

## Physiologie, métabolisme

# Analyse quantitative de la régulation de la glycolyse chez *Lactococcus lactis* : du gène à l'enzyme

Sergine EVEN, Lisa FONTAINE, Nic LINDLEY,  
Muriel COCAIGN-BOUSQUET\*

Centre de Bioingénierie Gilbert Durand, UMR 5504 INSA/CNRS et UMR 792 INSA/INRA,  
Institut National des Sciences Appliquées, 135 avenue de Rangueil,  
31077 Toulouse Cedex 4, France

**Abstract — Quantitative analysis of glycolysis regulation in *Lactococcus lactis*: from gene to enzyme.** Transcripts of the sequenced genes encoding enzymes of central metabolism of *Lactococcus lactis* have been quantified using slot blot technology. Methods of quantification and data analysis were optimised to obtain a quantitative approach with high sensitivity. Transcript and enzymatic activity profiles were compared with regard to the carbon source (glucose or galactose), on two different synthetic culture media.

*Lactococcus lactis* / transcript / enzyme

**Résumé —** Nous avons mesuré sur membranes (slot blot) les ARN messagers des gènes connus du métabolisme central de *Lactococcus lactis*. La méthode de mesure et d'analyse des données, optimisée pour rendre le dosage quantitatif, sera présentée ainsi que les performances du dosage. Les profils ARNm et activités enzymatiques seront comparés en fonction de la nature du substrat carboné (glucose et galactose) sur deux milieux de culture synthétiques de composition différente.

*Lactococcus lactis* / transcrit / enzyme

### 1. INTRODUCTION

L'étude du métabolisme central chez *Lactococcus lactis* est basée sur la quantification des enzymes et sur la modélisation in vivo des diverses régulations enzyma-

tiques dans des conditions environnementales définies et contrôlées. Elle permet de comprendre le point de fonctionnement des différentes enzymes et rend possible l'identification des étapes limitantes, qui sont des cibles potentielles pour une amélioration

\* Correspondance et tirés-à-part  
Tél. : (33) 5 61 55 94 38 ; fax : (33) 5 61 55 94 00 ; e-mail : cocaign@insa-tlse.fr

des performances du micro-organisme. Les flux métaboliques dépendent des concentrations d'enzymes et des mécanismes de contrôle présents dans la cellule (activateurs, inhibiteurs, concentrations de substrats...). Alors que ces derniers commencent à être compris chez *L. lactis*, la régulation des niveaux d'enzymes, qui peuvent varier significativement en fonction des conditions environnementales, demeure méconnue. Très peu de données sur la régulation de l'expression des gènes glycolytiques étant disponibles à l'heure actuelle, il devient nécessaire d'étendre nos investigations dans ce domaine. Nous avons dans cette optique, étudié l'influence de la nature du sucre (glucose ou galactose) sur l'expression des gènes du métabolisme central chez *L. lactis* IL 1403, sur deux milieux de culture différents (milieu synthétique MS10R et MCD [7]). Pour cela nous avons mesuré sur membrane (slot blot), les ARN messagers des gènes connus du métabolisme central de *L. lactis* : les gènes *pfk*, *pyk*, et *ldh* (constituant l'opéron *las* [11], les gènes *tpi* et *gap* [4, 5], *pfl* [2] et *adhE* [3] mais aussi *ccpA* [1] et l'ARN 16S [6]. La méthode de mesure et d'analyse des données optimisée pour rendre le dosage quantitatif sera présentée dans ce travail. D'autre part, les activités intracellulaires des enzymes codées par ces différents gènes, phosphofructokinase (PFK), pyruvate kinase (PK), lactate déhydrogénase (LDH), triose-phosphate isomérase (TPI), pyruvate formate lyase (PFL) et éthanol déhydrogénase (ADHE), seront mesurées. Ces activités spécifiques représentent les quantités d'enzyme synthétisées dans la cellule à condition que l'enzyme en question ne subisse pas de régulation post traductionnelle. Aussi les profils ARNm et quantités d'enzymes obtenus seront comparés. Une telle étude doit permettre d'évaluer le poids de la transcription dans la régulation des voies métaboliques et s'inscrit ainsi dans un projet d'analyse globale de la régulation de la glycolyse chez *L. lactis*.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1. Souche et conditions de culture

La souche utilisée pour cette étude, *Lactococcus lactis* IL 1403, a été cultivée sur les milieux MCD et MS10R (milieu MS10 complété par 1 mg·L<sup>-1</sup> de riboflavine) décrits dans les travaux de Coccagn-Bousquet et al. [7], avec glucose ou galactose comme source de carbone. Les cultures ont été réalisées en anaérobiose, dans des tubes bouchés par des bouchons butyle ou dans des fermenteurs de 2L (Setric génie Industriel, Toulouse, France), à une température de 30 °C, pH 6,6 et sous agitation constante à 300 rpm. Le pH dans le fermenteur est maintenu à 6,6 par ajout automatique de KOH (10 N). Les fermenteurs sont inoculés à partir de pré-cultures réalisées sur le même milieu, centrifugées et concentrées, de sorte à obtenir une DO<sub>580</sub> initiale de 0,1–0,2 dans le fermenteur.

Le suivi de la croissance est effectué par turbidimétrie (à 580 nm), une unité de DO correspondant à 0,3 g·L<sup>-1</sup> de cellules sèches.

### 2.2. Dosage des activités enzymatiques

#### 2.2.1. Préparation des extraits bruts

Les extraits bruts pour le dosage des activités enzymatiques sont préparés selon la méthode décrite par Garrigues et al. [10]. Les dosages d'activités sont réalisés immédiatement après le cassage des cellules et sont basés sur le couplage de l'activité enzymatique avec la consommation ou la production de NADH, celles-ci étant suivies par absorbance à 340 nm.

#### 2.2.2. Phosphofructokinase

La phosphofructokinase (PFK) est dosée selon la méthode décrite par Dominguez et al. [8] modifiée de la façon suivante : le milieu réactionnel contient du tampon triéthanolamine-HCl (100 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7,2), MgCl<sub>2</sub> (5 mmol·L<sup>-1</sup>), KCl (10 mmol·L<sup>-1</sup>),

NADH (0,3 mmol·L<sup>-1</sup>), ATP (5 mmol·L<sup>-1</sup>), fructose biphosphate aldolase (1 U), glycér phosphate deshydrogénase (2 U), triose-phosphate isomérase (5 U) et fructose-6-phosphate (20 mmol·L<sup>-1</sup>).

### 2.2.3. Triose-phosphate isomérase

L'activité triose-phosphate isomérase (TPI) a été mesurée avec une méthode issue de celle de Dominguez et al. [8]. Le milieu réactionnel est constitué de tampon triéthanolamine-HCl (125 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7,2), NADH (0,3 mmol·L<sup>-1</sup>), glycér phosphate deshydrogénase (1 U), et glycéraldehyde-3-phosphate (6 mmol·L<sup>-1</sup>).

### 2.2.4. Glycéraldehyde-3-phosphate deshydrogénase

La glycéraldehyde-3-phosphate deshydrogénase (GAPDH) est mesurée selon le protocole de Even et al. [9], sans l'étape de réactivation, non nécessaire pour la GAPDH de *L. lactis* IL1403.

### 2.2.5. Pyruvate kinase

L'activité pyruvate kinase (PK) a été déterminée selon une méthode optimisée, issue de celle de Thomas [16]. Le milieu réactionnel est constitué de tampon Tris-HCl (100 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7,2), MnSO<sub>4</sub> (5 mmol·L<sup>-1</sup>), KCl (10 mmol·L<sup>-1</sup>), NADH (0,3 mmol·L<sup>-1</sup>), LDH (10 U), phosphoenolpyruvate (6 mmol·L<sup>-1</sup>) et GDP (30 mmol·L<sup>-1</sup>).

### 2.2.6. Lactate deshydrogénase

La lactate deshydrogénase (LDH) est dosée selon la méthode optimisée par Garrigues et al. [10].

### 2.2.7. Ethanol deshydrogénase

L'éthanol deshydrogénase (ADHE) a été mesurée d'après la méthode de Vasconcelos et al. [17], modifiée comme suit : le milieu

de réaction contient du tampon phosphate (100 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 7,2), du DTT (2 mmol·L<sup>-1</sup>), du NADH (0,3 mmol·L<sup>-1</sup>) et de l'acétaldéhyde (20 mmol·L<sup>-1</sup>).

## 2.3. Dosage des transcrits

### 2.3.1. Prélèvement et extraction d'ARN total

Les cellules sont prélevées pendant la phase exponentielle de croissance : un volume correspondant à 6 mg de cellules (masse sèche) est centrifugé (4 °C, 5 min, 8 000 rpm), lavé dans 1 mL de tampon TE (Tris-HCl (10 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 8), EDTA (1 mmol·L<sup>-1</sup>)), repris dans 500 µL de tampon TE, congelé rapidement dans de l'azote liquide et stockées à -80 °C. Les ARN sont extraits selon la méthode décrite par Sambrook et al. [15]. Les cellules sont cassées aux billes sur un mini-beadbeater (Biospec Products, Bartlesville, USA) (trois cycles d'une minute intercalés de deux minutes de refroidissement). Après élimination des débris cellulaires (centrifugation : 4 °C, 30 min, 13 000 rpm), le surnageant est traité au phénol/chloroforme. L'ARN est précipité à l'éthanol, et repris dans du tampon TE pour être quantifié par une mesure de DO à 260 et 280 nm.

### 2.3.2. Choix des amorces

Les paires d'amorces sont choisies de sorte à obtenir des produits PCR de 500 pb correspondant à chaque gène d'intérêt. Chaque amorce contient 23 à 24 bases et est choisie pour avoir un T<sub>m</sub> proche de 72 °C (calculé par la relation 2 AT + 4 GC).

### 2.3.3. Amplification par PCR

Les réactions PCR sont réalisées dans un volume final de 100 µL contenant : 1 à 2 µg d'ADN génomique de *L. lactis* IL1403, 1 µmol·L<sup>-1</sup> de chaque amorce, 200 µmol·L<sup>-1</sup> de dNTPs, 1,5 mmol·L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub> et 1 U de Taq (Sigma). Les fragments sont amplifiés

pendant 45 cycles définis comme suit : 94 °C pendant 30 s, 56 °C pendant 30 s, 70 °C pendant 1 min, avec un cycle final à 70 °C pendant 10 min. Les produits PCR sont purifiés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2 %. La bande de taille attendue est découpée et purifiée avec le Kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany). La validité de la sonde est confirmée par digestion enzymatique.

#### 2.3.4. Préparation des membranes

Une quantité identique de chaque sonde (0,2 µg), reprise du tampon SSC 5× (volume final 250 µL), est dénaturée (95 °C pendant 5 min) avant d'être déposée sur une membrane de nylon chargée positivement (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France), à l'aide d'un appareillage de slot blot (Slot Blot Filtration Manifold, PR 6458, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA). L'ADN est fixé sur la membrane par exposition aux UV. Les membranes sont rincées dans de l'eau stérile avant de les laisser sécher à température ambiante et de les stocker à 4 °C.

#### 2.3.5. Marquage de l'ARN total

Une quantité constante d'ARN total de *L. lactis* IL1403 (2 ou 4 µg) est marquée à la digoxigénine selon les instructions du kit DIG-Chem-Link labeling set (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France) et stockée à -20 °C jusqu'à l'hybridation.

#### 2.3.6. Hybridation

Les membranes que l'on veut comparer sont traitées en parallèle et hybridées avec une concentration d'ARN constante. Les membranes sont pré-hybridées (5 h à 68 °C) dans des tubes contenant 20 mL de tampon d'hybridation (SSC 5×, agent bloquant 1 % (p/v) (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France) additionné de N-Lauroyl-sarcosine 0,02 % (p/v), NaCl 0,02 % (p/v), et SDS 0,02 % (p/v)). Le tampon de pré-hybridation est éliminé et remplacé par le

tampon d'hybridation contenant l'ARN marqué à la digoxigénine, celui-ci ayant été auparavant dénaturé (10 min à 95 °C). Après hybridation (15 h à 68 °C), les membranes sont lavées deux fois 5 min avec du tampon SSC 2×, SDS 0,1 %, à température ambiante, puis deux fois 15 min avec du tampon SSC 0,5× SDS 0,1 %, à 68 °C.

#### 2.3.7. Détection

Toutes les étapes sont réalisées à température ambiante sous agitation. Après un bref lavage (1 à 5 min) dans du tampon de lavage (tampon acide maléique (0,1 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7,5), NaCl (0,15 mol·L<sup>-1</sup>), Tween 20 0,3 % (v/v)), les membranes sont incubées pendant 30 min dans la solution de blocage (tampon acide maléique (0,1 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7,5), NaCl (0,15 mol·L<sup>-1</sup>) et agent bloquant 1 % (p/v)), puis 30 min dans la solution de blocage contenant l'anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline (75 mU·mL<sup>-1</sup>) (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France). Les membranes sont lavées à deux reprises (15 min dans du tampon de lavage), équilibrées pendant 5 min dans le tampon de la phosphatase alcaline (Tris-HCl (0,1 mol·L<sup>-1</sup>, pH 9,5), NaCl (0,1 mol·L<sup>-1</sup>) et placées dans une pochette en polypropylène. Après addition du substrat de la phosphatase alcaline, l'AttoPhos (Amersham Pharmacia biotech, Orsay, France), la membrane est scannée sur un fluorimager (STORM 860, Molecular Dynamics, Cambridge, USA), à une résolution de 100 microns. Les images sont stockées et analysées à l'aide du logiciel ImageQuant v.5.1.

### 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

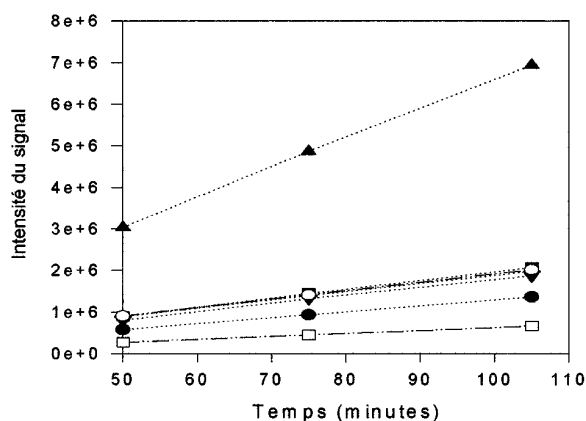
#### 3.1. Quantification de l'expression des gènes

##### 3.1.1. Analyse des données

L'intensité du signal de chaque spot est calculée par intégration du signal à

**Figure 1.** Quantification des transcrits : évolution de l'intensité du signal dans le temps après ajout d'AttoPhos. ● PFK, ■ TPI, ▲ GAP, ○ PK, ▼ LDH, □ PFL, ◆ ADH.

**Figure 1.** Transcript quantification: signal intensity increases with time after the addition of AttoPhos. ● PFK, ■ TPI, ▲ GAP, ○ PK, ▼ LDH, □ PFL, ◆ ADH.



l'intérieur d'un rectangle prédéfini (méthode des volumes du logiciel ImageQuant) après soustraction du bruit de fond (mode local median du même logiciel). Pour chaque spot, l'intensité du signal augmente linéairement dans le temps après l'addition de l'AttoPhos (Fig. 1), avec une vitesse représentant l'activité de la phosphatase alcaline (PA). Cette activité est directement proportionnelle à la quantité d'ARNm hybridé et reflète l'abondance d'un transcrit spécifique dans une population d'ARN. Elle pourra être comparée à une autre population en faisant le rapport des activités PA (abondance relative). Cette méthode de détection, du fait de l'amplification du signal avec le temps et de la bonne linéarité de la phosphatase alcaline, doit permettre la détection de faibles signaux.

### 3.1.2. Normalisation

La normalisation par rapport à un témoin interne et notamment par rapport à l'ARN 16S est fréquemment utilisée pour s'affranchir des erreurs de dépôt d'ARN total dans le cas des northerns [12]. Cependant, l'étude de la réponse obtenue pour l'ARN 16S a montré que la cinétique de la phosphatase alcaline n'était pas linéaire. En effet, en raison des très fortes quantités d'ARN 16S

hybridées, le signal tend vers un plateau après quelques minutes de cinétique. Le dosage de cet ARN n'est donc pas possible, ce qui exclut son utilisation comme témoin interne.

Bien que Luesink ait suggéré une expression constitutive de *ccpA* entre glucose et galactose [12], les niveaux d'expression de *ccpA* dans nos conditions de culture ont montré des variations significatives, invalidant l'utilisation de ce gène comme témoin interne. En effet sur MS10R galactose, la quantité de *ccpA* augmente d'un facteur 2,3 par rapport au glucose. On suppose que dans les travaux de Luesink, la nature du milieu de culture (M17) ou bien les conditions de culture (pH et environnement gaz non contrôlés) sont à l'origine des différences observées.

La normalisation par rapport à l'intensité totale des spots comme cela est couramment fait pour les puces ADN [13, 14] n'est pas envisageable dans notre cas puisque seuls quelques gènes sont quantifiés. Ainsi, aucune normalisation interne ne sera effectuée. Par contre, les membranes que l'on veut comparer sont traitées en parallèle, depuis l'extraction jusqu'à la détection (voir matériel et méthodes), afin d'éviter toute différence de rendement pour chacune des étapes, notamment lors du marquage.

### 3.1.3. Concentrations relatives d'ARNm

Le rapport des activités phosphatase alcaline pour une même sonde, dans 2 conditions différentes, permet de déterminer l'abondance relative d'un transcrite spécifique dans 2 populations d'ARN. Cependant on compare par ce calcul les proportions d'un ARN messenger par rapport à l'ARN total en fonction des conditions de culture (travail à ARN constant). Or, la concentration d'ARN total dans la cellule peut varier significativement en fonction des conditions de culture (0,05 à 0,10 g ARN·g cellule masse sèche<sup>-1</sup> sur galactose entre le milieu MS10R et MCD). Afin de tenir compte de ces variations et d'accéder aux concentrations relatives des transcrits dans les cellules, les rapports d'activités phosphatase alcaline sont corrigés par les rapports des concentrations en ARN total.

### 3.1.4. Reproductibilité

Afin d'évaluer la précision globale de cette technique, trois populations d'ARN, toutes issues de la phase exponentielle de croissance d'une même fermentation et donc se trouvant dans le même état physiologique, ont été analysées. Les activités phosphatase alcaline correspondant à chaque transcrite pour les trois prélèvements sont présentées dans le tableau I. Elles ont été corrigées par les concentrations relatives d'ARN total dans les cellules (g ARN·g cellule masse sèche<sup>-1</sup>), déterminées lors de l'extraction d'ARN. Les concentrations en ARN total dans les cellules en fonction du prélèvement ne varient pas beaucoup (5 % de variation) et sont le reflet de l'erreur commise sur les extractions d'ARN. L'écart-type, calculé sur les trois activités phosphatase alcaline correspondant à un même transcrite est en moyenne de 18 %. Ainsi les rapports de concentrations de transcrite seront jugés comme significatifs lorsqu'ils sont supérieurs à 1 plus deux écart-types (>1,4). La méthode utilisée dans cette étude permet

**Tableau I.** Activités phosphatase alcaline (min<sup>-1</sup>) correspondant aux concentrations cellulaires des transcrits pour 3 prélèvements d'ARN indépendants issus d'une même phase exponentielle de croissance de *L. lactis* IL 1403.

**Tableau I.** Phosphatase alcaline activities (min<sup>-1</sup>) corresponding to cellular transcript concentrations for three independent RNA preparations taken from the same exponential growth phase of *L. lactis* IL 1403.

Prélèvement	1	2	3
<i>pfk</i>	17 986	17 431	13 584
<i>tpi</i>	18 259	14 221	20 255
<i>gap</i>	84 016	51 534	67 289
<i>pyk</i>	22 156	21 082	19 180
<i>ldh</i>	28 473	21 227	18 393
<i>pfl</i>	10 990	8 075	6 790
<i>adhE</i>	18 510	15 098	18 757

donc d'interpréter de faibles variations d'expression, si l'on compare aux récentes études sur le transcriptome de *Escherichia coli* [13, 14] pour lesquelles seuls les ratios supérieurs à 2,5–5 sont interprétés. La précision de la méthode est un facteur déterminant pour l'étude de l'expression des gènes glycolytiques chez *L. lactis*, étant données les faibles variations de messenger attendues, si l'on en juge les faibles variations de concentrations d'enzymes (facteur 2–3 maximum) déterminées par Garrigues et al. [10].

### 3.1.5. Linéarité

Afin de vérifier la linéarité de la technique, nous avons réalisé plusieurs dilutions, dans une gamme de 1 à 10, de l'ARN total de *L. lactis* dans de l'ARN de transfert de levure (6 µg d'ARN au total). Pour chaque transcrite étudié, une relation de proportionnalité est observée entre les concentrations relatives des transcrits et les quantités d'ARN de *L. lactis* introduites. On note cependant une légère atténuation de la réponse (pente moyenne de l'évolution des



concentrations des transcrits en fonction de la dilution de 0,8). Ce phénomène avait aussi été observé [18] sur des filtres avec une détection des transcrits par radioactivité.

### 3.2. Étude de l'expression des gènes glycolytiques chez *L. lactis*

#### 3.2.1. Analyse cinétique

La souche *L. lactis* IL 1403 a été cultivée en fermenteur dans un environnement physico-chimique contrôlé sur deux milieux synthétiques : le milieu MCD et le milieu synthétique réduit, MS10 plus riboflavine (MS10R), optimisé par rapport aux besoins de la souche en sels, vitamines et bases azotées [7]. Deux sources de carbone ont été étudiées, à savoir le glucose et le galactose et les performances cinétiques du micro-organisme ont été comparées sur chacun des deux milieux de culture. Le milieu MCD permet une croissance rapide avec un taux de croissance de  $0,81 \text{ h}^{-1}$  sur glucose et  $0,28 \text{ h}^{-1}$  sur galactose tandis qu'une croissance plus lente est observée dans le milieu MS10R ( $0,51 \text{ h}^{-1}$  sur glucose et  $0,16 \text{ h}^{-1}$  sur galactose). Dans toutes les conditions testées, le métabolisme de la souche reste homolactique.

#### 3.2.2. Analyse des transcrits

Les messagers des gènes connus du métabolisme central de *L. lactis* (*pfk*, *pyk* et *ldh*, *tpi*, *gap*, *pfl* et *adhE*) ont été dosés à partir de cellules prélevées en phase exponentielle de croissance et sont répertoriées dans le tableau II. Lorsqu'on compare l'effet des sucres sur les deux milieux de culture, on voit qu'une augmentation significative de la quantité de transcrits est observée sur glucose pour les gènes *pfk*, *tpi*, *pyk* et *ldh* sur les deux milieux. Le niveau d'expression du gène *gap* est constant dans les diverses conditions testées sauf sur galactose dans le milieu MS10R où on mesure une augmentation de la quantité de transcrits. Il a été démontré que l'opéron *las* (*pfk*, *pyk* et

*ldh*) est régulé positivement par CcpA [12], ce qui est cohérent avec l'augmentation de transcrits observée sur glucose, le substrat de la répression catabolique. Par contre, les variations de transcrits *gap* entre glucose et galactose montrent que la régulation de l'expression des gènes glycolytiques n'est pas identique pour tous les gènes, suggérant l'absence d'un contrôle unique au niveau de l'expression des gènes glycolytiques. L'expression des gènes *pfl* et *adhE*,

**Tableau II.** Variations des quantités de transcrits en fonction de la nature du sucre (glucose ou galactose) chez *L. lactis* IL 1403 cultivé sur 2 milieux de culture différents (MS10R et MCD). Sur un même milieu et pour un transcrit donné, les valeurs sont normées par rapport à la plus faible valeur obtenue sur chacun des 2 sucres. Le signe + indique une expression plus forte sur glucose et le signe -, plus forte sur galactose. Les mesures de transcrits sont corrigées par rapport aux variations de concentration en ARN dans la cellule. Compte tenu de la précision d'un tel dosage (18 %), seules seront interprétées les variations dont l'amplitude est supérieure ou égale à 1,4.

**Tableau II.** Pattern of gene expression with regard to carbon source (glucose or galactose) in *Lactococcus lactis* IL1403 grown on 2 different culture media (MS10R and MCD). Data are compared for each transcript on one medium and are normalised with regard to the lowest value. Positive ratio corresponds to a higher expression on glucose and negative ratio to a higher expression on galactose. Ratios are corrected due to the variation of cellular RNA concentration. Since a standard deviation of 18% was observed, only ratio higher than 1.4 are considered to be significant.

	Milieu MS10R	Milieu MCD
<i>pfk</i>	+1,8	+1,7
<i>tpi</i>	+1,5	+2,3
<i>gap</i>	-1,5	-1,2
<i>pyk</i>	+2,4	+2,3
<i>ldh</i>	+1,8	+2,3
<i>pfl</i>	+1,0	-2,0
<i>adhE</i>	-2,7	-1,6
<i>ccpA</i>	-2,3	+1,5

les gènes du métabolisme mixte, augmente sur galactose sur milieu MCD tandis que seule l'augmentation de l'expression de *adhE* est visualisée sur MS10R.

### 3.2.3. Comparaison enzymes et transcrits

Les activités des enzymes codées par les gènes étudiés ont été dosées à partir de cellules prélevées en phase exponentielle de croissance (Tab. III). Leurs variations en fonction de la nature du sucre, sur chacun des deux milieux, ont été comparées aux variations des transcrits correspondant. Les

**Tableau III.** Variations des quantités d'enzymes (activités maximales) en fonction de la nature du sucre (glucose ou galactose) chez *L. lactis* IL 1403 cultivé sur 2 milieux de culture différents (MS10R et MCD). Sur un même milieu et pour une enzyme donnée, les valeurs sont normées par rapport à la plus faible valeur obtenue sur chacun des deux sucres. Le signe + indique une activité plus forte sur glucose et le signe -, plus forte sur galactose. Les activités enzymatiques sont des valeurs moyennes obtenues à partir de 4 ou 5 mesures indépendantes et seules seront considérées comme significatives les variations dont l'amplitude est supérieure ou égale à 1,2.

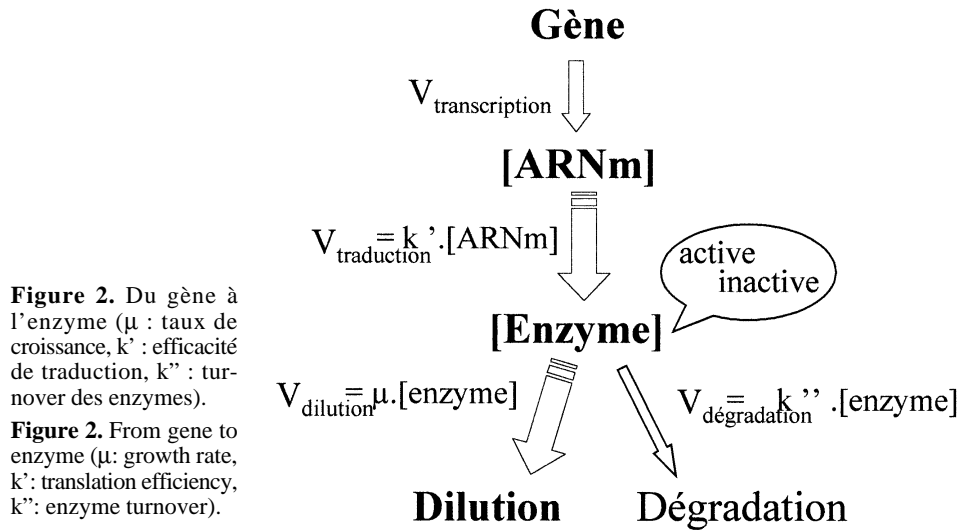
**Tableau III.** Enzymatic activity profiles with regard to carbon source (glucose or galactose) in *L. lactis* IL 1403 grown on 2 different culture media (MS10R and MCD). Data are normalised with regard to the lowest value. Positive ratio corresponds to a higher activity on glucose and negative ratio to a higher activity on galactose. Enzymatic activities are calculated from 4 or 5 independent measurements and ratios higher than 1.2 are considered to be significant.

	Milieu MS10R	Milieu MCD
PFK	+1,0	+1,3
TPI	+1,4	+1,4
GAPDH	-1,1	+1,0
PK	-1,1	+1,3
LDH	+1,0	+1,5
PFL	nd	-1,1
ADHE	-2,6	-1,9

quantités d'enzyme PFK, TPI, PK et LDH, augmentent significativement sur glucose sur milieu MCD mais avec une amplitude plus faible que les transcrits correspondants. Sur MS10R, l'augmentation de la quantité de transcrit sur glucose ne se répercute pas sur les niveaux d'enzymes qui restent similaires sur glucose ou galactose, sauf dans le cas de la TPI. Aucune variation d'activité GAP n'est observée entre glucose et galactose sur MS10R ou MCD. Ces variations d'enzymes sont cohérentes avec les variations de transcrits observées sur MCD mais pas sur MS10R. L'activité ADHE augmente sur galactose dans les deux milieux de culture. Cependant, alors que les variations des niveaux d'enzyme sont en général atténuées par rapport aux variations des messagers, on peut voir ici une augmentation similaire à celle des transcrits. Par contre, l'activité PFL est identique pour le glucose et le galactose sur le milieu MCD alors que la quantité de transcrit augmente significativement sur galactose. Y a-t-il une régulation de la traduction pour ce gène ou un contrôle post-traductionnel de l'enzyme ? Le fait de maintenir une activité PFL constante in vivo explique peut-être pourquoi le métabolisme reste homolactique sur galactose, alors qu'une déviation vers le métabolisme mixte est habituellement observée chez *L. lactis* [10]. Aucune activité PFL n'a pu être détectée sur le milieu MS10R, quelque soit le sucre utilisé, le niveau d'enzyme étant inférieur au seuil de sensibilité du dosage.

Des incohérences entre les variations d'enzymes et de messagers apparaissent clairement dans les résultats précédents montrant qu'il n'y a pas de corrélation systématique entre ces deux facteurs. On observe notamment des différences en fonction du milieu de culture. Ainsi, pour certains gènes (*pfk*, *pyk*, *ldh*), une variation similaire de transcrits se répercute au niveau des enzymes uniquement dans le cas du milieu MCD alors que l'on conserve des activités PFK, PK et LDH constantes sur MS10R. L'intensité de réponse au niveau des enzymes est aussi variable en fonction





du gène considéré. En effet, les variations d'enzymes sont en général atténuées par rapport aux variations de transcrits mais pas dans le cas de *adhE* et parfois, aucune variation d'enzyme n'est mesurée, malgré un changement significatif de la quantité de transcrit. Bien que la comparaison quantité d'enzyme et de transcrit soit souvent faite, ces deux paramètres ne doivent pas être comparés. En effet, seul un lien direct entre la quantité de transcrits et la vitesse de synthèse d'une enzyme peut exister selon l'hypothèse où la vitesse de traduction est proportionnelle à la quantité de messagers et donc au nombre de sites de fixation des ribosomes (RBS) présent (Fig. 2). La vitesse de synthèse d'une enzyme peut être assimilée à la vitesse de dilution de cette enzyme au cours de la croissance (Fig. 2), étant donné que la vitesse de dégradation des protéines est négligeable (faible turnover). Ainsi on peut voir que pour la PFK, la PK et la LDH, la vitesse de synthèse des enzymes ( $[\text{enz}] \cdot \mu$ ) est toujours supérieure sur glucose, ce qui est cohérent avec une augmentation de l'expression sur glucose même dans le cas où la répercussion sur les quantités d'enzymes n'est pas visualisée (MS10R). Par contre,

pour les enzymes plus abondantes sur galactose (PFL et ADHE), la vitesse de synthèse est aussi supérieure sur glucose, compte tenu de la croissance plus rapide sur ce substrat et ce, malgré une quantité de transcrit inférieure. Ceci semble montrer que les variations d'enzymes observées ne sont pas la simple résultante de modulations au niveau de la transcription mais que d'autres régulations interviennent, au niveau de la traduction ou de modifications post-traductionnelles. Par ailleurs, l'observation directe des variations de transcrits montre que les effets sucre sont directement dépendants du milieu. Notamment aucune variation d'expression n'est visualisée pour *pfl* sur MS10R alors que la quantité de transcrits double sur MCD galactose. Les gènes glycolytiques semblent ainsi soumis à des régulations croisées complexes et il est donc nécessaire de considérer un effet sucre dans un contexte donné et non dans l'absolu. Cette étude préliminaire doit maintenant être élargie à l'ensemble des gènes glycolytiques, ceci afin de mettre en évidence une logique globale de régulation de la glycolyse chez *L. lactis*.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé dans le cadre de l'AIP INRA (Programme prioritaire en microbiologie) et du programme CEE (BIO4-CT96-0498).

## RÉFÉRENCES

- [1] Aleksandrak T., Kowalczyk M., Bardowski J., Numéro d'accès sur Genbank: gi: 4028602, 1998.
- [2] Arnau J., Jørgensen F., Madsen S.M., Vrang A., Israelsen H., Cloning, expression and characterization of the *Lactococcus lactis* *pfl* gene, encoding pyruvate formate lyase, J. Bacteriol. 179 (1997) 5884–5891.
- [3] Arnau J., Jørgensen F., Madsen S.M., Vrang A., Israelsen H., Cloning of the *Lactococcus lactis* *adhE* gene, encoding multifunctional alcohol dehydrogenase, by complementation of a fermentative mutant of *Escherichia coli*, J. Bacteriol. 180 (1998) 3049–3055.
- [4] Cancilla M.R., Davidson B.E., Hillier A.J., Nguyen N.Y., Thompson J., The *Lactococcus lactis* triosephosphate isomerase gene, *tpi*, is monocistronic, Microbiology 141 (1995) 229–238.
- [5] Cancilla M.R., Hillier A.J., Davidson B.E., *Lactococcus lactis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, *gap*: further evidence for strongly biased codon usage in glycolytic pathway genes, Microbiology 141 (1995) 1027–1036.
- [6] Chiaruttini C., Milet M., Gene organization, primary structure and RNA processing analysis of a ribosomal RNA operon in *Lactococcus lactis*, J. Mol. Biol. 230 (1993) 57–76.
- [7] Coccagn-Bousquet M., Garrigues C., Novak L., Lindley N.D., Loubière P., Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*, J. Appl. Bacteriol. 79 (1995) 108–116.
- [8] Dominguez H., Rollin C., Guyonvarch A., Guerin-Kern J.-L., Coccagn-Bousquet M., Lindley N.D., Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose, Eur. J. Biochem. 254 (1998) 96–102.
- [9] Even S., Garrigues C., Loubière P., Lindley N.D., Coccagn-Bousquet M., Pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis* is dependent upon glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity, Metabolic Eng. 1 (1999) 198–205.
- [10] Garrigues C., Loubière P., Lindley N.D., Coccagn-Bousquet M., Control of the shift from homolactic to mixed acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio, J. Bacteriol. 179 (1997) 5282–5287.
- [11] Llanos R.M., Harris C.J., Hillier A.J., Davidson B.E., Identification of a novel operon in *Lactococcus lactis* encoding three enzymes for lactic acid synthesis: phosphofructokinase, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase, J. Bacteriol. 175 (1993) 2541–2551.
- [12] Luesink E.J., van Herpen R.E., Grossiord B.P., Kuipers O.P., de Vos W.M., Transcriptional activation of the glycolytic *las* operon and catabolite repression of the *gal* operon in *Lactococcus lactis* are mediated by the catabolite control protein CcpA, Mol. Microbiol. 30 (1998) 789–798.
- [13] Richmond C.S., Glasner J.D., Mau R., Jin H., Blattner F.R., Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12, Nucleic Acids Res. 27 (1999) 3821–3835.
- [14] Tao H., Bausch C., Richmond C., Blattner F.R., Conway J., Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media, J. Bacteriol. 181 (1999) 6425–6440.
- [15] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989.
- [16] Thomas T.D., Activator specificity of pyruvate kinase from lactic *Streptococci*, J. Bacteriol. 125 (1976) 1240–1242.
- [17] Vasconcelos I., Girbal L., Soucaille P., Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol, J. Bacteriol. 176 (1994) 1443–1450.
- [18] Zhao N., Hashida H., Takahashi N., Misumi Y., Sakaki Y., High density cDNA filter analysis: a novel approach for large-scale, quantitative analysis of gene expression, Gene 156 (1995) 207–213.