

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Discipline : Science Alimentaire (Microbiologie Alimentaire)

Présentée et soutenue publiquement

Par

Recep ÇIBIK

le 24 mars 2000

**Leuconostocs isolés de fromages traditionnels français :
- Identification phénotypique et moléculaire
- Caractérisation biochimique et moléculaire du
système autolytique**

Directeur de thèse : Charles DIVIES

JURY

M. C. DIVIES
Mme. A. LONVAUD
M. H. PREVOST
Mme. M.-P. CHAPOT-CHARTIER
M. P. TAILLIEZ
M. J. B. MILLIERE

Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

RESUME

La diversité moléculaire de 220 souches de *Leuconostoc* a été analysée par RAPD. Cinq groupes ont été définis regroupant la majorité des souches étudiées. Cette technique a également permis de distinguer les souches de *Ln. citreum*. Des séquences d'ADNr 16S et des hybridations *in situ* utilisant une sonde spécifique du genre *Leuconostoc* (sauf *Ln. fallax*) ont permis i) d'établir une collection de souches correctement identifiées et ii) de confirmer la classification des souches aux profils RAPD atypiques. Un test PCR, basé sur des amorces spécifiques ciblant les régions variables des ADNr 16S, a été développé. Il permet d'identifier rapidement et précisément les souches de *Ln. mesenteroides*, *Ln. citreum*, *Ln. lactis* et *W. paramesenteroides*.

Le comportement autolytique de 59 souches de *Leuconostoc* a été étudié. Le taux d'autolyse est variable selon les souches et compris entre 7 et 44 %. Deux bandes majeures correspondant aux peptidoglycane hydrolases (PGH) ont été détectées par SDS-PAGE renaturante. L'analyse de spécificité a révélé deux types de PGH : une glycosidase et une amidase (ou une peptidase). Le gène (*lnmur*) de *Ln. citreum* 22R, codant pour une PGH, a été cloné et séquencé. *lnmur* a une masse moléculaire de 23,9 kDa et ne possède pas de séquence spécifique permettant son ancrage à son substrat. Une protéine chimère composée de *lnmur* et de la partie C-terminale de *Acma* de *L. lactis* a été construite. Cette enzyme est capable de compléter une mutation de *acmA* chez *L. lactis*.

SUMMARY

Molecular diversity of 220 *Leuconostoc* strains were analyzed by the RAPD technique. Majority of the strains were classified into five groups. The technique allows us to distinguish *Ln. citreum* strains from the others. 16S rDNA sequencing and *in situ* hybridization by using a specific probe for the *Leuconostoc* genus (except *Ln. fallax*) were used to classify strains of a large collection and to identify strains having atypical RAPD pattern. A simple PCR test using specific primers targeted variable regions of the 16S rDNA molecule was also developed to accurately identify strains of the species *Ln. mesenteroides*, *Ln. citreum*, *Ln. lactis* and *W. paramesenteroides*.

Autolysis of 59 *Leuconostoc* strains provided evidence that autolysis is a strain depending phenomenon. Depending on the strain, the autolysis rate was comprised between 7 and 44 %. Two major peptidoglycan hydrolases (PGH) bands were revealed in renaturing SDS-PAGE. The presence of a glycosidase and an amidase or a peptidase was evident using specificity analysis. A gene (*lnmur*) of *Ln. citreum* 22R encoding a PGH active protein was cloned and sequenced. The molecular mass is 23,9 kDa. The gene devoids of a specific sequence required in the cell wall attachment of the protein. A chimeric protein was constructed by fusion of *lnmur* to the C-terminal region of *Acma* of *L. lactis*. Expression of the chimera was able to complement an *acmA* mutation in *L. lactis*.

J'adresse tout d'abord mes remerciements à Monsieur C. DIVIES, Professeur à l'Université de Bourgogne pour m'avoir accepté dans sa formation doctorale.

Je tiens à remercier Madame A. LONVAUD-FUNEL, Professeur à l'Université de Bordeaux, Monsieur H. PREVOST, Professeur à l'Université de Nantes et Monsieur J. B. MILLIERE, Professeur à l'Université Henri Poincaré-Nancy I de m'avoir fait l'honneur d'assumer la charge d'être rapporteur et examinateur de cette thèse.

Mes très sincères remerciements vont à Monsieur P. TAILLIEZ, Ingénieur de recherches à l'Unité de Recherches Laitières et Génétique Appliquée et Madame M.-P. CHAPOT-CHARTIER, chargée de recherches à l'Unité de Biochimie et Structure des Protéines pour leur encouragement, la qualité de leur encadrement et leurs compétences qu'ils ont eu la gentillesse de me transmettre.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Monsieur M. DESMAZEAUD, Directeur de l'Unité de Recherches Laitières et Génétique Appliquée, pour m'avoir accueilli dans son unité et m'avoir permis de réaliser cette étude.

Mes remerciements vont également à Madame A. GRUSS pour sa contribution à la partie anglaise de ce manuscrit.

Que toutes les personnes de l'équipe biodiversité et de l'équipe autolyse, ainsi que celles de l'Unité de Recherches Laitières et Génétique Appliquée, soient remerciés pour les aides qu'ils m'ont apportées tout au long de ce travail.

ABREVIATIONS

A	: absorbance
aa	: acide aminé
ADN	: acide désoxyribonucléique
Amp	: ampicilline
ARN	: acide ribonucléique
B.	: <i>Bacillus</i>
Br.	: <i>Brevibacterium</i>
CNRZ	: Centre National de Recherches Zootechniques
DAPI	: 4,6-Diamino-2-phénylindole
DTT	: dithiothréitol
E.	: <i>Escherichia</i>
Ent.	: <i>Enterococcus</i>
EDTA	: acide éthylène diamine tétraacétique
Ery	: Erythromycine
GCG	: Genetique Computer Group
IPTG	: isopropyl- β -D-thiogalactoside
kb	: kilobase
kDa	: kilodalton
L.	: <i>Lactococcus</i>
Lb.	: <i>Lactobacillus</i>
Ln.	: <i>Leuconostoc</i>
M.	: <i>Micrococcus</i>
NCDO	: National Collection of Dairy Organismes
Ni-NTA	: acide nickel-nitrilo-triacétique
O.	: <i>Oenococcus</i>
ORF	: phase ouvert de lecture
PAGE	: électrophorèse en gel d'acrylamide
pb	: paire de bases
PCR	: réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN
PGH	: peptidoglycane-hydrolase
PLS	: Projections on latent structures
PMSF	: phénylméthylsulfonyl fluoride
RAPD	: Randomly Amplified Polymorphic DNA fingerprinting
rbs	: site de liaison du ribosome
RDP	: Ribosomal data project database
Staph.	: <i>Staphylococcus</i>
Str.	: <i>Streptococcus</i>
SDS	: dodécyl sulfate de sodium
subsp.	: sous-espèce
Tét	: tétracycline
X-gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
W.	: <i>Weissella</i>

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	10
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	13
I- LES BACTERIES LACTIQUES	13
1.1 Les caractères généraux des bactéries lactiques	13
1.2. Rôles des bactéries lactiques dans l'industrie laitière	13
II- LES LEUCONOSTOCS ET LEUR UTILISATION EN TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE	17
2.1 Le genre <i>Leuconostoc</i>	17
2.1.1 Ecologie des leuconostocs	17
2.1.2. Taxonomie des leuconostocs	18
2.1.3. Utilisation des leuconostocs en technologie alimentaire	22
2.1.3.1. Industrie laitière	22
2.1.3.2. Autres utilisations des leuconostocs	22
2.2. Activités métaboliques des leuconostocs	23
2.2.1. Métabolisme des sucres	23
2.2.2. Métabolisme du citrate	24
2.2.2.1. Stimulation de la croissance des leuconostocs en présence du citrate	26
2.2.2.2. Les mécanismes d'utilisation du citrate	26
2.2.3. Métabolisme azote	29
2.2.3.1. Protéases	29
2.2.3.2. Peptidases	29
2.2.3.3. Transport des peptides et des acides aminés	30
2.2.4. Catabolisme des acides aminés	30
2.2.5. Métabolisme des lipides	32
III- AUTOLYSE DES BACTERIES LACTIQUES AU COURS DE L'AFFINAGE DU FROMAGE	32
3.1. L'affinage des fromages	33
3.1.1. L'accélération de l'affinage	33
3.1.2. Les techniques pour mettre en évidence la lyse bactérienne au cours de l'affinage	34
3.1.3. Influence de la lyse sur l'affinage	35

IV- AUTOLYSE BACTERIENNE ET PEPTIDOGLYCANE HYDROLASES	36
4.1. Composition de la paroi bactérienne	36
4.2. Les peptidoglycane hydrolases	38
4.2.1. Les différents types de PGHs	39
4.2.2. Localisation des PGHs	39
4.2.3. Rôle physiologique des PGHs	39
4.2.4. Organisation structurale des PGHs	41
4.3. Autolyse des bactéries lactiques	43
4.3.1. Lyse spontanée en milieu de culture	43
4.3.2. Lyse induite par le transfert des cellules en solution tamponnée	44
4.3.3. Détection et caractérisation des activités autolytiques en gel d'électrophorèse renaturant	45
4.3.4. Les PGHs des bactéries lactiques	46
4.3.4.1. AcmA, l'autolysine majeure de <i>Lactococcus lactis</i>	46
4.3.4.2. Autres PGHs	46
 V- LES SYSTEMES DE LYSE INDUCTIBLE CHEZ LES BACTERIES LACTIQUES	 47
 MATERIEL ET METHODES	 50
 I- TECHNIQUE DE MICROBIOLOGIE	 50
1.1. Matériel biologique	50
1.1.1. Leuconostocs	50
1.1.2. Lactocoques	50
1.1.3. <i>Escherichia coli</i>	58
1. 2. Autolyse en milieu liquide	58
1.2.1. Autolyse spontanée en milieu de culture	58
1.2.2. Autolyse induite dans un milieu tamponné	58
 II-TECHNIQUE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	 59
2.1. Plasmides	59
2.1.1. Plasmide pBluescript II SK+	59
2.1.2. Plasmide pQE30	59
2.1.3. Plasmide pCYT1	61
2.1.4. Les plasmides NZ9520 et NZ9530	61
2.2. Préparation des cellules compétentes	62
2.2.1. Préparation des cellules compétentes d' <i>E. coli</i>	62
2.2.2. Préparation des cellules compétentes de <i>L. lactis</i>	62
2.3. Transformation des cellules	63

2.3.1. Par "un choc de température"	63
2.3.2. Par électroporation	63
2.4. Techniques de manipulation de l'ADN	63
2.4.1. Extraction et purification de l'ADN total des leuconostocs	63
2.4.2. Préparation de l'ADN plasmidique	64
2.4.2.1. La technique de lyse à l'eau bouillante	64
2.4.2.2. La technique de lyse alcaline	64
2.4.3. Dosage de l'ADN	65
2.5. Réactions de Polymérisation en Chaîne de l'ADN (PCR) et PCR inverse	65
2.5.1. PCR	65
2.5.1.1. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting)	66
2.5.1.2. Amplification et séquençage des ADNr 16S	66
2.5.1.3. Amplification par PCR des régions de l'ADNr 16S	
à l'aide d'amorces spécifiques d'espèces	66
2.5.2. PCR inverse	68
2.6. Digestion de l'ADN	70
2.7. Ligature de l'ADN	70
2.8. Electrophorèse en gel d'agarose	70
2.9. Elution des fragments d'ADN à partir de gels d'agarose	71
2.10. Séquençage de l'ADN	71
2.11. Hybridation de type Southern	71
2.11.1. Transfert de l'ADN sur une membrane	71
2.11.2. Préparation de la sonde	72
2.11.3. Hybridation et révélation	72
2.12. La technique d'hybridation <i>in situ</i> (HIS)	73
2.12.1. Choix des sondes	73
2.12.2. Principe de la technique	73
2.12.2.1. Destabilisation du lait et perméabilisation des cellules par un traitement	
avec une solution de Triton-trypsine	73
2.12.2.2. Fixation des cellules	75
2.12.2.3. Perméabilisation des cellules	75
2.12.2.4. Hybridation	75
2.12.2.5. Observations microscopiques	76

III- TECHNIQUES DE BIOCHIMIE **76**

3.1. Préparation des extraits et des fractions cellulaires	
pour détecter les activités autolytiques	76
3.1.1. Extraits SDS	76
3.1.2. Surnageant de culture	76
3.1.3. Extraits au chlorure de lithium (LiCl)	77

3.1.4. Préparations de parois et de fractions cytoplasmiques	77
3.2. Préparations des substrats pour analyser les activités autolytiques	77
3.3. Techniques électrophorétiques	78
3.3.1. Electrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	78
3.3.2. Electrophorèse SDS-PAGE renaturante	78
3.4. Expression et purification des protéines recombinantes	79
3.4.1. Induction de l'expression des protéines recombinantes	79
3.4.1.1. Induction chez <i>E. coli</i> par IPTG	79
3.4.1.2. Induction par la nisine	79
3.4.2. Purification des protéines recombinantes	80
3.5. Dosage des protéines	80
3.6. Dosage des groupements aminés libres	80
3.7. Dosage des sucres réducteurs	81
 IV- ANALYSE DE DONNEES	 81
4.1. Analyse des séquences nucléotidiques	81
4.2 Analyse des profils RAPD	81
4.3. Recherche de corrélations entre données moléculaires et non moléculaires	82
4.3. Analyse polyphasique	82
4.5. Traitement des séquences d'ADNr 16S et construction d'arbres phylogénétiques	82
 RESULTATS	 83
 PARTIE I	 83
 INTRODUCTION	 83
 I – CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES LEUCONOSTOCS	 83
 II - IDENTIFICATION BACTERIENNE PAR APPROCHES MOLECULAIRES	 83
2.1. Typage moléculaire des souches par RAPD (<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA fingerprinting</i>)	86
2.2. Identification des souches par leur séquence d'ADNr 16S	86
2.3. Identification bactérienne rapide au niveau cellulaire par hybridation <i>in situ</i> (HIS)	89
 III - APPLICATION DE L'ANALYSE MULTIVARIABLE A L'ETUDE DE LA BIODIVERSITE DES LEUCONOSTOCS	 92
3.1. Recherche de corrélations entre la RAPD et les sous-espèces de <i>Ln. mesenteroides</i>	

par régression PLS	92
3.2. Recherche de corrélations entre la RAPD et l'origine d'isolement (Reblochon) des souches de <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> et subsp. <i>mesenteroides</i> par régression PLS	97
CHAPITRE I	98
Molecular diversity of <i>Leuconostoc mesenteroides</i> and <i>Leuconostoc citreum</i> isolated from traditional French cheeses as revealed by RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing, and 16S rDNA fragment amplification	99
PARTIE II	133
INTRODUCTION	133
CHAPITRE I	136
Autolysis of dairy leuconostocs and detection of peptidoglycane hydrolases by renaturing SDS-PAGE	136
CHAPITRE II	
Cloning and expression of <i>lnmur</i> , a peptidoglycane hydrolase gene from <i>Leuconostoc citreum</i> , homologous to the N-terminal domain of the <i>Lactococcus lactis</i> major autolysin AcmA	156
DISCUSSION GENERALE	177
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	182

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Le groupe des bactéries lactiques est constitué d'un ensemble de genres comprenant des coques et des bacilles immobiles. Ces bactéries à Gram positif ont un métabolisme aérobie facultatif et fermentaire. Elles sont capables de produire de l'acide lactique à partir du lactose. Elles acidifient ainsi le lait et contribuent à l'élaboration de la texture et de la saveur des produits laitiers. Au cours de la fabrication des produits fermentés, les réactions liées au catabolisme des substrats carbonés, à la lipolyse et à la protéolyse contribuent à la synthèse de composés d'arômes importants pour le développement des goûts caractéristiques de chaque produit. Par leur capacité à diminuer le pH des produits et à produire des substances bactéricides, elles inhibent également la croissance des micro-organismes indésirables dans des aliments. Le développement de nouvelles applications telles que l'utilisation de ces bactéries en tant que probiotiques ou comme vecteurs vaccinaux offrent des perspectives intéressantes.

Alors que les recherches se sont surtout développées sur *Lactococcus lactis*, micro-organisme modèle, les connaissances acquises sur le genre *Leuconostoc* restent encore modestes. Dans l'industrie laitière, les leuconostocs sont utilisés en association avec les lactocoques pour la production de beurre et de certains types de fromages. Les lactocoques assurent la protéolyse et l'acidification du lait alors que les leuconostocs, par leur aptitude à produire du CO₂ et du diacétyl, assurent l'ouverture de la pâte fromagère et l'aromatisation des produits.

Les caractères biochimiques et physiologiques ne permettent pas de classer sans erreur les souches du genre *Leuconostoc* dans les différentes espèces décrites. De plus, des variants de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* non producteurs de dextrane peuvent être classés de manière erronée dans l'espèce *Weissella paramesenteroides*. Au cours de la dernière décennie, avec le développement des techniques moléculaires, plusieurs nouvelles espèces de leuconostoc ont été décrites. *Ln. paramesenteroides* a rejoint d'autres lactobacilles dans le nouveau genre *Weissella*. *Ln. oenos* a été rebaptisé *Oenococcus oeni*.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous avons classé 220 souches de leuconostoc isolées, pour la plupart, de fromages français, dans différentes espèces (*Ln. lactis*, *Ln. mesenteroides*, *W. paramesenteroides*) et sous-espèces (*mesenteroides*, *dextranicum* et *cremoris*) à l'aide de tests phénotypiques simples. Le typage moléculaire de ces souches par RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA fingerprinting) a été réalisé. Il permet de

classer les profils en groupes très représentés et d'identifier ceux qui sont plus originaux. Cette technique a permis, en particulier, de détecter un groupe de souches de l'espèce *Ln. citreum*, de reclasser des souches de *W. paramesenteroides* dans l'espèce *Ln. mesenteroides* (variants non producteurs de dextrane). Le séquençage de l'ADNr 16S a été réalisé systématiquement à partir de l'ADN de souches représentatives des grands groupes RAPD et de souches au profil RAPD atypique. Cette technique a confirmé l'existence de souches de *Ln. citreum*. Des amorces ciblant les régions variables des ADNr 16S de *Ln. mesenteroides*, *Ln. lactis*, *Ln. citreum* et *W. paramesenteroides* ont été développées de manière à amplifier un fragment de taille différente selon les espèces. Une sonde spécifique du genre *Leuconostoc* (à l'exception de *Ln. fallax*) et ciblant l'ARNr 16S a été utilisée en hybridation *in situ*. Ces deux dernières techniques ont été validées sur un grand nombre de souches et permettent de confirmer rapidement l'appartenance d'une souche au genre *Leuconostoc* et à une espèce donnée.

La deuxième partie de ce manuscrit est consacrée à la caractérisation biochimique et moléculaire du système autolytique chez *Leuconostoc*. L'autolyse bactérienne consiste en l'éclatement de la cellule suite à la dégradation de la paroi par des enzymes endogènes appelées peptidoglycane-hydrolases. Ces enzymes hydrolysent le peptidoglycane, constituant majeur de la paroi. Chez les lactocoques et les lactobacilles, l'autolyse libère le contenu enzymatique intracellulaire dans le caillé fromager. Ces enzymes sont alors au contact de leurs substrats. Ce phénomène est associé à une intensification de la protéolyse au cours de l'affinage et à une diminution de l'amertume. Ceci a des effets positifs sur la qualité organoleptique des fromages.

Cette partie est composée de deux chapitres. Le chapitre II du manuscrit porte sur la caractérisation biochimique du système autolytique chez *Leuconostoc*. La souche *Ln. mesenteroides* 10L a été choisie comme modèle car elle présente un caractère autolytique élevé. La source de carbone présente dans le milieu de culture favorise (cas du glucose) ou défavorise (cas du lactose ou du galactose) l'autolyse de cette souche. En gel SDS-PAGE renaturant contenant des cellules autoclavées de *Micrococcus lysodeikticus*, trois bandes d'activités de taille comprise entre 41 et 52 kDa sont mises en évidence. Lorsque des cellules de *Ln. mesenteroides* sont utilisées en remplacement de celles de *M. lysodeikticus*, des bandes d'activités supplémentaires sont détectées. L'analyse des profils d'activités de souches appartenant à différentes espèces de leuconostoc montrent que ceux de *Ln. mesenteroides*, *Ln. pseudomesenteroides*, *Ln. carnosum* et *Ln. citreum* sont similaires et différents de ceux de *Ln. lactis*. Selon les résultats d'analyse de la spécificité, la souche 10L contient une glycosidase et

une *N*-acetylmuramyl-L-amidase ou une endopeptidase.

Le chapitre III du manuscrit porte sur le clonage et le séquençage d'un gène de *Ln. citreum* codant pour une protéine homologue aux *N*-acetyl-muramidases bactériennes. Il s'agit d'une protéine de 209 acides aminés présentant un peptide signal de 31 acides aminés. Contrairement aux autres *N*-acetyl-muramidases connues, celle-ci ne possède pas de séquences répétées d'acides aminés impliquées dans le mécanisme d'ancrage à la paroi cellulaire. Cependant, sous cette forme, l'enzyme purifiée est capable d'hydrolyser le peptidoglycane. Une protéine chimère composée de l'enzyme de *Ln. citreum* et de la région C-terminale (régions répétées) de l'autolysine majeure *acmA* de *L. lactis* est capable de compléter une mutation du gène *acmA* chez *L. lactis*.

Les résultats présentés dans cette partie constituent les premières données sur l'autolyse et les peptidoglycane-hydrolases chez *Leuconostoc*.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I- LES BACTERIES LACTIQUES

1.1. Les caractères généraux des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, immobiles, asporulées, anaérobies facultatives, qui ne possèdent ni catalase, ni oxydase. L'aptitude à produire de l'acide lactique comme produit majeur par fermentation des glucides constitue leur caractère commun. Du point de vue morphologique et physiologique, les bactéries lactiques représentent un ensemble hétérogène de genres et d'espèces (tableau 1). Dans leur revue parue en 1997, STILES et HOLZAPFEL ont présenté les différents genres de bactéries lactiques d'intérêt alimentaire. Il s'agit principalement de *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Oenococcus* et *Aerococcus* (figure 1).

1.2. Rôles des bactéries lactiques dans l'industrie laitière

Les souches appartenant aux genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Leuconostoc* sont utilisées couramment dans l'industrie laitière, souvent en cultures mixtes et en association avec d'autres micro-organismes comme les bactéries propioniques, les bactéries d'affinage, les moisissures (*Penicillium*) ou les levures (*Kluyveromyces*). Les bactéries lactiques jouent un rôle très important en technologie fromagère puisqu'elles constituent la flore de base de tous les types de fromage. Leurs rôles principaux sont (DESMAZEAUD, 1990; DELLAGLIO et coll., 1995) : i) la production d'acide lactique et de composés d'arômes, ii) leur effet bactériocinogène et, pour certaines espèces, iii) la production de CO₂. Les bactéries lactiques sont aussi largement utilisées dans la fabrication de nombreux produits alimentaires à base des végétaux (choucroute, olive, pain, soja, vin) ou de produits animaux (fromage, beurre, yaourt, produits carnés).

L'acide lactique est l'un des produits issus de la transformation du lactose du lait par les bactéries. Dans le cas des bactéries lactiques homofermentaires, cet acide est la seule molécule produite à partir de cette source de carbone. Le premier effet de l'acidification du lait est de favoriser la coagulation. L'abaissement du pH protège aussi le caillé contre d'éventuelles contaminations microbiennes non désirables responsables de l'apparition de dé-

Tableau 1 : Les caractères généraux des bactéries lactiques d'après HOLZAPFEL et SCHILLINGER (1991)

	Leuconostocs	Lactobacilles		Streptococques	Pédiococques	Carnobactéries
		hétérofermentaires stricts	homofermentaires stricts			
Morphologie	coques ou coccobacilles	coccobacilles ou bâtonnets	bâtonnets	coques (coccobacilles)	coques en tétrades	bâtonnets
Production de CO ₂ à partir glucose	+	+	-	-	-	(+)
Hydrolyse de l'arginine	-	+/-	-/+	-ou+	-ou+	+
Production de dextrane à partir du saccharose	-ou+	-/+	-/+	-	-	-
Isomère de l'acide lactique	D (-)	DL	D (-), DL ou L (-)	L (+)	DL ou L (+)	L (+)

+, réaction positive ; (+), faible réaction ; +/-, réaction positive dans la plupart des cas, seules quelques espèces donnent un résultat négatif ; -/+, réaction négative dans la plupart des cas, seules quelques espèces donnent un résultat positif.

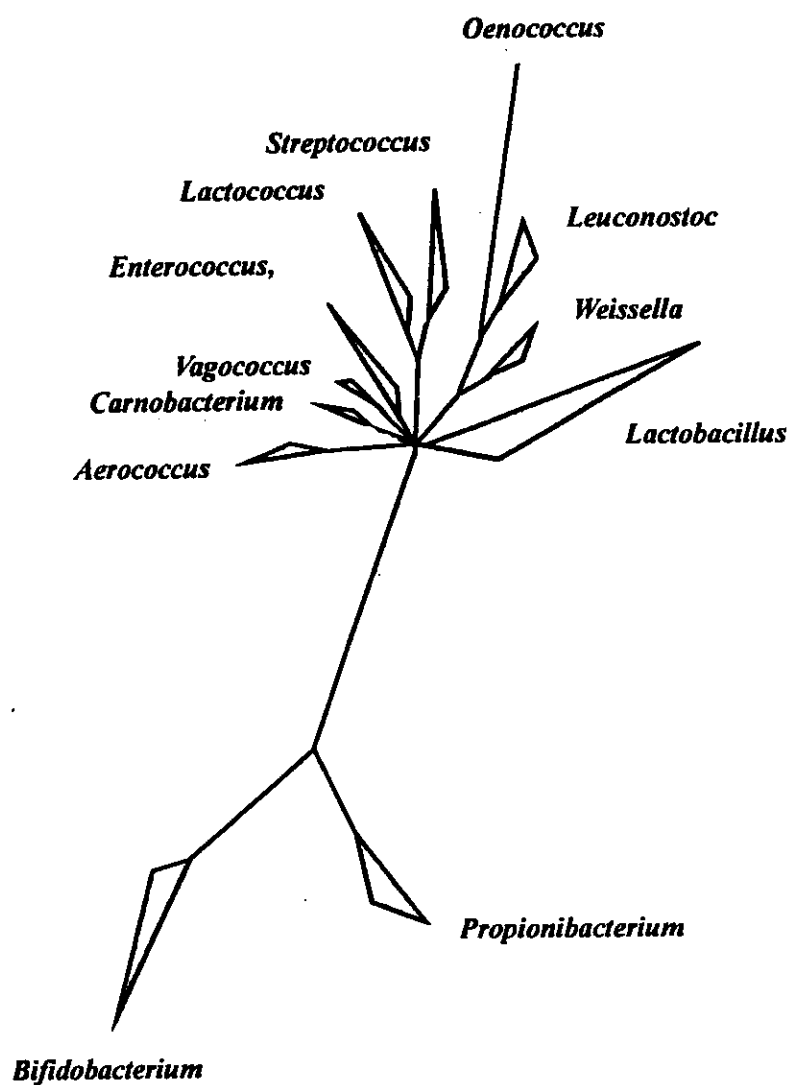


Figure 1. Arbre phylogénétique des bactéries lactiques (partie haute) incluant des bactéries à Gram positif à haut GC % utilisées en technologie laitière (*Bifidobacterium* et *Propionibacterium*) (STILES et HOLZAPFEL, 1997).

fauts de goût et de texture. L'abaissement du pH entraîne également la solubilisation de minéraux tels que le calcium et le phosphore liés aux micelles de caséine. Ces ions jouent un rôle important dans la cohésion du réseau protéique et donc dans la texture du fromage.

Les composés d'arômes sont des produits du métabolisme des glucides et des acides organiques du lait. Ce sont essentiellement des acides, des alcools, des aldéhydes, des cétones (en C4) et des esters. L'acide lactique est un produit sans odeur et non volatil qui participe à la flaveur des produits laitiers en leur donnant une saveur acide. L'acide acétique provient du métabolisme du citrate ou du lactose. L'acide l'acétique joue un rôle en augmentant la perception du diacétyl (BENNET et coll., 1965). L'éthanol est l'alcool principalement rencontré dans les produits laitiers. Cependant, son rôle dans l'aromatisation des produits laitiers n'est pas encore clairement élucidé. Il s'agirait probablement d'un effet indirect en association avec d'autres composés non identifiés. Dans les produits laitiers fermentés, le citrate est considéré comme le précurseur du diacétyl. Ce composé est responsable de l'arôme dit "de beurre" ou "de noisette". La majorité des souches de *Leuconostocs* et celles appartenant au biovar *diacetylactis* de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sont capables de produire du diacétyl en présence de citrate.

Les bactéries lactiques participent également à la protéolyse. Les enzymes protéolytiques des bactéries lactiques sont responsables de la formation de la flaveur caractéristique de chaque fromage (HEMME et coll., 1982; VISSER, 1977). Les premières enzymes bactériennes impliquées dans la cascade de réactions protéolytiques sont les protéases. Elles coupent la caséine en libérant des protéines de faibles poids moléculaires. Ces fragments subissent ensuite des dégradations conduisant à la formation de petits peptides et d'acides aminés libres sous l'action des peptidases et d'aminopeptidases. A ce niveau, les enzymes autolytiques jouent un rôle très important dans la libération du potentiel enzymatique intracellulaire. Elles permettent ainsi à ces enzymes protéolytiques d'accéder plus facilement à leurs substrats (CROW et coll., 1995; CHAPOT-CHARTIER et coll., 1994; WILKINSON et coll., 1994a).

La production de CO₂ par les souches du genre *Leuconostoc* est un caractère recherché dans la fabrication des fromages comme le Roquefort. Le CO₂ assure l'ouverture de la pâte fromagère, indispensable au développement du *Penicillium roqueforti* (DEVOYOD et MULLER 1969).

II- LES LEUCONOSTOCS ET LEUR UTILISATION EN TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE

2.1. Le genre *Leuconostoc*

Les leuconostocs sont les seules bactéries lactiques de forme coccoïde qui possèdent un métabolisme hétérofermentaire. Elles produisent du CO₂, de l'éthanol et de l'acide lactique D (-) à partir des glucides. L'absence de production d'ammoniaque à partir d'arginine constitue un critère de différenciation caractéristique des leuconostocs (ABD-EL-MALEK et GIBSON, 1948). Elles ne possèdent pas de catalase. Elles sont chimio-organotrophes et ont besoin, pour se développer, de milieux riches contenant des facteurs de croissance multiples et des acides aminés. Les cellules sont de forme légèrement ovale (coques de 0,5 à 0,7 µm sur 0,7 à 1,2 µm), disposées par paires ou en chaînes courtes. Leur température optimale de croissance se situe entre 20 et 30°C (GARVIE, 1986). Cependant, certaines souches appartenant aux espèces *Ln. gelidum* et *Ln. carnosum*, isolées de la viande, sont capables de pousser à une température de 1°C (SHAW et HARDING, 1989).

2.1.1 Ecologie des leuconostocs

Les espèces bactériennes appartenant au genre *Leuconostoc* colonisent des habitats très variés comme les produits laitiers, les végétaux et les produits carnés. Ces bactéries sont fréquemment présentes dans le lait et la vaisselle destinée à la fabrication fromagère. Les souches appartenant essentiellement à l'espèce *Ln. lactis* et à la sous- espèce *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* ont été isolées du lait (ABD-EL-MALEK et GIBSON, 1948). Plus récemment, VILLANI et coll. (1997) ont isolé 215 souches du genre *Leuconostoc* du lactosérum et du lait de buffle. COGAN et coll. (1997) ont montré que, 10% des 4379 isolats obtenus à partir de différentes variétés de fromages artisanaux, appartenaient au genre *Leuconostoc*. De leur côté, DEVOYOD et POUILLAIN (1988) ont isolés environ 250 souches appartenant essentiellement à *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* et *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum*. Ces souches provenaient de divers fromages français fabriqués au lait cru. Certaines sous-espèces paraissent spécifiques d'une niche écologique. C'est le cas de *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* et de *Ln. lactis*. Ces deux espèces présentent la particularité d'avoir des traits métaboliques restreints et adaptés au milieu lait. Des souches appartenant aux espèces *Ln. gelidum* et *Ln. carnosum* ont été isolées de produits à base de viande

conditionnés sous-vide et conservés à basse température (SHAW et HARDING, 1989; BJÖRKROTH et coll., 1998).

2.1.2. Taxonomie des leuconostocs

Le genre *Leuconostoc* a été défini pour la première fois par VAN TIEGHEM en 1878 (tableau 2). Le terme "leuco" vient du grec "leucos" qui signifie blanc et "nostoc" du nom d'une algue bleue mucilagineuse. Les première souches ont été isolées à partir d'accidents apparus dans les sucreries.

A partir de ce moment, de nombreuses études ont été réalisées sur la classification de ces bactéries. En 1948, ABD-EL-MALEK et GIBSON ont étudié 40 souches de streptocoques hétérofermentaires isolées du lait. D'après ces auteurs, la majorité de ces souches a été classée dans l'espèce *Streptococcus kefir*. Plus tard, GARVIE (1960) a reclassé ces souches dans l'espèce *Ln. lactis*. En 1967, ce même auteur a isolé du vin une nouvelle espèce de *Leuconostoc* dénommée *Ln. oenos* (GARVIE 1967 a,b). Dans la 8ème édition du Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974), GARVIE a proposé de classer les leuconostocs en six espèces : *Ln. mesenteroides*, *Ln. dextranicum*, *Ln. lactis*, *Ln. cremoris*, *Ln. paramesenteroides* et *Ln. oenos*. Les résultats obtenus par des techniques i) de bactériologie classique, ii) d'hybridation ADN-ADN (GARVIE, 1981) et iii) d'immunologie (HONTEBEYRIE et GASSER, 1975) ont permis à ces derniers auteurs de proposer un rang de sous-espèce de l'espèce *Ln. mesenteroides* aux deux espèces *Ln. dextranicum* et *Ln. cremoris*.

En 1989, cinq nouvelles espèces sont venues compléter le genre *Leuconostoc*. SHAW et HARDING (1989) ont testé cinquante deux souches isolées de produits carnés conservés à basse température, en utilisant la technique d'hybridation ADN-ADN et l'analyse des profils des acides gras membranaires. Les souches qui présentent le même profil d'acides gras cellulaires mais diffèrent par leur homologie ADN-ADN, ont été classées dans les nouvelles espèces *Ln. gelidum* et *Ln. carnosum*. Par leurs phénotypes, ces deux espèces sont très proches l'une de l'autre. Le seul moyen de les séparer est l'hybridation ADN-ADN. L'ADN de la souche type de *Ln. carnosum* présente seulement 18% d'homologie avec celui de la souche type de *Ln. gelidum*.

Tableau 2. Historique de genre *Leuconostoc* (THUNEL, 1995)

Espèces	Références
<i>-Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	VAN TIEGHEM (1878), GARVIE (1983)
<i>-Ln. lactis</i>	ABD-EL-MALEK et GIBSON (1948), GARVIE (1960)
<i>-Ln. paramesenteroides</i>	GARVIE (1967)
(Reclassification ; <i>Weissella paramesenteroides</i>)	COLLINS et coll., (1993)
<i>-Ln. oenos</i>	GARVIE (1967)
(Reclassification ; <i>Oenococcus oeni</i>)	DICKS et coll., (1995)
<i>-Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	GARVIE (1983)
<i>-Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	GARVIE (1983)
<i>-Ln. pseudomesenteroides</i>	FARROW et coll., (1989)
<i>-Ln. gelidum</i>	SHAW et HARDING (1989)
<i>-Ln. carnosum</i>	SHAW et HARDING (1989)
<i>-Ln. citreum</i>	FARROW et coll., (1989)
<i>-Ln. amelibiosum</i> (identique à <i>Ln. citreum</i>)	SCHILLINGER et coll., (1989)
<i>-Ln. fallax</i>	MARTINEZ-MURCIA et COLLINS (1991)
<i>-Ln. argentinum</i>	DICKS et coll., (1993)

FARROW et coll. (1989) ont réalisé des tests phénotypiques en complément de l'hybridation ADN-ADN sur trente et une souches à Gram positif, de forme coccoïde, résistantes à la vancomycine et isolées de prélèvements cliniques. Ils ont ainsi décrit deux nouvelles espèces appartenant au genre *Leuconostoc*. L'une produit un pigment jaune. Elle a été nommée *Ln. citreum*. La seconde a été baptisée *Ln. pseudomesenteroides*.

La même année, SCHILLINGER et coll. (1989), en utilisant des études d'hybridation ADN-ADN, ont décrit une nouvelle espèce nommée *Ln. amelibiosum*. Cependant, TAKAHASHI et coll. (1992) ont montré que cette espèce correspondait en fait, à l'espèce *Ln. citreum*.

En 1991, une souche atypique de *Leuconostoc*, isolée de choucroute, a été classée dans une nouvelle espèce : *Ln. fallax* (MARTINEZ-MURCIA et COLLINS, 1991). L'analyse des profils de protéines solubles et des résultats d'hybridation ADN-ADN concernant sept souches de *Leuconostoc* isolées de laits crus en Argentine ont conduit à la description d'une nouvelle espèce *Ln. argentinum*. (DICKS et coll., 1993).

Toutes les espèces de leuconostoc présentent un haut degré d'homologie au niveau de leurs séquences d'ARNr 16S. Elles forment un groupe phylogénique séparé des autres bactéries lactiques (MARTINEZ-MURCIA et COLLINS, 1990). Par contre, les mêmes auteurs ont montré que la séquence d'ARNr 16S de *Ln. paramesenteroides* présente plus d'homologie avec celles d'un groupe composé de lactobacilles hétérofermentaires atypiques : *Lb. confusus*, *Lb. kandleri*, *Lb. minor*, *Lb. halotolerans* et *Lb. viridescens*. COLLINS et coll. (1993) ont constaté, par analyse des séquences d'ARNr 16S de souches isolées de saucissons secs fermentés, que celles-ci étaient apparentées au groupe constitué de *Ln. paramesenteroides* et des lactobacilles hétérofermentaires atypiques. Ces auteurs ont proposé lors de définir un nouveau genre pour associer ces différentes espèces. Celui-ci a été nommé *Weissella*. Les souches grecques ont été classées dans une nouvelle espèce baptisée *W. hellenica*. Certains caractères phénotypiques permettant de distinguer les leuconostocs, *W. paramesenteroides* et *Oenococcus oeni* sont récapitulés dans le tableau 3.

Ln. oenos est la seule espèce du genre *Leuconostoc* capable de croître en milieu acide contenant 10% éthanol. De plus, la mobilité électrophorétique d'enzymes dépendant du NAD comme la D(-) lactate déshydrogénase, la 6-phosphogluconate déshydrogénase et l'alcool déshydrogénase de cette espèce diffèrent de celles des autres membres du genre *Leuconostoc* (DICKS et coll., 1990a; GARVIE, 1969; GARVIE, 1986). Enfin, l'analyse des séquences des ARNr 16S et 23S révèle que le genre *Leuconostoc* se compose de trois groupes bien distincts :

Tableau 3. Quelques caractères phénotypiques de *Leuconostoc*, *W. paramesenteroides* et *O. oeni*

Espèces	Type de muréine	Pigmentation jaune	Production de dextrane	L-Arabinose	D-Fructose	Saccharose	Tréhalose
<i>Ln. amelibiosum</i>	Lys-Ala ₂	-	+	+	+	+	+
<i>Ln. argentinum</i>	nd	nd	-	v	v	+	v
<i>Ln. carnosum</i>	nd	-	+	-	+	+	+
<i>Ln. citreum</i>	nd	+	+	+	+	+	+
<i>Ln. fallax</i>	Lys-Ala ₂	nd	-	-	+	+	+
<i>Ln. gelidum</i>	nd	-	v	-	+	+	v
<i>Ln. lactis</i>	Lys-Ala ₂	-	-	-	+	+	+
<i>Ln. mes. subsp. crem.</i>	Lys-Ser-Ala ₂	nd	-	-	-	-	-
<i>Ln. mes. subsp. dext.</i>	Lys-Ser-Ala ₂	nd	+	-	+	+	+
<i>Ln. mes. subsp. mes.</i>	Lys-Ser-Ala ₂	-	+	+	+	+	+
<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	nd	-	-	+	+	+	+
<i>O. oeni</i>	Lys-Ala-Ser	nd	-	v	+	+	+
<i>W. paramesenteroides</i>	Lys-Ala ₂	nd	-	v	+	+	+

celui des *leuconostocs sensu stricto*, celui des *Weissella* et celui de *Ln. oenos* (GARVIE, 1981; SCHILLINGER et coll., 1989; MARTINEZ-MARCIA et COLLINS, 1990; YANG et WOESE, 1989; MARTINEZ-MURCIA et COLLINS, 1991). A partir de ces résultats, DICKS et coll. (1995) ont proposé de remplacer le nom d'espèce *Ln. oenos* par celui de *O. oeni*.

2.1.3. Utilisation des *Leuconostoc* en technologie alimentaire

Comme pour les autres bactéries lactiques, l'industrie alimentaire est la principale utilisatrice de *Leuconostoc*. Les principales applications concernent les industries laitières, fromagères et la production vinicole. Cependant, d'autres procédés de fermentation traditionnelle de produits végétaux contenant des leuconostocs sont utilisés dans de nombreux pays intertropicaux (DAMELIN et coll., 1999; FIGUEROA et coll., 1995)

2.1.3.1. Industrie laitière

Les leuconostocs entrent dans la composition de la flore bactérienne des levains lactiques mésophiles. La production de diacétyle et d'acétoïne à partir du citrate est sans doute le caractère le plus recherché chez les leuconostocs. Ces substances sont responsables de l'arôme et du goût particulier de certains produits laitiers (fromages, beurre). Les leuconostocs sont avec *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, les seules espèces productrices de diacétyle et d'acétoïne. Cependant, certaines souches de cette espèce produisent de grandes quantités d'acétaldéhyde (HARVEY, 1960) responsable d'un défaut d'arôme dit de "vert" ou d'"âcre" dans les produits laitiers (LINDSAY et coll., 1965). Les leuconostocs sont capables de dégrader l'acétaldéhyde et à ce titre, sont utilisés en co-culture avec *L. lactis* pour éliminer ce défaut.

Les leuconostocs sont également utilisés pour améliorer l'ouverture de la pâte dans certains fromages tels que le Roquefort, l'Edam et le Gouda (DEVOYOD et POULLAIN, 1988). Ces ouvertures sont réalisées grâce à la production de CO₂. Dans le cas du fromage de roquefort, l'ouverture de la pâte permet le développement correct de *Penicillium roqueforti* (DEVOYOD et MULLER 1969).

2.1.3.2. Autres utilisations des leuconostocs

En œnologie, les leuconostocs permettent d'améliorer la qualité organoleptique du vin. Cette amélioration résulte de la transformation de l'acide malique (dont le goût est très prononcé) en acide lactique. En plus de la fermentation malolactique, celle de l'acide citrique permet la production dans le vin des composés aromatiques comme l'acétoïne et le diacétyl (LONVAUD-FUNEL, 1995).

En inhibant la croissance des bactéries indésirables, les leuconostocs peuvent aussi améliorer la conservation des aliments. MATHER et BABEL (1959) ont rapporté que l'utilisation des leuconostocs dans la production de beurre inhibe le développement de *Pseudomonas fragi* et *Pseudomonas putrefaciens*. L'inhibition des psychrotrophes est également mise en évidence dans le lait à 7°C. Le taux d'inhibition peut aller jusqu'à 10^7 ufc/ml en 5 jours en fonction de l'inoculum utilisé (FANTUZZI et coll., 1999). L'effet inhibiteur peut être lié à la production d'acide acétique ou de diacétyl (JAY, 1982). De même, la production de différentes bactériocines a été décrite chez plusieurs espèces de *Leuconostoc* (STILES, 1994; HECHARD et coll., 1992; KRIER et coll., 1999).

Certaines souches de leuconostocs produisent des quantités considérables de dextrans. Il s'agit de polymères de glucose utilisés dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique ou encore en médecine. Plusieurs souches de *Leuconostoc* ont été isolées à partir d'accidents survenus dans l'industrie sucrière. Les dextrans produits par ces bactéries entraînent l'obstruction des tuyauteries dans les usines. Ceci est un problème important dans l'industrie de sucrerie.

2.2. Activités métaboliques des leuconostocs

2.2.1. Métabolisme des sucres

Comme les autres bactéries lactiques, les leuconostocs ne peuvent pas produire d'énergie en utilisant la phosphorylation oxydative. En effet, ils ne possèdent pas de cytochrome, ni certaines enzymes nécessaires au cycle de Krebs. Ils produisent l'énergie dont ils ont besoin par la fermentation des sucres (COGAN et JORDAN, 1994). Le lactose (50 g/l dans le lait de vache) est la principale source de carbone et d'énergie des bactéries lactiques lors de leur croissance dans le lait et dans les produits laitiers. Le métabolisme des glucides est initié par l'action d'un système de transport de ces molécules à travers la membrane cytoplasmique. Les systèmes de transport ont été étudiés chez différentes bactéries lactiques (FOUCAUD et POOLMAN, 1992; HUTKINS et PONNE, 1991). Il a été montré que le gène

(*lacS*) responsable du transport du lactose chez *Ln. lactis* est porté par un plasmide alors que chez *Lb. bulgaricus* et *Str. thermophilus*, le même gène est localisé sur la chromosome (VAUGHAN et coll., 1996; MOLLET et coll., 1993). Différents types de transport ont été proposés chez les bactéries lactiques (KONINGS et coll., 1989; POOLMAN, 1993). Chez les lactocoques et certains lactobacilles homofermentaires, les sucres sont transportés par le système phosphoénolpyruvate-phosphotransférase (PEP-PTS). Ce système semble être absent chez *Leuconostoc* (COGAN, 1980). Dans ce système, le lactose est d'abord phosphorylé lors du passage à travers la membrane par l'action d'une phosphotransférase. Puis, le lactose-6-P est hydrolysé par une P- β -galactosidase (KONINGS et coll., 1994a).

La fermentation des hexoses par les leuconostocs entraîne la formation de lactate, d'éthanol et de CO₂ en quantité équimolaire. Après être passé à travers l'enveloppe cellulaire, le lactose est hydrolysé par la β -galactosidase en donnant le glucose et le galactose (figure 2). Le gène codant pour la β -galactosidase se trouve sur un plasmide de 23 kb. Deux gènes sont impliqués dans l'utilisation du lactose : *lacL* et *lacM*. Ils sont nécessaires pour la production d'une β -galactosidase fonctionnelle (DAVID et coll., 1992). Le poids moléculaire apparent de la β -galactosidase est de ~80 kDa et la température optimale comprise entre 43°C et 58°C (HUANG, 1994). Le glucose entrant dans la voie glycolytique conduit à la production de D-lactate, de CO₂ et d'éthanol. Le galactose intracellulaire emprunte la voie de Leloir.

2.2.2. Métabolisme du citrate

Toutes les souches de *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* et une grande partie des autres souches de leuconostocs laitiers sont capables d'assimiler le citrate en présence d'un sucre fermentescible (GARVIE 1986). Dans les produits laitiers, l'utilisation de citrate par les bactéries lactiques conduit à la production de composés aromatiques comme le diacétyle, l'acétoïne et le 2,3-butylène-glycol (SPECKMAN et COLLINS, 1968). Bien que la quantité de citrate soit faible dans le lait (environ 10 mM dans le lait de vache), ses produits de dégradation jouent un rôle très important dans l'arôme des produits laitiers et notamment dans les fromages frais et le beurre.

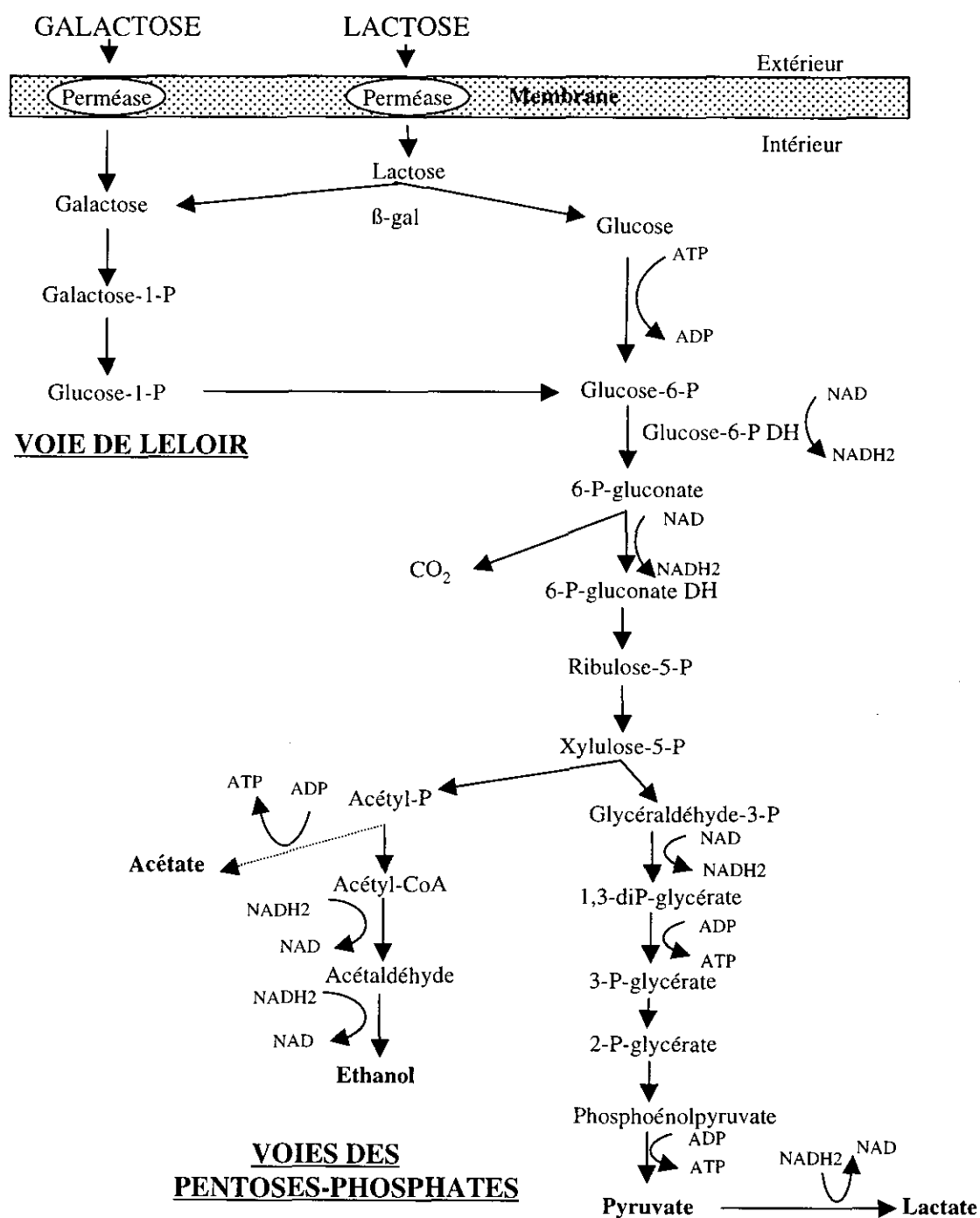


Figure 2 : Métabolisme du lactose et du galactose par la voie des pentoses-phosphates (d'après De ROISSART, 1986)

2.2.2.1. Stimulation de la croissance des leuconostocs en présence du citrate

Différents sucres fermentescibles ont été testés en association avec le citrate pour mieux expliquer la croissance et le métabolisme des leuconostocs. La croissance des leuconostocs est activée par la présence de citrate (SCHMITT et DIVIÈS, 1991). COGAN (1987) a montré que le co-métabolisme du citrate et du glucose provoque une stimulation de croissance chez *Ln. lactis*, *Ln. mesenteroides* et *W. paramesenteroides*. De même, la croissance des leuconostocs est augmentée de 50 à 100 % en présence de citrate dans un milieu contenant du lactose (STARRENBURG et HUGENHOLTZ, 1991). Récemment, il a été également montré que le co-métabolisme du citrate et du xylose par *Ln. mesenteroides* entraîne la stimulation de la croissance, l'augmentation de la production de D-lactate et d'acétate et l'inhibition de la production d'éthanol (SCHMITT et coll., 1997). L'addition d'acétaldéhyde (100 µg/ml) dans le milieu contenant du glucose et du citrate stimule aussi la croissance et conduit à une production plus élevée d'acétoïne et de diacétyl chez *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* (COLLINS et SPECKMAN, 1974). De même, il a été montré que l'oxygène et le diacétyl stimulent aussi la croissance des leuconostocs (LUCEY et CONDON, 1986; SCHMITT et DIVIES, 1990; SCHMITT et coll., 1994). La stimulation peut être expliquée par un gain d'ATP provenant de la voie de l'acétate kinase favorisée en présence de citrate jouant le rôle d'accepteur d'électrons (SCHMITT et coll., 1992). La création d'une force protomotrice lors de la fermentation du citrate par *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (HUGENHOLTZ, 1993) et *Ln. mesenteroides* a aussi été mise en évidence (MARTY-TEYSSET et coll., 1996a et b).

2.2.2.2. Les mécanismes d'utilisation du citrate

Le métabolisme du citrate comporte plusieurs différentes étapes : le transport du citrate à l'intérieur de la cellule, l'hydrolyse de cette molécule en oxaloacétate et en acétate, la formation du pyruvate par décarboxylation de l'oxaloacétate et la réduction du pyruvate en lactate. La voie métabolique du citrate est présentée dans la figure 3.

La présence d'une citrate perméase transmembranaire est essentielle dans le métabolisme du citrate. Les citrate perméases des leuconostocs et des lactocoques sont codées

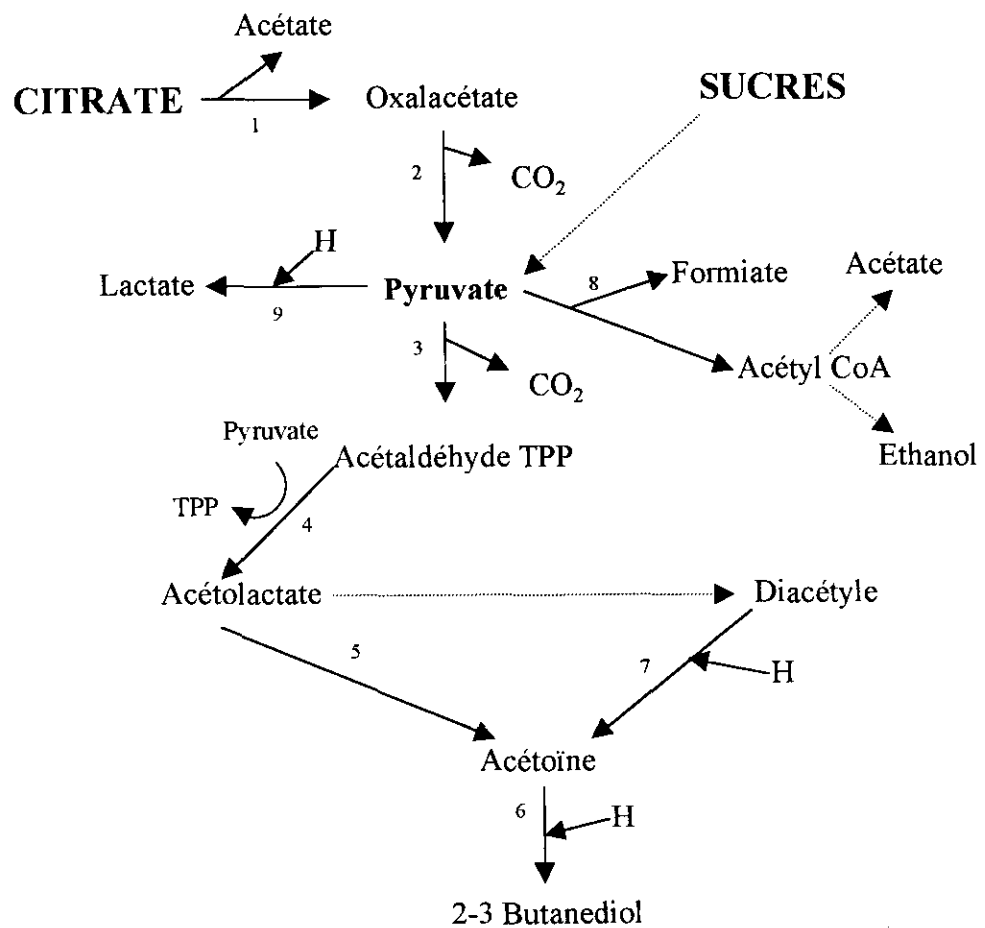


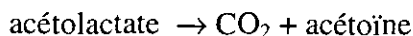
Figure 3 : Les étapes principales du métabolisme du citrate par les bactéries lactiques (d'après DIVIES et coll. 1994). 1; Citrate lyase, 2; Oxalacétate décarboxylase, 3; Pyruvate décarboxylase, 4; α -acétolactate synthétase, 5; α -acétolactate décarboxylase, 6; Acétoïne réductase, 7; Diacétyle réductase, 8; Pyruvate formiate lyase, 9; Lactate déshydrogénase.

par des plasmides de 22 et de 8 kpbs respectivement (LIN et coll., 1991; DAVID et coll., 1992). Il a été montré que l'inaptitude de certaines souches à utiliser le citrate est liée à l'instabilité de ce plasmide (BELLENGIER et coll., 1994; KIHAL et coll., 1996). Chez les leuconostocs et les lactocoques, le pH optimum de l'activité de cette enzyme se situe entre 5,0 et 6,0 (STARRENBURG et HUGENHOLTZ, 1991; SMITH et coll., 1992; SMITH et coll., 1993).

A l'intérieur de la cellule, le citrate est hydrolysé en acétate et en oxaloacétate par une seconde enzyme appelée citrate lyase ou citratase. Cette enzyme est constitutive chez les lactocoques et inductible chez les leuconostocs (HARVEY et COLLINS, 1961; COGAN et coll., 1981). Chez *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* et *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, l'activité de la citrate lyase est stimulée en présence des ions magnésium et manganèse (HARVEY et COLLINS, 1961). Chez *Leuconostoc*, cette enzyme est régulée par le citrate présent dans le milieu de croissance. En présence de citrate, l'activité peut être induite jusqu'à 20 fois (HUGENHOLTZ et STARRENBURG, 1992). Par contre, cette régulation n'existe pas chez les lactocoques.

Le catabolisme du citrate se poursuit par l'intervention d'une oxaloacétate décarboxylase. Cette enzyme clive l'oxaloacétate en pyruvate et en CO₂. Le pyruvate joue un rôle clé dans le co-métabolisme des sucres et du citrate chez les leuconostocs et les lactocoques. L'activité de cette enzyme est contrôlée par le citrate présent dans le milieu. MARTY-TEYSSET et coll. (1996b) ont montré que, chez les leuconostocs, le blocage de cette enzyme en absence de citrate, entraîne la production d'aspartate par transamination de l'oxaloacétate.

L'acide pyruvique synthétisé à partir du citrate et des sucres joue un rôle clé dans le métabolisme. Les bactéries lactiques disposent de plusieurs possibilités pour l'utiliser. Dans sa fonction principale comme précurseur d'arômes, il est converti en diacétyle, en acétoïne et en 2,3 butanediol. Le diacétyle est produit par oxydation puis décarboxylation de l' α -acétolactate (SPECKMAN et COLLINS, 1968). L' α -acétolactate décarboxylase est impliquée dans la formation d'acétoïne selon la réaction suivante :



Finalement, l'enzyme 2,3-butanediol deshydrogénase catalyse à la fois la réduction irréversible du diacétyle en acétoïne et la réduction réversible de l'acétoïne en 2,3-butanediol (GIBSON et coll., 1991).

2.2.3. Métabolisme azoté

2.2.3.1. Protéases

Les bactéries lactiques utilisent leurs enzymes protéolytiques afin d'utiliser les caséines du lait comme source d'azote. La masse moléculaire des caséines étant élevée, elles ne sont pas transportées à travers la paroi. Bien que la plupart des bactéries lactiques possèdent des enzymes protéolytiques, les leuconostocs n'ont pas d'activité protéolytique leur permettant de dégrader les caséines (BELLENGIER et coll., 1997; SERVER-BUSSON et coll., 1999). En absence de ces enzymes, les leuconostocs peuvent croître et acidifier modérément le lait en utilisant les petits peptides et les acides aminés libres (DEMIRCI et HEMME, 1995). EZZAT et coll., (1993) ont purifié et caractérisé une enzyme protéolytique d'une souche de *Ln. mesenteroides*. Cependant, malgré la présence de cette enzyme, la souche est incapable d'atteindre une population supérieure à 10^8 ufc/ml de lait.

2.2.3.2. Peptidases

La deuxième étape de l'utilisation de la caséine est la dégradation des oligopeptides libérés par l'action des protéases. Ce sont les endopeptidases ou les exopeptidases qui clivent les oligopeptides. Les endopeptidases clivent les oligopeptides de grande taille, alors que les exopeptidases clivent les peptides de plus petite taille (MONNET et coll., 1993). Ainsi, en fonction de leur spécificité, différentes peptidases ont été mises en évidence chez les bactéries lactiques et surtout chez *L. lactis* (MIERAU et coll., 1993 ; TAN et KONINGS, 1990 ; ZEVACO et coll., 1990 ; MARS et MONNET 1995 ; voir la revue de CHRISTENSEN et coll., 1999).

Contrairement aux lactocoques, le système peptidasique des leuconostocs a été relativement peu étudié. EZZAT et coll. (1994) ont rapporté la présence d'une X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase. Des activités aminopeptidasiques, dipeptidyl-aminopeptidasiques, endopeptidasiques, dipeptidasiques et carboxypeptidasiques ont été également détectées dans différentes souches de leuconostocs (VAFOPOULOU-MASTROJIANNAKI et coll., 1996a;

SERVER-BUSSON et coll., 1999; BELLENGIER et coll., 1997; EL-SHAFAEI et coll., 1990). Ces résultats montrent que les leuconostocs sont dotés d'activités peptidasiques comme d'autres bactéries lactiques. Mais à ce jour, aucune de ces enzymes n'a été purifiée et caractérisée. Aucun des gènes codant pour ces activités n'a été séquencé.

2.2.3.3. Transport des peptides et des acides aminés

Actuellement, les connaissances sur le système peptidasique des lactocoques suggèrent que toutes les peptidases sont localisées à l'intérieur des cellules. En conséquence, l'utilisation des peptides comme source d'azote est conditionnée par leur transport à travers la paroi bactérienne (TAN et coll., 1992; MIERAU et coll., 1993; MONNET et coll., 1993; voir aussi la revue de KONINGS et coll., 1994b). Les mécanismes impliqués dans le transport des acides aminés et des peptides ont été bien étudiés chez les lactocoques. Par contre, ils sont peu étudiés chez *Leuconostoc*. Une seule étude sur la caractérisation du transport des acides aminés chez les leuconostocs a été publiée (WINTERS et coll., 1991). Ces auteurs ont montré que la force proto-motrice était impliquée dans le transport de treize acides aminés à l'exception du tryptophane chez *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* CNRZ 1273. L'analyse de la cinétique du transport des acides aminés branchés a mis en évidence trois systèmes de transport secondaires ayant différentes affinités.

2.2.4. Catabolisme des acides aminés

Peu d'études ont été réalisées sur le catabolisme des acides aminés par les bactéries lactiques. Les données disponibles proviennent en grande partie de travaux réalisés chez *L. lactis*, la bactérie lactique modèle. La dégradation des acides aminés fait intervenir des réactions de transamination, désamination, décarboxylation, oxydation, etc. (ROUDOT-ALGARON et YVON, 1998) (figure 4). Les enzymes responsables de ces activités sont spécifiques soit d'un acide aminé donné, soit d'un groupe d'acides aminés. La dégradation des acides aminés, notamment les aromatiques ou ceux à chaîne latérale ramifiée, produit des composés d'arômes qui sont directement responsables de la saveur et de la flaveur des fromages. La transamination constitue la première étape de la dégradation des acides aminés aromatiques ou à chaîne ramifiée chez les lactocoques. L'aminotransférase majeure de *L. lactis* qui utilise comme substrats, les trois acides aminés aromatiques ainsi que la leucine et la méthionine a été purifiée et caractérisée (YVON et coll., 1997). La réaction de transamina-

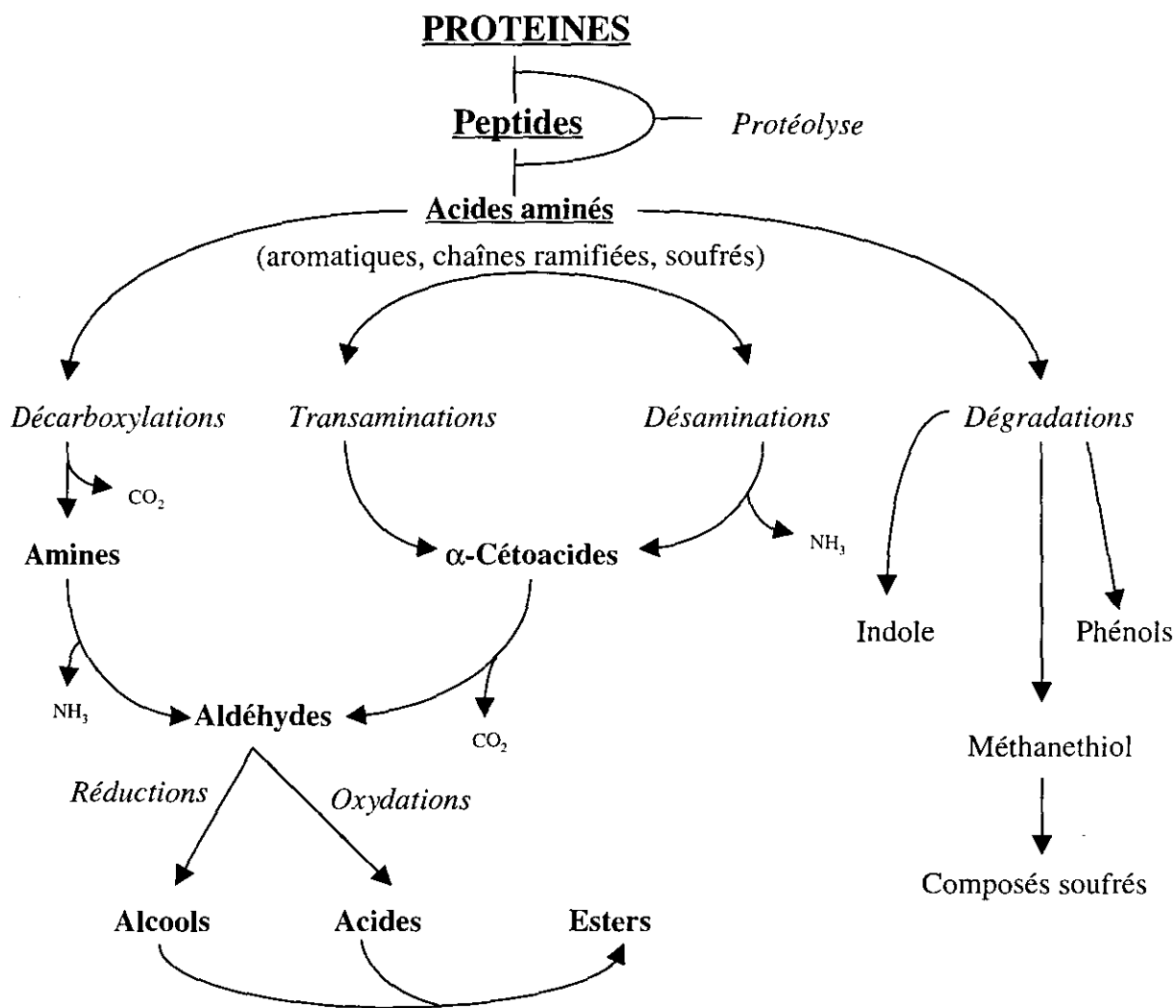


Figure 4 : Différentes voies possibles de la dégradation des acides aminés chez *L. lactis* (d'après ROUDOT-ALGARON et YVON, 1998).

tion nécessite la présence d'un cétoacide accepteur de groupements aminés. Ces cétoacides sont à leur tour dégradés par des deshydrogénases pour produire des acides (ROUDOT-ALGARON et YVON, 1998).

2.2.5. Métabolisme des lipides

Le métabolisme des lipides chez les bactéries lactiques a été peu étudié. Les enzymes identifiées sont regroupées en deux familles: les estérases et les lipases. TSUJITA et coll., (1990) ont défini trois caractéristiques pour distinguer ces deux types d'enzymes : la longueur du produit d'hydrolyse, la nature du substrat et les caractéristiques cinétiques de l'enzyme. Les estérases hydrolysent des lipides monomériques solubles et libèrent des acides gras de taille comprise entre deux et huit atomes de carbone. Elles ont une cinétique de type " michaelien ". Les lipases hydrolysent des lipides en émulsion et libèrent des acides gras à dix atomes de carbone ou plus. Elles sont actives uniquement au niveau des interfaces formés entre deux milieux, l'un hydrophobe et l'autre hydrophile.

Les études réalisées sur les activités lipolytiques des bactéries lactiques montrent qu'elles sont faibles par rapport à celles d'autres bactéries (UMEMOTO et coll., 1978; KAMALY et coll., 1990; KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1984). La lipolyse par les bactéries lactiques a donc probablement un rôle négligeable dans la fabrication des fromages. Des auteurs ont montré par la suite que le Cheddar fabriqué à partir de lait écrémé perdait son arôme naturel. En fait, les acides gras volatils à courtes chaînes carbonées, libérés suite à l'action des enzymes lipolytiques interviennent dans le développement de l'arôme de certains fromages. Plusieurs enzymes lipolytiques ont été identifiées dans diverses espèces de bactéries lactiques (HOLLAND et COOLBEAR, 1996; VAFOPOULOU-MASTROJIANNAKI et coll., 1996(b); CHICH et coll., 1997). Ces études montrent que ces enzymes ont des spécificités différentes et que plusieurs types d'enzymes sont produits par une même bactérie.

III- AUTOLYSE DES BACTERIES LACTIQUES AU COURS DE L'AFFINAGE DU FROMAGE

Comme nous l'avons décrit ci-dessus, les bactéries lactiques possèdent un ensemble d'enzymes cytoplasmiques telles que des peptidases, estérases, lipases, enzymes de conversion des acides aminés en arômes qui participent au phénomène d'affinage et au développement des qualités organoleptiques des fromages (VISSER, 1977; CHAPOT-

CHARTIER, 1996). Pour que ces enzymes puissent accéder à leurs substrats qui se trouvent à l'extérieur de la cellule, dans le caillé fromager, l'autolyse des bactéries, c'est à dire l'ouverture des cellules permettant la libération du contenu intracellulaire apparaît comme une étape nécessaire.

3.1. L'affinage des fromages

Au cours de l'affinage, les fromages acquièrent la texture et la flaveur qui font leur typicité. L'affinage est un phénomène très complexe, qui met en jeu de nombreuses réactions biochimiques. Bien que ce processus présente des variations en fonction du type de fromage considéré, les réactions généralement impliquées sont : la glycolyse, la protéolyse, la lipolyse et la conversion des acides aminés libres en composés d'arômes.

La protéolyse du lait puis du caillé est assurée tout d'abord par la chymosine présente dans la présure et par la plasmine, enzyme protéolytique endogène du lait. Les protéases des bactéries lactiques jouent par la suite également un rôle très important dans la dégradation de la caséine. Cependant, la dégradation excessive de celle-ci provoque l'accumulation de peptides contenant une proportion importante d'acides aminés hydrophobes responsables de défauts liés à l'amertume (LEMIEUX et SIMARD, 1991). La dégradation des peptides amers par des peptidases de bactéries lactiques permet la diminution de l'amertume et la formation d'acides aminés libres précurseurs de composés d'arômes.

3.1.1. L'accélération de l'affinage

Dès le début des années 1950, de nombreux travaux ont été menés afin de diminuer les coûts de production des fromages en réduisant la durée de l'affinage. Plus la durée d'affinage est longue et plus le coût de fabrication est élevé. En effet, ce dernier inclut alors des frais de stockage et de maintenance importants (FOX et coll., 1996). Différentes techniques ont été décrites pour accélérer l'affinage. Toutes visent à augmenter l'intensité des réactions biochimiques mises en jeu. Au cours des années 1975 à 1985, les études se sont focalisées plus particulièrement sur l'addition d'enzymes exogènes dans le lait ou dans le caillé et sur l'utilisation de cultures atténuées. Des levains, le plus souvent thermochoqués et possédant un potentiel protéolytique et peptidolytique, ont été utilisés (BIRKELAND et coll., 1992 ; EL-SODA 1993). L'application d'une température élevée au cours de l'affinage peut aussi diminuer sa durée (ASTON et coll., 1985). Enfin, une autre voie pour accélérer l'affinage est

l'utilisation de levains autolytiques qui peuvent libérer rapidement leur contenu enzymatique intracellulaire.

3.1.2. Les techniques de mise en évidence de la lyse bactérienne au cours de l'affinage

La mise en évidence de l'autolyse des bactéries dans le fromage est rendue difficile par la complexité et la nature solide du fromage. Plusieurs techniques ont été décrites et utilisées pour mettre en évidence la lyse des bactéries dans le fromage. Le dénombrement des bactéries viables sur milieux sélectifs est la plus simple. Cependant, les résultats obtenus ne sont pas toujours directement corrélés à la lyse puisque certaines cellules peuvent être à la fois, non-cultivables ou non-viables et non lysées. Pour que les résultats soient plus précis, cette technique doit être combinée avec d'autres.

La détection des enzymes intracellulaires libérées dans le fromage et utilisées en tant que marqueurs de lyse a été également proposée dans différentes études. Les enzymes choisies doivent être intracellulaires, assez stables dans le caillé au cours de l'affinage et dans le tampon d'extraction et suffisamment abondantes dans la cellule pour être détectées. L'extraction de ces enzymes à partir du fromage doit être réalisée soigneusement car au cours de cette étape, les enveloppes bactériennes peuvent aussi s'ouvrir et libérer des enzymes dont l'action va modifier les résultats d'évaluation de la lyse. Dans le cas de *L. lactis*, les auteurs ont choisi différents enzymes intracellulaires comme marqueurs : les aminopeptidases (CHAPOT-CHARTIER et coll., 1994; LEPEUPLE et coll., 1998b; MEIJER et coll., 1998; PILLIDGE et coll., 1998; BOUTROU et coll., 1998; CROW et coll., 1995), la lactate deshydrogénase (WILKINSON et coll., 1994a; MEIJER et coll., 1998), la glucose-6-phosphate deshydrogénase (WILKINSON et coll., 1994a et b, 1995), la fructose diphosphate aldolase (PILLIDGE et coll., 1998). Ces enzymes ont été dosées en général, par mesure de leur activité enzymatique.

L'utilisation de tests immunochimiques a également été proposée pour mettre en évidence la présence d'enzymes marqueurs de lyse (CHAPOT-CHARTIER et coll., 1994 ; VALENCE et coll., 1998).

D'autres auteurs ont cherché à détecter l'ADN libéré au cours de la lyse (OHMIYA et SATO, 1970; BIE et SJÖSTROM, 1975a et b). Cependant, la dégradation de l'ADN doit être prise en compte.

L'observation directe de la morphologie des cellules bactériennes par microscopie électronique sur des coupes de fromage permet de visualiser de manière directe l'état des cellules à l'intérieur du fromage (CHAPOT-CHARTIER et coll., 1994; LEPEUPLE et coll., 1998b; KAWABATA et coll., 1997). Elle permet de plus la mise en évidence des différents stades du processus d'autolyse. Elle reste cependant une technique lourde à mettre en œuvre.

Aucune de ces techniques, du fait de leurs limites, ne permet à elle seule une évaluation précise de la lyse. Pour mieux apprécier l'importance de l'autolyse bactérienne, il est donc judicieux de croiser les résultats obtenus en utilisant une combinaison de ces techniques.

3.1.3. Influence de la lyse sur l'affinage

La protéolyse est l'un des phénomènes les plus importants au cours de l'affinage du fromage. En plus des enzymes naturelles du lait et de celles apportées pour la coagulation, les enzymes bactériennes protéolytiques jouent un rôle clé pour le bon déroulement de ce phénomène. Etant donné la localisation intracellulaire de ces enzymes, la rupture de la paroi bactérienne par des enzymes lytiques est une étape nécessaire pour la libération de leur contenu dans le caillé. Les études portant sur différentes souches et sur l'addition de phages provoquant la lyse bactérienne dans le fromage ont permis de mettre en évidence que celle-ci s'accompagnait de l'intensification de la protéolyse et de la diminution de l'amertume du fromage (CHAPOT-CHARTIER et coll., 1994; CROW et coll., 1995; KAWABATA et coll., 1997; LEPEUPLE et coll., 1998b).

Dans une étude réalisée sur le fromage à pâte pressée non cuite de type Saint Paulin (CHAPOT-CHARTIER et coll., 1994), les auteurs ont testé la capacité de deux souches de lactococoques à se lyser au cours de l'affinage. Il a été montré que l'aptitude à la lyse de ces deux souches était différente. La souche *L. lactis* subsp. *cremoris* AM2 se lyse dès le début de l'affinage. Le phénomène est accompagné d'une augmentation de la concentration en acides aminés libres avec diminution de l'amertume. Par contre, la souche *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO763 ne montre pas de lyse et la quantité d'acides aminés libres était moindre par rapport à la souche AM2. Ensuite, il a été mis en évidence que la souche AM2 était lysogène. Le prophage était responsable de la lyse précoce de la souche. En comparant le comportement de la souche AM2 et celui d'une souche dérivée guérie de son prophage, LEPEUPLE et coll. (1998b) ont montré que la lyse et l'intensification de la protéolyse sont associées à ce prophage.

Des auteurs ont décrit une nouvelle méthode pour augmenter le taux de lyse bactérienne au cours de l'affinage du fromage Cheddar (MORGAN et coll., 1995). Ils ont utilisé la souche *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* DPC3286 productrice des bactériocines "lactococcins A, B et M" en mélange avec d'autres lactocoques sensibles. Lorsque cette souche est utilisée en culture mixte avec la souche *L. lactis* subsp. *cremoris* HP, une lyse et l'augmentation des acides aminés libres dans le fromage sont observées dès le début de l'affinage.

Ces études montrent l'influence de la lyse sur l'amélioration de la qualité des fromages. La sélection des souches en fonction de leur aptitude autolytique apparaît donc comme un facteur important.

IV. AUTOLYSE BACTERIENNE ET PEPTIDOGLYCANE HYDROLASES

L'autolyse désigne l'éclatement de la cellule sous l'action d'enzymes endogènes capables d'hydrolyser le peptidoglycane de la paroi de la bactérie. Ces peptidoglycane hydrolases (PGHs) sont également appelées autolysines. L'autolyse peut se déclencher en fin de phase exponentielle de croissance, en condition de privation nutritionnelle ou en présence de certains antibiotiques (SHOCKMAN et HOLTJE, 1994). L'autolyse résulte alors d'une action incontrôlée des peptidoglycane hydrolases.

4.1. Composition de la paroi bactérienne

L'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram positif est constituée principalement de la membrane cytoplasmique et de la paroi. Dans certains cas, on peut également observer une couche externe de protéines appelée couche S (S-layer) ou des polysaccharides capsulaires.

La paroi protège la cellule contre les variations osmotiques et concourt à sa forme caractéristique. Elle a une épaisseur de 20 à 50 nm et permet à la cellule d'être en contact avec le milieu extracellulaire. Elle est perméable à l'eau, aux sels minéraux et aux métabolites (ARCHIBALD et coll., 1993). Sa forme peut s'étendre ou se contracter en fonction du changement de pH ou de la force ionique du milieu (MARQUIS et CARSTENSEN, 1973). Chez les bactéries à Gram positif, la paroi est constituée de plusieurs composants : le peptidoglycane, les acides teichoïques et lipoteichoïques, les protéines et les polysaccharides accessoires (figure 5) (voir la revue de DELCOUR et coll., 1999).

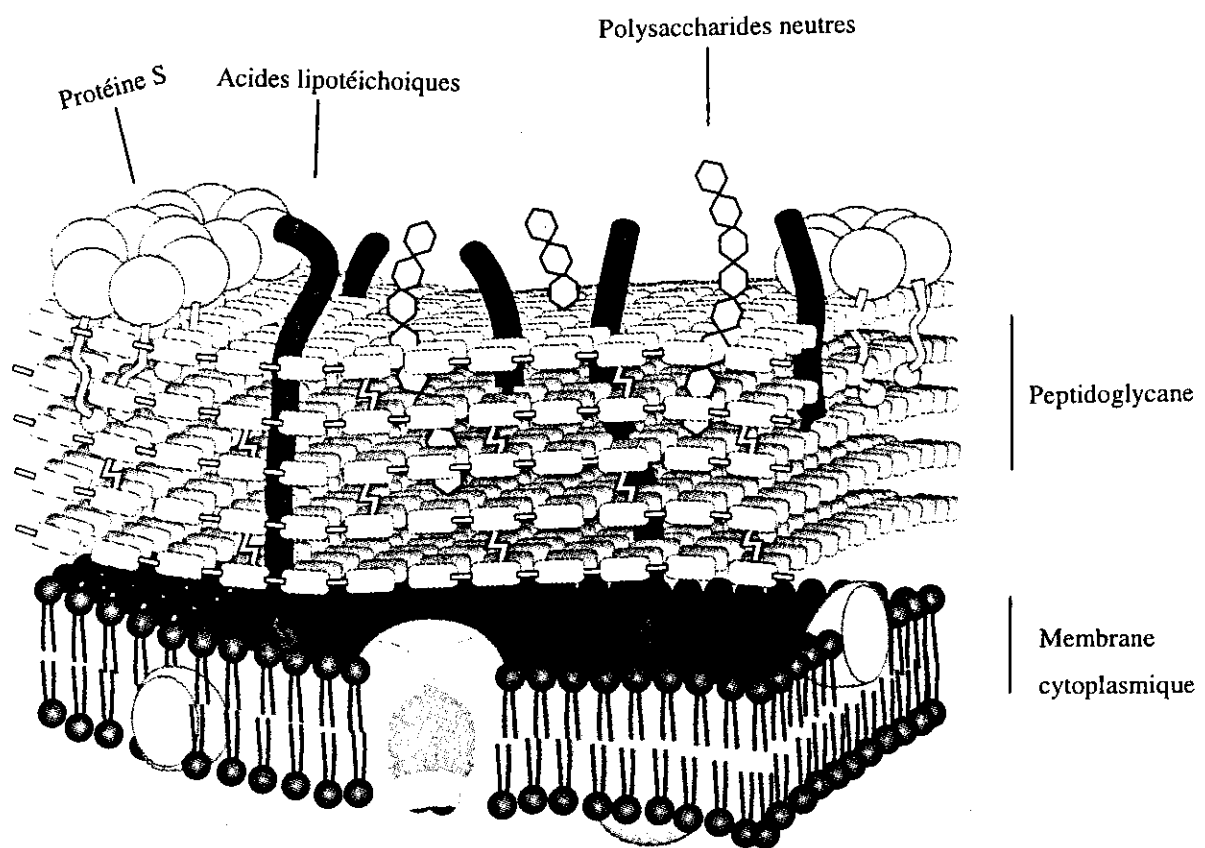


Figure 5. Schéma de la structure de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram positif (d'après Delcour et coll., 1999).

Le peptidoglycane, également appelé muréine, constitue un réseau dense régulier autour de la cellule et en assure l'intégrité structurale. Il est le principal composant de la paroi (50 à 80 % en poids sec). Il est constitué de chaînes linéaires de glycanes composées d'un enchaînement d'acides N-acétyl muramiques et de N-acétylglucosamine associés par des liaisons glycosidiques β -1,4. Les chaînes de glycane sont aussi reliées entre elles par des ponts peptidiques. Alors que les chaînes de glycane assurent la solidité de la paroi, les ponts peptidiques, par leur flexibilité, assurent la structure élastique de celle-ci (ARCHIBALD et coll., 1993). Chez les bactéries à Gram-positif, le tetrapeptide est composé généralement des acides aminés placés dans l'ordre suivant : L-Ala-D-Glu-X-D-Ala. La troisième acide aminé est un diaminoacide spécifique de l'espèce. Les *Leuconostocs* et certains lactobacilles (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*) contiennent également un D-lactate après le D-Alanine pour former un pentapeptide. Ce dernier assure la résistance naturelle de ces souches à la vancomycine (BILLOT-KLEIN et coll. 1994; DELCOUR et coll., 1999). La séquence du pont peptidique peut également servir de marqueur taxonomique (SCHLEIFER et KANDLER, 1972; ROGERS et coll. 1980). La nature de ce pont chez *Leuconostoc* est indiquée dans la figure 6.

Les acides téichoïques sont des polymères polyanioniques également présents dans la paroi. Ils sont composés de poly-glycérol phosphates, de poly-ribitol phosphates ou de poly-glucosyl phosphates auxquels sont fréquemment attachés différents sucres (glucose, galactose) et de l'alanine (SHOCKMAN et BARRET, 1983). Ils sont présents dans de nombreuses bactéries à Gram-positif et constituent environ 10 % du poids sec cellulaire. Ils sont attachés de manière covalente à l'acide N-acétylmuramique du peptidoglycane par une liaison phosphodiester. Leur aptitude à fixer les cations semble jouer un rôle de protection des cellules contre les effets toxiques de certains métaux (ARCHIBALD, 1993).

Les acides lipoteichoïques sont quant à eux, attachés à la surface extérieure de la membrane cytoplasmique par leur partie lipidique. Le polymère traverse le peptidoglycane et s'étend à la surface cellulaire. Leur fonction exacte n'est pas encore bien définie (NAVARRE et SCHNEEWIND, 1999).

La paroi bactérienne contient également des protéines associées. Généralement, les parois des bactéries à Gram positif contiennent moins de protéines que celles des bactéries à Gram négatif.

4.2. Les peptidoglycane hydrolases (PGH)

4.2.1. Les différents types de PGHs

Les autolysines ont été classées en fonction de leur spécificité d'hydrolases au sein du peptidoglycane (GHUYSEN, 1968 ; SHOCKMAN et BARRET 1983) (figure 6). Les N-acétylmuramidases (lysozymes) hydrolysent les liaisons β 1-4 entre l'acide N-acétylmuramique et la N-acétylglucosamine. Les β -N-acétylglucosaminidases hydrolysent les liaisons β 1-4 entre la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique. Les N-acétylmuramyl-L-alanine amidases (amidases) hydrolysent les liaisons entre le groupement lactyl de l'acide muramique et le groupement α -aminé de la L-alanine qui est le premier acide aminé du pont peptidique. Les peptidases hydrolysent les chaînes peptidiques principales ou les ponts interchaînes reliant les chaînes de glycanes.

4.2.2. Localisation des PGHs

Dans la mesure où le substrat des autolysines se trouve à l'extérieur de la membrane cytoplasmique, ces enzymes doivent passer à travers celle-ci pour l'atteindre. Ainsi, la plupart des autolysines possèdent un peptide signal permettant leur exportation (NAVARRE et SCHNEEWIND 1999).

4.2.3. Rôle physiologique des autolysines

Chez plusieurs espèces bactériennes, il a été montré que l'activité autolytique était maximale lors de la phase exponentielle de croissance. Malgré les diverses études réalisées pour comprendre les rôles des autolysines, enzymes potentiellement dangereuses pour la cellule, ceux-ci ne sont pas complètement élucidés. Cela est sans doute lié à la complexité des phénomènes mis en jeu. Les peptidoglycane hydrolases seraient ainsi impliquées dans la croissance de la bactérie, la séparation des cellules en fin de division, le renouvellement du peptidoglycane et son recyclage, la morphogenèse des flagelles, la transformation de cellules compétentes, la formation et la germination des spores (SHOCKMAN et HÖLTJE, 1994).

L'un des rôles les plus importants des autolysines est associé à la croissance de la cellule bactérienne. En réalisant des coupures au sein du peptidoglycane, cette enzyme permet d'abord la formation des pores au niveau du peptidoglycane puis l'insertion des nouveaux matériaux synthétisés (HÖLTJE et TUOMANEN; 1991; CHAPOT-CHARTIER, 1996; HÖLTJE, 1998). L'hydrolyse du peptidoglycane s'effectue au niveau de "points clés" de

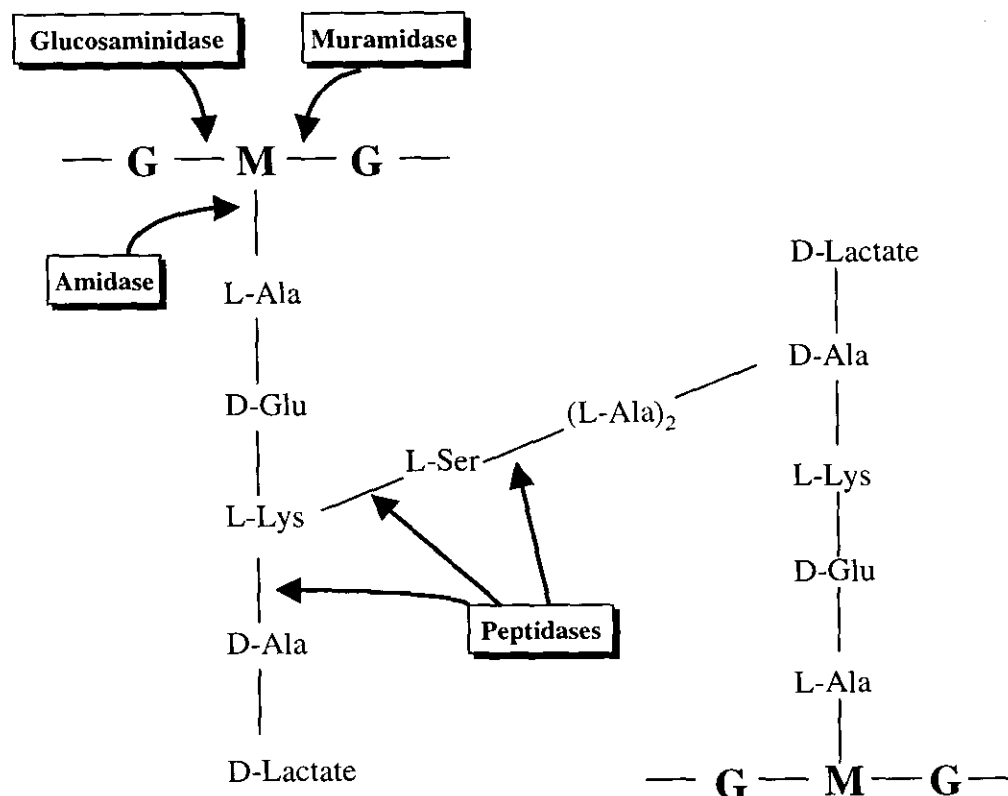


Figure 6 : Schéma de la structure du peptidoglycane de *Leuconostoc mesenteroides* et spécificité des autolysines. Le peptidoglycane est formé de chaînes de polysaccharides composées de N-acétylglucosamine (G) et d'acide N-acétylmuramique (M) liés par des liaisons glycosidiques β -1,4. Sur cette chaîne de polysaccharides sont fixées de manière covalente, des chaînes composées de L-Ala, D-Glu, L-Lys, D-Ala et D-Lac, dont certaines sont reliées entre elles par l'intermédiaire de L-Ser et (L-Ala)₂. Les sites de coupure des différentes classes d'autolysines sont indiquées sur le schéma (d'après CHAPOT-CHARTIER et coll. 1996).

manière à créer des sites accepteurs pour les nouvelles sous-unités de peptidoglycane synthétisées.

Les gènes codant pour différentes PGHs sont maintenant clonés et séquencés (SHOCKMAN et HÖLTJE, 1994 ; CHAPOT-CHARTIER 1996). L'inactivation de ces gènes a permis d'appréhender expérimentalement le rôle de certaines PGHs. L'implication des PGHs dans le processus de séparation cellulaire après la division a été mise en évidence chez différentes bactéries. Chez *L. lactis* en particulier, l'inactivation de l'enzyme majeure *Acma* conduit à la formation de longues chaînettes de cellules (BUIST et coll., 1995). KANEDA (1997) a muté une souche de *Staph. aureus* avec la N-méthyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. Le mutant forme des ensembles composés de 8 à 64 cellules alors que la souche sauvage présente des cellules individuelles, des doublets ou de courtes chaînettes. En microscopie électronique, le mutant présente une paroi plus épaisse par rapport à celle des cellules sauvages indiquant un défaut de rupture et de libération du peptidoglycane.

Chez *Bacillus subtilis*, au moins sept gènes codant pour des PGHs ont été caractérisés. L'inactivation de chacun d'entre eux ou de plusieurs simultanément a permis de mettre en évidence différentes fonctions de ces enzymes. L'absence de l'amidase majeure *CwlB* se traduit par une résistance accrue des cellules à la lyse, une différence dans le taux de renouvellement du peptidoglycane et dans la mobilité cellulaire (KURODA et SEKIGUCHI, 1991; MARGOT et KARAMATA, 1992). Cependant, ces études font également apparaître une difficulté pour étudier le rôle de ces enzymes. En effet, certains mutants présentant jusqu'à quatre gènes inactivés, ne sont pas altérés dans leur croissance. Ceci suggère que la cellule dispose de PGHs dont les activités se recouvrent (FOSTER, 1991). Chez *Salmonella typhimurium*, la protéine flagellaire *FlgJ* présente une homologie avec le domaine catalytique de certaines muramidases et possède une activité peptidoglycane hydrolase. Elle est impliquée dans le développement et le transport des flagelles à travers la couche de peptidoglycane (NAMBU et coll., 1999).

Chez les bactéries pathogènes, les autolysines peuvent, dans certains cas, jouer un rôle dans la virulence. L'autolysine majeure de *Str. pneumoniae* (*lytA*) est considérée comme un important facteur de virulence (WHATMORE, 1999). De plus, les produits de dégradation du peptidoglycane suite à l'action des autolysines, se sont révélés être fortement impliqués dans certaines conditions dans les mécanismes de réactions inflammatoires (TUOMANEN, 1985 ; SATO et coll. 1996). Par ailleurs, il a été montré que la *N*-acétyl-glucosaminidase de *Staph. aureus* a une influence fortement dépressive sur le système immunitaire de la souris (VALISENA et coll., 1991).

4.2.4. Organisation structurale des PGHs

Plusieurs gènes codant pour des PGHs ont été clonés et bien caractérisés chez différentes espèces de bactéries à Gram positif. Les produits de ces gènes ont des tailles très variables (voir les revues de SHOCKMAN et HÖLTJE, 1994 et de CHAPOT-CHARTIER, 1996). Cependant, en général ces autolysines ont en commun, une organisation modulaire avec deux domaines. L'un porte l'activité catalytique et l'autre le site de liaison à la paroi. Le domaine de liaison à la paroi comprend 2 à 6 répétitions d'un motif d'acides aminés qui peut aller de 20 à 150 résidus. Ces répétitions sont reliées entre-elles par des séquences charnières qui n'interviennent pas dans la liaison.

La fonction de ces domaines a été précisée par des études réalisées chez *Str. pneumoniae*. Ces protéines se fixent sur des ligands par l'intermédiaire de leurs séquences répétées (WREN, 1991). Le rôle des séquences répétées des autolysines dans la fixation au substrat a été confirmé par la suite, par des expériences de délétions et de fusions de protéines. Il a été montré que l'activité des autolysines Cpl1, Cpl17 (muramidases) et LytA (amidase) de *Str. pneumoniae*, délétées de leurs séquences répétées, était plus faible que celle des enzymes complètes (SANZ et coll., 1992). Des résultats similaires ont été obtenus avec la protéine AcmA, autolysine majeure de *L. lactis*. La délétion des trois motifs répétés dans la région C-terminale abolit totalement la fixation de cette enzyme à la paroi de la bactérie. Cependant, celle-ci conserve une activité significative *in vitro* (BUIST, 1997b).

Des expériences de fusion de protéines ont également été réalisées pour identifier le rôle des différents domaines constituant les autolysines. CROUX et coll. (1993a) ont réalisé une fusion entre les autolysines Lyc de *Clostridium acetobutylicum* et Cpl1 de *Str. pneumoniae*. Les domaines N-terminaux où résident les activités catalytiques de ces deux enzymes, sont très homologues. Les enzymes diffèrent au niveau de leurs domaines C-terminaux qui portent les sites de fixation au substrat. La protéine de fusion contenant le domaine catalytique de Lyc et le domaine C-terminal de Cpl1 est capable d'hydrolyser la paroi de *Str. pneumoniae* et non celle de *Cl. acetobutylicum*. Ce résultat montre le rôle du domaine C-terminal de la protéine Cpl1 dans la fixation au substrat. De même, la partie N-terminale de LytA, une amidase de *Strep. pneumoniae*, fusionnée avec le domaine C-terminal de Lyc (une muramidase) possède une activité amidasique et est capable d'hydrolyser la paroi de *Cl. acetobutylicum* (CROUX et coll. 1993b).

Chez *Staphylococcus aureus*, une autolysine (Atl) ayant à la fois une activité amidase et glucosaminidase est codée par un gène monocistronique (OSHIDA et coll., 1995). Cette autolysine est synthétisée sous forme de précurseur portant les activités amidase et glucosaminidase respectivement aux extrémités N et C-terminales. La région centrale contient trois répétitions d'acides aminés. Après sa synthèse, le précurseur est dirigé vers la surface cellulaire. Par la suite, un clivage au niveau de la région centrale libère la partie amidase et deux répétitions à son extrémité C-terminale. La partie glucosaminidase est libérée avec une répétition à son extrémité N-terminale.

L'activité des autolysines, pour être complète, nécessite la fixation de l'enzyme à son substrat. Au plan évolutif et compte tenu de la distinction structurale et fonctionnelle des deux domaines des autolysines, il a été proposé que les séquences codant pour ces enzymes dérivent de deux gènes indépendants à l'origine. Ces gènes auraient ensuite fusionné pour permettre une meilleure fixation au substrat et le bon positionnement du site actif de l'enzyme.

4.3. Autolyse des bactéries lactiques

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour étudier les propriétés autolytiques ou détecter la présence d'activités autolytiques chez les bactéries lactiques : i) le suivi de la lyse spontanée des cellules en milieu de culture, ii) la lyse induite par le transfert des cellules en solution tamponnée et iii) la détection des autolysines par la technique d'électrophorèse renaturante. A l'heure actuelle, encore très peu d'enzymes ont été caractérisées au niveau moléculaire chez ces bactéries.

4.3.1. Lyse spontanée en milieu de culture

L'autolyse de différentes souches de bactéries lactiques telles que *L. lactis*, *Str. thermophilus* et différentes espèces de lactobacilles a été étudiée en milieu de croissance (LANGSRUD et coll., 1987 ; VEGARUD et coll., 1983 ; HUSSON KAO et coll., 2000 ; RIEPE et coll., 1997 ; VALENCE et coll., 1998). Ces expériences ont mis en évidence la variabilité du comportement autolytique entre les souches ainsi que l'influence de la composition du milieu de croissance sur l'autolyse. Celle-ci se traduit par une diminution de la densité optique de la culture après la phase exponentielle de croissance. Chez *Str. thermophilus* (HUSSON KAO et coll., 2000) ou *L. lactis* (RIEPE et coll., 1997), la courbe de croissance de certaines souches particulièrement autolytiques présente une forme en cloche,

témoin d'une lyse rapide et massive des cellules. Les souches non autolytiques, quelque soit l'espèce, ne se lysent pas ou se lysent progressivement après plusieurs jours d'incubation (VEGARUD et coll., 1983 ; LANGSRUD et coll., 1987).

L'influence de la source de carbone présente dans le milieu de culture sur l'autolyse a été étudiée par différents auteurs. RIEPE et coll., (1997) ont montré que le caractère autolytique de certaines souches de *L. lactis* était plus prononcé lorsque le glucose, par rapport à d'autres sources de carbone, était présent dans le milieu de culture. Des résultats similaires ont été obtenus avec la souche *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L (voir le chapitre II de la deuxième partie de ce manuscrit). Pour cette dernière, la lyse la moins importante est obtenue lorsqu'elle est cultivée dans un milieu contenant du galactose ou du lactose. MOUSTAFA et COLLINS (1968) ont suggéré que les cellules de *Str. diacetylactis* cultivées dans un milieu contenant du glucose deviennent plus fragiles et se lysent immédiatement après l'arrêt de la croissance. Selon ces auteurs, la fragilité des cellules résulterait de leur incapacité à utiliser le glucose comme précurseur de la galactosamine, molécule entrant dans la composition des acides teichoïques. Chez *Str. thermophilus*, les cellules cultivées dans un milieu contenant du saccharose deviennent résistantes à la lyse (SANDHOLM et SARIMO 1981). Ce phénotype n'a pas été observé chez *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L. En effet, la lyse en présence de saccharose était supérieure à celle obtenue dans un milieu contenant du lactose ou du galactose (Chapitre II de la deuxième partie de ce manuscrit).

4.3.2. Lyse induite par le transfert des cellules en solution tamponnée

Des conditions de privation nutritionnelle telles que le transfert des cellules en culture dans une solution tamponnée peut induire l'autolyse. Cette approche est simple à mettre en œuvre et permet de comparer en même temps plusieurs souches dans les mêmes conditions. Différents paramètres comme le pH, la phase de croissance, la température d'incubation, les ions présents etc., influençant l'aptitude à l'autolyse, peuvent également être étudiés dans ce système.

L'aptitude des bactéries à se lyser dans un tampon dépend fortement de leur état physiologique. Plusieurs études ont montré que l'activité autolytique était optimale lorsque les cellules étaient récoltées en phase exponentielle de croissance. C'est le cas des lactocoques (MOU et coll., 1976; RIEPE et coll., 1997; NISKASAARI, 1989), de *Lb. acidophilus* (COYETTE et GHUYSEN 1970; COYETTE et SHOCKMAN, 1973), de *Lb. bulgaricus* et de *Lb. casei* (KANG et coll., 1998; El-SODA et coll., 1995). Chez *Lb. acidophilus* CRL 640

FERNANDEZ MURGA et coll., (1995) ont rapporté que l'autolyse était maximale lors de la phase exponentielle de croissance mais également lors de la phase transitoire entre la phase exponentielle et la phase stationnaire. Ce résultat suggère la présence d'au moins deux autolysines dans cette souche. De même chez *Lb. helveticus*, une activité autolytique optimale a été décrite en phase transitoire pour la souche CNRZ 414 (LORTAL et coll., 1989) et en phase exponentielle de croissance pour la souche ISLC5 (VALENCE et LORTAL, 1995).

Ces différentes études ont mis en évidence également l'effet de la température, du pH et de la concentration en différents cations. Généralement, pour chaque espèce étudiée, les températures optimales de croissance et d'autolyse sont identiques. L'activité autolytique maximale des lactocoques est comprise entre pH 6,0 et 8,5 (OSTLIE et coll., 1995a). Celles de *Lb. helveticus* et *Lb. acidophilus* sont comprises entre pH 5,0 et 7,0 (OHMIYA et SATO, 1969; LORTAL et coll., 1989 et 1991). Chez *L. lactis*, l'activité augmente en présence d'ions Mg^{2+} , elle est inhibée en présence des cations Cu^{2+} et Co^{2+} (OSTLIE et coll., 1995a; RIEPE et coll., 1997).

De manière générale, l'autolyse en solution tamponnée observée pour les lactobacilles est supérieure à celle des lactocoques et des leuconostocs.

4.3.3. Détection et caractérisation des activités autolytiques en gel d'électrophorèse renaturante

La technique d'électrophorèse renaturante a été décrite pour la première fois par POTVIN et coll. (1988). Il s'agit d'un gel d'électrophorèse SDS-PAGE contenant un substrat de PGH tel que des cellules bactériennes autoclavées ou des parois autoclavées. Les cellules autoclavées de microcoques sont souvent incorporées dans le gel (OSTLIE et coll., 1995b; VALENCE et LORTAL, 1995; RIEPE et coll., 1997; LEPEUPLE et coll., 1998a). Après migration, le gel est lavé dans de l'eau distillée pour éliminer le SDS; les protéines sont renaturées dans un tampon contenant du Triton X100. Les autolysines peuvent alors hydrolyser leur substrat. La présence de l'activité se traduit par l'apparition d'une bande translucide sur un fond opaque. La technique permet d'étudier les facteurs influençant la renaturation de l'enzyme. L'effet de différents paramètres tels que la phase et la température de croissance ou la présence d'ions peut être étudié pour mieux caractériser le système autolytique. La technique d'électrophorèse renaturante permet aussi la détection simultanée de plusieurs activités autolytiques présentes dans une même souche. Chez *L. lactis*, plusieurs bandes avec une taille et une intensité différentes ont été obtenues. La présence de plusieurs

bandes d'activité autolytique peut être liée à l'existence de plusieurs formes dégradées actives de l'enzyme. Cette hypothèse est suggérée par les résultats de BUIST et coll. (1995). En étudiant le profil obtenu par électrophorèse renaturante d'un mutant de *L. lactis* MG1363 délété du gène *acmA*, ces auteurs ont montré que l'ensemble des bandes (celle à 46 kDa et les autres) ne sont plus visibles sur le gel. Dans le cas de la souche autolytique *L. lactis* 2250, l'existence d'une seconde peptidoglycane hydrolase de 14 kDa a été mise en évidence (RIEPE et coll. 1997).

Chez *Lb. helveticus*, la technique a permis de révéler une bande majeure de 42 kDa et six autres bandes de poids moléculaires compris entre 29 et 33 kDa en utilisant les microcoques ou les lactobacilles comme substrats. Une autre bande de 37,5 kDa a été détectée lorsque la paroi de cette bactérie est incorporée dans le gel comme substrat (VALENCE et LORTAL 1995).

Récemment, des auteurs ont utilisé cette technique comme moyen d'identification des lactobacilles par comparaison de leurs profils autolytiques (LORTAL et coll., 1997). Ils ont observé que les profils étaient similaires à l'intérieur d'une même espèce et que chaque espèce présente un profil spécifique.

4.3.4. Les PGHs des bactéries lactiques

4.3.4.1. AcmA, l'autolysine majeure chez *L. lactis*

La première enzyme de PGHs caractérisée au niveau moléculaire est AcmA, l'autolysine majeure de *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (BUIST 1997a). La protéine possède une masse moléculaire de 46 kDa. Elle est composée de deux régions : la région N-terminale et la région C-terminale. La région N-terminale est le domaine catalytique de la protéine. Elle contient 218 acides aminés. Les premiers 57 acides aminés constituent le peptide signal. La région C-terminale est le domaine de fixation de la protéine à la paroi. Elle est constituée de trois répétitions homologues. Il a été montré que la masse moléculaire de la protéine diminue lorsque l'on élimine les répétitions. La mutation du gène *acmA* confirme qu'il est bien le gène majeur de l'autolyse de cette souche et qu'il assure la séparation des cellules (BUIST et coll., 1995).

4.3.4.2. Autres PGHs

Peu de PGHs de bactéries lactiques sont caractérisées au niveau moléculaire excepté AcmA. Récemment, deux autres PGHs présentant des homologies de séquence avec le domaine catalytique de AcmA, ont été identifiées chez *Str. thermophilus* (HUSSON KAO 1999) et chez *Ln. citreum* (Chapitre II de la deuxième partie de ce manuscrit). Les deux enzymes présentent la particularité de ne pas posséder de régions répétées ni de domaine spécifique de liaison à la paroi. Leur rôle dans la cellule n'est pas connu actuellement.

V. LES SYSTEMES DE LYSE INDUCTIBLE CHEZ LES BACTERIES LACTIQUES

L'identification des gènes codant pour des autolysines ou des protéines de lyse de bactériophages ainsi que les promoteurs inductibles, a permis de construire des systèmes de lyse inductible de façon contrôlée. Cette approche consiste à cloner des gènes impliqués dans la lyse sous le contrôle d'un promoteur inductible. Pour que le système puisse être utilisé pour lyser les bactéries dans le fromage, les promoteurs choisis doivent être inductibles par des facteurs ou molécules compatibles avec une utilisation alimentaire et la technologie fromagère. Différents promoteurs ont été isolés pour être utilisés à cette fin : promoteurs inductibles par l'addition de nisine (De RUYTER et coll., 1997), par l'addition de NaCl (SANDERS et coll., 1997), par un choc thermique chaud (NAUTA et coll., 1997) ou froid (CHAPOT-CHARTIER et coll., 1997).

Actuellement, le système le plus efficace développé chez *L. lactis* est celui inductible par la nisine, peptide antimicrobien accepté en agro-alimentaire (KUIPERS et coll., 1995; De RUYTER et coll., 1996). Des quantités sub-inhibitrices de nisine peuvent induire la transcription des gènes clonés sous le contrôle du promoteur du gène *nisA* codant pour le précurseur de la nisine (figure 7). La régulation du promoteur *nisA* est assurée par un système d'auto-régulation constitué i) du gène *nisK* qui fonctionne comme un senseur en détectant la présence de la nisine dans le milieu et ii) du gène *nisR* qui agit comme activateur de la transcription du gène codant pour le précurseur de la nisine. Il a été montré que ce promoteur peut être également utilisé avec d'autres bactéries d'intérêt industriel comme *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* (KLEEREBEZEM et coll., 1997; EICHENBAUM et coll., 1998).

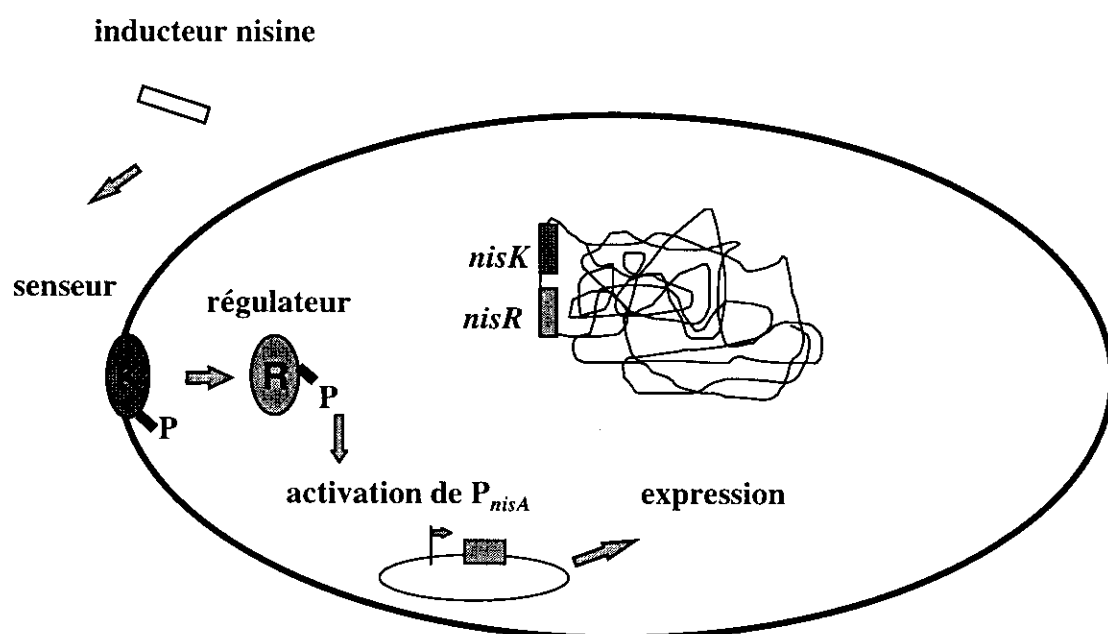


Figure 7 : Le système d'expression inductible par la nisine. NisK détecte la présence de la nisine dans le milieu et s'autophosphoryle. Ensuite, le groupement phosphorylé est transféré à NisR qui agit comme activateur du promoteur $nisA$ (P_{nisA}).

De RUYTER et coll. (1997) ont testé le promoteur *nisA* pour induire la lyse bactérienne dans un fromage modèle. Pour ce faire, ils ont placé les gènes *lytA* et *lytH* codant respectivement pour la lysine et la holine du bactériophage du lactocoque ϕ US3, sous le contrôle du promoteur *nisA*. L'induction a été faite dans le milieu de culture et dans le caillé par l'addition de nisine pure. Quatre jours après l'induction, l'activité intracellulaire L-lactate deshydrogénase mesurée dans le caillé était quatre fois supérieure à celle du témoin confirmant la lyse des bactéries, donc la fonctionnalité du système.

MATERIEL ET METHODES

I- TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE

1.1. Matériel biologique

1.1.1. *Leuconostocs*

Les souches utilisées dans cette étude sont répertoriées dans les tableaux 4a et 4b. La majorité des souches de *Leuconostoc* a été isolée dans notre laboratoire par J.-J. DEVOYOD, entre 1974 et 1990, à partir de divers fromages français fabriqués au lait cru, de lait ou d'équipements utilisés. Les souches-type ont été fournies par le laboratoire de microbiologie de l'Université de Gand (Belgique). Les souches sont cultivées à 30°C en milieu MRS (De MAN et coll., 1960) et éventuellement réisolées sur le même milieu contenant 12 g/l d'agar. Les souches sont conservées à -80°C dans le milieu MRS contenant 15 % de glycérol (v/v).

Les études de croissance en présence de différents sucres ont été réalisées dans des tubes contenant 9 ml de milieu MRS reconstitué (sans sucres) et 1 ml d'une solution à 50 g/l contenant la source de carbone à tester. Les solutions d'arabinose, de tréhalose et de fructose sont préparées dans l'eau distillée et stérilisées à l'aide d'un filtre 0,45 µm (Millipore). Les milieux sontensemencés avec une culture en fin de phase exponentielle de croissance à raison de 0,5 %. Les résultats sont lus après 24 h et 48 h d'incubation à 30°C.

La production de dextrane à partir de saccharose a été testée sur le milieu MSE agar (MAYEUX et coll., 1962) contenant 100 g/l de saccharose. Les boîtes sontensemencées avec une culture en MRS diluée de manière à obtenir des colonies isolées et incubées à 30°C pendant 48 h dans des jarres anaérobies. La production de dextrane est observée par formation de colonies d'aspect visqueux.

1.1.2. *Lactocoques*

La souche *L. lactis* MG1363 délétée au niveau du gène majeur d'autolyse *acmA* et la souche *L. lactis* NZ9000 productrice de nisine ont été fournies par Girbe BUIST et Oscar KUIPERS du NIZO (Pays Bas). Les souches *L. lactis* IL1403 et NCDO763 ont été fournies par Marie-Pierre CHAPOT CHARTIER de l'Unité de Recherches et Biochimie des Protéines de l'INRA (Jouy-en-Josas). Elles sont cultivées à 30°C en milieu M17 (TERZAGHI et SANDINE,

Tableau 4a. Liste des 250 souches de bactéries lactiques utilisées au cours de ce travail

Espèce moléculaire	Phénotype	Numéro d'origine	Numéro CNRZ	Origines
<i>Ln. citreum</i> (ex- <i>Ln. amelibiosum</i>)	<i>mesenteroides</i>	2G		Chèvre Charollais
	<i>mesenteroides</i>	2J		Chèvre Charollais
	<i>mesenteroides</i>	9E		Lait pour Reblochon
	<i>mesenteroides</i>	9L		Lait pour Reblochon
	<i>dextranicum</i>	15B		Pont l'Evêque
	<i>dextranicum</i>	15C		Pont l'Evêque
	<i>dextranicum</i>	22N	1476	Roquefort (accident fabric.)
	<i>mesenteroides</i>	22P	1477	Roquefort (accident fabric.)
	<i>dextranicum</i>	22R	1478	Roquefort (accident fabric.)
	<i>mesenteroides</i>	47S	1449	Fromage de l'Arrière
	<i>mesenteroides</i>	48H	1466	fromage de chèvre
	<i>mesenteroides</i>	48I	1452	Fromage de l'Arrière
	<i>mesenteroides</i>	48J	1451	Fromage de l'Arrière
	<i>mesenteroides</i>	48K	1467	Fromage de l'Arrière
	<i>mesenteroides</i>	48M	1448	Fromage de l'Arrière
	<i>mesenteroides</i>	48S	1461	betterave à sucre
	<i>mesenteroides</i>	50A	1766	Caillé Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	50D	1767	Caillé Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	50E	1768	Caillé Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	50L	1771	Caillé Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	50N	1773	Caillé Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	50T	1792	Caillé Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	51C	1778	Caillé Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	51Np		Caillé Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	54K	1800	Sérum Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	54L	1693	Sérum Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	54N	1802	Sérum Crottin de Chavignol
	<i>W. paramesenteroides</i>	1984		Jus de canne à sucre (Antilles)
	<i>mesenteroides</i>	LMG9824 ^T		
<i>Ln. citreum</i>	<i>mesenteroides</i>	LMG9849 ^T		
<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>mesenteroides</i>	6M		Halloumi
	<i>mesenteroides</i>	6N		Halloumi
	<i>mesenteroides</i>	6O		Halloumi
	<i>mesenteroides</i>	6P		Halloumi
	<i>mesenteroides</i>	10F	1810	Reblochon
	<i>mesenteroides</i>	10G		Reblochon
	<i>mesenteroides</i>	11E		Reblochon
	<i>mesenteroides</i>	15J		Abbaye d'Entrames
	<i>mesenteroides</i>	16	1747	
	<i>mesenteroides</i>	18C	1020	Caillé de Cantal fermier
	<i>mesenteroides</i>	18E		Roquefort
	<i>mesenteroides</i>	18F		Lait de gerle
	<i>mesenteroides</i>	18J		Lait de Cantal laitier
	<i>mesenteroides</i>	18K	1019	Lait de gerle
	<i>mesenteroides</i>	18L		Lait de gerle
	<i>mesenteroides</i>	18O		Cantal fermier de 2 mois
	<i>mesenteroides</i>	18P	1473	Cantal fermier de 2 mois
	<i>mesenteroides</i>	18R		Cantal fermier de 2 mois
	<i>mesenteroides</i>	18T		Cantal fermier de 1 mois
	<i>mesenteroides</i>	18U		Gerle
	<i>mesenteroides</i>	19B	1024	Gerle

Espèce moléculaire	Phénotype	Numéro d'origine	Numéro CNRZ	Origines
<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>mesenteroides</i>	19C		Gerle
	<i>mesenteroides</i>	19E		Gerle
	<i>mesenteroides</i>	19F		Gerle
	<i>mesenteroides</i>	19G		Gerle
	<i>mesenteroides</i>	19H		Caillé de Salers
	<i>mesenteroides</i>	19J		Caillé de Salers
	<i>mesenteroides</i>	19K		Salers de 2 mois
	<i>mesenteroides</i>	19M		Laguiole de 2 mois
	<i>mesenteroides</i>	19N		Laguiole de 2 mois
	<i>mesenteroides</i>	19P		Laguiole de 2 mois
	<i>mesenteroides</i>	19R		Laguiole de 2 mois
	<i>mesenteroides</i>	20	1750	
	<i>mesenteroides</i>	20A		Gerle de St Nectaire
	<i>mesenteroides</i>	20B		Gerle de St Nectaire
	<i>mesenteroides</i>	20C		Gerle de St Nectaire
	<i>mesenteroides</i>	20E		Cantal laitier
	<i>mesenteroides</i>	20F	1027	Gerle
	<i>mesenteroides</i>	20H		Gerle
	<i>mesenteroides</i>	20I	1804	Gerle
	<i>mesenteroides</i>	20J		Gerle
	<i>mesenteroides</i>	20K		Cantal fermier de 1 mois
	<i>mesenteroides</i>	21	1751	
	<i>mesenteroides</i>	23	1753	
	<i>mesenteroides</i>	23A	1479	Roquefort de 8 jours
	<i>mesenteroides</i>	23C	1480	Caillé de Roquefort
	<i>mesenteroides</i>	23D	1481	Roquefort avant salage
	<i>mesenteroides</i>	23H	1482	Roquefort avant salage
	<i>mesenteroides</i>	23I	1483	Jeune fromage de Roquefort
	<i>mesenteroides</i>	23J		Roquefort
	<i>mesenteroides</i>	23U	1485	Jeune fromage de Roquefort
	<i>mesenteroides</i>	24A		Roquefort
	<i>mesenteroides</i>	24D		Roquefort
	<i>mesenteroides</i>	24F		Roquefort
	<i>mesenteroides</i>	24I		Roquefort
	<i>mesenteroides</i>	24L		Roquefort
	<i>mesenteroides</i>	24N		Roquefort
	<i>mesenteroides</i>	24U		Roquefort
	<i>mesenteroides</i>	26F		
	<i>mesenteroides</i>	35		
	<i>mesenteroides</i>	51G	1782	Caillé Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	51H	1783	Caillé Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	51I	1784	Caillé Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	51J	1785	Caillé Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	51L	1786	Caillé Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	51M	1788	Caillé Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	51N	1789	Caillé Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	51Ng		Caillé Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	51T		
	<i>mesenteroides</i>	54C	1793	Sérum Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	54E	1795	Sérum Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	54G		Sérum Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	54H	1798	Sérum Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	54M	1801	Sérum Crottin de Chavignol
	<i>mesenteroides</i>	L4		
	<i>mesenteroides</i>		749 ^T	Olives

Espèce moléculaire	Phénotype	Numéro d'origine	Numéro CNRZ	Origines
<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>dextranicum</i>	2C		Chèvre Charollais
	<i>dextranicum</i>	2D		Chèvre Charollais
	<i>dextranicum</i>	2F		Chèvre Charollais
	<i>dextranicum</i>	8	1739	
	<i>dextranicum</i>	9		
	<i>dextranicum</i>	9A		Lait pour Reblochon
	<i>dextranicum</i>	9B		Lait pour Reblochon
	<i>dextranicum</i>	9C		Lait pour Reblochon
	<i>dextranicum</i>	9D		Lait pour Reblochon
	<i>dextranicum</i>	9F		Lait pour Reblochon
	<i>dextranicum</i>	9G		Lait pour Reblochon
	<i>dextranicum</i>	9H		Lait pour Reblochon
	<i>dextranicum</i>	9I		Lait pour Reblochon
	<i>dextranicum</i>	9K		Lait pour Reblochon
	<i>dextranicum</i>	9M		Lait pour Reblochon
	<i>dextranicum</i>	9O	1807	Reblochon
	<i>dextranicum</i>	9P		Reblochon
	<i>dextranicum</i>	9R		Reblochon
	<i>dextranicum</i>	9S		Reblochon
	<i>dextranicum</i>	9T		Reblochon
	<i>dextranicum</i>	9U		Reblochon
	<i>dextranicum</i>	10A	1468	Reblochon
	<i>dextranicum</i>	10B		Reblochon
	<i>dextranicum</i>	10C		Reblochon
	<i>dextranicum</i>	10D	1809	Reblochon
	<i>dextranicum</i>	10E	1808	Reblochon
	<i>dextranicum</i>	10I		Reblochon
	<i>dextranicum</i>	10N		Reblochon
	<i>dextranicum</i>	10R		Reblochon
	<i>dextranicum</i>	10S	1812	Reblochon
	<i>dextranicum</i>	10T		Reblochon
	<i>dextranicum</i>	11	1742	
	<i>dextranicum</i>	11A		Reblochon
	<i>dextranicum</i>	11C		Reblochon
	<i>dextranicum</i>	11D		Reblochon
	<i>dextranicum</i>	11F		Reblochon
	<i>dextranicum</i>	11G		Reblochon
	<i>dextranicum</i>	14		
	<i>dextranicum</i>	14S		Chèvre Charollais
	<i>dextranicum</i>	14T		Chèvre Charollais
	<i>dextranicum</i>	17A		Tamié
	<i>dextranicum</i>	18	1748	
	<i>dextranicum</i>	18A		Cheddar
	<i>dextranicum</i>	18B		Cheddar
	<i>dextranicum</i>	19L	1025	Laguiole de 2 mois
	<i>dextranicum</i>	19S	1029	Gerle de St Nectaire
	<i>dextranicum</i>	19U	1475	Gerle de St Nectaire
	<i>dextranicum</i>	20L		Cantal fermier de 1 mois
	<i>dextranicum</i>	20M		Cantal fermier de 1 mois
	<i>dextranicum</i>	20R	1487	Levain pour Roquefort
	<i>dextranicum</i>	22	1752	
	<i>dextranicum</i>	22J		Roquefort (accident fabric.)
	<i>dextranicum</i>	23B		Roquefort
	<i>dextranicum</i>	23E		Roquefort
	<i>dextranicum</i>	23K		Roquefort
	<i>dextranicum</i>	23M		Roquefort

Espèce moléculaire	Phénotype	Numéro d'origine	Numéro CNRZ	Origines
<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>dextranicum</i>	23N		Roquefort
	<i>dextranicum</i>	23O		Roquefort
	<i>dextranicum</i>	23S		Roquefort
	<i>dextranicum</i>	23T		Roquefort
	<i>dextranicum</i>	24B	1489	Roquefort
	<i>dextranicum</i>	24E		Roquefort
	<i>dextranicum</i>	24G		Roquefort
	<i>dextranicum</i>	24H		Roquefort
	<i>dextranicum</i>	24M		Roquefort
	<i>dextranicum</i>	24R		Roquefort
	<i>dextranicum</i>	24T		Roquefort
	<i>dextranicum</i>	26A		
	<i>dextranicum</i>	26B		
	<i>dextranicum</i>	26E		
	<i>dextranicum</i>	50M	1772	Caillé Crottin de Chavignol
	<i>dextranicum</i>	50O	1694	Crottin de Chavignol
	<i>dextranicum</i>	51A	1777	Tome (accident fabric.)
	<i>dextranicum</i>	51P		
	<i>dextranicum</i>	54F	1796	Sérum Crottin de Chavignol
	<i>dextranicum</i>	IB11	1221	Domiaty Egypte
	<i>dextranicum</i>		77 ^T	
	<i>dextranicum</i>	426		Kéfir, Moscou
<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>cremoris</i>	2L		Chèvre Charollais
	<i>cremoris</i>	2N		Chèvre Charollais
	<i>cremoris</i>	6	1737	
	<i>cremoris</i>	7	1738	
	<i>cremoris</i>	10	1741	
	<i>cremoris</i>	13F		Chèvre Charollais
	<i>cremoris</i>	13H		Chèvre Charollais
	<i>cremoris</i>	25T		
	<i>cremoris</i>	50I	1769	Caillé Crottin de Chavignol
	<i>cremoris</i>	51K	1700	Crottin de Chavignol
	<i>cremoris</i>	54O		
	<i>cremoris</i>		361 ^T	Levain lactique
<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>lactis</i>	25J		
<i>Ln. mesenteroides</i>	sp.	2E		Chèvre Charollais
	sp.	2M		Chèvre Charollais
	sp.	11B		Reblochon
	sp.	12	1743	
	sp.	19	1749	
	sp.	24O	1805	Roquefort
	sp.	25B	1806	Roquefort
	sp.	54B	1791	Chèvre fermier (accident. fabric.)
<i>Ln. mesenteroides</i>	sp.	54J		
	<i>W. paramesenteroides</i>	2K		Chèvre Charollais
	<i>W. paramesenteroides</i>	9J		Lait pour Reblochon
	<i>W. paramesenteroides</i>	10J		Reblochon
	<i>W. paramesenteroides</i>	13M		Pont l'Evêque
	<i>W. paramesenteroides</i>	13O		Pont l'Evêque
	<i>W. paramesenteroides</i>	17C		Pont l'Evêque
	<i>W. paramesenteroides</i>	24S		Roquefort
<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>W. paramesenteroides</i>	25N		

Espèce moléculaire	Phénotype	Numéro d'origine	Numéro CNRZ	Origines
<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>W. paramesenteroides</i>	54S		
	<i>W. paramesenteroides</i>	H36		Choucroute polonaise
<i>Ln. mesenteroides</i>	ND	10U		Reblochon
	ND	18M		Lait de gerle
	ND	50P		Caillé Crottin de Chavignol
	ND	51E		Caillé Crottin de Chavignol
	ND	51F		Caillé Crottin de Chavignol
<i>Ln. fallax</i>	ND	17D	2049	Livarot
<i>Ln. lactis</i>	<i>cremoris</i>	15	1746	
	<i>lactis</i>	15D		Coeur de Bray
	<i>lactis</i>	15H		Coeur de Bray
	<i>lactis</i>	LMG7940		
	<i>lactis</i>	LMG8894 ^T		
<i>W. paramesenteroides</i>	<i>W. paramesenteroides</i>	LMG9852 ^T		
<i>W. viridescens</i>	ND	32		
<i>Lb. casei</i>	ND	15A		Chèvre Charollais
	ND	22L		
	ND	22M		
<i>Lb. rhamnosus</i>	ND	5		
<i>Lb. plantarum</i>	ND	24C		Roquefort
	ND	24J		Roquefort
	ND	24K		Roquefort
	ND	26C		
	ND	26L		
<i>Lb. pentosus</i>	<i>Lb. pentosus</i>	29		
<i>Lb. fermentum</i>	ND	26		
<i>Ec. faecalis</i>	ND	17		
	ND	24P		Roquefort
	ND	33		
	ND	34		
	ND	37		
	ND	49R		
	ND	51O		
	ND	54P		
	ND	54R		
	ND	54T		

Les souches types proviennent de la collection du Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Gand (LMG, Belgique). Elles sont identifiées par la présence d'un ^T à la suite de leur numéro d'identification. Les correspondances avec les numéros de l'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia) sont *Ln. amelibiosum* LMG9824^T = ATCC13146 ; *Ln. citreum* LMG9849^T = ATCC49370 ; *Ln. lactis* LMG8894^T = ATCC19256 ; *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* 361^T = ATCC19254 ; *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* 77^T = ATCC19255 ; *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 749^T = ATCC8293 ; *W. paramesenteroides* LMG9852^T = ATCC33313.

Tableau 4b. Autres souches bactériennes utilisées au cours de ce travail

Bactéries	Génotype ou origine	Source ou référence
<i>L. lactis</i>		
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO763		collection INRA
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403		collection INRA
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363 <i>acmAΔI</i>	souche dérivée de MG1363 portant une délétion dans <i>acmA</i>	BUIST et coll. 1995
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000	souche dérivée de NZ3000 <i>pepN : nisRnisK</i>	collection NIZO, Pays Bas
<i>E. coli</i>		
<i>E. coli</i> TG1	[<i>supE hsdΔ5 thi Δ(lacproAB) F'(traD36proAB+ lacI^f lacZΔM15)</i>]	GIBSON, 1984
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46thi relA1 lac^cØ F'</i> [<i>proAB⁺ lacI^f lacZΔM15 Tn10(ter^f)</i>]	Stratagène
<i>Staph. aureus</i> S23		collection INRA
<i>Staph. xylosus</i> C39D6		collection INRA
<i>Listeria innocua</i> lin11		collection INRA
<i>Listeria monocytogenes</i> V7		collection INRA
<i>Brevibacterium linens</i> CO9		collection INRA
<i>Ent. faecalis</i> efs1		collection INRA

Tableau 5. Liste des plasmides construits au cours de ce travail.

Plasmides	Description
pTIL340 :	Le fragment 94-647 de <i>lnmur</i> est cloné dans pBSK+.
pTIL341 :	Le fragment 5-617 de <i>lnmur</i> est cloné dans pBSK+
pTIL342 :	pBSK+ portant la région répétée de <i>acmA</i> amplifiée avec les amorces LnP9 et LnP10.
pTIL343 :	Dérivé de pQE30 portant l'insert de 552 pbs de pTIL340.
PTIL344 :	Dérivé de pCYT1. Le gène chimérique (<i>lnmur-cA</i>) de 1370 pbs est sous le contrôle du promoteur <i>nisA</i> .

1975) contenant 5 g/l de glucose à la place du lactose. Lorsque les souches portent les plasmides utilisés (tableau 5), de l'ampicilline et l'érythromycine sont ajoutés à une concentration finale de 50 et 5 µg/ml respectivement. Les souches sont conservées à -80°C dans le milieu M17 contenant 15 % de glycérol.

1.1.3. *Escherichia coli*

Les souches d'*Escherichia coli* TG1 et XL1-Blue sont fournies par Stratagène (La Jolla, Calif., USA). Les souches sont cultivées dans le milieu de Luria-Bertani (LB) à 37°C sous agitation. La souche XL1-Blue est cultivée en présence de tétracycline à la concentration de 10 µg/ml. Lorsque les souches portent les plasmides pBluescript SK+ ou pQE30, de l'ampicilline est ajouté dans le milieu à une concentration finale de 50 µg/ml. Les souches sont conservées à -80°C dans le milieu LB en présence de 15 % de glycérol.

1. 2. Autolyse en milieu liquide

1.2.1. Autolyse spontanée en milieu de culture

L'autolyse dans le milieu de culture est évaluée en mesurant la diminution de l'absorbance A_{650nm} à l'aide d'un spectrophotomètre (Beckman DU 640). La phase de déclin obtenue après la phase exponentielle de croissance traduit le phénomène d'autolyse cellulaire. Dans ces essais, le milieu de culture est tamponné avec 100 mM final de β -glycérophosphate de sodium. Ce procédé empêche l'inactivation des enzymes autolytiques par un pH trop acide du milieu.

1.2.2. Autolyse induite dans un milieu tamponné

Cette technique consiste à transférer des cellules du milieu de culture dans une solution tamponnée. Les cellules sont récoltées à différents stades de croissance par centrifugation (3000 x g pendant 10 min) et lavées dans une solution contenant 50 mM de phosphate de potassium (pH 6,5). L' A_{650nm} est ajustée à 0,6-0,8 avec la même solution. La lyse est évaluée par mesure de l' A_{650nm} après incubation des tubes contenant les suspensions à 30°C. Différents paramètres tels

que le stade de croissance, la température d'incubation, le pH, la présence d'ions, d'activateurs et d'inhibiteurs ont été testés pour caractériser l'autolyse.

II- TECHNIQUE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

2.1. Plasmides

2.1.1. Plasmide pBluescript II SK+

Le plasmide pBluescript II SK+ (Stratagène Cloning Systems, La Jolla, CA, USA) de 2,96 kbs (figure 8) permet le clonage et le séquençage de molécules d'ADN. Grâce à son origine de réplication ColE1, le plasmide se réplique chez *E. coli* où il se trouve à un haut nombre de copies (environ 50 copies par cellule). Il porte un gène codant pour la résistance à l'ampicilline et une région de clonage multiple, contenant 21 sites de restriction uniques, située en amont d'une portion du gène *lacZ*. Le fragment du gène *lacZ* porté par le plasmide complémente la délétion de *lacZ* appelée M15. Cette mutation correspond à la délétion des acides aminés 14 à 44 de la β -galactosidase et entraîne l'inactivation de l'enzyme. Ainsi, si le plasmide est introduit dans une souche de génotype *lacZ* Δ M15 synthétisant une β -galactosidase inactive, il rétablit la synthèse d'une enzyme active par α -complémentation. En présence d'un substrat chromogène de la β -galactosidase (X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) et d'un inducteur de l'opéron lactose (IPTG : isopropyl- β -D-thiogalactoside), les colonies possédant le vecteur sans insert apparaissent colorées en bleu alors que les clones avec insert restent blancs.

2.1.2. Plasmide pQE30

Le plasmide pQE30 (3,462 kb) (Qiagen) a été utilisé pour exprimer chez *E. coli* des protéines recombinantes possédant une extrémité constituée de 6 histidines (6xHis) et destinées à être purifiées en une seule étape par chromatographie d'affinité. Le plasmide se réplique chez *E. coli* avec un bas nombre de copies et possède l'origine de réplication ColE1. Il présente une région de clonage multiple contenant neuf sites de restriction uniques. Le gène codant pour la protéine à exprimer est cloné en aval de la séquence codant les 6xHis. De plus, le plasmide porte le gène de la β -lactamase ce qui donne aux cellules qui le portent la résistance à l'ampicilline.

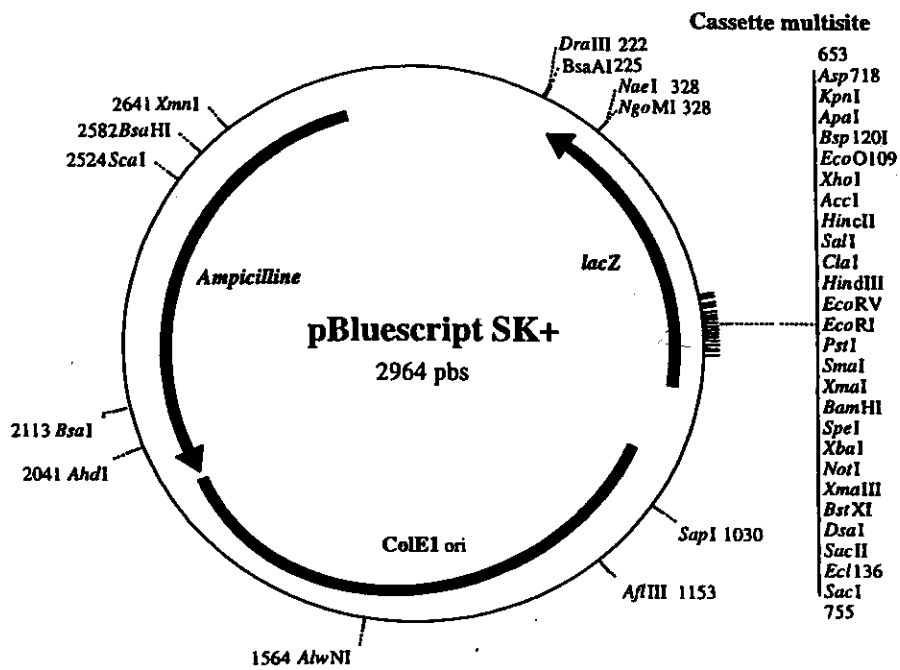


Figure 8. Carte génétique du plasmide pBluescript SK⁺

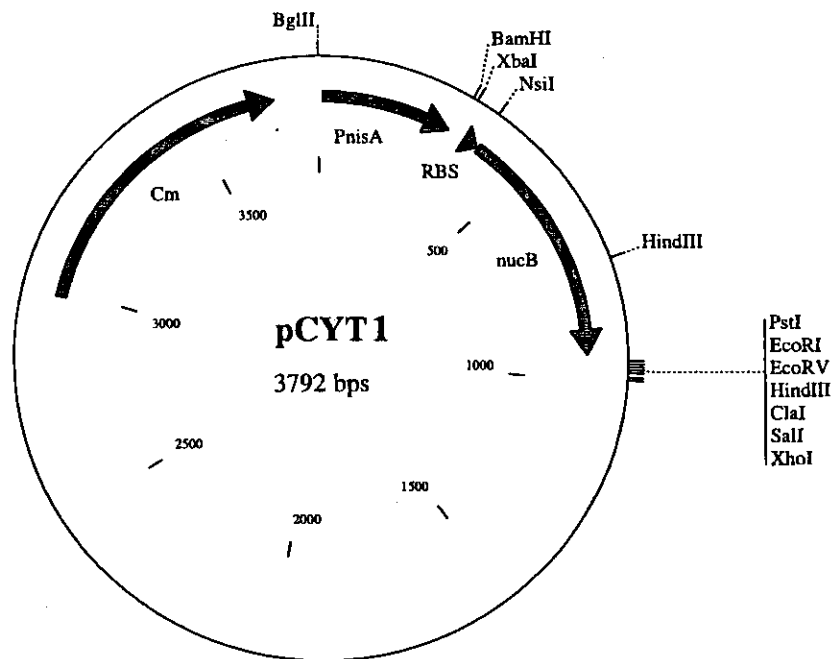


Figure 9. Carte génétique du plasmide pCYT1

2.1.3. Plasmide pCYT1

Le plasmide pCYT1 a été construit par P. LANGELLA et sera prochainement publié (LANGELLA et coll., publication en préparation) (figure 9). Il s'agit d'un dérivé du plasmide pNZ8010 (de RUYTER et coll., 1996, fourni par Oscar KUIPERS) dans lequel le gène *gus* codant pour la β -glucuronidase est exprimé sous la dépendance du promoteur du gène *nisA* (*PnisA*) de l'opéron de biosynthèse de la nisine chez *L. lactis*. Dans ce contexte, le gène *gus* n'est exprimé qu'en présence de l'inducteur nisine et son expression est proportionnelle à la dose de nisine utilisée pour l'induction. Le gène *gus* a d'abord été délété par une digestion *XbaI* et remplacé par un fragment d'ADN digéré par *BamHI* et *XbaI* codant le site d'attachement du ribosome (RBS_{Usp45}), le peptide signal du gène *usp45* (SP_{Usp45}, van ASSELDONK et coll., 1990) de *L. lactis* et la partie mature de la nucléase de *Staph. aureus* (Nuc, LE LOIR et coll., 1994) pour obtenir le plasmide pSEC. Le fragment d'ADN codant le SP_{Usp45} a ensuite été obtenu par PCR inverse pour construire le plasmide pCYT1. Un site de coupure par *NsiI* a été introduit à l'extrémité 3' du RBS_{Usp45} afin de permettre le remplacement du fragment codant la partie mature de Nuc par un fragment codant pour une protéine hétérologue. Ainsi, dans notre cas, la partie du gène *nuc* a d'abord été éliminée par une double digestion *NsiI/HindIII* et remplacée par un fragment d'ADN digéré par *NsiI-HindIII* codant pour une autolysine de *Ln. citreum*. Le plasmide obtenu, pCYT1: *LnMur*, a ensuite été introduit dans la souche de *L. lactis* NZ9000 (fournie par Oscar KUIPERS) portant sur son chromosome *nisR* et *nisK*, les deux gènes régulateurs de *PnisA*.

2.1.4. Les plasmides NZ9520 et NZ9530

Les plasmides NZ9520 et NZ9530 ont été construits par KLEEREMBEZEM et coll. (1997). Ils sont dérivés des plasmides pIL253 et pIL252 (SIMON et CHOPIN, 1988). Ils portent un gène codant pour la résistance à l'érythromycine. NZ9520 est un plasmide à haut nombre de copies (45 à 65 par cellule). NZ9530 est un plasmide à bas nombre de copies (6 à 9 par cellule). Dans le cas de NZ9520, le gène *repF* codant pour le répresseur qui contrôle la réplication, est interrompu par une séquence de 22 pbs flanquée du site *KpnI*. Dans le cas de NZ9530, le fragment de 22 pbs a été digéré par *KpnI*.

2.2. Préparation des cellules compétentes

2.2.1. Préparation des cellules compétentes d'*E. coli*

Les cellules compétentes de la souche TG1 d'*E. coli* sont préparées selon la méthode de HANAHAN (1983). A partir d'une culture d'une nuit à 37°C sur milieu gélosé LB additionné de MgCl₂ (10 mM), une colonie isolée est prélevée pour effectuer une préculture de 3 à 4 heures sous agitation dans 5 ml de milieu LB contenant du MgCl₂ (10 mM). 100 ml du même milieu sont ensuite ensemencés avec la totalité de cette préculture jusqu'à l'obtention d'une absorbance comprise entre 0,5 et 0,8 à 550 nm. Les cellules sont ensuite récoltées par centrifugation à 6000 x g pendant 12 min à 10°C remises en suspension dans 30 ml de tampon TfbI (acétate de potassium 30 mM ; KCl 100 mM ; CaCl₂ 10 mM ; MnCl₂ 50 mM ; glycérol 15%,) et laissées 5 à 10 min dans la glace avant d'être centrifugées à 6000 x g pendant 8 min à 4°C. Elles sont à nouveau remises en suspension dans 4 ml de tampon TfbII (MOPS 10 mM ; CaCl₂ 75 mM ; KCl 10 mM ; glycérol 15%) puis congelées dans l'azote liquide par aliquotes de 100 µl et stockées à -80°C.

2.2.2. Préparation des cellules compétentes de *L. lactis*

Les cellules compétentes de *L. lactis* sont préparées selon la méthode d'HOLLO et NES (1989) avec quelques modifications. 200 ml de milieu M17 contenant 0,5 % glucose, 0,5 M saccharose et 2% glycine (M17 Glu Sacc Gly) sont ensemencés à 0,1% à l'aide d'une culture de la nuit obtenue en M17 Glu Sacc Gly. La glycine perturbe la synthèse de la paroi et facilite ainsi l'entrée de l'ADN dans les cellules. Le saccharose est utilisé en tant que protecteur osmotique. A une A_{600nm} de 0,6 environ, les cellules sont récupérées et lavées deux fois avec 200 ml, puis une fois avec 20 ml de saccharose 0,5 M-glycérol 10% froid. Le culot est repris dans 1 ml de solution de polyéthylène glycol 3000 à 30 % et glycérol à 10% froid. Les cellules sont ensuite aliquotées en 100 µl dans des tubes Eppendorf, congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

2.3. Transformation des cellules

2.3.1. Par “un choc de température”

Les cellules compétentes d'*E. coli* sont décongelées lentement sur la glace puis incubées 15 min dans la glace en présence du 20 µl ADN plasmidique. Le mélange est incubé 5 min à 37°C puis 0,8 ml de milieu LB préchauffé à 37°C est rajouté. Après 1 h d'expression à 37°C, les cellules sont étalées sur milieu gélosé LB contenant l'antibiotique nécessaire.

2.3.2. Par électroporation

L'électroporation de *L. lactis* est effectuée selon la méthode de HOLO et NES (1989). Les cellules compétentes, décongelées de la même façon que celles d'*E. coli* sont soumises à une électroporation (25 µF, 200 Ω et 2.5 kV) dans une cuve prévue à cet effet et préalablement refroidie dans la glace pendant 15 min. Puis 1 ml de milieu M17 additionné de saccharose 0.5 M final est immédiatement rajouté. Le mélange est incubé quelques minutes dans la glace, transféré à 30°C et incubé pendant 2 h. Les cellules sont étalées sur le milieu gélosé M17 contenant l'antibiotique nécessaire.

2.4. Techniques de manipulation de l'ADN

2.4.1. Extraction et purification de l'ADN total des leuconostocs

La méthode décrite par De Los REYES-GAVILLAN et coll. (1992) a été utilisée pour extraire l'ADN total. Deux tubes Eppendorf contenant chacun 2 ml de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance sont centrifugés à 15000 g pendant 10 min. Le surnageant est éliminé soigneusement. Le culot est repris dans 200 µl de tampon TES à pH 8 (Tris-HCl 50 mM ; EDTA 1 mM et saccharose 8,5%) contenant 20 mg/ml de lysozyme et 10 UI mutanolysine (Sigma). L'ensemble est incubé dans un bain-marie à 37°C pendant 1 h. La lyse des bactéries est provoquée par l'addition de 50 µl de SDS à 20%.

Afin de purifier l'ADN, le lysat est traité trois fois successivement par un mélange de

phénol, chloroforme et alcool isoamylique (25/24/1 : v/v/v). Ce traitement permet d'éliminer les composants cellulaires non-nucléiques comme les protéines et les lipides. La phase aqueuse contenant les acides nucléiques est traitée avec le mélange chloroforme-alcool isoamylique pour éliminer les traces de phénol. Puis les acides nucléiques, contenus dans la phase aqueuse sont précipités pendant 1 h à -20°C par l'addition d'un volume d'isopropanol à -20°C . Ils sont récupérés par centrifugation (15000 g pendant 10 min) et lavés avec de l'éthanol à 70%. Après une nouvelle centrifugation, les acides nucléiques sont séchés et repris dans 200 μl d'eau milliQ stérile contenant 10 μg de RNase. Cette dernière est indispensable pour digérer l'ARN.

2.4.2. Préparation de l'ADN plasmidique

2.4.2.1. La technique de lyse à l'eau bouillante

Cette méthode permet la préparation rapide de petites quantités d'ADN plasmidique, ce qui est intéressant pour l'analyse de clones recombinants.

Les colonies isolées sur milieu gélosé LB ampicilline sont cultivées dans le même milieu liquide de 6 h à une nuit à 37°C sous agitation. Après culture, la suspension cellulaire (2 ml) est centrifugée à 6000 x g pendant 10 min à 4°C . Les cellules sont ensuite lysées par remise en suspension du culot dans 200 μl de tampon STET (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 ; EDTA 50 mM ; Triton X-100 5 % et saccharose 8 %) et addition de 10 μl d'une solution de lysozyme à 10 mg/ml. L'ensemble est mélangé et transféré immédiatement à 100°C pendant 40 s. Après centrifugation à 10 000 g pendant 30 min, le culot contenant des débris cellulaires et l'ADN chromosomique (liés à la membrane bactérienne) sont ôtés à l'aide d'une pipette. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique et les ARN sont précipités avec 180 μl d'isopropanol pendant 5 à 10 min à température ambiante. Les acides nucléiques sont alors centrifugés 10 min à 10000 x g puis lavés à l'éthanol 70 %. Le culot est enfin séché sous vide ou à température ambiante et remis en suspension dans 10 μl de tampon TE (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 et EDTA 50 mM).

2.4.2.2. La technique de lyse alcaline

Deux ml de culture à la fin de phase exponentielle de croissance sont centrifugés à 15000 x g pendant 30 s. Le culot est repris dans 150 μl de TES (Tris HCl 50 mM, EDTA 50 mM et 20%

de saccharose). Pour l'extraction d'ADN plasmidique de *L. lactis*, le TES est remplacé par le TES-lysozyme (10 mg/ml) et incubé pendant 15 min à 37°C. Un volume de 200 µl de NaOH 0,2 N, SDS 1% est ajouté pour lyser des cellules et dénaturer l'ADN. Ce dernier est ensuite renaturé par addition de 200 µL d'acétate de potassium 3 M à pH 4.8 froid. Après une incubation de 10 min à 4°C, le mélange est centrifugé 3 min à 15000 g à 4°C. L'ADN contenu dans la phase aqueuse est récupéré et précipité par l'addition de 2 volumes d'éthanol pendant 20 min à température ambiante, puis lavé avec un volume l'éthanol 70 %, séché sous vide et repris dans 30 µl TE contenant de la RNase à 10 µg/ml.

2.4.3. Dosage de l'ADN

La concentration en ADN de la solution est déterminée par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm. Une unité d'absorbance correspond à une concentration d'environ 50 µg/ml d'ADN double-brin. Une lecture de l'absorbance à 280 nm est également effectuée afin d'estimer la pureté de l'ADN. Les préparations pures d'ADN présentent des rapports A_{260nm}/A_{280nm} compris entre 1,8 et 2,0. En cas de contamination par des protéines ou encore par du phénol, ce rapport est significativement diminué et une quantification de la concentration en acides nucléiques est alors peu précise.

Il est encore possible d'estimer la concentration en ADN d'une solution par électrophorèse en gel d'agarose en comparant l'intensité de la bande obtenue avec celle d'un ADN témoin de concentration connue. Pour les plasmides, les quantifications sont effectuées après linéarisation de ceux-ci par une enzyme de restriction.

2.5. Réactions de Polymérisation en Chaîne de l'ADN (PCR) et PCR inverse

2.5.1. PCR

Les réactions de polymérisation en chaîne de l'ADN sont réalisées avec un thermocycleur DNA Thermal Cycler 2400 (Applied Biosystems, San José, CA) et la Taq polymérase (Quatum-Appligene).

Le programme d'amplification utilisé est adapté à chaque PCR ; il comprend, dans tous les cas, une phase préliminaire de dénaturation de l'ADN pendant 5 min à 94°C ou 96°C. Une

dénaturation courte (30 s entre 94 et 96°C) précédée de la phase d'hybridation des amorces à l'ADN dont la durée (30 s à 2 min) et la température (entre 45 et 55°C le plus souvent) sont fonction du couple d'amorces choisies. L'étape d'amplification de l'ADN est ensuite effectuée à 72°C et la durée d'amplification est adaptée à la longueur du fragment à synthétiser (1 min par kb à amplifier). Les phases de dénaturation, d'hybridation et d'amplification, sont répétées 30 fois. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi à 4°C.

2.5.1.1. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting)

Les amorces A1 et A2 (tableau 6) sont utilisées dans deux réactions de PCR différentes. La dénaturation de l'ADN est faite à 94°C pendant 5 min lors du premier cycle et 1 min pour les 30 cycles suivants. Une étape d'hybridation à 36°C pendant 2 min est suivie par une étape d'élongation à 72°C également pendant 2 min (TAILLIEZ et coll.,1998).

2.5.1.2. Amplification et séquençage des ADNr 16S

La région codant pour l'ADNr 16S est amplifiée quasiment en totalité en utilisant les amorces conservées P1 et P2 (tableau 6). L'ADN est soumis à une dénaturation à 96°C pendant 4 min, puis 30 cycles comprenant chacun une étape de dénaturation pendant 30 s à 50°C et une étape d'élongation pendant 2 min à 72°C. Les produits PCR sont purifiés par le kit Wizard (Promega) de manière à éliminer P1 et P2. Les amorces SP1, SP2, SP3, SP4 et SP5 sont choisies dans les régions conservées et utilisées pour le séquençage.

2.5.1.3. Amplification par PCR des régions de l'ADNr 16S à l'aide des amorces spécifiques d'espèces

Les séquences des ADNr 16S (~1400 pbs) des souches appartenant aux espèces *Ln. mesenteroides*, *Ln. citreum*, *Ln. lactis* et *W. paramesenteroides* ont été extraites de « GenBank » ou sont établies dans notre laboratoire. La comparaison des séquences à l'aide du logiciel GeneCompar (Applied-Maths, Belgique) permet de définir des oligonucleotides spécifiques (tableau 6). Le cycle d'amplification comprend une dénaturation à 94°C pendant 4 min puis 30 cycles composés d'une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 s, d'une étape d'hybridation à

Tableau 6. Liste des oligonucléotides utilisés au cours du travail

Oligonu- cléotides	Séquence	Description
P1	AGAGTTTGATCMTGGCTC	Position 8 de l'ADNr 16S (BROSIUS et coll. 1978)
P2	CNCGTCCTTCATCGCCT ®	Position 44 de l'ADNr 23S (BROSIUS et coll. 1980)
SP1	ACTCCTACGGGAGGCAGCA	Position 338 de l'ADNr 16S (ce travail)
SP2	ACCGCGGCTGCTGGCACG ®	Position 514 de l'ADNr 16S (ce travail)
SP3	TACGCATTTACCKCTACA ®	Position 684 de l'ADNr 16S (ce travail)
SP4	CTCGTTGCGGGACTTAAC ®	Position 1089 de l'ADNr 16S (ce travail)
SP5	GNTACCTTGTTACGACTT ®	Position 1492 de l'ADNr 16S (ce travail)
Lnml	TGTCGCATGACACAAAGTTA	Position 185 de l'ADNr 16S (ce travail)
Lnml	ATCATTTCTATTCTAGCTG ®	Position 470 de l'ADNr 16S (ce travail)
Ln11	ATAGGGAATGATTCTAGTTC	Position 457 de l'ADNr 16S (ce travail)
Ln12	AGATTAGCTCACCTCGCG ®	Position 1283 de l'ADNr 16S (ce travail)
Lncl1	ACTTAGTATCGCATGATATC	Position 183 de l'ADNr 16S (ce travail)
Lncl2	AGTCGAGTTGCAGACTGCAG ®	Position 1326 de l'ADNr 16S (ce travail)
Wpm1	TACCGTATAATACCAACAAC	Position 163 de l'ADNr 16S (ce travail)
Wpm2	AACCCTCGAACATCTAGCAC ®	Position 834 de l'ADNr 16S (ce travail)
A1	TGCTCTGCCC	Oligonucléotide pour RAPD (TAILLIEZ et coll., 1998)
A2	GTCCACACGG	Oligonucléotide pour RAPD (TAILLIEZ et coll., 1998)
LnZ1	Séquence non disponible	Sonde pour l'HIS ; cible l'ARNr 16S de <i>Leuconostoc</i> sauf <i>Ln. fallax</i> (TAILLIEZ communication personnelle)
LcZ1	Séquence non disponible	Sonde pour l'HIS ; cible ARNr 16S de <i>L. lactis</i> (TAILLIEZ communication personnelle)
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGG	Position 338 cible l'ARNr 16S des bactéries (AMANN et coll., 1990)
LnP1	GTNATGATNGCNCARGC	Séquence conservée de <i>lnmur</i> (aa 86-91) (ce travail)
LnP2	GGRTCNGTNGCRTANC®	Séquence conservée de <i>lnmur</i> (aa 190-195) (ce travail)
LnP3	CATTCCAACCTCGTGCCATGA®	Position 683-664 de <i>lnmur</i> (ce travail)
LnP4	CGGCCCAATATCAGCATGTT	Position 684-703 de <i>lnmur</i> (ce travail)
LnP5	CGCGGATCCACTTTTTGGTCGCAAACAC (<i>Bam</i> HI)	Position 305-323 de <i>lnmur</i> (ce travail)
LnP6	GGAAGCTTCGGAACATTTCCGTT® (<i>Hind</i> III)	Position 857-843 de <i>lnmur</i> (ce travail)
LnP7	GCCTGCAGCAAAAAGAAAAGACGT (<i>Pst</i> I)	Position 216-232 de <i>lnmur</i> (ce travail)
LnP8	CCATCGATTTTTGTGGTACATCAAAGCG® (<i>Cla</i> I)	Position 838-818 de <i>lnmur</i> (ce travail)
LnP9	CCATCGATGCTGGTACTTCTAATTCCGGT (<i>Cla</i> I)	Position 652-675 de <i>acmA</i> (BUIST et coll., 1995)
LnP10	CCGCTCGAGTCATCTTCAGTCTGTTTTAAAG® (<i>Xho</i> I)	Séquence de l'extrémité 3' de <i>acmA</i> (1382-1359)

® La séquence complémentaire.

Les sites de restriction sont soulignés et les enzymes de restriction sont écrits entre parenthèses.

58°C (60°C pour les sondes Ln11 et Ln12) pendant 30 s et d'une élongation à 72°C pendant 1,5 min.

2.5.2. PCR inverse

La PCR inverse est une technique qui permet d'amplifier les régions flanquant un fragment d'ADN de séquence connue (SILVER 1991) (figure 10). Cette technique se déroule en trois étapes : digestion de la matrice d'ADN, circularisation des fragments d'ADN obtenus et amplification PCR sur l'ADN circularisé avec des amorces divergentes.

Le choix de l'enzyme de restriction destinée à digérer la matrice d'ADN est essentielle. L'enzyme ne doit évidemment pas couper dans la séquence connue. Elle doit être choisie de telle façon que le fragment connu se situe dans un fragment de taille adaptée, afin d'optimiser les chances de cloner le gène entier sans par ailleurs gêner les processus ultérieurs de circularisation et d'amplification. Afin de choisir une enzyme adaptée, l'ADN total de *Ln. citreum* 22R est digéré séparément par plusieurs enzymes. Des hybridations de type Southern (cf. 2.11.) sont réalisées en utilisant comme sonde le fragment d'ADN de séquence connue. La ou les digestions pour lesquelles la sonde hybride avec un fragment de taille convenable est ou sont utilisées pour la PCR inverse. Après digestion, l'enzyme est inactivée par chauffage à 72°C pendant 10 min ou par extraction au chloroforme-alcool isoamylique. L'ADN de la phase aqueuse est précipité par l'éthanol en présence d'acétate de sodium et de glycogène. Il est récolté par centrifugation, rincé dans l'éthanol 70% et séché sous vide. Le culot d'ADN est repris dans l'eau.

Afin de circulariser les fragments d'ADN digérés, une ligation est effectuée dans des conditions diluées (1 µg/ml d'ADN) afin de favoriser la rencontre des extrémités d'un même fragment plutôt que la concatémérisation des fragments. Le mélange réactionnel contenant l'ADN, la ligase (10-15 U / ml final) et le tampon de ligation est complété à 1 ml avec d'eau et incubé 16 h à 15°C. L'enzyme est inactivée par chauffage à 72°C pendant 10 min et le mélange est extrait par une solution de chloroforme-alcool isoamylique. L'ADN est ensuite concentré et dessalé par précipitation avec le mélange éthanol-acétate de sodium.

La PCR est alors réalisée avec des amorces divergentes choisies dans le fragment de séquence connue et 1 µg d'ADN circularisé comme matrice. Les réactions de PCR inverse sont réalisées en utilisant 5 U Taq polymérase et 45 cycles d'amplification.

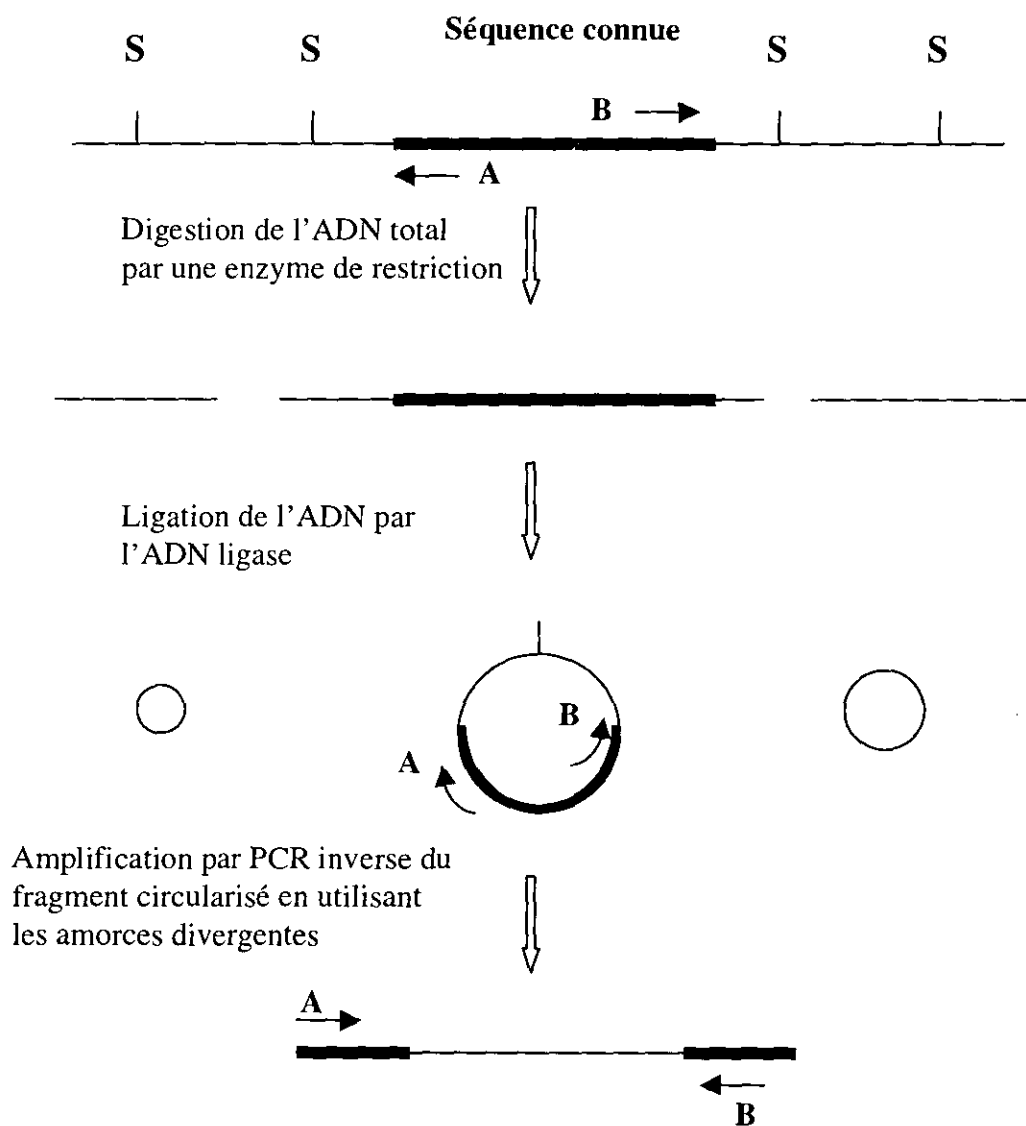


Figure 10. Principe de la PCR inverse.

Une molécule d'ADN avec un fragment de séquence connue (ligne épaisse) est digérée par une enzyme de restriction au niveau des sites S, diluée et circularisée par ligation. Les amorces A et B (orientation 5' vers 3' indiquée par une flèche) sont ensuite utilisées pour amplifier par PCR les régions flanquant la séquence connue.

2.6. Digestion de l'ADN

L'ADN à digérer est incubé 1 h à température recommandée en présence de l'enzyme de restriction (1 U/ μ g d'ADN) et du tampon approprié recommandé par le fournisseur.

2.7. Ligature de l'ADN

La réaction de ligature d'un insert dans un vecteur est effectuée avec un excès d'insert (4 fois en concentration molaire) par rapport au vecteur.

Le fragment et le vecteur digérés sont mis en suspension dans du tampon de ligation (Tris-HCl 40 mM, pH 7,5 ; $MgCl_2$ 10 mM ; DTT 10 mM ; ATP 5 mM ; BSA 500 μ g/ml). La ligation est assurée par l'ADN ligase (Boehringer ou Biolabs) ajoutée à la concentration de 0,5 U/ μ l. Le mélange réactionnel est incubé 16 h à 15°C.

Le mélange de ligation est précipité par une solution d'éthanol/acétate de sodium puis séché sous vide. Le culot est remis en suspension dans de l'eau.

2.8. Electrophorèse en gel d'agarose

L'agarose à 0.8% (SeaKem HGT, FMC Bioproducts Rockland Maine USA) ou à 1 % (Seakem GTG) est dissous dans du tampon TBE composé de 89 mM de Tris HCl, 89 mM de borate et 20 mM d'EDTA. Le mélange est porté à ébullition dans un four à micro-ondes et refroidi jusqu'à 50°C. Pour assurer la coloration de l'ADN et sa visualisation sous une lampe UV, le bromure d'éthidium (0.2 μ g/ml) est ajouté juste avant de couler le gel.

Les échantillons sont repris dans le tampon de dépôt (1/4 vol.) composé de bleu de bromophénol (0,1%), de saccharose (40%) et d'EDTA (50 mM pH 8,2). Après dépôt de ceux-ci dans les puits, la migration de l'ADN est effectuée dans du tampon TBE en voltage désiré. L'ADN est ensuite visualisé par observation du gel sous rayonnement ultraviolet à 312 nm.

La migration des échantillons pour la RAPD est faite dans un gel d'agarose 1% (GTG SeaKem). 20 μ l de produit de PCR sont déposés pour chaque échantillon. Un marqueur de taille (123 bp DNA Ladder, Gibco BRL) composé d'un polymère de 123 pbs est déposé des deux côtés et au centre du gel. Il servira de référence pour corriger les différences mineures de migration entre gels. L'électrophorèse a lieu pendant environ 6 h sous 0,30 mA/cm. Pour révéler des bandes

amplifiées, les gels sont immergés pendant 10 min sous agitation dans une solution contenant 250 µl de bromure d'éthidium à 1% dans 300 ml d'eau. L'excès de bromure d'éthidium est éliminé en immergeant le gel dans un bac contenant de l'eau pendant 20 min. Les gels sont photographiés sous UV à l'aide d'un film (Polaroid) avec négatif.

2.9. Elution des fragments d'ADN à partir de gels d'agarose

Pour éluer les fragments d'ADN d'un gel d'agarose (GTG à 0,7 %), le tampon utilisé est le TAE (Tris HCl 50 mM, acide acétique 20 mM, EDTA 50 mM pH 8,0). L'agarose contenant les fragments d'ADN désirés est découpé et placé sur un filtre SpinX (Corning Costar Corp., Cambridge, MA, USA). L'ensemble est placé à -20°C pendant 15 min. L'ADN est élué par centrifugation à température ambiante et précipité à l'éthanol en présence d'acétate de sodium et de glycogène. Il est ensuite récolté par centrifugation, rincé dans l'éthanol à 70%, séché sous vide et repris dans l'eau pure.

2.10. Séquençage de l'ADN

L'ADN est séquencé selon la méthode des "dideoxy" (SANGER et coll., 1977) à l'aide des kits ABI PRISM Dye Primer et ABI PRISM Dye Terminator (Applied Biosystems, San José, CA). Les séquences ont été obtenues à l'aide d'un séquenceur automatique (373 DNA sequencer, Applied Biosystems).

2.11. Hybridation de type Southern

2. 11.1. Transfert de l'ADN sur une membrane

Après électrophorèse en gel d'agarose des ADN totaux digérés, ceux-ci sont transférés par capillarité sur une membrane de nylon chargée positivement (Hybond N+, Amersham, Buckinghamshire, Grande Bretagne).

Le gel d'agarose est d'abord placé sous agitation dans une solution de dépurination (HCl, 250 mM) pendant 30 min. Ce procédé permet ainsi le transfert des fragments d'ADN de taille supérieure à 10 kb. Après rinçage à l'eau, l'ADN est dénaturé en plaçant le gel 30 min dans une

solution dénaturante contenant du NaCl (1,5 M) et du NaOH (0,5 M). Le gel est rincé à l'eau puis incubé 30 min dans une solution de neutralisation (NaCl 1,5 M ; Tris HCl 0,5 M ; pH 7,5).

Le transfert par capillarité de l'ADN sur la membrane se fait pendant la nuit. L'ADN est élué du gel par un flux ascendant de SSC 20 x (citrate trisodique 0,3 M ; NaCl 3 M ; pH 7,0)

Après le transfert, l'ADN est lié à la membrane, mais non fixé à celle-ci. La liaison irréversible de l'ADN est obtenue par fixation alcaline. Pour ce faire, la membrane est placée pendant 15 min sur une feuille de papier Whatman 3MM imbibée de NaOH 0,4 M. La membrane est ensuite rincée dans du tampon SSC 5 x (citrate trisodique 75 mM ; NaCl 0,75 M ; pH 7,0). A ce stade, la membrane peut être conservée à 4°C dans du papier Whatman 3MM ou utilisée directement pour l'hybridation.

2.11.2. Préparation de la sonde

Le fragment d'ADN du gène *lnmur* utilisé comme sonde est purifié (élimination des amorces PCR ayant servi à l'obtenir) à l'aide du kit Wizard (Promega) selon les instructions du fabricant. La quantité d'ADN nécessaire pour l'hybridation est ajustée à 10 ng/μl avec de l'eau.

Le marquage de l'ADN est fait en utilisant le kit de marquage ECL (Amersham Little Chalfont, G.B.). Pour ce faire, l'ADN est dénaturé par chauffage 5 min à 100°C et refroidi 5 min sur la glace. Le marquage est effectué selon les instructions du fournisseur par addition d'un volume d'agent de marquage contenant la peroxydase chargée positivement et d'un volume de glutaraldéhyde permettant la liaison covalente de la peroxydase à l'ADN. L'ensemble est incubé 10 min à 37°C.

2.11.3. Hybridation et révélation

La membrane d'ADN est préhybridée 1 h à 42°C dans le tampon d'hybridation préparé selon les instructions du fabricant (Amersham). La sonde est ensuite déposée dans le tampon d'hybridation. L'hybridation a lieu pendant 16 h à 42°C sous agitation douce. Afin d'éliminer la sonde fixée de façon non spécifique à la membrane, celle-ci est lavée en conditions stringentes par deux incubations successives de 20 min à 42°C dans une solution contenant du SSC 0,5 x, de l'urée 6 M et du SDS 0,4 %, et rincée deux fois 5 min dans du SSC 2x à température ambiante.

La membrane est partiellement séchée. La révélation est effectuée par autoradiographie

selon le protocole du kit. L'émission du signal est fondée sur la réduction, par la peroxydase fixée sur la sonde, du peroxyde d'hydrogène présent dans un des réactifs du kit couplée à l'oxydation du luminol présent dans l'autre réactif. Le luminol ainsi oxydé produit de la lumière qui impressionne le film autoradiographique.

2.12. La technique d'hybridation *in-situ* (HIS)

2.12.1. Choix des sondes

Les sondes utilisées pour l'HIS sont dirigées contre l'ARNr 16S des cellules bactériennes. Elles sont couplées de façon covalente à un fluorochrome tel que la fluorescéine ou la tétramethylrhodamine. Les sondes sont définies en fonction des régions cibles (variables ou conservées) de la séquence 16S de l'ARNr. Leur spécificité est évaluée à l'aide de la fonction « check probe » de la banque RDP permettant de sortir la liste des séquences d'ARNr les plus homologues. Une sonde EUB338 définie par AMANN et coll. (1990), capable d'hybrider à l'ARNr 16S de toutes les espèces bactériennes, est utilisée en contrôle.

2.12.2. Principe de la technique

Celle-ci est présentée dans la figure 11.

2.12.2.1. Déstabilisation du lait et perméabilisation des cellules par un traitement avec une solution de Triton-trypsine

Le test est réalisé sur des cellules en phase exponentielle de croissance contenant une quantité importante de ribosomes. Le milieu estensemencé avec une culture de nuit à raison de 5 % et incubé pendant 3 h. Cette culture est mélangée avec du lait stérile reconstitué pour avoir une concentration bactérienne comprise entre 10^4 et 10^6 cellules/ml. 100 μ l de ce mélange additionné de 800 μ l de solution de triton-trypsine (33 mg de trypsine, 21 ml de triton 0,5 %, 4 ml de PBS) sont incubés à 60°C pendant 10 min. Ce traitement permet d'éliminer les globules gras et les protéines du lait et facilite la filtration. Ensuite, l'ensemble est déposé dans un bloc composé de 12 puits, d'un joint et d'un filtre (Biocom, Les Ulis Cedex). Le filtre est composé d'une membra-

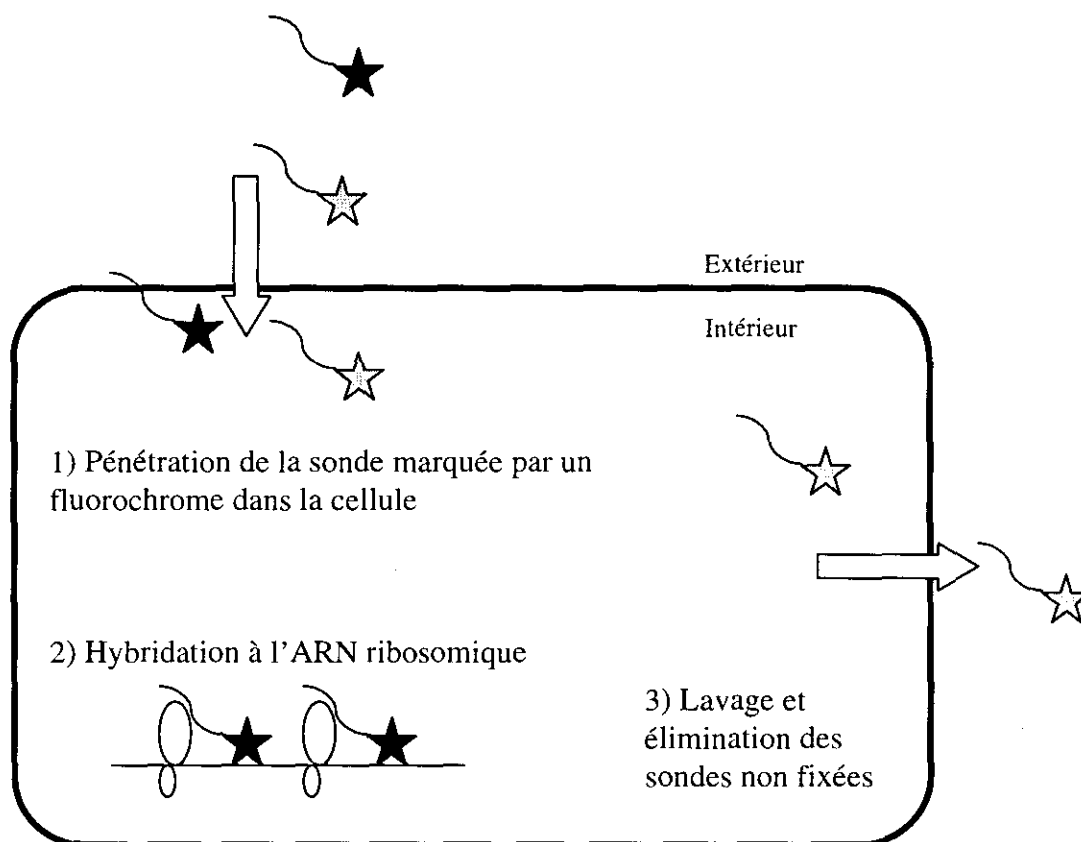


Figure 11. Principe de l'hybridation *in situ* (MATTE-TAILLIEZ et coll., 1997)

ne de polycarbonate avec des pores de 0,6 μm empêchant le passage des cellules bactériennes présentes dans le lait au cours de la filtration. Les échantillons sont filtrés sous vide, puis lavés par filtration avec 1 ml de tampon phosphate salin (PBS) composé de 100 mM de Na_2HPO_4 , 20 mM de NaH_2PO_4 , 1,5 M de NaCl à pH 7,3.

2.12.2.2. Fixation de cellules

La fixation des cellules est effectuée à l'aide de paraformaldéhyde (PFA) à 4 % (4 g de PFA, 100 ml de PBS, une goutte de NaOH 10 N). Ce dernier stabilise la structure de la cellule en créant un réseau entre les protéines cellulaires. 400 μl de PFA sont ajoutés dans chaque puit. Le système est placé à 4°C pendant 20 min. Les cellules sont ensuite lavées avec le PBS par filtration.

2.12.2.3. Perméabilisation des cellules

Pour assurer la pénétration des sondes dans les cellules, la paroi bactérienne doit être dégradée partiellement au moyen d'enzymes lytiques comme le lysozyme. Cette étape est nécessaire pour les bactéries à Gram positif. Elle ne l'est généralement pas pour les cellules à Gram négatif.

Ce procédé s'effectue par l'addition de 400 μl de tampon de lysozyme (lysozyme : 10 mg/ml, EDTA 50 mM et Tris HCl 100 mM, pH 8,0) dans chaque puit. L'ensemble est incubé à 37°C pendant 25 min. Ensuite, le lysozyme est éliminé par filtration et les cellules sont lavées avec le PBS.

2.12.2.4. Hybridation

Avant de passer à l'étape d'hybridation, les cellules fixées et perméabilisées sont déshydratées par trois bains successifs d'éthanol à 50, 80 et 100 % pendant trois minutes. Puis, le filtre est séparé du bloc pour être séché à l'air. Il est ensuite replacé dans le système.

200 ng de chacune des sondes (la sonde générale EUB338 et une sonde spécifique sont utilisées simultanément) dans un volume final de 4 μl sont ajoutés à 36 μl de la solution d'hybridation (formamide 15 %, NaCl 1 M, SDS 0,01 % et Tris-HCl 50 mM à pH 8,0) et déposés

sur chaque échantillon. L'hybridation est effectuée à 46°C pendant 2 h 30 en atmosphère humide.

Après hybridation, les filtres sont placés dans un tampon de lavage (NaCl 200 mM, EDTA 5 mM, Tris-HCl 50 mM à pH 8,0 et SDS 0,01 %) pendant 10 min à 46°C pour éliminer les sondes en excès ou fixées de manière non spécifique.

2.12.2.5. Observations

Les préparations sont observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Nikon, Japon) équipé de filtres permettant la sélection des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de la rhodamine (rouge), de la fluorescéine (vert) et du DAPI (bleu). Le microscope est également muni d'une caméra reliée au logiciel d'analyse d'images VISIOLAB 1000 (BIOCOM).

III- TECHNIQUES DE BIOCHIMIE

3.1. Préparation des extraits et des fractions cellulaires pour détecter les activités autolytiques

3.1.1. Extraits SDS

Quatre ml de culture en phase exponentielle de croissance sont centrifugés (13000 g, à 4°C pendant 10 min). Le culot est lavé avec de l'eau stérile et repris dans 40 µl de solution dénaturante contenant en concentrations finales ; Tris HCl 62,5 mM à pH 6,8, SDS 1 %, DTT 50 mM, glycérol 10 %, bleu de bromophénol 0,01 %. L'ensemble est porté à ébullition pendant 3 min. Les débris insolubles sont éliminés par centrifugation pendant 10 min à 13000 g. Le surnageant (extrait SDS) est récupéré. Il peut être conservé au congélateur tout en conservant son activité.

3.1.2. Surnageant de culture

Dans certains cas, le surnageant de culture est d'abord filtré sur des filtres stériles de 0,45 µm (Millipore). Il est ensuite concentré 25 fois à l'aide de concentrateurs Centriplus (Amicon, Beverlay, USA) présentant un seuil de coupure à 10000 Da.

Dans d'autres cas, le surnageant de culture est dialysé pendant la nuit à 4°C et concentré sept fois à l'aide d'un évaporateur sous vide (Savant Instruments, Farmingdale, NY). Le surnageant est ensuite repris dans une solution dénaturante concentrée 5 fois avant d'être porté à l'ébullition pendant 3 min.

3.1.3. Extraits au chlorure de lithium (LiCl)

Les cellules obtenues par centrifugation de 50 ml de culture sont resuspendues dans 250 µl d'une solution contenant 5 M de chlorure de lithium (agent chaotrope), Tris HCl 50 mM à pH 7,5 et du phenylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) 1 mM (inhibiteur de protéases à sérine). La suspension est incubée à 4°C pendant 30 min. Les cellules sont éliminées par centrifugation et le surnageant est dialysé contre une solution de Tris HCl 50 mM à pH 7,5 et LiCl 100 mM.

3.1.4. Préparation de parois et de fractions cytoplasmiques

Les cellules provenant de la centrifugation de 200 ml de culture sont remises en suspension dans 20 ml de tampon phosphate de potassium (50 mM, pH 6,5 à 4°C) contenant 1 mM de PMSF. Les cellules sont cassées par dix passages au sonicateur (Branson sonifier, USA) avec des intervalles de 20 s. Les cellules qui ne sont pas cassées, sont éliminées par centrifugation (3000 g pendant 15 min à 4°C). Le surnageant est centrifugé de nouveau (20000 g pendant 30 min à 4°C). Le surnageant est gardé en tant qu'extrait cytoplasmique. Le culot est lavé deux fois avec du tampon phosphate de potassium (50 mM, pH 6,5) et constitue une préparation de parois actives.

3.2. Préparation des substrats pour analyser les activités autolytiques

Les cellules de différentes espèces bactériennes obtenues par centrifugation de 500 ml de culture sont récupérées en fin de phase exponentielle de croissance. Elles sont lavées deux fois avec de l'eau distillée. Les culots sont repris dans 20 ml d'eau distillée avant d'être lyophilisés.

Les cellules des bactéries lyophilisées sont resuspendues à 10 % final dans l'eau distillée et autoclavées à 120°C pendant 20 min.

3.3. Techniques électrophorétiques

3.3.1. Electrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Les électrophorèses SDS PAGE sont réalisées selon la méthode de LAEMMLI (1970) avec un appareil " mini protean cell unit " (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA) et des gels de 75 x 55 mm.

Les gels de 10 à 15 % d'acrylamide sont utilisés. Ils sont préparés à partir d'une solution d'acrylamide mère contenant 30 % d'acrylamide et 0,8 % de bis-acrylamide. Ils sont formés d'un gel de concentration de protéines à 4,5 % d'acrylamide, pH 6,8 et d'un gel de séparation à pH 8,8 contenant 10 à 15 % d'acrylamide et 0,1 % de SDS. La migration s'effectue dans un tampon Tris-glycine (respectivement 6 g/l et 28,8 g/l) à pH 8,3 contenant 0,1 % de SDS.

Après dépôt des échantillons, la migration est effectuée à 100 V jusqu'à ce que le témoin de migration atteigne le haut de gel de séparation puis le voltage est augmenté à 200 V.

3.3.2. Electrophorèse SDS-PAGE renaturante

La technique d'électrophorèse SDS-PAGE renaturante a été utilisée pour la détection des activités autolytiques (POTVIN et coll. 1988). Des cellules autoclavées de *M. lysodeikticus* ATCC 4698 (0,2 %), ou des cellules d'autres bactéries (0,4 %) ont été incorporées dans le gel d'électrophorèse SDS-PAGE comme substrat des enzymes bactériolytiques.

Après migration des protéines, les gels sont lavés pendant 30 min dans un bain de 250 ml d'eau distillée sous agitation douce. Ils sont ensuite transférés dans le tampon de renaturation contenant 50 mM de phosphate de potassium à pH 6,5 et 0,1 % ou 1 % de Triton X100. Le Triton X100 permet d'éliminer le SDS fixé sur les protéines en le remplaçant par un détergent non ionique. Les gels sont incubés à 37°C pendant 16 h sous agitation douce pour renaturer les enzymes. Les gels sont ensuite colorés dans une solution de bleu de méthylène à 0,1 % préparée dans 0,01 % de KOH, pendant 2 h sous agitation douce. Ils sont ensuite décolorés dans un bain d'eau distillée. Les activités autolytiques apparaissent sous forme de bandes claires sur fond opaque.

L'influence de cations mono et divalents sur la renaturation des bandes d'activités

autolytiques est testée en ajoutant les cations suivants dans le tampon de renaturation : NaCl (100 mM), KCl (100 mM), CaCl₂ (10 mM), HgCl₂ (10 mM), MgCl₂ (10 mM) and MnCl₂ (10 mM).

3.4. Expression et purification des protéines recombinantes

Les protéines exprimées à partir du vecteur pQE30 possèdent une extrémité composée de six résidus histidine qui permet leur purification en une seule étape par chromatographie d'affinité sur résine acide nickel-nitrilotriacétique (Ni-NTA ; Qiagen). Les étapes de l'induction et de purification des protéines recombinantes sont réalisées selon les instructions du fournisseur.

3.4.1. Induction de l'expression des protéines recombinantes

3.4.1.1. Induction chez *E. coli* par IPTG

Les cellules de *E. coli* XL1-Blue portant le plasmide pTIL343 qui contient le gène *lnmur* sans son peptide signal (ssPS) potentiel sont cultivées dans le milieu LB contenant ampicilline et tétracycline jusqu'à A_{650nm} comprise entre 0,5 et 0,7. L'IPTG est alors ajouté à la concentration finale de 1 mM. L'incubation est poursuivie pendant 4 h. L'induction est contrôlée par électrophorèse SDS-PAGE en utilisant les extraits SDS.

3.4.1.2. Induction par la nisine

Les cellules *L. lactis* MG1363 portant les plasmides pTIL346 et pTIL344 contenant respectivement le gène codant pour la protéine LnMur et celui de la protéine chimère sont cultivées pendant une nuit en milieu M17 Glu en présence des antibiotiques ampicilline et érythromycine. Il en est de même pour les cellules de *L. lactis* MG1363 portant les plasmides NZ9520 et NZ9530. Dans le cas de la souche *L. lactis* NZ9000 qui porte les gènes *nisRK* dans son génome, les transformations sont faites uniquement avec les plasmides pTIL346 et pTIL344. Le milieu est inoculé à 2 % avec la préculture et incubé jusqu'à ce que la A_{650nm} soit comprise entre 0,5 et 0,8. La nisine est alors ajoutée à une concentration finale comprise entre 2 à 500 ng/ml dans le milieu en fonction de l'expérience à réaliser. De la même façon, l'induction est testée par SDS-PAGE.

3.4.2. Purification des protéines recombinantes

La protéine LnMur (ssPS) est exprimée sous forme insoluble. Le lysat est préparé dans des conditions dénaturantes.

Les cellules XL1-Blue sont resuspendues au 1/10 dans un volume de tampon contenant NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM et de l'urée 8 M à pH 8,0. Elles sont placées sous agitation pendant 1 h à température ambiante. La suspension est centrifugée à 10000 g pendant 20 min. Le surnageant est analysé par SDS-PAGE. 600 μl de lysat sont chargés sur la mini-colonne contenant la résine Ni-NTA (Quiagen) préalablement équilibrée avec le tampon utilisé pour resuspendre les cellules. Les protéines liées de façon non spécifiques sont éliminées par deux lavages avec le tampon composé de NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM et l'urée 8 M à pH 6,3. La protéine purifiée est alors éluée dans 200 μl de tampon composé de NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM et l'urée 8 M à pH 4,5. La pureté de la protéine est vérifiée par SDS-PAGE et sa concentration est déterminée.

3.5. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de BRADFORD (1976). Il repose sur la mesure de l'absorbance à 595nm résultant de la fixation du bleu de Coomassie G250 sur les protéines en milieu acide. Les étalonnages sont réalisés avec l'albumine de sérum bovin.

3.6. Dosage des groupements aminés libres

La méthode (GHUYSEN et coll., 1966) repose sur la formation de dinitrophénylaminoacide suite à la réaction du dinitrofluorobenzène avec les résidus (-NH₂) libres. Ce premier donne une couleur jaune qui absorbe à une longueur d'onde de 420 nm.

Les solutions utilisées sont : le tétraborate de potassium (0,5 %), le dinitrofluorobenzène pur et l'HCl 2 N.

A 100 μl d'échantillon sont ajoutés 25 μl de tétraborate de potassium et 10 μl de dinitrofluorobenzène. Le mélange est laissé 30 min à 60°C. 800 μl de HCl sont ajoutés pour arrêter la réaction. La lecture est effectuée à 420 nm. La gamme étalon est effectuée avec la glycine.

3.7. Dosage des sucres réducteurs

Le dosage des sucres réducteurs libérés suite à la lyse de la paroi est effectué selon la technique décrite par THOMPSON et SHOCKMAN (1968). Les solutions utilisées sont : le ferricyanure de potassium (0,05 %), le carbonate de cyanure (1,325 g de Na_2CO_3 , 0,1625 g de KCN dans 250 ml d'eau) et l'acide sulfurique (0,1 N). Le réactif coloré est composé de : sulfate d'ammonium ferrique (15 g/l), de dodécyl sulfate de sodium (3 g/l), de polyvinyl pyrrolidone (10 g/l) et d'acide sulfurique (0,05 N).

A 100 μl d'échantillon, on ajoute successivement 100 μl de ferricyanure de potassium, et 100 μl de carbonate de cyanure. L'échantillon est chauffé 15 min à 100°C et refroidi sous un courant d'eau froide. 250 μl d'acide sulfurique et 200 μl de réactif coloré sont ajoutés et mélangés. La lecture est effectuée après 15 min à 700nm. La gamme étalon est effectuée avec la glucosamine.

IV. ANALYSES DES DONNEES

4.1. Analyse des séquences nucléotidiques

Les séquences nucléotidiques et les séquences d'acides aminés sont analysées à l'aide d'un programme d'analyse de séquences « Genetics Computer Group (GCG) – Version 9.1 » (University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, WI, USA). Les recherches d'homologie sont réalisées dans les banques de données GenBank (ADN) et SWISSPROT (protéine) au moyen des programmes BLAST et FASTA. Le programme CLUSTAL W est utilisé pour réaliser des alignements multiples des séquences protéiques. La présence d'un peptide signal a été détectée grâce aux outils protéomiques disponibles sur le serveur internet de l'Institut Suisse de bioinformatique (<http://www.expasy.ch>).

4.2. Analyse des profils RAPD

Les négatifs des films sont numérisés à l'aide d'un numériseur (Hewlet Packard Scan jet II CX/T). Le traitement de l'image est ensuite effectué comme décrit par TAILLIEZ et coll.

(1998) grâce au logiciel GelCompar (Applied Maths, Kortrijk, BELGIQUE). Ce logiciel permet :

- de normaliser les profils afin de minimiser les différences de migration entre gels,
- de calculer les coefficients de similitude de Pearson (SNEATH et SOKAL, 1973) entre les profils en tenant compte du nombre, de la position et de l'intensité des différentes bandes RAPD,
- de regrouper ces profils en utilisant la méthode d'agrégation hiérarchique UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) (SOKAL et MICHENER, 1958).

4.3. Recherche de corrélations entre données moléculaires et non moléculaires

La recherche de corrélations entre différents types de données (Umetri, 1996; MATTE-TAILLIEZ et coll., 2000) est effectuée à l'aide du logiciel SIMCA-P (Umetri, Suède) incluant la régression PLS.

4.4. Analyse polyphasique

La classification des souches en utilisant simultanément différents types de données (RAPD, phénotypes, origine d'isolement etc.) est effectuée à l'aide du logiciel BioNumériques (Applied Maths, Belgique)

4.5. Traitement des séquences de l'ADNr 16S et construction d'arbres phylogénétiques

Les séquences partielles (~600 pbs / 1400 pbs) obtenues sont alignées. Le consensus déduit est comparé aux séquences archivées dans la banque RDP (Ribosomal Database Project ; <http://www.cme.msu.edu/RDP>). Les arbres phylogénétiques sont construits en incorporant des séquences référencées dans RDP ou GenBank et les nouvelles séquences obtenues lors de ce travail par le programme GeneCompar (Applied Maths, Kortrijk Belgique).

RESULTATS

PARTIE I

INTRODUCTION

I - CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES LEUCONOSTOCS

Les techniques de taxonomie classique basées sur l'analyse de critères biochimiques et/ou physiologiques ne permettent pas la classification précise des souches de leuconostoc dans les différentes espèces décrites (GARVIE, 1960; MILLIERE et coll., 1989). Quelques tests sont cependant utiles pour classer des souches dans le genre *Leuconostoc* : ces bactéries sont hétérofermentaires strictes, elles produisent l'isomère de l'acide lactique D(-) et n'hydrolysent pas l'arginine. Ces deux derniers critères permettent d'éviter le classement erroné des souches de leuconostoc dans le groupe des lactobacilles hétérofermentaires stricts ou dans celui très proche au plan phylogénétique des *Weissella*. En général, les souches appartenant à ces deux derniers groupes produisent de l'acide lactique DL et hydrolysent l'arginine (à l'exception des souches de *W. paramesenteroides* classées précédemment dans l'espèce *Ln. paramesenteroides*).

Au cours de ce travail, nous avons utilisé quatre caractères phénotypiques proposés par GARVIE (1986) pour classer les souches de manière présomptive dans les espèces et sous-espèces suivantes: *Ln. lactis*, *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *W. paramesenteroides* (voir article de ce chapitre). Ces caractères sont les suivants : production de dextrane à partir de saccharose, production d'acide à partir d'arabinose, de tréhalose et de fructose. Les résultats obtenus par cette approche ont permis de classer 221 souches de leuconostoc de la manière suivante : *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, 102; *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, 81; *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*, 13; *Ln. lactis*, 3 et *W. paramesenteroides*, 12. Neuf souches présentent un phénotype atypique ne permettant pas leur classification à l'aide de ce schéma. Le phénotype d'une souche, *Ln. fallax* 17D, n'a pas été établi.

II – IDENTIFICATION BACTERIENNE PAR APPROCHES MOLECULAIRES

Les résultats de cette étude sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8. Identification des 82 souches supposées appartenir au genre *Leuconostoc* par différentes techniques moléculaires

Souches	Identification par RAPD Groupe RAPD : voir article fig. 1a ou 1b : voir ce chapitre	Identification par ADNr 16S	Identification par HIS avec la sonde spécifique du genre <i>Leuconostoc</i>
2E	<i>Ln. citreum</i> (G6)	<i>Ln. citreum</i>	+
2F	<i>Ln. mesenteroides</i> (i)	ND	+
2G	<i>Ln. citreum</i> (G6)	<i>Ln. citreum</i>	+
2J	<i>Ln. citreum</i> (G6)	<i>Ln. citreum</i>	+
2M	<i>Ln. mesenteroides</i> (G4)	ND	+
9E	<i>Ln. citreum</i> (G6)	<i>Ln. citreum</i>	+
9L	<i>Ln. citreum</i> (G6)	<i>Ln. citreum</i>	+
9M	<i>Ln. mesenteroides</i> (G1)	ND	+
10J	<i>Ln. mesenteroides</i> (G1)	ND	+
10L	atypique (fig. 1b)	<i>Ln. mesenteroides</i>	+
10M	atypique (fig. 1b)	<i>Ln. mesenteroides</i>	+
11A	<i>Ln. mesenteroides</i> (G1)	ND	+
11B	<i>Ln. mesenteroides</i> (G1)	ND	+
13M	<i>Ln. mesenteroides</i> (G1)	ND	+
13O	<i>Ln. mesenteroides</i> (G3)	ND	+
15B	<i>Ln. citreum</i>	<i>Ln. citreum</i>	+
17A	<i>Ln. mesenteroides</i> (i3)	ND	+
17C	<i>Ln. mesenteroides</i> (G4)	ND	+
18B	<i>Ln. mesenteroides</i> (G4)	ND	+
18S	atypique (fig. 1b)	ND	+
20L	<i>Ln. mesenteroides</i> (G3)	ND	+
20M	<i>Ln. mesenteroides</i> (G3)	ND	+
22K	atypique (fig. 1b)	ND	+
22R	<i>Ln. citreum</i>	<i>Ln. citreum</i>	+
23N	<i>Ln. mesenteroides</i> (i)	ND	+
24G	<i>Ln. mesenteroides</i> (i)	ND	+
24H	<i>Ln. mesenteroides</i> (i)	ND	+
24S	<i>Ln. mesenteroides</i> (G1)	ND	+
25N	<i>Ln. mesenteroides</i> (i)	ND	+
26A	<i>Ln. mesenteroides</i> (G1)	ND	+
48B	<i>Ln. mesenteroides</i> (G1)	ND	+
48I	<i>Ln. mesenteroides</i> (G1)	ND	+
50I	<i>Ln. mesenteroides</i> (G4)	ND	+
50M	atypique (i1)	<i>Ln. mesenteroides</i>	+
54E	<i>Ln. mesenteroides</i> (G1)	ND	+
54F	<i>Ln. mesenteroides</i> (G3)	ND	+
54J	<i>Ln. mesenteroides</i> (G1)	ND	+
54M	<i>Ln. mesenteroides</i> (G1)	ND	+
54S	<i>Ln. mesenteroides</i> (G1)	ND	+
CNRZ426	<i>Ln. mesenteroides</i> (i2)	ND	+
CNRZ749 ^T	<i>Ln. mesenteroides</i> (G1)	ND	+
CNRZ1746	<i>Ln. lactis</i> (G7)	<i>Ln. lactis</i>	+
CNRZ1750	<i>Ln. mesenteroides</i> (G5)	ND	+
CNRZ1751	<i>Ln. mesenteroides</i> (G5)	ND	+
LMG7940	<i>Ln. lactis</i> (G7)	ND	+
LMG9824 ^T	<i>Ln. citreum</i> (G6)	ND	+
LMG11482 ^T	<i>Ln. pseudomesenteroides</i> (fig. 1b)	ND	+
LMG11498 ^T	<i>Ln. carnosum</i>	ND	+
LMG18279 ^T	<i>Ln. gelidum</i>	ND	+
L4	<i>Ln. mesenteroides</i> (G1)	ND	+

Tableau 8 (suite)

Souches	Identification par RAPD Groupe RAPD : voir article fig. 1a ou 1b : voir ce chapitre	Identification par ADNr 16S	Identification par HIS avec la sonde spécifique du genre <i>Leuconostoc</i>
5	<i>Lb. rhamnosus</i> (fig. 1a)	<i>Lb. rhamnosus</i>	-
10U	atypique { <i>Ln. mesenteroides</i> (fig. b)}	<i>Ln. mesenteroides</i>	-
15A	<i>Lb. casei</i>	ND	-
15D	<i>Ln. lactis</i> (fig. 1b)	ND	-
15H	<i>Ln. lactis</i> (fig. 1b)	<i>Ln. lactis</i>	-
17	<i>Ent. faecalis</i> (fig. 1a)	<i>Ent. faecalis</i>	-
17D	<i>Ln. fallax</i> (i6)	<i>Ln. fallax</i>	-
18M	atypique { <i>Ln. mesenteroides</i> (fig. 1b)}	<i>Ln. mesenteroides</i>	-
22L	atypique { <i>Lb. casei</i> (fig. 1b)}	ND	-
22M	atypique { <i>Lb. casei</i> (fig. 1b)}	<i>Lb. casei</i>	-
24C	<i>Lb. plantarum</i> (fig. 1a)	ND	-
24J	<i>Lb. plantarum</i> (fig. 1a)	ND	-
24K	<i>Lb. plantarum</i> (fig. 1a)	ND	-
24P	<i>Ent. faecalis</i> (fig. 1a)	<i>Ent. faecalis</i>	-
26	<i>Lb. fermentum</i> (fig. 1a)	<i>Lb. fermentum</i>	-
26C	<i>Lb. plantarum</i> (fig. 1a)	ND	-
26L	<i>Lb. plantarum</i> (fig. 1a)	<i>Lb. plantarum</i>	-
29	atypique	<i>Lb. pentosus/Lb. plantarum</i>	-
32	atypique (fig. 1b)	<i>W. viridescens</i>	-
33	atypique { <i>Ent. faecalis</i> (fig. 1b)}	<i>Ent. faecalis</i>	-
34	atypique { <i>Ent. faecalis</i> (fig. 1b)}	<i>Ent. faecalis</i>	-
37	atypique { <i>Ent. faecalis</i> (fig. 1b)}	<i>Ent. faecalis</i>	-
49R	<i>Ent. faecalis</i> (fig. 1a)	ND	-
50P	atypique { <i>Ln. mesenteroides</i> (fig. 1b)}	<i>Ln. mesenteroides</i>	-
51E	atypique { <i>Ln. mesenteroides</i> (fig. 1b)}	<i>Ln. mesenteroides</i>	-
51F	atypique { <i>Ln. mesenteroides</i> (fig. 1b)}	ND	-
51O	atypique { <i>Ent. faecalis</i> (fig. 1b)}	<i>Ent. faecalis</i>	-
54P	<i>Ent. faecalis</i> (fig. 1a)	<i>Ent. faecalis</i>	-
54R	<i>Ent. faecalis</i> (fig. 1a)	<i>Ent. faecalis</i>	-
54T	<i>Ent. faecalis</i> (fig. 1a)	<i>Ent. faecalis</i>	-
CNRZ1753	<i>Ln. mesenteroides</i> (G1)	ND	-
LMG9852 ^T	<i>W. paramesenteroides</i> (i5)	<i>W. paramesenteroides</i>	-

ND : non déterminé. Les groupes RAPD G1 à G7, i et les profils uniques i1, i2, i3, i5 et i6 sont ceux décrits dans l'article de ce chapitre.

2.1. Typage moléculaire des souches par RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA fingerprinting*)

Pour classer et identifier des centaines de souches bactériennes, il est intéressant d'utiliser des techniques de typage moléculaire. La technique RAPD (WELCH et McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et coll., 1990) a été choisie car elle permet de mettre en évidence la diversité moléculaire au sein d'une même espèce (regroupement des profils similaires, détection des profils peu représentés) et, a fortiori, de séparer des souches appartenant à des espèces proches. Ainsi, 29 souches de l'espèce *Ln. citreum* ont été détectées dans notre collection de *Ln. mesenteroides*. Elles ne pouvaient pas être identifiées par les critères phénotypiques utilisés. D'autre part, 10 des 11 souches classées dans l'espèce *W. paramesenteroides* par ces mêmes tests sont maintenant considérées comme des variants de *Ln. mesenteroides* non producteurs de dextrane, la onzième est classée dans l'espèce *Ln. citreum*.

En plus des 221 souches présentées dans l'article de ce chapitre, les profils RAPD de 50 souches de notre collection classées sous le nom *Leuconostoc* ont été réalisés. Ces profils sont différents de ceux déjà décrits dans l'article (excepté ceux des deux souches *Ln. lactis* 15D et 15H identifiées plus récemment) et ont fait l'objet d'une étude complémentaire. Ils ont tout d'abord été comparés à l'ensemble des profils RAPD de la banque de données de la collection CNRZ. Vingt-trois souches ont ainsi été reclassées dans les espèces suivantes, figure 12a : souche 5 (*Lb. rhamnosus*); souche 26 (*Lb. fermentum*); souches 23F, 24C, 24J, 24K, 26C, 26I, 26K, 26L (*Lb. plantarum*); souches 17, 24P, 36, 49R, 51S, 51U, 54P, 54R, 54T, 52A, 52C (*Ent. faecalis*); figure 12b : souches 15D, 15H (*Ln. lactis*). Aucun profil n'est apparenté à ceux obtenus pour les trois souches de collection de l'espèce *Ln. pseudomesenteroides* (Collection LMG, Gand, Belgique). Il est à noter que ces souches présentent des profils RAPD complètement différents les uns des autres. De même, aucun profil n'est apparenté à ceux des souches de *W. confusa* de la collection CNRZ, autre espèce capable de produire des dextranes à partir du saccharose.

2.2. Identification des souches par leur séquence d'ADNr 16S

A partir de l'analyse RAPD, 31 souches représentatives ont été sélectionnées (figures 12a et 12b). Les séquences des ADNr 16S correspondantes ont été établies et comparées à

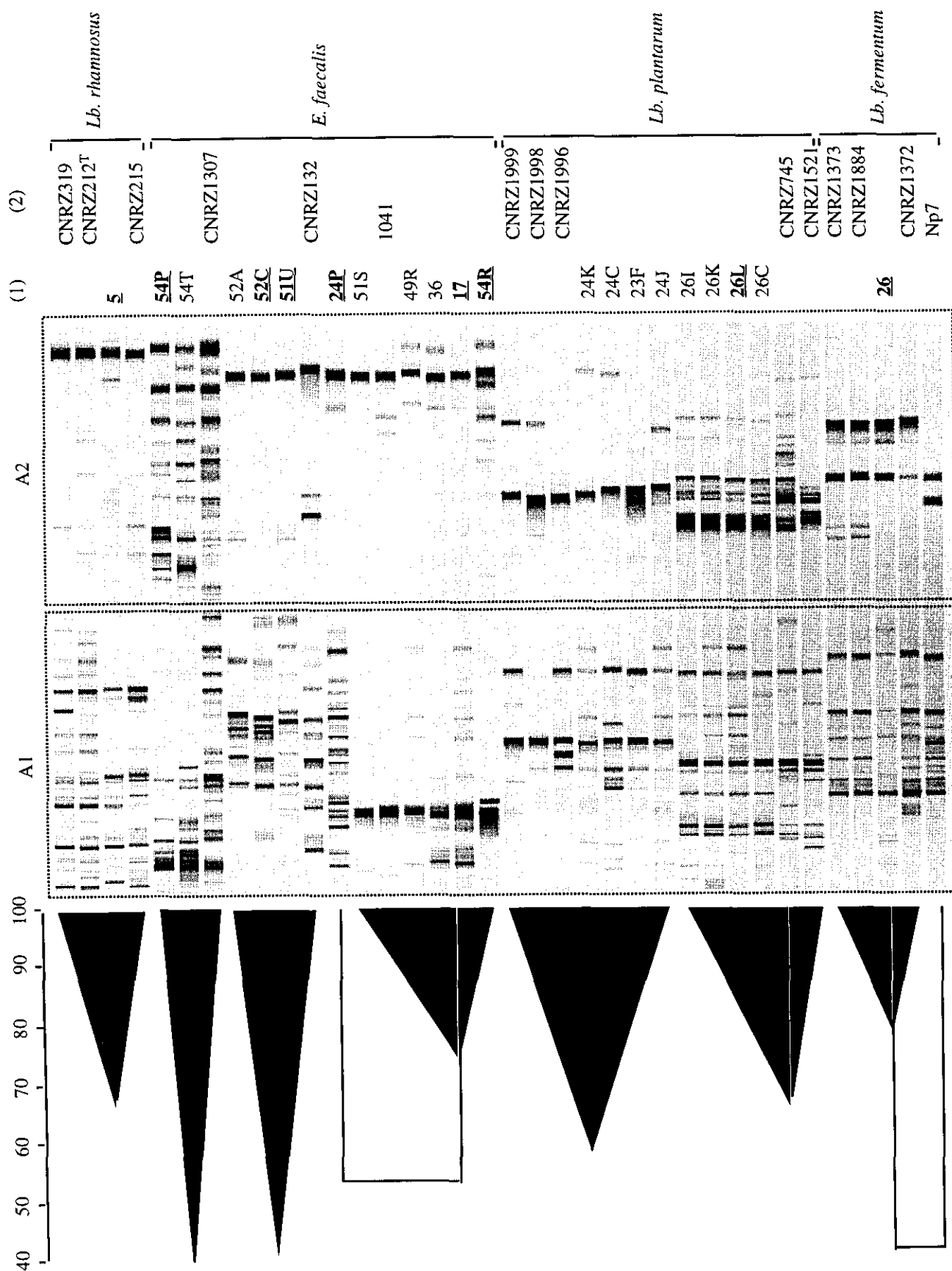


Figure 12a : Comparaison des profils RAPD de souches initialement classées dans le genre *Leuconostoc* (1). Ces profils sont comparés à ceux de souches de référence (Collection CNRZ) (2). Deux amorces A1 et A2 ont été utilisées. L'échelle correspond aux valeurs du coefficient de similitude de Pearson. Les triangles noirs correspondent à des ensembles de profils ayant plus de 40 % de similitude. Les numéros soulignés correspondent aux souches dont l'ADNr16S a été séquencé. L'espèce indiquée résulte de la concordance entre l'identification obtenue par RAPD et celle obtenue par les séquences d'ADNr16S.

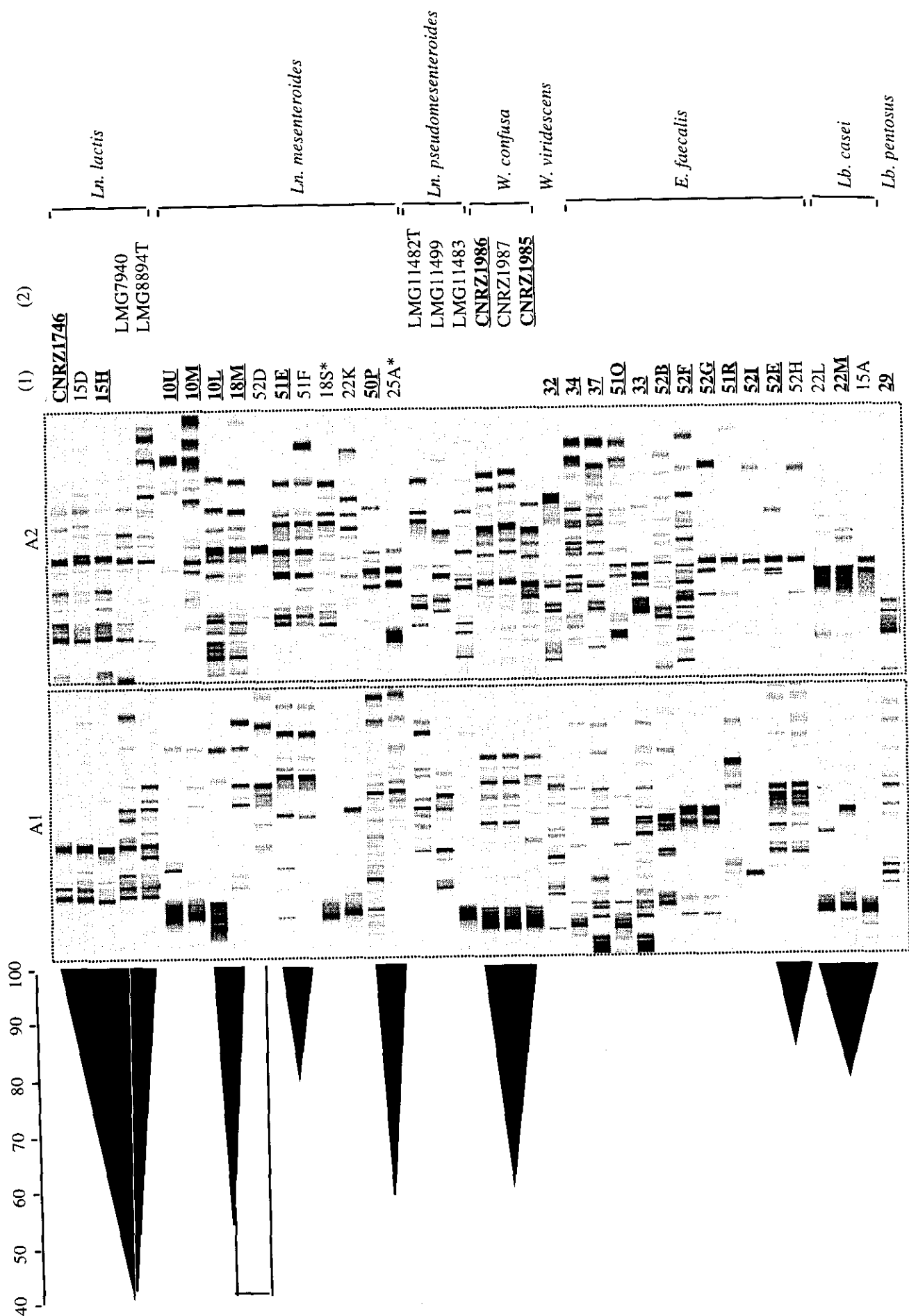


Figure 12b : Comparaison des profils RAPD de souches initialement classées dans le genre *Leuconostoc* (1). Ces profils sont comparés à ceux de souches de référence (Collections CNRZ et LMG) (2). Voir aussi la légende de la figure 12a.

celles présentes dans la banque internationale RDP (Ribosomal Data Project database; MAIDAK et coll., 1999). Les identifications obtenues ont été reportées dans les figures 12a et 12b. Des souches d'entérocoques (*Ent. faecalis*) et des lactobacilles du groupe II (*Lb. plantarum*) ont été fréquemment identifiées. Une souche de *Ln. fallax* (17D) (voir article ce chapitre), de *Lb. fermentum* (26), de *Lb. pentosus* (29), de *Lb. rhamnosus* (5), de *W. viridescens* (32), trois souches de *Ln. lactis* (15D, 15H et CNRZ1746) et de *Lb. casei* (15A, 22L et 22M) font partie des espèces rarement rencontrées dans cette collection. Douze souches de *Ln. mesenteroides* (10L, 10M, 10U, 18M, 18S, 25A, 50P, 51E, 51F, 51K, 51T, 52D) aux profils RAPD peu représentés ont aussi été identifiées par cette technique.

L'identification des souches par l'analyse des séquences d'ADNr 16S est très performante car elle ne nécessite pas de connaissances taxonomiques a priori sur ces souches et les banques (RDP et GenBank) contiennent un grand nombre de séquences qui croît de manière exponentielle.

2.3. Identification bactérienne rapide au niveau cellulaire par hybridation *in situ* (HIS)

Pour confirmer ou infirmer le classement par taxonomie classique ou typage moléculaire d'un grand nombre de souches d'une collection dans une espèce ou dans un genre, il est possible d'utiliser l'identification rapide au niveau cellulaire par hybridation *in situ*. Cette technique est basée sur l'hybridation d'une sonde spécifique couplée à un fluorochrome (rhodamine ou fluorescéine) à l'ARNr de la bactérie. Les cellules en croissance exponentielle sont récoltées par filtration. Elles sont ensuite fixées par une solution de paraformaldéhyde de manière à conserver l'intégrité de leur morphologie. Les bactéries à Gram positif sont traitées par une solution de lysozyme afin de perméabiliser les parois. Les préparations sont déshydratées puis mises en contact avec la ou les sondes dans un tampon d'hybridation approprié. Après incubation à la température adaptée, les préparations sont lavées pour éliminer les sondes non fixées. Elles sont ensuite observées au microscope à épifluorescence. Vingt-quatre cultures peuvent être traitées par jour et par personne.

Les sondes ciblent les régions de l'ARNr 16S (ou 23S) conservées (sondes générales) ou variables (sondes spécifiques de groupes, de genres ou d'espèces). Dans notre cas, nous avons utilisé la sonde générale Eub338 (AMANN et coll., 1990) comme témoin d'hybridation et une sonde composée de 18 bases spécifiques du genre *Leuconostoc* à l'exception de *Ln. fallax*. Cette sonde a été définie au laboratoire (P. TAILLIEZ, communication personnelle)

après alignement des séquences d'ADNr16S correspondant aux genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella* (voir article de ce chapitre) et sur la base des connaissances du laboratoire sur l'accessibilité des régions variables de l'ARNr 16S par des sondes *in situ*. La spécificité de cette sonde a été évaluée en utilisant la fonction "*check probe*" de la banque RDP. Elle a aussi été évaluée par expérimentation sur des souches de référence. La technique a ensuite été appliquée à des souches aux profils RAPD très représentés et à celles qui ont un profil atypique. Les résultats sont présentés dans le tableau 8. La sonde spécifique a donné un signal positif avec 50 souches de *Leuconostoc* choisies dans les espèces suivantes : *Ln. mesenteroides*, *Ln. pseudomesenteroides*, *Ln. citreum*, *Ln. lactis*, *Ln. carnosum*, *Ln. gelidum*. Elle a donné un résultat négatif avec 24 souches appartenant aux espèces *Ln. fallax*, *W. paramesenteroides*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosum*, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. fermentum*, et *Ent. faecalis*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'analyse informatique utilisant la banque RDP. Cependant, un résultat négatif a aussi été obtenu avec deux souches de *Ln. lactis* (15D et 15H), cinq souches de *Ln. mesenteroides* au profil RAPD atypique (10U, 18M, 50P, 51E et 51F) et une souche de cette même espèce ayant un profil RAPD typique du groupe G1 (CNRZ1753). Les séquences d'ADNr 16S des souches 10U, 15H, 18M, 50P, 51E montrent que la séquence cible et celle de la sonde spécifique sont totalement complémentaires. Il faudra donc réaliser une nouvelle hybridation pour confirmer ce résultat négatif. S'il y a de nouveau absence d'hybridation, il faudra suspecter un problème d'accessibilité de la région cible dans le cas de ces quelques souches. En hybridation *in situ*, le problème d'accessibilité à certaines régions de l'ARNr 16S est connu (FUCHS et coll. 1998). Cela est lié au fait que, dans cette technique, les ribosomes gardent leur forme native. Les repliements des ARNr et les protéines ribosomales peuvent ainsi masquer certaines régions. De plus, l'accessibilité d'une même région n'est pas identique d'une espèce bactérienne à l'autre (sauf si les séquences cibles sont complètement identiques comme dans le cas de Eub338). Par exemple, il n'a pas été possible de marquer par cette technique la souche type de *W. paramesenteroides* ou des souches de *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*, *Lb. casei* et *Ec. faecalis* à l'aide de sondes complémentaires ciblant la même région que celle choisie pour marquer les cellules de *Leuconostoc*. La séquence primaire de la cible, son repliement et les interactions avec les molécules environnantes jouent probablement un rôle dans son accessibilité. Cependant, à notre connaissance, il n'a pas été confirmé expérimentalement qu'une séquence cible accessible pour un certain nombre de souches pouvait ne pas l'être pour quelques autres.

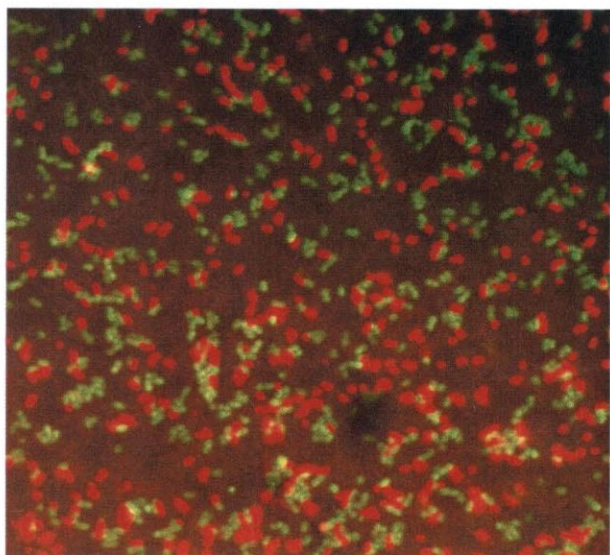


Fig. 13a : Identification des cellules de *Ln. citreum* 22R (en rouge) et de *Lc. lactis* CNRZ105 (en vert) par HIS avec la sonde spécifique du genre *Leuconostoc* couplée à la rhodamine et de l'espèce *Lc. lactis* couplée à la fluorescéine.

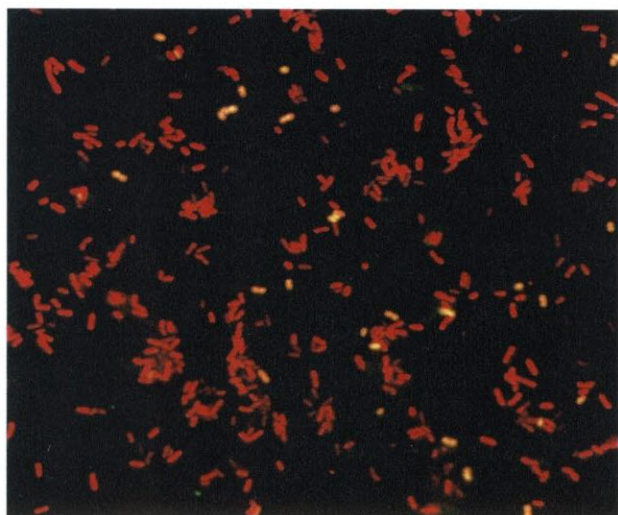


Fig. 13b : Identification des cellules de *Lb. plantarum* CNRZ211 (en rouge) et *Ln. mesenteroides* 50M (en jaune) par HIS en utilisant la sonde générale EUB338 couplée à la rhodamine et la sonde spécifique du genre *Leuconostoc* couplée à la fluorescéine.

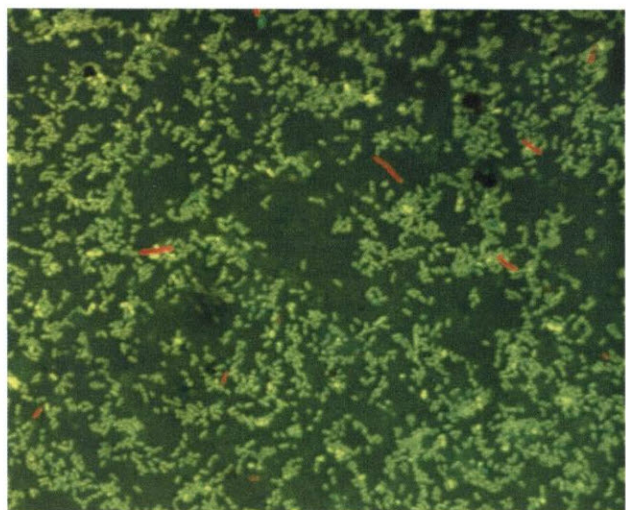


Fig. 13c : Détection de bacilles (rouge) dans une culture de *Leuconostoc* (vert-jaune) par HIS. Les bacilles sont détectées par la sonde générale EUB338 couplée à la rhodamine. Les cellules de leuconostoc sont identifiées par la sonde spécifique de genre couplée à la fluorescéine.

Fig. 13 : Identification des cellules bactériennes par hybridation *in situ*. Observations microscopiques à l'objectif X40. Chaque photo est composée de deux plans superposés. L'un correspond à l'image obtenue à l'aide des filtres excitation/émission de la rhodamine et l'autre correspond à l'image obtenue à l'aide des filtres excitation/émission de la fluorescéine.

Cette technique peut aussi être utilisée pour identifier au niveau cellulaire, deux ou trois espèces en co-culture (figure 13a). Les espèces en présence sont alors marquées par des sondes spécifiques couplées à différents fluorochromes (DAPI, fluorescéine, rhodamine). Il est aussi possible de réaliser des doubles marquages sur les mêmes cellules, l'un avec une sonde générale comme Eub338 et l'autre avec une sonde spécifique (figures 13b et 13c).

Des applications de cette technique sont développées actuellement pour le contrôle des levains industriels lactiques et non lactiques en liaison avec des entreprises. Les sondes adaptées à la technique d'hybridation *in situ* et spécifiques de différentes espèces, genres ou groupes bactériens sont disponibles (Collection CNRZ, I.N.R.A., Jouy-en-Josas) mais les séquences ne sont pas actuellement divulguées.

III – APPLICATION DE L'ANALYSE MULTIVARIABLE A L'ETUDE DE LA BIODIVERSITE DES LEUCONOSTOCS

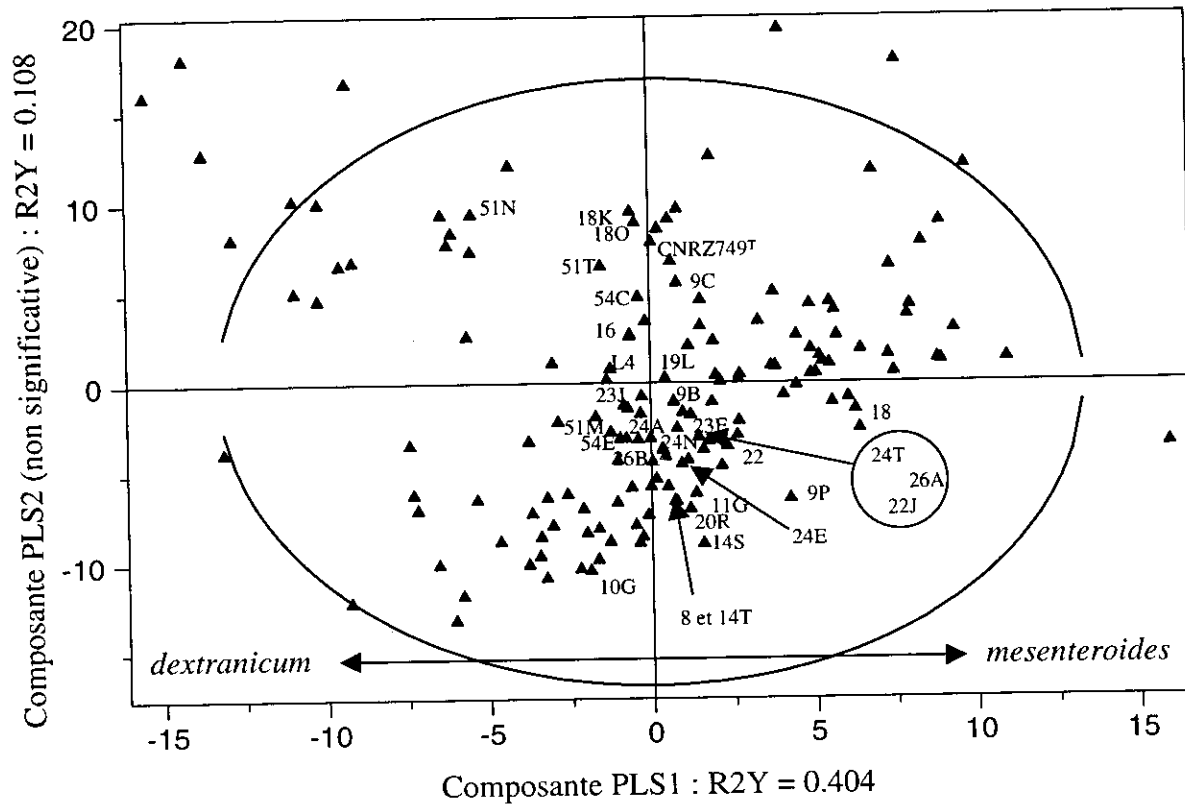
Nous avons utilisé la régression PLS (*Projections on Latent Structures* ou *Partial Least Squares regression*) (MATTE-TAILLIEZ et coll., 2000) pour mettre en évidence des corrélations entre des données moléculaires (les profils RAPD sont choisis comme variables X) et non-moléculaires (les sous-espèces *mesenteroides* ou *dextranicum* de *Ln. mesenteroides* ou l'origine d'isolement des souches (Reblochon) sont choisies comme variables Y). La régression PLS est réalisée à l'aide du logiciel SIMCA-P (U-metri, Suède). Chaque profil RAPD est découpé en 1000 variables correspondant aux 1000 régions du profil. Une valeur correspondant à l'intensité d'une bande RAPD normalisée (obtenue par le logiciel GelCompar, Applied-Maths, Belgique) ou une valeur égale à zéro si cette région du profil ne présente pas de bande constituent ces variables X. La régression PLS a les propriétés suivantes : i) le nombre de variables X peut être très supérieur au nombre d'observations, ii) la méthode répond de manière très satisfaisante au problème de multicollinéarité. De plus, le logiciel SIMCA-P accepte d'analyser les jeux avec données manquantes.

3.1. Recherche de corrélations entre la RAPD et les sous-espèces de *Ln. mesenteroides* par régression PLS

Les sous-espèces de *Ln. mesenteroides* ne peuvent pas être clairement séparées par RAPD en utilisant les deux amorces choisies (voir figure 1a de l'article présenté dans ce

chapitre). Seul le groupe RAPD G2 contient uniquement des souches de la sous-espèce *cremoris*. Cependant, des souches de cette même sous-espèce se trouvent aussi dans les groupes RAPD G1 et G4. Avec la régression PLS, nous avons recherché des régions du profil RAPD corrélées aux sous-espèces *mesenteroides* et *dextranicum* très représentées dans notre collection. La figure 14a présente la répartition des observations (154 souches) dans un plan formé par les deux meilleures composantes PLS obtenues par validation croisée (Umetri, 1996). Seule la composante PLS1 est significative et permet d'expliquer 40.4 % des différences observées sur les variables Y (sous-espèces). Les souches de la sous-espèce *mesenteroides* sont représentées par des triangles situés en majorité sur la droite de la figure alors que les souches de la sous-espèce *dextranicum* sont situées sur la gauche de la figure. La limite des deux populations est matérialisée par un trait vertical situé à l'abscisse 0. Les souches dont le numéro est indiqué sur la figure, constituent un ensemble dont la sous-espèce est mal prédite par RAPD (soit 20 %; 31 souches sur les 154). Ces souches sont identifiées par la carte de la figure 14b. Cette carte représente la corrélation entre le phénotype observé par expérimentation et l'estimation de la probabilité d'appartenir à la sous-espèce *mesenteroides* par RAPD. Ainsi, les souches 51N, 10G à CNRZ749T (*mesenteroides*) seraient plutôt de la sous-espèce *dextranicum* par analyse PLS des profils RAPD et inversement pour les souches 9P, 18, 26B à 22. Les deux amorces RAPD et les deux méthodes d'analyse (hiérarchisée et régression PLS) utilisées ne permettent donc pas la séparation exacte des deux sous-espèces de *Ln. mesenteroides*. Il a aussi été montré que le ribotypage (VILLANI et coll., 1997) et la technique SDS-PAGE (DICKS et coll., 1990; VILLANI et coll., 1997) ne permettaient pas d'identifier les souches de *Ln. mesenteroides* au niveau de la sous-espèce. Ces résultats font penser que les sous-espèces de *Ln. mesenteroides* pourraient plutôt être considérées comme des biovars. Par contre, chez *L. lactis* (POT et coll., 1996; TAILLIEZ et coll., 1998) et *Lb. delbrueckii* (GIRAFFA et coll., 1998; HERTEL et coll., 1993), les sous-espèces (*cremoris-lactis* et *lactis-bulgaricus*, respectivement) peuvent être clairement différenciées par des techniques de typage moléculaire et par des critères phénotypiques. Plus récemment, MOSCHETTI et coll. (2000) ont obtenu un fragment RAPD de 1151 pbs présent dans la majorité (19/21) des profils de souches de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* étudiées. Ces auteurs ont utilisé un fragment interne de 825 pbs comme sonde en hybridation en goutte (dot blot) et ont obtenu un signal avec l'ADN des 19 souches de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* et aucun signal en conditions stringentes avec l'ADN de deux souches de *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum*. Ce test mériterait donc d'être validé sur un plus grand nombre de souches. Cependant, et en accord avec nos résultats, ces auteurs n'ont pas pu sépa-

a)



b)

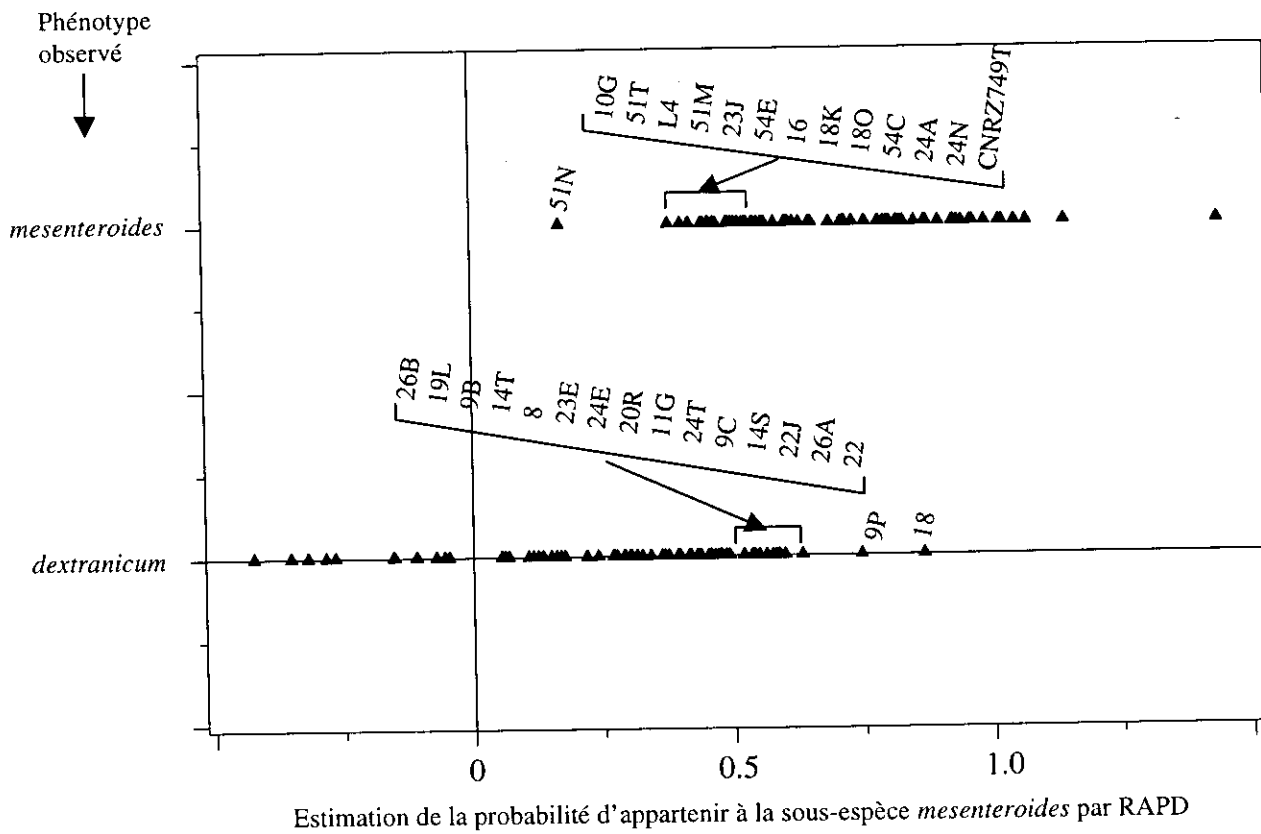
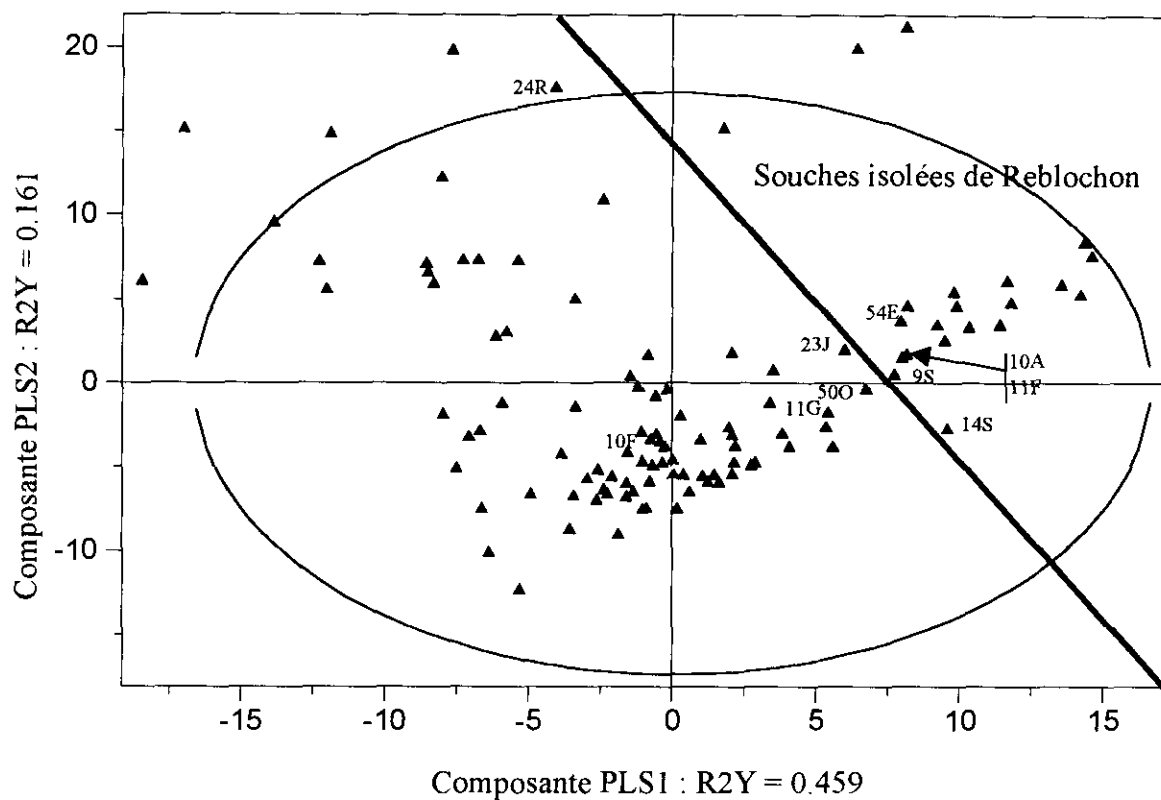


Figure 14.

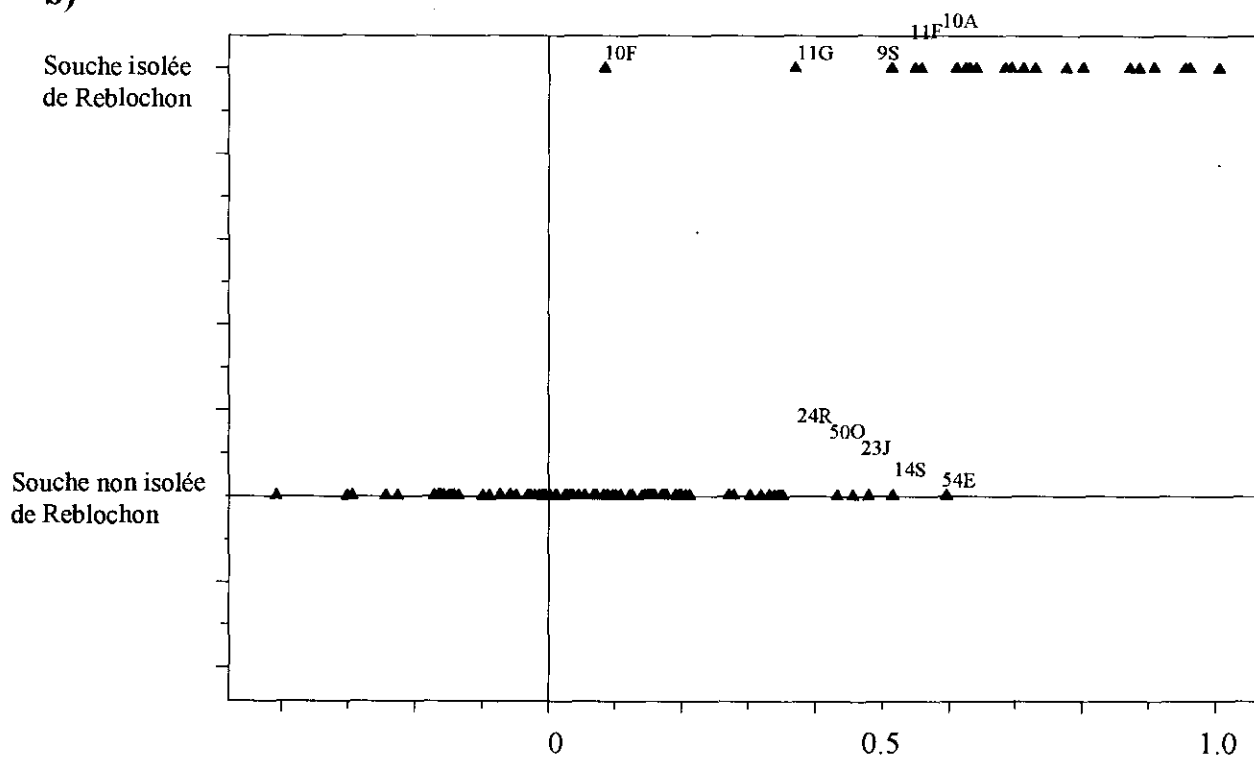
Figure 14. Corrélations entre profils RAPD et les sous-espèces *dextranicum* et *mesenteroides* de *Ln. mesenteroides*. **a)** Carte de répartition des 154 souches figurées par des triangles noirs dans l'espace des variables X (profils RAPD) par projection dans un plan défini par deux composantes PLS1 et PLS2. Seule la composante PLS1 est obtenue par validation croisée (UMETRI, 1996). L'ellipse d'Hotelling (UMETRI, 1996), figurée en trait plein, définit l'espace de confiance à 95% du modèle de régression. La répartition obtenue à partir des données RAPD permet de classer sur la gauche de ce plan, les souches de la sous-espèce *dextranicum* et sur la droite, celles de la sous-espèce *mesenteroides*. Les données RAPD des trois souches 51N, 9P et 18 sont en contradiction avec les sous-espèces proposées. Pour toutes les autres souches dont le numéro est indiqué (20% environ), les données RAPD ne permettent pas de prédire la sous-espèce des souches. **b)** Carte de corrélation entre les données RAPD et les phénotypes observés (sous-espèce). Une estimation de la probabilité d'appartenir à la sous-espèce *mesenteroides* par RAPD est reportée en abscisse; le phénotype observé par les critères phénotypiques est indiqué en ordonnée. Cette carte permet d'identifier les souches dont la sous-espèce est mal prédite par le modèle de régression PLS à partir de la RAPD.

Figure 15. Corrélations entre profils RAPD et l'origine d'isolement (Reblochon) des souches de *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* et subsp. *mesenteroides*. **a)** Carte de répartition des 108 souches dont l'origine est connue, figurées par des triangles noirs dans l'espace des variables X (profils RAPD) par projection dans un plan défini par deux composantes PLS1 et PLS2 obtenues par validation croisée (UMETRI, 1996). L'ellipse d'Hotelling (UMETRI, 1996), figurée en trait plein, définit l'espace de confiance à 95% du modèle de régression. La répartition obtenue à partir des données RAPD permet de classer sur la partie supérieure droite de ce plan, les souches isolées de Reblochon. La souche 10F est classée par RAPD dans le groupe des souches non isolées de Reblochon. Pour les autres souches dont le numéro est indiqué (8 %), les données RAPD ne permettent pas de prédire l'origine des souches. **b)** Carte de corrélation entre les données RAPD et l'origine d'isolement des souches (Reblochon). Une estimation de la probabilité d'être isolée du Reblochon est reportée en abscisse; l'origine d'isolement est indiquée en ordonnée.

a)



b)



Estimation de la probabilité, pour une souche, d'être isolée de Reblochon, par RAPD

Figure 15.

rer par RAPD les profils de *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* (deux souches testées) de ceux de *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (une souche testée).

3.2. Recherche de corrélations entre la RAPD et l'origine d'isolement (Reblochon) des souches de *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* et subsp. *mesenteroides* par régression PLS

C'est pour ce type de fromage que nous avons pu obtenir le meilleur modèle reliant la RAPD et l'origine d'isolement des souches. 108 souches de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* et subsp. *dextranicum* pour lesquelles l'origine précise d'isolement est connue, ont été utilisées. Les souches sont représentées par des triangles noirs situés dans un plan défini par deux composantes PLS expliquant 62 % des variations de la variable Y (origine d'isolement) (figure 15a). Les deux populations (celle isolée de Reblochon et celle qui ne l'est pas) sont séparées par un trait oblique. La carte de la figure 15b indique que les deux souches, 14S et 54E isolées respectivement de Charollais et de serum de Crottin de Chavignol, ont les traits RAPD caractéristiques des souches isolées du Reblochon. Les deux souches 10F et 11G auraient pu être isolées d'autres fromages. Les autres souches dont les numéros sont indiqués (9S, 10A, 11F, 23J, 24R, 50O) se situent à proximité de la ligne de séparation des populations et ne peuvent pas être classées de manière fiable dans l'une ou l'autre des populations. Cependant, la majorité des souches isolées de Reblochon peut être identifiée par RAPD. Il peut donc s'agir d'une population de souches particulièrement adaptées à la technologie de fabrication de ce fromage.

Molecular diversity of Leuconostoc mesenteroides and Leuconostoc citreum isolated from traditional French cheeses as revealed by RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA fragment amplification

RECEP CIBIK, ELODIE LEPAGE and PATRICK TAILLIEZ

Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Recherches Laitières et Génétique Appliquée, Collection CNRZ de bactéries lactiques et de bactéries propioniques, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas Cedex.

A PARAÎTRE DANS "SYSTEMATIC AND APPLIED MICROBIOLOGY", 2000

Subject category: Applied microbiology

Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, U.S.A.; CNRZ, Collection of the Centre National de la Recherche Zootechnique, INRA, Jouy-en-Josas, France; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, Germany; JCM, Japan Collection of Microorganisms, Saitama, Japan; L. , Leuconostoc; LMG, Collection of the Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgium; NCDO, National Collection of Dairy Organisms and NCFB, National Collection of Food Bacteria, Aberdeen, Scotland, U.K.; RAPD, Randomly Amplified Polymorphic DNA; RDP, Ribosomal Database Project; UPGMA, Unweighted Pair Group Method Using arithmetic Averages.

Summary

For a long time, the identification of the Leuconostoc species has been limited by a lack of accurate biochemical and physiological tests. Here, we use a combination of RAPD, 16S rDNA sequencing, and 16S rDNA fragment amplification with specific primers to classify different leuconostocs at the species and strain level. We analysed the molecular diversity of a collection of 221 strains mainly isolated from traditional French cheeses. The majority of the strains were classified as Leuconostoc mesenteroides (83.7 %) or Leuconostoc citreum (14 %) using molecular techniques. Despite their presence in French cheeses, the role of L. citreum in traditional technologies has not been determined, probably because of the lack of strain identification criteria. Only one strain of Leuconostoc lactis and Leuconostoc fallax were identified in this collection, and no Weissella paramesenteroides strain was found. However, dextran negative variants of L. mesenteroides, phenotypically misclassified as W. paramesenteroides, were present. The molecular techniques used did not allow us to separate strains of the three L. mesenteroides subspecies (mesenteroides, dextranicum and cremoris). In accordance with previously published results, our findings suggest that these subspecies may be classified as biovars. Correlation found between phenotypes dextranicum and mesenteroides of L. mesenteroides and cheese technology characteristics suggests that certain strains may be better adapted to particular technological environments.

Key-words: Leuconostoc mesenteroides, Leuconostoc amelibiosum, Leuconostoc citreum, RAPD, 16S rDNA sequence, bacterial identification using PCR amplification

Introduction

Leuconostocs are lactic acid bacteria, that can be found in milk (ABD-EL-MALEK and GIBSON, 1948), dairy products (SHERWOOD, 1939; DEVOYOD and MULLER, 1969; MARET and SOZZI, 1976) and on dairy equipment (DEVOYOD and POUILLAIN, 1988). They have an important technological role in dairy product manufacture (VEDAMUTHU, 1994) more particularly, for aroma production (COGAN, 1975; KEENAN, 1968) or "green" flavor removal (KEENAN and LINDSAY, 1966) and cheese texture (STADHOUDERS, 1986). They are also currently included in many commercial aroma starter cultures (COGAN, 1995). Because several isolates of leuconostoc were also associated with spoilage of chill-stored, raw or cooked vacuum-packed meats (SHAW and HARDING, 1989; BJORKROTH et al., 1998) or generalized infections of immuno-depressed adults (AGUIRRE and COLLINS, 1993; GASSER, 1994), there is a need for precise identification both at strain and species level. For a long time, the identification of Leuconostoc species has been limited by a lack of accurate biochemical and physiological tests (GARVIE, 1960; MILLIERE et al., 1989). Based on results obtained with molecular techniques, the Leuconostoc sphere was finally divided into three closely-related genera: i) the Leuconostoc genus includes eight species and three subspecies: 1) L. mesenteroides (GARVIE, 1986), 2) L. lactis (GARVIE, 1986), 3) L. pseudomesenteroides (FARROW et al. 1989), 4) L. citreum (FARROW et al., 1989) (also known as L. amelibiosum) (SCHILLINGER et al., 1989; TAKAHASHI et al., 1992), 5) L. fallax (MARTINEZ-MURCIA and COLLINS, 1991), 6) L. argentinum (DICKS et al. 1993), 7) L. carnosum and 8) L. gelidum (SHAW and HARDING, 1989), plus L. mesenteroides subspecies mesenteroides, dextranicum and cremoris (GARVIE, 1983), ii) the Oenococcus genus is composed of the unique species O. oeni (GARVIE, 1967; DICKS et al., 1990; DICKS et al., 1995), and iii) the Weissella genus is composed of seven species: W. confusa,

W. halotolerans, W. hellenica, W. kandleri, W. minor, W. paramesenteroides and W. viridescens (COLLINS et al, 1993).

In the present study, we compared the classification obtained by using phenotypic characterization, RAPD typing and 16S rDNA amplification on a collection of 221 leuconostoc strains. RAPD analysis allowed us to identify strains of L. citreum that were previously classified as L. mesenteroides subsp. mesenteroides, L. mesenteroides subsp. dextranicum or W. paramesenteroides by classical phenotypic tests. Using this method, we could determine the degree of molecular diversity within our strain collection. Almost complete 16S rDNA sequencing confirmed the classification of representative strains in the species L. citreum or L. lactis. Accurate identification of a large number of strains at the species level was achieved using specific 16S rDNA fragment amplifications. Characterization of the strains within a species (L. mesenteroides or L. citreum) based on four phenotypic traits revealed a diversity of expression and the possibility that multiple variants exist within a collection of leuconostocs. Correlation could be made between phenotypes (dextranicum and mesenteroides) of L. mesenteroides and cheese technologies, suggesting a better adaptation of certain strains to particular technological environments.

Materials and Methods

Bacterial strains and culture conditions

Some of the strains were previously identified (DEMIRCI and HEMME, 1995). The majority (73%) of the 221 bacterial strains included in this study were isolated from fifteen traditional French cheeses made with raw milk (cow, goat and sheep) between 1974 and 1990. Some strains were also isolated from milk (7%), cheeses produced outside of France (3%), dairy

equipment such as "gerle" (3%) and vegetable matter (1%). A few strains (13%) were supplied by the LMG collection of bacteria (Gent, Belgium) or were of unknown origin. The presence of Leuconostoc evaluated on MSE agar, was generally comprised between 10^4 and 10^9 colonies forming units (CFU) per gramme of traditional cheese and 10^3 CFU/ml of milk. Strains were conserved at -80°C in MRS containing 15% glycerol or as freeze-dried cultures, and are part of the CNRZ collection of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria, INRA (Jouy-en-Josas, France). Strains were grown at 30°C in MRS broth (DE MAN et al., 1960) and isolated anaerobically on MRS agar.

Biochemical tests

Acid production from arabinose, trehalose and fructose was assessed in tubes filled with 10 ml of MRS broth containing bromo cresol purple as pH indicator and none (negative control) or one of the different carbon sources. A fifty μl aliquot of a stationary phase (usually 24 hours) culture in MRS broth was used to inoculate the different test-tube cultures. Results were read after a 2-day incubation time at 30°C . Slime-producing colonies were detected by plating appropriate dilutions of a culture on MSE agar (MAYEUX et al., 1962) containing 100g/l of sucrose and incubated anaerobically for three days at 30°C .

DNA extraction, PCR amplification and conventional DNA electrophoresis

Extraction of total cellular DNA and RAPD reactions were performed as described elsewhere (TAILLIEZ et al., 1998). RAPD patterns were determined using primers P1 (5'-TGCTCTGCCC-3') and P2 (5'-CTGCTGGGAC-3') in separate reactions. Merged RAPD patterns were compared using the GelCompar programme (APPLIED-MATHS, Belgium). RAPD reactions were standardized by using a single source of *Taq* polymerase. Reproducibility of RAPD fingerprinting results was assessed by comparing the product of

different PCR reactions, using DNA prepared from separate cultures of the same strain. Several strains were studied, and pairs of patterns obtained from the same strains had a Pearson's coefficient of 80-100%, indicating that the techniques used in our analyses are reliable (data not shown). PCR amplification of 16S rDNA fragments of L. mesenteroides, L. lactis, L. citreum and W. paramesenteroides were performed using four specific primers pairs, respectively: Lnm1 (5'-TGTCGCATGACACAAAGTTA-3', corresponding to conserved E. coli 16S rRNA position 185 forward (BROSIUS et al., 1978)) and Lnm2 (5'-ATCATTTCTATTCTAGCTG-3', position 470 reverse); Lnl1 (5'-ATAGGGAATGATTCTAGTTC-3', position 457 forward) and Lnl2 (5'-AGATTAGCTCACCCTCGCG-3', position 1283 reverse); Lncit1 (5'-ACTTAGTATCGCATGATATC-3', position 183 forward) and Lncit2 (5'-AGTCGAGTTGCAGACTGCAG-3', position 1326 reverse); Wpm1 (5'-TACCGTATAATACCAACAAC-3', position 163 forward) and Wpm2 (5'-AACCTCGAACATCTAGCAC-3', position 834 reverse). PCR amplification was carried out in 100µl containing 20-100 ng of DNA, 1.5 mM MgCl₂, 0.6 µM of each primer, 200 µM each dATP, dCTP, dGTP and dTTP (ROCHE DIAGNOSTICS), and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (QUANTUM-APPLIGENE) in 10 mM Tris HCl pH 9.0. A Perkin Elmer 2400 thermal cycler was used for 30 cycles of amplification (94°C for 30 s; 58°C for 30 s (except for primers Lnl1 and Lnl2 where the annealing temperature was 60°C), 72°C for 1.5 min) after a DNA denaturing step of 94°C for 5 min. A ten µl aliquot of the PCR reaction was deposited for gel electrophoresis in 1% Seakem GTG agarose (TEBU) gels in TBE.

16S rDNA sequencing

The almost complete 16S rRNA gene was amplified by PCR using two primers (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTC-3', corresponding to conserved E. coli 16S rRNA positions 8

to 25, forward (BROSIUS et al., 1978); 5'-CNCGTCCTTCATCGCCT-3', corresponding to conserved *E. coli* 23S rRNA positions 44 to 60, reverse (BROSIUS et al., 1980)). PCR reactions were carried out in 100 µl containing 20-100 ng of DNA, 1.5 mM MgCl₂, 0.6 µM of each primer, 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate (ROCHE DIAGNOSTICS) and 2.5U of *Taq* DNA polymerase (QUANTUM-APPLIGENE) in the buffer supplied with the enzyme. Amplification conditions were : 96°C for 4 min followed by 30 cycles of 10 s at 96°C, 30 s at 50°C, and 72°C for 2 min. PCR products were purified by a Wizard kit (PROMEGA). The partial sequence of the 16S rDNA amplified fragment was directly determined using the ABI PRISM Dye Terminator kit, a 373 DNA sequencer and the protocols recommended by the manufacturer (APPLIED-BIOSYSTEMS). The sequencing primers, SP1, 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3' (position 338, forward); SP2, 5'-ACCGCGGCTGCTGGCACG-3' (position 514, reverse); SP3, 5'-TACGCATTTACCKC TACA-3' (position 684, reverse); SP4, 5'- CTCGTTGCGGGACTTAAC-3' (position 1089, reverse) and SP5, 5'-GNTACCTTGTTACGACTT-3' (position 1492, reverse) targeted to conserved regions of the molecule (WEISBURG et al., 1991). The overlapping sequences obtained with SP1 and SP2 or with SP3, SP4 and SP5 were merged using the GeneCompar programme (APPLIED-MATHS, BELGIUM). Each of the merged sequences was compared with those listed in the Ribosomal Database Project (RDP, <http://www.cme.msu.edu/RDP>), version 7.0 using the similarity rank function (MAIDAK et al., 1999). 16S rDNA sequence of *L. citreum* 2E, 2G, 2J, 9E, 9L, 22R, *L. fallax* 17D, *L. mesenteroides* 50M and reference sequences of the *Leuconostoc-Weissella-Oenococcus* group were extracted from the GenBank database (BENSON et al., 1999) and used for alignments. The GeneCompar programme (APPLIED-MATHS, BELGIUM) was used to i) calculate phylogenetic distances, ii) construct distance matrix trees by using the neighbor-joining method (SAITOU and NEI, 1987) and iii) perform a bootstrap analysis (FELSENSTEIN, 1985) using 1,000 data sets.

Results

Classical identification of the 221 Leuconostoc strains. Strain identification based on biochemical and physiological taxonomy traits has limited performance in differentiating between Leuconostoc species (GARVIE, 1960; MILLIERE et al., 1989). In this study, we selected four features proposed by GARVIE (1986) to try to identify the strains of our collection (e.g., production of slime from sucrose, and acid produced from growth in arabinose, trehalose and fructose) (figures 1a and 1b): L. mesenteroides subsp. mesenteroides exhibit dextran production and acid produced from arabinose, trehalose and fructose (102 strains), L. mesenteroides subsp. dextranicum exhibit dextran production and acid produced from trehalose and fructose (81 strains), for L. mesenteroides subsp. cremoris, the four characters are negative (13 strains). Three strains correspond to L. lactis (acid produced from fructose only) and twelve to W. paramesenteroides (no production of dextran, variable acid production from arabinose and acid production from trehalose and fructose). Nine strains (4%) exhibited atypical biochemical patterns and remained unclassified using this scheme. They were noted as L. sp.

RAPD classification of the 221 Leuconostoc strains. The RAPD patterns of each Leuconostoc strain were determined using primers P1 and P2 in separate reactions and were then merged for computations (Fig. 1a and 1b). Most strains could be grouped into one of seven clusters. One cluster (G1) contains a majority of the strains (124/221). These exhibit highly similar RAPD patterns (Pearson's coefficient >70%). The majority (8/12) of the L. mesenteroides subsp. cremoris is clustered in group G2. Strains of L. mesenteroides subsp. mesenteroides or subsp. dextranicum are equally distributed in groups G1 and G3 to G6.

Strains of group G6 (Fig. 1b) exhibit RAPD patterns similar to those of the L. amelibiosum LMG9824^T type-strain (SCHILLINGER et al., 1989). The profile of the L. citreum LMG9849^T type-strain (FARROW et al., 1989) is shown to be unrelated. The RAPD patterns of L. lactis LMG7940^T and LMG8894 are grouped with that of strain CNRZ1746. The latter exhibited a L. mesenteroides subsp. cremoris phenotype. Two strains (W. paramesenteroides LMG9852^T and 17D) showed unique patterns, and could thus not be classified.

These results show that a majority of strains in the collection can be classified into two major families using the RAPD technique. The first family contains mainly L. mesenteroides strains (Fig. 1a), and the second mainly L. amelibiosum (or L. citreum) strains (Fig. 1b). Strains of L. lactis and W. paramesenteroides can also be distinguished by this technique (Fig 1b).

Strain identification using 16S rDNA sequencing. The almost complete 16S rDNA sequences (1,407 bps) of strains 22R (GenBank n°AF195784), 2E, 2G, 2J, 9E, 9L, 17D (GenBank n° AF218797) and 50M were determined. These sequences and those of strains belonging to the Leuconostoc-Weissella-Oenococcus group were compared (Fig. 2). Results confirm the classification of these strains (except 17D and 50M) as members of the L. citreum species, as suggested by results obtained with the RAPD technique. Strain 17D is classified as L. fallax (Fig. 2), an atypical leuconostoc species, which explains its unique RAPD pattern. Strain 50M has a 16S rDNA sequence closely related to those of L. mesenteroides-L. pseudomesenteroides. Partial 16S rDNA sequence (600 pbs) of strains 15B and 48I (RAPD group G6) as well as strains CNRZ1746 and LMG8894^T (RAPD group G7) were compared to those present in the RDP database (MAIDAK et al., 1999). Results confirm their classification as L. citreum and L. lactis respectively.

Rapid identification of L. mesenteroides, L. citreum, L. lactis and W. paramesenteroides strains using a specific 16S rDNA fragment-based amplification. To easily classify a large number of strains in the four species cited above, a pair of specific PCR-primers for each of them were defined (e.g., Lnm1-Lnm2, Lncit1-Lncit2, Lnl1-Lnl2 and Wp1-Wp2). Primer sequences were determined using an alignment of the 16S rDNA sequences of leuconostoc reference-strains (Fig. 2). They were chosen to specifically amplify four 16S rDNA fragments of different sizes (Fig. 3). The specificity of the primers was also evaluated using the check probe function of the RDP database. This PCR test was applied to i) strains representative of our collection, ii) those that have an atypical phenotype (noted as L. sp.), and iii) those that seem to be misclassified by their phenotype. They are listed in table 1. The results showed that: i) strains of Fig. 1a noted i (nine strains) and i1, i2, i3 and those which were representative of groups G1 to G5 belonged to the L. mesenteroides species, ii) strains of RAPD group G6 belonged to the L. citreum species, iii) strains of RAPD group G7 belonged to the L. lactis species and iv) only strain LMG9852T (type strain) was confirmed to be W. paramesenteroides. No amplification was obtained with the DNA of strain 2E despite that its 16SrDNA sequence has the targeted regions complementary to the sequence of primers Lncit1-Lncit2. For strains 2G (L. citreum) and 50M (L. mesenteroides), false positive amplifications were also obtained with primers Lnm1-Lnm2 and Lnl1-Lnl2 respectively. Seventy negative controls have been realized and have confirmed the specificity of the PCR tests. Primers Lnl1-Lnl2 have to be used in PCR reactions with an annealing temperature of 60°C (instead of 58°C for the other pairs of primers) to avoid false positive results.

Congruence analysis. The combination of the three molecular techniques used in this study allow us to classify strains at the species level. Using RAPD fingerprinting, L. citreum (L. amelibiosum) strains could be identified in our collection by comparing the profiles of certain

strains with those of the type strain LMG9824^T. The presence of strains of this species was not previously revealed by phenotypical tests. This technique further allowed us to reclassify strain CNRZ1746 as L. lactis; it was previously characterized phenotypically as being L. mesenteroides subsp. cremoris. Strain classification using partial or almost complete 16S rDNA sequence has confirmed the presence of L. citreum, L. fallax and L. lactis strains in our collection. In our study, the specific 16S rDNA amplification test has been particularly useful as a follow-up after first classifying the collection by RAPD fingerprinting. This technique has confirmed the classification obtained by using RAPD. Moreover, the taxonomic position of strains showing i) unique RAPD profiles, ii) atypical phenotypes or iii) phenotypes that were incompatible with the RAPD classification, has been specified. Among the nine strains (noted L. sp.) showing atypical traits (table1), eight of them are reclassified as L. mesenteroides and one as L. citreum. Eleven strains were classified as W. paramesenteroides by their phenotype (including the type-strain LMG9852^T). Ten of them should be considered as dextran-negative variants of L. mesenteroides subsp. mesenteroides or subsp. dextranicum. The last one (CNRZ1984) is reclassified as L. citreum. Strains 25J and CNRZ1746 previously classified as L. lactis and L. mesenteroides subsp. cremoris respectively, are reclassified as L. mesenteroides and L. lactis respectively by molecular techniques. The whole collection of L. citreum strains was misclassified by phenotypic criteria. Thus, in our case, results obtained by molecular and phenotypic techniques showed a convergence coefficient of 77.7 % (i.e., 49 strains were misclassified by phenotypic characterization).

Distribution of Leuconostoc mesenteroides strains in different traditional French cheeses.

Among the collection of L. mesenteroides subsp. mesenteroides or subsp. dextranicum studied, most of the strains (127) were isolated from Reblochon (cow milk cheese), Roquefort

(sheep milk cheese), Crottin de Chavignol (goat milk cheese) and some hard cheeses from the Massif Central area (Cantal, Laguiole, Salers made with cow milk and similar technologies). We selected these strains and those isolated from milk or dairy equipment (such as traditional wooden bowls named "gerle") used to produce these cheeses. For each of these strains, a similarity matrix was calculated including data of origins (kind of cheese, milk, whey, curd, equipment, sample) and phenotype (subsp. mesenteroides, subsp. dextranicum) and using the Dice correlation coefficient. A second similarity matrix was calculated including RAPD data and using the Pearson correlation coefficient. Data from the two matrices were combined using the BioNumerics programme (APPLIED-MATHS, BELGIUM). Figure 4 shows the resulting dendrogramme obtained using the combined similarity matrix. Results indicate that most of the strains isolated from Reblochon and milk for Reblochon have a dextranicum phenotype. Most of the strains isolated from "gerle" and cheeses produced in the Massif Central area, or from Crottin de Chavignol have a mesenteroides phenotype. In contrast, strains isolated from Roquefort are equally distributed between both phenotypes. Most of the L. citreum strains were from curd or whey of Crottin de Chavignol (mesenteroides phenotype). Three strains isolated from Roquefort cheeses after accidents of fabrication belong to the L. citreum species (dextranicum phenotype). This dendrogramme, which incorporates different types of data, provides information on the biodiversity of this strain collection, as well as a first view on the L. mesenteroides distribution in these cheeses. The similarity coefficients comprise between 50 and 60% for each group. This shows that the strains isolated from a cheese technology do not represent multiple copies of the same strains. Moreover, the level of Leuconostoc present in these cheeses, evaluated by isolation on MSE agar, was generally comprised between 10^4 and 10^9 CFU per gramme of cheese, thus indicating that they should play a role in certain cheese technologies.

Discussion

A combination of three molecular techniques (RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA fragment amplification) was used to classify a large collection of Leuconostoc strains both at species and strain levels.

The sensitive RAPD typing method coupled to a digitised data analysis has confirmed its potential in revealing clear differences between Leuconostoc strains that were indistinguishable by most biochemical and physiological traits (SHILLINGER et al., 1989). For example, i) strains of L. citreum were misclassified as L. mesenteroides or W. paramesenteroides by their phenotypic traits (Table 1); ii) potential dextran-negative variants (PEDERSON and ALBURY, 1955) of L. mesenteroides subsp. mesenteroides or subsp. dextranicum were previously classified as W. paramesenteroides using conventional tests (Table 1), and iii) strains exhibiting atypical phenotypes (noted as L. sp. in Table 1) are now classified as L. mesenteroides species. This analysis has also revealed molecular diversity within species. Thus, the 185 strains of L. mesenteroides comprise five RAPD groups (G1 to G5) plus several individuals. No group was constituted of strains isolated from a unique source. Strains from one source could also be found in different RAPD groups. It thus appears that genetically distinguishable strains of the same species may exhibit similar adaptable capacities, in order to grow together in a particular cheese technology ecosystem.

However, RAPD did not allow distinctions at the subspecies level for L. mesenteroides. Four of the five RAPD groups (G1, G3 to G5) comprising L. mesenteroides strains include both dextranicum and mesenteroides subspecies, while the RAPD group G2 comprises L. mesenteroides subsp. cremoris only. Several strains having the cremoris phenotype are also

present in RAPD groups G1 and G4 or have ungrouped profile (i). The absence of a clear separation between strains of different L. mesenteroides subspecies has also been observed by using other molecular typing methods such as SDS-PAGE of whole-cell bacterial proteins (DICKS et al., 1990; VILLANI et al., 1997) and ribotyping (VILLANI et al., 1997). In contrast, subspecies of Lactococcus lactis (POT et al., 1996, TAILLIEZ et al., 1998) or of Lactobacillus delbrueckii (GIRAFFA et al., 1998; HERTEL et al., 1993) can be easily separated by using molecular typing methods. As the RAPD method is highly sensitive, we consider that the phenotypes that discriminate the three subspecies of L. mesenteroides may correspond to variations in genome expression (PEDERSON and ALBURY, 1955) rather than real genome differences. Also using a RAPD-PCR approach, MOSCHETTI et al. (2000) found a RAPD fragment that hybridizes specifically to DNA of L. mesenteroides subsp. mesenteroides strains. A weaker signal was observed with DNA from strains of L. mesenteroides subsp. dextranicum but only two strains were tested, which is insufficient to validate the test. We therefore suggest that the L. mesenteroides subspecies should be considered as L. mesenteroides biovars.

The complete or partial 16S rDNA sequencing technique can be used to confirm identification of strains that have already been classified using the RAPD typing method. At this level, only a few representative strains (Fig 2) can be selected for identification. This technique has confirmed the presence of L. citreum strains (13% of this collection) in French traditional cheese technologies. In contrast, only one strain of L. lactis has been isolated, despite its interesting properties in cheese technologies (COGAN and JORDAN, 1994). Moreover, this technique has allowed the identification of strain 17D (isolated from a Livarot cheese) as L. fallax, an atypical Leuconostoc species originally isolated from sauerkraut (MARTINEZ-MURCIA and COLLINS, 1991).

The development of a PCR-based method using specific primers targeted to variable regions of the 16S rDNA proved to be a valuable tool to rapidly confirm the taxonomical position of a large number of strains. Thus, the taxonomical position of more than 22 % of strains under study has been clarified. A similar approach was previously developed to classify strains of Lactococcus at the species and subspecies level (KLIJN et al., 1991) and in Leuconostoc at the genus level (KLIJN et al., 1991; WARD et al., 1995). Also, DAVID and DE VOS (1992) were able to distinguish between W. paramesenteroides and Leuconostoc species and between L. mesenteroides and L. lactis.

The association of three molecular techniques provides a maximum of information for strain typing. The RAPD technique lead to the detection of unique profiles. These could correspond to underrepresented strains of the species under study, or to strains of another species. To answer this question, a large database of RAPD profiles could be needed. Alternatively, 16S rDNA sequencing techniques can be applied to strains with unique RAPD profiles; this may be the method of choice, as large 16S rDNA sequence databases are available (RDP and GenBank), and the method does not require prior information on strains to classify them. Finally, the amplification of 16S rDNA fragments using specific primers for each species allows rapid analysis of a large number of strains and contributes to classification at the species level.

We showed that L. mesenteroides is the dominant species of Leuconostoc isolated from traditional French cheeses. L. mesenteroides subsp mesenteroides is frequently isolated from traditional wooden bowls named "gerle", used for milk storage before transformation to produce cheeses such as Laguiole, Cantal and Salers, with cow milk. Strains of this subspecies

are also isolated from Crottin de Chavignol, a cheese made with goat milk. In contrast, the major strains, isolated from the milk used to make Reblochon (as well as from the cheese) are of the subspecies dextranicum. Strains of both subspecies are isolated from Roquefort cheeses, which are made with sheep milk.

To date, the role of L. citreum or L. amelibiosum strains in traditional French cheese technologies has been underestimated largely because of an inability to identify strains of these species with phenotypic criteria. However, strains of L. citreum seem to be as ubiquitous as those of L. mesenteroides. They are isolated from cheeses made with cow, sheep or goat milk, from vegetable matter such as sugar beet (strain 48S) and sugar cane juice (strain CNRZ1984) as well as from meat products (MAKELA et al., 1992) and blood (FARROW et al., 1989). Our results reveal for the first time the ubiquitous character of the leuconostoc species and its adaptable potentiality to dairy technologies.

Acknowledgments

We are grateful to ALEXANDRA GRUSS for her precious help in the preparation of the manuscript. We thank GUILLAUME JAVEL, PASCAL QUENEE and DENIS HEMME for their contribution in early steps of the work. R.C. was supported by The Turkish Council of High Education and I.N.R.A (France).

References

- ABD-EL-MALEK, Y. and GIBSON, T.: Studies in the bacteriology of milk. I. The streptococci of milk. *J. Dairy Res.* 15, 233-248 (1948).
- AGUIRRE, M. and COLLINS, M.D.: Lactic acid bacteria and human clinical infection. A review. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 95-107 (1993).
- BENSON D.A., BOGUSKI M.S., LIPMAN D.J., OSTELL J., FRANCIS OUELLETTE B.F., RAPP B.A., WHEELER D.L. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) 12-17.
- BJORKROTH, K.J., VANDAMME, P. and KORKEALA, H.J.: Identification and characterization of Leuconostoc carnosum, associated with production and spoilage of vacuum-packaged, sliced, cooked ham. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3313-3319 (1998).
- BROSIUS, J., PALMER, M.L., KENNEDY, P. J. and NOLLER, H.F.: Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4801-4805 (1978).
- BROSIUS, J., DULL, T.J., and NOLLER, H.F.: Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 201-204 (1980).
- COGAN, T.M.: Citrate utilization in milk by Leuconostoc cremoris and Streptococcus diacetylactis. *J. Dairy Res.* 42, 139-146 (1975).
- COGAN, T.M.: History and taxonomy of starter cultures, pp. 1-23. In: *Dairy Starter Cultures* (T.M. COGAN and J.-P. ACCOLAS, eds) VCH Publishers, Inc. N.Y. (1995).
- COGAN, T.M. and JORDAN, K.N.: Symposium: the dairy Leuconostoc. Metabolism of Leuconostoc bacteria. *J. Dairy Sci.* 77, 2704-2717 (1994).

- COLLINS, M.D., SAMELIS, J., METAXOPOULOS, J. and WALLBANKS S.: Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus Weissella for the Leuconostoc paramesenteroides group of species. J. Appl. Microbiol. 75, 595-603 (1993).
- DAVID, S. and DE VOS, W.M.: Reclassification of two Leuconostoc strains using PCR-derived specific DNA-probes of 16S rRNA variable regions, pp. 29-36. In: Genetics of mesophilic citrate fermenting lactic acid bacteria (DAVID, S., PhD thesis) (1992).
- DE MAN, J.C., ROGOSA, M. and SHARPE, M.E.: A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. 23, 130-135 (1960).
- DEMIRCI, Y. and HEMME, D.: Acidification test based on the use of biomass for screening of Leuconostoc. Application to Ln. mesenteroides strains isolated from French raw milk cheeses. J. Dairy Res. 62, 521-527 (1995).
- DEVOYOD, J.J. and MULLER, M.: La flore microbienne du fromage de Roquefort. III. Les streptocoques lactiques et les leuconostoc. Influence de différents microorganismes de contamination. Le Lait 49, 369-399 (1969).
- DEVOYOD, J.J. and POULLAIN, F.: Les Leuconostoc. Propriétés : leur rôle en technologie laitière. Le Lait 68, 249-280 (1988).
- DICKS, L.M.T., VAN VUUREN, H.J.J. and DELLAGLIO, F.: Taxonomy of Leuconostoc species, particularly Leuconostoc oenos, as revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns, DNA base compositions, and DNA-DNA hybridizations. Int. J. System. Bacteriol. 40, 83-91 (1990).
- DICKS, L.M.T., FANTUZZI, L., GONZALEZ, F.C., DU TOIT, M. and DELLAGLIO, F.: Leuconostoc argentinum sp nov., isolated from Argentine raw milk. Int. J. System. Bacteriol. 43, 347-351 (1993).

- DICKS, L.M.T., DELLAGLIO, F. and COLLINS, M.D.: Proposal to reclassify Leuconostoc oenos as Oenococcus oeni [corrig.] gen. nov., comb. nov. Int. J. System. Bacteriol. 45, 395-397 (1995).
- FARROW, J.A.E., FACKLAM, R.R. and COLLINS, M.D.: Nucleic acid homologies of some vancomycin-resistant Leuconostocs and description of Leuconostoc citreum sp. nov. and Leuconostoc pseudomesenteroides sp. nov. Int. J. System. Bacteriol. 39, 279-283 (1989).
- FELSENSTEIN, J.: Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39, 783-791 (1985).
- GARVIE, E.I.: The genus Leuconostoc and its nomenclature. J. Dairy Res. 27, 283-292 (1960).
- GARVIE, E.I.: Leuconostoc oenos sp. nov. J. Gen. Microbiol. 48, 431-438 (1967).
- GARVIE, E.I.: Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris (Knudsen and Sørensen) comb. nov. and Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum (Beijerinck) comb. nov. Int. J. System. Bacteriol. 33, 118-119 (1983).
- GARVIE, E.I.: Genus Leuconostoc, pp. 1071-1075. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, (P.H.A. SNEATH, N.S. MAIR, M.E. SHARPE and J.G. HOLT, eds). Baltimore: Williams and Wilkins (1986).
- GASSER, F.: Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. Bull. Inst. Pasteur 92, 45-67 (1994).
- GIRAFFA, G., DE VECCHI P. and ROSSETTI, L.: Identification of Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus and subspecies lactis dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis. J. Appl. Microbiol. 85, 918-924 (1998).
- HERTEL, C., LUDWIG, W., POT, B., KERSTERS, K. and SCHLEIFER, K.H.: Differentiation of lactobacilli occurring in fermented milk products by using

- oligonucleotide probes and electrophoretic protein profiles. *System. Appl. Microbiol.* 16, 463-467 (1993).
- KEENAN, T.W. and LINDSAY, R.C.: Removal of green flavor from ripened butter cultures. *J. Dairy Sci.* 49, 1563-1565 (1966).
- KEENAN, T.W.: Production of acetic acid and other volatile compounds by Leuconostoc citrovorum and Leuconostoc dextranicum. *Appl. Microbiol.* 16, 1881-1885 (1968).
- KLIJN, N., WEERKAMP, A.H., and DE VOS, W.M.: Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3390-3393 (1991).
- MAIDAK, B.L., COLE, J.R., PARKER, Jr, C.T., GARRITY, G.M., LARSEN, N., LI, B., LILBURN, T.G., McCAUGHEY, M.J., OLSEN, G.J., OVERBEEK, R., PRAMANIK, S., SCHMIDT, T.M., TIEDJE, J.M., WOESE, C.R.: A new version of RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 27, 171-173 (1999).
- MAKELA, P., SCHILLINGER, U., KORKEALA, H. and HOLZAPFEL, W.H.: Classification of ropy slime producing lactic acid bacteria based on DNA-DNA homology, and identification of Lactobacillus sake and Leuconostoc amelibiosum as dominant spoilage organisms in meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 16, 167-172 (1992).
- MARRET, R. and SOZZI, T.: Flore lactique de fromageries d'alpages suisses. *Le Lait* 56, 304-318 (1976).
- MARTINEZ-MURCIA, A.J. and COLLINS, M.D.: A phylogenetic analysis of an atypical leuconostoc: description of Leuconostoc fallax sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* 82, 55-60 (1991).
- MAYEUX, J.V., SANDINE, W.E. and ELLIKER, P.R.: A selective medium for detecting Leuconostoc organisms in mixed strain starter cultures. *J. Dairy Sci.* 45, 655-656 (1962).

- MILLIERE, J.B., MATHOT, A-G, SCHMITT, P. and DIVIES, C.: Phenotypic characterization of Leuconostoc species. J. Appl. Bacteriol. 67, 529-542 (1989).
- MOSCHETTI G., BLAIOTTA G., VILLANI F. and COPPOLA S.: Specific detection of Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides with DNA primers identified by randomly amplified polymorphic DNA analysis. Appl. Environ. Microbiol. 66, 422-424 (2000).
- PEDERSON, C.S. and ALBURY, M.N.: Variation among the heterofermentative lactic acid bacteria. J. Bacteriol. 70, 702-708 (1955).
- POT, B., DEVRIESE, L.A., URSI, D., VANDAMME, P., HAESBROUCK, F. and KERSTERS, K.: Phenotypic identification and differentiation of Lactococcus strains isolated from animals. System. Appl. Microbiol. 19, 213-222 (1996).
- SAITOU, N. and NEI, M.: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406-425 (1987).
- SHAW, B.G. and HARDING, C.D.: Leuconostoc gelidum sp. nov. and Leuconostoc carnosum sp. nov. from chill-stored meats. Int. J. System. Bacteriol. 39, 217-223 (1989).
- SHERWOOD, I.R.: The bacterial flora of New-Zealand Cheddar cheese. J. Dairy Res. 10, 426-448 (1939).
- SCHILLINGER, U., HOLZAPFEL, W. and KANDLER, O.: Nucleic acid hybridization studies on Leuconostoc and heterofermentative lactobacilli and description of Leuconostoc amelibiosum sp. nov. System. Appl. Microbiol. 12, 48-55 (1989).
- STADHOUDERS, J.: The control of cheese starter activity. Netherland Milk Dairy J. 40, 155-173 (1986).

- TAILLIEZ, P., TREMBLAY, J., EHRLICH, S.D. and CHOPIN, A.: Molecular diversity and relationship within Lactococcus lactis, as revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *System. Appl. Microbiol.* 21, 530-538 (1998).
- TAKAHASHI, M., OKADA, S., UCHIMURA, T. and KOZAKI, M.: Leuconostoc amelibiosum, Schillinger, Holzapfel, and Kandler 1989 is a later subjective synonym of Leuconostoc citreum, Farrow, Facklam, and Collins 1989. *Int. J. System. Bacteriol.* 42, 649-651 (1992).
- VEDAMUTHU, E.R.: The dairy Leuconostoc: use in dairy products. *J. Dairy Sci.* 77, 2725-2737 (1994).
- VILLANI, F., MOSCHETTI, G., BLAIOTTA, G. and COPPOLA, S.: Characterization of strains of Leuconostoc mesenteroides by analysis of soluble whole-cell protein pattern, DNA fingerprinting and restriction of ribosomal DNA. *J. Appl. Microbiol.* 82, 578-588 (1997).
- WARD, L.J.H., BROWN, J.C.S. and DAVEY, G.P.: Detection of dairy Leuconostoc strains using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 20, 204-208 (1995).
- WEISBURG, W.G., BARNS, S.M., PELLETIER, D.A. and LANE, D.J.: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697-703 (1991).

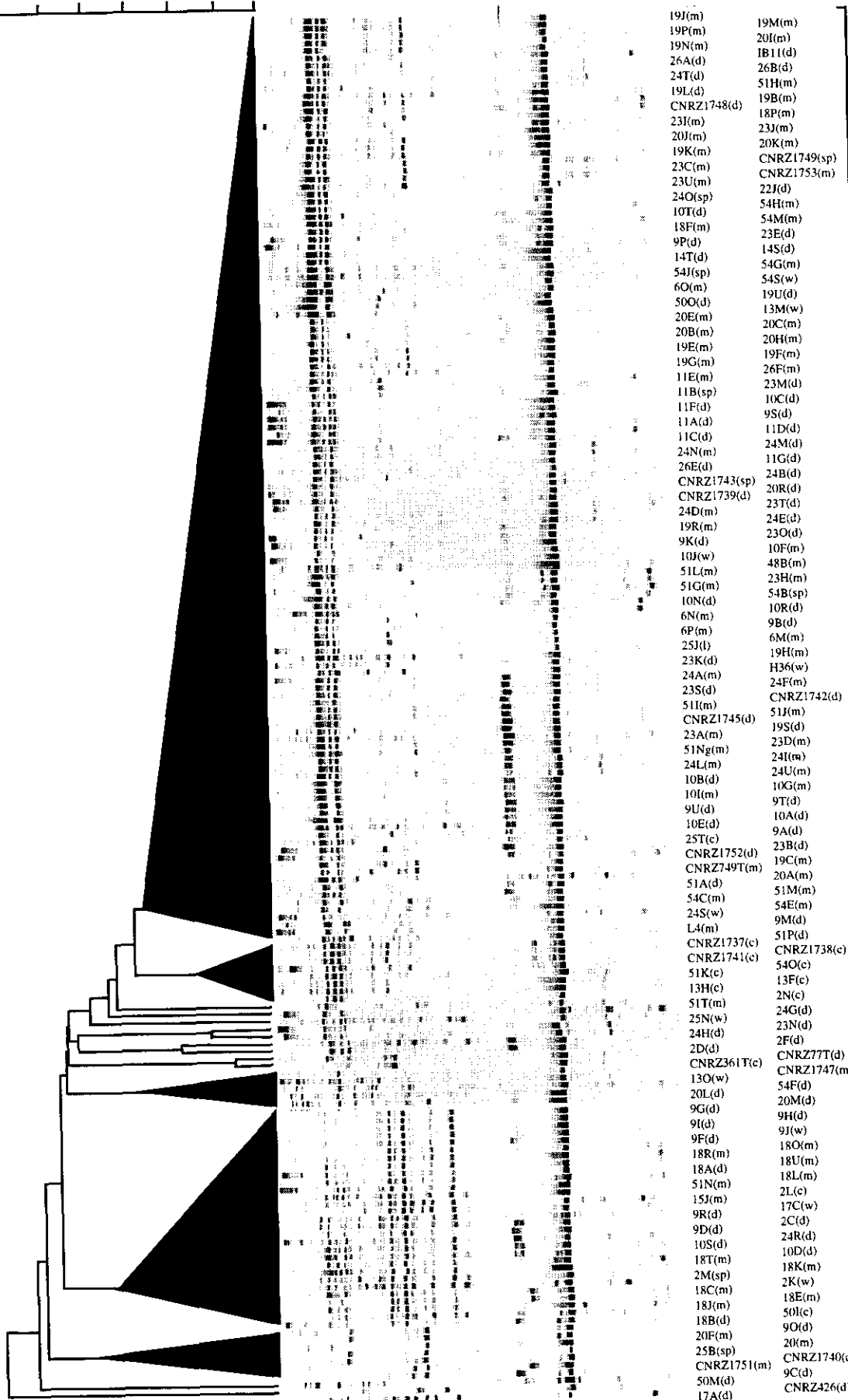
Table 1. Comparison of Leuconostoc strain classification using different methods. Strains that are: representative of the different RAPD groups, have unique RAPD profiles (i and i1 to i6) and potentially misclassified by phenotypic characterization are examined. The RAPD groups are indicated. Classification obtained by using 16S rDNA fragment amplification, 16S rDNA sequencing and phenotypic traits are presented. Strains showing atypical phenotypes are noted as L. sp. ND: not determined. Type-strains are indicated as the number of the strains followed by T (CNRZ77T, L. mesenteroides subsp. dextranicum; CNRZ361T, L. mesenteroides subsp. cremoris; CNRZ749T, L. mesenteroides subsp. mesenteroides; LMG8894T, L. lactis; LMG9824T, L. amelibiosum; LMG9849T, L. citreum, LMG9852T, W. paramesenteroides).

Strains	RAPD groups	PCR groups	Phenotypic groups
2D	i	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
2F	i	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
2K	G4	<i>L. mesenteroides</i>	<i>W. paramesenteroides</i>
2L	G4	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. cremoris</i>
2M	G4	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. sp.</i>
9C	G5	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
9D	G4	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
9H	G4	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
9J	G4	<i>L. mesenteroides</i>	<i>W. paramesenteroides</i>
9M	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
9P	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
10B	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
10F	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. mesenteroides</i>
10J	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>W. paramesenteroides</i>
11B	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. sp.</i>
13M	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>W. paramesenteroides</i>
13O	G3	<i>L. mesenteroides</i>	<i>W. paramesenteroides</i>
17A	i3	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
17C	G4	<i>L. mesenteroides</i>	<i>W. paramesenteroides</i>
18C	G4	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. mesenteroides</i>
19S	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
23N	i	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
24B	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
24G	i	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
24H	i	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
24O	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. sp.</i>
24S	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>W. paramesenteroides</i>
25B	G5	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. sp.</i>
25J	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. lactis</i>
25N	i	<i>L. mesenteroides</i>	<i>W. paramesenteroides</i>
25T	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. cremoris</i>
50M	i1	<i>L. mesent.+L. lactis</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
51K	G2	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. cremoris</i>
51M	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. mesenteroides</i>
51P	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
51T	i	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. mesenteroides</i>
54B	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. sp.</i>
54J	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. sp.</i>
54S	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>W. paramesenteroides</i>
CNRZ77 ^T	i	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
CNRZ361 ^T	i	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. cremoris</i>
CNRZ426	i2	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
CNRZ749 ^T	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. mesenteroides</i>
CNRZ1740	G5	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
CNRZ1741	G2	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesent. cremoris</i>
CNRZ1743	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. sp.</i>
CNRZ1749	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. sp.</i>

H36	G1	<i>L. mesenteroides</i>	<i>W. paramesenteroides</i>
2E	G6	no signal	<i>L. sp.</i>
2G	G6	<i>L. mesent. + L. citreum</i>	<i>L. mesent. mesenteroides</i>
2J	G6	<i>L. citreum</i>	<i>L. mesent. mesenteroides</i>
9E	G6	<i>L. citreum</i>	<i>L. mesent. mesenteroides</i>
9L	G6	<i>L. citreum</i>	<i>L. mesent. mesenteroides</i>
15B	G6	<i>L. citreum</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
22N	G6	<i>L. citreum</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
22R	G6	<i>L. citreum</i>	<i>L. mesent. dextranicum</i>
48I	G6	<i>L. citreum</i>	<i>L. mesent. mesenteroides</i>
50A	G6	<i>L. citreum</i>	<i>L. mesent. mesenteroides</i>
50E	G6	<i>L. citreum</i>	<i>L. mesent. mesenteroides</i>
50L	G6	<i>L. citreum</i>	<i>L. mesent. mesenteroides</i>
CNRZ1984	G6	<i>L. citreum</i>	<i>W. paramesenteroides</i>
LMG9824 ^T	G6	<i>L. citreum</i>	<i>L. mesent. mesenteroides</i>
LMG9849 ^T	i4	<i>L. citreum</i>	<i>L. mesent. mesenteroides</i>
CNRZ1746	G7	<i>L. lactis</i>	<i>L. mesent. cremoris</i>
LMG7940	G7	<i>L. lactis</i>	<i>L. lactis</i>
LMG8894 ^T	G7	<i>L. lactis</i>	<i>L. lactis</i>
17D	i6	<i>L. fallax</i>	ND
LMG9852 ^T	i5	<i>W. paramesenteroides</i>	<i>W. paramesenteroides</i>

Figure 1a. RAPD patterns of 185 Leuconostoc mesenteroides strains, using primers P1 and P2, and deduced dendrogramme obtained by UPGMA of correlation value of merged RAPD patterns. The scale gives the measure of the correlation values (Pearson's coefficient X 100). The RAPD patterns shown are negative digitized images of RAPD products separated on ethidium bromide stained agarose gels. RAPD products are obtained with primer P1 or P2 as indicated at the top. Groups are indicated in brackets. Strains that are classed individually are designated i and i1 to i3. Phenotypic classification of the strains are indicated as follows : (m), L. mesenteroides subsp. mesenteroides; (c), L. mesenteroides subsp. cremoris; (d), L. mesenteroides subsp. dextranicum; (l), L. lactis; (w), W. paramesenteroides; (sp), L. species. Type-strains are indicated as the number of the strains followed by T.

20 40 60 80 100



G1

G2

i

G3

G4

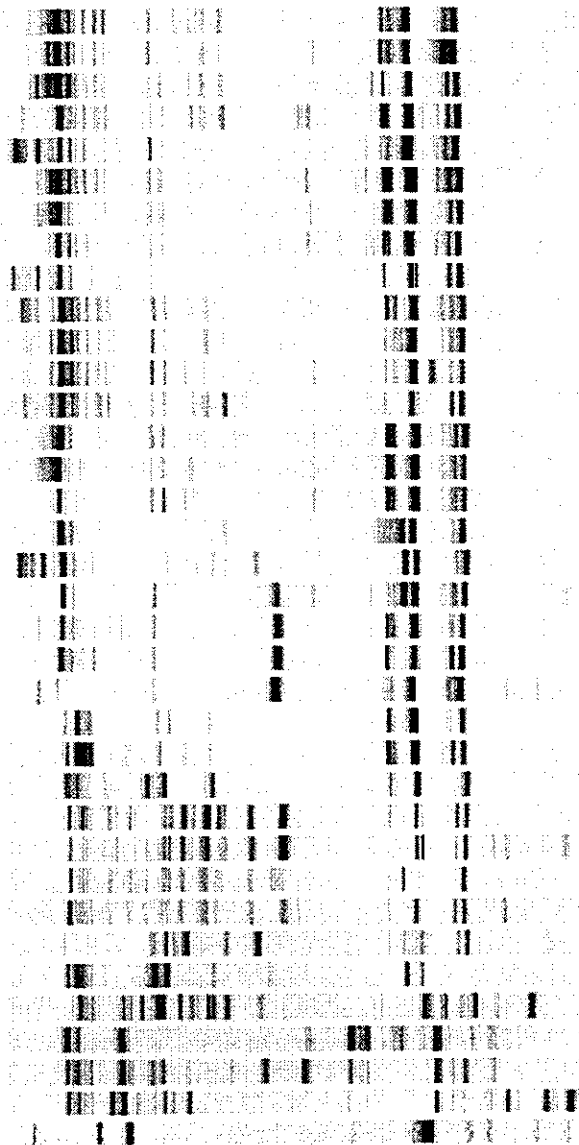
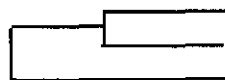
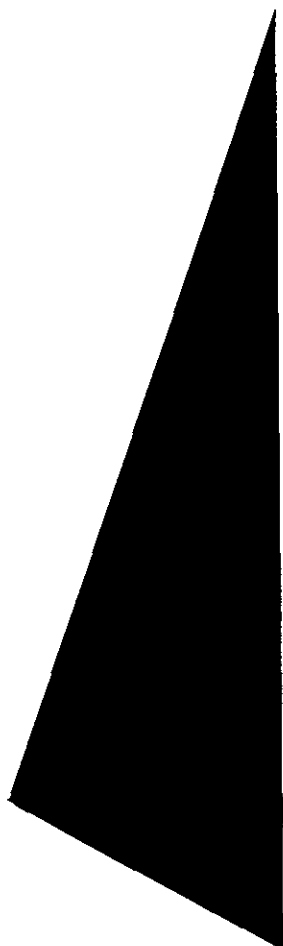
G5

11

i2

Figure 1b. RAPD patterns of L. citreum (ex-L. amelibiosum) (RAPD group G6), L. citreum (i4), L. lactis (RAPD group G7), L. fallax (i6) and W. paramesenteroides (i5) strains, using primers P1 and P2. Strains that are classed individually are designated i4, i5 and i6. See legend of figure 1a for details.

20 40 60 80 100



22N(d)
 22R(d)
 48S(m)
 51C(m)
 50T(m)
 48J(m)
 48M(m)
 48H(m)
 50D(m)
 54K(m)
 54L(m)
 54N(m)
 51Np(m)
 47S(m)
 48I(m)
 48K(m)
 15B(d)
 15C(d)
 50N(m)
 50L(m)
 50E(m)
 50A(m)
 CNRZ1984(w)
 22P(m)
 LMG9824T(m)
 2J(m)
 2G(m)
 2E(sp)
 9L(m)
 9E(m)
 LMG9849T(m)
 LMG9852T(w)
 CNRZ1746(c)
 LMG7940(l)
 LMG8894T(l)
 17D

G6

i4

i5

G7

i6

Figure 2. Phylogenetic tree showing the position of strains 22R (CNRZ1478), 2E, 2J, 2G, 9E, 9L, 17D and 50M compared to related bacteria (e.g., Leuconostoc, Weissella and Oenococcus). Pairwise phylogenetic distances were calculated on 1407 nucleotides of the 16S rDNA sequences. The tree was constructed by using the neighbor-joining method included in the GeneCompar programme (APPLIED-MATHS, BELGIUM). The sequences used in the analysis include those obtained from the GenBank database. The GenBank accession numbers and the corresponding strain numbers are: AB015642, W. hellenica DS-12; AB023242, L. mesenteroides NCFB523; AB023243, L. mesenteroides NCRIC1541; AB023968, L. lactis JCM6123; AB004661, L. gelidum JCM10093; AF086706, W. sp. LMG17702; AF086707, W. sp. LMG17707; AF111948, L. citreum ATCC49370; AF111949, L. citreum IH22; AF175402, L. gelidum DSM5578; AF175403, L. argentinum DSM8581; AF195784, L. citreum 22R; AF218797, L. fallax 17D; M23033, W. paramesenteroides DSM20288; M23034, L. mesenteroides subsp. cremoris DSM20346; M23035, L. mesenteroides DSM20343; M23036, W. confusa DSM20196; M23037, W. halotolerans DSM20190; M23038, W. kandleri DSM20593; M23039, W. minor DSM20014; M23040, W. viridescens DSM20410; M35820, O. oeni DSM20252; S63851, L. fallax DSM20189; S67831, W. paramesenteroides NCFB2973; X95977, L. carnosum NCFB2776; X95978, L. mesenteroides NCDO523; X95979, L. pseudomesenteroides NCDO768; X95980, O. oeni NCDO1674. Bootstrap values, expressed as a percentage of 1,000 data sets are shown at the branching points. Scale bar represents 2.5 nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

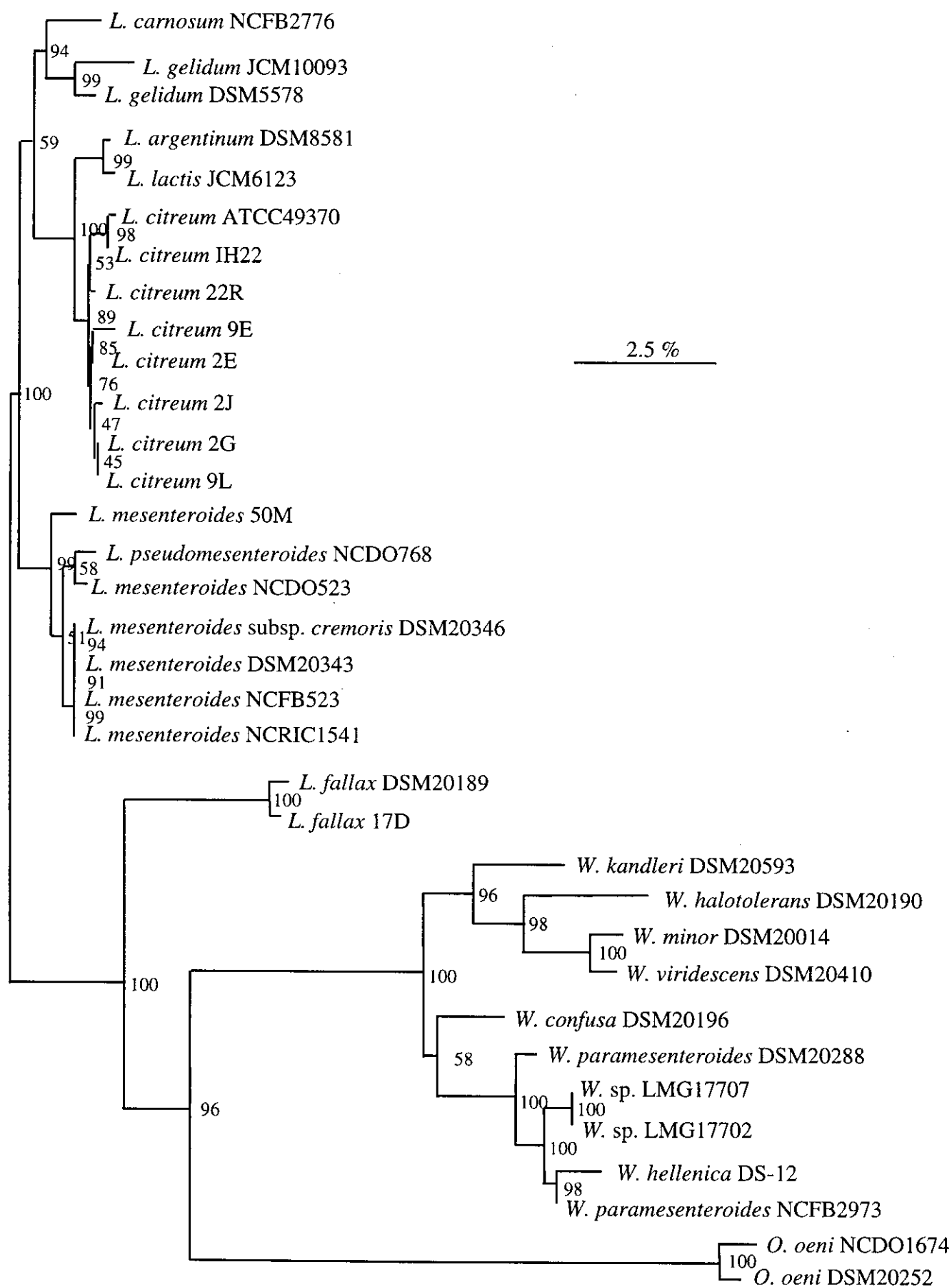
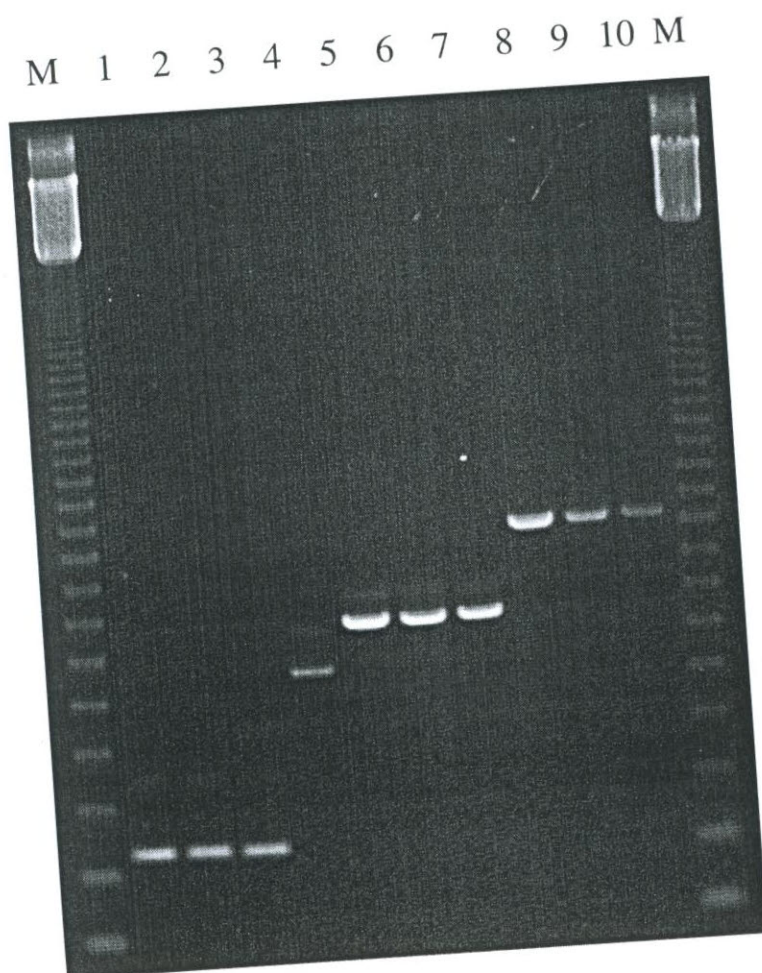


Figure 3. Species-specific 16S rDNA amplified fragments of L. mesenteroides, L. lactis, L. citreum and W. paramesenteroides separated on ethidium bromide stained agarose gel. Lanes 1 to 3, 270 bps-fragment specific of L. mesenteroides subsp. dextranicum CNRZ77T, subsp. cremoris CNRZ361T, subsp. mesenteroides CNRZ749T respectively, amplified using primers pair Lnm1 and Lnm2; Lane 4, 656 bps-fragment specific of W. paramesenteroides LMG 9852T amplified using primers pair Wp1 and Wp2; lanes 5 to 7, 810-bps-fragment of L. lactis LMG8894T, LMG7940 and CNRZ1746 respectively, amplified using primers pair Lla1 and Lla2; Lanes 8 to 10, 1129 bps-fragment specific of L. citreum LMG9824T, LMG9849T and 22R (CNRZ1478) respectively, amplified using primers pair Lcit1 and Lcit2; M, polymer of 123 bps (LIFE-TECHNOLOGIES, GIBCO BRL).



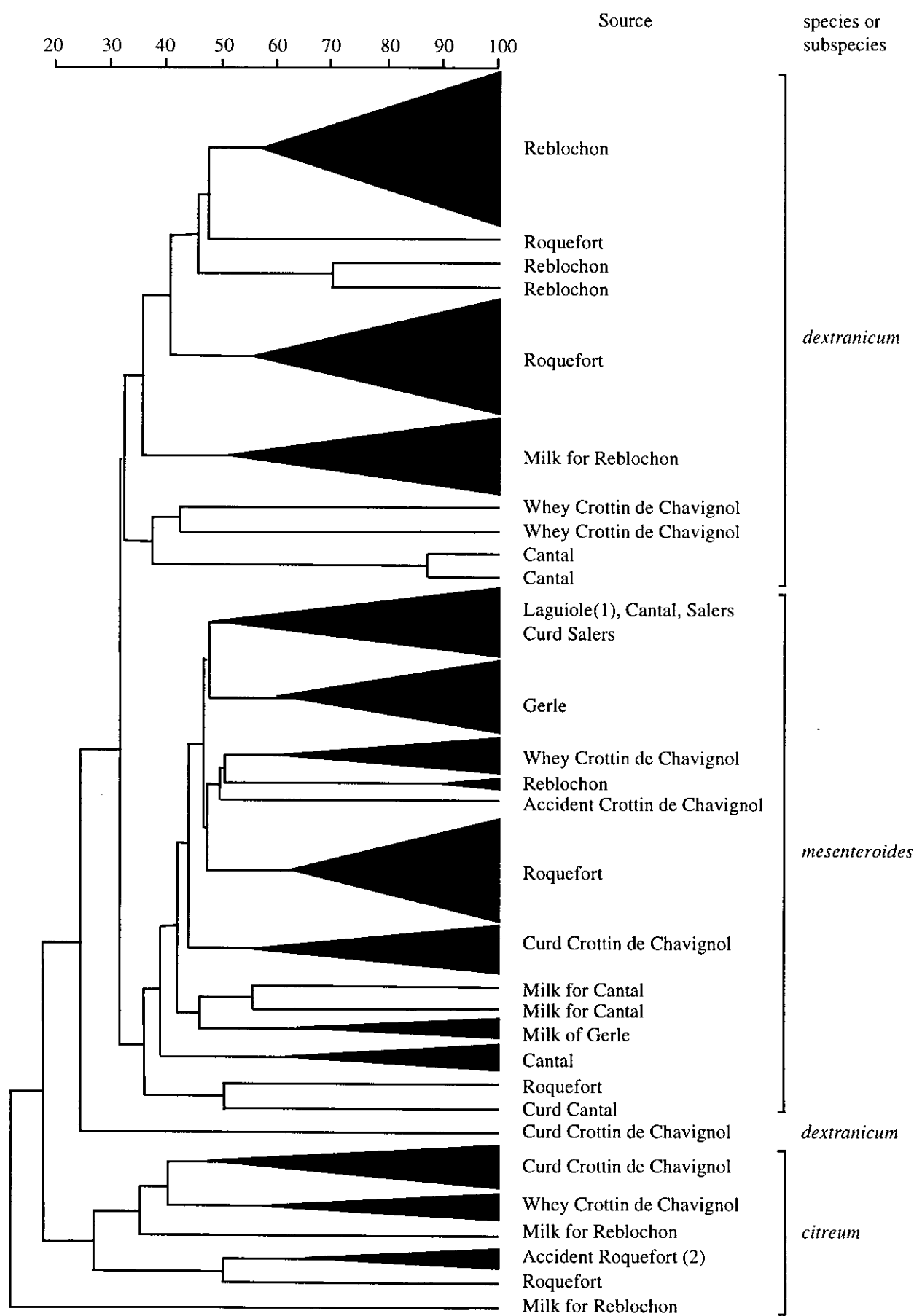
← 1129 bp

← 792 bp

← 656 bp

← 270 bp

Figure 4. Dendrogramme showing diversity of 127 *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and subsp. *dextranicum* strains isolated from different dairy products and the distribution between phenotypes (*mesenteroides* and *dextranicum*) and source of isolation. A similarity matrix was calculated including data of sources (type of cheese, milk, whey, curd, equipment, sample) and phenotype (subsp. *mesenteroides*, subsp. *dextranicum*) using the Dice correlation coefficient. A second similarity matrix was calculated including RAPD data and using the Pearson correlation coefficient. The two matrices were combined using the BioNumerics programme (APPLIED-MATHS, BELGIUM). The resulting dendrogramme shown is based on the combined similarity matrix. (1) one strain has a *dextranicum* phenotype. (2) the three strains of this subgroup have a *dextranicum* phenotype.



PARTIE II

INTRODUCTION

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux propriétés autolytiques des leuconostocs et avons entrepris une caractérisation moléculaire des peptidoglycane hydrolases de ces bactéries. Ce choix a été guidé par les résultats disponibles chez d'autres bactéries lactiques, en particulier *L. lactis*, qui ont montré l'intérêt, au niveau technologique, de sélectionner des souches à forte capacité autolytique. En effet, la lyse bactérienne s'accompagne de la libération du contenu enzymatique intracellulaire dans le milieu extérieur. Les bactéries lactiques contiennent dans leur cytoplasme des enzymes dont l'action contribue au développement des qualités organoleptiques des produits laitiers fermentés. L'utilisation de souches autolytiques apparaît ainsi comme un moyen d'accélérer l'affinage des fromages ou d'intensifier certains arômes.

Dans le premier chapitre, nous avons tout d'abord étudié le comportement autolytique d'un ensemble de 59 souches d'origine laitière appartenant à différentes espèces et sous-espèces du genre *Leuconostoc*. En solution tamponnée (phosphate de potassium 50 mM pH 6,5 à 30°C), le taux d'autolyse (mesuré par la diminution de la turbidité de la suspension cellulaire) de la majorité des souches est relativement faible, compris entre 10 et 30% avec quelques souches particulièrement peu autolytiques (7%) et d'autres plus autolytiques (45%). Nous avons sélectionné la souche 10L de *Ln mesenteroides* subsp. *mesenteroides* qui présente un taux d'autolyse parmi les plus élevés pour poursuivre notre étude. Nous avons observé que le taux d'autolyse de la souche 10L après croissance en milieu MRS dépend de la source de carbone présente dans le milieu et qu'il est maximal après croissance en présence de glucose.

Nous avons ensuite analysé le contenu en peptidoglycane hydrolases de la souche 10L par la technique d'électrophorèse renaturante. Le profil enzymatique obtenu est relativement complexe. Lorsque des cellules de *M. lysodeikticus* sont incorporées dans le gel en tant que substrat, nous avons révélé 3 bandes d'activité avec une masse moléculaire comprise entre 41 et 52 kDa. En utilisant des leuconostocs comme substrat, trois bandes supplémentaires mineures (à 122, 65 et 33 kDa) ont été visualisées. Au cours de ce travail, nous avons également identifié la spécificité des autolysines qui entrent en jeu dans l'autolyse d'une préparation de parois de la souche 10L. Nos résultats suggèrent l'existence d'au moins deux

types d'enzymes (une glycosidase et une amidase ou une peptidase). Ce résultat est compatible avec la présence de plusieurs bandes majeures d'activité dans le profil d'activités PGH de cette souche.

Nous avons comparé les profils d'activités PGH des différentes espèces de *Leuconostoc* suivantes: *Ln mesenteroides*, *Ln pseudomesenteroides*, *L. carnosum*, *Ln citreum* et *Ln lactis*. Les profils obtenus n'étaient pas caractéristiques d'une espèce donnée. En effet, ils étaient similaires pour les différentes souches sauf pour *Ln lactis* ce qui permettait de distinguer cette espèce des autres.

Dans le deuxième chapitre, nous avons entrepris une caractérisation au niveau moléculaire des PGHs de *Leuconostoc*. D'après les études rapportées dans la littérature au sujet d'autres bactéries à Gram positif telles que *B. subtilis* ou *Ent. hirae*, il apparaissait que la purification de ces enzymes était, de manière générale, une tâche fastidieuse et difficile. Ces enzymes sont en effet peu abondantes et fortement liées à la paroi. Leur purification nécessite donc l'utilisation de très grands volumes de culture et la mise au point de conditions d'extraction de la paroi. Nous avons donc choisi de rechercher la présence d'un gène homologue à la seule PGH de bactérie lactique alors caractérisée au niveau moléculaire, l'autolysine majeure AcmA de *L. lactis* qui est une N-acétyl-muramidase.

Nous avons cloné et séquencé le gène *lnmur* de *Ln citreum* 22R. La protéine correspondante, LnMur, est constituée de 209 acides aminés et possède une masse moléculaire de 23.934 Da. Les 31 premiers résidus constituent une séquence signal potentielle. Elle possède des similitudes de séquence avec les N-acétyl-muramidases de *L. lactis*, *Ent. faecalis* et *Ent. hirae*. Contrairement à la plupart des PGHs connues, cette protéine ne possède pas de séquences d'acides aminés répétées qui sont impliquées dans la liaison à la paroi. Nous avons exprimé le gène *lnmur* chez *E. coli* en fusionnant une queue constituée de 6 His à la protéine LnMur dépourvue par ailleurs de sa séquence signal. Nous avons purifié la protéine recombinante par chromatographie d'affinité. Nous avons montré que LnMur possède effectivement une activité PGH en utilisant la technique d'électrophorèse renaturante. Nous avons ensuite construit une protéine de fusion entre LnMur et le domaine C-terminal de l'autolysine majeure AcmA de *L. lactis* contenant les séquences répétées. Cette protéine a été exprimée chez *L. lactis*. L'enzyme chimère obtenue est active comme l'indique la bande d'activité à 44 kDa obtenue en électrophorèse renaturante. Cette protéine de fusion a été exprimée chez un mutant *acmA* de *L. lactis* MG1363. Celui-ci présente une altération au

niveau de la séparation des cellules après leur division ce qui se traduit par la formation de longues chaînes de cellules. L'expression de l'enzyme chimère est capable de compléter la mutation *acmA* en restaurant une séparation des cellules similaire à la souche sauvage. Nos résultats indiquent que l'enzyme LnMur est active également *in vivo* à l'intérieur de la paroi bactérienne.

CHAPITRE I

Autolysis of dairy leuconostocs and detection of peptidoglycane hydrolases by renaturing SDS-PAGE

CIBIK Recep¹ & CHAPOT CHARTIER Marie-Pierre²

Publication soumise à *Journal of Applied Microbiology*, 2000

Institut National de la Recherche Agronomique, ¹Unité de Recherches Laitières et Génétique Appliquée, ²Unité de Biochimie et Structure des Protéines, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas Cedex

Summary

Autolysis of 59 strains of dairy *Leuconostoc* was examined under starvation conditions in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) at 30°C. The extent of lysis appeared to be strain dependant and not related to the species. One of the strain exhibiting the highest extent of autolysis, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L, was selected for further study. The autolysis extent of strain 10L after maximum growth on MRS medium depends on the carbon source. It was maximum with glucose and greatly reduced after growth on lactose or galactose. Renaturing gel electrophoresis analysis of the peptidoglycan hydrolases of strain 10L using *Micrococcus lysodeikticus* cells as substrate revealed two major species of 41 and 52 kDa molecular mass. When *Leuc. mesenteroides* cells were used as substrate, some supplementary activity bands were observed at 33, 65 and 122 kDa. Peptidoglycan hydrolase profiles of strains belonging to the species *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. pseudomesenteroides*, *Leuc. carnosum* and *Leuc. citreum* were similar, while that of *Leuc. lactis* strains was distinct. According to the specificity analysis, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L seems to contain a glycosidase and an *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase or an endopeptidase.

Introduction

Bacterial autolysis results from the hydrolysis of the cell wall peptidoglycan by their own peptidoglycan hydrolases also named autolysins (Shockman and Hölte 1994). On the basis of their cleavage specificities of the peptidoglycan, they are divided most commonly into four classes: i) β -N acetylmuramidase (lysozyme) which hydrolyse the glycan chains after N-acetylmuramic acid, ii) β -N acetylglucosaminidases which hydrolyse the glycan chains after N-acetylglucosamine, iii) N-acetylmuramyl-L-alanine amidases which hydrolyse the bond between N-acetylmuramic acid and L-alanine and iv) peptidases which hydrolyse the main peptide chains or the peptide bridges.

Lactic acid bacteria are widely used in starters for cheese making. Their autolysis has an important impact on cheese ripening. Studies carried out with *Lactococcus lactis* provided evidence that early bacterial autolysis during ripening leads to the release of intracellularly located peptidases into the curd (Chapot-Chartier *et al.* 1994; Wilkinson *et al.* 1994a, 1994b). This results in an increase of free amino acid production rate and a decrease of bitterness (Crow *et al.* 1995; Lepeuple *et al.* 1998a). Thus, lactic acid bacteria autolysis is likely to accelerate ripening and to affect flavour development.

Leuconostocs are lactic acid bacteria widely used in dairy industry together with acid producing lactococci in the manufacturing of some cheese varieties such as Gouda cheese or blue type cheeses. They are able to produce carbon dioxide and diacetyl by metabolising citrate. Whereas diacetyl is an important flavour compound, carbon dioxide is responsible for eye formation (Vedamuthu 1994). The proteolytic system of leuconostocs and its influence on proteolysis through the ripening process has not been studied in detail. However, it has been evidenced that, leuconostocs are as rich as other lactic acid bacteria in intracellular proteolytic enzymes (El shafei *et al.* 1990) which could thus also contribute to cheese organoleptic properties development.

Autolytic properties of leuconostocs might be a good criterium for selection of strains of technological interest. In the present study, autolysis of 59 dairy *Leuconostoc* strains was examined after transfer in phosphate buffer solution. Peptidoglycan hydrolases of *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L and different *Leuconostoc* species were characterised by renaturing SDS-PAGE. The specificity of the autolysins involved in cell wall hydrolysis of *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L was also analysed.

Materials and Methods

Bacterial strains and growth conditions

Leuconostoc strains used in this study were obtained from the CNRZ collection (INRA, Jouy-en-Josas, France) and are shown on Fig. 1. The type strains, *Leuc. carnosum* LMG 11498^T, *Leuc. pseudomesenteroides* LMG 11482^T, *Leuc. citreum* LMG 9849^T, *Leuc. lactis* LMG 8894^T and the strains *Leuc. pseudomesenteroides* LMG 11483 and *Leuc. lactis* LMG 7940 were purchased from the LMG culture collection (Gent University, Belgium). Strains were stored at -18°C in MRS medium (de Man *et al.* 1960) containing 15% (v/v) glycerol and grown in MRS medium at 30°C except *Leuc. carnosum* which was grown at 22°C. 1% inoculum was used for subcultures. Growth and autolysis of *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L was followed in MRS medium buffered with 100 mM sodium β -glycerophosphate. Growth and autolysis was followed by measuring the O.D. at 650nm (O.D.₆₅₀) with a spectrophotometer (Beckman DU 640).

Autolysis of whole cells in buffer solution

Exponential phase cells (O.D.₆₅₀ = 1-1.5) were harvested by centrifugation (3000 g for 10 min at 4°C) and washed in potassium phosphate buffer (50 mM, pH 6.5). Cells were then resuspended in the same buffer to an O.D.₆₅₀ of 0.6-0.8 and incubated at 30°C. The autolysis extent was expressed as the percent decrease of the O.D.₆₅₀ after 24 h incubation.

Preparation of native cell walls

Late exponential phase bacteria (O.D.₆₅₀ = 1-1.5) were harvested by centrifugation (3000 g for 10 min at 4°C). The pellet was washed in cold potassium phosphate buffer (50 mM, pH 6.5) and resuspended in the same buffer supplemented with 1 mM PMSF. The cells were broken by ten ultrasonication cycles (20 s) at 4°C with 20 s intervals. Unbroken cells were discarded by centrifugation (3000 g for 20 min at 4°C). The cell free extract was then recentrifuged (20000 g for 20 min at 4°C). The pellet containing native cell walls was washed twice with cold distilled water and stored at -20°C.

Preparation of cellular fractions

Cell fractions of *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strain 10L were prepared from exponential phase cultures ($\text{O.D.}_{650} = 1\text{--}1.5$). Whole-cell SDS extracts were prepared by resuspending the cell pellet from a 4 ml culture in 40 μl SDS-PAGE sample buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 1% SDS, 10% (v/v) glycerol, 5% (v/v) β -mercaptoethanol and 0.01 % (w/v) bromophenol blue). The suspension was then boiled at 100°C for 3 min in a water bath, centrifuged at 13000 g for 5 min and the supernatant (whole-cell SDS extract) was recovered. Culture supernatant was filtered through 0.45 μm pore-size filters (Millex-HA, Millipore S.A. Bedford, MA 01730 USA), dialysed overnight at 4°C against 1000 volumes of 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) and was then concentrated seven-fold in a Speed-vac (Savant Instruments).

LiCl extract was prepared from a 50 ml bacterial culture. After centrifugation, the cell pellet was resuspended in 500 μl of a solution containing a final concentration of 5 M LiCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) and 1 mM PMSF. The suspension was incubated at 4°C for 1 h. Cells were then removed by centrifugation (3000 g at 4°C for 15 min.). The supernatant was dialysed against 1000 volumes of 100 mM LiCl and 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) at 4°C overnight.

Native cell walls were obtained as described above. The supernatant obtained after centrifugation of the cell free extract for the cell wall preparation was used as the cytoplasmic extract. All the fractions were resuspended in SDS-PAGE sample buffer and heated for 3 min before loading on polyacrylamide gels.

Renaturing SDS-PAGE (zymogram)

Renaturing SDS-PAGE electrophoresis was performed essentially as described by Potvin *et al* (1988) and Lepeuple *et al* (1998b) with 10 or 12.5% (w/v) polyacrylamide separating gels in a Mini-Protean II cell unit (Biorad Laboratories Inc. Hercules CA. USA). Autoclaved cells (120°C for 15 min) of *M. lysodeikticus* ATCC 4698 (Sigma Chemicals PO. Saint Louis Mo. USA) were incorporated into polyacrylamide gels at a concentration of 0.2% (w/v) and used to test bacteriolytic activity. Autoclaved cells of other bacteria were used at a concentration of 0.4% (w/v).

Following electrophoresis, gels were soaked in 250 ml distilled water for 30 min at room temperature under gentle agitation. Gels were then transferred, unless otherwise stated, to 200 ml renaturing buffer (50 mM potassium phosphate buffer pH 6.5 containing 0.1% Triton X-100) and incubated at 37°C with gentle agitation for 16 h. Afterwards, they were stained in 0.01% KOH containing 0.1% methylene blue for 2 h, and destained in distilled water. Lytic bands appeared as clear zones in an opaque background. Molecular masses were determined by comparison with standards run on the same gel.

The influence of different compounds on the activity profile was examined by incubating gel slices in renaturation buffer containing the following compounds: NaCl (100 mM), KCl (100 mM), CaCl₂ (10 mM), MgCl₂ (10 mM), MnCl₂ (10 mM), HgCl₂ (10 mM), EDTA (10 mM), DTT (10 mM) and iodoacetic acid (10 mM). The effect of pH was determined by incubating gel slices in sodium acetate (pH 4.5-5.5), potassium phosphate (pH 5.5-7.5) and Tris-HCl (pH 7.5-9) buffers.

Determination of autolysin specificity

Native cell walls (5-10 mg/ml) were resuspended in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) and the suspension was incubated at 30°C for 24 h. Cell wall hydrolysis was monitored by measuring O.D.₆₅₀. Unhydrolysed cell walls were eliminated by centrifugation (16000 g for 15 min). The amount of reducing sugars liberated during cell wall hydrolysis was determined by the method of Park and Johnson (1949) as modified by Thompson and Shockman (1968). The amount of free amino groups liberated during cell wall hydrolysis was determined by the method of Ghuysen *et al* (1966).

Results

Autolysis of dairy leuconostocs in potassium phosphate buffer

Conditions leading to autolysis in a buffered solution were optimised using *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strain 10L. Maximal autolysis was observed when cells were harvested in exponential phase and then incubated in potassium phosphate buffer (50 mM at pH between 5.5 and 7.5). Temperature optimum for autolysis was 30°C (data not shown). Under the defined optimal conditions (i.e. 50 mM potassium phosphate, pH 6.5,

30°C), we examined autolysis of 59 *Leuconostoc* strains. After 24 h incubation, the extent of autolysis ranged between 7 to 44% (Fig. 1). No significant variation was observed upon further incubation. *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L was identified as undergoing high extent of autolysis (42%) in the buffer system described above. We therefore selected this strain for further study.

Growth and autolysis in MRS medium containing various carbon sources

The influence of the nature of the carbon source on growth and autolysis of strain 10L was tested in buffered MRS medium (Fig. 2). Decrease of O.D.₆₅₀ started just after maximal growth. After 72 h incubation, the autolysis extent reached 79, 40, 23 and 12% when glucose, sucrose, galactose and lactose (1% concentration for each) were respectively used as carbon source. Thus, autolysis depends on the nature of carbon source in the growth medium. When sodium β -glycerophosphate was omitted from the medium, autolysis was reduced probably due to a lower pH value at the end of exponential phase of growth (data not shown).

Zymogram analysis of peptidoglycan hydrolases

Whole-cell SDS extract of *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L was tested for its peptidoglycan hydrolase activities using *M. lysodeikticus* cells as substrate by renaturing SDS-PAGE (Fig. 3, lane 1). Two bacteriolytic activity bands were revealed after two hours of incubation in renaturation buffer at 37°C. The bands, referred to as A1 and A2, have apparent molecular masses of 52 kDa and 41 kDa respectively. Further incubation (for 16 h) revealed another lytic zone containing variable number of bands with molecular masses ranging between 45 and 49 kDa (A3), as well as a weak 42 kDa band in some cases. These bands could not be reproducibly found in gels, possibly suggesting that they corresponded to degradation products of the 52 kDa enzyme.

Various cellular fractions from strain 10L were tested for their peptidoglycan hydrolase activities (Fig. 4). Similar profiles were obtained with whole-cell SDS extract, cell wall fraction and culture supernatant. In LiCl extract, two additional bands having apparent molecular masses of 31 and 27 kDa were detected. These bands were also observed at very low intensities in the supernatant fraction, suggesting that they could be degradation products of the major activities.

Influence of pH and chemical compounds on the peptidoglycan hydrolase profile

The effect of pH and various chemical compounds on the renaturation and activity of the 3 major bacteriolytic bands (A1, A2 and A3) of strain 10L was studied by incubating gel slices under different conditions during the renaturation procedure. Optimum pH was found to be between 5.5 and 7.5 values and the intensity of the bands was reduced under acidic and basic conditions. The presence of monovalent cations K^+ (100 mM) and Na^+ (100 mM) in the renaturation buffer promoted the activities of nearly all the bands, whereas partial inhibition was observed in the presence of the divalent cations Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} . All the 3 activity bands were completely inhibited by the divalent cation Hg^{2+} . EDTA, iodoacetic acid and DTT had no significant influence (Table 1).

Substrate specificity of peptidoglycan hydrolases

To determine the substrate specificity of the peptidoglycan hydrolases revealed in zymogram, we tested whole-cell SDS extract of strain 10L in gels containing autoclaved whole cells of different bacteria. When cells of *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* 50M were incorporated into the gel six bacteriolytic activity bands were detected, three corresponding to A1, A2 A3 and three others which did not react with micrococci (Fig. 3. lane 2). These extra bands of apparent molecular masses 122, 65 and 33 kDa were however less intense. Activity bands A1, A2 and A3 were also revealed when *Listeria monocytogenes* V7 cells were incorporated into the gel (results not shown). No activity was detected on *Listeria innocua* Lin11, *Enterococcus faecalis* EfS1, *Staphylococcus aureus* S23, *Staphylococcus xylosus* C39D6 or *Brevibacterium linens* OC9.

Comparison of the peptidoglycan hydrolase profiles of different *Leuconostoc* strains and species

We compared the peptidoglycan hydrolase profiles of 29 strains belonging to *Leuc. mesenteroides* and *Leuc. citreum* species with *M. lysodeiktikus* substrate under the same conditions. 18 out of 29 strains revealed lytic activity bands. Though some variations regarding the intensities of bands were observed, similar profiles in terms of apparent

molecular masses were observed for all positive strains (like the profile obtained for strain 10L) (data not shown). We considered that the 11 *Leuconostoc* strains that gave no lytic pattern might show lytic activity with a more closely related cell wall substrate. We therefore performed zymograms of these strains using *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* 50M whole-cells as the substrate. Nevertheless, no activity was detected after 48 h incubation. In a second assay, we attempted to extract the lytic enzymes using 5 M LiCl (see Material and Methods), however no activity was detected regardless of the substrate used. These results may indicate that either the extraction procedure results in inefficient extraction or inactivation of peptidoglycan hydrolase activities or that these activities are weak in the corresponding strains.

We then compared the peptidoglycan hydrolase profiles of different strains belonging to different *Leuconostoc* species. *Leuc. carnosum* 11498, *Leuc. pseudomesenteroides* 11483, *Leuc. pseudomesenteroides* 11482 and *Leuc. citreum* 9849 exhibited peptidoglycan hydrolase profiles similar to that of *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L (Fig. 5), while *Leuc. lactis* 9740 and 8894 exhibited a different one. The latter strains displayed a double band with molecular masses of 67-68 kDa. Another band at 52 kDa was observed only with the strain 9740. These results show that *Leuc. lactis* strains can be separated from other species by their peptidoglycan hydrolase profile.

Specificity analysis of autolysin(s)

The specificity of the autolysins involved in autolysis of cell walls of *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L was studied. Identification of newly exposed chemical groups of the peptidoglycan after autolysis of native cell walls enables to determine the specificity of the endogenous autolytic enzymes. The presence of a glycosidase (muramidase or glucosaminidase) results in an increase in the quantity of reducing groups, whereas the presence of an amidase or a peptidase results in an increase in the number of free amino groups. As shown on Fig. 6, autolysis of native cell walls of *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L was accompanied by an increase in both reducing groups and free amino groups. This suggests that the strain contains at least two different enzymes, a glycosidase and an amidase or a peptidase.

Discussion

In the present study, we provide a first evaluation of the autolytic properties and peptidoglycan hydrolases content of dairy leuconostocs.

Transfer of growing cells of dairy *Leuconostoc* strains in a buffered solution induces cell autolysis as reported previously for other Gram positive bacteria and in particular for other lactic acid bacteria such as *L. lactis* (Mou *et al.* 1976; Ostlie *et al.* 1995), *Lactobacillus helveticus* (Lortal *et al.* 1989) or *Lact. acidophilus* (Murga *et al.* 1995). The propensity to lyse under starvation conditions appeared as a strain dependent character in *Leuconostoc*. It varies among the strains belonging to the same species and thus, does not appear as a species related character.

We have observed that autolysis, after reaching the stationary phase, of *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L varies according to the carbon source in the medium. The highest extent of autolysis was observed when cells were grown on glucose. Similar results were reported previously for other lactic acid bacteria such as *L. lactis* (Moustapha and Collins 1968; Vegarud *et al.* 1983) or *Streptococcus thermophilus* (Sandholm and Sarimo 1981; Thomas and Crow 1983). In *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis*, the cells were osmotically more fragile when grown on glucose than when grown on galactose or lactose (Moustapha and Collins 1968). According to the authors, the osmotic fragility of the cells would result from their inability to use glucose as an adequate precursor of galactosamine that is found in teichoic acids of the cell wall. This would result in weaker cell wall and higher susceptibility to autolysins

By renaturing SDS-PAGE, we have evidenced several peptidoglycan hydrolase activities in *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L. Two major molecular species at 52 and 41 kDa corresponding to bands A1 and A2, were detected on *Micrococcus* and *Leuconostoc* substrate and were equally active on *Listeria monocytogenes*. A third lytic zone with several bands (identified as A3) may correspond to degradation products of A1 since the number and intensity of the bands varied. In addition, three weaker activity bands at 122, 65 and 33 kDa, were visualised only on *Leuconostoc* substrate. The exact number of enzymes present in bacteria is however difficult to determine by this technique. First, only enzymes able to renature after SDS treatment are susceptible to be detected. Secondly, the number of bands detected may not reflect the exact number of peptidoglycan hydrolases present in the strain. As reported in previous studies, post-translational modification such as glycosylation may generate several forms of the same enzyme and processing or proteolytic degradation

may produce fragments that retain enzymatic activity. In *L. lactis* for example, it was shown, by inactivation of the gene encoding the major autolysin AcmA, that several bands detected by renaturing electrophoresis are related to AcmA and correspond to degradation products or to a precursor form (Buist *et al.*, 1995). In the case of *Staphylococcus aureus* also, most of the multiple bands detected by renaturing SDS-PAGE results from the processing of the major autolysin Atl (Foster *et al.* 1995).

In agreement with previous reports (Ostlie *et al.* 1995; Chapot-Chartier *et al.* 1996; Lortal *et al.* 1997), we observed that the peptidoglycan hydrolase profile of strains within a species is conserved. However, in contrast to previous observations for the *Lactobacillus* genus (Lortal *et al.*, 1997), the peptidoglycan hydrolase profile does not appear specific of one species in the *Leuconostoc* genus. It may rather be an indication of species relatedness.

Further studies of the peptidoglycan hydrolases will require isolation of their genes. Construction of mutants by gene inactivation would then allow to evaluate their role in cell physiology as well as in cell autolysis.

Acknowledgements

We wish to thank Anne-Sophie Lepeuple for helpful advice for renaturing SDS-PAGE, Patrick Tailliez and Denis Hemme for helpful discussions. We are very grateful to Sandy Gruss for critical reading of the manuscript. R. C. was recipient of a fellowship from Turkish High Education Council.

References

- Buist, G., Kok, J. Leenhouts, K. J., Dabrowska, M., Venema G. and Haandrikman A. J. (1995) Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation. *Journal of Bacteriology* **177**, 1554-1563.
- Chapot-Chartier, M.-P., Deniel, C., Rousseau, M., Vassal, L. and Gripon, J. C. (1994) Autolysis of two strains of *Lactococcus lactis* during cheese ripening. *International Dairy Journal* **4**, 251-269.
- Chapot-Chartier, M.-P. (1996) Les autolysines des bactéries lactiques. *Lait* **76**, 91-109.
- Crow, V. L., Coolbear, T., Gopal, P. K., Martley, F. G., McKay, L. L. and Riepe H. (1995) The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *International Dairy Journal* **5**, 855-875.
- De Man, J. C., Rogosa, M. and Sharpe, M. E. (1960) A medium for cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* **23**, 130-135.
- El-Shafei, H., El-Soda, M. and Ezzat, N. (1990) The peptide hydrolase system of the *Leuconostoc*. *Journal of Food Protection* **53**, 165-169.
- Foster, S. (1995) Molecular characterization and functional analysis of the major autolysin of *Staphylococcus aureus* 8325/4. *Journal of Bacteriology* **177**, 5723-5725.
- Ghuysen, J. M., Tipper, D. J. and Strominger J. L. (1966) Enzyme that degrade bacterial cell walls. *Methods in Enzymology* **8**, 885-899.
- Lepeuple, A. S., Vassal, L., Cesselin, B., Delacroix-Buchet, A., Gripon J.-C. and Chapot-Chartier, M.-P. (1998a) Involvement of a prophage in the lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2 during cheese ripening. *International Dairy Journal* **8**, 667-674.
- Lepeuple, A. S., Van Gemert, E. and Chapot-Chartier, M.-P. (1998b) Analysis of the bacteriolytic enzymes of the autolytic *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain AM2 by renaturing polyacrylamid gel electrophoresis : identification of a prophage encoded enzyme. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4142-4148.
- Lortal, S., Boyaval, P. and van Heijenoort, J. (1989) Influence de plusieurs facteurs sur l'autolyse de *Lactobacillus helveticus* CNRZ 414. *Lait* **69**, 223-231.

- Lortal, S., Valence, F., Bizet, C. and Maubois, J. L. (1997) Electrophoretic pattern of peptidoglycane hydrolases, a new tool for bacterial species identification: application to 10 *Lactobacillus* species. *Research in Microbiology* **148**, 461-474.
- Mou, L., Sullivan, J. J. and Jago, G. R. (1976) Autolysis of *Streptococcus cremoris*. *Journal of Dairy Research* **43**, 275-282.
- Moustafa, H. H. and Collins, E. B. (1968) Role of galactose or glucose-1-phosphate in preventing the lysis of *Streptococcus diacetylactis*. *Journal of Bacteriology* **95**, 592-602.
- Murga, M. L. F., de Ruiz, H. A. P. and de Valdez, G. F. (1995) Influence of the incubation temperature on the autolytic activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Applied Bacteriology* **78**, 426-429.
- Ostlie, H., Vegarud, G. and Langsrud, T. (1995) Autolysis of lactococci: detection of lytic enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis and characterisation in buffer systems. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 3598-3603.
- Park, J. T. and Johnson, M. J. (1949) A submicro determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* **181**, 149-151.
- Potvin, C., Leclerc, D., Tremblay, G., Asselin, A. and Bellemare, G. (1988) Cloning, sequencing and expression of a *Bacillus* bacteriolytic enzyme in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* **214**, 241-248.
- Sandholm, E. and Sarimo, S. S. (1981) Autolysis of *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiology Letters* **11**, 125-129.
- Shockman, G. D. and Hölte, J.-V. (1994) Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases. New Comprehensive Biochemistry. In *Bacterial Cell Wall*, Edited by Ghuysen, J.-M. and Hakenbeck, R. 131-166.
- Thomas, T. D. and Crow, V. L. (1983) Lactose and sucrose utilisation by *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiology Letters* **17**, 13-17.
- Thompson, J. S. and Shockman, G. D. (1968) A modification of the Park and Johnson reducing sugar determination suitable for the assay of insoluble materials its application to bacterial cell wall. *Analytical Biochemistry* **22**, 260-268.
- Vedamuthu, E. R. (1994) The dairy *Leuconostoc*: use in dairy products. *Journal of Dairy Science* **77**, 2725-2737.

- Vegarud, G., Castberg, H. B. and Langsrud, T. (1983) Autolysis of group N streptococci: effects of media composition, modifications and temperature. *Journal of Dairy Science* **66**, 2294-2302.
- Wilkinson, M. G., Guinee, T. P. and Fox, P. F. (1994a) Factors which may influence the determination of autolysis of starter bacteria during Cheddar cheese ripening. *International Dairy Journal* **4**, 141-160.
- Wilkinson, M. G., Guinee, T. P., O'Callaghan, D. M. and Fox, P. F. (1994b) Autolysis and proteolysis in different strains of starter bacteria during Cheddar cheese ripening. *Journal of Dairy Research* **61**, 249-262.

Table 1. Influence of different compounds on the renaturation and activity of bacteriolytic bands

Chemical compounds ^b	Intensity of bacteriolytic bands ^a		
	A1	A2	A3
NaCl (100 mM)	+	+	+-
KCl (100 mM)	+	+	+-
CaCl ₂ (10 mM)	-	-	+-
MgCl ₂ (10 mM)	+-	-	+-
MnCl ₂ (10 mM)	+-	-	-
HgCl ₂ (10 mM)	--	--	--
EDTA (10 mM)	+-	+-	+-
DTT (10 mM)	+-	+-	+-
Iodoacetic acid (10 mM)	+-	+-	+-

^a --, complete inhibition; -, weak inhibition; +-, no effect; +, activation

^b The compounds were added in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) containing 0.1% (v/v) Triton X-100.

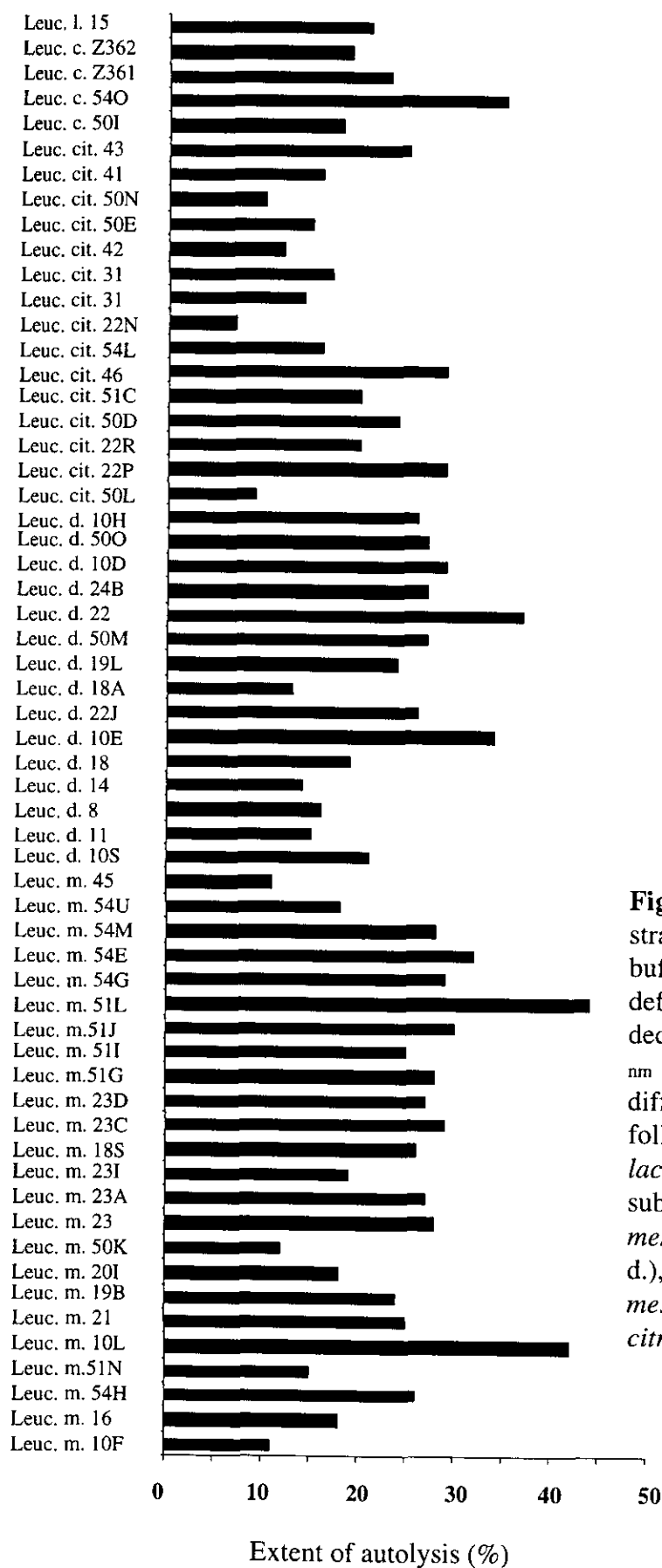


Figure 1. Autolysis of dairy *Leuconostoc* strains in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5. The autolysis extent was defined as the percentage of turbidimetric decrease of the cell suspension at O.D. 650 nm after 24 h incubation at 30°C. The different strains tested belong to the following species and subspecies: *Leuc. lactis* (Leuc. l.), *Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris* (Leuc. c.), *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (Leuc. d.), *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (Leuc. m.), and *Leuc. citreum* (Leuc. cit.).

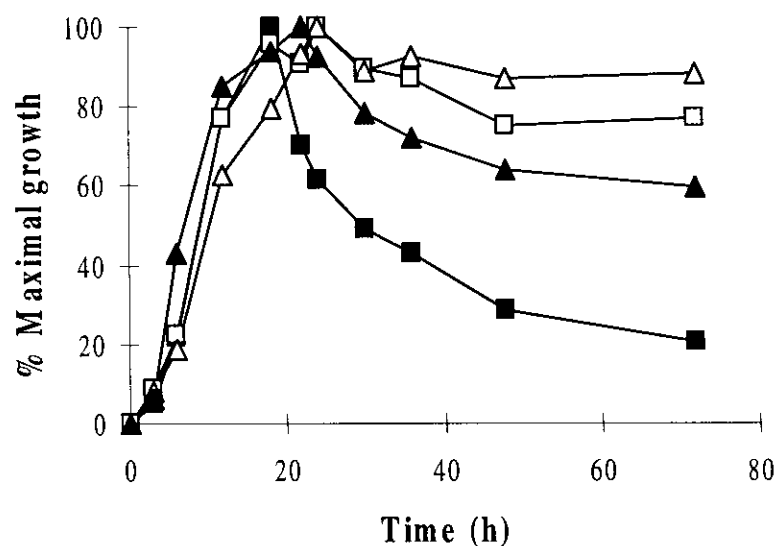


Figure 2. Influence of carbon source on autolysis of *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L. The strain was grown in MRS medium buffered with 100 mM sodium β -glycerophosphate and containing glucose (■), lactose (Δ), galactose ($\square$) or saccharose ($\blacktriangle$) at 1% concentration as carbon source. O.D.₆₅₀ was measured and the resulting curves were compared by normalising maximal growth to 100%.

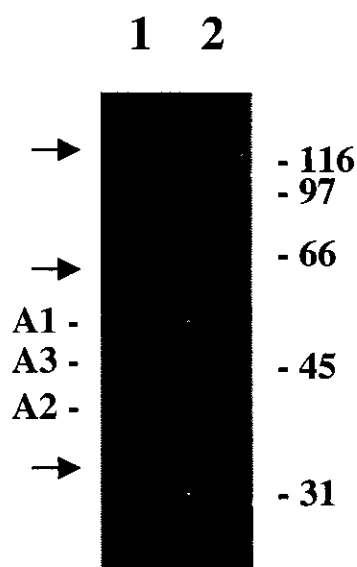


Figure 3. Peptidoglycan hydrolase profile of *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L on a gel containing 0.2 % (w/v) autoclaved cells of *M. lysodeikticus* (lane 1) or 0.4% (w/v) of autoclaved cells of *Leuc. mesenteroides* subsp *dextranicum* 50M (lane 2) as the substrate. Whole-cell SDS extracts were loaded on the gels and the activities were revealed in renaturing buffer after 16 h incubation at 37°C. The molecular masses (in kDa) of standards are indicated on the right.

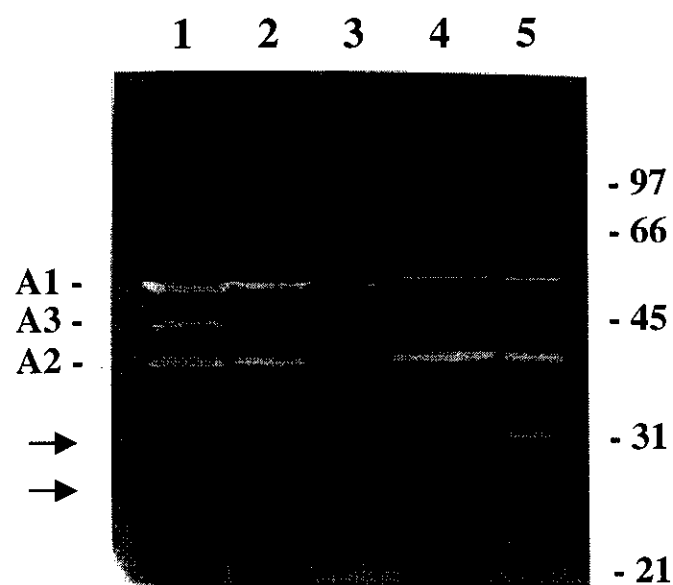


Figure 4. Peptidoglycan hydrolase profiles of different cellular fractions from *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strain 10L. Autoclaved cells of *M. lysodeikticus* (0.2%) were used as substrate. Cellular fractions were prepared as described in Material and Methods. Whole-cell SDS extract (lane 1), cell wall fraction (lane 2), cytoplasmic fraction (lane 3), culture supernatant (lane 4) and LiCl extract (lane 5). The molecular masses (in kDa) of standards are indicated on the right.

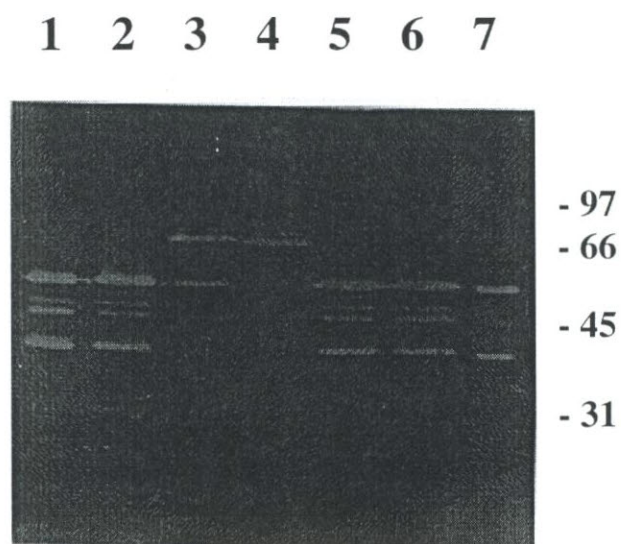


Figure 5. Peptidoglycan hydrolase profiles of different *Leuconostoc* species. Whole-cell SDS extracts of the following strains: *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L (lane 1), *Leuc. carnosum* LMG 11498 (lane 2), *Leuc. lactis* LMG 9740 (lane 3), *Leuc. lactis* LMG 8894 (lane 4), *Leuc. pseudomesenteroides* LMG 11483 (lane 5), *Leuc. pseudomesenteroides* LMG 11482 (lane 6) and *Leuc. citreum* LMG 9849 (lane 7) were loaded on a gel containing 0.2% *M. lysodeikticus* cells. The molecular masses (in kDa) of standards are indicated on the right.

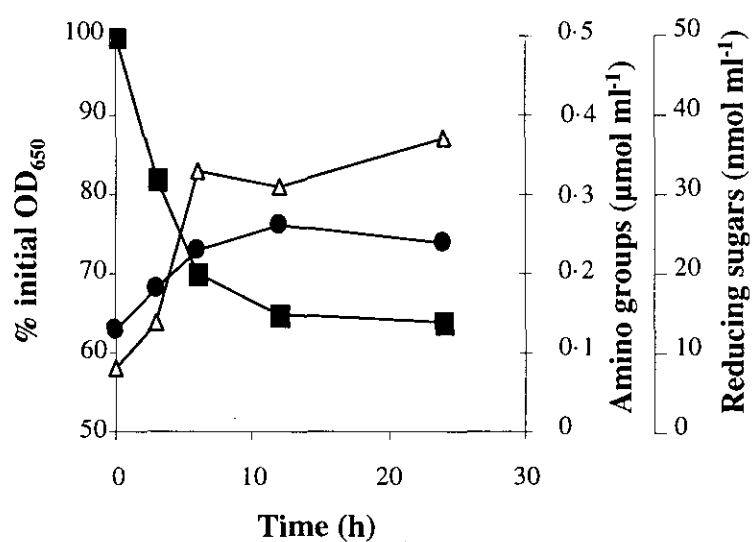


Figure 6. Autolysis of native cell walls of *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L (■) and analysis of reducing sugars (Δ) and free amino groups (●). Cell walls were resuspended in potassium phosphate buffer (50 mM, pH 6.5 at 30°C) and autolysis was monitored by measuring O.D.₆₅₀.

CHAPITRE II

Identification of Lnmur, an atypical peptidoglycan hydrolase derived from *Leuconostoc citreum*.

R. Cibik¹, P. Tailliez¹, P. Langella¹ and M.-P. Chapot-Chartier²

Publication soumise à *Applied and Environmental Microbiology*, 2000

Institut National de la Recherche Agronomique, ¹Unité de Recherches Laitières et Génétique Appliquée, ²Unité de Biochimie et Structure des Protéines, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas Cedex

ABSTRACT

A gene encoding a protein homologous to known bacterial N-acetyl-muramidases has been cloned from *Leuconostoc citreum* by a PCR-based approach. The encoded protein, Lnmur, consists of 209 amino acid residues with a calculated molecular mass of 23,934 Da including a 31 amino acid putative signal peptide. In contrast to most of the other known peptidoglycan hydrolases, Lnmur does not contain amino acid repeats involved in cell wall binding. By renaturing SDS-PAGE, we have shown that the purified Lnmur protein exhibits peptidoglycan hydrolysing activity. An active chimeric protein was constructed by fusion of Lnmur to the C-terminal repeat-containing domain (cA) of AcmA, the major autolysin of *Lactococcus lactis*. Expression of the Lnmur-cA fusion protein was able to complement an *acmA* mutation in *L. lactis*; normal cell separation after cell division was restored by Lnmur-cA expression.

INTRODUCTION

Bacteria produce one or several peptidoglycan hydrolases (PGHs) which are capable of hydrolyzing covalent bonds in the peptidoglycan of their own cell envelope (for review, see 40). Some of them, named autolysins, are able to trigger cell autolysis. PGHs are located in

the cell wall and are involved in various cellular functions including cell wall expansion, cell wall turnover or cell separation. On the basis of their cleavage site in the peptidoglycan, four types of PGHs are defined: i) N-acetyl-muramidases; ii) N-acetyl-glucosaminidases; iii) N-acetyl-muramoyl-L-alanine amidases and iv) peptidases. Most of the PGHs characterized so far, have a modular structural organization with two domains: a catalytic domain containing the enzyme active site and a cell wall binding domain composed of several amino acid repeats (19, 26).

Autolysis of lactic acid bacteria (LAB) used as starters for cheese manufacturing plays an important role in flavour development during ripening (for reviews see 15, 12). It has been shown that lysis of *Lactococcus lactis* starter strains leads to the release of intracellular peptidases in the cheese curd and, as a result, more free amino acids (which are aroma precursors) are produced, and hydrophobic bitter peptides are degraded (11, 45, 31).

Leuconostocs are heterofermentative LAB used as cheese starters in association with lactococci. They contribute to the development of cheese organoleptic properties by metabolizing citrate to diacetyl, an important flavor compound, and to CO₂, which is responsible for eyes formation in some Dutch cheeses (14). Like lactococci, leuconostocs also contain a diverse pool of peptidases (20). Thus, autolysis of *Leuconostoc* starter strains could contribute to peptidolysis during cheese ripening. In order to understand and control autolysis, a first step is to identify the enzymes involved in this phenomenon.

Among LAB, the major autolysin AcmA of *L. lactis* remains, at this time, the only PGH characterized at the genetic level. AcmA is a N-acetyl-muramidase that is required for proper cell separation after cell division (8) and is involved in autolysis observed during stationary phase after growth in liquid medium (10).

In the present study, we report the cloning, sequencing and expression of a PGH-encoding gene, named *lnmur*, from *Leuconostoc citreum* 22R. The Lnmur protein shows sequence homology to the N-terminal catalytic domain of several known bacterial muramidases. However, in contrast to these muramidases, it is devoid of a specific cell wall binding domain. We constructed an active chimeric protein by fusion of Lnmur and the *L. lactis* AcmA cell wall binding domain, and showed that it complements an AcmA deficiency in *L. lactis*.

MATERIALS and METHODS

Bacterial strains, plasmids and growth conditions.

The strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *Ln. citreum* 22R and *L. lactis* strains were grown at 30°C respectively in MRS medium (17) or M17 medium containing 0.5% glucose (M17-glu) (43). *Escherichia coli* strains were grown in LB (Luria-Bertani) medium at 37°C under vigorous shaking conditions. When required, antibiotics were added at the following concentrations: ampicillin 50 µg/ml, chloramphenicol 25 µg/ml, tetracycline 10 µg/ml and erythromycin 5 µg/ml, except otherwise stated.

General DNA techniques, PCR and transformation.

Molecular cloning techniques were performed essentially as described (39). Total DNA was isolated from *Ln. citreum* 22R according to de los Reyes-Gavillan *et al.* (16) except that 10 IU of mutanolysin (Sigma Chemicals, Saint Louis Mo., USA) was added to TES buffer (25% sucrose, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0). Plasmid DNA was isolated essentially as described (7); for *L. lactis*, cells were incubated in TES buffer containing 10 mg of lysozyme per ml at 37°C for 10 min before alkaline lysis. Restriction enzymes, DNA ligase, T4 DNA polymerase and Klenow enzyme were obtained from Gibco BRL or New England Biolabs and used according to suppliers' instructions. PCR was performed with a Perkin-Elmer Cetus thermocycler (Norwalk Conn.). Electroporation of *L. lactis* was performed as described (29) and transformants were plated on M17-glu agar plates containing the required antibiotic. DNA sequencing was performed by the dideoxy-chain termination method with the Dye Terminator ABI Prism Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer). DNA sequence was determined with an automated Applied Biosystems 373 DNA sequencer (Perkin Elmer). Protein homology searches were carried out with the Blast program (3).

Cloning of the *lnmur* gene.

Two conserved stretches of amino acids were selected from the alignment of the N-terminal regions of the N-acetylmuramidases of *L. lactis* (8), *Enterococcus faecalis* (5) and *Enterococcus hirae* (13). These were used to design the degenerated primers LnP1 and LnP2 (Table 2). A PCR reaction with these primers on *Ln. citreum* 22R total DNA gave rise to a single DNA fragment with the expected size. The nucleotide sequence of this 323-bp fragment was determined and the deduced amino acid sequence revealed similarity with the N-terminal region of AcmA, the muramidase of *L. lactis*. The entire gene was cloned by

reverse PCR as previously described (41) with the divergent primers LnP3 and LnP4 (Table 2) corresponding to internal sequences of the 323-bp fragment. Total DNA from *Ln. citreum* 22R was digested with *Hind*III, and the resulting fragments were self-ligated and used as template for PCR reaction with the divergent primers. A 3.6 kb DNA fragment was amplified and sequenced.

Expression and purification of the 6-His-tagged Lnmur protein in *E. coli*.

The expression vector pQE30 (Qiagen) was used for overproduction of the Lnmur protein in *E. coli*. A DNA fragment encoding *lnmur* without its putative signal peptide was amplified with the primers LnP5 and LnP6 (Table 2) and fused in frame downstream of the N-terminal 6xHis box sequence in pQE30. The resulting plasmid (pTIL343) was used to transform *E. coli* XL1-Blue competent cells. IPTG was added at a final concentration of 1 mM to the culture at OD₆₅₀ = 0.6-0.8 to induce the expression of the 6-His-tagged Lnmur protein. The culture was further incubated at 37°C for 4 h. The cells were harvested by centrifugation and broken by freezing and thawing process followed by sonication. The inclusion bodies containing the recombinant protein were collected by centrifugation at 15,000 X *g* for 10 min at 4°C. The recombinant protein was solubilized in 8 M urea and purified on a nickel-nitriloacetic acid (Ni-NTA) spin column (Qiagen) as recommended by the supplier. Protein concentration was determined with the Coomassie protein assay kit (Pierce).

Mass spectrometry

Protein molecular mass was determined by mass spectrometry with a MALDI-TOF system (Matrice Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight, LD-TOF G 2025A, Hewlett Packard).

Construction of a chimeric protein between Lnmur and the C-terminal domain of *L. lactis* AcmA and expression in *L. lactis*

A chimeric protein was constructed by fusion of Lnmur with the C-terminal domain (cA) of *L. lactis* AcmA containing the amino acid repeats involved in cell wall binding (10). The Lnmur-cA chimeric protein was expressed in *L. lactis* using the nisin-inducible expression system (18) with the plasmid vector pCYT1 (P. Langella, personal communication). PCYT1 is a derivative of pNZ8010 (18) in which the *gusA* gene was replaced by a DNA fragment encoding the *usp45* ribosome binding site (RBS) (44) fused to

Staphylococcus aureus nuc gene (30). pCYT1 was digested with *Nsi*I and *Xho*I to remove *nuc* and to place the *lnm*ur-*cA* gene fusion under control of the *nisA* promoter and expressed via the *usp45* RBS.

The *lnm*ur gene was amplified by PCR (with primers LnP7 and LnP8) and the 3'-end of the *acmA* gene (*cA*) was amplified by PCR from *L. lactis* IL1403 total DNA (with primers LnP9 and LnP10). The blunted PCR products were cloned in the *Eco*RV site of pBSK+ to yield plasmids pTIL341 (for *lnm*ur) and pTIL342 (for *cA*). pTIL341 and pTIL342 were subsequently digested with *Pst*I and *Cla*I, and with *Cla*I and *Xho*I respectively, to recover the inserts. The 636-bp *Pst*I-*Cla*I fragment carrying the *lnm*ur gene plus the 740-bp *Cla*I-*Xho*I fragment carrying the 3'-end of *acmA* were mixed with pCYT1 vector digested with *Nsi*I and *Xho*I and the mixture was ligated. Plasmid pTIL344 containing both fragments allowing in frame fusion of *lnm*ur and the 3'-end of *acmA* was selected. It was used to transform *L. lactis* NZ9000 (kindly provided by Oscar Kuipers, NIZO, Ede, NL) that contains the regulatory *nisRK* genes integrated in its chromosome and the *acmA*-negative mutant, *L. lactis* MG1363*acmAΔI* (8). In the latter case, MG1363*acmAΔI* harboring pTIL344 was then transformed with pNZ9520 or pNZ9530 plasmid (27), which carry the regulatory *nisRK* genes.

For induction of the *nisA* promoter, strains were grown until an OD₆₅₀ of 0.5 was reached and nisin was added at a final concentration of 2.5 ng/ml. Growth was continued for 5 h and cells were harvested. SDS cell-extracts were prepared as described below and submitted to SDS-PAGE or tested for bacteriolytic activity by renaturing SDS-PAGE.

SDS-PAGE and detection of bacteriolytic activity by renaturing SDS-PAGE.

SDS-PAGE was performed according to Laemmli (28) with 10 to 15% (wt/vol) polyacrylamide separating gels. Gels were stained with Coomassie brilliant blue 250 (Sigma).

For renaturing SDS-PAGE, autoclaved cells of *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 (0.2%, wt/vol) (Sigma), of *Ln. mesenteroides* 50M (0.4%, wt/vol) or of *L. lactis* NCDO763 (0.4%, wt/vol) were incorporated into polyacrylamide gels as substrate. Preparation of samples and detection of bacteriolytic activity were performed essentially as described (37, 32). For the preparation of *Ln. citreum* SDS cell-extract, 4 ml of culture was centrifuged and the cell pellet was resuspended in 40 µl of SDS-PAGE sample buffer. The suspension was boiled at 100°C for 3 min, centrifuged at 13,000 X g for 10 min, and the supernatant (SDS cell-extract) was loaded on the gel. Culture supernatant was concentrated 25 times with a Centriplus concentrator (Amicon, Beverly, USA) with a 10,000 Da molecular weight cut-off.

Following electrophoresis, gels were soaked in 250 ml distilled water for 30 min at room temperature under gentle agitation. They were transferred into 200 ml of renaturation buffer consisting of 50 mM potassium phosphate (pH 6.5) buffer with 1% (vol/vol) Triton X-100 and further incubated at 37°C for 16 h under gentle shaking conditions. The gels were then stained with 0.1% methylene blue in 0.01% KOH and subsequently destained with distilled water. Bacteriolytic activity bands appeared as clear zones in the opaque background. Molecular masses were determined with standards run on the same gel.

Fluorescent *in situ* hybridization

Fluorescent *in situ* hybridization was performed as described by Amann *et al.* (2). Cells were treated with lysozyme and a 16S RNA-targeted probe (EUB338) (1) labeled with fluorescein or rhodamin was used for hybridization. Photographs of cells were taken with an epifluorescence microscope (Nikon, Japan)

Nucleotide sequence accession number

The nucleotide sequence described in this paper is deposited in the EMBL/NCBI/DDBJ sequence databases under the accession number AF176553.

RESULTS

Cloning and sequencing of *lnmur* gene from *Ln. citreum* 22R

Using the PCR-based strategy described in Material and Methods, we have cloned a 3.6 kb DNA fragment from *Ln. citreum* 22R total DNA. Analysis of the nucleotide sequence of this fragment revealed the presence of a 630-bp ORF (*lnmur*) sharing homology with *L. lactis acmA* (Fig.1). *lnmur* is preceded by a putative RBS as well as by consensus -10 and -35 regions corresponding to a putative promoter. A potential transcription terminator is present downstream of the ORF.

lnmur specifies a 209-residue polypeptide (Lnmur), with a calculated molecular mass of 23,934 Da. The first 31 amino acids are predicted to serve as a signal peptide (35). The protein has a predicted isoelectric point (pI) of 9.1. Cleavage of the signal peptide would yield a 178-residue mature protein with a calculated molecular mass of 20,171 Da and a predicted isoelectric point of 5.4.

Sequence homology searches revealed that Lnmur has sequence identity with the N-terminal regions of the *L. lactis* muramidase AcmA (37%) (8), the *E. hirae* muramidase-2

(37%) (13) and the *E. faecalis* autolysin (38%) (5) (Fig. 2). Significant level of identity was also found with the C-terminal region of the flagellar protein FlgJ of *Salmonella typhimurium* (37%) which possesses peptidoglycan-hydrolyzing activity (25, 34) and the *E. coli* FlgJ homolog (37%) (6) (Fig. 2). These proteins have a modular structural organization with a catalytic domain fused to a cell wall binding domain (26). Surprisingly, Lnmur comprises just the catalytic domain of these proteins but lacks a domain containing amino acid repeats. Lnmur contains several acidic residues separated by 13-33 residues, which could be involved in the catalytic site of the enzyme as proposed for other muramidases (26, 34). For example, E120 and D137 are spaced by 16 amino acids.

Part of an ORF (ORFB) was found upstream of *lnmur* (Fig. 1) but no homology was found with sequences present in the databases. Downstream of *lnmur*, another complete ORF was identified (accession number AF176554), which encodes a 750-residue polypeptide with high sequence similarity with *Staphylococcus aureus* DNA helicase PcrA (51 %) (24) and *Bacillus subtilis* homolog (55%) (36)

Lnmur has peptidoglycan-hydrolyzing activity.

The Lnmur protein devoid of its putative signal sequence was overproduced in *E. coli* as a 6xHis N-terminal tagged protein. It was purified from inclusion bodies by metal-chelate affinity chromatography on a Ni-NTA spin column. The eluted fraction was analyzed by SDS-PAGE and a single band with an apparent molecular mass of 24.5 kDa was detected after Coomassie Blue staining (Fig. 3, lane 1 and 2). The apparent molecular mass of the protein was higher than that calculated (21,569 Da). Nevertheless, the molecular mass of the purified protein determined by mass spectrometry ($21,680 \pm 100$ Da) fits the calculated mass, thus indicating that the electrophoretic mobility of the protein may be altered by the 6xHis-tag.

The peptidoglycan-hydrolyzing activity of the purified protein was assayed by renaturing SDS-PAGE with autoclaved cells of *M. lysodeikticus* as the substrate. Activity was observed as a clear band at a molecular mass of around 24 kDa on the opaque background after incubation in renaturation buffer (Fig. 3, lane 3), thus indicating that Lnmur has peptidoglycan-hydrolyzing activity. Several activity bands can be detected in *Ln. citreum* 22R cell extracts by renaturing SDS-PAGE (R. Cibik and M.-P. Chapot-Chartier, submitted for publication). In order to determine whether the activity corresponding to Lnmur could be detected in *Ln. citreum* 22R, whole SDS cell extract and concentrated culture supernatant were tested in the same conditions as the purified Lnmur. However, even after 2 days of

incubation of the gel in renaturation buffer, no activity at the expected molecular mass could be detected (data not shown). This suggest that the quantity of enzyme produced is too low to be detected in these conditions.

A chimeric fusion protein between Lnmur and the *L. lactis* AcmA C-terminal domain is able to complement AcmA deficiency in *L. lactis*.

We constructed a chimeric protein by fusion of Lnmur with the *L. lactis* AcmA C-terminal domain (cA) (which contains 3 amino acid repeats, (10)). The chimeric *lnmur-cA* gene was expressed in the *acmA* deletion mutant, *L. lactis* MG1363*acmAΔI* (8) in order to investigate whether it could complement an AcmA deficiency.

For expression purpose, the nisin-inducible expression system was used (18). The chimeric *lnmur-cA* gene was cloned under the control of the *nisA* promoter in pCYT1 (Table 1). The resulting plasmid carrying the chimeric *lnmur-cA* gene was transformed in *L. lactis* MG1363*acmAΔI*. Since the strain MG1363 does not contain the regulatory *nisRK* genes, the plasmid pNZ9520 (Table 1) carrying *nisRK* was also introduced into MG1363*acmAΔI* harboring pTIL344.

L. lactis MG1363*acmAΔI* is characterized by the presence of long bacterial chains and the absence of any activity band in renaturing SDS-PAGE with *M. lysodeikticus* substrate. However, both these phenotypes are reversed in the MG1363*acmAΔI* strain harboring plasmids pTIL344 and pNZ9520 even in the absence of nisin. A 44-kDa activity band was observed using either *M. lysodeikticus* (Fig. 4, lane 2), *Ln. mesenteroides* or *L. lactis* cells as substrates (data not shown). This activity was absent from MG1363*acmAΔI* harboring pTIL344 alone (Fig. 4, lane 1). In addition, we observed that *L. lactis* MG1363*acmAΔI* harboring plasmids pTIL344 and pNZ9520 lost its sedimentation properties and formed short chains similar to wild-type MG1363 (Fig. 5). These results indicate that the chimeric protein Lnmur-cA is fonctionnal and able to complement an AcmA deficiency.

We were surprised to detect Lnmur-cA activity in the absence of nisin inducer, as well as a lack of induction after nisin addition. Previously, Kleerebezem *et al.* (27) also reported a significant level of transcription from the *nisA* promoter in absence of nisin, when the *nisRK* genes were carried by the high copy number pNZ9520, as well as a reduced or abolished inducibility of the *nisA* promoter. They overcome this problem by the use of the low copy number plasmid pNZ9530 (Table 1) carrying the *nisRK* genes. In our case, even with pNZ9530 instead of pNZ9520 and whatever the nisin concentration, nisin-inducible

expression of *lnmur-cA* gene was not obtained. However, we did obtain nisin-inducible expression of *lnmur-cA* when pTIL344 was transformed in *L. lactis* NZ9000 which carries the *nisRK* genes integrated in its chromosome thus indicating that the construction was functional (data not shown).

DISCUSSION

In this study, we describe the cloning and sequencing of the *lnmur* gene from *Ln. citreum*, encoding a peptidoglycan hydrolase homologous to other bacterial N-acetyl-muramidases. To our knowledge, this is the first report concerning a peptidoglycan hydrolase gene from a *Leuconostoc* species. Up to now, only one peptidoglycan hydrolase originating from a lactic acid bacterium has been characterized at the molecular level, the major autolysin AcmA from *L. lactis*.

Lnmur is homologous to the other previously identified bacterial muramidases. However, in contrast to the known enzymes, Lnmur contains only the catalytic domain and is devoid of the cell wall binding domain that typically consists of repeated sequences (26). To date, no such muramidase has been described in the literature; however, very recently, a similar peptidoglycan hydrolase, exhibiting 35 % sequence identity with Lnmur, has been identified in the lactic acid bacterium, *Streptococcus thermophilus* (23). Despite the lack of amino acid repeats, Lnmur is endowed with peptidoglycan hydrolysing activity as detected *in vitro* (Fig. 3) and in overexpression system in *L. lactis* (data not shown). These results are in agreement with previous data showing that the N-terminal AcmA domain (9) or the C-terminal FlgJ domain (34) without amino acid repeats retain enzymatic activity. In addition, we constructed an active fusion protein between Lnmur and the AcmA C-terminal domain containing amino acid repeats. The resulting chimeric protein was able to play the role of AcmA in cell separation after cell division in the *L. lactis acmA* deletion mutant, thus indicating that Lnmur is also functional on the cell wall *in vivo*.

Nisin-inducible expression of the fusion *lnmur-cA* gene was not obtained in the MG1363*acmAΔ1* deletion mutant, in which *nisRK* genes required for nisin-mediated signal transduction were plasmid carried. However, inducible expression was observed in *L. lactis* NZ9000 strain with the *nisRK* genes integrated in its chromosome, this suggests that the problems encountered are most probably linked to the strain used, that is the *acmA* deletion mutant. This observation could be due to a modification of the cell surface of the mutant

devoid of *AcmA* which could alter the interaction of nisin with the NisK sensor protein located in the cell cytoplasmic membrane.

No activity band migrating at the molecular mass expected for Lnmur could be revealed in *Ln citreum* 22R extract nor in culture supernatant by renaturing SDS-PAGE either in cell extract or in culture supernatant. This is most probably due to a low expression level of the protein since the expression consensus sequences, putative promoter and RBS sequences, were identified upstream of the ORF encoding Lnmur.

As discussed above, Lnmur does not contain amino acid repeats involved in cell wall attachment. In the case of the *S. thermophilus* homolog, the protein was shown to be cell-associated (23). The structural similarity between these proteins leads us to suggest that Lnmur in *Ln citreum* may thus also be cell-associated. Nevertheless, Lnmur does not possess the characteristics described for surface proteins such as a LPXTG motif (21), or a region rich in Pro-Gly and Ser-Thr (38). Other means of protein association with the cell wall are: i) via membrane association, i.e. by a trans-membrane segment on the protein or indirectly by protein interactions with a membrane protein, or ii) via protein interactions with a cell wall component. It is worth noting that the PGH amino acid repeats have been proposed to direct the enzyme to the cell division site (4). The absence of these repeats could allow a more homogenous distribution of the enzyme around the cell.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank G. Buist for providing strain *L. lactis* MG1363*acmAΔ1*, O. P. Kuipers for strain *L. lactis* NZ9000 and plasmids NZ9520 and NZ9530. We thank J. Bardowski and C. Husson-Kao for helpful discussions and O. Firmesse, C. Huard, J. Tremblay and J. Commissaire for technical assistance. Authors are grateful to A. Gruss for critical reading of the manuscript. R.C. was recipient of a fellowship from Turkish High Education Council.

REFERENCES

1. Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1919-1925.
2. Amann, R. I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143-159.
3. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. Schaffer, J. Zang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
4. Baba, T., and O. Schneewind. 1998. Targeting of muralytic enzymes to cell division site of Gram-positive bacteria: repeat domains direct autolysin to the equatorial surface ring of *Staphylococcus aureus*. *EMBO J.* **17**:4639-4646.
5. Béliveau, C., C. Potvin, J. Trudel, A. Asselin, and G. Bellemare. 1991. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a *Streptococcus faecalis* autolysin. *J. Bacteriol.* **173**:5619-5623.
6. Blattner F. R., G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, F. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M., A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* **277**:1453-1474.
7. Birnboim, H., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
8. Buist, G., J. Kok, K. J. Leenhouts, M. Dabrowska, G. Venema and A. J. Haandrikman. 1995. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation. *J. Bacteriol.* **177**:1554-1563.
9. Buist, G., H. Karsens, A. Nauta, D. van Sinderen, Venema, and J. Kok. 1997. Autolysis of *Lactococcus lactis* caused by overproduction of its major autolysin. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2722-2728.
10. Buist, G. 1997. PhD thesis. University of Groningen, The Netherlands.

11. Chapot-Chartier, M.-P., C. Deniel, M. Rousseau, L. Vassal, and J. C. Gripon. 1994. Autolysis of two strains of *Lactococcus lactis* during cheese ripening. *Int. Dairy J.* **4**:251-269.
12. Chapot-Chartier, M.-P. 1996. Les autolysines des bactéries lactiques. *Lait*, **76**: 91-109.
13. Chu, C.-P., R. Kariyama, L. Daneo-Moore, and G. D. Shockman. 1992. Cloning and sequence analysis of the muramidase-2 gene from *Enterococcus hirae*. *J. Bacteriol.* **174**:1619-1625.
14. Cogan, T. M., and K. N. Jordan. 1994. Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. *J. Dairy Sci.* **77**:2704-2717.
15. Crow, V. L., P. K. Coolbear, P. K. Gopal, F. G. Martley, L. L. McKay and H. Riepe. 1995. The role of autolysis of lactic acid bacteria in ripening of cheese. *Int. Dairy J.* **5**:855-875.
16. de los Reyes-Gavillan C. G., G. K. Y. Limsowtin, P. Tailliez, L. Séchaud, and J. P. Accolas. 1992. A *Lactobacillus helveticus*-specific DNA probe detects restriction fragment length polymorphism in this species. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3429-3432.
17. de Man, J. C., M. Rogosa, and M. E. Sharpe. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **23**:130-135.
18. de Ruyter, P. G. G. A., O. P. Kuipers, de Vos W. M. 1996. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3662-3667.
19. Díaz, E., R. López, and J. L. García. 1991. Chimeric pneumococcal cell wall lytic enzymes reveal important physiological and evolutionary traits. *J. Biol. Chem.* **266**:5464-5471.
20. El-Shafei H., M. El-Soda, and N. Ezzat. 1990. The peptide hydrolase system of the *Leuconostoc*. *J. Food Protect.*, **53**: 165-169.
21. Fischetti, V. A., V. Pancholi, and O. Schneewind. 1990. Conservation of an hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram positive cocci. *Mol Microbiol.*, **4**: 1603-1605.
22. Gibson, T. J. 1984. PhD thesis. Cambridge University, Cambridge, United Kingdom.
23. Husson-Cao, C. 1999. PhD thesis. Compiègne University, France.

24. Iordanescu I. 1993. Characterization of the *Staphylococcus aureus* chromosomal gene *pcrA*, identified by mutations affecting plasmid pT181 replication. Mol. Gen. Genet., **241**: 185-192.
25. Jones, C. J., M. Homma and R. M. Macnab. 1989. L-, P- and M- ring proteins of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*: gene sequences and deduced protein sequences. J. Bacteriol. **171**:3890-3900.
26. Joris, B., S. Englebert, C.-P. Chu, R. Kariyama, L. Daneo-Moore, G. D. Shockman, and J.-M. Ghuysen. 1992. Modular design of the *Enterococcus hirae* muramidase-2 and *Streptococcus faecalis* autolysin. FEMS Microbiol. Lett. **91**:257-264.
27. Kleerebezem, M., M. M. Beerthuyzen, E. E. Vaughan, W. M. de Vos, and O. P. Kuipers. 1997. Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* spp. Appl. Environ. Microbiol. **63**:4581-4584.
28. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature **227**:680-685.
29. Langella, P., Y. Le Loir, S. D. Ehrlich, and A. Gruss. 1993. Efficient plasmid mobilisation by pIP501 in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. J. Bacteriol. **175**:5806-5813.
30. Le Loir Y., A. Gruss, S. D. Ehrlich, and P. Langella. 1994. Direct screening of recombinant Gram-positive bacteria using the secreted staphylococcal nuclease as a reporter. J. Bacteriol. **176**: 5135-5139.
31. Lepeuple A.-S., L. Vassal, B. Cesselin, A. Delacroix, J.-C. Gripon, and M.-P. Chapot-Chartier. 1998. Involvement of a prophage in the lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2 during cheese ripening. Int. Dairy J. **8**:667-674.
32. Lepeuple A.-S., E. van Gemert, and M.-P. Chapot-Chartier. 1998. Analysis of the bacteriolytic enzymes of the autolytic *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain AM2 by renaturing polyacrylamide gel electrophoresis : identification of a prophage-encoded enzyme. Appl. Environ. Microbiol. **64**:4142-4148.
33. Lepeuple A.-S. 1998. PhD thesis. University Paris 7, France.
34. Nambu, T., T. Minamino, R. M. Macnab, and K. Kutsukake. 1999. Peptidoglycan-hydrolysing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **181**:1555-1561.

35. Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak, and G. von Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*. **10**:1-6.
36. Petit, M.-A., E. Dervyn, M. Rose, K. D. Entian, S. McGovern, S. D. Ehrlich and C. Bruand. 1998. PcrA is an essential DNA helicase of *Bacillus subtilis* fulfilling functions both in repair and rolling-circle replication. *Mol. Microbiol.* **29**: 261-273.
37. Potvin, C., D. Leclerc, G. Tremblay, A. Asselin, and G. Bellemare. 1988. Cloning, sequencing and expression of a *Bacillus* bacteriolytic enzyme in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **314**:241-248.
38. Rathsam, C., and N. A. Jacques. 1998. Role of the C-terminal domains in surface attachment of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *J. Bacteriol.* **180**: 6400-6413.
39. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
40. Shockman G. D., and J.-V. Hltje. 1994. Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases. *New Comprehensive Biochem., Bacterial Cell Wall*, J-M Ghuysen and R. Hakenbeck Eds, 131-166.
41. Silver, J. 1991. Inverse polymerase chain reaction, *In* M. J. McPherson, P. Quirke, and G. R. Taylor (ed.), *PCR: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, p. 137-146.
42. Simon, D., and A. Chopin. 1988. Construction of a plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie* **70**:559-566.
43. Terzaghi, B. E., and W. E. Sandine. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* **29**:807-813.
44. van Asseldonk, M., G. Rutten, M. Oteman, R.J. Siezen, W.M. de Vos, and G. Simons. 1990. Cloning, expression in *Escherichia coli* and characterization of *usp45*, a gene encoding a highly secreted protein from *Lactococcus lactis* MG1363. *Gene* **95**: 155-160.
45. Wilkinson, M. G., T. P. Guinee, D. M. O'Callaghan, and P. F. Fox. 1994. Autolysis and proteolysis in different strains of starter bacteria during cheddar cheese ripening. *J. Dairy. Res.* **61**:249-262.

Table 1: Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or Plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
Strains		
<i>E. coli</i>		
-TG1	[<i>supE hsdΔ5 thi Δ(lacproAB) F' (traD36proAB+lac^f lacZΔM15)</i> <i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46thi relA1 lac</i> Ø <i>F' (proAB⁺ lac^f lacZΔM15 Tn10(tet^r)</i>]	(22)
-XL1-Blue	Wild-type strain	Stratagene
<i>Ln. citreum</i> 22R	Wild-type strain	CNRZ collection
<i>Ln. mesenteroides</i> 50M	Wild-type strain	CNRZ collection
<i>L. lactis</i>		
-MG1363 <i>acmAΔI</i>	Derivative of MG1363 carrying a 701-bp <i>SacI-SpeI</i> deletion in <i>acmA</i>	(8)
-NZ9000	Derivative of NZ3000; <i>pepN:nisRnisK</i>	O. Kuipers ^a
-NCDO763	Wild-type strain	CNRZ collection
Plasmids		
pBluescript SK+(pBSK+)	Ap ^r	Stratagene
pQE30	Ap ^r , expression vector, 6xHis-tag at the N-terminus of the protein	Qiagen
pCYT1	Cm ^r , pNZ8010 derivative carrying a transcriptional fusion of the <i>nisA</i> promoter, the <i>usp45</i> RBS and the <i>S. aureus nucA</i> gene	P. Langella ^b
pNZ9520	Em ^r , <i>nisRK</i> genes cloned in high copy number cloning vector pIL253 (42)	(27)
pNZ9530	Em ^r , <i>nisRK</i> genes cloned in low copy number cloning vector pIL252 (42)	(27)
pTIL340	Ap ^r , pBSK+ carrying the 552-bp <i>BamHI-HindIII</i> fragment encoding <i>lmur</i> amplified with the primers LnP5 and LnP6	This study
pTIL341	Ap ^r , pBSK+ carrying the 636-bp <i>PstI-ClaI</i> fragment encoding <i>lmur</i> amplified with the primers LnP7 and LnP8	This study
pTIL342	Ap ^r , pBSK+ carrying the 740-bp <i>ClaI-XhoI</i> fragment encoding the amino acid repeats of <i>acmA</i> (cA) amplified with the primers LnP9 and LnP10	This study
pTIL343	pQE30 derivative with the 552-bp <i>BamHI-HindIII</i> insert of pTIL340	This study
pTIL344	Cm ^r , pCYT1 derivative carrying the 1370-bp chimeric gene <i>lmur-cA</i> under control of the <i>nisA</i> promoter	This study

^a NIZO, Kernhemseweg 2, 6718 ZB Ede, The Netherlands

URLGA, INRA, 78352 Jouy-en-Josas, France

Table 2: Oligonucleotides used in this study

Primers ^a	Sequence ^b	Restriction site	Positions
LnP1	GTNATGATNGCNCARGC		Conserved region: aa 86-91 ^c
LnP2(r)	GGRTCNGTNGCARTANC		Conserved region: aa 190-195 ^c
LnP3(r)	CATTCCAACTCGTGCCATGA		Nucleotides 683-664 of the sequenced fragment
LnP4	CGGCCCAATATCAGCATGTT		Nucleotides 684-703 of the sequenced fragment
LnP5	CGCGGATCCACTTTTGGTCGCAAAACAC	<i>Bam</i> HI	Nucleotides 305-323 of the sequenced fragment
LnP6(r)	GGAAAGCTTCGGAAACATTTCGGTT	<i>Hind</i> III	Nucleotides 857-843 of the sequenced fragment
LnP7	GCCATGCAGCAAAAGAAAAGACGCT	<i>Pst</i> I	Nucleotides 216-232 of the sequenced fragment
LnP8(r)	CCATCGAATTTTTGTGGTACATCAAAAGCG	<i>Clal</i>	Nucleotides 838-818 of the sequenced fragment
LnP9	CCATCGAAGCTGGTACTTCTAAATTCGGGT	<i>Clal</i>	Nucleotides 652-675 of <i>acmA</i> ^d
LnP10(r)	CCGCTCGAGTCATCTTCAGTCTGTTTFAAAAG	<i>Xho</i> I	Nucleotides 1382-1359 of the 3' end of the transcription terminator downstream <i>acmA</i> ^d

^a (r), complementary primer.

^b N = A or C or T or G; R = A or G. Restriction sites are underlined.

^c Positions refer to the *L. lactis* MG1363 *AcmA* sequence (8).

^d Positions refer to the *L. lactis* IL1403 *acmA* sequence (33).

TAAACAGAGCATGAGGTGTTACAGCAAATATTTACTGTATTAGCAAATCGCACAAATTAT	60
K T E H E V L Q Q I F T V L A N R T I I	
CTGGGTGACACATCATTTGACGGGTATTTGGGCAGTTGATCAAGTTTATTTTCTTGAAAA	120
W V T H H L T G I W A V D Q V Y F L E K	
	-35
AGGGCAATTTACTTTGTCTGGGGACACCTACTGATTTAGCAAAAAATGCAACACACTTTCA	180
G Q F T L S G T P T D L A K N A T H F Q	
	-10 RBS
ACAAC <u>TATTAGCAATGGATG</u> ATTTGGGTAAATGGCAAAAAGAAAAAGACGTGGCAAAAA	240
Q L L A M D D L G * M A K R K R G K K	10
	-----> Lnmur
GAAATATTTTCGTTTGAATCTCTGGTTATGGATAAGCAGTATTTTAGTGTTGGCAATTGG	300
K I F R L N L W L W I S S I L V L A I G	30
CGCAACTTTTTGGTCTGCAAACTAATATACAACGAAGAAATGCACAAGGACAAGACGT	360
A T F W S Q T L I Y N E E N A Q G Q D V	50
	≤
TGTGCGTCAACAAAATATAGCTTGGATTAATCAACTAGCACCATATGCGCGATTAATGCA	420
V R Q Q N I A W I N Q L A P Y A R L M Q	70
AGAAAAGTACGGTGTGATTGCGTCAATTAGTATCGCGCAGGCCATTTTAGAGTCAGATTG	480
E K Y G V I A S I S I A Q A I L E S D W	90
GCATACTTCGACGCTATCGCCACAGTATAATAATTTATTCGGCATTAAAGCTGACGCAGG	540
H T S T L S P Q Y N N L F G I K A D A G	110
GCAAAAAAGTGTTGTTTACCAACCCAGGAGTTTCAAAATGGCGAATGGGTCACTATTCA	600
Q K S V V L P T Q E F Q N G E W V T I Q	130
AGGGCGCTTTGCAGCTTATGATTCATGGCAAGAGAGTATGAAGGCGCATGCTGAATTACT	660
G R F A A Y D S W Q E S M K A H A E L L	150
TTATCATGGCACGAGTTGGAATGCGGCCCAATATCAGCATGTTTTAGCGGCCAAAGATTA	720
Y H G T S W N A A Q Y Q H V L A A K D Y	170
TCAGGCAGCAGCTAATGCATTGACAAAAGATGGGTATGCCACTGATCCAACTTATGCAGA	780
Q A A A N A L T K D G Y A T D P T Y A E	190
AAAGCTCATCGCAATTATTCAGACGTGGCATTTGTCTGCGCTTTGATGTACCACAAAAATA	840
K L I A I I Q T W H L S R F D V P Q K *	209
AAAACGGAAATGTTCCGTTTTTTTTATTTT	869

Figure 1: Nucleotide sequence (1-869) and deduced amino acid sequences of the *Ln citreum* DNA fragment carrying the *lnmur* gene. The putative -10 and -35 sequences are double underlined and the putative RBS is indicated with a dotted line. The stop codon is indicated with an asterisk and a putative transcription terminator is underlined. The putative peptide signal cleavage site is indicated with an arrow.

```

EfAutol  FIAEIATYAQPIAQANDLYASVMIAQAVVESGWGSSALSQA---PYYN-LFGIKGSYQGQ
Mur2      FIAELARCAQPIAQANDLYASVMMAQAIVESGWGASTLSKA---PNYN-LFGIKGSYNGQ
AcmA      FIESIAASAKPVADANGLYPSVMIAQAILESNGWSSQLSRA---PYYN-LFGIQGTYQGK
FlgJ      FLARLSLPARLASEQSGVPHHLILAQAALSEGWQQRQILRENGEPSYN-VFGVKATASWK
Lnmur     WINQLAPYARLMQEKYGVIASISIAQAILES DWHTSTLS----PQYNNLFGIKADAGQK
          ::  ::  *:   :   .:   : :*** :**.*   :   * ** :***:.   :

EfAutol  --TVYMDTLEYLNNKWVSKKEPFRQYPSFAESFNDNAYVLR-NTSFGNG-YYYAGTWKSN
Mur2      --SVYMDTW EYLNKGKWLVKKEPFRKYPSYMESFQDNHVLK-TTSFQAGVYYYAGAWKSN
AcmA      --SVVFKTQEYLNKGKVVTKDMPFRVYPSFNQSFQDNAYVLK-TTNFGNG-PYYAKAWRAN
FlgJ      GPVTEITTT EYENG EAKVKAKFRVYSSYLEALSDYVALLTRNPRYAAV--TTAATAE-
Lnmur     --SVVLPTQEFQNGEWVTIQGRFAAYDSWQESMKAHAELLYHGTSWNAAQYQHVLAAK-D
          . : * *: *: . * * *: :. . : * . : . : .

EfAutol  TKSYPDATACLTGR-YATDPGYAGKLNNIITTYGLTKYDTP--
Mur2      TSSYRDATAWLTGR-YATDPSYNAKLNNVITAYNLTQYDTP--
AcmA      AATYQDATAALTGR-YATDPSYGASLNRIISQYNLTRFDGA--
FlgJ      ----QGAVALQNAG-YATDPNYARKLTSMIQQLKAMSEKVS-
Lnmur     ---YQAAANALTKDGYATDPTYAEKLIAIIQTWHLSRFDVPQK
          * . . ***** * . * : * . .

```

Figure 2: Alignment of the amino acid sequences of Lnmur of *Ln. citreum* 22R, and the catalytic domain of AcmA of *L. lactis* MG1363, autolysin (EfAutol) of *E. faecalis*, muramidase-2 (Mur2) of *E. hirae* and flagellar protein (FlgJ) of *S. typhimurium*. Alignment was made using the ClustalW program. Identical residues present in all the sequences are indicated with an asterisk and similar residues with a point. Putative acidic residues present in the catalytic site are in bold letters.

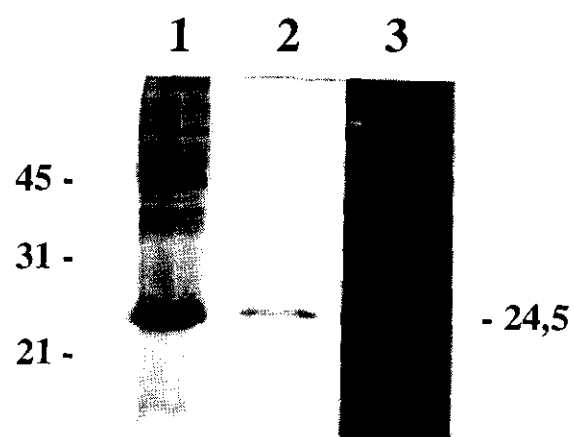


Figure 3: SDS-PAGE and renaturing SDS-PAGE analysis of the purified 6xHis-tagged Lnmur protein. Lanes 1-2: Coomassie Blue staining. Lane 1: whole SDS cell extract of *E. coli* XL1-Blue harboring pTIL343 induced for 4 h with IPTG; lane 2: recombinant Lnmur purified on Ni-NTA resin; lane 3: activity of the purified recombinant protein by renaturing SDS-PAGE containing 0.2% autoclaved *M. lysodeikticus* cells. The molecular masses (in kDa) of standard proteins are indicated on the left.

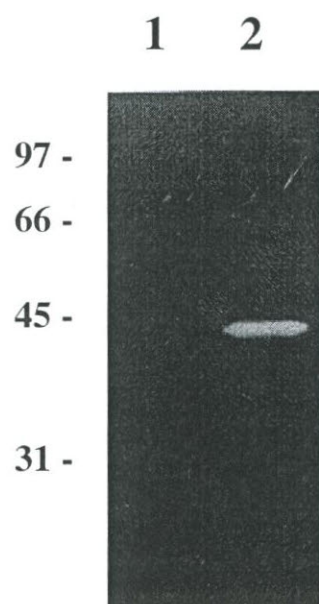


Figure 4: Renaturing SDS-PAGE analysis of the chimeric Lnmur-cA protein expressed in *L. lactis* MG1363 Δ cmA Δ I. Lane 1: *L. lactis* MG1363 Δ cmA Δ I harboring plasmid pTIL344; lane 2: *L. lactis* MG1363 Δ cmA Δ I harboring pTIL344 and pNZ9520 carrying *nisRK* genes. SDS cell-extract of each strain was prepared from a non-induced culture and loaded onto polyacrylamide gel containing 0.2 % autoclaved *M. lysodeikticus* cells. The molecular masses (in kDa) of standard proteins are indicated on the left of the gel.

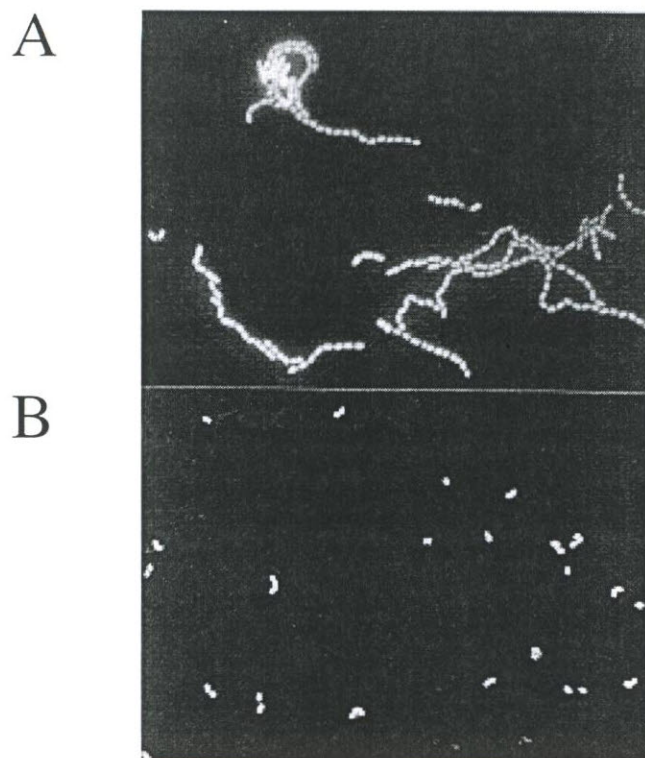


Figure 5: Epifluorescent micrograph of *L. lactis* MG1363 *acmAΔI* (A) and *L. lactis* MG1363 *acmAΔI* harbouring pTIL344 and pNZ9520 (B). Bacteria were grown in M17-glu medium. Micrographs were taken after *in situ* hybridization of the lysozyme-treated bacteria with the universal probe EUB338.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Les leuconostocs sont des bactéries lactiques hétérofermentaires largement utilisées dans l'industrie alimentaire. Elles contribuent à la production d'arôme et au développement de flaveur dans les produits laitiers. Elles participent également par les métabolites qu'elles produisent et par les enzymes qu'elles synthétisent à la maturation et à la structuration de certains fromages. Cet intérêt des leuconostocs rend important leur étude dont le but ultime est de mieux caractériser et de mieux utiliser leur potentiel technologique. Au cours de notre thèse, nous avons axé nos travaux sur l'analyse taxonomique des leuconostocs d'une part, et d'autre part sur le système autolytique de ces bactéries.

1. Taxonomie des leuconostocs

Pendant longtemps, l'identification des espèces du genre leuconostoc était basée sur des tests taxonomiques classiques. Ces études qui reposaient sur certains caractères biochimiques, ne permettent pas une classification satisfaisante des leuconostocs. Le développement de techniques moléculaires a permis de faire des avancées sur la taxonomie bactérienne.

L'analyse du comportement autolytique des souches de notre collection initialement classées dans le genre *Leuconostoc* et la comparaison de leurs profils d'activité autolytique obtenus par la technique SDS-PAGE renaturante (zymogramme) ont révélé de la diversité. Ces premiers résultats semblaient en contradiction avec ceux décrits par LORTAL et coll. (1997). En effet, ces auteurs ont montré que les zymogrammes pouvaient être utilisés comme outils de classification car les profils semblent conservés pour les souches d'une même espèce. Ces résultats contradictoires nous ont donc conduit à entreprendre une étude taxonomique systématique sur cette collection.

L'utilisation de techniques de typage (RAPD) et d'identification moléculaires (séquençage de l'ADNr16S) nous a permis de constater qu'un certain nombre de ces souches appartiennent en fait aux genres *Lactobacillus* et *Enterococcus*. Les quelques souches de lactobacilles étudiées présentent une aptitude à l'autolyse beaucoup plus importante que celle des leuconostocs et des zymogrammes différents. Les souches de cette collection n'avaient donc pas été préalablement identifiées avec attention et précision alors que des tests

phénotypiques simples décrits dans le chapitre I de ce manuscrit permettent très rapidement de séparer les souches de lactobacilles et d'entérocoques de celles des leuconostocs.

La discrimination des souches de *Ln. citreum* fut plus délicate car les tests phénotypiques utilisés ne sont pas satisfaisants. Les souches de cette espèce se confondent avec celles de *Ln. mesenteroides*. De même, les zymogrammes de ces deux espèces sont identiques. Le gène de l'hélicase et celui de la peptidoglycane hydrolase de *Ln. citreum* 22R présentent de l'homologie avec ceux de *Ln. mesenteroides* (résultats obtenus par hybridation de type Southern), bien qu'il n'ait pas été possible d'amplifier ces gènes chez *Ln. mesenteroides* avec des amorces choisies dans les séquences de *Ln. citreum*. Ces deux espèces sont donc très proches au plan phylogénétique, occupent les mêmes niches écologiques "fromagères" et semblent être les espèces dominantes isolées de ces fromages traditionnels.

Il est à noter que les souches de l'espèce *Ln. lactis* et ceux de la sous-espèce *Ln. mesenteroides* subspecies *cremoris* ont été relativement peu isolées. Bien qu'elles soient décrites comme micro-organismes intéressants en technologie fromagère, leur rôle et leur influence dans les écosystèmes de ces fromages restent à démontrer. De même, aucune souche de *W. paramesenteroides* (identifiée au plan moléculaire) n'a été répertoriée dans cette collection.

2. Autolyse des leuconostocs

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux propriétés autolytiques des leuconostocs et avons entrepris une caractérisation moléculaire des enzymes à activité peptidoglycane hydrolases impliquées dans l'autolyse de ces bactéries. Comme cela a été montré chez *L. lactis*, la sélection de souches à forte capacité autolytique présente un intérêt technologique. En effet, la lyse bactérienne s'accompagne de la libération, dans le milieu extérieur, du contenu enzymatique intracellulaire, qui dans le cas des bactéries lactiques, contribue au développement des qualités organoleptiques des fromages. L'utilisation de souches autolytiques apparaît ainsi comme un moyen d'accélérer l'affinage des fromages ou d'intensifier certains arômes.

Nous avons comparé les propriétés autolytiques d'un ensemble de 59 souches de leuconostocs d'origine laitière par transfert des cellules en croissance en conditions de carence nutritionnelle. La capacité d'une souche à s'autolyser n'apparaît pas liée à l'espèce à laquelle elle appartient. Par ailleurs, il s'agit d'une propriété variable entre souches. Des observations

similaires ont été également rapportées pour d'autres bactéries lactiques, telles que *L. lactis*, *Lb. helveticus*, ou encore *Str. thermophilus*. Pour *L. lactis*, cette variabilité inter-souches a été mise en évidence également lorsque les bactéries sont dans le fromage.

L'origine de la variabilité des propriétés autolytiques entre souches n'est pas entièrement élucidée pour l'instant et plusieurs facteurs sont probablement impliqués. Dans le cas de souches particulièrement autolytiques de *L. lactis* ou *Str. thermophilus*, il a été montré que la forte propension à la lyse était liée à la présence d'un prophage dans ces souches (LEPEUPLE et coll., 1998a; HUSSON-KAO et coll., 2000). Ainsi, lorsque la souche *L. lactis* subsp. *cremoris* AM2, qui s'autolyse précocément et massivement dans le fromage en début d'affinage, est guérie d'un prophage, le dérivé obtenu ne s'autolyse plus que lentement et modérément. L'implication directe des protéines de lyse du prophage est fortement suspectée. Un autre facteur qui peut intervenir est le niveau d'expression des peptidoglycane hydrolases et/ou la régulation de leur activité par des protéases. Ainsi, il a été montré que, chez *L. lactis*, l'autolysine majeure, AcmA, est dégradée par la protéase de paroi, PrtP, et que la vitesse et le taux d'autolyse sont dépendants de la spécificité et de la quantité de protéase présente dans la cellule (BUIST, 1997a). La composition de la paroi pourrait également être à l'origine de la variabilité observée entre souches. A l'heure actuelle, il n'existe aucune étude systématique à ce sujet. Néanmoins, MEIJER et coll. (1998) ont mis en évidence que la souche *L. lactis* subsp. *cremoris* SK110 et le dérivé obtenu après introduction des gènes conférant l'immunité à la nisine, diffèrent par leur capacité à se lyser dans le fromage et par ailleurs présentent une différence au niveau de la composition de leur paroi.

L'autolyse bactérienne résulte de l'action d'enzymes endogènes de la bactérie capables d'hydrolyser le peptidoglycane de sa propre paroi. Une connaissance des enzymes impliquées dans le phénomène d'autolyse apparaît alors comme une étape nécessaire à la compréhension du phénomène et donc par la suite à son contrôle. Les bactéries à Gram positif possèdent en général plusieurs peptidoglycane hydrolases endogènes qui sont impliquées dans des processus physiologiques variés.

L'évaluation du contenu en peptidoglycane hydrolases de la souche *Ln mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L par électrophorèse renaturante suggère une certaine complexité du système de peptidoglycane hydrolases de *Ln mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Deux activités majeures de 52 et 41 kDa ont été révélées ainsi que d'autres activités mineures. Cependant, il est difficile sur la base de ces résultats, de conclure quant au nombre effectif d'enzymes différentes, car une modification post-traductionnelle ou encore une dégradation protéolytique d'une enzyme donnée peut conduire à la détection de plusieurs bandes d'activité

en électrophorèse. Nous avons cependant mis en évidence l'existence d'au moins deux types d'enzymes, de spécificités différentes, qui interviennent au cours de l'autolyse de parois de *Ln mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 10L.

Nous avons ensuite entrepris de caractériser ces enzymes au niveau moléculaire. D'après la littérature concernant d'autres bactéries à Gram positif telles que *B. subtilis* ou *Ent. hirae*, la purification des peptidoglycane hydrolases apparaissait une tâche fastidieuse et difficile car ces enzymes sont peu abondantes et fortement liées à la paroi. Nous avons donc choisi de rechercher la présence d'un gène homologue à l'autolysine majeure AcmA de *L. lactis*, la seule PGH alors caractérisée au niveau moléculaire lors du démarrage de nos travaux. Cette approche nous a permis d'isoler le gène *lnmur* de *Ln citreum*, qui code pour une protéine (LnMur) de 23,9 kDa présentant des similarités de séquences avec AcmA ainsi qu'avec d'autres N-acétyl-muramidases bactériennes connues. Par cette approche, nous n'avons pas cloné le gène codant pour l'une des enzymes détectées par électrophorèse renaturante, mais au contraire pour une enzyme non identifiée dans les cellules par cette technique. En effet, quelles que soient les conditions du test, nous n'avons pas détecté une bande d'activité à la masse moléculaire attendue pour LnMur, ni dans des extraits cellulaires, ni dans le surnageant de culture de *Ln citreum* 22R.

L'analyse de la séquence nucléotidique de la région en amont de *lnmur* a révélé la présence des signaux nécessaires à l'expression du gène. Par ailleurs, nous avons montré que la protéine possède effectivement une activité d'hydrolyse du peptidoglycane. Enfin, nous avons montré qu'elle est capable d'hydrolyser le peptidoglycane *in vivo* à l'intérieur de la paroi. Tous ces résultats suggèrent que la protéine est fonctionnelle chez *Ln citreum*. Notons par ailleurs qu'une enzyme similaire a été identifiée chez *Str. thermophilus* (HUSSON-KAO 1999) et est présente dans le génome de *L. lactis* IL1403 (A. Sorokine, communication personnelle). La conservation de ce gène chez différentes bactéries lactiques suggère également la fonctionnalité de ce gène. Son rôle dans la physiologie de la cellule n'est pas connu à l'heure actuelle. L'obtention de mutant par inactivation du gène est une étape nécessaire pour aborder cette étude.

Les homologies de séquence observées entre LnMur et les autres muramidases sont localisées au niveau du domaine catalytique de ces enzymes. Contrairement aux autres muramidases, la protéine LnMur présente la particularité de ne pas posséder de domaine renfermant des séquences d'acides aminés répétées et impliqué dans la liaison de l'enzyme à la paroi. Ceci suggère que LnMur lie son substrat par un mode différent de celui communément

trouvé dans les enzymes déjà décrites. Des études complémentaires sont nécessaires pour étudier la localisation de la protéine dans la cellule et le mode d'interaction avec son substrat.

Le développement de nouvelles techniques comme les puces à ADN ou l'hybridation *in situ* (déjà utilisée au cours de ce travail) ouvrent des perspectives intéressantes pour détecter et dénombrer avec des niveaux de spécificité variés et directement dans leur environnement (levain, lait, caillé, fromage) les différents micro-organismes présents. Les différentes sondes et amorces PCR développées au cours de ce travail peuvent être utilisées dans la fabrication des puces à ADN et permettront la capture des fragments d'ADNr ou d'ARNr 16S des différentes espèces de *Leuconostoc* à détecter. De même, ces puces peuvent aussi contenir des sondes captures d'ARN messagers codant des fonctions d'intérêt comme l'autolyse. A l'aide de ces nouvelles techniques, nous aurons la possibilité de décrire de manière exhaustive, les micro-organismes présents dans un écosystème et d'évaluer l'expression de tels ou tels gènes d'intérêt. Ces nouvelles technologies constituées de tests rapides permettent d'envisager l'étude de la dynamique et des fonctions de ces écosystèmes microbiens complexes.

Le développement des connaissances concernant le système autolytique des bactéries lactiques, la caractérisation moléculaire des enzymes et l'étude des différents facteurs qui régulent leur activité devraient permettre à terme d'obtenir des souches autolytiques et de mieux contrôler leur lyse. Ces souches autolytiques pourront être obtenues soit par sélection de souches naturelles, soit par les techniques de génétique moléculaire en construisant des systèmes de lyse inductible.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABD-EL-MALEK Y. & GIBSON T. Studies in the bacteriology of milk. J. Dairy Res., 1948, 15, 233-248.
- AMANN R. I., BINDER B. J., OLSON R. J., CHISHOLM S. W., DEVEREUX R. & STAHL D. A., Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol., 1990, 56, 1919-1925.
- ARCHIBALD A.R., HANCOCK I. C. & HARWOOD C. R. Cell wall structure, synthesis and turnover. In J. A. Hoch and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1993, p. 381-410.
- ASTON J., GILES J., DURWAR I. & DULLEY J. Effect of elevated ripening temperatures on proteolysis and flavour development in Cheddar cheese. J. Dairy Res., 1985, 52, 565-572.
- BELLENGIER P., HEMME D. & FOUCAUD C. Citrate metabolism in 16 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and subsp. *dextranicum* strains. J. Appl. Bacteriol., 1994, 77, 54-60.
- BELLENGIER P., RICHARD J. & FOUCAUD C. Nutritional requirements of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and subsp. *dextranicum* for growth in milk. J. Dairy Res., 1997, 64, 95-103.
- BENNET G., LISKA B. J. & HEMPENIUS W. L. Effects of other flavor components on the perception of diacetyl in fermented dairy products. J. Food Sci., 1965, 30, 35-37.
- BIE R. & SJÖSTRÖM G. Autolytic properties of some lactic acid bacteria used in cheese production. Part I.: material and methods. Milchwiss., 1975(a), 30, 653-657.
- BIE R. & SJÖSTRÖM G. Autolytic properties of some lactic acid bacteria used in cheese production. Part II.: experiments with fluid substrates and cheese. Milchwiss., 1975(b), 30, 739-747.
- BILLOT-KLEIN D., GUTMANN L. SABLE S. GUTTET E. & VAN HEIJENOORT J. Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin-resistant VANB-type *Enterococcus* D366 and of the naturally glycopeptide-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Enterococcus gallinarum*. J. Bacteriol., 1994, 176, 2398-2405.
- BIRKELAND S. E., ABRAHAMSEN R. K. & LANGSRUD T. Accelerated cheese ripening: use of Lac⁻ mutants of lactococci. J. Dairy Res., 1992, 59, 389-400.
- BJÖRKROTH K. J., VANDAMME P. & KORKEALA H. J. Identification and characterization of *Leuconostoc carnosum* associated with production and spoilage of vacuum-packaged, sliced, cooked Ham. Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64, 3313-3319.
- BOUTROU R., SEPULCHRE A., PITEL G., DURIER C. VASSAL L., GRIPON J.-C. & MONNET V. Lactococcal lysis and curd proteolysis: two predictable events important for the development of cheese flavour. Int. Dairy J., 1998, 8, 609-616.

BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle protein dye binding. *Analytic. Biochem.*, 1976, 72, 248-254.

BROSIUS, J., PALMER, M.L., KENNEDY, P. J. and NOLLER, H.F.: Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978, 75, 4801-4805.

BROSIUS, J., DULL, T.J., and NOLLER, H.F.: Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980, 78, 201-204.

BUIST G., KOK J. LEENHOUTS K. J. DABROWSKA M. VENEMA G. & HAANDRIKMAN A. J. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation. *J. Bacteriol.*, 1995, 177, 1554-1563.

BUIST G. *AcmA* of *Lactococcus lactis*, a cell-binding major autolysin. Thèse de Doctorat. Université de Groningen, Hollande, 1997(a), p. 125.

BUIST G., KARSENS H. NAUTA A. SINDEREN D. VAN. VENEMA G. & KOK J. Autolysis of *Lactococcus lactis* caused by induced overproduction of its major autolysin, *AcmA*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997(b), 63, 2722-2728.

CHAPOT-CHARTIER M.-P., DENIEL C. ROUSSEAU M. VASSAL L. & GRIPON J. C. Autolysis of two strains of *Lactococcus lactis* during cheese ripening. *Int. Dairy J.*, 1994, 4, 251-269.

CHAPOT-CHARTIER M.-P. Les autolysins des bactéries lactiques. *Lait*, 1996, 76, 91-109.

CHAPOT-CHARTIER M.-P., SCHOULER C., LEPEUPLE A.-S., GRIPON J.-C. & CHOPIN A. Characterization of *cspB*, a cold shock-inducible gene from *Lactococcus lactis*, and evidence for a family genes homologous to the *Escherichia coli cspA* major cold shock gene. *J. Bacteriol.*, 1997, 179, 5589-5593.

CHICH J.-F., MARCHESSEAU K. & GRIPON J.-C. Intracellular Esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763: purification and characterization. *Int. Dairy J.*, 1997, 7, 169-174.

COGAN T. M. Les levains lactiques mésophiles. Une revue. *Lait*, 1980, 60, 397-425.

COGAN T. M., O'DOWD M. & MELLERICK D. Effects of pH and sugar on acetoin production from citrate by *Leuconostoc lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1981, 41, 1-8.

COGAN T. M. Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* ssp.: effects on growth, substrates and products. *J. Appl. Bacteriol.*, 1987, 63, 551-558.

COGAN T. M. & JORDAN K. N. The Dairy *Leuconostoc*. Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. *J. Dairy Sci.*, 1994, 77, 2704-2717.

COGAN T. M., BARBOSA M., BEUVIER E., BIANCHI-SALVADORI B., COCCONCELLI P. S., FERNANDES I., GOMEZ R., KALANTZOPOULOS G., LEDDA A., MEDINA M., REA M. C. & RODRIGUEZ E. Characterisation of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. 1997, 64, 409-421.

COLLINS E. B. & SPECKMAN R. A. Influence of acetaldehyde on growth and acetoin production by *Leuconostoc citrovorum*. J. Dairy Sci., 1974, 57, 1428-1431.

COLLINS M. D., SAMELIS J. METAXOPOULUS J. & WALLBANKS S. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. J. Appl. Bacteriol., 1993, 75, 595-603.

COYETTE J. & GHUYSEN J. M. Wall autolysins of *Lactobacillus acidophilus* 63 AM Gasser. Biochemistry, 1970, 9, 2952-2955.

COYETTE J. & SHOCKMAN G. D. Some properties of the autolytic N-acetylmuramidase of *Lactobacillus acidophilus*. J. Bacteriol., 1973, 114, 34-41.

CHRISTENSEN J. E., DUDLEY E. G., PEDERSON J. A. & STEELE J. L. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 1999, 76, 217-246.

CROUX, C., RONDA C., LOPEZ L. & GARCIA J. L. Interchange of functional domains swithces enzyme specificity: construction of of a chimeric pneumococcal-clostridial cell wall lytic enzyme. Mol. Microbiol., 1993(a), 9, 1019-1025.

CROUX C., RONDA C., LOPEZ L. & GARCIA J. L. Role of the C-terminal domain of the lysozyme of *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 in a chimeric pneumococcal-clostridial cell wall lytic enzyme. FEBS Lett., 1993(b), 336, 111-114.

CROW V. L., COOLBEAR T. GOPAL P. K. MARTLEY F. G. MCKAY L. L. & RIEPE H. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. Int. Dairy J., 1995, 5, 855-875.

DAMELIN L. H., DYKES G. A. & VON HOLY A. Biodiversity of lactic acid bacteria from food-related ecosystems. Microbios. 1999, 83, 13-22.

DAVID S., STEVENS H. VAN RIEL M. SIMONS G. & DE VOS W. M. *Leuconostoc lactis* β -galactosidase is encoded by two overlapping genes. J. Bacteriol., 1992, 174, 4475-4481.

DELCOUR J., FERAIN T., DEGHOAIN M., PALUMBO E. & HOLS P. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 1999, 76, 159-184.

DELLAGLIO F., DICKS L. M. T. & TORRIANI S. The genus *Leuconostoc* in The lactic acid bacteria. Vol. 2. The genera of lactic acid bacteria, B. J. B. Wood & W. H. Holtzapfel, ed. Blackie Academic & Professional, 1995, 235-278.

DE LOS REYES GAVILLANC. G., LIMSOWTIN G. K. Y., TAILLIEZ P., SECHAUD L. & ACCOLAS J. P. A *Lactobacillus helveticus*-specific DNA probe detects restriction fragment length polymorphism in this species. Appl. Environ Microbiol., 1992, 58, 3429-3432.

DE MAN J. C., ROGOSA M. & SHARPE M. E. A Medium for cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol., 1960, 23, 130-135.

DEMIRCI Y. & HEMME D. Acidification test based on the use of biomass for screening of *Leuconostoc*. Application to *Ln. mesenteroides* strains isolated from French raw milk cheeses. J. Dairy Res., 1995, 62, 1-7.

DE ROISSART H. Bactéries Lactiques. Dans "Laits et produits laitiers" Volume 3. Luquet F. M. (ed.) Lavoisier, Paris, 1986, 341-414.

DE RUYTER P. G. G. A., KUIPERS O. P. & DE VOS W. M. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62, 3662-3667.

DE RUYTER P. G. G. A., KUIPERS O. P., MEIJER W. C. & DE VOS W. M. Food-grade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening. Nat. Biotech., 1997, 15, 976-979.

DESMAZEAUD M. J. Le lait milieu de culture. Microbiol. Aliment. Nutr., 1990, 8, 313-325.

DEVOYOD J. J. & MULLER M. La flore microbienne du fromage de Roquefort. III. Les streptocoques lactiques et les *Leuconostoc*. Influence de différents micro-organismes de contamination. Lait, 1969, 49, 369-399.

DEVOYOD J. J. & POULLAIN F. Les *Leuconostocs* : leur rôle en technologie laitière. Lait, 1988, 68, 249-280.

DICKS L. M. T. & VAN VUUREN H. J. J. Differentiation of *Leuconostoc* species by nicotinamide adenine dinucleotide-dependent D(-)-lactic dehydrogenase profiles. FEMS Microbiol. Lett., 1990(a), 67, 9-14.

DICKS L. M. T., FANTUZZI L. GONZALEZ F. C. DU TOIT M. & DELLAGLIO F. *Leuconostoc argentinum* sp. nov., isolated from Argentine raw milk. Int. J. Syst. Bacteriol., 1993, 43, 347-351.

DICKS L. M., DELLAGLIO F. & COLLINS M. D. Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* (corrig.) gen. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 1995, 45, 395-397.

DIVIES C., FREY L., HUBERT J.-C. & DE ROISSART H. Métabolisme d'autres substrats carbonés par les bactéries lactiques. Dans "Bactéries Lactiques", volume 1. De Roissart H. et Luquet F. M. (ed.). Loriga, 1994, 291-307.

EICHENBAUM Z., FEDERLE M. J., MARRA D., DE VOS W. M. KUIPERS O. P., KLEEREBEZEM M. & SCOOT J. R. Use of lactococcal *nisA* promoter to regulate gene expression in Gram positive bacteria : comparison of induction level and promoter strength. Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64, 2763-2769.

EL-SHAFEI H., EL-SODA M. & EZZAT N. The peptide hydrolase system of the *Leuconostoc*. J. Food Prot., 1990, 53, 165-169.

EL-SODA M. Accelerated maturation of cheese. Int. Dairy J., 1993, 3, 531-544.

EL-SODA M., FARKYE N., VUILLEMARD J. C., SIMARD R. E., OLSON N. F., EL KHOLY W., DAKO E., MEDRANO E., GABER M. & LIM L. Autolysis of lactic acid bacteria: impact on flavor development in cheese. In: Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence. G. Charalambous, Ed. Elsevier Science, 1995.

EZZAT N., EL-SODA M. EL-SHAFEI H. & OLSON N. F. Cell-wall associated peptide hydrolase and esterase activities in several cheese-related bacteria. Food Chem., 1993, 48, 19-23.

EZZAT N., EL-SODA M. & EL-SHAFEI H. Partial purification and characterization of peptide hydrolase system in several cheese-related bacteria. Egypt. J. Dairy Sci., 1994, 22, 217-231.

FANTUZZI L., RAFFELLINI S. & GONZALEZ F. C. Inhibition of psychotrophic bacteria growth in raw milk stored at low temperature by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* LL152. Microbiol. Aliment. Nutr., 1999, 17, 101-106.

FARROW J. A. E., FACKLAM R. R. & COLLINS M. D. Nucleic acid homologies of some vancomycin-resistant *Leuconostoc* and description of *Leuconostoc citreum* sp. nov. and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 1989, 39, 279-283.

FERNANDEZ MURGA M.L., PESCE DE RUIZ HOLGADO A. & DE VALDEZ G. F. Influence of the incubation temperature on the autolytic activity of *Lactobacillus acidophilus*. 1995, J. Appl. Bacteriol., 78, 426-429.

FIGUEROA C., DAVILA A. M. & POURQUIE J. Lactic acid bacteria of the sour cassava starch fermentation, Lett. Appl. Microbiol. 1995, 21, 126-130.

FOSTER S. J. Cloning, expression, sequence analysis and biochemical characterization of an autolytic amidase of *Bacillus subtilis* 168trpC J. Gen Microbiol., 1991, 137, 1987-1998.

FOUCAUD C. & POOLMAN B. Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. Functional reconstitution of the protein and characterization of the kinetic mechanism of transport. J. Biol. Chem., 1992, 267, 22087-22092.

FOX P. F., WALLACE J. M., MORGAN S., LYNCH C. M. NILLAND E. J. & TOBIN J. Acceleration of cheese ripening. Antonie van Leewenhoek, 1996, 70, 271-297.

FUCHS B. M., WALLNER G., BEISKER W., SCHWIPPL I., LUDWIG W. & AMANN R. Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. Appl. Environ. Microbiol. 1998, 64, 4973-4982.

GARVIE E. I. The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. J. Dairy Res., 1960, 27, 283-292.

GARVIE E. I. The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc* including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov.) and *Leuconostoc oenos*. J. Gen. Microbiol., 1967(a), 48, 439-447.

GARVIE E. I. *Leuconostoc oenos* sp. nov. J. Gen. Microbiol., 1967(b), 48, 431-438.

GARVIE E. I. Lactic Dehydrogenases of Strains of the Genus *Leuconostoc*. J. Gen. Microbiol., 1969, 58, 85-94.

GARVIE E. I. 1974(a), *Leuconostoc* Van Tieghem 1878, 198AL emend mut. car. Hucker and Pederson 1930, 66AL. Dans "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 8ème ed., R. E. Buchanan and N. E. Gibsons, ed. Williams and Wilkins Co, Baltimore, p. 510-530.

GARVIE E. I. Subdivisions within the genus *Leuconostoc* as shown by RNA/DNA hybridization. J. Gen. Microbiol., 1981, 127, 209-212.

GARVIE E. I. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (Knudsen and Sorensen) comb. nov. and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (Beijerinck) comb. nov. Int. J. System. Bacteriol., 1983, 33, 118-119.

GARVIE E. I. *Leuconostoc* Van Tieghem 1878, 198AL emend mut. car. Hucker and Pederson 1930, 66AL. Dans "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" 1st ed., R. E. Buchanan and N. E. Gibsons, ed. Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1986, p. 1071-1075.

GHUYSEN J. M. TIPPER D. J. & STROMINGER J. L. Enzyme that degrade bacterial cell walls. Methods in Enzymology, 1966, 8, 885-899.

GHUYSEN J.-M. Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. Bacteriol. Rev., 1968, 32, 425-464.

GIBSON T. J. Studies on the Eppstein-barr genome. Ph. D. Thesis, Cambridge University, Cambridge, United Kingdom, 1984.

GIBSON T. D., PARKER S. M. & WOODWARD J. R. Purification and characterization of diacetyl reductase from chicken liver and *Streptococcus lactis* and enzymic determination of diacetyl and diketons. Enzyme Microbiol. Technol., 1991, 13, 171-178.

GIRAFFA, G., DE VECCHI P. and ROSSETTI, L.: Identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis. J. Appl. Microbiol., 1998, 85, 918-924.

HANAHAN D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol., 1983, 166, 557.

HARVEY R. J. & COLLINS E. B. Role of citritase in acetoin formation by *Streptococcus diacetylactis* and *Leuconostoc citrovorum*. J. Bacteriol., 1960, 82, 954-959.

HECHARD Y., DERIJARD B., LETELLIER F. & CENATIEMPO Y. Characterisation and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. J. Gen. Microbiol., 1992, 138, 2725-2731.

HEMME D., BOUILLANNE C. METRO F. & DESMAZEAUD M. J. Microbial catabolism of amino acids during cheese ripening. *Sci. Aliments*, 1982, 2, 113-123.

HERTEL, C., LUDWIG, W., POT, B., KERSTERS, K. and SCHLEIFER, K.H.: Differentiation of lactobacilli occurring in fermented milk products by using oligonucleotide probes and electrophoretic protein profiles. *System. Appl. Microbiol.* 1993, 16, 463-467.

HOLLAND R. & COOLBEAR T. Purification of tributyrin esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* E8. *J. Dairy. Res.*, 1996, 63, 131-140.

HOLLO H. & NES I. F. High-frequency transformation by electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, 55, 3119-3123.

HÖLTJE J. V. & TUOMANEN E. I. The murein hydrolases of *Escherichia coli*: properties; functions and impact on the course of infections *in vivo*. *J. Gen. Microbiol.*, 1991, 137, 441-454.

HÖLTJE J-V. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbol. Rev.*, 1998, 62, 181-203.

HOLZAPFEL W. H. & SCHILLINGER U. The genus *Leuconostoc*. Dans *The Prokaryotes*, Barlows A. et coll. ed. New-York, Springer-Verlag, 1991, 1508-1534.

HONTEBEYRIE M. & GASSER F. Comparative immunological relationships of two distinct sets of isofunctional deshydrogenases in the genus *Leuconostoc*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1975, 25, 1-6.

HUANG D. Q. Etude du métabolisme de sucres (lactose, raffinose, pentose) par des bactéries lactiques du genre *Leuconostoc*. Thèse, Université de Bourgogne, Dijon, 1994, p. 212.

HUGENHOLTZ J. & STARRENBURG M. J. C. Diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* and *Leuconostoc* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1992, 38, 17-22.

HUGENHOLTZ J. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1993, 12, 165-178.

HUSSON-KAO C. Etude des mécanisme moléculaires d'autolyse de *Streptococcus thermophilus*. Thèse de Doctorat, Université de Compiègne, 1999, 205.

HUSSON-KAO C., MENGAUD J., GRIPON J.-C., BENBADIS L. & CHAPOT-CHARTIER M.-P. The autolysis of *Streptococcus thermophilus* DN-001065 is triggered by several food-grade environmental signals. *Int. dairy J.*, 2000, 9, 715-723.

HUTKINS R. W. & PONNE C. Lactose uptake driven by galactose efflux in *Streptococcus thermophilus*: evidence for a galactose-lactose antiporter. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, 57, 941-944.

- JAY J. M. Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1982, 44, 525-530.
- KALOGRIDOU-VASSILIADOU D. Lipolytic activity and heat resistance of extracellular lipases of some Gram-negative bacteria. *Milchwiss.*, 1984, 39, 601-604.
- KAMALY K. M., TAKAYAMA K. & MARTH E. H. Acylglycerol acylhydrolase (lipase) activities of *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, and their mutants. *J. Dairy Sci.*, 1990, 73, 280-290.
- KANEDA S. Isolation and characterisation of autolysin-defective mutants of *Staphylococcus aureus* that form cell packets. *Curr. Microbiol.*, 1997, 34, 354-359.
- KANG O. J., VEZINA L. P., LABERGE S. & SIMARD R. E. Some factors influencing the autolysis of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei*. *J. Dairy Sci.*, 1998, 81, 639-646.
- KAWABATA S., VASSAL L., BARS D. L., CESSÉLIN B., NARDI M., GRIPON J.-C. & CHAPOT-CHARTIER M.-P. Phage induced lysis of *Lactococcus lactis* during Saint Paulin cheese ripening and its impact on proteolysis. *Lait*, 1997, 77, 229-239.
- KIHAL M., PREVOST H., LHOTTE M. E., HUANG D. Q. & DIVIES C. Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1996, 22, 219-223.
- KLEEREBEZEM M., BEERTHUYSEN M. M., VAUGHAN E. E., DE VOS W. M. & KUIPERS O. P. Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63, 4581-4584.
- KONINGS W. N., POOLMAN B. & DRIESSEN A. J. M. Bioenergetics and solute transport in lactococci. *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 1989, 16, 419-476.
- KONINGS W. N., POOLMAN B. & VAN VEEN H. W. Solute transport and energy transduction in bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1994(a), 65, 369-380.
- KONINGS W. N., POOLMAN B., DRIESSEN A. J. M., SMID E. J. & MOLENAAR D. Mécanismes du transport des nutriments dans les bactéries lactiques. Dans "Bactéries Lactiques" Volume I, Ed. de Roissart V. et Luquet F. M. 1994(b), p. 209-238.
- KRIER F., REVOL-JUNELLES A. M. & GERMAIN P. Influence of temperature and pH on the production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, 50, 359-363.
- KURODA A. & SEKIGUCHI J. Molecular cloning and sequencing of a major *Bacillus subtilis* autolysin gene. *J. Bacteriol.*, 1991, 173, 7304-7312.
- KUIPERS O. P., BEERTHUYZEN M. M., DE RUYTER P. G. G. A., LUESINK E. J. & DE VOS W. M. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 27299-27304.

- LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227, 680-685.
- LANGSRUD T., LANDAAS A. & CATSBERG H. B. Autolytic properties of different strains of group N-streptococci. *Milchwiss.*, 1987, 42, 556-560.
- LEMIEUX L. & SIMARD R. E. Bitter flavour in dairy products. I. A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. *Lait*, 1991, 71, 599-636.
- LEPEUPLE A.-S. Autolyse des lactocoques: étude du système autolytique et construction d'un système de lyse inductible. Thèse de Doctorat. Université Paris 7. Paris, 1998, 123.
- LEPEUPLE A.-S., VAN GEMERT E. & CHAPOT-CHARTIER M.-P. Analysis of the bacteriolytic enzymes of the autolytic *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain AM2 by renaturing polyacrylamid gel electrophoresis : identification of a prophage encoded enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998(a), 65, 4142-4148.
- LEPEUPLE A. S., VASSAL L., CESSÉLIN B., DELACROIX-BUCHET A., GRIPON J.-C. & CHAPOT-CHARTIER M.-P. Involvement of a prophage in the lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2 during cheese ripening. *Int. Dairy J.*, 1998(b), 8, 667-674.
- LIN J., SCHMITT P. & DIVIES C. Characterization of a citrate-negative mutant of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*: metabolic and plasmidic properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1991, 34, 628-631.
- LINSAY R. C., DAY E. A. & SANDINE W. E. Green flavor defect in lactic starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 1965, 48, 863-869.
- LONVAUD-FUNEL A. Microbiology of the malolactic fermentation: molecular aspects. *FEMS Microbiol. Lett.* 1995, 126, 209-214
- LORTAL S., BOYAVAL P. & VAN HEIJENOORT J. Influence de plusieurs facteurs sur l'autolyse de *Lactobacillus helveticus* CNRZ 414. *Lait*, 1989, 69, 223-231.
- LORTAL S., ROUSSEAU M. BOYAVAL P. & VAN HEIJENOORT J. Cell wall and autolytic system of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046. *J. Gen. Microbiol.*, 1991, 137, 549-559.
- LORTAL S., VALENCE F., BIZET C. & MAUBOIS J. L. Electrophoretic pattern of peptidoglycane hydrolases, a new tool for bacterial species identification: application to 10 *Lactobacillus* species. *Res. Microbiol.*, 1997, 148, 461-474.
- LUCEY C. A. & CONDON S. Active role of oxygen and NADH oxidase in growth and energy metabolism of *Leuconostoc*. *J. Gen. Microbiol.*, 1986, 132, 1789-1796.
- MAIDAK, B.L., COLE, J.R., PARKER, Jr, C.T., GARRITY, G.M., LARSEN, N., LI, B., LILBURN, T.G., McCAUGHEY, M.J., OLSEN, G.J., OVERBEEK, R., PRAMANIK, S., SCHMIDT, T.M., TIEDJE, J.M., WOESE, C.R.: A new version of RDP (Ribosomal Database Project)., *Nucleic Acids Res.*, 1999, 27, 171-173.

MARGOT P. & KARAMATA D. Identification of the structural genes for N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase and its modifier in *Bacillus subtilis* 168: inactivations of these genes by insertionnal mutagenesis has no effect on growth or cell separation. *Mol. Gen. Genet.*, 1992, 232, 359-366.

MARQUIS R. E. & CARSTENSEN E. L. Electric conductivity and internal osmolality of intact bacterial cells. *J. Bacteriol.*, 1973, 113, 1198-1206.

MARTINEZ-MURCIA A. J. & COLLINS M. D. A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1990, 70, 73-84.

MARTINEZ-MURCIA A. J. & COLLINS M. D. A phylogenetic analysis of an atypical leuconostoc: description of *Leuconostoc fallax* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1991, 82, 55-60.

MATHER D. W. & BABEL F. J. Inhibition of certain types of bacterial spoilage in creamed cottage cheese by the use of a creaming mixture prepared with *Streptococcus citrovorus*. *J. Dairy Sci.*, 1959, 42, 1917-1926.

MARS I. & MONNET V. An aminopeptidase P from *Lactococcus lactis* with original specificity. *Bioch. Biophys. Acta.*, 1995, 1243, 209-215.

MARTY-TEYSSET C., POSTHUMA C. Lolkema J. S. DIVIES C. & KONINGS W. N. Proton motive force generation by citrilolactic fermentation in *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.*, 1996(a), 178, 2178-2185.

MARTY-TEYSSET C., Lolkema J. S. SCHMITT P. DIVIES C. & KONINGS W. N. The citrate metabolic pathway in *Leuconostoc mesenteroides*: expression, amino acid synthesis, and alpha-ketocarboxylate transport. *J. Bacteriol.*, 1996(b), 178, 6209-6215.

MATTE-TAILLIEZ O., QUENEE P. & TAILLIEZ P. Diversité des bactéries lactiques, Actes du colloque lactique 97, 1997, 143-155.

MATTE-TAILLIEZ O., TENENHAUS M. & TAILLIEZ P. Contribution de l'analyse de données multivariée à l'étude de la biodiversité des lactocoques. *Sciences des Aliments*, 2000, 20, 63-70.

MAYEUX J., SANDINE W. & ELLIKER P. A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 1962, 45, 655.

MEIJER W., VAN DE BUNT B. TWIGT M. DE JONGE B. SMIT G. & HUGENHOLTZ J. Lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* SK110 and its nisin-immune transconjugant in relation to flavor development in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64, 1950-1953.

MIERAU I., TAN P. S. T. HAANDRIKMAN A. J. KOK J. LEENHOUTS K.J. KONINGS W. N. & VENEMA G. Cloning and sequencing of the gene for a lactococcol endopeptidase, an enzyme with sequence similarity to mammalian enkephalinase. *J. Bacteriol.*, 1993, 175, 2087-2096.

- MILLIERE, J.B., MATHOT, A-G, SCHMITT, P. and DIVIES, C.: Phenotypic characterization of *Leuconostoc* species. J. Appl. Bacteriol., 1989, 67, 529-542.
- MOLLET B., KNOL J., POOLMAN B., MARCISSET O. & DELLEY M. Directed genomic integration, gene replacement, and integrative gene expression in *Streptococcus thermophilus*. J. Bacteriol., 1993, 175, 4315-4324.
- MONNET V., CHAPOT-CHARTIER M.-P. & GRIPON J. C. Les peptidases des lactocoques. Lait, 1993, 73, 97-108.
- MORGAN S., ROSS R. P. & HILL C. Bacteriolytic activity caused by the presence of a novel lactococcal plasmid encoding Lactococcins A, B and M. Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61, 2995-3001.
- MOSCHETTI G., BLAIOTTA G., VILLANI F. & COPPOLA C. Specific detection of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* with DNA primers identified by randomly amplified polymorphic DNA analysis. Appl. Environ. Microbiol. 2000, 66, 422-424.
- MOU L., SULLIVAN J. J. & JAGO G. R. Autolysis of *Streptococcus cremoris*. J. Dairy Res., 1976, 43, 275-282.
- MOUSTAFA H. H. & COLLINS E. B. Role of galactose or glucose-1-phosphate in preventing the lysis of *Streptococcus diacetylactis*. J. Bacteriol., 1968, 95, 592-602.
- NAMBU T., MINAMINO T., MACNAP R., M. & KUTSUKAKE K. Peptidoglycan-hydrolasing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol., 1999, 181, 1555-1561.
- NAUTA A., VAN DER BURG B., KARSENS H., VENEMA G. & KOK J. Design of thermolabile bacteriophage repressor mutants by comparative molecular modelling. Nat Biotech., 1997, 980-983.
- NAVARRE W. W. & SCHNEEWIND O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 1999, 63, 174-229.
- NISKASAARI K. Characteristics of the autolysis of variants of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. J. Dairy Res., 1989, 56, 639-649.
- OHMIYA K. & SATO Y. Studies on the proteolytic action of dairy lactic acid bacteria. Part IX. Autolysis and proteolytic action of *Streptococcus cremoris* and *Lactobacillus helveticus*. Agr. Biol. Chem., 1969, 33, 1628-1635.
- OHMIYA K. & SATO Y. Studies on the proteolytic action of dairy lactic acid bacteria. Part X. Autolysis of lactic acid bacterial cells in aseptic rennet curd. Agr. Biol. Chem., 1970, 34, 457-463.
- OSHIDA T., SUGAI M., KOMATSUZAWA H., HONG Y.-M., SIGINAKA H. & TOMASZ A. A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase

- domain and an endo- β -N-acetylglucosaminidase domain: cloning, sequence analysis and characterisation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1995, 92, 285-289.
- OSTLIE H., VEGARUD G. & LANGSRUD T. Autolysis of dairy propionibacteria in buffer systems. *J. Dairy Sci.*, 1995(a), 78, 2315-2325.
- OSTLIE H., VEGARUD G. & LANGSRUD T. Autolysis of lactococci: detection of lytic enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis and characterization in buffer systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995(b), 61, 3598-3603.
- PILLIDGE C. J., GOVINDASAMY-LUCEY S., GOPAL P. K. & CROW V. L. The major lactococcal cell wall autolysin AcmA does not determine the rate of autolysis of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 2250 in Cheddar cheese. *Int. Dairy J.*, 1998, 843-850.
- POOLMAN B. Biochemistry and molecular biology of galactoside transport and metabolism in lactic acid bacteria. *Lait*, 1993, 73, 87-96.
- POT, B., DEVRIESE, L.A., URSI, D., VANDAMME, P., HAESBROUCK, F. and KERSTERS, K.: Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. *System. Appl. Microbiol.*, 1996, 19, 213-222.
- POTVIN C., LECLERC D. TREMBLAY G. ASSELIN A. & BELLEMARE G. Cloning, sequencing and expression of a bacillus bacteriolytic enzyme in *Escherchia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 1988, 214, 241-248.
- RIEPE H. R., PILLIDGE C. J. COPAL P. K. & MCKAY L. L. Characterization of the highly autolytic *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains CO and 2250. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63, 3757-3763.
- ROGERS H. J., PERKINS H. R. & WARD J. B. Microbial cell walls and membranes. Chapman and Hall, London New York. 1980,
- ROUDOT-ALGARON F. & YVON M. Le catabolisme des acides aminés aromatiques et des acides aminés à chaîne ramifiée chez *Lactococcus lactis*. *Lait*, 1998, 78, 23-30.
- SANDERS J. W., VENEMA G. & KOK J. A chlorid inducible gene expression cassette and its use in induced lysis of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63, 4877-4882.
- SANDHOLM E. & SARIMO S. S. Autolysis of *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1981, 11, 125-129.
- SANGER F., NICKLEN S. & COULSON A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1977, 74, 5463-5467.
- SANZ J. M., DIAZ E. & GARCIA J. L. Studies on the structure and function of the N-terminal domain of the pneumococcal murein hydrolases. *Mol. Microbiol.*, 1992, 6, 921-931.
- SATO K., QUARTEY M. K., LIEBELER C. L., LE C. T. & SCOTT G.G. Role of autolysin and pneumolysin in middle ear inflammation caused by a type 3 *Streptococcus pneumoniae* strain in the chinchilla otitis media model. *Infection and Immunity*, 1996, 64, 1140-1145.

- SCHILLINGER U., HOLZAPFEL W. & KANDLER O. Nucleic acid hybridization studies on *Leuconostoc* and heterofermentative lactobacilli and description of *Leuconostoc amelibiosum* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol., 1989, 12, 48-55.
- SCHLEIFER K.-H. & KANDLER O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol. Rev., 1972, 36, 407-477.
- SCHMITT P. & DIVIES C. Effect of acetaldehyde on growth, substrates, and products by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*. Biotechnol. Prog., 1990, 6, 421-424.
- SCHMITT P. & DIVIES C. Co-metabolism of citrate and lactose by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. J. Ferment. Bioeng., 1991, 71, 1-3.
- SCHMITT P., DIVIES C. & CARDONA R. Origin of end-products from the co-metabolism of glucose and citrate by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1992, 36, 679-683.
- SCHMITT P., BERNET N. ZARZELLI Y. & DIVIES C. Effect of diacetyl on growth, substrates, products and enzymes of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Milchwiss., 1994, 49, 183-185.
- SCHMITT P., VASSEUR C. PHALIP V. HUANG D. Q. DIVIES C. & PREVOST H. Diacetyl and acetoin production from the co-metabolism of citrate and xylose by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1997, 47, 715-718.
- SERVER-BUSSON C., FOUCAUD C. & LEVEAU J.-Y. Selection of dairy *Leuconostoc* isolates from important technological properties. J. Dairy Res., 1999, 66, 245-256.
- SHAW B. G. & HARDING C. D. *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. nov. from chill-stored meats. Int. J. Syst. Bacteriol., 1989, 39, 217-223.
- SHOCKMAN G. D. & BARRET J. F. Structure, function and assembly of cell walls of Gram positive bacteria. Ann. Rev. Microbiol., 1983, 37, 501-527.
- SHOCKMAN G. D. & HÖLTJE J.-V. Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases. New Comprehensive Biochem. Bacterial Cell Wall, J-M Ghuysen and R Hakenbeck Eds, 1994, 131-166.
- SILVER J. Inverse polymerase chain reaction. Dans, PCR: a practical approach, M. J. McPherson, P. Quirke, and G. R. Taylor ed., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom. 1991, p. 137-146.
- SIMON D. & CHOPIN A. Construction of a plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. Biochimie, 1988, 70, 559-566.
- SMITH M. R., HUGENHOLTZ J. MIKOCZI P. DE REE E. BUNCH A. W. & DE BONT J. A. M. The stability of the lactose and citrate plasmids in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. FEMS Microbiol. Lett., 1992, 96, 7-12.

- SMITH M. R., VAN DER SCHAAF A. DE REE E. M. DE BONT J. A. M. & HUGENHOLTZ J. The physiology of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* immobilized in hollow-fibre bioreactors: glucose, lactose and citrate metabolism at high cell densities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1993, 39, 94-98.
- SNEATH P. H. A., SOKAL R. R. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. San Francisco, W. H. Freeman. 1973.
- SOKAL R. R. & MICHENER. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.*, 1958, 22, 1409-1438.
- SPECKMAN R. A. & COLLINS E. B. Diacetyl biosynthesis in *Streptococcus diacetylactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *J. Bacteriol.*, 1968, 95, 174-180.
- STARRENBURG M. J. C. & HUGENHOLTZ J. Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* ssp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, 57, 3535-3540.
- STILES M. E. Bacteriocins produced by *Leuconostoc* species. *J. Dairy Sci.*, 1994, 77, 2718-2724.
- STILES M. E. & HOLZAPFEL W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomie. *Int. J. Food Microbiol.*, 1997, 36, 1-29.
- TAILLIEZ P., TREMBLAY J., EHRLICH S. D. & CHOPIN A. Molecular diversity and relationship within *Lactococcus lactis*, as revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) *Int. System. Appl. Microbiol.* 1998, 21, 530-538.
- TAKAHASHI M., OKADA S. UCHIMURA T. & KOZAKI M. *Leuconostoc amelibiosum* Schillinger; Holzapfel, and Kandler 1989 is a later subjective synonym of *Leuconostoc citreum* Farrow, Facklman, and Collins 1989. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1992, 42, 649-651.
- TAN P. S. T. & KONINGS W. N. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, 56, 526-532.
- TAN P. S. T., CHAPOT-CHARTIER M.-P. POS K. M. ROUSSEAU M. BOQUIEN C. Y. GRIPON J. C. & KONINGS W. N. Localization of peptidases in lactococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, 58, 285-292.
- TERZAGHI B. E. & SANDINE W. E. Improved medium fro lavtic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, 1975, 29, 807-813.
- THUNELL R. K. The dairy leuconostocs: taxonomy of the leuconoctocs. *J. Dairy Sci.*, 1995, 78, 2514-2522.
- THOMPSON J. S. & SHOCKMAN G. D. A modification of the Park and Johnson reducing sugar determination suitable for the assay of insoluble materials its application to bacterial cell wall. *Analytical Biochemistry*, 1968, 22, 260-268.

TSUJITA T., SHIRAI K. SAITO Y. & OKUDA H. Relationship between lipase and esterase. In *Isozymes: Structure, Function and use in Biology and Medicine*. Wiley-Liss, 1990, p. 915-933.

TUOMANEN E. The induction of meningeal inflammation components of the pneumococcal cell wall. *J. Infect. Diseases*, 1985, 151, 859-868.

UMEMOTO Y. & SATO Y. Lipolysis by intracellular lipase of *Streptococcus lactis* against its neutral lipids obtained by growth at low temperature. *Agricult. Biol. Chem.*, 1978, 42, 221-225.

UMETRI AB, Multivariate modelling, analysis and SPC of process data. *Manuel de l'utilisateur*. Version 3,0, 1996, Suède.

VAFOPOULOU-MASTROJIANNAKI A. & LITOPOULOU-TZANETAKI E. Protease and peptidase activity from whole cells and crude cell-free extracts of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc paramesenteroides* isolated from cheese. *Microbiol. Alim. Nutr.*, 1996(a), 14, 167-174.

VAFOPOULOU-MASTROJIANNAKI A., LITOPOULOU-TZANETAKI E. & TZANETAKIS N. Esterase activities of cell-free extracts from "wild" strains of leuconostocs and heterofermentative lactobacilli isolated from traditional Greek cheese. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1996(b), 23, 367-370.

VALENCE F. & LORTAL S. Zymogram and preliminary characterization of *Lactobacillus helveticus* autolysins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61, 3391-3399.

VALENCE F., RICHOUX R., THIERRY A., PALVA A. & LORTAL S. Autolysis of *Lactobacillus helveticus* and *Propionibacterium freudenreichii* in Swiss cheeses: first evidence by using species specific lysis markers. *J. Dairy Res.*, 1998, 65, 609-620.

VALISENA S., VARALDO P. E. & SATTA G. Staphylococcal endo-beta-N-acetylglucosaminidase inhibits response of lymphocytes to mitogens and interferes with production of antibodies in mice. *J. Clin. Invest.*, 1991, 87, 1969-1976.

VAN TIEGHEM P. Sur la gamme de sucrerie (*Leuconostoc mesenteroides*). *Ann. Sci. Nat. Bot.*, 1878, 7, 180-203.

VAUGHAN E. E., DAVID S. & DE VOS W. N. The lactose transporter in *Leuconostoc lactis* is a new member of the lacS subfamily of galactoside-pentose-hexuronide translocators. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62, 1574-1582.

VEDAMUTHU E. R. The dairy *Leuconostoc*: use in dairy products. *J. Dairy Sci.*, 1994, 77, 2725-2737.

VEGARUD G., CASTBERG H. B. & LANGSRUD T. Autolysis of group n streptococci: effects of media composition, modifications and temperature. *J. Dairy Sci.*, 1983, 66, 2294-2302.

VILLANI F., MOSCHETTI G. BLAIOTTA G. & COPPOLA S. Characterization of strains of *Leuconostoc mesenteroides* by analysis of soluble whole-cell protein pattern, DNA fingerprinting and restriction of ribosomal DNA. J. Appl. Microbiol., 1997, 82, 578-88.

VISSER F. M. W. Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese: 2) Development of bitterness and cheese flavour. Neth. Milk Dairy J., 1977, 31, 188-209.

WELCH J., McCLELLAND M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic acids Res., 1990, 18, 7213-7218.

WHATMORE A. M., KING S. J., DOHERTY, N. C., STURGEON, D., CHANTER N. & DOWSON C. G. Molecular characterisation of equine isolates of *Streptococcus pneumoniae*: natural disruption of genes encoding the virulence factors pbneumolysin and autolysin. Infect. Immun., 1999, 67, 2776-2782.

WILKINSON M. G., GUINEE T. P. & FOX P. F. Factors which may influence the determination of autolysis of starter bacteria during cheddar cheese ripening. Int. Dairy J., 1994(a), 4, 141-160.

WILKINSON M. G., GUINEE T. P. O'CALLAGHAN D. M. & FOX P. F. Autolysis and proteolysis in different strains of starter bacteria during Cheddar cheese ripening. J. Dairy Res., 1994(b), 61, 249-262.

WILKINSON M. G., GUINEE T. P., O'CALLAGHAN D. M. & FOX P. F. Effect of cooking temperature on the autolysis of starter, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2, and the maturation of Cheddar cheese. Milchwissenschaft, 1995, 50, 376-380.

WILLIAMS J. G. K., KUBELIK A. R., LIVAK K. J. RAFALSKI J. A. & TINGEY S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic acids. Res., 1990, 18, 6531-6535.

WINTER D. A., POOLMAN B. HEMME D. & KONINGS W. N. Branched-chain amino acid transport in cytoplasmic membranes of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* CNRZ 1273. Appl. Environ. Microbiol., 1991, 57, 3350-3354.

WREN B. W. A family of clostridial and streptococcal ligand-binding proteins with conserved C-terminal repeat sequences. Mol. Microbiol., 1991, 5, 797-803.

YANG D. & WOESE C. R. Phylogenetic structure of the "*Leuconostoc*": an interesting case of rapidly evolving organism. Syst. Appl. Microbiol., 1989, 12, 145-149.

YVON M., THIROUIN S. RIJNEN L. FROMENTIER D. & GRIPON J. C. An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavour compounds. Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63, 414-419.

ZEVACO C., MONNET V. & GRIPON J. C. Intracellular X-prolyl dipeptidyl peptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: purification and properties. J. Appl. Bacteriol., 1990, 68, 357-366.