

Physiologie, métabolisme

Catabolisme de l'arginine par *Oenococcus oeni* : aspects énergétiques et génétiques

Thierry TONON, Jean-Paul BOURDINEAUD, Aline LONVAUD-FUNEL*

Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie Appliquée, Faculté d'Œnologie,
Unité associée INRA, Université Victor Ségalen-Bordeaux 2,
351 cours de la Libération, 33405 Talence Cedex, France

Abstract — Arginine catabolism by *Oenococcus oeni*: energetic and genetic aspects. Most of the *Oenococcus oeni* strains are able to breakdown arginine, one of the main amino acid in wine, through the arginine deiminase pathway (ADI pathway). Citrulline is excreted and then reacts with ethanol to produce ethyl carbamate (or urethane). The carcinogenic effects on laboratory animals have been demonstrated for this compound when administrated at high concentrations. Thus, its level in wine might be monitored and regulated. Comparison between strains able or not to hydrolyse arginine has shown that degradation of this amino acid produces ATP. This energy can be used by growing cells and by “viable but non-culturable” cells that retrieve a growing state. Cloning of ADI pathway genes led to isolating the *arcABC* cluster. Upstream *arcA*, an open reading frame called *orf229* encodes for a protein called ORF229p which shares common features with proteins involved in transcription activation. Moreover, a motif which matches the CRP binding domain was found in the promoter region of *arcA*. RT-PCR experiments on the *arc* cluster regulation showed that arginine stimulates transcription of the 4 genes. From sequence data, primers were chosen and applied in a PCR test, but failed to discriminate strains able or not to catabolise arginine.

Oenococcus oeni / arginine / arginine deiminase pathway / starved cell / *arc* cluster

Résumé — La majorité des souches d'*Oenococcus oeni* sont capables de dégrader l'arginine, un des acides aminés majoritaires dans le vin, par la voie de l'arginine déiminase (voie ADI). Ce catabolisme conduit notamment à la libération de citrulline, qui réagit avec l'éthanol pour former du carbamate d'éthyle (ou uréthane). Ce composé, à fortes doses, présente des effets cancérigènes mis en évidence sur des animaux de laboratoire. Sa teneur pourrait donc être réglementée. La comparaison de souches positive et négative vis-à-vis de ce caractère a montré que l'utilisation de l'arginine entraîne la production d'ATP. Cette énergie est consommée par des cellules en croissance et par des cellules viables mais non cultivables. Le clonage des gènes codant pour les enzymes de la voie ADI a permis l'isolement du cluster *arcABC*. En amont d'*arcA*, un cadre ouvert de lecture nommé *orf229* a été repéré.

* Correspondance et tirés-à-part
Tél. : (33) 5 56 84 64 66 ; fax : (33) 5 56 84 64 68 ; e-mail : Aline.Lonvaud@oenologie.u-bordeaux2.fr

La séquence en acides aminés déduite (ORF229p) présente des homologies de séquence et un lien phylogénétique avec des facteurs liés à l'activation de la transcription. De plus, un site similaire à celui spécifique impliqué dans la fixation des facteurs de type CRP a été identifié dans la région promotrice du gène *arcA*. Des expériences de RT-PCR ont montré que l'arginine stimulait la transcription des trois gènes *arc* et de l'*orf229*. Les données génétiques ont ensuite été appliquées, mais n'ont pas abouti, pour tenter de différencier par PCR les souches capables et celles incapables d'hydrolyser l'arginine.

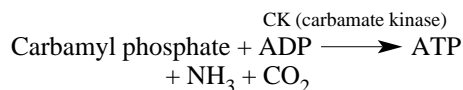
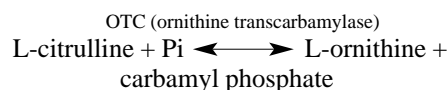
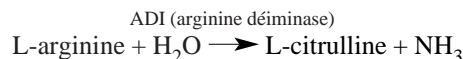
Enococcus œni* / arginine / voie de l'arginine déiminase / cellule carencée / cluster *arc

1. INTRODUCTION

L'élaboration de la plupart des vins rouges et de certains vins blancs de garde fait intervenir deux étapes de fermentation. La première, la fermentation alcoolique, est réalisée par la levure *Saccharomyces cerevisiae* et correspond à la transformation des sucres en alcool. La seconde, la fermentation malolactique, dépend des bactéries lactiques, principalement *Enococcus œni*, qui assurent la dégradation de l'acide malique en acide lactique. Cette réaction contribue à la complexité aromatique et apporte une certaine stabilité microbienne au produit fini, mais peut aussi être le siège de métabolismes indésirables qui affectent aussi bien les qualités organoleptiques que les propriétés toxicologiques et hygiéniques des vins [6, 18]. Les agents de cette fermentation peuvent ainsi produire de la citrulline, qui réagit avec l'éthanol pour former du carbamate d'éthyle (ou uréthane). Il a été démontré que ce composé, présent naturellement dans les produits et les boissons fermentés [1, 25, 26], pouvait, à fortes doses, présenter des effets cancérigènes sur des animaux de laboratoire [23]. Il est donc possible d'envisager à plus ou moins long terme l'instauration d'une législation internationale quant à la teneur en carbamate d'éthyle dans les vins.

La citrulline est un intermédiaire du catabolisme de l'arginine par les bactéries lactiques du vin. Cette dégradation se produit

via la voie de l'arginine déiminase (voie ADI) qui fait intervenir trois enzymes :



Récemment, il a été montré que la citrulline pouvait être stockée pendant la croissance des cellules *E. œni*, puis libérée au cours de leur lyse pendant la conservation du vin [22]. Les aspects physiologiques et enzymatiques de ce métabolisme ont déjà été abordés chez les bactéries lactiques du vin [16]. Il a été notamment mis en évidence le rôle positif de la dégradation de cet acide aminé lors de la croissance d'*E. œni*. Cette propriété de la voie ADI est retrouvée chez de nombreuses espèces bactériennes [5], pour lesquelles cet acide aminé peut aussi constituer une source de carbone dans des conditions de croissance bien définies. Toute l'énergie produite par phosphorylation au niveau du substrat est conservée car l'entrée d'arginine dans la cellule ne nécessite pas d'énergie métabolique. Ce transport se fait par un mécanisme d'antiport arginine-ornithine [14, 27], grâce aux différences de concentrations de ces deux acides aminés de part et d'autre de la membrane.

En conditions de carences nutritionnelles et/ou de stress environnementaux, il a été montré que de nombreux micro-organismes pouvaient modifier leur comportement, c'est-à-dire conserver une partie de leur métabolisme actif, mais perdaient leur capacité à former des colonies sur milieu solide [24]. Ces cellules, qui représentent une forme d'adaptation et de résistance vis-à-vis de conditions écologiques particulières, sont dites viables mais non cultivables (cellules VNC). Ainsi, des bactéries lactiques du lait, carencées en lactose, continuent à utiliser l'arginine [15, 28]. Dans le vin, il a été observé que des cellules VNC d'*Æ. œni* conservent la possibilité de libérer de l'histamine par décarboxylation de l'histidine [3]. Des cellules de cette espèce, ayant épuisé les sources énergétiques d'un milieu de culture, pourraient produire de l'ATP à partir de l'arginine et utiliser cette énergie pour croître.

L'étude des structures moléculaires déterminant ce métabolisme n'a jamais été menée de façon approfondie chez les bactéries lactiques du vin, mais chez plusieurs autres micro-organismes. Concernant les bactéries lactiques, l'opéron ADI est seulement connu pour *Lactobacillus sakei* [29]. Les quatre gènes de l'opéron *arc* sont nommés *arcA*, *arcB*, *arcC* et *arcD* et codent respectivement pour l'ADI, l'OTC, la CK et la protéine responsable de l'antiport arginine-ornithine. Le clonage de ces gènes a été entrepris pour la bactérie *Æ. œni*. Les trois loci *arcA*, *arcB* et *arcC* ont été isolés. Le gène *arcD* n'a pas pu être repéré, mais un autre gène, nommé *orf229* et présentant des similitudes avec des activateurs de la transcription de la famille FNR-FLP-CRP, a été identifié en amont d'*arcA*. Les données acquises ont été considérées pour étudier l'effet de l'arginine sur la transcription des gènes du cluster *arc*. De plus, la possibilité de discriminer rapidement au niveau génétique les souches capables et incapables de dégrader l'arginine a été testée.

2. ÉTUDE DE LA CAPACITÉ DES SOUCHES D'*Æ. œni* DE LA COLLECTION DE LA FACULTÉ D'ŒNOLOGIE DE BORDEAUX À DÉGRADER L'ARGININE

Pour aborder cette étude, un criblage de souches d'*Æ. œni* isolées de vins rouges a été mis en œuvre. Ce test a été effectué dans un milieu MRS pH 4,5 contenant 11 mmol·L⁻¹ de glucose et 29 mmol·L⁻¹ d'arginine. Après ensemencement, les tubes sont incubés 10 j à 25 °C, puis les produits de la voie ADI ont été dosés (Tab. I). Sur les 17 souches testées, 13 sont capables d'hydrolyser l'arginine et seront notées arg(+) (par opposition aux souches arg(-)). L'aptitude à dégrader l'arginine dépend donc de la souche. Cette particularité phénotypique a déjà été mise en évidence par d'autres auteurs [12, 17]. De même, on observe des différences de valeurs de pH du milieu en fin de culture, liées aux quantités d'ammoniac libérées par ce catabolisme. On peut aussi noter que les quantités d'arginine dégradées dépassent dans deux cas (pour les souches ATCC 23277 et ICEB 9204) la concentration initiale. En effet, le dosage de l'arginine initial est de 40 mmol·L⁻¹, correspondant aux 29 mmol·L⁻¹ ajoutés et à l'arginine intrinsèque au milieu (extraits de levure, extrait de viande, bactopectone).

3. ASPECT ÉNERGÉTIQUE

3.1. Mise en évidence de la production d'ATP

Cette détermination a été effectuée par bioluminescence, technique utilisée jusqu'à présent au laboratoire pour le dénombrement de micro-organismes [19]. Parmi les souches testées précédemment, ICEB 8406 arg(+) et ICEB 8413 arg(-) ont été considérées pour mener à bien cette expérience. Après croissance, les cellules ont été incubées dans du tampon NaCl 7 g·L⁻¹ jusqu'à

Tableau I. Capacité des souches d'*Æ. æni* de la Collection de la Faculté d'Œnologie de Bordeaux à dégrader l'arginine.**Table I.** Ability of the *Æ. æni* strains of the Collection of the Faculty of Oenology of Bordeaux to degrade arginine.

Souches	Arginine consommée (mmol·L ⁻¹)	pH après culture	Citrulline libérée (mmol·L ⁻¹)	Ornithine produite (mmol·L ⁻¹)	Ammoniac produit (mmol·L ⁻¹)
ATCC ^a 23279	5,3	4,6	0,2	3,8	7,7
ATCC 23277	34,5	6,6	1	25,5	56,9
ICEB ^b 8403	11	5	0,3	7,8	22,7
ICEB 8406	16,5	5,2	1,2	13,3	27,5
ICEB 8417	15	5,1	0,6	11,5	28,3
ICEB 8419	25,5	6,8	0,8	16,8	33
ICEB 9204	30	6,4	1	18,1	40,7
ICEB 9523	12	4,9	0,7	9,3	23
ICEB 9628	15	5,3	0,4	10,2	27,4
HB108	10,5	4,9	0,2	7	18,8
SC254	24	6,5	1	18,2	41,1
89111	17,5	5,9	0,6	12,9	34,6
89127	13	5	0,8	12,1	26
NCDO ^c 1823	0	4,4	<0,1 ^d	<0,1	0,5
ICEB 8413	0	4,4	<0,1	<0,1	0,1
ICEB 8908	0	4,3	<0,1	<0,1	0
ICEB 9614	0	4,2	<0,1	<0,1	0

^a ATCC : American Type Culture Collection.

^b ICEB : Institut d'Œnologie de Bordeaux.

^c NCDO : National Center of Dairy Organism.

^d La concentration déterminée est inférieure à 0,1 mmol·L⁻¹.

Le pH initial du milieu de culture est 4,5. Les concentrations d'arginine et de citrulline ont été déterminées par colorimétrie, selon des protocoles déjà établis [17]. L'ornithine a été transformée en citrulline pour pouvoir être dosée. La quantité d'ammoniac libérée a été mesurée grâce au kit Roche approprié.

^a ATCC : American Type Culture Collection.

^b ICEB : Institut d'Œnologie of Bordeaux.

^c NCDO : National Center of Dairy Organism.

^d The concentration determined was below 0.1 mmol·L⁻¹.

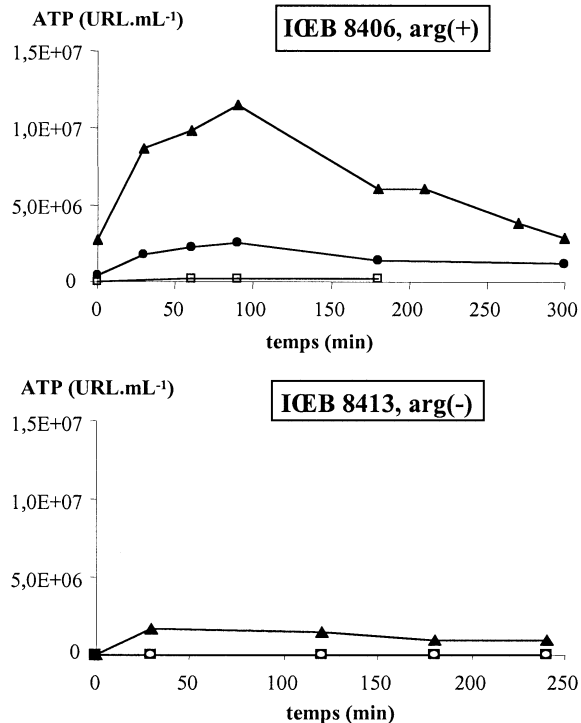
Initial pH was 4.5. Arginine and citrulline concentrations were determined by colorimetry, according to published methods [17]. Ornithine was transformed in citrulline before determination. Ammonia was measured by the appropriate Roche kit.

observer une diminution significative du contenu intracellulaire d'ATP. Puis les cellules ont été incubées en présence d'acide malique (1 g·L⁻¹) ou d'arginine (1 g·L⁻¹), en tampon phosphate pH 4,5. Une troisième suspension cellulaire, sans substrat, a aussi été préparée. Les dosages ont été effectués à différents temps d'incubation (Fig. 1).

Pour les deux souches, une production significative d'ATP est mesurée dans la fraction contenant l'acide malique, comme cela était prévisible [4]. La différence de production d'ATP entre ces deux souches peut s'expliquer par des variations au niveau de la capacité à transporter et utiliser l'acide malique. Pour la souche ICEB 8406, on

Figure 1. Mesure de la production d'ATP par des cellules carencées d'*Æ. æni*. Les cellules ont été incubées en absence de substrat (□), et en présence d'acide malique (▲) ou d'arginine (●). Les résultats sont exprimés en unité relative de lumière (URL.mL⁻¹). La souche ICEB 8413 est arg(-) et la souche ICEB 8406 est arg(+).

Figure 1. ATP production from starved cells of *Æ. æni*. Incubation was performed without substrate (□), and in presence of malic acid (▲) or arginine (●). Results are expressed in relative light unit (URL.mL⁻¹). Strain ICEB 8413 is arg(-) and strain ICEB 8406 is arg(+).



observe aussi une libération d'ATP en présence d'arginine, mais en quantité plus faible que lorsque les cellules ont été incubées en présence d'acide malique. Puis, pour les deux souches, les concentrations d'ATP diminuent au cours du temps. Il est soit dégradé, soit utilisé par les cellules, sans qu'il y ait croissance car les conditions expérimentales ne le permettent pas.

3.2. Rôle positif de l'arginine au cours de la croissance cellulaire

Afin de voir si l'énergie produite lors de la dégradation de l'arginine peut être couplée à la croissance bactérienne, du MRS à 11 mmol.L⁻¹ glucose supplémenté ou non avec l'acide aminé (29 mmol.L⁻¹) a été ensemencé avec la souche ICEB 8406. Au cours de l'incubation (Fig. 2), on constate que l'hexose est utilisé de façon presque

similaire dans les deux conditions de culture. Dans le milieu le plus riche, 60 % de l'arginine sont utilisés pendant la durée de l'expérience, mais pas de façon linéaire. En effet, si on calcule sa vitesse de dégradation, on constate que celle-ci s'accélère entre le 8^e et le 10^e jour, avant de ralentir pour revenir à sa valeur initiale après le 17^e jour de culture. Il semble donc qu'il y ait un décalage entre le catabolisme du sucre et celui de l'acide aminé, même si une faible quantité d'arginine est dégradée parallèlement au glucose en début de culture. Quoi qu'il en soit, cela suffit pour accélérer la croissance d'*Æ. æni*. Ceci est illustré lorsqu'on calcule le taux de croissance μ dans la partie linéaire des deux courbes de croissance. Les valeurs ($\times 1\,000$) sont respectivement de 6,6 h⁻¹ en absence d'arginine et de 9,4 h⁻¹ en présence d'arginine. La densité optique mesurée en fin de culture est plus élevée dans le milieu additionné d'arginine.

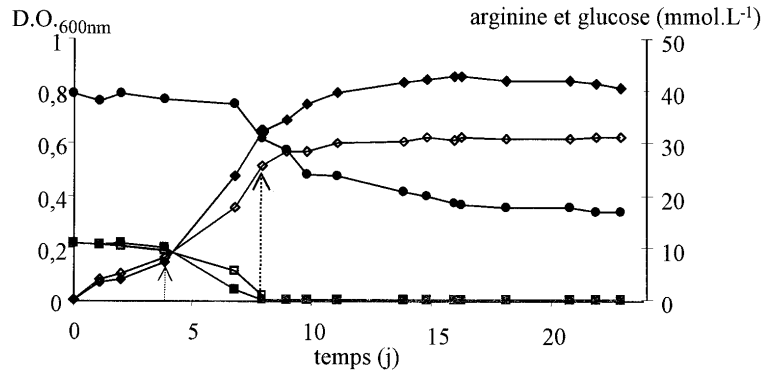


Figure 2. Comparaison de la croissance de la souche ICÉB 8406 en MRS à 11 mmol·L⁻¹ glucose en absence et en présence d'arginine (concentration finale de 29 mmol·L⁻¹). Évolution de la croissance (OD_{600nm} , ◆), des concentrations en arginine (●) et glucose (■) dans le milieu enrichi en arginine et dans le milieu sans arginine (mêmes symboles vides). Le taux de croissance μ a été calculé (moyenne de 4 expériences) pour les deux conditions dans l'intervalle de temps défini par les deux flèches.

Figure 2. Comparison of ICÉB 8406 strain growth in 11 mmol·L⁻¹ glucose MRS medium with and without 29 mmol·L⁻¹ arginine added. Evolution of OD_{600nm} (◆), arginine (●) and glucose (■) concentration were determined in the medium supplemented with arginine and in the medium not supplemented (corresponding open symbols). Growth yield μ was calculated (mean of 4 experiments) for both conditions during incubation time indicated by dot arrows.

Les mêmes constatations ont été réalisées pour des cultures dans du MRS contenant davantage de glucose (28 mmol·L⁻¹) et additionné ou non d'arginine (29 mmol·L⁻¹).

3.3. Influence de l'addition d'arginine à des cellules VNC

L'incidence du catabolisme de l'arginine est étudiée pour des cellules dont l'état physiologique est tel que leur métabolisme est encore actif (hydrolyse du chromophore fluorescent Fluorassure®, Chemunex, Evry, France), mais ne leur permet pas de former des colonies sur milieu solide. Dans ce but, du MRS appauvri en glucose (5,5 mmol·L⁻¹) a étéensemencé avec la souche ICÉB 8406 et la culture incubée 16 j. Le dosage journalier du glucose montre son épuisement au bout de 7 j. La population viable est estimée par la technique d'épifluorescence directe (DEFT), adaptée aux bactéries

lactiques du vin [21]. Puis l'arginine a été rajoutée à une concentration finale de 1 g·L⁻¹ dans le milieu épuisé en substrats fermentescibles. Dès que l'acide aminé commence à être utilisé, on observe une augmentation de la population bactérienne estimée par les deux techniques de dénombrement, épifluorescence et comptage de colonies (Fig. 3). Ceci signifie que son apport permet d'initier une nouvelle phase de croissance pour ces cellules carencées. Cependant, ce renouveau n'est que temporaire car 12 jours après l'ajout d'arginine, la population viable décroît pour revenir au niveau atteint avant de modifier les conditions de culture. À la fin de cette expérience, l'arginine n'a pas été complètement dégradée, il reste environ 50 % de la quantité initiale. Une des hypothèses avancées pour expliquer ce phénomène est que les protéines impliquées dans l'entrée et l'utilisation de l'acide aminé sont inactives, à la suite de l'épuisement de

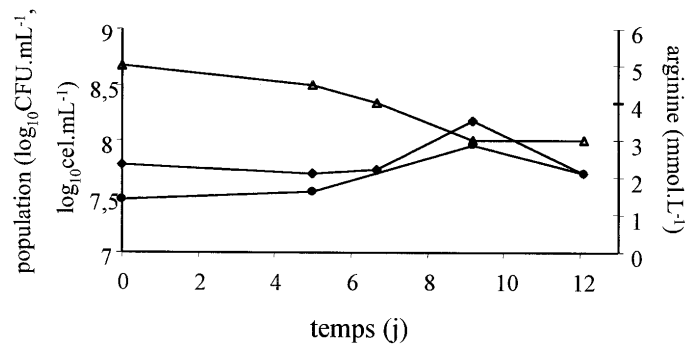


Figure 3. Suivi d'une population de cellules carencées de la souche *Æ. æni* ICB 8406 après addition d'arginine à 5,5 mmol.L⁻¹ final. La culture a été incubée 16 j avant addition d'arginine, pour épuiser le milieu en sources de carbone fermentescibles. La population a été estimée par épifluorescence directe (cel.mL⁻¹, ◆) et par dénombrement sur boîte (CFU.mL⁻¹, ■). L'utilisation de l'arginine a aussi été suivie (▲).

Figure 3. Evolution of starved cells of *Æ. æni* ICB 8406 after addition of arginine at 5.5 mmol.L⁻¹ final concentration. The culture was incubated 16 d before arginine addition in order to deplete the medium of carbon sources. Bacterial population was estimated by DEFT (cel.mL⁻¹, ◆) and by colony count (CFU.mL⁻¹, ■). Arginine breakdown was monitored (▲).

facteurs nécessaires à leur activité et/ou à des conditions environnementales peu propices à leur activité.

4. ASPECT GÉNÉTIQUE

4.1. Clonage des gènes du cluster *arc* d'*Æ. æni*

La comparaison de séquences d'OTC et de CK présentes dans les banques de données a permis de déterminer des couples d'amorces utilisables en PCR pour chacun des deux gènes correspondants. À partir de ces amorces de séquence redondante, des sondes ont été obtenues et utilisées pour hybrider de l'ADN génomique de la souche ATCC 23279 (souche capable de dégrader l'arginine et de libérer de l'ornithine, Tab. I), digéré par différentes enzymes de restriction. Deux fragments chevauchants permettent d'obtenir une séquence contenant plusieurs cadres ouverts de lecture, dont les gènes *arcA*, *arcB* et *arcC* recherchés (Fig. 4). Les séquences en acides aminés déduites

ont été comparées à celles préalablement isolées chez d'autres organismes. Elles sont très similaires à celles de *Lb. sakei*, ce qui n'est pas surprenant puisqu'il s'agit de deux bactéries lactiques. Plus généralement, les valeurs obtenues sont plus fortes avec les enzymes de bactéries à Gram (+) qu'avec celles de bactéries à Gram(-). En effet, les valeurs des pourcentages d'identité dépassent les 50 % si on compare les séquences des enzymes d'*Æ. æni* avec celles des enzymes des autres bactéries à Gram(+). Cependant, concernant la CK, ces pourcentages restent élevés quel que soit l'organisme considéré, aussi bien pour l'archaeobactérie *Halobacterium salinarium* que pour le parasite *Giardia intestinalis* (valeurs supérieures à 35 %). Ceci pourrait signifier que la séquence de cette enzyme a subi moins de modifications que celle de l'ADI et de l'OTC au cours de l'évolution.

Concernant les cadres ouverts de lecture en amont du gène *arcA*, aucune homologie n'a pu être mise en évidence pour l'*orf119* avec les séquences présentes dans les

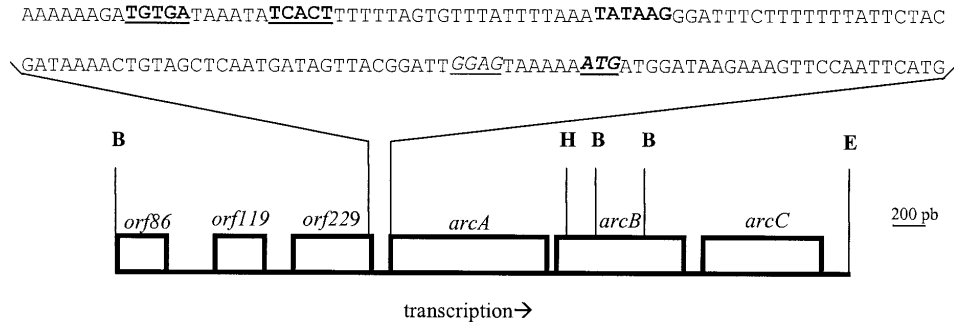


Figure 4. Organisation des gènes *arc* d'*E. coli*. Le sens de transcription de ces gènes est indiqué par la flèche. La séquence intergénique entre *arcA* et l'*orf229* est aussi représentée. Les lettres en gras, en italique et soulignées indiquent le site potentiel d'initiation de la traduction du gène *arcA*. Les caractères en italique et soulignés correspondent au site potentiel de fixation du ribosome. Les lettres en gras représentent la région promotrice potentielle -10, dont la séquence consensuelle est TATAAT. Les caractères en gras et soulignés indiquent un site présentant de fortes similitudes avec le site consensuel de fixation des facteurs de type CRP, dont la séquence est TGTGA-(6 nt)-TCACA. Différents sites de restriction sont indiqués : *Bsp*XI (B), *Eco*RI (E) et *Hind*III (H).

Figure 4. Genes organization of the *E. coli* *arc* cluster. The arrow indicate the direction of transcription. The sequence upstream the promoter region *arcA* is shown in detail. The translation start site of *arcA* is shown in bold underlined italics. The ribosomal binding site is indicated by underlined italics. Bold letters highlight the putative -10 promoter region (consensus sequence is TATAAT). Bold underlined letters indicate the two putative halves of the CRP-binding site matching the consensus (TGTGA-(6 nt)-TCACA). Several restriction sites are mentioned: *Bsp*XI (B), *Eco*RI (E) et *Hind*III (H).

banques de données. Par contre, la séquence en acides aminés déduite de l'*orf86* présente des similitudes significatives avec l'extrémité C-terminale d'une protéine pouvant être impliquée dans la méthylation des ARNr et des ARNt chez *Bacillus subtilis* [7]. Aucun cadre ouvert de lecture n'a été défini en aval d'*arcC*. Le gène déterminant la protéine de transport de l'arginine n'a pas été isolé.

En amont du gène *arcA*, un cadre ouvert de lecture codant pour une protéine de 229 acides aminés (ORF229p) a été mis en évidence. Cette séquence présente de faibles homologies (15–20 % d'identité, 40–50 % de similitude) avec des protéines appartenant à la famille des régulateurs de la transcription CRP (cAMP Receptor Protein, ou CAP pour Catabolite Activator Protein), FNR (Fumarate and Nitrate Reduction Regulation) et FLP (FNR-Like Protein). Il est bien établi qu'une protéine de type FNR

est impliquée dans l'activation de la voie ADI de *Pseudomonas aeruginosa* en condition d'anaérobiose [8, 9]. De même, ce type de régulation est susceptible d'intervenir pour la voie ADI chez *Bacillus licheniformis* [20]. Il est à noter que les protéines FLP n'ont été jusqu'à présent isolées que chez des bactéries lactiques : *Lactobacillus casei* [10, 13] et *Lactococcus lactis* [11]. Pour tenter de situer plus précisément la protéine ORF229p par rapport à celles citées ci-dessus, un arbre phylogénétique a été construit par analyse de parcimonie complétée par une analyse de bootstrap. Différents représentants des facteurs FNR, FLP et CRP ont été sélectionnés. L'arbre ainsi obtenu a permis de constater que les protéines FNR forment deux sous-groupes délimités selon leur origine (isolées de bactéries à Gram(+) et à Gram(-)). Des différences au niveau d'acides aminés primordiaux pour leur activité biologique peuvent peut-être

expliquer ce résultat. Il en a aussi été déduit que la protéine d'*E. æni* est plus proche des facteurs de type CRP et des FNR isolées de bactéries à Gram (+) que des FLP. Pour approfondir cette analyse, l'application du programme MOTIFFINDER a permis de mettre en évidence dans la partie N-terminale d'ORF229p un site potentiel de fixation pour l'AMPc. De plus, dans la moitié C-terminale, la présence d'un domaine hélice-coude-hélice intervenant dans la fixation des protéines à l'ADN a été révélée. La configuration de cette séquence en acides aminés présente donc des caractéristiques communes aux facteurs CRP. De plus, lorsqu'on s'intéresse plus précisément à l'espace intergénique entre l'*orf229* et *arcA* (Fig. 4), plusieurs sites sont retrouvés, dont un très similaire au site de fixation pour les activateurs de type CRP.

4.2. Effet de l'arginine sur la transcription des gènes *arc*

Afin d'optimiser la croissance de la souche ICEB 8406, et favoriser l'extraction des ARN totaux, cette souche a été cultivée dans du MRS pH 5 contenant 56 mmol·L⁻¹ de glucose, 56 mmol·L⁻¹ de fructose et 75 mmol·L⁻¹ d'acide malique (MRS bis). Puis les conditions de culture ont été modifiées lorsque les cellules ont atteint la phase de croissance dans le but de tester l'influence de la présence d'arginine sur la transcription des gènes *arc* et de l'*orf229*, mais aussi pour observer si cet acide aminé seul (en absence de sucres fermentescibles), pouvait modifier l'expression de ces gènes.

La technique employée pour la mise en évidence de la présence des transcrits est la RT-PCR. Les ARN totaux ont été extraits grâce au kit StrataPrep® Total RNA Mini-prep (Stratagene, Amsterdam, Pays-Bas) et traités à la DNase. Il a été vérifié par PCR qu'ils ne contenaient pas d'ADN qui pourrait fausser l'interprétation des résultats. Puis les ADNc ont été obtenus par application du kit ProSTAR™ First Strand RT-PCR

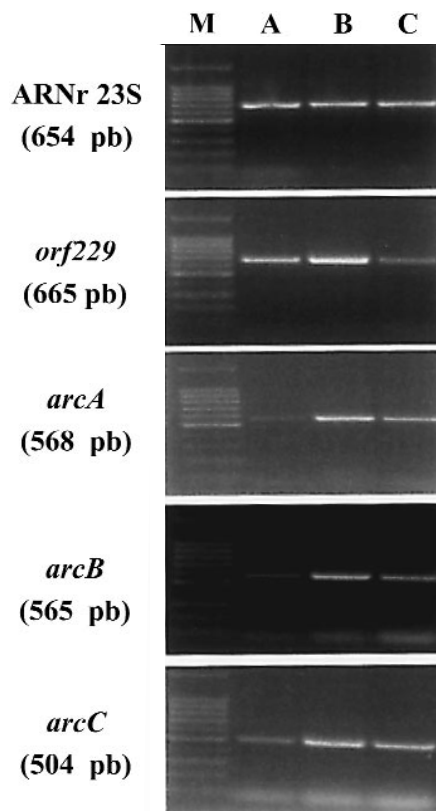


Figure 5. Profils de RT-PCR obtenus après extraction des ARN totaux issus de trois conditions de culture différentes. À partir de cellules de la souche ICEB 8406 en phase exponentielle de croissance dans du MRS bis, les conditions de culture sont : (A) culture en MRS bis durant 22 h ; (B) : addition d'arginine à 5 g·L⁻¹ final et incubation pendant 22 h supplémentaires ; (C) suspension dans du MRS bis contenant ni glucose, ni fructose, mais 5 g·L⁻¹ d'arginine et incubation maintenue pendant 22 h. Les gènes et la taille des amplifiats correspondants sont mentionnés. M : marqueurs de poids moléculaire 100 pb (Promega, Lyon, France).

Figure 5. RT-PCR patterns obtained with total RNA extracted from three different culture conditions. Growing cells of the strain ICEB 8406 in MRS bis medium were cultured as follows: (A) growth in MRS bis for 22 h; (B) arginine added at the final concentration of 5 g·L⁻¹ and incubation for 22 h; (C) cells in MRS bis medium without glucose, nor fructose, but with 5 g·L⁻¹ arginine and incubation for 22 h. Genes and corresponding fragment size are mentioned. M: 100 bp molecular weight marker (Promega, Lyon, France).

(Stratagène). Le gène de l'ARNr 23S a été utilisé comme témoin de non-induction. En effet, il est indispensable à la vie bactérienne, sans qu'il soit impliqué dans une voie métabolique. Son expression n'est donc pas soumise à régulation par l'arginine.

L'analyse des amplifications concernant les cinq gènes étudiés (Fig. 5) montre tout d'abord que les trois gènes *arc* et l'*orf229* sont exprimés à un niveau basal dans les cellules, en absence d'arginine. Leur expression est donc constitutive. Lorsque l'acide aminé est rajouté, l'intensité de l'amplification est supérieure, donc la transcription de ces quatre gènes est stimulée. Si l'arginine est incorporée en l'absence de sucres fermentescibles, l'expression des gènes *arcA*, *arcB* et *arcC* diminue légèrement. L'effet d'un déficit en hexoses est très net dans le cas de l'*orf229* puisque l'expression est alors inférieure à celle du niveau basal. Cette remarque va à l'encontre du fait que la protéine ORF229p puisse être un membre de la famille des facteurs de type CRP qui sont préférentiellement exprimés en condition de carence en glucose. Cette protéine pourrait donc constituer un nouveau facteur de régulation pour le métabolisme d'*Æ. œni*. Mais ceci n'est qu'une hypothèse et des travaux sont nécessaires pour la confirmer ou l'infirmer.

4.3. Application : détection des gènes *arc*

À partir des séquences des trois gènes *arc*, nous avons recherché un moyen de distinguer au niveau génétique les souches capables de celles incapables de dégrader l'arginine. Des oligonucléotides ont été définis pour amplifier par PCR la séquence complète des loci d'intérêt. De l'ADN correspondant aux deux souches arg(+) étudiées jusqu'à présent et aux quatre souches arg(-) (Tab. I) a été utilisé. La nature des amplifiats a été vérifiée par hybridation des profils PCR avec les sondes appropriées. Les résultats obtenus ont montré qu'un fragment

est détecté pour les trois gènes et pour toutes les souches testées, sauf pour l'ICEB 8413. En effet, les PCR spécifiques des trois gènes réalisées en présence de l'ADN de cette souche n'ont pas abouti à l'amplification des fragments attendus. Dans l'état actuel des connaissances, il est donc impossible de distinguer facilement les deux types de souches. L'incapacité à dégrader l'arginine n'est donc pas due à l'absence de l'information génétique déterminant les enzymes ADI, OTC et CK. Des mutations ponctuelles et/ou de courtes délétions au niveau des gènes, mais aussi des phénomènes de régulation peuvent être à l'origine de cette variabilité intra-espèce.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude de l'aspect énergétique du catabolisme de l'arginine chez *Æ. œni* a montré que la dégradation de l'acide aminé pouvait être couplée à la production d'ATP, donc d'énergie. Celle-ci est employée par les cellules au cours de la croissance lorsque les conditions de culture le permettent et par des cellules carencées dans un milieu réactionnel où les sources d'énergie sont épuisées. Dans un environnement toxique pour les micro-organismes tel que le vin, la présence d'arginine représente un avantage pour les souches capables de l'utiliser. Mais l'acide aminé seul ne permet pas de maintenir de façon prolongée le renouveau de ces cellules. Chez *Lb. sakei*, il a été montré que le catabolisme de cet acide aminé était associé à une amélioration de la survie de cellules en phase stationnaire, indépendamment de l'augmentation du pH lié à ce métabolisme [2]. De même, chez *Lc. lactis*, des mesures simultanées de dégradation d'arginine, de production d'ATP et de population bactérienne ont montré le rôle positif de la dégradation d'arginine sur le maintien en culture de cellules [28].

L'aspect génétique de ce métabolisme a ensuite été abordé. Trois des gènes

constituant le cluster *arc* ont été isolés : *arcA*, *arcB* et *arcC*. Le quatrième, *arcD*, correspondant à la protéine responsable de l'antiport arginine-ornithine, n'a pas encore été repéré, mais des travaux sont en cours pour l'isoler. Un autre locus, nommé *orf229*, a été mis en évidence juste en amont d'*arcA*. Puis la régulation de ces gènes a été étudiée par RT-PCR. Les gènes *arc* et l'*orf229* sont exprimés constitutivement au cours de la croissance cellulaire et leur transcription est stimulée par l'arginine. L'étude des transcrits des gènes du cluster *arc* par des expériences de type Northern apportera des informations très importantes et nécessaires à la compréhension de leur régulation. Elles permettront sans doute de déterminer si les trois gènes sont organisés en opéron.

L'analyse portant sur le gène isolé en amont d'*arcA* montre qu'il pourrait s'agir d'un nouveau facteur de régulation de la transcription chez *Æ. æni*. Mais beaucoup reste à faire pour préciser la fonction de la protéine ORF229p. En effet, en considérant que la transcription de ce locus est stimulée en présence d'arginine, il faut dorénavant savoir si l'ORF229p se fixe sur le site potentiel en amont du gène de l'ADI pour activer son expression.

La connaissance des séquences nucléotidiques ne permet pas de différencier facilement les souches arg(+) et arg(-) car l'information génétique correspondant aux gènes de la voie ADI est présente pour les souches dont l'incapacité à hydrolyser l'arginine a été démontrée. Ce résultat ne peut pas faciliter la sélection de souches pour la production de levains malolactiques, ou la caractérisation d'une flore indigène. Le clonage du gène *arcD* déterminant la protéine de transport de l'arginine, et la détermination de la fonction précise de l'*orf229* devrait permettre de répondre à cette attente.

REMERCIEMENTS

T. Tonon a bénéficié d'une bourse accordée par le Ministère de l'Éducation Nationale, de la

Recherche et de la Technologie. Merci au Professeur G. Pérez-Martinez pour nous avoir envoyé la séquence de l'opéron *arc* de *Lactobacillus sakei* avant sa publication et à A. Joyeux, F. Bornant, E. Stéfanou et C. Philippot pour leur contribution à ce travail.

RÉFÉRENCES

- [1] Canas B.J., Harvey D.C., Robinson L.R., Sullivan M.P., Joe F.L. Jr., Diachenko G.W., Ethyl carbamate levels in selected foods and beverages, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72 (1989) 873–876.
- [2] Champomier Vergès M.-C., Zuñiga M., Morte-Deville F., Pérez-Martinez G., Zagorec M., Ehrlich S.D., Relationships between arginine degradation, pH and survival in *Lactobacillus sakei*, *FEMS Microbiol. Lett.* 180 (1999) 297–304.
- [3] Coton E., Rolland G.C., Bertrand A., Lonvaud-Funel A., Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency and distribution, *Am. J. Enol. Vitic.* 49 (1998) 199–203.
- [4] Cox D.J., Henick-Kling T., Chemiostatic energy from malolactic fermentation, *J. Bacteriol.* 171 (1989) 5750–5752.
- [5] Cunin R., Glansdorff N., Piérard N., Stalon V., Biosynthesis and metabolism of arginine in Bacteria, *Microbiol. Rev.* 50 (1986) 314–352.
- [6] de Revel G., Martin N., Pripis-Nicolau L., Lonvaud-Funel A., Bertrand A., Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 4003–4008.
- [7] Gagnon Y., Breton R., Putzer H., Pelchat M., Grunberg-Manago M., Lapointe J., Clustering and co-transcription of the *Bacillus subtilis* genes encoding the aminoacyl-tRNA synthetases specific for glutamate and for cysteine and the first enzyme for cysteine biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 7473–7482.
- [8] Gamper M., Zimmermann A., Haas D., Anaerobic regulation of transcription initiation in the *arcDABC* operon of *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* 173 (1991) 4742–4750.
- [9] Galimand M., Gamper M., Zimmermann A., Haas D., Positive FNR-like control of anaerobic arginine degradation and nitrate respiration in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* 173 (1991) 1598–1606.
- [10] Gostick D.O., Green G., Irvine A.S., Gasson M.J., Guest J.R., A novel regulatory switch mediated by the FNR-like protein of *Lactobacillus casei*, *Microbiology* 144 (1998) 705–717.

- [11] Gostick D.O., Griffin H.G., Shearman C.A., Scott C., Green J., Gasson M.J., Guest J.R., Two operons that encode FNR-like proteins in *Lactococcus lactis*, *Mol. Microbiol.* 31 (1999) 1523–1535.
- [12] Granchi L., Paperi R., Rosellini D., Vincenzini M., Strain variation of arginine catabolism among malolactic *Oenococcus oeni* strains of wine origin, *Ital. J. Food Sci.* 4 (1998) 351–357.
- [13] Irvine A.S., Guest J.R., *Lactobacillus casei* contains a member of the CRP-FNR family, *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 753.
- [14] Konings W.N., Poolman B., Driessen A.J.M., Bioenergetics and solute transport in lactococci, *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 16 (1989) 419–476.
- [15] Kunji E.R.S., Ubbink T., Matin A., Poolman B., Konings W.N., Physiological responses of *Lactococcus lactis* ML3 to alternating conditions of growth and starvation, *Arch. Microbiol.* 159 (1993) 372–379.
- [16] Liu S.Q., Pilone G.J., A review: arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance, *J. Appl. Microbiol.* 84 (1998) 315–327.
- [17] Liu S.Q., Pritchard G.C., Hardman M.J., Pilone G.J., Occurrence of arginine deiminase pathway enzymes in arginine catabolism in wine lactic acid bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 310–316.
- [18] Lonvaud-Funel A., Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine, *Antonie van Leeuwenhoek* 76 (1999) 317–331.
- [19] Lonvaud-Funel A., Joyeux A., Application de la bioluminescence au dénombrement des micro-organismes vivants dans les vins, *Connaiss. Vigne Vin* 16 (1982) 241–256.
- [20] Maghnouj A., Franco de Sousa Cabral T., Stalon V., Vander Wauven C., The *arcABDC* gene cluster, encoding the arginine deiminase pathway of *Bacillus licheniformis*, and its activation by the arginine repressor ArgR, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 6468–6475.
- [21] Millet V., Lonvaud-Funel A., The viable but non culturable state of wine microorganisms during storage, *Lett. Appl. Microbiol.* 20 (2000) 136–141.
- [22] Mira de Orduña R., Liu S.-Q., Patchett M.L., Pilone G.J., Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Lett.* 183 (2000) 31–35.
- [23] Mirvish S.S., The carcinogenic action and metabolism of urethan and N-hydroxy urethan, *Adv. Cancer Res.* 11 (1968) 1–42.
- [24] Oliver J.D., Formation of viable but non culturable cells, Starvation in Bacteria, Kjelleberg, Plenum Press, New York, 1993, pp. 239–271.
- [25] Ough C.S., Ethyl carbamate formation in fermented beverages and food. I. Naturally occurring ethyl carbamate, *J. Agric. Food Chem.* 24 (1976) 323–328.
- [26] Ough C.S., Ethyl carbamate in foods and wine, *Bull. Soc. Med. Friends Wine* 25 (1993) 7–8.
- [27] Poolman B., Driessen A.J.M., Konings W.N., Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*, *J. Bacteriol.* 169 (1987) 5597–5604.
- [28] Stuart M.R., Chou L.S., Weimer B.C., Influence of carbohydrate starvation and arginine on culturability and amino acid utilization of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 665–673.
- [29] Zuñiga M., Champomier Vergès M.-C., Zagorec M., Pérez-Martinez G., Structural and functional analysis of the gene cluster encoding the enzymes of the arginine deiminase pathway of *Lactobacillus sake*, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 4154–4159.