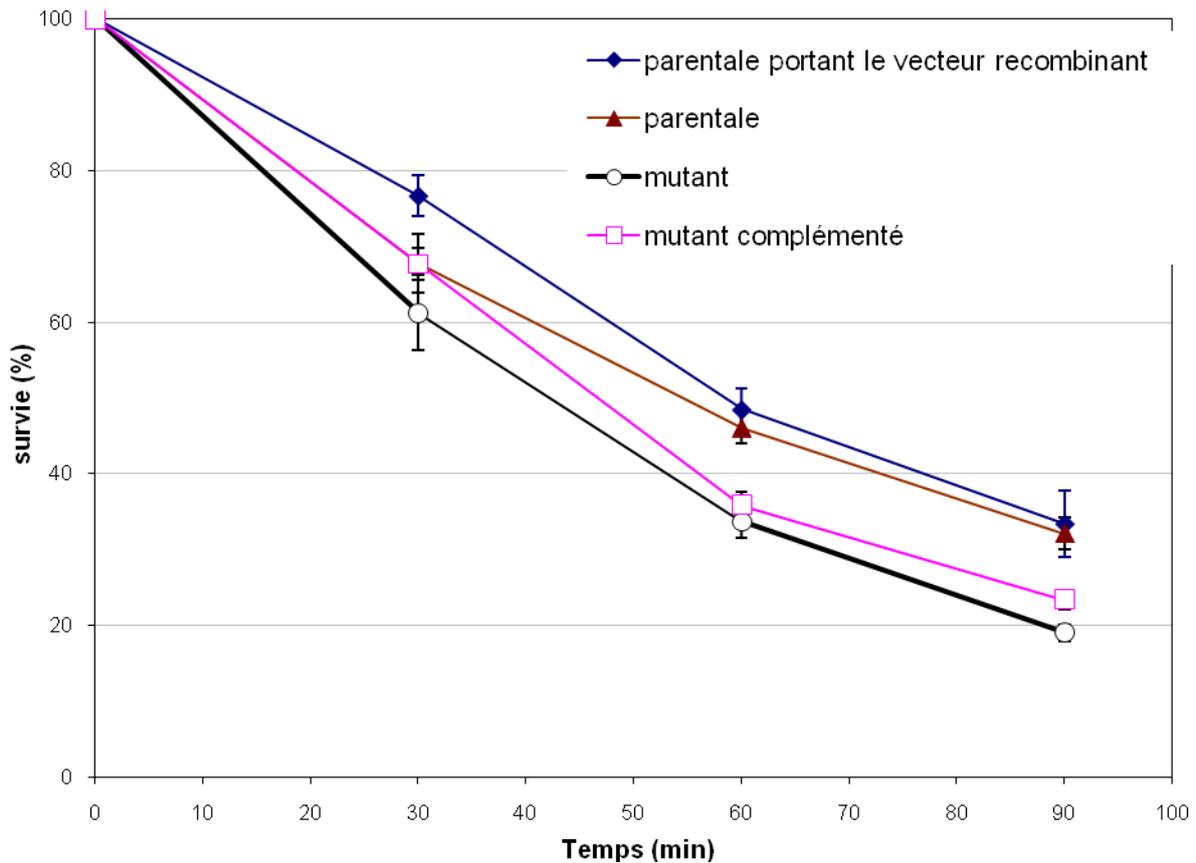
milieu M 17/3, 30°C. Le pourcentage de survie est défini par numérations des UFC à différents temps en référence à la population au temps 0 (Fig. 19).

Le mutant, MG1363 *cfa*<sup>-</sup>pDL278, présente une acidosensibilité plus élevée que les trois autres souches. Après 30 min d'incubation à pH 3, le taux de mortalité atteint environ 70%, contre 50% pour la souche parentale et le mutant complétement et 35 % pour la souche parentale portant le vecteur pGC20. La complémentation de la souche mutante semble restaurer une acido-tolérance. Ce résultat concorde avec ceux obtenus par Chang et Cronan (19). Cependant, après 60 min de traitement, la mortalité (> 90%) de la souche mutante complétement MG1363 *cfa*<sup>-</sup>pGC20 est comparable à celle obtenue sur le mutant. Il est à noter que la souche parentale portant le vecteur pGC20 est la moins acido-sensible. Cette résistance pourrait être liée à un effet combiné de l'activité de la Cfa synthase de *O. oeni* et de celle de *L. lactis*.

### **2.2.2 Résistance à un stress éthanolique**

Les souches de *L. lactis* subsp. *cremoris* sont cultivées en milieu M 17/7 jusqu'en phase stationnaire de croissance (T = 400 min). Les cellules sont récoltées par centrifugation et resuspendues en milieu M 17/7 contenant 15% (v/v) éthanol, 30°C. Le pourcentage de survie est défini par numérations des UFC à différents temps rapportées à la population au temps 0.

Le stress alcoolique à 15% a un effet marquant sur la viabilité des souches (Fig. 20). Après 90 min de choc, la mortalité est de 80 % pour le mutant et 60 % pour la souche parentale. On remarque, comme pour le stress acide, que c'est la souche parentale complétement qui semble résister le mieux à l'éthanol. Par contre, la complémentation du mutant avec le gène *cfa* de *O. oeni* ne permet pas dans ce cas de restaurer, même partiellement, une tolérance à l'éthanol (70% de mortalité après 90 min de traitement).



**Figure 20 :** Résistance à l'éthanol 15% (v/v) des souches parentales (MG1363pDL278, MG1363pGC20), mutant (MG1363 *cfa*pDL278) et mutant complémenté (MG1363 *cfa*pGC20). Les souches de *L. lactis* subsp. *cremoris* sont cultivées en milieu M 17/7 jusqu'en phase stationnaire de croissance (T = 400 min). Les cellules sont récoltées par centrifugation et resuspendues en milieu M 17/7 à 15% (v/v) éthanol. Le pourcentage de survie est défini par numération des UFC à différents temps rapportée à la population au temps 0. Les valeurs représentées sont les valeurs moyennes obtenues après 2 répétitions indépendantes.

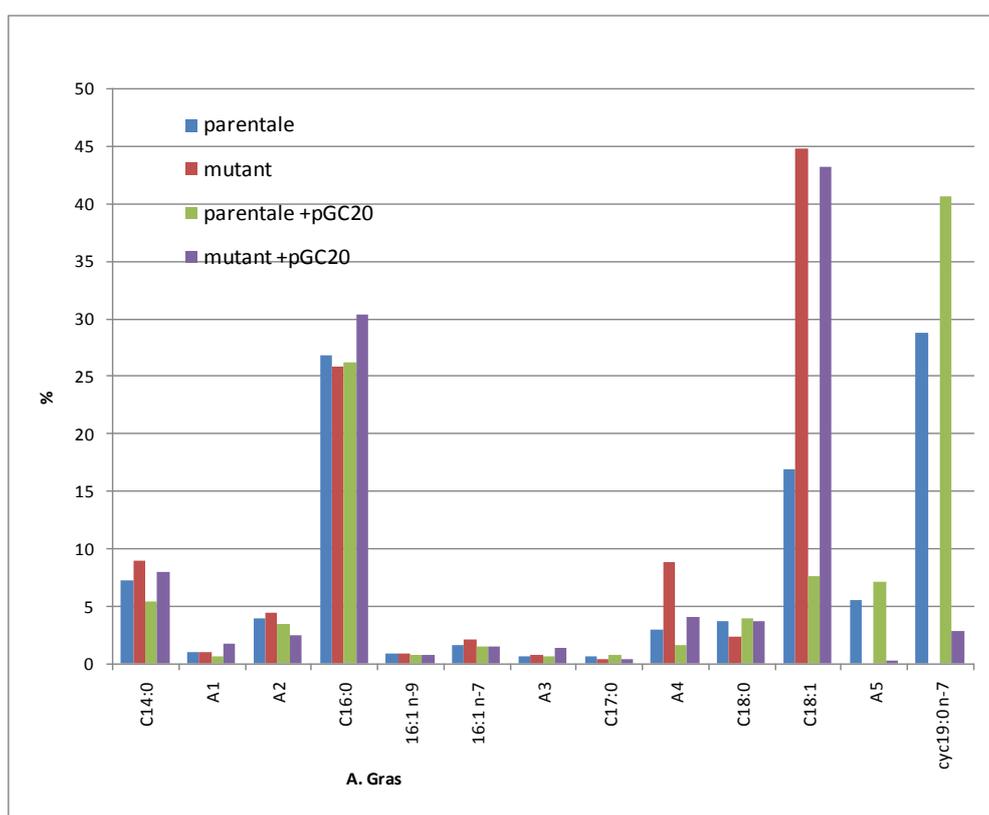
Lorsque les souches sont cultivées en conditions optimales (M17/7), l'analyse des acides gras par CPG démontre que même chez la souche parentale, le taux de conversion du C18:1 (acide vaccénique) en cycC19:0 n-7 (acide lactobacillique) est faible. A pH 7,2, même en phase stationnaire, il semblerait qu'il n'y ait pas une forte induction de la synthèse de la Cfa synthase. Ce premier résultat est contradictoire avec la bibliographie où il a été démontré une apparition des CFA dès le début de la phase stationnaire (19, Grogan, 1986 #23, 22, 63). Il est vrai que dans ces conditions, il est difficile de conclure sur la fonctionnalité du gène *cfa* de *O. oeni*. Le comportement des quatre souches soumises à un stress acide (pH 3,0) ou éthanol (15% v/v) confirme ce fait. En effet, le faible taux de CFA ne permet pas à la souche parentale de résister significativement à ces deux stress, comparé à la souche mutante. De

plus, la faible survie du mutant complémenté ne permet pas d'affirmer de façon catégorique à l'efficacité de la complémentation.

### 3. Culture des souches en condition acide (culture sur M17/5)

#### 3.1 Analyse du profil des Acides Gras membranaires

Selon Budin Verneuil *et al.* (14), l'induction de la transcription du gène *cfa* chez *L. lactis* subsp. *cremoris* est maximale lorsque les cellules ont été pré-adaptées par une culture en conditions modérément acides (pH 5). Les souches de *L. lactis* ont donc été mises en culture sur milieu M17/5 à 30°C. Comme précédemment, nous avons déterminé la composition en acides gras membranaires par CPG à deux stades de la croissance : en phase exponentielle et en phase stationnaire (Fig. 21 et Fig. 22, respectivement).

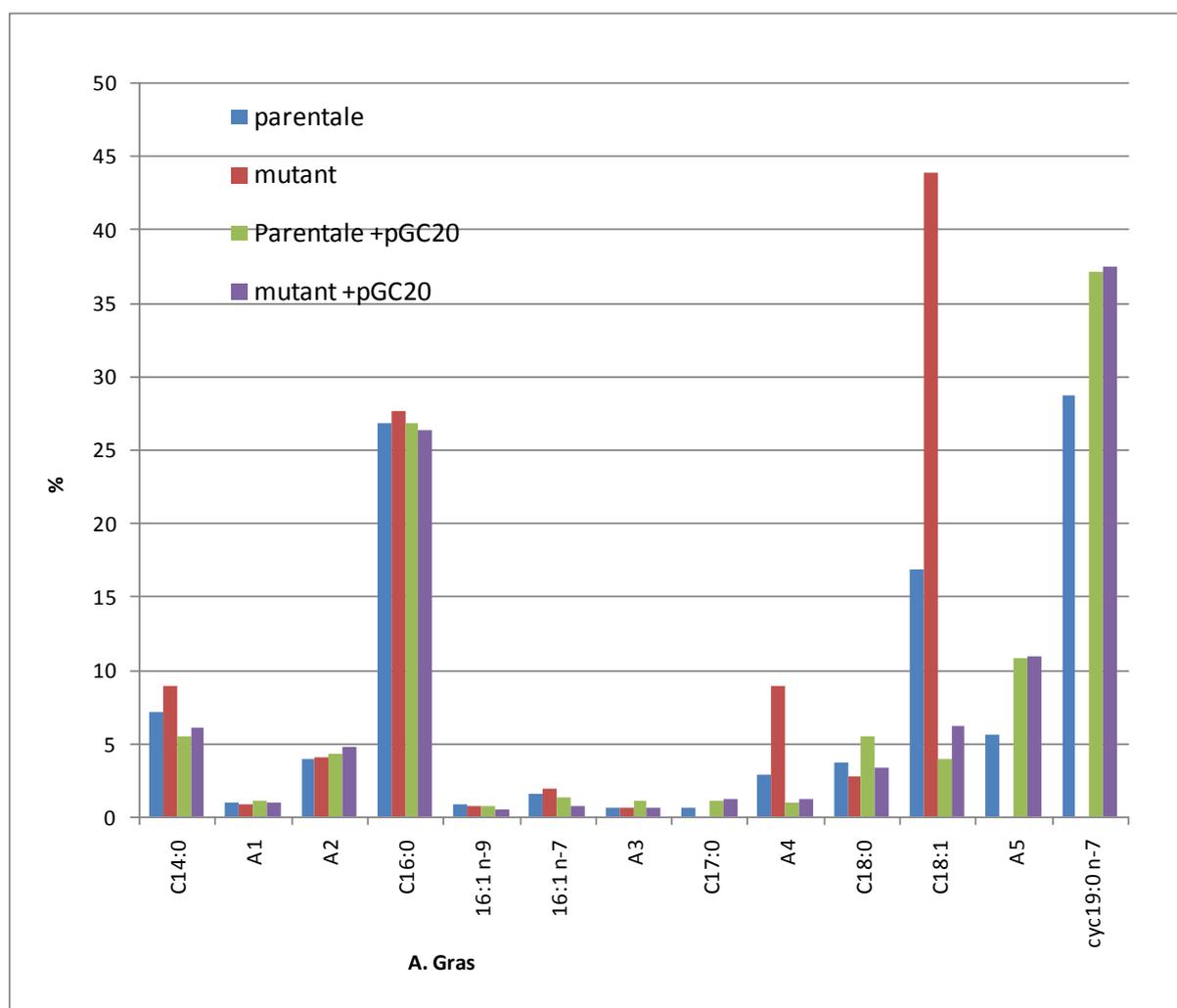


**Figure 21** : Composition en résidus d'AG membranaires (% pondéral) des souches parentales (MG1363pDL278, MG1363pGC20), mutant (MG1363 *cfa*pDL278) et mutant complémenté (MG1363 *cfa* pGC20) déterminée à partir des cellules récoltées en fin de phase exponentielle de croissance (T = 200min) en milieu M17/5 par CPG. Les résultats sont présentés en pourcentage pondéral. Les AG sont désignés par leur nombre de carbone suivi de leur nombre de double liaison.

Si l'on compare avec les données obtenues sur cellules cultivées à pH 7,2 et prélevées en phase exponentielle, nous pouvons constater qu'il y a peu de différence significative entre les 4 souches en ce qui concerne les acides gras saturés. Les pourcentages de C14:0, C16:0 et C18:0 sont comparables (Fig. 21) à ceux obtenus en phase exponentielle à pH 7,2 (Fig. 17). En ce qui concerne l'acide cis-vaccénique, C18:1 n-7, sa teneur reste constante chez le mutant MG1363*cfa*<sup>-</sup>pDL278. Il en est de même pour l'acide gras A4. Cependant, les taux de cet acide gras et d'acide cis-vaccénique sont plus élevés chez le mutant comparé aux autres souches. On ne détecte pas chez la souche mutante d'acide gras cyclique, ni d'acide gras noté A5. Par contre, le taux des deux acides gras A4 et C18:1 n-7 diminue considérablement pour la souche parentale (2,5% de A4 ; 17% d'acide cis-vaccénique) et pour la souche parentale portant le pGC20 (1% de A4 ; 7% d'acide cis-vaccénique). De plus, on détecte l'acide gras A5 et l'acide lactobacillique cycC19:0 n-7 chez ces deux souches à des taux élevés. Ces résultats suggèrent que la présence de l'acide gras A5 dépendrait, comme pour l'acide gras cyclique lactobacillique, de la fonctionnalité du gène *cfa*.

On observe chez le mutant complémenté MG1363 *cfa*<sup>-</sup>pGC20 une légère diminution du taux d'acide cis-vaccénique, C18:1 n-7, avec un faible taux de conversion en acide lactobacillique (2,6% de cyclopropanation).

En phase stationnaire, chez le mutant MG1363 *cfa*<sup>-</sup>pDL278, le taux de C18:1 n-7 reste identique à celui obtenu sur cellules prélevées en phase exponentielle (Fig. 22). On ne détecte pas d'acide gras cyclique, ni d'acide gras A5. Les taux d'acide gras noté A4 et de C18:1 n-7 restent encore très élevés. Chez les trois autres souches, l'acide cis-vaccénique, C18:1 n-7, est cyclisé en partie. Le mutant complémenté MG1363 *cfa*<sup>-</sup>pGC20 présente une nette diminution du taux de C18:1 n-7 (6%) et un taux important de cycC19:0 n-7 (37%). Nous pouvons constater que, comme précédemment, la cyclopropanation de l'acide cis-vaccénique est liée à l'apparition de l'acide gras A5.



**Figure 22** : Composition en résidus d'AG membranaires (% pondéral) des souches parentales (MG1363pDL278, MG1363pGC20), mutant (MG1363 *cf*a pDL278) et mutant complété (MG1363 *cf*a pGC20), déterminée à partir des cellules récoltées en phase stationnaire de croissance (T = 400 min) en milieu M17/5 par CPG. Les résultats sont présentés en pourcentage pondéral. Les AG sont désignés par leur nombre de carbone suivi de leur nombre de double liaison.

D'après Budin-Verneuil et *al.* (14), l'induction de la transcription du gène *cf*a de *L. lactis* subsp. *cremoris* est maximale après adaptation des cellules à pH 5,0 (70 mmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> protéine sur cellules cultivées à pH 5 ; 60 mmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> protéine sur cellules cultivées à pH 6 ; 10 mmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> protéine sur cellules cultivées à pH 7 – mesures réalisées après 200 minutes de croissance). L'analyse des acides gras par CPG confirme ce résultat. En effet, même lorsque les cellules sont prélevées en phase exponentielle de croissance, le taux d'acide lactobacillique représente environ 28 % des AG totaux chez la souche parentale et 40 % chez la souche parentale portant le pGC20. Lorsque les cellules sont prélevées en phase stationnaire, l'acide lactobacillique représente 28 % des AG totaux chez la

souche parentale et 38 % chez la souche parentale portant le pGC20 et chez le mutant complémenté. La complémentation permet, dans ce cas, de restaurer la capacité des cellules à synthétiser des acides gras cycliques. Chez le mutant complémenté MG1363 *cfa* pGC20, le taux d'acide lactobacillique représente environ 37 % des AG totaux, lorsque les cellules sont prélevées en phase stationnaire.

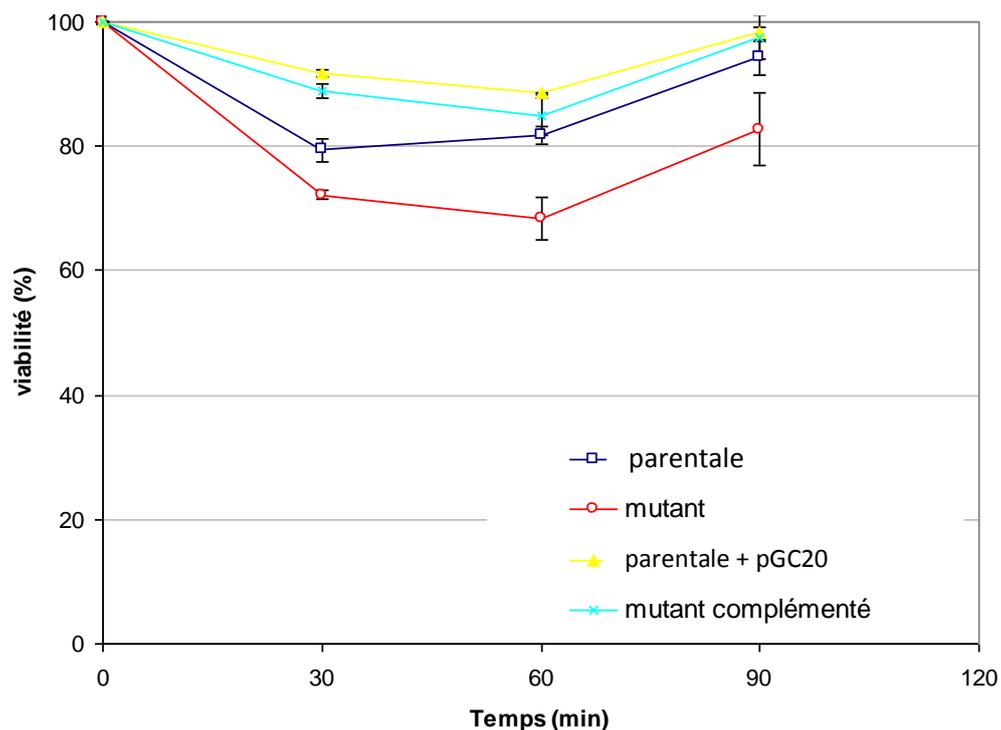
Donc, nous pouvons conclure que le gène *cfa* de *O. oeni* exprimé chez *L. lactis* subsp. *cremoris* est fonctionnel.

### **3.2 Résistance des souches adaptées à l'acidité aux stress environnementaux (acide et éthanolique)**

#### **3.2.1 Résistance à un stress acide**

Les quatre souches sont cultivées sur milieu M 17/5 jusqu'en phase stationnaire de croissance (T = 400 min). Les cellules sont récoltées par centrifugation et resuspendues en milieu M17/3 à 30°C. Le pourcentage de survie est défini par numérations des UFC à différents temps rapportées aux valeurs obtenues au temps 0. Les valeurs représentées sont les valeurs moyennes obtenues après 2 répétitions indépendantes.

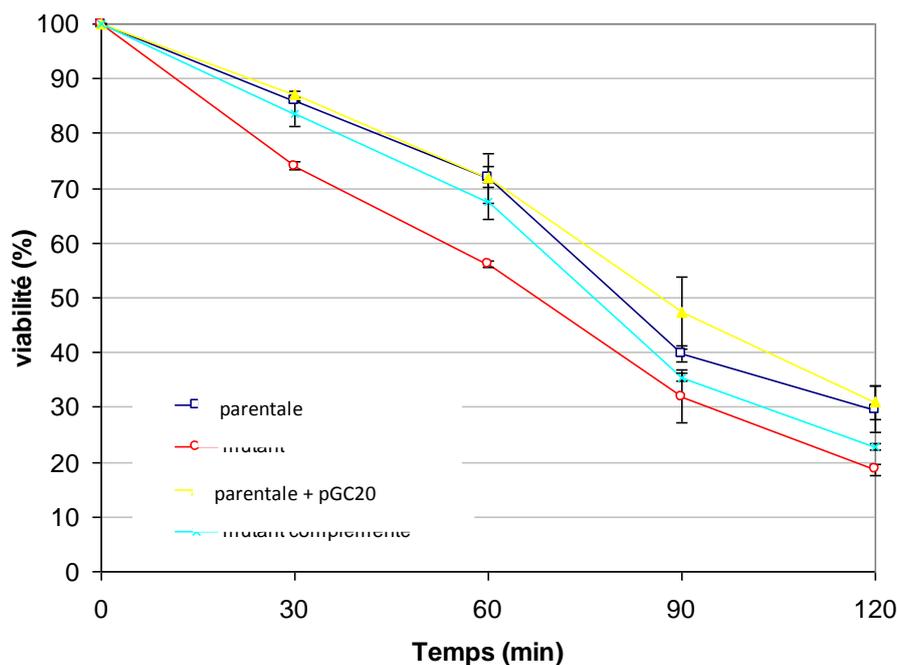
On observe (Fig. 23) un fort taux de survie de l'ensemble des souches suite au stress acide, y compris la souche mutante MG1363 *cfa* pDL278. La survie des souches varie de 70 à 90 %. A noter que nous obtenions des valeurs de 10 à 20 % de viabilité sur cellules non adaptées après 1 heure de stress à pH 3,0 (Fig. 19). La souche mutante présente cependant une survie significativement plus faible que celles obtenues chez les trois autres souches (70% de viabilité pour le mutant contre 90% de viabilité chez la souche parentale). La complémentation de la souche mutante permet de conférer une acido-résistance supérieure à celle obtenue sur la souche parentale et comparable à celle obtenue sur la souche parentale portant le pGC20.



**Figure 23 :** Résistance à l'acidité des souches après une adaptation préalable à l'acidité. Les souches parentales (MG1363pDL278, MG1363pGC20), mutante (MG1363 *cfā*pDL278) et mutante complémentée (MG1363 *cfā* pGC20) sont cultivées en milieu M 17/5 jusqu'en phase stationnaire de croissance (T = 400 min). Les cellules sont récoltées par centrifugation et resuspendues en milieu M 17/3. Le pourcentage de survie est défini par numération des UFC à différents temps. Les valeurs représentées sont les valeurs moyennes obtenues après 2 répétitions indépendantes.

### 3.2.2 Résistance à un stress éthanolique

Les souches de *L. lactis* sont cultivées en milieu M 17/5 jusqu'en phase stationnaire de croissance (T = 400 min). Les cellules sont récoltées par centrifugation et resuspendues en milieu M 17/7 contenant 15% (v/v) d'éthanol, 30°C. Le pourcentage de survie est défini par numérations des UFC à différents temps et rapportées aux valeurs obtenues au temps 0.



**Figure 24 :** Résistance à l'éthanol des souches après une adaptation préalable à l'acidité. Les souches parentales (MG1363pDL278, MG1363pGC20), mutante (MG1363 *cf*a<sup>-</sup>pDL278) et mutante complémente (MG1363 *cf*a<sup>-</sup>pGC20) sont cultivées en milieu M 17/5 jusqu'en phase stationnaire de croissance (T = 400 min). Les cellules sont récoltées par centrifugation et resuspendues en milieu M 17/7 contenant 15% éthanol. Le pourcentage de survie est défini par numération des UFC à différents temps. Les valeurs représentées sont les valeurs moyennes obtenues après 2 répétitions indépendantes.

La survie des souches de *L. lactis* subsp. *cremoris* a également été évaluée en présence de 15% (v/v) d'éthanol après une adaptation préalable à l'acidité (Fig. 24). On observe une résistance plus élevée que celles obtenues sans adaptation préalable (Fig. 20) mais cette différence est moins marquée par rapport à l'effet de l'adaptation sur la survie suite à un stress acide. Après 2 h de traitement, la viabilité est de 20 % pour le mutant MG1363 *cf*a<sup>-</sup>pDL278 qui apparaît le plus sensible. La survie du mutant complémente MG1363 *cf*a<sup>-</sup>pGC20 est de l'ordre de 25% et comparable à celle du mutant. La résistance de la souche parentale est proche de celle obtenue sur la souche parentale portant le pGC20 qui est la souche la plus résistante (30% de survie après 2 h d'incubation en présence d'éthanol).

#### 4. Conclusions

Afin d'étudier l'impact de la présence d'acides gras cycliques membranaires sur la résistance aux stress, deux types de stress physiologiques ont été réalisés sur les différentes souches construites : le stress acide à pH 3 et le stress éthanol à 15% v/v. Les résultats obtenus montrent que, pour ces deux traitements, avec ou sans adaptation préalable à l'acidité,

l'expression du gène *cfa* de *O. oeni* augmente la résistance au stress de la souche mutante complémentée par rapport à la souche mutante. Le mutant complémenté est plus résistant que le mutant et la souche parentale, mais moins que la souche parentale portant le pGC20 dans la majorité des cas.

L'adaptation préalable à l'acidité des souches étudiées confère une plus grande résistance aux stress pour les quatre souches, plus particulièrement suite à un stress acide à pH 3. Ces résultats s'opposent à ceux précédemment obtenus sur le mutant  $\Delta cfa$  de *E. coli* complémenté avec le gène *cfa* de *O. oeni* (45). En effet, la souche de *E. coli* complémentée, présente un taux de survie de 94 % après 3 heures d'incubation en présence de 10 % d'éthanol, contre 43 % après 3 heures d'incubation à pH 3. Le mutant *cfa*-, quant à lui, présente des taux de survie de 46 % et 11 %, après 3 heures d'incubation en présence d'éthanol ou à pH acide, respectivement.

Le choix d'utiliser dans ce premier travail un système d'expression hétérologue en prenant pour bactérie hôte, *L. lactis* subsp. *cremoris*, même s'il se justifie, n'apparaît pas judicieux. En effet, la cyclopropanation des acides gras insaturés reste partielle chez le mutant complémenté avec le gène *cfa* de *O. oeni*, de la même manière que chez le mutant  $\Delta cfa$  de *E. coli* (45). Ici, encore, des valeurs de pH intracellulaire différentes entre la bactérie hôte et *O. oeni* peuvent expliquer ce fait. On peut à priori exclure une différence d'affinité de la Cfa synthase de *O. oeni* pour les acides gras insaturés membranaires de *L. lactis* subsp. *cremoris*, puisque les compositions en acides gras chez ces deux bactéries sont très proches. Chez *L. lactis* subsp. *cremoris*, le locus *cfa* est organisé en opéron avec le gène *metK* (codant la SAM synthétase) (14). La stratégie d'interruption du gène *cfa* par intégration du vecteur pORI19 (INRA Jouy en Josas) a probablement engendré un effet polaire sur *metK* ce qui pourrait affecter le phénotype. Afin de pouvoir lever cette ambiguïté, nous avons décidé de construire un mutant  $\Delta cfa$  chez *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363, dénué d'effet polaire sur *metK*.

Dans le Chapitre suivant, nous présentons la stratégie d'élaboration de ce nouveau mutant.

Une première analyse physiologique comparant la souche parentale, la souche mutante générée et la souche mutante complémentée avec le propre gène *cfa* de *L. lactis* subsp. *cremoris*, a permis d'appréhender le rôle joué par les acides gras cycliques chez cette bactérie lactique. Ce travail fait l'objet d'une publication soumise en octobre 2010 à *Applied Environmental Microbiology*.

## CHAPITRE 2

### Acides Gras cycliques membranaires et réponse au stress acide chez *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (Article 1)

#### Cyclopropanation of membrane unsaturated fatty acids is not essential in acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

Thi Mai Huong To<sup>1</sup>, Cosette Grandvalet<sup>1,2</sup>, Raphaëlle Tourdot-Maréchal<sup>1,\*</sup>

*Laboratoire Recherche en Vigne et Vin EA 4149, Université de Bourgogne, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin Jules Guyot, 1, rue Claude Ladrey – Campus Universitaire Montmuzard, BP27877, F-21078 Dijon, France<sup>1</sup> and Department DSAN – AgroSUP, 26 bd Dr Petitjean, BP 87999, F-21079 Dijon cedex, France<sup>2</sup>*

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire Recherche en Vigne et Vin EA 4149, Université de Bourgogne, IUVV, 1, rue Claude Ladrey – Campus Universitaire Montmuzard, BP27877, F-21078 Dijon, France. Phone: 33 3 80 39 61 92. Fax: 33 3 80 39 62 65. E-mail address: tourdot@u-bourgogne.fr

## Résumé

Les acides gras cycliques (CFAs pour Cyclo Fatty Acids) sont synthétisés *in situ* par le transfert d'un groupe méthylène de la S-adénosyl-L-méthionine à une double liaison d'une chaîne d'acides gras insaturés au sein de phospholipides membranaires. Cette conversion, catalysée par l'enzyme Cfa Synthase, est un mécanisme décrit chez de nombreuses bactéries. Ce mécanisme est reconnu aujourd'hui comme un mécanisme clé dans l'adaptation des bactéries en réponse à une perturbation drastique de l'environnement. Le rôle des CFAs dans l'ATR (Acid Tolerance Response) a été étudié chez la bactérie lactique *L. lactis* subsp. *cremoris*. Un mutant  $\Delta cfa$  a été construit par échange allélique. Le gène codant pour la Cfa synthase a été cloné et introduit dans la souche mutante pour obtenir une souche mutante complétée, utilisée comme témoin. Les données obtenues par CPG et CPG-MS ont démontré l'absence de production d'acide gras cyclique chez la souche mutante. Le taux d'acide gras cyclique (acide lactobacillique) dans la membrane de la souche parentale et de la souche complétée augmente lorsque les cellules entrent en phase stationnaire, plus particulièrement lorsque les cellules sont adaptées à l'acidité par une culture à pH 5,0, et, plus surprenant, lorsque les cellules sont cultivées en présence de 6% d'éthanol. Les résultats de PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) démontrent que la transcription du gène *cfa* est fortement induite par l'acidité (10 fois plus de transcrits sur cellules cultivées à pH 5,0) et par l'éthanol (9 fois plus de transcrits sur cellules cultivées en présence de 6% éthanol) par rapport au niveau obtenu sur cellules prélevées en phase stationnaire de croissance en milieu optimal. La viabilité des cellules a été mesurée chez la souche mutante, la souche parentale et la souche complétée, suite à un stress acide (pH 3,0). Après une adaptation à l'acidité, les trois souches présentent un pourcentage de survie élevé après un choc acide (pH 3). Ceci prouve que la cyclopropanation des acides gras insaturés n'est pas indispensable à la survie de *L. lactis* subsp. *cremoris* en conditions de stress acide. En outre, les données d'anisotropie de fluorescence démontrent que la présence de CFAs membranaires ne permet pas de réguler le niveau de fluidité membranaire, en particulier avec des cellules cultivées en présence d'éthanol, où une fluidification membranaire est observée pour les trois souches. Dans ce cas, l'hypothèse d'un équilibre entre les acides palmitoléique / cis-vaccénique / lactobacillique pour réguler la fluidité membranaire chez *L. lactis* subsp. *cremoris* est avancée.

## INTRODUCTION

Cyclopropane fatty acids (CFAs) are synthesized *in situ* by the transfer of a methylene group from *S*-adenosyl-L-methionine to a double bond of unsaturated fatty acid chains of membrane phospholipids. This conversion, catalyzed by the Cfa synthase enzyme, occurs in many bacteria Gram negative (11, 19, 53, 62), or Gram positive (44, 51, 96, 100, 101, 113). It is nowadays recognized that this energetically expensive conversion [CFAs synthesis requires three ATP molecules per cyclopropane ring formed (107)] plays a major role in adaptation of bacteria in response to a drastic perturbation of the environment. In *E. coli*, a correlation between the level of CFAs in membrane and the resistance of the bacterium to lethal pH was reported (13). The strategies including the construction and the physiological study of *cfa*-deficient cells in *E. coli* (19) or *Salmonella typhimurium* (63) demonstrated likewise the high sensitivity of the deficient cells to acid stress. An overexpression of the *cfa* gene in *Clostridium acetobutylicum* increased the CFAs content of cells as well as acid and butanol resistance (113).

Focusing on stress tolerance of lactic acid bacteria, the cyclopropane fatty acids are regarded as key fatty acids. Lactic acid bacteria often used as starters in food fermentation (including probiotics) are confronted with various kinds of environmental perturbations, such as osmotic, thermal, acid, ethanol stresses, from their production in industry to their implementation. It has been reported that the cyclopropanation of the monounsaturated oleic acid increased after acid and cold stresses in *Lactobacillus helveticus* (76). In the lactic acid bacterium of wine *Oenococcus oeni*, cells respond to culture in presence of ethanol by increasing their CFAs content (101). The data obtained by Grandvalet *et al.* (44) demonstrated that *O. oeni* acid-grown cells or cells harvested in the stationary growth phase increased their CFAs content at the expense of oleic acid, in the same way as ethanol-grown cells. In case of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, the predominance of CFAs over other unsaturated and saturated fatty acids is observed with cells submitted to osmotic stress or high temperature (12, 51). The proteomic strategy developed to characterize the acid tolerance response in *L. lactis* subsp. *cremoris* underlines that Cfa synthase could be considered not only as a key effector of the lactococcal acid tolerance but also as a general stress protein (15).

It is unanimously agreed that the extent of the cyclopropanation of the monounsaturated fatty acids represents the major adaptative response of the bacterial cells in order to stabilize the membrane fluidity known as ‘homeoviscous adaptation’ (96). However,

the role of CFAs in membrane fluidity adjustments remains unclear. According to the hypothesis of Härtig *et al.* (52), cyclopropane fatty acids could be considered as saturated ones. In comparison to *cis* unsaturated fatty acids, the presence of CFAs could make the membrane more rigid because of their higher lipid melting points of the phospholipid bilayer in comparison with unsaturated fatty acids (47). But contrary effects were obtained for measurements of membrane physical changes due to cyclopropane formation. For example, a cyclopropane fatty acid-deficient strain of *Pseudomonas putida* and the wild-type strain could not be differentiated by the fluidity level of their membranes (79). However, the results obtained from lipids extracts of the same bacterium by using two independent methods (fluorescence polarization and FTIR measurement) indicate that CFAs definitely render lipid bilayers more rigid (71).

The purpose of this study was to investigate the physical role of CFAs in stress response of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by physiological studies of a *cfa*-deficient mutant. Strains were exposed to acid and ethanol sublethal stresses which are associated with cyclopropanation of membrane fatty acids in lactic acid bacteria. The impact of the mutation on survival of strains in acidic conditions was discussed, as the relationship of membrane fluidity variations and changes in membrane fatty acids components.

## MATERIAL AND METHODS

**Bacterial strains, media.** Bacterial strains and their phenotype are listed in Table 4.

**TABLE 4:** Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains or Plasmids	Genotype or markers; characteristics and uses	Reference or source
<b><i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> strains</b>		
MG1363	Plasmid-free derivative of <i>L. lactis</i> NCDO 712 cured of $\Phi$ T712 prophage	(41)
MG1363 $\Delta$ cfa	<i>cfa</i> mutant derivative of MG1363	This study
MG1363 pDL278	MG1363 harbouring pDL278, Sp <sup>R</sup>	This study
MG1363 $\Delta$ cfa pDL278	MG1363 $\Delta$ cfa harbouring pDL278, Sp <sup>R</sup>	This study
MG1363 $\Delta$ cfa pDLcfa12A3	MG1363 $\Delta$ cfa harbouring pDLcfa12A3, Sp <sup>R</sup>	This study
<b><i>E. coli</i> strains</b>		
K12 ER2738	General cloning strain	Invitrogen
EC101	<i>E. coli</i> JM101 with <i>repA</i> from pWV01 integrated into the chromosome. Host strain used for construction of pGID023 derivative plasmids	(65)
<b>Plasmids</b>		
pDL278	<i>E. coli</i> - <i>L. lactis</i> shuttle vector (6.6 kbp). Sp <sup>R</sup>	(21)
pDLcfa12A3	pDL278 derivative vector used to express the <i>cfa</i> gene under endogenous promoter. Sp <sup>R</sup>	This study
pGID023	Shuttle vector (8.2 kbp) for <i>E. coli</i> and <i>L. lactis</i> ; derivative of pJDC9 containing the pE194 replication functions (thermo-sensitive <i>ori</i> ); used as an unstable integration vector. Em <sup>R</sup>	(55)
pTMH1	Integration plasmid, pGID023 derivative containing the <i>cfa</i> gene carrying a 28bp internal deletion (nucleotide 514 to 541 of the coding sequence). Em <sup>R</sup>	This study

Em<sup>R</sup>: Erythromycin resistance (10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> for *L. lactis* subsp. *cremoris*; 250  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> for *E. coli*)

Sp<sup>R</sup>: Spectinomycin resistance (1000  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> for *L. lactis* subsp. *cremoris*; 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> for *E. coli*)

*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 was grown at 30°C in the M17/7 medium (14). M17/7 medium corresponded to M17 containing MOPS (3-N-morpholino propane sulfonic acid) 200 mmol/l instead of  $\beta$ -disodium glycerophosphate and supplemented with 0.5% (g/l) glucose. The pH was adjusted to 7.2 with NaOH. M17/5 and M17/3 media corresponded to M17/7 acidified with HCl to pH 5 or pH 3, respectively. For M17/7 medium + 6% (v/v) ethanol, absolute ethanol was added to the medium.

For recombinant strains, the medium was appropriately supplemented with spectinomycin (1 mg/ml for *E. coli* and 15 µg/ml for *L. lactis* subsp. *cremoris*) or erythromycin (10 µg/ml for *L. lactis* subsp. *cremoris* and 250 µg/ml for *E. coli*). *E. coli* strain BL21 was used for DNA cloning and overexpression and was grown in Luria-Bertani (LB) broth or on LB agar plates at 37°C.

**Growth in sublethal stress conditions, acid shock.** Overnight-cultures of *L. lactis* subsp. *cremoris* strains were used to inoculate M17/7 medium at an initial optical density 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.1. Stationary phase cells were harvested after 5.5 h incubation (OD<sub>600</sub> = 2.6) at 30°C. For ethanol-adapted and acid-adapted grown cells, *L. lactis* subsp. *cremoris* was inoculated at the same initial OD<sub>600</sub> as previously in M17/7 medium with 6 % (v/v) ethanol or in M17/5 medium. Adapted-grown cells were harvested by centrifugation (6500 × g, 10min, 25°C) from their early stationary phase after 7 h (OD<sub>600</sub> = 0.6) and 6 h (OD<sub>600</sub> = 1.1) of growth with 6% ethanol and at pH 5, respectively. The cells were then resuspended in M17/3 medium for acid shock. Aliquots were collected at timed intervals (0 min, 90 min and 180 min) and viable cells were measured by serial dilutions, plating on M17/7 agar supplemented with spectinomycin and counting colonies after 24 h of incubation. The strain survival was defined as the ratio of colonies (CFU) formed on M17/7 agar medium at the different sampling times, versus T<sub>0</sub>. Each experiment was performed in triplicate.

**DNA manipulation and transformation.** Standard procedures as purification, ligation, restriction analysis, gel electrophoresis were carried out as described by Sambrook *et al.* (91). *L. lactis* subsp. *cremoris* chromosomal DNA was prepared by the classical method described by Posno *et al.* (82). PCR products and restriction products were purified with the Gene Elute PCR Kits (Sigma, France). Conventional electroporation was used for *E. coli* and *L. lactis* subsp. *cremoris* was transformed by electroporation as described by Dower *et al.* (36).

**Construction of *L. lactis* subsp. *cremoris* Δ*cfa*-deficient strain and homologous complementation of the mutant.** In order to delete an internal part of the *cfa* gene (28 bp deleted from nucleotide 514 to 541 of the coding sequence), two fragments generated by PCR were cloned into pGID023 in order to construct the integration plasmid pTMH1. The primers olcg100 (5'CCCCGAATTCTTGGTATTTGAAAAACAGTCTTG-3') and olcg101 (CCCCGGATCCCGGCCACCAGGTTTGCTAT) which include EcoRI and BamHI restriction sites, respectively (restriction sites were underlined), were used to amplify the 5' region of the coding sequence from nucleotide 1 to 512. The primer olcg102

(CCCCGGATCCACTTTGATGTTTAAAGCCGTGC) which includes BamHI site (underlined) and the primer olcg103 (TCCAGCTTCAAAACTTGCGG) were used to amplify the 3' region of the coding sequence from nucleotide 541 to 1104. Both PCR products were digested with EcoRI-BamHI and BamHI-HindIII, respectively, using the cleavage HindIII site at the position 1078 of the coding sequence. Purified digested PCR products were ligated using BamHI site. The 1056 bp fragment obtained was then sub-cloned into the EcoRI / HindIII sites of pGID023 in order to obtain the thermo-sensitive suicide vector pTMH1 for *cfa* gene replacement in *L. lactis* subsp. *cremoris*. The 8.2-kb cloning vector pGID023 is stable in *E. coli* and unstable in Gram-positive bacteria under nonselective conditions. Mutagenesis by allelic replacement is therefore possible in *L. lactis* subsp. *cremoris* by two successive homologous recombinations: an insertion followed by excision (55). Erythromycin resistance was the selective marker in *E. coli* and in gram-positive bacteria. Mutagenesis by allelic replacement at the *cfa* locus was performed in *L. lactis* subsp. *cremoris*. Plasmid pTHM1 was electropored into *L. Lactis* subsp. *cremoris*. Stable erythromycin-resistant transformants were selected for plasmid pTHM1 integration at the *cfa* locus. After growth in presence of erythromycin, erythromycin-sensitive excisants were isolated. To confirm the deletion of the *cfa* gene in these excisants, their genomic DNA were tested by PCR amplification using primers olcg 104 (AATTGCTAAAGTTCATCATATCTT) and olcg 105 (CATCTGCTGAAAGTCCGTATT). 28 pb deletion and the cleavage BamHI site were confirmed, demonstrating the presence of the mutation in the tested excisants. One excisant, named *L. lactis* subsp. *cremoris*  $\Delta cfa$ , was used in this study for physiological analysis.

Homologous complementation of the *L. lactis* subsp. *cremoris*  $\Delta cfa$  strain was performed, as control. The *cfa* gene of *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 wild-type with its promoter was amplified by PCR with High Fidelity tag, using primers MG1363cfa1 (ATGGAATTCTTTTTTATTATATCAAAAACTAT) and MG1363cfa2 (AGCGGATCCTAAAAATGTCCCCCAATCTAAAT) which include EcoRI and BamHI sites (underlined), respectively. The 1894 pb fragment obtained was digested with EcoRI and BamHI and cloned into pDL278 in order to yield the pDLcfa12A3 vector. This vector was electropored into *L. lactis* subsp. *cremoris*  $\Delta cfa$  strain. The complemented strain was named *L. lactis* subsp. *cremoris*  $\Delta cfa$  + pDLcfa.

**RNA extraction and analysis.** A bacterial culture in stationary phase of growth was centrifuged and washed with water DMPC (0.1% dimethylpyrocarbonate treated water before autoclaving to inactivate RNases). The cell pellet was taken in 1 ml Tri-Reagent (Sigma-

Aldrich) and cells were broken in Precellys Disruptor by 2 cycles of 30 s at 6000 rotations per minute, in the presence of 200 mg of glass beads (diameter 70 / 100  $\mu\text{m}$ ). Total RNAs were then extracted with phenol-chloroform, precipitated with isopropanol and resuspended in RNase free-water. Reverse Transcription-PCR was carried out using the reverse transcriptase iScript<sup>TM</sup> (Bio-Rad) as recommended by the supplier.

The real-time PCR (qRT-PCR) was carried out on a BioRad I-Cycler with the IQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green supermix (Biorad) in 96-well plates. For each measurement, a threshold cycle value ( $C_T$ ) was determined. Quantification of mRNA was calculated by the method of threshold ( $\Delta\Delta\text{CT}$ ) in which the quantity of target cDNA is adjusted relative to a reference made by the amount of cDNA as described by Desroche *et al.* (33). The results were normalized by using of the *butB* gene coding for 2,3-butanediol dehydrogenase as an internal control. We have previously verified that the level of transcription of *butB* gene was independent of the conditions of growth tested in this study.

**Fatty acid determination.** The total lipids were extracted from cells, cultured under adapted or un-adapted conditions, harvested in the stationary phase of growth. The extraction was conducted with chloroform / methanol (1:2) according to the method described by Bligh and Dyer (7). The fatty acids were directly trans-esterified with 3% methanol in sulfuric acid for 2 h at 82°C. The separation and determination of the fatty acid methyl esters were performed with a Chrompack CP 9002 gas chromatograph equipped with an injector and detector flame ionization FID (GC-FID). The separation was carried out in a capillary Varian Factor Four (30 m x 0.32 mm). The temperature detector and injector were 230°C and 220°C respectively. The initial oven temperature was 160°C for 10 minutes and then increased to 180°C at 2°C / min. The fatty acid esters were identified by comparing their retention times with those of the standard compounds (Nu Check Prep., Elysian, MN, USA). The molar percentage of each component was calculated from the peak area obtained (ratio peak area / total area of all peaks).

Fatty acid assignments were completed by GC-mass spectrometry (GC-MS). 4,4-Dimethyloxazoline (DMOX) derivatives were prepared in a simple one-pot reaction. Total lipids were converted to their DMOX derivatives by treatment with 2-amino-2-methylpropanol in a sealed ampoule at 180°C for 18 h. The reaction mixture was cooled, dissolved in dichloromethane and washed twice with 1 ml of water. After drying the organic phase, the solvent was removed under a stream of nitrogen and the sample was dissolved in hexane. The sample was applied to a short column of Florisil, which was subsequently

washed with hexane prior to elution of the DMOX derivatives with a mixture of hexane/acetone (96:4, v/v).

**Cell membrane labelling and fluorescence anisotropy measurements.** Before each measurement, bacterial cells were energized in 50 mM MES (2-[*N*-morpholino]ethanesulfonic acid)-KOH buffer (pH 7.2) containing 10 mM glucose to prevent a decrease in membrane fluidity caused by bacterial death independent of the stress nature (104). Membrane fluidity was determined continuously by measuring fluorescence anisotropy using hydrophobic 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) (Molecular Probes, Oregon, USA) as a probe as previously described in (23). Anisotropy values were automatically calculated by the spectrofluorometer according to Shinitzky *et al.* (94). Fluorescence anisotropy (inversely proportional to membrane fluidity) was measured at 30°C, with determinations made every 8 s. To ensure probe stabilization within cell membranes for optimal anisotropy determination, control and stress-grown adapted cells were incubated with DPH probe in 50 mM MES-KOH buffer, 10 mM glucose, pH 7.2 at 30°C for 15 min. Each measurement was repeated at least five times.

**Statistical analysis.** A one-way analysis of variance (ANOVA) was performed to test whether there was a significant difference between cell viability percentages, membrane fluidity values, membrane fatty acids compositions. The confidence interval for a difference in the means was set at 95% ( $p < 0.05$ ) and the Tukey test was used to locate these significant differences. SigmaStat<sup>®</sup> software was used to carry out these statistical analyses.

## RESULTS

**Influence of culture conditions on the Fatty Acids composition.** The fatty acid composition of the *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 strain was compared to those of the mutant (*L. lactis* subsp. *cremoris*  $\Delta cfa$ ) and the complemented strain (*L. lactis* subsp. *cremoris*  $\Delta cfa$  + pDLcfa) grown in different culture conditions. This analysis was performed with stationary grown cells cultured in optimal medium or in sub-lethal conditions of growth (pH 5 or with 6% ethanol) (Table 5).

We have previously verified that the deletion of the *cfa* gene had no influence to the specific growth rate (data not shown). Six main fatty acids were identified C14:0, C16:0, C16:1n-7, C18:0, C18:1n-7 and cycC19:0n-7. Stable quantities of C15:0 *anteiso* were detected for all strains. Two unknown fatty acids, A4 and A5 were detected. In order to identify these fatty acids, a preparation of ester derivatives of fatty acids by the basic method was conducted. In this case, no fatty acid corresponding to the same retention times was detected by chromatographic analysis (data not shown). A4 and A5 probably resulted from C18:1n-7 and cycC19:0n-7, as transient compounds generated by the trans-esterification in acidic condition.

Under all growth conditions, the mutant strain *L. lactis* subsp. *cremoris*  $\Delta cfa$  could not produce lactobacillic acid and high level of CFA precursor (C18:1n-7) was detected, compared to the wild-type and the complemented strains. Thanks to copies number of pDLcfa12A3 vector, the over-expression of the *cfa* gene in the complemented strain *L. lactis* subsp. *cremoris*  $\Delta cfa$  + pDLcfa allowed an increase of the production of lactobacillic acid from *cis*-vaccenic acid compared to the wild-type strain. These data validate our strategy to obtain a *cfa*-deficient strain and a homologous recombinant strain as control.

**TABLE 5.** Fatty acid compositions (molar percentage) of *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 strains grown at 30°C on M17/7 or in sub-lethal stress conditions

Growth medium		Fatty acids compositions (Molar percentages) <sup>a</sup>								
		M17/7			M17/5			M17/7 + 6% Ethanol		
Strains	Fatty acids	<i>L. lactis cremoris</i> wild-type	<i>L. lactis cremoris</i> $\Delta cfa$	<i>L. lactis cremoris</i> $\Delta cfa$ pDLcfa	<i>L. lactis cremoris</i> wild-type	<i>L. lactis cremoris</i> $\Delta cfa$	<i>L. lactis cremoris</i> $\Delta cfa$ pDLcfa	<i>L. lactis cremoris</i> wild-type	<i>L. lactis cremoris</i> $\Delta cfa$	<i>L. lactis cremoris</i> $\Delta cfa$ pDLcfa
	C15:0 <i>iso</i>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.84 ± 8.44	6.46 ± 3.19	13.33 ± 5.92
	C14:0	9.21 ± 0.35	9.91 ± 0.75	11.07 ± 1.45	7.46 ± 1.09	6.86 ± 0.97	8.82 ± 1.08	10.45 ± 2.13	8.92 ± 0.73	9.95 ± 1.21
	C15:0 <i>anteiso</i>	5.15 ± 1.43	3.65 ± 0.28	3.77 ± 0.78	7.22 ± 0.50	5.71 ± 0.16	4.66 ± 3.58	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	C16:0	22.63 ± 2.08	24.04 ± 1.32	23.59 ± 1.92	29.53 ± 1.47	28.34 ± 0.95	33.22 ± 1.82	23.12 ± 3.27	26.20 ± 2.93	30.34 ± 1.70
	C16:1 n-7	2.42 ± 0.53	2.16 ± 0.18	2.95 ± 1.31	2.13 ± 1.58	2.60 ± 1.84	0.00 ± 0.00	17.36 ± 5.76	16.45 ± 5.15	0.00 ± 0.00
	A4 <sup>b</sup>	7.59 ± 0.60	8.33 ± 0.46	3.96 ± 2.15	1.76 ± 1.44	16.23 ± 1.57	0.00 ± 0.00	0.40 ± 0.41	2.06 ± 0.81	0.00 ± 0.00
	C18:0	1.33 ± 0.51	1.63 ± 0.79	1.54 ± 0.40	3.44 ± 0.71	3.93 ± 0.64	5.11 ± 0.99	6.31 ± 1.62	8.14 ± 3.29	10.11 ± 0.58
	C18:1 n-7	32.29 ± 5.67	50.28 ± 1.69	19.42 ± 4.86	3.60 ± 0.95	36.32 ± 1.91	0.00 ± 0.00	9.93 ± 1.72	31.77 ± 7.47	0.00 ± 0.00
	A5 <sup>b</sup>	1.23 ± 0.71	0.00 ± 0.00	4.70 ± 0.17	13.74 ± 0.67	0.00 ± 0.00	4.60 ± 2.86	0.27 ± 0.47	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	cycC19:0 n-7	18.15 ± 3.23	0.00 ± 0.00	29.00 ± 3.69	31.11 ± 0.43	0.00 ± 0.00	43.58 ± 2.89	25.32 ± 2.41	0.00 ± 0.00	36.28 ± 3.61
	UFA/SFA ratio <sup>c</sup>	0.68	1.47	0.34	0.08	1.03	0.00	0.44	1.18	0.00
	CFA conversion (%) <sup>d</sup>	35.99	0.00	59.89	89.62	0.00	100.00	71.83	0.00	100.00

<sup>a</sup> Samples were taken from their stationary phase of growth. Each value is the mean of three separate analysis. The summed data presented is the mean value +/- the SD of three replicate values. C14:0 myristic acid; C16:0: palmitic acid; C16:1 n-7: palmitoleic acid; C18:0: stearic acid; C18:1n-7: cis-vaccenic acid; cycC19:0n-7: lactobacillic acid.

<sup>b</sup> no identified fatty acids.

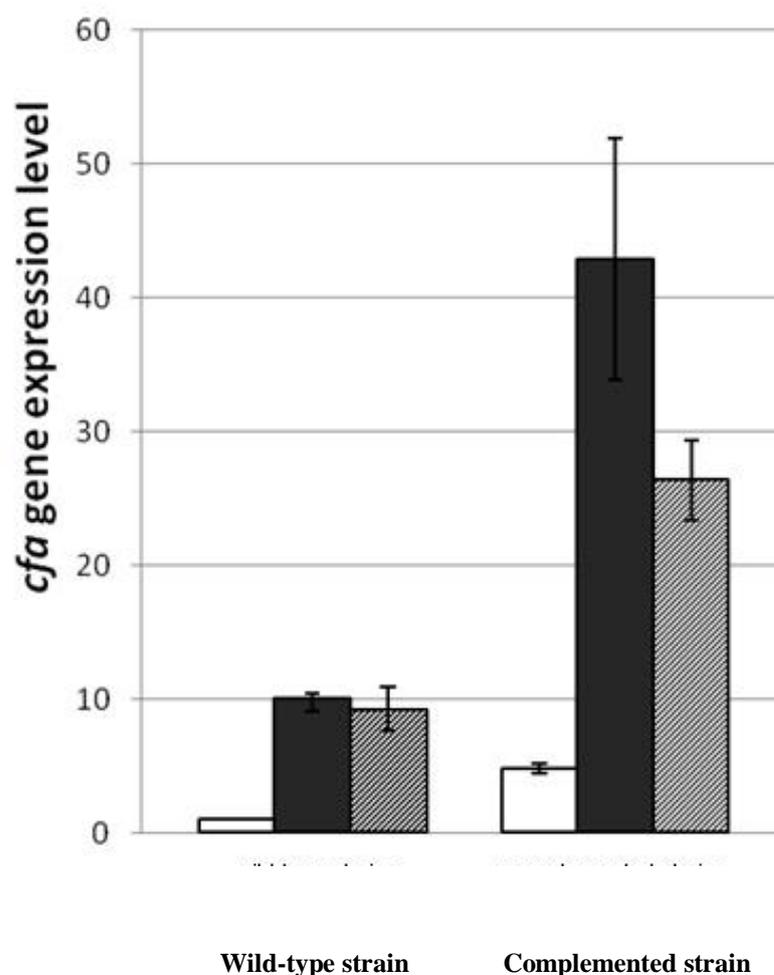
<sup>c</sup> UFA/SFA ratio =  $\frac{\sum(C16:1+C18:1n-7)}{\sum(C14:0+C16:0+C18:0+cycC19:0n-7)}$  (cycC19:0n-7 is considered as a saturated fatty acid).

<sup>d</sup> CFA conversion =  $100 * \frac{\sum(cycC19:0n-7)}{\sum(cycC19:0n-7+C18:1n-7)}$ .

Under optimal growth condition (M17/7), the amount of C16:0 represented around 24% (% molar) in the three strains. Stable quantity of C15:0 *anteiso* was detected for all strains. Changes in the Unsaturated Fatty Acids/Saturated Fatty Acids (UFA/SFA) ratio depended only on the CFA conversion. There was only 36% of CFA conversion for the wild-type strain versus 60% for the complemented strain thanks to the multi-copies vector. In cells grown under acid condition (M17/5), UFA/SFA ratio decreased significantly for the wild-type strain and the control, as main consequence of the CFA formation. We observed that 90% of cis-vaccenic acid was converted into lactobacillic acid for the wild-type strain and 100% for the complemented strain. We can note that the null value for the control UFA/SFA ratio was due to the absence of detection of palmitoleic acid. On grown-cells with ethanol (M17/7 + 6% ethanol), except for the control, UFA/SFA ratio did not change significantly for the wild-type and the mutant strains, compared to the values obtained in optimal conditions of growth. Surprisingly, we remarked for both the strains a large amount of C16:1n-7 (17% molar percentage versus 2.5% in M17/7). For all strains, the growth in presence of ethanol induced an increase of stearic acid molar percentage (8% versus 1.5% in M17/7). Moreover, no C15:0 *anteiso* was detected and we observed the apparition of C15:0. Inversely, the conversion of cis-vaccenic acid into lactobacillic acid was not affected by the growth condition with 71% and 100% of CFA conversion in wild-type and control strains, respectively.

**Expression of the *cfa* gene was induced by acidity and ethanol growth conditions.**

The differential rates of conversion of C18:1n-7 to cycC19:0n-7 observed previously between the wild-type and the control strains led us to study the level transcription of the *cfa* gene in tested growth conditions. The results obtained by qRT-PCR were presented Fig. 25.



**Figure 25.** Relative mRNA levels of *L. lactis* subsp. *cremoris* *cfa* gene in response to various conditions of growth as determined by quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted from the stationary phase cells growing in M17/7 (open bars), in M17/5 (filled bars) or in M17/7 + 6% ethanol media (horizontally striped bars). Expression level was normalized to that of the *butB* gene encoding for 2,3-butanediol dehydrogenase.

By using the comparative critical threshold ( $\Delta\Delta C_T$ ) method with *butB* gene of *L. lactis* subsp. *cremoris* as an internal control, we found that the *cfa* mRNA level increase 10 times when the wild-type strain cells were cultured at pH 5 and 9 times when cultured in presence of 6% ethanol. Thanks to the multi-copies plasmid and compared to the wild-type strain, the complemented strain showed an increase of the *cfa* mRNA levels by five-, forty two- and twenty four folds in optimal, acid- and ethanol-grown cells, respectively. This over-expression allowed this strain to convert all C18:1n-7 to cycC19:0n-7. Budin-Verneuil *et al.* (14) previously showed by reporter system the induction of *cfa* gene expression by moderate acidity. Our results agreed with these authors and demonstrate that the *cfa* promoter of *L. lactis* subsp. *cremoris* is highly regulated at the transcriptional level by both acidity and ethanol.

**Is the presence of Cyclopropane Fatty Acids a key factor to maintain the membrane rigidity in *L. lactis* subsp. *cremoris* strains?** The DPH probe is widely used for the membrane fluidity state evaluation. Indeed, it partitions favorably to the membrane interior, it has intense fluorescence, it does not appear to bind to proteins and it is sensitive to the physical state of the membrane (23, 42, 104). Fluorescence anisotropy values of DPH obtained in stationary cells grown were shown in Table 6.

**TABLE 6.** Anisotropy values R of DPH in *L. lactis* subsp. *cremoris* strains grown at 30°C on M17/7 or in sub-lethal stress conditions

Growth medium Strains	M17/7	M17/5	M17/7+6% ethanol
<i>L.lactis cremoris</i> <i>wild-type</i>	0,141 ±0,012 <sup>a,d</sup>	0,139 ±0,011 <sup>b,d</sup>	0,122 ±0,003 <sup>b,c</sup>
<i>L. lactis cremoris</i> $\Delta$ <i>cfa</i>	0,136±0,016 <sup>a,d</sup>	0,125±0,006 <sup>a,d</sup>	0,116±0,006 <sup>a,c</sup>
<i>L. lactis cremoris</i> $\Delta$ <i>cfa</i> + pDL <i>cfa</i>	0,139±0,011 <sup>a,c</sup>	0,150±0,008 <sup>b,d</sup>	0,127±0,006 <sup>b,c</sup>

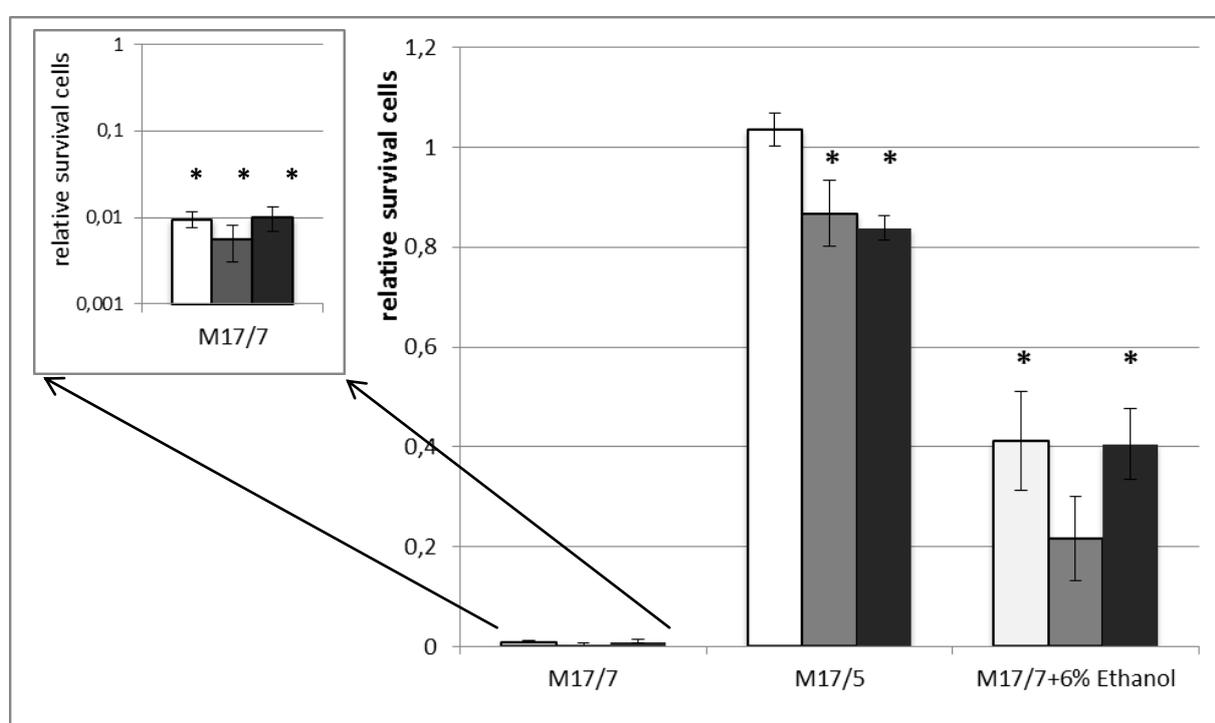
Samples were taken from their stationary phase of growth. Each value is the mean of at least five separate analyses. The summed data presented is the mean value +/- the SD of replicate values. Anisotropy values R of the DPH were continuously monitored for a period of 15 min.

Statistical analysis by Tukey test ( $p < 0.05$ ): Comparison by column with value<sup>a</sup> significantly < value<sup>b</sup>; Comparison by line with value<sup>c</sup> significantly < value<sup>d</sup>.

When the strains were grown in optimal conditions (M17/7 medium), the initial value of anisotropy was not significantly different for the three strains (mean R value = 0.138). It means that there was no difference of the membrane fluidity level between the strains, independently of the percentage of UFA cyclopropanation. In cells grown in acidic condition (M17/5 medium), the value of anisotropy was maintained for the *L. lactis* subsp. *cremoris*  $\Delta$ *cfa* mutant strain. Membranes appeared significantly more rigid (notified by an increasing of R values) for the wild-type and the complemented strains (mean R value = 0.144). We could correlate this data with the higher levels of the CFA conversion (90% and 100% for the wild-type strain and the complemented strain, respectively). In cells grown with ethanol (M17/7 + 6% ethanol), despite of the fact that the membrane appeared more fluid in the mutant strain,

all fluidity all R values dropped in comparison with values obtained in optimal or acidic condition of growth, meaning a fluidization of the membrane induced by a growth in presence of ethanol.

**Is the presence of Cyclopropane Fatty Acids a key factor for the survival of *L. lactis* subsp. *cremoris* strains after an acidic challenge?** In order to test the impact of the mutation on the acid resistance of *L. lactis* subsp. *cremoris*, the three strains were cultivated under optimal condition (pH 7) or acid-adapted condition (M17/5) or ethanol adapted condition (M17/7+ 6% ethanol) until the early stationary phase before being shocked. Results of survival were reported Fig. 26.



**Figure 26.** Survival of the *L. lactis* subsp. *cremoris* strains during acid challenge (pH 3.0) in function of the growth conditions; *L. lactis* subsp. *cremoris* wild-type (open bars); *L. lactis* subsp. *cremoris*  $\Delta cfa$  (dark grey bars); *L. lactis* subsp. *cremoris*  $\Delta cfa$  + pDLcfa (black bars). Cells were grown until stationary state, harvested and resuspended in M17/3. Viability cells were counted after 3 h acid shock. The strains survival was defined as the ratio of colonies (CFU) formed on M17/7 agar medium at the sampling time, versus  $T_0$ .

Each value is the mean of three determinations. The summed data presented is the mean value +/- the SD of replicate values; (\*) means there is no significant difference between these values; A value of relative survival 1 corresponds to  $3 \cdot 10^8$  cells/ml.

With cells grown under optimal conditions (M17/7), a decrease of 2 logs of viable cells was observed after 3 hours of incubation at pH 3.0. There was no significant difference

of viability between the three strains. The presence of CFA could not confer a better survival to the wild-type, nor to the complemented strains, which contained a larger amount of CFA. With acid-adapted cells, we observed an increase of the survival for all strains, including the mutant strain. After 3 hours of incubation at pH 3.0, more than 80% cells were still alive. Surprisingly, with ethanol-adapted cells, an opposite effect was observed. The mutant strain *L. lactis* subsp. *cremoris*  $\Delta cfa$  was significantly more affected by the acid shock, with 80% mortality after 3 hours of incubation at pH 3.0. No significant difference was observed between the wild-type and the control strains but a better survival was obtained in comparison with the mutant strain, with 40% of viable cells after 3 h of treatment.

## DISCUSSION

Modifications in fatty acids composition leading to an increase of the degree of saturation on the membrane lipids are well-known reactions of bacteria in response to a drastic modification of the environment (58, 62). Among these modifications, the synthesis of cyclopropane fatty acids is recognized to favor the stress tolerance, particularly in lactic acid bacteria, as well as the response to acid, ethanol and osmotic stresses (4, 44, 51, 71, 76, 101, 104). The lactobacillic acid cycC19:0n-7 detected in the membrane of *L. lactis* subsp. *cremoris* wild-type as well as of the control strain derives from the precursor cis-vaccenic acid C18:1n-7. The conversion ratio reached a value of 36% when the cells entered in stationary phase of growth on an optimal medium as M17/7. Acid-growth condition induced CFA synthesis, with a conversion ratio of around 90%. This result correlates with increasing amounts of *cfa* mRNA transcripts with acid-adapted cells grown, thus confirming that the gene *cfa* is regulated at the transcriptional level, according to the data of Budin-Verneuil *et al.* (14).

We have demonstrated previously on the wine lactic acid bacterium, *Oenococcus oeni*, that an increase of the CFA content was obtained with ethanol-grown cells (44). No data is available concerning the effect of ethanol on membrane composition of *L. lactis* subsp. *cremoris*. Our results demonstrated that the presence of ethanol in the medium induced not only an increase of the mechanism of cyclopropanation (conversion ratio two times folder in comparison with cells grown in optimal conditions), but also an increase of the transcripts of the *cfa* mRNA. The mechanism involved in the control of *cfa* expression has not been yet elucidated in *L. lactis* subsp. *cremoris*. Only the work of Budin-Verneuil *et al.* (14) underlined

that the induction by acidity of the *cfa* promoter expression would be independent of (p)ppGpp in this bacterium.

More interesting is the comparison of the fatty acid profiles between cells adapted to acid and those adapted to ethanol. First, we observed for the three strains a disappearance of C15:0 *anteiso* the benefit of C15:0 *iso*. The growth-dependant changes in the ratio of terminally branched *iso* and *anteiso* fatty acids were suggested in *Bacillus subtilis* as mechanism to adjust fluidity (52, 60, 64), without change of the saturation level of membrane fatty acids. Second, an accumulation of palmitoleic acid was obtained in the wild-type and the mutant strains cultivated in presence of ethanol (17% of molar percentage *versus* 2.5% with acid-grown cells). Another adaptative strategy to adjust membrane fluidity consists in a growth-dependant elongation of fatty acid chain length (29, 52). The gene *fabF* encoding a 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase was found in the *L. lactis* subsp. *cremoris* genome (9). This protein, annotated FabF, is responsible for the elongation of C16:1 n-7 (palmitoleic acid) to C18:1 n-7 (cis-vaccenic acid). Basing on the proteomic characterization of the acid tolerance response (ATR) in *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (15), FabF was not shown overproduced when the cells were incubated at pH 5.0. However, the synthesis of this protein was induced in both acid stress-resistant mutants of *L. lactis* subsp. *cremoris* (14), suggesting to the authors that this mechanism must be implied in acid adaptation of the bacterium. If we postulate that ATR implies in *L. lactis* subsp. *cremoris* a mechanism of elongation of the palmitoleic acid to cis-vaccenic acid, followed by a cyclopropanation of cis-vaccenic acid into lactobacillic acid, we would logically have observed an accumulation of cis-vaccenic acid for the mutant strain grown at pH 5.0. However, this fatty acid represented 36% of the total membrane fatty acid when the mutant cells were grown in acid condition *versus* 50% when the mutant cells were grown at pH 7.0. This result casts doubt on the involvement of FabF in the ATR. An analysis of the level of expression of the *fabF* gene, correlated with the level of expression of the *cfa* gene, in different stress conditions should be able in future to clarify the role of FabF in stress response. Moreover, the accumulation of palmitoleic acid observed with wild-type and mutant strains grown in presence of ethanol suggest a repression of the transcription of the *fabF* gene. This fact could explain a less CFA conversion ratio (71 %) and an increase of the UFA/CFA ratio observed in the wild-type strain (0.44 with ethanol-grown cells *versus* 0.08 with acid-grown cells). But we found an inverse behavior in the complemented strain used as control. An over production of Cfa synthase may affect in this particular case the equilibrium between palmitoleic/cis-vaccenic/ lactobacillic acids.

The role of structural classes of fatty acids in bacterial membrane homeoviscous adaptation is very well-documented (52, 54, 71). Concerning cyclopropane fatty acids, although the molecular mechanism controlling their formation was the subject of numerous data (20), the role of these acids is not yet fully understood. According to Härtig *et al.* (52), compared to *cis* unsaturated fatty acids, the presence of CFA should make the membrane more rigid because of their higher lipid melting points. The determination of membrane anisotropy R values with stationary phase cells grown on M17/7 did not verify the link between the presence of CFA and a lesser fluid membrane. In fact, the absence of cyclopropanation had no influence on the R value. In this case, the partial cyclopropanation of *cis*-vaccenic acid would not allow a regulation of the membrane fluidity. An induction by acidity of the synthesis of CFA led to a significant increase of R particularly on the control strain that over-produced lactobacillic acid. Surprisingly, the induction by ethanol of the cyclopropanation led for the wild-type and the control strains a significant decrease of R, reflecting a fluidization of the membrane. These results contrast with main studies of CFA role on membrane fluidity (47, 52). Moreover, previous studies on the lactic acid bacterium *O. oeni* have shown significant increases of membrane anisotropy with cells harvested in the stationary growth phase, as well as acid- or ethanol-grown cells (23, 31). In *E. coli*, one of the modifications that occur in membrane lipid composition in response to ethanol is an increase in the amount of unsaturated fatty acids (58). In ethanol-grown cells (wild-type and mutant strains), we actually observed higher amounts of C16:1n-7 instead of C18:1 n-7. Shorter chains of fatty acids are characterized by a lower melting point. This data could explain the membrane fluidization observed in both strains, but did not explain the value of R observed in the complemented strain.

With no-adapted cells, the presence of cyclopropane fatty acid could not confer a better survival after an acid shock to the wild-type, nor to the complemented strains which contained a larger amount of CFA. This result was consistent with fluidity data, suggesting an absence of homeoviscous adaptation despite the synthesis of CFA. The increase of survival observed with acid-adapted, independently of the cyclopropanation of the *cis*-vaccenic acid, supports the fact that the synthesis of CFA is not essential in acid tolerance response.

In comparison with data obtained with acid-grown cells, the lower survival values observed with ethanol-adapted cells could be explained by a more fluid-state of the membrane, affecting the cellular integrity. In order to understand the different behavior observed between acid-adapted and ethanol-adapted cells, we compared by qRT-PCR ten genes expression

levels in the three strains cultured under three conditions (M17/7, M17/5 and M17/7 + 6% ethanol). The chosen genes encode for stress proteins highly induced by acidity in *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (15). The comparison of genes expression levels demonstrated that ATR is strongly induced by acidity in the three strains and slightly by ethanol (data not shown). The ATR response implies that *L. lactis* subsp. *cremoris* reorganizes its metabolisms in response to acid stress. The Cfa synthase has been demonstrated as part of the 10 most over-expressed proteins in *L. lactis* subsp. *cremoris* incubated at pH 5.0 (15). However, other stress proteins must predominate to maintain the membrane integrity against acid stress. In *O. oeni*, induction of the expression of *hsp 18*, encoding for the lipo-chaperon protein Lo18, was previously shown (23). Lo18 was found to be peripherally associated with the cytoplasmic membrane. An involvement of this small Hsp in the maintenance of membrane integrity has been demonstrated (25). No gene encoding for such a protein has been identified in the genome of *L. lactis* subsp. *cremoris*. The role of ATR-overproduced proteins on the stabilization of membrane fluidity remains to be elucidated in this bacterium.

A growth in presence of ethanol induces an over production of CFA, independently of the ATR response. In this particular case, an acid shock induced a mortality lower than that observed on cells grown in optimal conditions. The accumulation of the shorter chain fatty acid C16:1n-7, known to decrease the hydrophobic interaction between the free acyls chains and the proteins, could explain the restriction of the deleterious effect of an acid treatment on cellular integrity.

We can conclude that the mechanism of cyclopropanation of the membrane unsaturated fatty acids, even if it could contribute to a better survival of *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 in response to an acid stress, is not a key factor for the acid stress resistance.

### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from the Embassy of France in Vietnam, by the Regional Council of Burgundy and by Agrosup Dijon - France. The GC-MS analyses were performed by the Plate- Forme Lipides-Arômes (UMR-1324, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, INRA Dijon). We thank Olivier Berdeaux and Stéphane Gregoire for their critical interpretation of the fatty acids profiles. We thank Dominique Garmyn for the gift of pGID023 vector and for his constant interest in this work.

## Données supplémentaires

**TABLE 7.** Valeurs d'anisotropie R chez les souches de *L. lactis* subsp. *cremoris* cultivées à 30°C sur M17/7 ou en conditions de stress – Effet d'un choc éthanol (18%v/v) sur la variation instantanée d'anisotropie.

Milieux de croissance	M17/7		M17/5		M17/7 + 6% Ethanol	
Souches	Initial value	Abrupt R <sup>γ</sup> value	Initial value	Abrupt R value	Initial value	Abrupt R value
<i>L. lactis cremoris parentale</i>	0,141 <sup>a,d</sup> ±0,012	0,068 <sup>b,c</sup> ±0,012	0,139 <sup>b,d</sup> ±0,011	0,071 <sup>b,c</sup> ±0,011	0,122 <sup>a,c</sup> ±0,003	0,104 <sup>a,d</sup> ±0,008
<i>L. lactis cremoris Δcfa</i>	0,136 <sup>a,d</sup> ±0,016	0,045 <sup>a,c</sup> ±0,02	0,125 <sup>a,d</sup> ±0,006	0,046 <sup>a,c</sup> ±0,014	0,116 <sup>a,c</sup> ±0,006	0,090 <sup>a,d</sup> ±0,012
<i>L. lactis cremoris Δcfa pDLcfa</i>	0,139 <sup>a,d</sup> ±0,011	0,073 <sup>b,c</sup> ±0,026	0,150 <sup>b,d</sup> ±0,008	0,074 <sup>b,c</sup> ±0,010	0,127 <sup>a,c</sup> ±0,006	0,093 <sup>a,d</sup> ±0,020

Les cellules sont prélevées en phase stationnaire de croissance. Chaque valeur représente la moyenne d'au moins cinq répétitions indépendantes +/- la variation standard. Les valeurs de R sont mesurées en continu pendant 15 minutes. Le choc éthanol est directement effectué au cours de la mesure par ajout d'éthanol dans la cuve.

Analyse statistique par le test de Tukey (p<0.05): Comparaison par colonne avec valeur<sup>a</sup> significativement < valeur<sup>b</sup>;

Comparaison par ligne avec valeur<sup>c</sup> significantly < valeur<sup>d</sup>.

<sup>γ</sup> Abrupt R value : Valeur instantanée de R après choc

Les variations instantanées d'anisotropie de fluorescence ont également été mesurées sur cellules directement choquées pendant la mesure par ajout d'éthanol. L'éthanol est en effet connu pour son effet instantanément fluidifiant sur la membrane. Dans ce cas, après 10 minutes d'incubation, un volume d'éthanol est directement ajouté dans la cuve, de manière à avoir une concentration finale de 18% éthanol (v/v). Les valeurs instantanées de l'anisotropie R, suite à l'ajout d'éthanol sont reportées dans le tableau 7.

Sur cellules cultivées en conditions optimales, comme sur cellules préalablement adaptées à l'acidité, l'ajout d'éthanol entraîne une fluidification instantanée de la membrane, marquée par une chute de la valeur d'anisotropie. Cependant, dans le cas des cellules cultivées à pH 5,0, la fluidification est moins forte pour la souche parentale et pour la souche mutante complémentée. Dans le cas des cellules cultivées en présence de 6% d'éthanol, le choc éthanol à 18% n'entraîne qu'une très faible fluidification de la membrane, indépendamment de la synthèse de CFA chez les trois souches analysées.

Ces résultats confortent l'hypothèse précédemment émise. Les acides gras cycliques membranaires ne sont pas déterminants dans la régulation de la fluidité membranaire chez *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363. En effet, même si il apparait sur cellules cultivées à pH acide un effet plus marqué du choc éthanol sur le mutant ne contenant pas de CFA membranaires, les résultats obtenus sur cellules cultivées en présence d'éthanol, puis stressés en présence de 18% d'éthanol, démontrent que la régulation de la fluidité, ainsi que la modulation instantanée de la fluidité face à un stress est peu dépendante de la présence d'acides gras cycliques au niveau membranaire.

## CHAPITRE 3

### Caractérisation du gène *cfa* de *O. oeni* par complémentation hétérologue d'un mutant *cfa* déficient de *L. lactis* subsp. *cremoris* (Article 2)

Pour répondre aux différentes hypothèses concernant le problème de complémentation partielle chez la bactérie hôte *L. lactis* subsp. *cremoris* (Chapitres 1 et 2), nous avons entrepris un travail de caractérisation biochimique *in vitro* de l'enzyme Cfa synthase de *O. oeni*.

Suite à la complémentation hétérologue de la souche mutante de *L. lactis* subsp. *cremoris*, nous constatons que l'introduction du gène *cfa* de *O. oeni* ne permet pas de restaurer le taux de CFA membranaires de la souche parentale. Pour répondre aux différentes hypothèses posées concernant ce phénomène de complémentation partielle, en particulier la préférence de substrat et la valeur de pH intracellulaire, la Cfa synthase de *O. oeni* a été surproduite chez *E. coli* puis purifiée afin de procéder à sa caractérisation biochimique *in vitro*. A partir des travaux initiés par Marie Tollot (103) la phase codante du gène *cfa* de *O. oeni* a été clonée dans le vecteur pET28 sous le contrôle du promoteur T7. Après transfert de ce plasmide recombinant dans la souche de *E. coli* BL21, les conditions de culture ont été optimisées pour la surexpression du gène *cfa* induite par ajout d'IPTG. Les protéines totales de la souche BL21 recombinante ont été analysées par électrophorèse en gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Une protéine d'environ 45 kDa, en accord avec la masse moléculaire théorique de la Cfa synthase de *O. oeni*, apparaît surproduite. A partir de l'extrait protéique, une purification a été réalisée par chromatographie d'affinité sur colonne d'agarose nickel (Ni-NTA agarose). L'activité enzymatique de la protéine recombinante a été estimée *in vitro*, après avoir optimisé la méthode de mesure des acides gras cycliques formés par CPG (protocole adapté de Courtois *et al.* (26, 27). Afin de mieux comprendre le mode d'action de cette enzyme et en particulier sa spécificité de substrat, les constantes enzymatiques ( $K_M$ ,  $V_{max}$ ), ont été déterminées.

L'ensemble des résultats obtenus est présenté sous forme d'un article en cours de préparation.

**The *Oenococcus oeni* cyclopropane fatty acid synthase: heterologous expression and biochemical characterization**

Thi Mai Huong To<sup>1</sup>, Cosette Grandvalet\*<sup>1,2</sup>, Thu-Ha Nguyen<sup>1</sup>, Raphaëlle Tourdot-Maréchal<sup>1</sup>

*Laboratoire Recherche en Vigne et Vin EA 4149, Université de Bourgogne, Institut  
Universitaire de la Vigne et du Vin Jules Guyot, 1, rue Claude Ladrey – Campus  
Universitaire Montmuzard, BP27877, F-21078 Dijon, France<sup>1</sup>*

*and Department DSAN – AgroSUP DIJON, Bâtiment Erasme, 1 esplanade Erasme, F-21000  
Dijon cedex, France<sup>2</sup>*

\* Corresponding author :

Mailing address: Laboratoire Recherche en Vigne et Vin EA 4149, Université de Bourgogne, IUVV, 1, rue Claude Ladrey – Campus Universitaire Montmuzard, BP27877, F-21078 Dijon, France.

Tel.: 33 3 80 39 62 66. Fax: 33 3 80 39 62 65.

E-mail address: cosette.grandvalet@u-bourgogne.fr

## Abstract

The cyclopropane fatty acid gene (*cfa*) of *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 was cloned and its property and activity of the Cfa Synthase were investigated. The function of the *cfa* gene was confirmed by complementation of a *L. lactis* subsp. *cremoris* *cfa*-deficient strain in term of unsaturated fatty acid cyclization. Over-produced in *E. coli* BL21 by using pET28a (+) as vector, the *O. oeni* Cfa synthase was purified using Ni-NTA matrix. The transformed strain overproduced a protein of approximately 45 kDa, in agreement with the theoretical molecular weight of the Cfa synthase from *O. oeni*.

The enzyme activity was recovered *in vitro*. Recombinant enzyme showed an optimum pH at 5.6 and an optimal temperature of 35.8°C. By Lineweaver-Burk plot analysis, the values of  $K_M$  and  $V_{max}$  were 2.26 mM and 64.5  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ , respectively. The turn over number ( $k_{cat}$ ) was 6000  $\text{min}^{-1}$ . Compared to other values published, the high  $K_M$  value obtained suggests a low affinity of *O. oeni* Cfa synthase for the phospholipid of *L. lactis*.

## 1. INTRODUCTION

*Oenococcus oeni* (*O. oeni*) is the lactic acid bacterium mainly responsible for the malolactique fermentation in wine-making. This bacterium can tolerate the low pH and the high ethanol content in wine and therefore it represents an original candidate to improve the knowledge on the lactic bacteria stress response (69).

Modification of the saturation degree of membrane fatty acids through the cyclisation of Unsaturated Fatty Acids (UFA) to Cyclopropane Fatty Acids (CFA) was recently demonstrated in *O. oeni* grown cells in sublethal stress conditions (39). This conversion is catalyzed *in situ* by the Cfa Synthase that transfers a methylene group from S-adenosyl-L-methionine to a double bond of UFA chains (C18:1n-7 and C18:1n-9) of membrane phospholipids. An increase of the CFA content was observed when the membrane cells grown in stress conditions (44, 101). The level of *cfa* transcripts increased when cells were harvested in the stationary phase and when cells grown in presence of ethanol or at low pH, suggesting transcriptional regulation of the *cfa* gene under different stress conditions (44). The investigation of the functionality of the *O. oeni cfa* gene encoding the Cfa synthase was a necessary step for a comparative study of the physiological role of CFA in lactic acid bacteria adaptation to environmental stresses.

The Cfa synthase of *E. coli* and *Mycobacterium tuberculosis* are very well characterized. The Cfa synthase of *E. coli* is a peptide consisting of 382 amino acid residues active *in vitro* as a homodimer (108). As many methyltransferases, the enzyme has three motifs consisting of 8 to 10 amino acids, involved in binding of S-adenosyl-L-methionine (AdoMet) and S-adenosyl homocysteine (AdoHcy) (59). Three cystein residues are well preserved, however, the mutation of these residues does not significantly affect the enzyme activity (47). Recently, a study conducted on three crystallographic Cfa synthases of *M. tuberculosis* has provided new evidence on the structure of the enzyme (56).

The biochemical study of the enzyme has revealed a relative instability of *E. coli* purified Cfa synthase. Its half-life was 16 h at 4°C and only a few minutes at 37°C (46). Relative stability of the enzyme can be obtained *in vitro* by addition of lipid molecules in purified fractions. The addition of bovine serum albumin (BSA) or dithiothreitol (DTT) also stabilized the enzyme *in vitro*. The Cfa synthase of *E. coli*, characterized by Guianvarc'h *et al.* (49), presented a  $K_m$  of 80  $\mu\text{M}$  and  $k_{\text{cat}}$  of 4  $\text{min}^{-1}$ .

The low efficiency of techniques for DNA manipulation in *O. oeni* strains imposes the development of a heterologous expression system. The function of the *cfa* gene was previously confirmed by complementation of a *cfa*-deficient *E. coli* strain. Nevertheless, the complementation remained partial because the conversion percentage of unsaturated fatty acids into CFA of the complemented strain (18%) was much lower than that of the wild-type strain (90%) (44). This could be caused by the expression of a heterologous gene in Gram negative *E. coli* cells or to a higher affinity of the *O. oeni* enzyme for its natural substrate (oleic acid instead of palmitoleic acid). Therefore, it seems necessary to study the activity of Cfa synthase of *O. oeni* expressed in a Gram-positive bacterium. We chose *L. lactis* subsp. *cremoris* as the host. For the study of biochemical characteristics of the enzyme, the Cfa synthase of *O. oeni* was overproduced in *E. coli* strain BL21 (103). After optimizing the purification step of the Cfa synthase from *O. oeni*, activity measurements *in vitro* have been implemented by the GC method. The development of this method aims at determining biochemical characteristics of *O. oeni* Cfa synthase.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### ***2.1. Strains, plasmids and media***

The bacterial strains and plasmids used are listed in Table 8. *E. coli* strains were cultured in Luria-Bertani (6) media, at 37°C on a rotator shaker at 150 rpm for liquid medium. *L. lactis* subsp. *cremoris* strains were cultured at 30°C in M17/7 (102). Kanamycin, spectinomycin and ampicillin were used at the concentrations of 50 µg.mL<sup>-1</sup>, 50 µg.mL<sup>-1</sup> and 100 µg.mL<sup>-1</sup>, respectively for *E. coli*. For *L. lactis* subsp. *cremoris* strains, 1 mg.mL<sup>-1</sup> of spectinomycin was added to the medium.

**Table 8:** Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Genotype or markers; characteristics and used <sup>a</sup>	Reference or source
<i>Escherichia coli</i> strains		
BL21 $\lambda$ DE3	Host strain for expression vector pET28a (+)	Promega
BL21 pET28a	BL21(DE3) transformed with pET28a (+), Km <sup>R</sup>	This work
BL21 pMT2-ht	BL21(DE3) transformed with the pMT2-ht, Km <sup>R</sup>	(103)
ER2738	General cloning strain	Invitrogene
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>		
MG1363	Plasmid-free derivative of <i>S. lactis</i> NCDO 712 cured of $\Phi$ T712 prophage	(41)
MG1363 $\Delta cfa$	<i>cfa</i> mutant derivative of MG1363	(102)
MG1363 $\Delta cfa$ pGC20	MG1363 $\Delta cfa$ transformed with pGC20, sp <sup>R</sup>	This study
<b>Plasmids</b>		
pUC18	Cloning vector, ap <sup>R</sup>	Our laboratory
pET28a (+)	Expression vector containing the T7 promoter, km <sup>R</sup>	Novagen
pMT2-ht(pETCfa1-2)	pET28a (+) containing <i>O. oeni cfa</i> gene under the control of T7 promoter and fused to 6 histidine codons, km <sup>R</sup>	This work
pDL278	<i>E. coli-L.lactis</i> shuttle vector (6.6 kbp), sp <sup>R</sup>	(21)
pGC20	pDL278 derivative vector used to express the <i>O. oeni cfa</i> gene under endogenous promoter, sp <sup>R</sup>	This study

<sup>a</sup>km<sup>R</sup>, sp<sup>R</sup>, ap<sup>R</sup> indicate resistance to kanamycin, spectinomycin and ampicillin respectively

## 2. 2. *Complementation of the L. lactis subsp. cremoris cfa-deficient strain.*

Standard procedures as purification, ligation, restriction analysis, gel electrophoresis were carried out as described by Sambrook *et al.* (91). *L. lactis* subsp. *cremoris* chromosomal DNA was prepared by the classical method described by Posno *et al.* (82). PCR products and restriction products were purified with the Gene Elute PCR Kits (Sigma, France). Conventional electroporation was used for *E. coli* and *L. lactis* subsp. *cremoris* was transformed by electroporation as described by Dower *et al.* (36).

The entire *cfa* gene of *Oenococcus oeni* ATCC BAA 1163 (including the promoter region) was amplified by PCR with High Fidelity taq using primers *cfa*4MT (CCCGGATCCTTCATTTTAATTAATAAAAAAATAAAATTTT) and *cfa*5MT (GGGGAATTCTCTTGTTCCTTTTTTTAGAAAATT) which include BamHI and EcoRI restriction sites, respectively (restriction sites were underlined). The PCR product was first subcloned into pUC18, and then the 1140-bp fragment isolated from BamHI and EcoRI digestion was ligated into the corresponding sites of pDL278 to yield pGC20. The pGC20 recombinant vector was introduced in the *L. lactis* subsp. *cremoris cfa*-deficient strain for the heterologous expression system.

## 2. 3. *RNA extraction and analysis.*

Cultures in exponential phase of growth were centrifuged and washed with water DMPC (0.1% dimethylpyrocarbonate treated water before autoclaving to inactivate RNases). The cell pellets were resuspended in 1 ml Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) and cells were broken in Precellys Disruptor by 2 cycles of 30 s at 6000 rotations per minute, in the presence of 200 mg of glass beads (diameter 70 / 100  $\mu$ m). Total RNAs were then extracted with phenol-chloroform, precipitated with isopropanol and resuspended in RNase free-water. Reverse Transcription-PCR was carried out using the reverse transcriptase iScript<sup>TM</sup> (Bio-Rad) as recommended by the supplier. The real-time PCR (qRT-PCR) was carried out on a BioRad I-Cycler with the IQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green supermix (Biorad) in 96-well plates. For each measurement, a threshold cycle value ( $C_T$ ) was determined. Quantification of mRNA was calculated by the method of threshold ( $\Delta\Delta CT$ ) in which the quantity of target cDNA was adjusted to a reference based on the amount of cDNA as described by Desroche *et al.* (33). The results were normalized by using of the *butB* gene coding for 2,3-butanediol

dehydrogenase as an internal control. We have previously verified that the level of transcription of *butB* gene was independent of the conditions of growth tested in this study.

#### **2. 4. Cloning and over-expression of the *O. oeni cfa* gene in *E. coli***

For biochemical characterization, the *O. oeni cfa* gene was cloned and expressed in *E. coli*. To facilitate purification of Cfa synthase, a His-tag was added to the N-terminal using the pET expression system. The entire coding sequence of the *O. oeni cfa* gene was amplified by PCR using the primers *cfa1M* (GGGGCCCCCATATGTTAGAGAAAACCATTTATCG) and *cfa2* (CCCGAAATTCTAACTTAATTCATGTTTCATAAATAT) which include NdeI and EcoRI restriction sites, respectively (underlined). The PCR product was first subcloned into pUC18, then the 1180-pb fragment isolated from NdeI and EcoRI digestion was ligated into the corresponding sites of pET-28a (+) to yield the pETcfa1-2 plasmid.

#### **2. 5. Cfa synthase over-production and purification**

The pETcfa1-2 plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen). The recombinant *E. coli* were aerobically grown in LB broth (500 mL) supplemented with 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  kanamycin for 2 h ( $\text{OD}_{600} = 0.7$ ) at 37°C. The *cfa* gene was induced by addition of 50  $\mu\text{M}$  isopropyl- $\beta$ -d thiogalactoside (IPTG) and cells were incubated 19 h at 16°C on a rotator shaker at 150 rpm. Cells were harvested by centrifugation ( $6000 \times g$ , 15 min). The cells were washed with buffer A ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ , 20 mM, pH 7.4; NaCl 300 mM) and resuspended in the same buffer. The cells were then disrupted by Precellys (speed 6500 rpm, 2 times, 20 seconds). Cells debris were removed by centrifugation ( $7000 \times g$ , 30 min). After centrifugation, the supernatant was directly applied to a Nickel- Nitrilotriacetate column (Ni-NTA agarose, Qiagen) pre-equilibrated with buffer A according to manufacturer's recommendations. The column was washed with buffer A and recombinant protein was eluted with an imidazol gradient (20 mM to 200 mM) in buffer A. Protein content was detected and quantified using the colorimetric assay described by Bradford (10). Purity and apparent molecular mass of the eluted protein were determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Fractions showing a single band on the gel were pooled, dialyzed to remove Imidazol and salts by the Amicon Ultra filter 15KDa (Millipore, USA), then stored at -20°C with 50% glycerol until use.

## **2. 6. Procedures for the lipids analysis**

### **2. 6.1 Phospholipids preparation**

The total lipids were extracted from the *L. lactis* subsp. *cremoris* strains cells, cultured at M17/7 medium, harvested in the stationary phase of growth. The total lipids were extracted with chloroform / methanol (1:2) according to the method described by Bligh and Dyer (7).

The unsaturated phospholipids as a substrate for the enzymatic assay *in vitro* were extracted from the *L. lactis*  $\Delta cfa$  cells. Once purified the phospholipids were resuspended in 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The phospholipid solution was sonicated for 3 min for dispersion prior to use as substrates before use in the Cfa synthase assay.

### **2. 6.2 Fatty acids esterification and GC analysis**

Total fatty acids were directly transesterified with 3% methanol in sulfuric acid for 2 h at  $82^{\circ}\text{C}$ . The methyl esters obtained are then analyzed by the Gas Chromatography (GC) using a Chrompack CP 9002 chromatograph equipped with an injector and flame detector ionization FID. The samples were analyzed on a capillary Varian Factor Four (30 m x 0.32 mm). The temperature detector and injector were  $230^{\circ}\text{C}$  and  $220^{\circ}\text{C}$  respectively. The initial oven temperature was  $160^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes and then increased to  $180^{\circ}\text{C}$  at  $2^{\circ}\text{C} / \text{min}$ . The AG esters are identified by comparing their retention times with those of the standard compounds (Nu Check Prep., Elysian, MN, USA). The percentage of each component is calculated from the peak area obtained (ratio peak area / total area of all peaks). The absolute quantification of each component was performed by using a defined amount of pentadecanoic acid (C15: 0) as internal standard.

### **2. 7. Cfa synthase assay**

The Cfa synthase Gas Chromatography assay was performed as previously described by Ploux (49) with some modifications. A standard reaction mixture (100  $\mu\text{l}$ ) consisted of: 20 mM potassium phosphate buffer, definite pH,  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  phospholipids of *L. lactis* spp. *cremoris*  $\Delta cfa$  membrane, 0.5 mM Bovine Serum Albumin (BSA), 10% (v/v) glycerol, 2 mM Dithiothreitol (DTT), 0.75 mM S-AdoMet, 0.5 mM EDTA. The reaction was initiated by the

addition of the Cfa synthase and incubated at a defined temperature for maximum 1 h. The reaction was stopped by adding 1 mL Tricloacetic acid TCA 10%.

### ***2. 8. Experimental design***

Experiments were designed using the NEMRODW software (LPRAI, University of Marseille, France) to determine the maximal rate of CFA conversion in the enzymatic reaction in relation with pH (5 to 6) and temperature (30°C to 37°C). We have chosen the square domain and 2<sup>nd</sup> degree polynomial model for this study.

### 3. RESULTS

#### 3. 1. The *O. oeni cfa* gene partially complements the *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 *cfa*-deficient strain

*L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 strain, previously constructed (102) was complemented with the pGC20 plasmid carrying the entire *O. oeni cfa* gene. Thanks to pGC20, an increase of cycC19:0 n-7 amounts and a decrease of its precursor C18:1 n-7 was observed in the *L. lactis* complemented strain, MG1363  $\Delta cfa$  pGC20 (Table 9).

Under optimal growth condition (M17/7), we observed only 3.7% of CFA conversion for the complemented strain versus 36% for parental strain MG1363. In spite of the multi-copies vector, the complementation of the MG1363 strain did not allow to restore the amount of CFA of the parental strain. By transcriptional fusion constructions, Budin-Verneuil *et al.* (14), reported an induction of the *L. lactis* subsp. *cremoris cfa* gene by moderate acidity of the medium. When cells were cultured under acidic condition, we observed almost 90% of CFA conversion. These results confirm, in agreement with the data of Budin-Verneuil *et al.* (14), an increase of the C18:1 n-7 cyclization in the parental strain under acidic condition. An increase of the CFA conversion rate was also observed in the complemented strain. Nevertheless, the level of CFA conversion in the complemented strain (15%) remains lower than in the parental strain. We can note that in acidic condition the complemented strain showed an increase of the CFA conversion level by four folds compared to optimal conditions, whereas in the parental strain the level increase by a factor of 2.5. We previously report that ethanol (6%) in the medium increased by two fold the CFA level in *L. lactis* subsp. *cremoris* (94). An increase by three fold of the CFA level was observed in the complemented strain. Those results confirm the function of the *O. oeni cfa* gene by complementation of a *L. lactis* subsp. *cremoris cfa*-deficient strain in terms of fatty acid composition, although the level of CFA was not totally restored. Moreover, we observed an induction of the expression of the heterologous gene in *L. lactis* subsp. *cremoris* in stress condition (growth at pH 5 or with 6% ethanol) compared to optimal growth conditions.

**TABLE 9.** Fatty acid compositions (molar percentage) of *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 strains grown at 30°C on M17/7 or in sub-lethal stress conditions

Strains Fatty acids	Fatty acids compositions (Molar percentages) <sup>a</sup>								
	M17/7			M17/5			M17/7 +6% Ethanol		
	MG1363	MG1363Δcfa	MG1363Δcfa + pGC20	MG1363	MG1363Δcfa	MG1363Δcfa + pGC20	MG1363	MG1363Δcfa	MG1363Δcfa + pGC20
C15:0 iso	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	6.84 ± 8.44	6.46 ± 3.19	6.82 ± 4.01
C14:0	9.21 ± 0.35	9.91 ± 0.75	9.64 ± 0.34	7.46 ± 1.09	6.86 ± 0.97	6.55 ± 0.27	10.45 ± 2.13	8.92 ± 0.73	9.64 ± 0.56
C15:0 antéiso	5.15 ± 1.43	3.65 ± 0.28	3.81 ± 0.28	7.22 ± 0.50	5.71 ± 0.16	5.87 ± 0.67	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C16:0	22.63 ± 2.08	24.04 ± 1.32	23.50 ± 1.31	29.53 ± 1.47	28.34 ± 0.95	28.06 ± 0.39	23.12 ± 3.27	26.20 ± 2.93	23.60 ± 1.79
C16:1 n-7	2.42 ± 0.53	2.16 ± 0.18	2.31 ± 0.25	2.13 ± 1.58	2.60 ± 1.84	2.51 ± 1.70	17.36 ± 5.76	16.45 ± 5.15	13.29 ± 0.83
A4 <sup>b</sup>	7.59 ± 0.60	8.33 0.46	8.53 ± 0.87	1.76 ± 1.44	16.23 ± 1.57	13.22 ± 0.15	0.40 ± 0.41	2.06 ± 0.81	2.45 ± 0.35
C18:0	1.33 ± 0.51	1.63 ± 0.79	1.95 ± 0.88	3.44 ± 0.71	3.93 ± 0.64	4.28 ± 0.08	6.31 ± 1.62	8.14 ± 3.29	5.74 ± 0.63
C18:1 n-7	32.29 ± 5.67	50.28 ± 1.69	47.94 ± 2.42	3.60 ± 0.95	36.32 ± 1.91	31.53 ± 1.43	9.93 ± 1.72	31.77 ± 7.47	34.40 ± 1.94
A5 <sup>b</sup>	1.23 ± 0.71	0.00 ± 0.00	0.49 ± 0.44	13.74 ± 0.67	0.00 ± 0.00	2.40 ± 0.44	0.27 ± 0.47	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Cyc C19:0 n-7	18.15 ± 3.23	0.00 ± 0.00	1.83 ± 0.84	31.11 ± 0.43	0.00 ± 0.00	5.57 ± 1.53	25.32 ± 2.41	0.00 ± 0.00	4.06 ± 0.56
UFA/SFA ratio <sup>c</sup>	0.68	1.47	1.37	0.08	1.03	0.77	0.44	1.18	1.19
CFA conversion (%) <sup>d</sup>	35.99	0.00	3.67	89.62	0.00	15.00	71.83	0.00	10.56

<sup>a</sup> Samples were taken from their stationary phase of growth. Each value is the mean of three separate analysis. The summed data presented is the mean value +/- the SD of three replicate values. C14:0 myristic acid; C16:0: palmitic acid; C16:1 n-7: palmitoleic acid; C18:0: stearic acid; C18:1n-7: cis-vaccenic acid; cycC19:0n-7: lactobacillic acid.

<sup>b</sup>no identified fatty acids.

<sup>c</sup>UFA/SFA ratio= $\Sigma$ (C16:1+C18:1n-7)/ $\Sigma$ (C14:0+C16:0+C18:0+cycC19:0n-7) (cycC19:0n-7 is considered as a saturated fatty acid).

<sup>d</sup>CFA conversion= $100 \times \Sigma$ (cycC19:0n-7)/ $\Sigma$ (cycC19:0n-7+C18:1n-7).

### 3. 2. Expression level of the *cfa* gene of *O. oeni* versus that of *L. lactis*

**Table 10:** Determination of the transcription level of the *L. lactis* and the *O. oeni cfa* genes by qRT-PCR

	Optimal growth conditions (pH 7)	Growth in acidic condition (pH 5)
<b><i>L. lactis cfa</i> gene</b>		
(in the <b>MG1363+pDL278</b> strain)	2,64	6,38
<b><i>O. oeni cfa</i> gene</b>		
(in the <b>MG1363<math>\Delta</math><i>cfa</i>+ pGC20</b> strain)	8,88	418,28

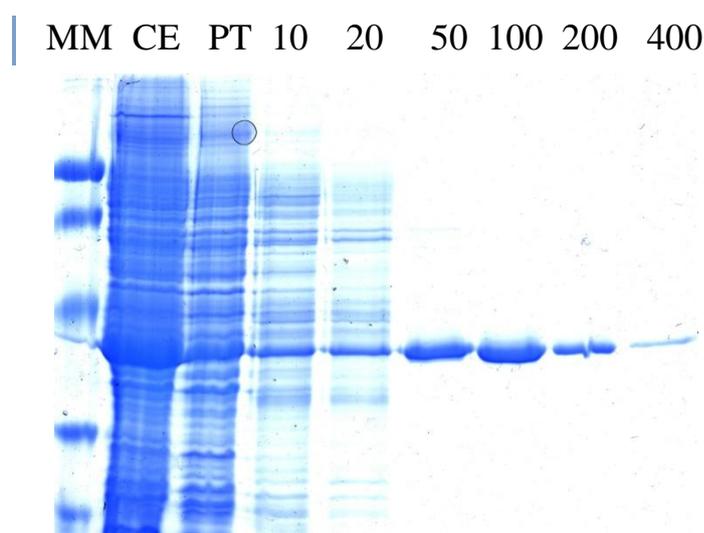
Total RNA was extracted from the stationary phase cells growing at pH 7 or pH 5. Relative expression levels were calculated using the comparative critical threshold ( $\Delta\Delta$ CT) method and normalized to that of the *butB* gene encoding for diacetyl acetoin reductase.

To explain the partial complementation of the *cfa*-deficient mutant, qRT-PCR experiments were performed in order to compare the expression level of the *cfa* gene of *O. oeni* with the *cfa* gene of *L. lactis* subsp. *cremoris*. In optimal growth condition, *O. oeni cfa* transcripts level was more than three times higher in the complemented strain compared to the level of the *cfa* transcripts in the parental strain. In acidic condition of growth, the level of *cfa* transcripts was increased more than forty seven-fold in the complemented strain *versus* two-fold in the parental strain. Those results did not explain the partial complementation of the *cfa*-deficient mutant since the *O. oeni cfa* transcripts level was 3 and 65-fold higher than *L. lactis cfa* transcripts level in optimal growth and acidic condition of growth, respectively. However, the incomplete cyclisation of unsaturated fatty acids in the complemented  $\Delta$ *cfa* strain could be due to a low translation level or a non optimal enzymatic activity of the *O. oeni* Cfa synthase in the heterologous host. Therefore, an enzymatic approach to studying Cfa synthase of *O. oeni in vitro* was investigated.

### 3. 3. Over-production and purification of the Cfa synthase

The Cfa synthase of *O. oeni* was overproduced by cloning its coding sequence in the plasmid pET28, placing the gene under the control of an inducible T7 bacteriophage promoter and creating a translational fusion that adds a carboxy-terminal extension containing six histidine residues. The enzyme was purified by immobilized metal affinity chromatography using a Ni-NTA agarose column (see Material & Methods). Initial attempts were frustrated by the poor yields and relative instable of enzyme *in vitro* resulting from the over-production. The purification process was modified in order to develop an improved methodology for *in vitro* study.

To optimize the production of *O. oeni* Cfa synthase in *E. coli*, different parameters were tested: induction conditions (temperature, time, IPTG concentration); composition of the cell lysis buffer. Optimized conditions were: a low induction temperature (17-20 °C), a moderate IPTG concentration (50µM to 100µM) and use of phosphate buffer (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> /KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM; NaCl, 300 mM, pH7.4) instead of sodium buffer. For enzyme purification, the sodium buffer (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM; Tris-HCl 50 mM, pH 8) was used. The addition of BSA and DTT was previously found to substantially stabilize the Cfa synthase activity (26), thus the BSA (80 µM) and DTT (2 µM) were added in the assays. As shown in Fig. 27, the *O. oeni* Cfa synthase protein was obtained with purity greater than 95% and displayed the expected apparent molecular mass of ~ 45 kDa.

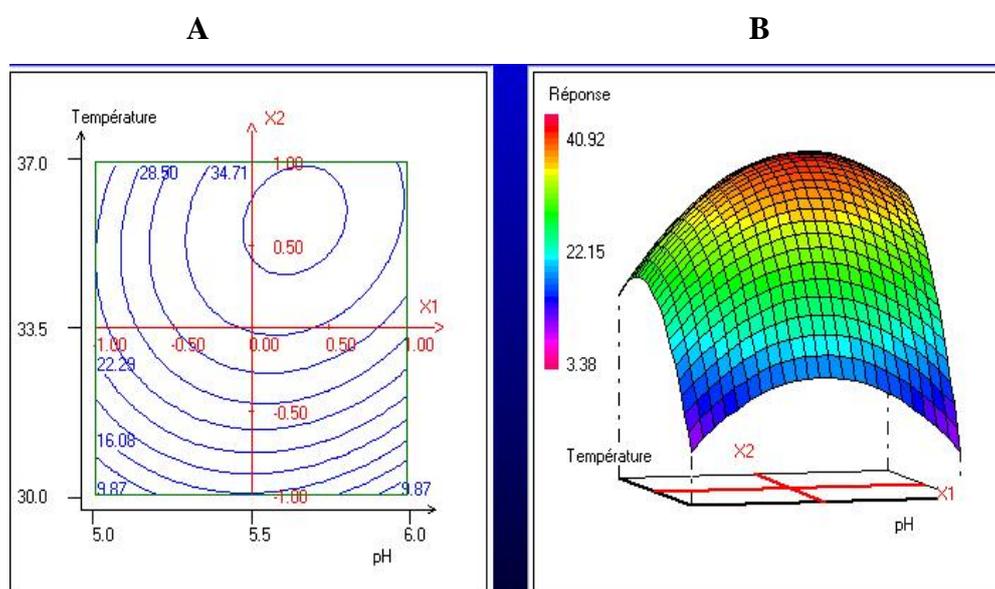


**Figure 27:** Purification of *O. oeni* Cfa synthase. SDS-PAGE analysis of crude cytosolic extracts from *E. coli* BL21 λ DE3 carrying pMT2-ht (lane CE), protein fraction non retained on Ni<sup>+</sup>-NTA column (lane PT), protein fraction eluted from Ni<sup>+</sup>-NTA column with 10, 20, 50, 100, 200 and 400 mM imidazole (lanes 10, 20, 50, 100, 200 and 400 respectively). Molecular mass standards (97.4 – 66 – 45 – 30 – 20.1 -14 kDa) were loaded in lane MM.

### 3. 4. Biochemical characterization of the recombinant Cfa Synthase

The conditions described by Ploux *et al* (50) were adapted to the Cfa synthase gas chromatography assay. In conditions applied (see Material & Methods), the Cfa synthase activity varies linearly with enzyme concentration, from 0 to 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (data not shown).

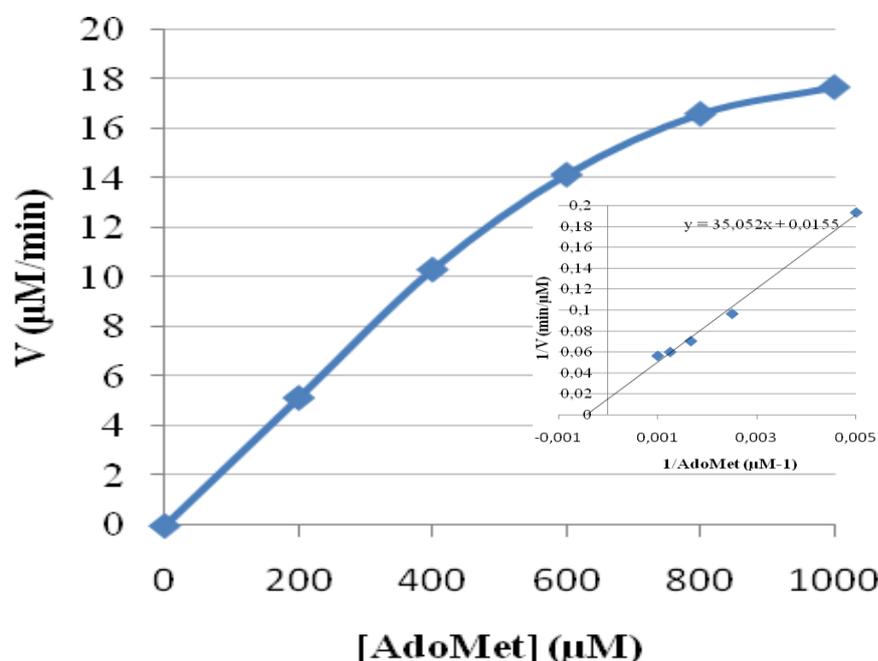
To define the optimal pH and optimal temperature conditions, the experimental design with the complete model using the NEMRODW software was performed. The constraints of 2 parameters were experimentally predetermined: the temperature was bounded between 30°C to 37°C and the pH was bounded between 5.0 to 6.0. Second degree polynomial model was calculated. We drew a response surface displaying the variation of two factors. The response surface and the corresponding projection with iso-response curves are shown in Fig. 28. The number on any curve gives the predicted response all along that curve and the circle delimits the experimental domain where this prediction is reliable. Analysis of these iso-response surfaces shows that, to obtain highest CFA conversion, the pH must be around 5.6 and the temperature must be around 35.8°C. The choice of catalysis conditions has a great impact on the CFA conversion (Fig. 28 A and B).



**Figure 28 A and B:** Iso-response curve and response variations: CFA synthesis in function of the pH and the temperature. A. Two-dimensional curves represent iso-response (predicted CFA synthesis) variations. B Three-dimensional surface represents response (predicted CFA synthesis) variations.

By Lineweaver-Burk plot analysis, the values of  $K_M$  and  $V_{\max}$  were 2.26 mM and 64.5  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ , respectively (Fig. 29). The turn over number ( $k_{\text{cat}}$ ) was 6000  $\text{min}^{-1}$ . Compare to other values published (49, 50, 108), the high  $K_M$  value obtained suggests a low affinity of *O.*

*oeni* Cfa synthase for its substrate. Moreover, the  $k_{cat}$  value means that the reaction take a long time to catalysis. These results could explain the partial cyclization of the unsaturated fatty acid in the *L. lactis* subsp. *cremoris* *cfa*-deficient mutant complemented with the *O. oeni cfa* gene.



**Figure 29:** Rate of the Cfa synthase reaction in function of AdoMet concentration. Determination of CFA levels were evaluated by GC. The data were fitted to the standard equation  $V = V_{max}[S] / K_m + [S]$ . Inset: Lineweaver-Burk representation.

#### 4. DISCUSSION

Despite the expression of the *cfa* gene of *O. oeni* in the host bacterium *L. lactis* subsp. *cremoris*, the CFA cyclization of the complemented strain remained partial. The conversion percentage of UFA into CFA was lower than that of the wild-type strain in optimal conditions and in stress conditions tested.

This partial complementation is not the consequence of a faulty transcription. Indeed, thanks to 12 copies number of the pGC20 plasmid, the expression level of the *O. oeni cfa* gene was 4 folds higher than that of *L. lactis* cultured at pH 7 and 65 folds higher for cells cultured at pH 5.0.

The difference of the fatty acid precursor levels could cause the partial conversion observed in the complemented strain. In fact, the preferential precursor of the *L. lactis* Cfa synthase is C18:1 n-7 (*cis*-vaccenic acid) whereas in *O. oeni* C18:1 n-9 (*cis*-oleic acid) is the preferential substrate of the enzyme (44). We have then supplemented the M17/7 growth medium with 1 mg.L<sup>-1</sup> Tween 80 (source of oleic acid). Surprisingly, despite the large amount of C18:1 n-9 available (30%) in this modified medium, a small amount of cycC19:0 n-9 (dihydrosterculic acid) *versus* cycC19:0 n-7, was produced in the complemented strain (data not shown). The predominance of cycC19:0 n-7 (lactobacillic acid) instead of cycC19:0 n-9 (dihydrosterculic acid) in the membrane of the complemented strain suggests that the partial cyclization was not linked to the fatty acids tails, nor to the position of the double bond.

Finally, the biochemical characterization of the enzyme was investigated. In optimal conditions for the activity of the enzyme (pH = 5.6, temperature = 35.8°C), we found that the affinity of the Cfa synthase was very low for its substrate, in comparison with previous data (27, 49, 50). We supposed that the affinity for substrate could be linked to the phosphoric acid headgroups of the membrane phospholipids. A great difference between the phosphoric acid headgroups of the *O. oeni* membrane and that of the *L. lactis* was observed (39). The *O. oeni* membrane contains 38% of Phosphatidyl Ethanolamine (PE) and 16% of Phosphatidyl Glycerol (PG). *L. lactis* membrane contains 65% of PG and 4% of Diphosphatidyl Glycerol (DPG) and no PE has been detected. In fact, the phospholipids differ, depending on the substituent attached to the phosphoric acid. This substituent determines the charge of the phospholipid. The steric and hydration capacity of the substituent can also determine the form of the phospholipid. For example, ethanolamine has a low steric hindrance and low hydration, which implies that PE headgroup is smaller than the glycerol group which has the same steric hindrance but is much more hydrated. Thus, PE has a cone shape and PG has a cylindrical one. The wide variety of polar and nonpolar parts is the cause of the high diversity of phospholipids and explains the differences in their physical properties. We suppose that the difference of the phosphoric heads of *L. lactis* lipid bilayer makes the Cfa synthase of *O. oeni* access to the substrate difficult.

## 5. CONCLUSION

The *cfa* gene from *O. oeni* is functional in the heterologous host, *L. lactis* subsp. *cremoris*. Its expression is highly induced by acidity or by ethanol in the growth medium. This result suggests a similar mechanism of the transcriptional regulation of the *cfa* gene in lactic acid bacteria, especially in acidic conditions. However, the expression of the *cfa* gene from *O. oeni* partially restores the synthesis of CFA in the *L. lactis* subsp. *cremoris* membrane. Biochemical characterization suggests that the partial complementation is due to substrate specificity, but not only to the fatty acid tails. The difference in the nature of the phospholipids between the *O. oeni* membrane and that of the host bacterium could lead to accessibility trouble. Further investigation is needed in order to identify the specificity of phospholipids in combination with substrates for an optimization of the Cfa synthase activity.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail a été réalisé dans la continuité du travail de thèse de Chu-Ky (21,41) réalisé au laboratoire où il a été clairement démontré que l'activité de la Cfa synthase chez la bactérie lactique *O. oeni* était associée à l'adaptation de la bactérie aux conditions environnementales. Même s'il est admis que la présence d'acides gras cycliques (CFA) limite la fluidification de la membrane plasmique, en conditions de stress, le rôle physiologique de ces acides n'a jamais été réellement démontré sur des systèmes *in vivo*.

Les résultats obtenus dans ce travail de thèse ont permis de démontrer que chez les deux bactéries lactiques modèles, *L. lactis* subsp. *cremoris* et *O. oeni*, la transcription du gène *cfa*, codant la Cfa synthase, est stimulée lorsque les cellules entrent en phase stationnaire de croissance ou lorsque les cellules sont cultivées en conditions de stress (milieu acide ou présence d'éthanol dans le milieu).

Le rôle des CFA a pu être appréhendé par l'analyse physiologique comparative de la souche parentale *L. lactis* subsp. *cremoris* et du mutant  $\Delta cfa$  généré chez cette souche. Les forts pourcentages de survie obtenus chez les souches cultivées à pH 5,0, puis subissant un stress acide (pH 3,0), prouvent que la cyclopropanation des acides gras insaturés n'est pas indispensable à la survie de *L. lactis* subsp. *cremoris* en conditions de stress acide. En outre, les données d'anisotropie de fluorescence démontrent que la présence de CFAs membranaires ne permet pas de réguler le niveau de fluidité membranaire, en particulier avec les souches cultivées en présence d'éthanol, où une fluidification membranaire est observée dans tous les cas. L'hypothèse d'un équilibre entre les acides palmitoléique / cis-vaccénique / lactobacillique pour réguler la fluidité membranaire chez *L. lactis* subsp. *cremoris* est avancée. De plus, le rôle des protéines surproduites au cours de l'ATR sur la régulation de la fluidité membranaire reste à étudier chez cette bactérie.

L'étude du rôle physiologique des CFA chez *O. oeni* a été appréhendée par expression du gène *cfa* de cette bactérie en système hétérologue. Les résultats obtenus confirment la fonctionnalité du gène chez la bactérie hôte *L. lactis* subsp. *cremoris*, cependant la cyclisation du précurseur acide cis-vaccénique, reste partielle chez la souche mutante complémentée.

Un travail de caractérisation biochimique *in vitro* de l'enzyme Cfa synthase de *O. oeni* a donc été entrepris afin d'expliquer la faible efficacité de l'enzyme de *O. oeni* chez la bactérie hôte. Les travaux réalisés ont permis la surproduction et la purification de l'enzyme. Une technique de mesure d'activité *in vitro* a été également développée. Une stratégie d'expression du gène *cfa* de *O. oeni* en système hétérologue dans la bactérie hôte *E. coli* BL21 a permis la surproduction d'une protéine d'environ 45 kDa, en accord avec la masse moléculaire théorique de la Cfa synthase de *O. oeni*. A partir de l'extrait protéique, une purification a été réalisée par chromatographie d'affinité sur colonne d'agarose nickel. Les tests d'activité enzymatique *in vitro* ont permis de déterminer la température optimale de l'enzyme, 35,8°C et son pH optimal, 5,6. Même en se plaçant dans les conditions physico-chimiques optimales de l'enzyme, nous constatons que la cyclisation *in vitro* de l'acide cis-vaccénique issu des phospholipides membranaires du mutant *L. lactis* subsp. *cremoris*  $\Delta cfa$  reste partielle. Ceci induit une détermination expérimentale de valeurs de  $K_M$  largement supérieures aux données citées dans la littérature (27, 49, 50). La différence de nature et de répartition des phospholipides membranaires entre les deux bactéries modèles pourrait expliquer l'action partielle de la Cfa synthase de *O. oeni*. Les tests d'activité enzymatique sur phospholipides issus de *O. oeni* sont en cours de réalisation, afin de valider notre hypothèse.

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Alberts, B., D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter (ed.).** 2005. L'essentiel de la biologie cellulaire.
2. **Alexandre, H., P. J. Costello, F. Remize, J. Guzzo, and M. Guilloux-Benatier.** 2004. *Saccharomyces cerevisiae-Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *Int J Food Microbiol* **93**:141-54.
3. **Assad-Garcia, J. S., M. Bonnin-Jusserand, D. Garmyn, J. Guzzo, H. Alexandre, and C. Grandvalet.** 2008. An improved protocol for electroporation of *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 using ethanol as immediate membrane fluidizing agent. *Lett Appl Microbiol* **47**:333-8.
4. **Beal, M. F.** 2000. Oxidative metabolism. *Ann N Y Acad Sci* **924**:164-9.
5. **Beney, L., and P. Gervais.** 2001. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl Microbiol Biotechnol* **57**:34-42.
6. **Bertani, G.** 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**:293-300.
7. **Bligh, E. G., and W. J. Dyer.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**:911-7.
8. **Bohin, J. P., and B. Lubochinsky.** 1982. Alcohol-resistant sporulation mutants of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **150**:944-55.
9. **Bolotin, A., P. Wincker, S. Mauger, O. Jaillon, K. Malarne, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich, and A. Sorokin.** 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* **11**:731-53.
10. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.
11. **Brian, B. L., and E. W. Gardner.** 1968. A simple procedure for detecting the presence of cyclopropane fatty acids in bacterial lipids. *Appl Microbiol* **16**:549-52.
12. **Broadbent, J. R., and C. Lin.** 1999. Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization. *Cryobiology* **39**:88-102.
13. **Brown, J. L., T. Ross, T. A. McMeekin, and P. D. Nichols.** 1997. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *Int J Food Microbiol* **37**:163-73.
14. **Budin-Verneuil, A., E. Maguin, Y. Auffray, S. D. Ehrlich, and V. Pichereau.** 2005. Transcriptional analysis of the cyclopropane fatty acid synthase gene of *Lactococcus lactis* MG1363 at low pH. *FEMS Microbiol Lett* **250**:189-94.
15. **Budin-Verneuil, A., V. Pichereau, Y. Auffray, D. Ehrlich, and E. Maguin.** 2007. Proteome phenotyping of acid stress-resistant mutants of *Lactococcus lactis* MG1363. *Proteomics* **7**:2038-46.
16. **Budin-Verneuil, A., V. Pichereau, Y. Auffray, D. S. Ehrlich, and E. Maguin.** 2005. Proteomic characterization of the acid tolerance response in *Lactococcus lactis* MG1363. *Proteomics* **5**:4794-807.
17. **Canet, S., M. Heyde, R. Portalier, and P. Laloi.** 2003. Involvement of phospholipids in resistance and adaptation of *Escherichia coli* to acid conditions and to long-term survival. *FEMS Microbiol Lett* **225**:207-11.
18. **Cavin, J. F., H. Prevost, J. Lin, P. Schmitt, and C. Divies.** 1989. Medium for Screening *Leuconostoc oenos* Strains Defective in Malolactic Fermentation. *Appl Environ Microbiol* **55**:751-3.
19. **Chang, Y. Y., and J. E. Cronan, Jr.** 1999. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **33**:249-259.
20. **Chang, Y. Y., J. Eichel, and J. E. Cronan, Jr.** 2000. Metabolic instability of *Escherichia coli* cyclopropane fatty acid synthase is due to RpoH-dependent proteolysis. *J Bacteriol* **182**:4288-94.
21. **Chen, Y. Y., and D. J. LeBlanc.** 1992. Genetic analysis of *scrA* and *scrB* from *Streptococcus sobrinus* 6715. *Infect Immun* **60**:3739-46.

22. **Chu-Ky, S.** 2005. Fluidité membranaire en relation avec l'adaptation de la bactérie lactique *Oenococcus Oeni* au milieu vin. Doctorat. Université de Bourgogne Dijon.
23. **Chu-Ky, S., R. Tourdot-Marechal, P. A. Marechal, and J. Guzzo.** 2005. Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochim Biophys Acta* **1717**:118-24.
24. **Copper, G. M. (ed.).** 1998. La cellule : une approche moléculaire.
25. **Coucheney, F., L. Gal, L. Beney, J. Lherminier, P. Gervais, and J. Guzzo.** 2005. A small HSP, Lol8, interacts with the cell membrane and modulates lipid physical state under heat shock conditions in a lactic acid bacterium. *Biochim Biophys Acta* **1720**:92-8.
26. **Courtois, F., C. Guerard, X. Thomas, and O. Ploux.** 2004. *Escherichia coli* cyclopropane fatty acid synthase. *Eur J Biochem* **271**:4769-78.
27. **Courtois, F., and O. Ploux.** 2005. *Escherichia coli* cyclopropane fatty acid synthase: is a bound bicarbonate ion the active-site base? *Biochemistry* **44**:13583-90.
28. **Cronan, J. E., Jr.** 2002. Phospholipid modifications in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **5**:202-5.
29. **Cronan, J. E., Jr., and E. P. Gelmann.** 1975. Physical properties of membrane lipids: biological relevance and regulation. *Bacteriol Rev* **39**:232-56.
30. **Cross, P. C., K. L. Mercer, J.-F. Denef, and S. Haumont (ed.).** 1995. Ultrastructure cellulaire et tissulaire : approche fonctionnelle, De Boeck Université ed, Bruxelles.
31. **Da Silveira, M. G., E. A. Golovina, F. A. Hoekstra, F. M. Rombouts, and T. Abee.** 2003. Membrane fluidity adjustments in ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells. *Appl Environ Microbiol* **69**:5826-32.
32. **Denich, T. J., L. A. Beaudette, H. Lee, and J. T. Trevors.** 2003. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J Microbiol Methods* **52**:149-82.
33. **Desroche, N., C. Beltramo, and J. Guzzo.** 2005. Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *J Microbiol Methods* **60**:325-33.
34. **Diefenbach, R., and H. Keweloh.** 1994. Synthesis of trans unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8 by direct isomerization of the double bond of lipids. *Arch Microbiol* **162**:120-5.
35. **Dombek, K. M., and L. O. Ingram.** 1984. Effects of ethanol on the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Bacteriol* **157**:233-9.
36. **Dower, W. J.** 1990. Electroporation of bacteria: a general approach to genetic transformation. *Genet Eng (N Y)* **12**:275-95.
37. **Edwards, P., J. S. Nelsen, J. G. Metz, and K. Dehesh.** 1997. Cloning of the *fabF* gene in an expression vector and *in vitro* characterization of recombinant *fabF* and *fabB* encoded enzymes from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **402**:62-6.
38. **Elmnasser, N., M. Ritz-Bricaud, S. Guillou, and M. Federighi.** 2006. Réponse adaptative de *Listeria monocytogenes* au stress osmotique et froid : Implication en sécurité des aliments. *Revue Med Vet* **157**:92-101.
39. **Exterkate, F. A., B. J. Otten, H. W. Wassenberg, and J. H. Veerkamp.** 1971. Comparison of the phospholipid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *J Bacteriol* **106**:824-9.
40. **Garvie, E. I.** 1967. *Leuconostoc oenos* sp.nov. *J Gen Microbiol* **48**:431-8.
41. **Gasson, M. J.** 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J Bacteriol* **154**:1-9.
42. **Gennis, P., J. Gallagher, C. Falvo, S. Baker, and W. Than.** 1989. Clinical criteria for the detection of pneumonia in adults: guidelines for ordering chest roentgenograms in the emergency department. *J Emerg Med* **7**:263-8.
43. **Goldfine, H., N. C. Johnston, J. Mattai, and G. G. Shipley.** 1987. Regulation of bilayer stability in *Clostridium butyricum*: studies on the polymorphic phase behavior of the ether lipids. *Biochemistry* **26**:2814-22.
44. **Grandvalet, C., J. S. Assad-Garcia, S. Chu-Ky, M. Tollot, J. Guzzo, J. Gresti, and R. Tourdot-Marechal.** 2008. Changes in membrane lipid composition in ethanol- and acid-

- adapted *Oenococcus oeni* cells: characterization of the *cfa* gene by heterologous complementation. *Microbiology* **154**:2611-9.
45. **Grogan, D. W., and J. E. Cronan, Jr.** 1986. Characterization of *Escherichia coli* mutants completely defective in synthesis of cyclopropane fatty acids. *J Bacteriol* **166**:872-7.
  46. **Grogan, D. W., and J. E. Cronan, Jr.** 1984. Cloning and manipulation of the *Escherichia coli* cyclopropane fatty acid synthase gene: physiological aspects of enzyme overproduction. *J Bacteriol* **158**:286-95.
  47. **Grogan, D. W., and J. E. Cronan, Jr.** 1997. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:429-41.
  48. **Gruner, S. M., P. R. Cullis, M. J. Hope, and C. P. Tilcock.** 1985. Lipid polymorphism: the molecular basis of nonbilayer phases. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **14**:211-38.
  49. **Guianvarc'h, D., T. Drujon, T. E. Leang, F. Courtois, and O. Ploux.** 2006. Identification of new inhibitors of *E. coli* cyclopropane fatty acid synthase using a colorimetric assay. *Biochim Biophys Acta* **1764**:1381-8.
  50. **Guianvarc'h, D., E. Guangqi, T. Drujon, C. Rey, Q. Wang, and O. Ploux.** 2008. Identification of inhibitors of the *E. coli* cyclopropane fatty acid synthase from the screening of a chemical library: *In vitro* and *in vivo* studies. *Biochim Biophys Acta* **1784**:1652-8.
  51. **Guillot, A., D. Obis, and M. Y. Mistou.** 2000. Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress. *Int J Food Microbiol* **55**:47-51.
  52. **Hartig, C., N. Loffhagen, and H. Harms.** 2005. Formation of trans fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* **71**:1915-22.
  53. **Heipieper, H. J., and J. A. de Bont.** 1994. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. *Appl Environ Microbiol* **60**:4440-4.
  54. **Heipieper, H. J., F. Meinhardt, and A. Segura.** 2003. The *cis-trans* isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiol Lett* **229**:1-7.
  55. **Hols, P., T. Ferain, D. Garmyn, N. Bernard, and J. Delcour.** 1994. Use of homologous expression-secretion signals and vector-free stable chromosomal integration in engineering of *Lactobacillus plantarum* for alpha-amylase and levanase expression. *Appl Environ Microbiol* **60**:1401-13.
  56. **Huang, C. C., C. V. Smith, M. S. Glickman, W. R. Jacobs, Jr., and J. C. Sacchettini.** 2002. Crystal structures of mycolic acid cyclopropane synthases from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **277**:11559-69.
  57. **In't Veld, G., M. G. Elferink, A. J. Driessen, and W. N. Konings.** 1992. Reconstitution of the leucine transport system of *Lactococcus lactis* into liposomes composed of membrane-spanning lipids from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochemistry* **31**:12493-9.
  58. **Ingram, L. O.** 1976. Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J Bacteriol* **125**:670-8.
  59. **Kagan, R. M., and S. Clarke.** 1994. Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch Biochem Biophys* **310**:417-27.
  60. **Kaneda, K., Y. Yoshioka, K. Makita, H. Toyooka, and K. Amaha.** 1997. Effects of carboxy-PTIO on systemic hemodynamics, liver energetics, and concentration of liver metabolites during endotoxic shock in rabbits: a <sup>31</sup>P and <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopic study. *Crit Care Med* **25**:1019-29.
  61. **Kaneda, T.** 1991. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol Rev* **55**:288-302.
  62. **Keweloh, H., and H. J. Heipieper.** 1996. Trans unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids* **31**:129-37.
  63. **Kim, B. H., S. Kim, H. G. Kim, J. Lee, I. S. Lee, and Y. K. Park.** 2005. The formation of cyclopropane fatty acids in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* **151**:209-18.

- 
64. **Konopasek, I., K. Strzalka, and J. Svobodova.** 2000. Cold shock in *Bacillus subtilis*: different effects of benzyl alcohol and ethanol on the membrane organisation and cell adaptation. *Biochim Biophys Acta* **1464**:18-26.
  65. **Law, J., G. Buist, A. Haandrikman, J. Kok, G. Venema, and K. Leenhouts.** 1995. A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes. *J Bacteriol* **177**:7011-8.
  66. **Le Guyader, L.** 2002. Utilisation de sondes pyréniques *in vivo* pour caractériser l'état de phase global de la membrane plasmique de cellules eucaryotes. Application à la détection de la liaison d'agonistes au récepteur d'opioïde murin. Doctorat. Université Paul Sabatier - Toulouse III, Toulouse.
  67. **Lee, D. C., and D. Chapman.** 1987. The effects of temperature on biological membranes and their models. *Symp Soc Exp Biol* **41**:35-52.
  68. **Linders, L. J., W. F. Wolkers, F. A. Hoekstra, and K. van 't Riet.** 1997. Effect of added carbohydrates on membrane phase behavior and survival of dried *Lactobacillus plantarum*. *Cryobiology* **35**:31-40.
  69. **Liu, S. Q.** 2002. A review: malolactic fermentation in wine -- beyond deacidification. *J Appl Microbiol* **92**:589-601.
  70. **Loffeld, B., and H. Keweloh.** 1996. *cis/trans* isomerization of unsaturated fatty acids as possible control mechanism of membrane fluidity in *Pseudomonas putida* P8. *Lipids* **31**:811-5.
  71. **Loffhagen, N., C. Hartig, W. Geyer, Voyeda M, and H. Harms.** 2007. Competition between *cis*, *trans* and cyclopropane fatty acid formation and its impact on membrane fluidity. *Eng Life Sci* **7**:67-74.
  72. **Lonvaud-Funel, A.** 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**:317-31.
  73. **Lonvaud-Funel, A., and C. Desens.** 1990. Constitution en acides gras des membranes des bactéries lactiques du vin. Incidences des conditions de culture. *Science des aliments* **10**:817-829.
  74. **Maillet, M., and M. Lemullois (ed.).** 2006. *Biologie cellulaire*, Masson ed.
  75. **Mansilla, M. C., L. E. Cybulski, D. Albanesi, and D. de Mendoza.** 2004. Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *J Bacteriol* **186**:6681-8.
  76. **Montanari, C., S. L. Sado Kamdem, D. I. Serrazanetti, F. X. Etoa, and M. E. Guerzoni.** 2010. Synthesis of cyclopropane fatty acids in *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus sanfranciscensis* and their cellular fatty acids changes following short term acid and cold stresses. *Food Microbiol* **27**:493-502.
  77. **Moreno-Arribas, M. V., and M. C. Polo.** 2005. Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Crit Rev Food Sci Nutr* **45**:265-86.
  78. **Morgan-Kiss, R. M., and J. E. Cronan.** 2008. The *Lactococcus lactis FabF* fatty acid synthetic enzyme can functionally replace both the *FabB* and *FabF* proteins of *Escherichia coli* and the *FabH* protein of *Lactococcus lactis*. *Arch Microbiol* **190**:427-37.
  79. **Munoz-Rojas, J., P. Bernal, E. Duque, P. Godoy, A. Segura, and J. L. Ramos.** 2006. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Appl Environ Microbiol* **72**:472-7.
  80. **Okamoto, T., H. Taguchi, K. Nakamura, H. Ikenaga, H. Kuraishi, and K. Yamasato.** 1993. *Zymobacter palmae* gen. nov., sp. nov., a new ethanol-fermenting peritrichous bacterium isolated from palm sap. *Arch Microbiol* **160**:333-7.
  81. **Pedrotta, V., and B. Witholt.** 1999. Isolation and characterization of the *cis-trans*-unsaturated fatty acid isomerase of *Pseudomonas oleovorans* GPo12. *J Bacteriol* **181**:3256-61.
  82. **Posno, M., W. R. Verweij, I. C. Dekker, P. M. de Waard, and G. S. Groot.** 1986. The genes encoding chloroplast ribosomal proteins S7 and S12 are located in the inverted repeat of *Spirodela oligorhiza* chloroplast DNA. *Curr Genet* **11**:25-34.
  83. **Quinn, P. J.** 1981. The fluidity of cell membranes and its regulation. *Prog Biophys Mol Biol* **38**:1-104.
-

- 
84. **Quivey, R. G., Jr., R. Faustoferri, K. Monahan, and R. Marquis.** 2000. Shifts in membrane fatty acid profiles associated with acid adaptation of *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol Lett **189**:89-92.
  85. **Ramos, J. L., E. Duque, M. T. Gallegos, P. Godoy, M. I. Ramos-Gonzalez, A. Rojas, W. Teran, and A. Segura.** 2002. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. Annu Rev Microbiol **56**:743-68.
  86. **Ramos, J. L., E. Duque, J. J. Rodriguez-Herva, P. Godoy, A. Haidour, F. Reyes, and A. Fernandez-Barrero.** 1997. Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. J Biol Chem **272**:3887-90.
  87. **Renouf, V., A. Delaherche, O. Claisse, and A. Lonvaud-Funel.** 2008. Correlation between indigenous *Oenococcus oeni* strain resistance and the presence of genetic markers. J Ind Microbiol Biotechnol **35**:27-33.
  88. **Rietveld, A. G., J. A. Killian, W. Dowhan, and B. de Kruijff.** 1993. Polymorphic regulation of membrane phospholipid composition in *Escherichia coli*. J Biol Chem **268**:12427-33.
  89. **Rosa, S. M., M. C. Antunes-Madeira, M. J. Matos, A. S. Jurado, and V. M. Madeira.** 2000. Lipid composition and dynamics of cell membranes of *Bacillus stearothermophilus* adapted to amiodarone. Biochim Biophys Acta **1487**:286-95.
  90. **Russell, N. J.** 1990. Cold adaptation of microorganisms. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **326**:595-608, discussion 608-11.
  91. **Sambrook, J., and R. Pollack (ed.).** 1974. Basic methodology for cell culture-cell transformation. Methods Enzymol, vol. 32.
  92. **Seigneuret, M., A. Zachowski, A. Hermann, and P. F. Devaux.** 1984. Asymmetric lipid fluidity in human erythrocyte membrane: new spin-label evidence. Biochemistry **23**:4271-5.
  93. **Shechter, E. (ed.).** 1997. Biochimie et biophysique des membrane : Aspects structuraux et fonctionnels, Masson ed.
  94. **Shinitzky, M.** 1984. Membrane fluidity in malignancy. Adversative and recuperative. Biochim Biophys Acta **738**:251-61.
  95. **Sikkema, J., J. A. de Bont, and B. Poolman.** 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol Rev **59**:201-22.
  96. **Sinensky, M.** 1974. Homeoviscous adaptation: a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A **71**:522-5.
  97. **Singer, S. J., and G. L. Nicolson.** 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science **175**:720-31.
  98. **Starka, J., and J. Moravova.** 1970. Phospholipids and cellular division of *Escherichia coli*. J Gen Microbiol **60**:251-7.
  99. **Streit, F., J. Delettre, G. Corrieu, and C. Beal.** 2008. Acid adaptation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* induces physiological responses at membrane and cytosolic levels that improves cryotolerance. J Appl Microbiol **105**:1071-80.
  100. **Suutari, M., and S. Laakso.** 1992. Temperature adaptation in *Lactobacillus fermentum*: interconversions of oleic, vaccenic and dihydrosterulic acids. J Gen Microbiol **138**:445-50.
  101. **Teixeira, H., M. G. Goncalves, N. Rozes, A. Ramos, and M. V. San Romao.** 2002. Lactobacillic acid accumulation in the plasma membrane of *Oenococcus oeni*: a response to ethanol stress? Microb Ecol **43**:146-53.
  102. **To, T. M. H., C. Grandvalet, and R. Tourdot Maréchal.** 2010. Cyclopropanation of membrane unsaturated fatty acids is not essential in acid stress response of *Lactococcus* subsp. *lactis cremoris* Applied and Environmental Microbiology.
  103. **Tollot, M.** 2005. Analyse physiologique de la reponse membranaire de *Oenococcus oeni* en condition de stress. Master 2 Recherche. Ecole National Supérieur de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation - Université de Bourgogne.
  104. **Tourdot-Maréchal, R., D. Gaboriau, L. Beney, and C. Divies.** 2000. Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*. Int J Food Microbiol **55**:269-73.
  105. **Vernier, G.** 2006. Protéine Amphitrophiques :Diversité conformationnelle et Versatilité des Interactions Protéines-Lipides. Cas d'étude de l' $\alpha$ -lactalbumine et de l'apo-myoglobine. Université Joseph Fourier, Grenoble.
-

- 
106. **Vollherbst-Schneck, K., J. A. Sands, and B. S. Montenecourt.** 1984. Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol* **47**:193-4.
  107. **Wang, A. Y., and J. E. Cronan, Jr.** 1994. The growth phase-dependent synthesis of cyclopropane fatty acids in *Escherichia coli* is the result of an RpoS(KatF)-dependent promoter plus enzyme instability. *Mol Microbiol* **11**:1009-17.
  108. **Wang, A. Y., D. W. Grogan, and J. E. Cronan, Jr.** 1992. Cyclopropane fatty acid synthase of *Escherichia coli*: deduced amino acid sequence, purification, and studies of the enzyme active site. *Biochemistry* **31**:11020-8.
  109. **Weber, F. J., and J. A. de Bont.** 1996. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim Biophys Acta* **1286**:225-45.
  110. **Wieslander, A., A. Christiansson, L. Rilfors, and G. Lindblom.** 1980. Lipid bilayer stability in membranes. Regulation of lipid composition in *Acholeplasma laidlawii* as governed by molecular shape. *Biochemistry* **19**:3650-5.
  111. **You, K. M., C. L. Rosenfield, and D. C. Knipple.** 2003. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl Environ Microbiol* **69**:1499-503.
  112. **Zhang, G. J., H. W. Liu, L. Yang, Y. G. Zhong, and Y. Z. Zheng.** 2000. Influence of membrane physical state on the lysosomal proton permeability. *J Membr Biol* **175**:53-62.
  113. **Zhao, Y., L. A. Hindorff, A. Chuang, M. Monroe-Augustus, M. Lyrstis, M. L. Harrison, F. B. Rudolph, and G. N. Bennett.** 2003. Expression of a cloned cyclopropane fatty acid synthase gene reduces solvent formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol* **69**:2831-41

## Résumé

Les résultats obtenus dans ce travail ont permis de démontrer que chez les deux bactéries lactiques modèles, *L. lactis* subsp. *cremoris* et *O. oeni*, la transcription du gène *cfa*, codant pour la Cfa synthase, est stimulée lorsque les cellules entrent en phase stationnaire de croissance ou lorsque que les cellules sont cultivées en conditions de stress (milieu acide ou présence d'éthanol dans le milieu).

Le rôle des acides gras cycliques (CFA) membranaires a pu être appréhendé par l'analyse physiologique comparative de la souche parentale *L. lactis* subsp. *cremoris* et du mutant  $\Delta cfa$  généré chez cette souche. Les forts pourcentages de survie obtenus chez les souches cultivées à pH 5,0, puis subissant un stress acide (pH 3,0), prouvent que la cyclopropanation des acides gras insaturés n'est pas indispensable à la survie de *L. lactis* subsp. *cremoris* en conditions de stress acide. En outre, les données d'anisotropie de fluorescence démontrent que la présence de CFAs membranaires ne permet pas de réguler le niveau de fluidité membranaire, en particulier avec les souches cultivées en présence d'éthanol, où une fluidification membranaire est observée dans tous les cas. L'hypothèse d'un équilibre entre les acides palmitoléique / cis-vaccénique / lactobacillique pour réguler la fluidité membranaire chez *L. lactis* subsp. *cremoris* est avancée.

L'étude du rôle physiologique des CFAs chez *O. oeni* nécessite l'expression du gène *cfa* de la bactérie en système hétérologue. Les résultats obtenus confirment la fonctionnalité du gène chez la bactérie hôte *L. lactis* subsp. *cremoris*, cependant la cyclopropanation du précurseur acide cis-vaccénique reste partielle chez la souche mutante complémentée.

Un travail de caractérisation biochimique *in vitro* de l'enzyme Cfa synthase de *O. oeni* a donc été entrepris afin d'expliquer la faible efficacité de l'enzyme de *O. oeni* chez la bactérie hôte. Les travaux réalisés ont permis la surproduction et la purification de l'enzyme. Une technique de mesure d'activité *in vitro* a été également développée. Une stratégie d'expression du gène *cfa* de *O. oeni* en système hétérologue dans la bactérie hôte *E. coli* BL21 Star a permis la surproduction d'une protéine d'environ 45 kDa, en accord avec la masse moléculaire théorique de la Cfa synthase de *O. oeni*. A partir de l'extrait protéique, une purification a été réalisée par chromatographie d'affinité sur colonne d'agarose nickel. Les tests d'activité enzymatique *in vitro* ont pu être réalisés. La température optimale de l'enzyme est de 35,8°C. Son pH optimal est de 5,6. Même en se plaçant dans les conditions physico-chimiques optimales pour l'activité de l'enzyme, nous constatons que la cyclopropanation *in vitro* de l'acide cis-vaccénique issu des phospholipides membranaires du mutant *L. lactis* subsp. *cremoris*  $\Delta cfa$  reste partielle. Ceci induit une valeur déterminée expérimentalement de  $K_M$  largement supérieure aux données citées dans la littérature. La différence, entre les deux bactéries modèles, de nature et de répartition des phospholipides membranaires pourrait expliquer l'action partielle de la Cfa synthase de *O. oeni*.

**Mots-clé :** *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Oenococcus oeni*, Cfa synthase, régulation de la fluidité membranaire.

## Summary

The results obtained in this work have shown that in both lactic acid bacteria models, *L. lactis* subsp. *cremoris* and *O. oeni*, transcription of the *cfa* gene, encoding the Cfa synthase is stimulated when cells enter stationary phase of growth or when the cells are grown under stress conditions (acidic or presence of ethanol in the medium).

The role of the Cyclo Fatty Acids (CFAs) has been apprehended by the comparative physiological analysis of the parental strain *L. lactis* subsp. *cremoris* and a  $\Delta cfa$  mutant generated in this strain. The high percentages of survival obtained in strains grown at pH 5.0 and undergoing acid stress (pH 3.0) prove that the cyclopropanation of unsaturated fatty acids is not essential for the survival of *L. lactis* subsp. *cremoris* under acid stress conditions. In addition, fluorescence anisotropy data show that the presence of membrane CFAs does not regulate the level of membrane fluidity, especially with strains grown in the presence of ethanol. The assumption of a balance between palmitoleic acid / cis-vaccenic acid / lactobacillic acid in membrane fluidity regulation in *L. lactis* subsp. *cremoris* is advanced.

The study of the physiological role of CFA in *O. oeni* requires *cfa* gene expression of the bacterium in a heterologous system. The results confirm the functionality of the gene in the host bacterium *L. lactis* subsp. *cremoris*. However, the cyclopropanation of the precursor cis-vaccenic acid remains partial in the mutant strain complemented.

Biochemical characterization *in vitro* of the enzyme Cfa synthase from *O. oeni* was therefore undertaken in order to explain the low efficiency of the enzyme of *O. oeni* in the host bacterium. The work led to the overproduction and purification of the enzyme. A technique for measuring the activity *in vitro* has also been developed. A strategy of *O. oeni cfa* gene expression in the heterologous host bacterium *E. coli* BL21 Star has permitted the surproduction of a protein of approximately 45 kDa. This data is in agreement with the theoretical molecular weight of the Cfa synthase from *O. oeni*. Protein purification was performed by affinity chromatography on nickel-agarose column. Enzymatic activity assays *in vitro* have been realized. The optimum temperature for the enzyme is 35.8 ° C. Its optimum pH is 5.6. However, we find that the *in vitro* cyclopropanation of cis-vaccenic acid from membrane phospholipids of the mutant *L. lactis* subsp. *cremoris*  $\Delta cfa$  remains partial. This leads to an experimental determination of  $K_M$  value much higher than the data cited in the literature. The difference between the nature and the distribution of membrane phospholipids in the two model bacteria may explain the partial activity of Cfa synthase from *O. oeni*.

**Keywords:** *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Oenococcus oeni*, Cfa synthase, regulation of membrane fluidity.