Électrophorégrammes des protéines, de la *Bêta*-galactosidase et de l'aldolase de *Streptococcus thermophilus* et des lactobacilles thermophiles

Leurs variations selon les souches et les conditions de culture

par

D. HEMME et Michèle NARDI*

INTRODUCTION

L'analyse des spectres électrophorétiques de protéines solubles ou d'enzymes dans un but taxonomique a été employée par de nombreux auteurs et pour divers genres bactériens [7, 23, 24, 25]. Certains auteurs ont utilisé des comparaisons d'enzymes telles que les estérases [20], les aldolases [18] ou encore les lacticodéshydrogénases [voir 9]. Morichi *et al.* [20] ont utilisé ces méthodes électrophorétiques dans le cas des lactobacilles. De même, récemment, Lauer *et al.* [16] utilisèrent le critère « migration des LDH » pour différencier divers groupes de souches appartenant au genre *Lactobacillus acidophilus*, et décrire *L. gasseri* [17]. Hemme *et al.* [10] ont considéré tant la migration électrophorétique des LDH que celle des protéines solubles pour la description d'une autre nouvelle espèce, *L. murinus*. Les streptocoques ont été également étudiés récemment par Jarvis et Wolff [14] par comparaison des spectres de protéines solubles. Ces spectres peuvent en effet être un moyen rapide de reconnaissance des souches, remplaçant avec avantage, selon Garber et Rippon, « une multitude d'autres tests d'identification » [8]. Il est parfois suffisant de repérer certaines bandes caractéristiques d'une souche ou d'une espèce [10], mais des densitogrammes peuvent être utilisés [21] et leur interprétation éventuellement faite par analyse numérique,

* Institut National de la Recherche Agronomique (CNRZ), Laboratoire de Microbiologie Laitière et de Génie Alimentaire - 78350 Jouy-en-Josas (France).

comme l'ont proposé Kersters et De Ley [15] et utilisé Jarvis et Wolff [14]. Ces densitogrammes permettent ainsi de comparer les valeurs relatives des divers pics obtenus à partir d'électrophorèses réalisées avec des extraits bruts provenant de cellules cultivées dans diverses conditions [21].

L'objet de ce travail était double. Il s'agissait d'une part de comparer vingt souches de lactobacilles thermophiles appartenant aux trois espèces *L. helveticus*, *L. lactis* et *L. bulgaricus*, ainsi que dix souches de *S. thermophilus*, par comparaison des profils de protéines solubles obtenus après électrophorèse en tube sur gel de polyacrylamide. De plus les souches de *S. thermophilus* étaient comparées par les activités β -gal, P- β -gal et aldolase révélées après électrophorèse, dont le nombre et la mobilité pouvaient éventuellement varier selon les souches. D'autre part, nous nous proposons de détecter des différences dans les spectres de protéines solubles obtenus à partir d'extraits de cellules récoltées dans des conditions variables, en escomptant pouvoir effectuer des rapprochements entre les variations de spectres observées et les variations des activités enzymatiques de la glycolyse observées précédemment par Hemme *et al.* [13] chez *S. thermophilus*.

MATERIEL ET METHODES

Souches

Les souches de bactéries lactiques utilisées ont été choisies dans la collection du Centre National de Recherches Zootechniques (CN RZ), Jouy-en-Josas. Elles ont été choisies [11] afin d'être représentatives de la collection CNRZ pour les quatre espèces étudiées [1]. L'origine des souches et leur nomenclature sont données dans le tableau 1.

Les souches étaient conservées à -30°C sous forme de cultures sur lait (inoculum 5 p. 100) non incubées, décongelées au fur et à mesure des besoins.

Culture des souches

Après décongélation rapide, les cultures étaient incubées à 37°C , repiquées deux fois sur lait tournesolé, puis sur milieu MRS (MRS broth Difco) dans le cas des lactobacilles ou de milieu M 17 [26] dans le cas de *S. thermophilus*. Cette dernière culture (10 ml) sert à ensemer un flacon de 2 l contenant 1,5 l des mêmes milieux stériles. Après 15 h de culture à 37°C , les bactéries sont récoltées par centrifugation.

TABLEAU 1

Nomenclature et origine des souches bactériennes*

Souches CNRZ	Origine	Isolée par	Date
<i>Streptococcus thermophilus</i> :			
7	Yoghourt	Mourgues, INRA	1957
21	Levain artisanal à Gruyère	Accolas, INRA	1960
160 (NCDO 1611)	Levain à yoghourt (France)	Portmann, INRA	1954
307	Levain artisanal à Gruyère	Accolas, INRA	1963
302 et 308	Levain artisanal à Gruyère	Accolas, INRA	1964
368 (Sts)	Souche à yoghourt (Pays-Bas)	Galeslout, NIZO, reçue en	1970
385	Yoghourt (Japon)	Accolas, INRA	1971
391	Levain à yoghourt (France)	Accolas, INRA	1971
445	Culture du commerce pour yoghourt	Bouillanne, INRA	1973
<i>Lactobacillus helveticus</i> :			
32	Levain artisanal à Gruyère	Marganne, INRA	1961
223 souche néotype ATCC 15009	Fromage d'Emmental	Orla-Jensen	1919
243	Levain artisanal à Gruyère	Accolas, INRA	1963
244, 249 et 303	Levain artisanal à Gruyère	Accolas, INRA	1964
414	Koumis de lait de vache (U.R.S.S.)	Accolas, INRA	1971
<i>Lactobacillus lactis</i> :			
238, 239 et 242	Levain artisanal à Gruyère	Accolas, INRA	1963
245, 247, 250 et 252	Levain artisanal à Gruyère	Accolas, INRA	1964
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> :			
36	Yoghourt (France)	Chevalier et Fournaud, INRA	1954
369 (Ib)	Souche à yoghourt (Pays-Bas)	Galeslout, NIZO, reçue en	1970
384	Yoghourt (Japon)	Accolas, INRA	1971
397, 418 et 419	Cultures mixtes pour yoghourt (France)	Accolas, INRA	1971

* CNRZ : Centre National de Recherches Zootechniques, Jouy-en-Josas (France).
 NCDO : National Collection of Dairy Organisms, Shinfield, Reading (Angleterre).
 INRA : Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas (France).
 NIZO : Netherlands Institute for Dairy Research, Ede (Pays-Bas).

Préparation des extraits bactériens

Pour chacune des vingt souches, après deux lavages en tampon phosphate 50 mM pH 6,5, 2 g (poids humide) de cellules bactériennes étaient traitées (bol de 35 ml) dans un appareil Vibrogen (Labo-Moderne, Paris) en présence de billes de verre (diamètre 0,11 mm) pendant 5 min, la température étant maintenue à 4° C. Après vérification de la lyse par observation microscopique, le broyat était séparé des billes de verre par décantation. Après centrifugation ((Sorvall) à 4° C pendant 30 min à 13 000 g, le surnageant de centrifugation contenant le matériel soluble était décanté des débris cellulaires et bactéries non lysées et réparti en fractions aliquotes de 15 ml. Celles-ci étaient aussitôt congelées à -30° C. Elles étaient ensuite décongelées au fur et à mesure des besoins.

Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Les électrophorèses des extraits bruts solubles étaient faites en gel de polyacrylamide en tube, selon la technique de Davis [5] à l'aide d'un appareillage Isco (modèle 1270) comportant 13 tubes de 100 × 6 mm. Les gels contenaient 7 p. 100 d'un mélange acrylamide/bis-acrylamide (95/5) (Cyanogum 41, Merck) dans le cas des séparations électrophorétiques destinées à comparer les souches entre elles. Le tampon utilisé dans ce cas tant pour la fabrication des gels que pour les bacs d'électrophorèse, était du tampon TRIS-borate 100 mM pH 9,2. Pour les études des variations selon les conditions de culture, les gels étaient à 6 p. 100 en acrylamide (proportion 58/2), fabriqués et utilisés à pH 8,5 dans le même tampon. Dans tous les cas les gels, de longueur 90 mm, étaient soumis à un courant d'ampérage constant (5 mA/tube) jusqu'à la migration maximale du Bleu de Bromophénol servant d'indicateur. La coloration des protéines était effectuée par le Bleu de Coomassie selon la technique décrite par Chrambach *et al.* [4]. La détection des activités β -galactosidase (β -gal) et phospho- β -galactosidase (P- β -gal) était effectuée sur les demi-gels coupés dans le sens de la longueur, qui étaient immergés dans le mélange habituel déjà décrit [13]. Pour la révélation de l'activité aldolase, le gel était découpé en tranches de 2 mm et chaque tranche était incubée dans le mélange habituel [13]. La localisation des activités dans l'électrophorégramme des protéines était faite par comparaison des distances de migration dans les deux moitiés du gel. Pour exploiter les résultats, des électrophorégrammes ont été enregistrés à partir des gels destinés à révéler les protéines ou les activités β -gal ou P- β -gal, à l'aide d'un lecteur de gels Isco (modèle UA 6, expansion 1 DO).

Reproductibilité des résultats

Afin de connaître les variations imputables aux conditions de réalisation des essais, plusieurs électrophorégrammes du même

fig. 1

Electrophorégrammes types des extraits bruts solubles des lactobacilles thermophiles.

extrait soluble ainsi que des électrophorégrammes d'extraits solubles provenant de broyages différents ou de cultures différentes, ont été réalisés. La teneur en protéines des extraits, mesurée par la méthode de Lowry *et al.* [19] était chaque fois ajustée à 1 mg/ml et 0,05 ml (soit 0,05 mg de protéines) déposé chaque fois sur les gels.

Influence des conditions de culture

L'obtention des cellules bactériennes dans le cas de ces essais a déjà été décrite par Hemme *et al.* [13].

RESULTATS

Comparaison des électrophorégrammes chez le genre *Lactobacillus*

Si l'on considère les pics majeurs des électrophorégrammes, on peut constater (fig. 1) que chacune des trois espèces de lactobacilles thermophiles présente un spectre caractéristique. Certains des pics paraissent communs aux trois espèces, malgré quelques différences dans la mobilité électrophorétique. Par contre, d'autres (hachurés ou noircis) sont caractéristiques de l'espèce. C'est le cas pour le pic n° 2, le doublet n°s 6 et 7 et le pic n° 20 pour *L. helveticus*; les pics 10 et surtout 15 pour *L. bulgaricus*; enfin le pic 6 et 14 pour *L. lactis*. Certains pics (p. ex. n°s 1, 3, 8 et 17) semblent présents chez les trois espèces bien que leur importance ne soit pas la même selon qu'il soit détecté chez l'une ou l'autre d'entre elles. Il y a lieu d'être prudent sur ces variations d'importance des pics, qui peuvent être plus importantes au sein d'une même espèce qu'entre espèces différentes.

fig. 2

Exemple d'électrophorégramme atypique de l'extrait brut soluble de *Lactobacillus lactis* CNRZ 238.

TABLEAU 2

Mobilités électrophorétiques relatives des protéines solubles chez *Streptococcus thermophilus*

Pics Souches									Référence									
	1	2	3	4	5	6	7	8	↓ 9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
385	0,28	0,32	0,37	0,44	0,52	0,56	0,68	0,88	1	1,1	1,15	1,24	1,35	1,43	1,48	1,56	1,70	1,8
445	0,32	0,37	0,42	0,48	0,55	0,60	0,74	0,94	1	1,1	1,17	1,24	1,39	1,47	1,50	1,64	1,72	1,85
7	0,31	0,35	0,39	0,46	0,53	0,59	0,72	0,90	1	1,1	1,14	1,21	1,39	1,45	1,5	1,64	1,77	1,85
160	0,31	0,35	0,40	0,46		0,60	0,74	0,94	1	1,1	1,17	1,24	1,43	1,46	1,49	1,67	1,79	1,88
302	0,28	0,35	0,40	0,46	0,56	0,60	0,73	0,92	1	1,1	1,15	(1,27)	1,40	(1,54)	(1,60)	1,68	1,76	(1,88)
21	0,32	0,37	0,42	0,48		0,61	0,74	0,94	1	1,08	1,13	1,18	1,39	1,42	1,46	1,61	1,75	1,85
307	0,25	0,31	0,36	0,42	0,52	0,56	0,68	0,86	1	1,1	1,14	1,21	1,36	1,39	1,43	1,58	1,67	1,8
368	0,28	0,35	0,39	0,47	0,56	0,59	0,72	0,92	1	1,1	1,18	1,23	1,42	1,48	1,54	1,66	1,75	1,89
391	0,30	0,34	0,38	0,46	0,54	0,59	0,7	0,92	1	1,1	1,14	1,22	1,42	1,46	1,54	1,66	1,80	1,88
308	0,32	0,35	0,39	0,46	0,53	0,59	0,72	0,92	1	1,08	1,16	1,22	1,40	(1,46)	(1,50)	1,65	1,78	1,86

Le pic n° 9 a été pris comme référence (migration = 1).

Les valeurs indiquées entre parenthèses correspondent à des pics peu nets sur les densitogrammes.

La figure 2 montre le cas de la souche *L. lactis* 238 qui apparaissait comme la seule souche atypique. Le pic 16, exacerbé chez cette souche est d'ailleurs caractéristique de l'espèce voisine *L. bulgaricus*. Aucune souche atypique n'a été trouvée chez *L. helveticus* et *L. bulgaricus*.

Comparaison des électrophorogrammes chez l'espèce *Streptococcus thermophilus*

Les dix souches de *S. thermophilus* étudiées possèdent toutes un pic caractéristique majeur (pic n° 9, fig. 3). Ce pic a été pris comme référence pour déterminer la mobilité électrophorétique relative des autres pics (tab. 2). On constate que les dix souches possèdent le plus souvent les dix-huit pics indiqués pour la souche 368 (fig. 3), la mobilité relative de chacun d'eux pouvant varier légèrement (tab. 2). Si on tient compte des pics majeurs, on peut distinguer quatre groupes dans l'espèce, selon le pic qui est deuxième en importance après le pic majeur n° 9. On a ainsi :

Groupes	Pic second	Souches
I	n° 7	445
II	n° 3	7 et 307
III	n° 2	308, 302 et 385
IV	n° 6	368, 160, 21 et 391

Notons que l'importance relative des différents pics, si elle est difficilement quantifiable, car elle dépend du degré de décoloration des gels, reste dans le même ordre néanmoins quel que soit le stade de décoloration.

Variations des électrophorogrammes selon les conditions de culture

Influence de la phase de croissance

Lorsque les souches de *S. thermophilus* se développent en milieu M 17 dont la source glucidique est le lactose et que la température est optimale, le pH baisse jusqu'aux environs de 5,1, malgré le pouvoir tampon du glycérophosphate que le milieu contient. On constate que le profil électrophorétique de l'extrait brut évolue selon le pH auquel les cellules sont prélevées. Cette évolution est nulle entre le pH d'inoculation, 6,8, et 5,8, devient sensible en dessous de cette valeur et va en s'accroissant jusqu'à pH 5,1. Les changements observés (fig. 4)

fig. 3

Electrophorégrammes des extraits bruts solubles
de *Streptococcus thermophilus*

Une souche type pour chacun des groupes est représentée :
groupe I : 445 ; groupe II : 7 ; groupe III : 308 ; groupe IV :
368. Les pics premiers et seconds en importance sont indi-
qués en noir.

fig. 4

a) Mobilités électrophorétiques de la β -galactosidase et de l'aldolase chez *Streptococcus thermophilus*

Ce profil s'applique aux dix souches CNRZ testées dans cette étude. Les bandes présentant une activité β -gal présentent aussi une activité P- β -gal.

b) et c) Variations des profils électrophorétiques pour les souches 302 et 385 selon le pH d'arrêt de la culture

Milieu M 17 à 10 g de lactose/l ; température d'incubation 42° C ; ensemencement 1 p. 100. — : pH 5,8 ; : pH 5,1.

Les mobilités électrophorétiques des enzymes (a) et des protéines solubles (b et c) peuvent être comparées (voir méthodes).

concernent seulement certains pics d'une part, comme les deux doublets de faible migration chez la souche 302, et diffèrent selon la souche d'autre part. On peut noter en particulier que la souche 302 montre plus de changements que la souche 385, notamment parmi les protéines migrant peu. La souche 21 (non représentée) a sensiblement le même comportement.

Influence de la température de croissance

Les électrophorogrammes varient selon la température de culture (fig. 5). Comme pour la phase de croissance, certaines protéines sont plus affectées que d'autres, et ce ne sont pas les mêmes chez la souche 302 et chez la souche 385. De plus, *S. thermophilus* 385, qui présente un caractère plus mésophile [1] semble plus affectée que la souche 302 à 48° C. La souche 302 possède en particulier une protéine qui est en quantité la plus faible à la température optimale de croissance de la souche (42° C), et qui augmente lorsque la température s'éloigne de l'optimum, vers les basses (30° C) ou les hautes (48° C) températures.

Influence de la source glucidique

La source énergétique habituelle de *S. thermophilus* est le lactose. Lorsque le glucose (5 g/l) remplace le lactose (10 g/l), on constate des modifications des profils électrophorétiques, avec notamment l'augmentation de plusieurs pics mais aucune diminution (non représenté). Le nombre de pics affectés est plus grand pour la souche 302 (5 pics) que pour la souche 385 (3 pics). Si la source énergétique est constituée de glucose (5 g/l) et de galactose (5 g/l), le profil pour la souche 302 est celui obtenu avec le lactose alors que pour la souche 385, le profil est plutôt celui obtenu avec le glucose seul.

Mobilités relatives de la β -galactosidase, de la phospho- β -galactosidase et de l'aldolase chez *Streptococcus thermophilus*

La β -galactosidase et la P- β -gal de *S. thermophilus* ont un poids moléculaire élevé (environ 380 000) (Hemme, données non publiées). De ce fait ces activités enzymatiques étaient détectées très près de la surface lorsque des gels à 7 p. 100 en acrylamide étaient utilisés. L'emploi de gels à 6 p. 100, identiques à ceux utilisés pour l'étude des variations selon les conditions de culture, a permis de localiser ces activités.

Chez toutes les souches de *S. thermophilus*, deux bandes d'activité sont révélées pour la β -gal, et elles possèdent les mêmes mobilités chez toutes les souches. De plus, l'activité P- β -gal est révélée rigoureusement aux mêmes distances (bandes I et II, fig. 4 a) que la β -gal ce qui tend à indiquer qu'il existe probablement deux isoenzymes toutes deux actives sur les substrats ONPG et ONPG-6 P utilisés pour la révélation des activités. La bande II, dont la migration vers l'anode à pH 8,5 est plus importante que celle de la bande I, est toujours

fig. 5

Variations des profils électrophorétiques de *Streptococcus thermophilus* 302 et 385 en fonction de la température d'incubation des cultures

Milieu M 17 à 10 g de lactose/l ; ensemencement 1 p. 100 ; arrêt des cultures à pH 5,2. — : 42° C ; --- : 45° C ; : 48° C ; — : 30° C.

plus intense que cette dernière. Elle correspond par ailleurs à un pic important chez la souche 385 à pH 5,8. La bande I correspond à la deuxième protéine du doublet de la souche 302, comme nous l'avons montré lors de la purification de la β -gal de cette même souche (Hemme, données non publiées).

L'aldolase a également été révélée. Elle a une mobilité beaucoup plus importante que la β -gal et correspond donc à une protéine de poids moléculaire plus faible et/ou une protéine plus acide (fig. 4 a). L'aldolase a une mobilité voisine chez les deux souches 302 et 385.

DISCUSSION

Les pics, ou bandes, obtenus lors des électrophorèses ne représentent que les protéines dont les concentrations sont les plus fortes. Un pic peut correspondre à plusieurs protéines et, pour être valables, les comparaisons doivent être faites entre des extraits solubles obtenus de bactéries cultivées et récoltées, broyées et analysées dans des conditions standard [voir 15 et 24]. Les profils différents obtenus pour les extraits de *S. thermophilus* pour des concentrations différentes d'acrylamide et un pH différent nous ont confirmé dans la nécessité de cette standardisation. Par contre, quel que soit le mode d'exploitation des électrophorégrammes (visuel ou densitogrammes), seuls les pics majeurs doivent être pris en considération [9], ceci d'autant plus que la méthode est utilisée comme méthode rapide d'identification [24]. Jarvis et Wolff [14] ont en effet exploité les densitogrammes en analysant le gel par option correspondant à un centième de la longueur totale du gel. Les résultats sont traités par analyse numérique. Or cette méthode ne tient pas compte des variations de décoloration possible et nécessite d'« ajuster » et de « normaliser » les enregistrements obtenus avant exploitation, en estimant que certaines protéines n'ont pas migré comme attendu ! L'utilisation des pics majeurs permet, comme le montre cette étude, de reconnaître les espèces et éventuellement les souches atypiques, ou bien encore de former des sous-groupes sur la base de la prépondérance de certains pics. Mais dans l'ensemble, l'espèce *S. thermophilus* apparaît relativement homogène, confirmant les données d'Ottogalli *et al.* [22] obtenues à partir d'hybridation de l'ADN. Nos résultats s'opposent à ceux utilisés par Jarvis et Wolff [14] qui, en utilisant les profils électrophorétiques de protéines solubles, trouvent des souches de *S. thermophilus* n'ayant entre elles que des coefficients de corrélation de 0,42, c'est-à-dire plus différentes entre elles que les diverses espèces de streptocoques mésophiles ! Mais, contrairement aux souches CN RZ utilisées dans notre étude qui sont bien connues, tant du point de vue phénotypique et morphologique [2] que par leurs propriétés technologiques, il semble qu'il en soit différemment pour les souches utilisées par les auteurs néo-zélandais.

La souche 385, qui acidifie le lait ou le milieu de culture plus que les autres souches de la collection CNRZ et n'est pas stimulée [11, 12] n'a pas pour autant un profil électrophorétique nettement différent. Parmi les hypothèses faites pour expliquer son fort pouvoir acidifiant par Hemme *et al.* [13], il semble donc qu'il faille retenir l'hypothèse d'une faculté de maintenir le pH intracellulaire à une valeur convenable et ceci pour des pH plus bas que les autres souches. On peut en effet supposer que si cette propriété de la souche correspondait à un métabolisme et donc à des enzymes différents, celles-ci auraient des propriétés électrophorétiques différentes.

Contrairement à ce qui a été décrit par Jarvis et Wolff [14] pour *S. lactis* ML3, nous avons observé des différences dans les profils lorsque la source glucidique variait. Cela semble indiquer que les variations observées au niveau du taux de croissance des cultures ne sont pas simplement le fait de la diminution d'activité d'une enzyme mais de changements plus importants. Ces modifications peuvent d'ailleurs effectivement diminuer l'activité des enzymes mais Hemme *et al.* [13] ont montré que dans certains cas, les cellules répondaient aux modifications en synthétisant des quantités d'enzymes plus importantes. Il n'est donc pas étonnant de détecter des pics de protéines plus importants qui correspondent vraisemblablement à certaines enzymes dont la production est exacerbée, notamment la β -gal, ou l'hexokinase [13].

A la différence de ce qui a été trouvé par London *et al.* [18] dans le cas des streptocoques mésophiles, les deux souches de *S. thermophilus* testées ne présentent qu'une seule activité aldolase. De plus la mobilité est voisine pour les deux souches. Ce comportement électrophorétique comparable pour l'aldolase des deux souches tendrait à montrer que cette enzyme est semblable chez 302 et chez 385. L'activité spécifique de la souche 385 pour l'aldolase étant toujours dix fois supérieure à celle de la souche 302, la souche 385 synthétiserait donc une quantité d'aldolase dix fois plus importante [2], et ceci quelles que soient les conditions de culture [13].

La détection de deux pics 1 et 2 ayant tous deux une activité β -gal et P- β -gal, et dont les mobilités sont les mêmes chez les dix souches de *S. thermophilus* testées, tend à confirmer l'existence d'enzymes responsables des deux activités, selon l'hypothèse proposée par Hemme *et al.* [13]. S'il s'agit de deux isoenzymes, leur poids moléculaire est voisin car on notait un seul pic d'élution β -gal/P- β -gal par filtration sur gel (Hemme, données non publiées). L'activité β -gal testée par ailleurs selon la méthode APIZYM sur cinquante-cinq souches de *S. thermophilus* a permis à Bouillanne et Desmazeaud [3] de détecter l'activité β -gal chez cinquante-trois souches. Pour celles-ci, une analyse factorielle de correspondance avait permis de rapprocher des souches qui se trouvent également proches par leurs profils électrophorétiques de protéines, telles les souches 7 et 307, ou bien 21 et 160. Pour ces auteurs, la souche 445 apparaissait également très

différente des autres souches. Les deux méthodes ne se recoupent pas néanmoins puisque certaines souches également trouvées différentes de la majorité par la méthode APIZYM, telles la souche 368 ou la souche 385, ne le sont pas par les spectres de protéines. On peut constater par ailleurs que les deux souches du groupe I de la présente étude (7 et 307) sont précisément les deux souches qui sont le plus aisément et le plus intensément stimulées par l'addition d'extraits de lactobacilles au lait dans lequel on les cultive, comme l'ont montré Hemme *et al.* [11]. Par contre, la souche 385, atypique par de nombreux caractères [1, 11, 12, 13] ne l'est pas si on considère le profil électrophorétique.

En conclusion, les données de cette étude complètent celles concernant l'équipement protéolytique de *S. thermophilus* [2, 6] et étaient celles plus récentes concernant le métabolisme glucidique [13]. Il reste néanmoins à établir des corrélations entre les ressemblances et dissemblances et le comportement général des souches ou des espèces, si on inclut les lactobacilles thermophiles. L'aldolase et l'effet de barrière au pH trouvés chez la souche 385 semblent aller dans ce sens.

Remerciements

Nous remercions J. P. Accolas et M. Desmazeaud pour leurs critiques et suggestions. Que le premier soit également remercié pour toute l'attention qu'il a portée à l'isolement et la connaissance de ces souches de bactéries lactiques thermophiles sans lesquelles cette étude n'aurait pas été possible.

Résumé

Trente souches représentatives de la collection du CNRZ et appartenant aux espèces de bactéries lactiques thermophiles *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *L. lactis* et *L. bulgaricus* ont été comparées par le profil électrophorétique des protéines solubles. Chaque espèce de lactobacille présente un profil caractéristique. Chez *S. thermophilus*, l'importance relative de certains pics majeurs permet de distinguer quatre groupes.

La mobilité électrophorétique des enzymes responsables de l'activité β -gal était la même pour toutes les souches de *S. thermophilus*. Les deux bandes détectées possédaient également une activité P- β -gal. Une seule activité aldolase a été trouvée, y compris chez la souche 385 qui possède pourtant une activité spécifique intracellulaire pour cette enzyme dix fois plus forte que chez les souches représentatives de l'espèce.

L'utilisation de l'électrophorèse des protéines et ses limites dans les études taxonomiques sont discutées. Des variations dans les profils selon les conditions de culture existent chez *S. thermophilus*, contrai-

rement à ce qui a été trouvé pour les streptocoques mésophiles. Les relations possibles de ces variations avec les changements observés dans le métabolisme glucidique de cette espèce sont discutés, ainsi que l'existence probable d'une enzyme possédant les deux activités β -gal et P- β -gal.

Summary

COMPARATIVE ELECTROPHORESIS OF PROTEINS, β -GALACTOSIDASE AND ALDOLASE OF *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* AND THERMOPHILIC LACTOBACILLI. VARIATIONS OF THE PROTEIN PATTERNS ACCORDING TO THE STRAINS AND THE CULTURE CONDITIONS

Thirty representative strains of the CNRZ collection belonging to the species of lactic acid bacteria *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *L. lactis* and *L. bulgaricus* were compared by their electrophoretic patterns of soluble proteins. Each lactobacilli species showed a typical profile. By *S. thermophilus* 4 groups could be distinguished according to the relative importance of the main bands.

The mobility of the enzymes responsible for β -gal activity was the same for all *S. thermophilus* strains. The two bands detected showed also a P- β -gal activity. Only one aldolase band appeared even for the strain 385 which is 10 times richer in this activity than the representative strains of the species.

The use of electrophoresis of soluble proteins and its limits for a taxonomic purpose are discussed. Variations in patterns for *S. thermophilus* with culture conditions were detected, unlike the mesophilic streptococci. Possible relationships with changes that occur in the sugar catabolism of this species are discussed and the probable existence of an enzyme whose activity is both β -gal and P- β -gal.

Zusammenfassung

Dreissig repräsentative Stämme aus der CNRZ-Sammlung, die den thermophilen Milchsäurebakterienarten *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *L. lactis* und *L. bulgaricus* angehören, wurden mit Hilfe des elektrophoretischen Profils der löslichen Eiweisse verglichen. Für jede Laktobazillenart gibt es ein artspezifisches Profil. Bei *S. thermophilus* können über die relative Bänderhöhe 4 Gruppen unterschieden werden. β -gal Aktivitäten wurden in zwei Bändern mit gleicher Mobilität bei allen Stämmen festgestellt. P- β -gal Aktivität weist die gleiche Migration auf wie die β -gal Aktivität. Es wurde eine einzige Aldolase-Aktivität gefunden, sogar bei dem Stamm 385, der eine 10 mal stärkere intrazelluläre Aktivität für

dieses Enzym aufweist im Vergleich zu den repräsentativen Stämmen von *S. thermophilus*.

Die Anwendung der Proteinelektrophorese und ihre Grenzen hinsichtlich der Taxonomie werden diskutiert. Entsprechend den Kulturbedingungen gibt es bei *S. thermophilus* Profilschwankungen im Gegensatz zu mesophilen Streptokokken. Die möglichen Zusammenhänge mit den beobachteten Veränderungen im Zuckermetabolismus dieser Art werden ebenso wie das mögliche Vorkommen eines Enzyms mit gleichzeitiger β -gal und P- β -gal Aktivität diskutiert.

Reçu pour publication en avril 1980.

Bibliographie

- [1] ACCOLAS (J. P.), BLOQUEL (R.), DIDIERNE (R.) et RÉGNIER (J.) (1977). — Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yoghourt. *Le Lait*, 57, 1-23.
- [2] ACCOLAS (J. P.), HEMME (D.), DESMAZEAUD (M.), BOUILLANNE (C.), VASSAL (L.) et VEAUX (M.) (1980). — Les levains thermophiles. Propriétés et comportement en technologie laitière. Une Revue. *Le Lait*, 60 (sous presse).
- [3] BOUILLANNE (C.) et DESMAZEAUD (M.) (1980). — Etude de quelques caractères de souches de *Streptococcus thermophilus* utilisées en fabrication de yoghourt et proposition d'une méthode de classement. *Le Lait*, 60 (sous presse).
- [4] CHRAMBACH (A.), REISFELD (R. A.), WYCKOFF (M.) and ZACCARI (J.) (1967). — A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 20, 150-154.
- [5] DAVIS (B. J.) (1964). — Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 404-427.
- [6] DESMAZEAUD (M. J.) et JUGE (M.) (1976). — Caractérisation de l'activité protéolytique et fractionnement des dipeptidases et des aminopeptidases de *Streptococcus thermophilus*. *Le Lait*, 56, 241-260.
- [7] EL-SHARKAWY (T. A.) and HUISINGH (D.) (1971). — Differentiation among *Xanthomonas* species by polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins. *J. Gen. Microbiol.*, 68, 155-165.
- [8] GARBER (E. D.) and RIPPON (J. W.) (1968). — Proteins and enzymes as taxonomic tools. *Advan. Appl. Microbiol.*, 10, 137-153.
- [9] HEMME (D.) (1974). — Taxonomie des lactobacilles homofermentaires du tube digestif du rat. Description de deux nouvelles espèces, *Lactobacillus intestinalis* et *Lactobacillus murini*. Thèse d'Etat, Paris.
- [10] HEMME (D.), RAIBAUD (P.), DUCLUZEAU (R.), GALPIN (J. V.), SICARD (Ph.) et VAN HELJENOORT (J.) (1980). — *Lactobacillus murinus* n. sp., une nouvelle espèce de la flore dominante autochtone du tube digestif du rat et de la souris. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 131 A, 297-308.
- [11] HEMME (D.), SCHMAL (V.) and AUCLAIR (J. E.) (1980). — Effect of the addition of extracts of thermophilic lactobacilli on acid production by *Streptococcus thermophilus* in milk. *J. Dairy Res.*, 47 (sous presse).
- [12] HEMME (D.), VASSAL (L.), FOYEN (H.) et AUCLAIR (J.) (1979). — Effet de l'addition de lactase au lait sur le développement des lactobacilles et des streptocoques thermophiles. *Le Lait*, 59, 597-614.

- [13] HEMME (D.), WAHL (D.) et NARDI (M.) (1980). — Variations de l'équipement enzymatique de *Streptococcus thermophilus*. *Le Lait*, 60, 111-129.
 - [14] JARVIS (A.W.) and WOLFF (J.M.) (1979). — Grouping of lactic streptococci by gel electrophoresis of soluble extracts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 391-398.
 - [15] KERSTERS (K.) and DE LEY (J.) (1975). — Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. *J. Gen. Microbiol.*, 87, 333-342.
 - [16] LAUER (E.), HELMING (Ch.) and KANDLER (O.) (1980). — Heterogeneity of the species *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Mocquot as revealed by biochemical characteristics and DNA-DNA hybridisation. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C*, 1, 150-168.
 - [17] LAUER (L.) and KANDLER (O.) (1980). — *Lactobacillus gasseri* sp. nov., a new species of the subgenus *Thermobacterium*. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C*, 1, 75-78.
 - [18] LONDON (J.) and KLINE (K.) (1973). — Aldolase of lactic acid bacteria: a case history in the use of an enzyme as an evolutionary marker. *Bacteriol. Rev.*, 37, 453-478.
 - [19] LOWRY (O.H.) ROSEBROUGH (N.J.), FARR (A.L.) and RANDALL (R.J.) (1951). — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
 - [20] MORICHI (T.), SHARPE (M.E.) and REITER (B.) (1968). — Esterases and other proteins of some lactic acid bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 53, 405-414.
 - [21] MOSES (V.) and WILD (D.G.) (1969). — Soluble protein profiles in *Escherichia coli*. *Folia Microbiol.*, 14, 305-309.
 - [22] OTTOGALLI (G.), GALLI (A.) and DELLAGLIO (F.) (1979). — Taxonomic relationships between *Streptococcus thermophilus* and other streptococci. *J. Dairy Res.*, 46, 127-131.
 - [23] ROBERTS (R.C.), ZAIS (D.P.), MARX (J.J.) and TREUHAFT (M.W.) (1977). — Comparative electrophoresis of proteins and proteases in thermophilic *Actinomycetes*. *J. Lab. Clin. Med.*, 90, 1076-1085.
 - [24] ROUATT (J.W.), SKYRING (G.W.), PURKAYASTHA (V.) and QUADLING (C.) (1970). Soil bacteria: numerical analysis of electrophoretic protein patterns developed in acrylamide gels. *Can. J. Microbiol.*, 16, 202-205.
 - [25] SEITER (J.A.) and JAY (J.M.) (1980). — Application of polyacrylamide gel electrophoresis to the characterization and identification of *Arthrobacter* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30, 460-465.
 - [26] TERZAGHI (B.) and SANDINE (W.E.) (1975). — Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, 27, 807-813.
-