

Expression différentielle des deux gènes du locus *clpP-clpL* de *Oenococcus oeni*

Charlotte BELTRAMO, Cosette GRANDVALET, Jean GUZZO*

Laboratoire de Microbiologie, UMR INRA 1232, ENSBANA, 1 esplanade Erasme,
21000 Dijon, France

Published online 13 November 2003

Abstract – Expression of *Oenococcus oeni* *clpP-clpL* locus in response to environmental conditions. The *Oenococcus oeni* lactic acid bacterium, mainly responsible for malolactic fermentation during winemaking processes, is confronted with various stresses including the presence of ethanol or low pH. The tolerance of this bacterium to stress is essential for its growth in wine. Comprehension of mechanisms involved in stress response is required for the control of malolactic starters. One of these mechanisms is based on the synthesis of stress proteins. This study deals with *clp* genes, which were known to play a central role in stress response and also in microbial development. The genome of *O. oeni* contains two genes surprisingly located in the same locus, encoding ClpP and ClpL proteins. The aim of this work was to characterize the *clpP-clpL* locus and the transcriptional expression during growth and following stress. In order to quantify the transcript ratios, a quantitative real-time reverse transcription-PCR experiment was set up. Finally, the regulation mechanisms of the *O. oeni* stress genes were discussed.

Lactic acid bacteria / *Oenococcus oeni* / stress response / *clp* gene / transcription

Résumé – La bactérie lactique *Oenococcus oeni*, souvent responsable de la fermentation malolactique lors du processus de vinification, est confrontée à de multiples stress, tels que la présence d'éthanol ou un pH faible. La tolérance de cette bactérie vis-à-vis de ces stress est essentielle à sa croissance dans un milieu vin donc la maîtrise des levains malolactiques nécessite l'étude et la compréhension des mécanismes impliqués dans la réponse au stress. L'un de ces mécanismes repose sur la production de protéines de stress et parmi ces dernières, la famille des protéines Clp joue un rôle majeur tant lors de stress qu'au cours de la croissance. Le gène *clpP* a été identifié chez *O. oeni* I.O.B. 8413. Il faut remarquer l'organisation génétique atypique de ce locus. En effet, chez *O. oeni*, le gène situé en aval de *clpP* code une protéine similaire à une Clp-ATPase de la classe ClpL. L'objectif de ce travail a été de caractériser le locus *clpP-clpL* et d'étudier son expression au niveau transcriptionnel suite à un stress et au cours de la croissance. Afin de pouvoir quantifier de façon relative l'expression des gènes de stress, la technique de PCR quantitative en temps réel a été mise en œuvre. Enfin, des mécanismes potentiels de régulation des gènes de stress chez *O. oeni* sont proposés.

Bactérie lactique / *Oenococcus oeni* / réponse au stress / gène *clp* / transcription

* Auteur correspondant : jean.guzzo@u-bourgogne.fr

1. INTRODUCTION

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt agroalimentaire en raison de la diversité de leurs métabolismes fermentaires. *Oenococcus oeni*, bactérie lactique hétérofermentaire, est principalement responsable de la fermentation malolactique lors du processus de vinification [13]. Cette fermentation augmente les qualités organoleptiques du vin et sa stabilité microbienne. Même si cette fermentation démarre naturellement grâce aux bactéries indigènes des baies de raisin, des retards de fermentation se produisent fréquemment. Ainsi, l'addition de ferments malolactiques lors de la vinification est de plus en plus répandue. Le milieu vin constitue un environnement stressant pour les bactéries (présence d'éthanol, de sulfites, pH faible, ...). La tolérance de *O. oeni* vis-à-vis de ces stress est essentielle à sa croissance dans un milieu aussi hostile. La maîtrise de l'utilisation des ferments malolactiques nécessite l'étude et la compréhension des mécanismes impliqués dans la résistance aux stress. L'un de ces mécanismes repose sur la production de protéines de stress ou Heat Shock Protein (HSP) [14]. Outre leurs rôles suite à un stress, ces protéines interviennent également en conditions optimales de croissance. Deux classes fonctionnelles de protéines de stress ont été identifiées [8] :

- les chaperons moléculaires qui catalysent le repliement des protéines et limitent leur agrégation en cas de stress ;
- les protéases qui permettent la dégradation des protéines mal repliées ou dénaturées suite à un stress.

Plusieurs gènes de protéines de stress ont été étudiés chez *O. oeni*, notamment *hsp18* codant la protéine Lo18 qui est une smHSP [4, 10], *trxA* codant une thioredoxine [11] mais aussi *clpX* codant une Clp-ATPase [12]. De multiples protéines Clp ont ainsi été identifiées et classées en deux sous-familles : les protéases, notamment ClpP [17] et les Clp-ATPases, chaperons moléculaires présentant aussi une activité ATPasique [21]. La protéase ClpP est

une Hsp jouant un rôle clef tant lors d'un stress qu'au cours de la croissance [7, 9]. L'activité protéolytique de ClpP est modulée par son association avec des protéines de la sous-famille des Clp-ATPases. Notre étude s'est portée sur un locus de *O. oeni* comprenant deux gènes *clp* dont l'organisation génétique est atypique. L'expression des gènes *clpP-clpL* après un stress éthanolique et au cours de la croissance a été étudiée et comparée aux connaissances acquises sur la régulation de l'expression des gènes de stress chez *O. oeni*. D'autre part, ce travail présente une technique mise en oeuvre pour quantifier de façon relative les taux de transcrits.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Souche, conditions de culture et chocs éthanolique et thermique

La souche *O. oeni* I.O.B.8413 a été fournie par l'Institut Oenologique de Bordeaux (France). *O. oeni* est cultivée à 30 °C en flacon hermétique sans agitation dans du milieu FT80 (pH 5,3) modifié par l'addition d'extrait de viande (5 g·L⁻¹) au lieu des casaminoacides [2]. Lorsque les cellules atteignent une absorbance de 0,8 à 600 nm, de l'éthanol absolu est ajouté à la culture de façon à avoir une concentration finale de 11 % (vol/vol) ou les cultures sont mises à 42 °C. La durée des stress est de une heure.

2.2. Extraction des ARN

Un volume de culture correspondant à 20 unités d'absorbance à 600 nm est centrifugé à 5000 × g et congelé à -20 °C. Les cellules sont remises en suspension dans 1 mL de Tri-Reagent (Sigma-Aldrich, L'isle-d'Abeau, Chenes, France). Après addition de 0,15 g de billes de verre (90–150 µm), les cellules sont cassées au broyeur à billes « Fastprep cell disintegrator FP120 Instrument Savant » (BIO 101, Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) à 4 °C, à raison de 6 fois 20 s à 6000 × g.

Les échantillons sont ensuite traités selon les recommandations du fournisseur (Sigma-Aldrich). Les ARN sont repris dans 30 μL d'eau traitée au DMPC 0,1 % (diméthylpyrrocarbonate) puis leur concentration est évaluée par mesure spectrophotométrique à 260 nm.

2.3. Analyse par hybridation : Northern blot

Les ARN (20 μg) sont séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose dénaturant (1 % (p/vol) d'agarose, et 6 % (vol/vol) de formaldéhyde). Puis ils sont transférés par capillarité sur une membrane de nitrocellulose « Nytran-N » (Schleicher and Schuell, Ecquevilly, France). Les sondes sont obtenues par amplifications par PCR avec les amorces appropriées puis purifiées grâce au kit « Qiaquick PCR purification » (Qiagen, Courtabœuf, France). Pour confirmer la spécificité de ces sondes, un Southern blot a été réalisé et les produits de PCR ont été séquencés. Les sondes sont marquées radioactivement au [α - ^{32}P] d'ATP (PerkinElmer, Zaventem, Belgique) par le kit « random primers DNA labelling » (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Les hybridations sont réalisées d'après le protocole décrit par Sambrook [19].

2.4. RT-PCR et PCR en temps réel

Les ARN totaux (5 μg) sont traités avec deux unités de DNase (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) comme indiqué par le fournisseur. Les ADNc sont synthétisés grâce au kit « thermoscript RT-PCR system » (Invitrogen) avec 1 μL de random hexamers (50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). L'absence d'ADN chromosomique a été contrôlée. À 5 μL de chaque dilution d'ADNc sont ajoutés 20 μL de mélange de PCR (12,5 μL de Master mix, 1 μL de chaque amorce à 7 $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 2,5 μL de fluorescéine à 1/10 000 et 3 μL de SBYR Green à 1/8000). Les ADNc spécifiques sont amplifiés par real-time PCR avec les amorces appropriées. Le gène *ldhD* de *O. oeni* est choisi comme contrôle

interne dans les conditions de cette étude. Pour pouvoir faire des comparaisons, contrôler la qualité d'extraction des ARN et l'efficacité de chaque transcription inverse, le taux d'ADNc *ldhD* a été quantifié en parallèle avec le taux d'ADNc des gènes *clp*. Les amplifications sont réalisées grâce à un thermocycleur Biorad-I-cycler (Hercules, USA). Le programme suivi comprend une première étape de dénaturation à 95 °C pendant 10 min, suivi de 45 cycles de 15 s à 95 °C et 30 s à 60 °C. La mesure de la fluorescence s'effectue à chaque étape d'hybridation. La spécificité de l'amplification est vérifiée pour chaque couple d'amorces par la courbe de fusion. L'efficacité des amplifications est déterminée grâce à une courbe étalon établie avec des dilutions en série des ADNc. L'efficacité E est calculée par la formule : $E = [10^{(1/p)} - 1] \times 100$ où p est la pente de la droite étalon. Les taux d'induction sont calculés par la méthode des seuils critiques ($\Delta\Delta C_T$) où la quantité d'ADNc cible est ajustée par rapport à une référence, constituée par la quantité d'ADNc du contrôle interne, ici la *ldhD*. Les expériences ont été réalisées sur deux cultures indépendantes.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Organisation génétique atypique du locus *clpP-clpL* de *O. oeni*

Des travaux antérieurs ont permis d'identifier le gène *clpX*. Ce gène est localisé en aval du gène *tig* codant le trigger factor. Chez les bactéries à Gram-négatif, l'organisation *tig-clpP-clpX* est couramment décrite tandis que chez les bactéries à Gram-positif, *clpP* est situé sur un locus ne présentant aucun gène codant une Clp-ATPase [6, 16, 18]. Chez *O. oeni*, le gène *clpP* est situé en amont d'un gène codant une protéase de 79 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ présentant un fort pourcentage d'identité avec une Clp-ATPase, différente de ClpX. La comparaison de la séquence en acides aminés (720 aa) avec celles de la base de données Genbank montre

des similarités significatives avec la classe I des Clp-ATPases, c'est-à-dire possédant deux domaines de fixation de l'ATP. Bien que le pourcentage d'identité avec les ClpE soit fort, il n'y a pas le motif spécifique en doigt de zinc en N-terminal sur la Clp-ATPase de *O. oeni*. L'absence de ce motif classe ce gène dans la sous-famille des gènes *clpL*. Jusqu'à présent, très peu de données sont disponibles sur cette sous-famille. De tels gènes ont été identifiés au cours des programmes d'annotation des génomes de *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp. et *Lactococcus* sp. La régulation du gène *clpL* n'a été abordée que chez *Streptococcus pneumoniae* [3]. Cependant, la fonction des protéines ClpL est à ce jour inconnue.

3.2. Suivi de l'expression des gènes *clpP* et *clpL* en fonction des conditions environnementales

Les gènes *clpP* et *clpL* sont régulés par les conditions de stress. Les ARN totaux ont été extraits à partir de cellules en phase exponentielle ($DO_{600nm} = 0,8$) stressées pendant une heure et non stressées. Une expérience de Northern blot a été réalisée sur ces ARN totaux avec des sondes spécifiques des gènes *clpP* et de *clpL*. L'analyse révèle la présence d'un petit (0,7 kb) et d'un grand transcrite (2,4 kb) correspondant respectivement au produit de transcription des gènes *clpP* et *clpL*. Le stress présenté est un choc éthanologique qui constitue un stress rencontré en milieu vin. Lorsque les cellules atteignent une absorbance de 0,8, de l'éthanol absolu est ajouté à la culture de façon à avoir une concentration finale de 11 % (vol/vol). Le résultat présenté sur la Figure 1 montre une augmentation du taux des transcrits des deux gènes. Un résultat équivalent a été obtenu suite à un choc thermique à 42 °C pendant une heure (résultats non montrés).

Des travaux antérieurs [10–12] ont mis en évidence une expression différentielle des gènes de stress *trxA*, *clpX* et *hsp18* de *O. oeni* en fonction du stade de croissance :

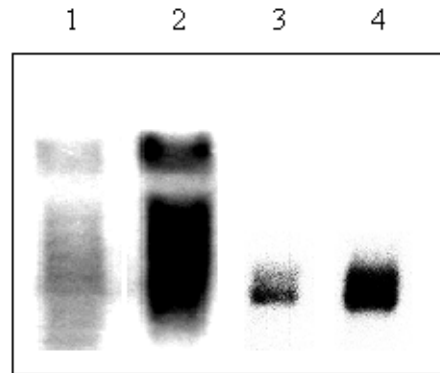


Figure 1. Analyse par Northern blot de l'expression des gènes *clpL* (pistes 1 et 2) et *clpP* (pistes 3 et 4). Les ARN totaux ont été isolés d'une culture de *O. oeni* (absorbance à 600 nm = 0,8) cultivée à 30 °C en conditions optimales (pistes 1 et 3) ou en présence d'éthanol (11 % vol/vol) pendant une heure (pistes 2 et 4).

Figure 1. Northern blot analysis of the expression of *clpL* gene (lanes 1 and 2) and *clpP* gene (lanes 3 and 4). Total RNAs were extracted from an *O. oeni* culture growth (absorbance at 600 nm = 0.8) at 30 °C in optimal conditions (lanes 1 and 3) or with ethanol (11% vol/vol) during one hour (lanes 2 and 4).

le taux de transcrits *clpX* est plus important en début de phase exponentielle tandis que les transcrits *hsp18* ne sont détectés qu'en phase stationnaire. Le taux de transcrite *trxA* reste constant au cours de la croissance. Une étude semblable a été réalisée par Northern blot avec des sondes spécifiques des gènes *clpP* et *clpL*. Le transcrite *clpP* est détecté tout au long de la croissance avec un taux maximum en début de phase exponentielle ; quant au transcrite *clpL*, il est faiblement détecté en phase exponentielle et fortement en phase stationnaire.

La spécificité de l'activité protéolytique de ClpP dépend de la nature de la Clp-ATPase avec laquelle elle s'associe. Les complexes protéolytiques ClpP-ClpX, ClpP-ClpA et ClpP-ClpC ont précédemment été caractérisés

Tableau I. Moyenne des C_T de 8 mesures de deux extractions d'ARN indépendantes avec les écarts types entre parenthèses pour les gènes *ldhD*, *clpP* et *clpL* en phase exponentielle (OD = 0,8), au début de phase stationnaire et en phase stationnaire tardive.

Table I. Mean values of eight measurements of each of two independent sets of RNA preparations with standard deviation in brackets for *ldhD*, *clpP* and *clpL* genes in exponential phase (OD = 0,8), at the entry of stationary phase and in late stationary phase.

	<i>ldhD</i>	<i>clpP</i>	<i>clpL</i>
Phase exponentielle	22,10 (0,40)	24,45 (0,8)	24,75 (0,39)
Entrée en phase stationnaire	25,12 (0,29)	27,44 (0,45)	20,50 (0,78)
Phase stationnaire tardive	24,43 (0,74)	26,70 (0,59)	21,84 (0,48)

ou suggérés chez différents micro-organismes. À ce jour aucune association ClpP-ClpL n'a été décrite. Cependant, l'expression différentielle des gènes *clp* observée au cours de la croissance suggère une potentielle association des protéines ClpP et ClpX au début de la phase exponentielle et de ClpP et ClpL au début de phase stationnaire chez *O. oeni*.

3.3. Mise en œuvre de la RT-PCR quantitative en temps réel

De façon à quantifier les taux d'induction de l'expression des gènes de stress, la technique de RT-PCR en temps réel a été mise en œuvre chez *O. oeni*. La première étape a consisté à identifier un témoin interne, c'est-à-dire un gène dont l'expression varie peu au cours des conditions appliquées. Les gènes testés sont d'une part des gènes essentiels comme les gènes *gyrA*, *gyrB* codant des gyrases et d'autre part des gènes du métabolisme carboné comme le gène *ldhD* codant la lactate déshydrogénase. Les gènes *ldhD* ou *gyrA* présentent chez *Oenococcus oeni* un potentiel de témoins internes. En effet, la variation du C_T pour ces gènes entre la condition témoin et les conditions de phase stationnaire est la plus faible. Il faut souligner qu'une variation physiologique est toujours présente entre les phases exponentielle et stationnaire [20]. Pour la suite des expériences, le gène codant la D-lactate déshydrogénase (*ldhD*) a été retenu. La phase stationnaire constitue une étape importante en ce qui concerne les change-

ments métaboliques. De plus, les levains malolactiques sont préparés à partir de cultures en phase stationnaire. C'est pourquoi les taux d'induction ont été calculés à l'entrée en phase stationnaire et en phase stationnaire tardive. La spécificité et l'efficacité de chaque PCR ont été contrôlées (voir « Sect. Matériels et méthodes »). Le tableau I présente la moyenne de 16 valeurs de C_T correspondant à 8 mesures pour chacune de deux extractions d'ARN indépendantes ainsi que les écarts types. Ensuite les taux d'induction relatifs des ARNm ont été calculés grâce à la méthode des seuils critiques ($\Delta\Delta C_T$). Tandis que le niveau d'expression du gène *clpP* reste identique entre la phase exponentielle et la phase stationnaire, le niveau d'expression du gène *clpL* relativement à la quantité de transcrite *ldhD* est induit d'un facteur environ 150 au début de phase stationnaire et d'un facteur environ 38 en phase stationnaire tardive comparativement à la phase exponentielle. L'ARNm *clpL* apparaît comme un bon marqueur du début de la phase stationnaire. De plus, ces résultats montrent une régulation différente des deux gènes du locus *clpP-clpL* au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel.

4. CONCLUSION

Dans cette étude, le locus *clpP-clpL* a été étudié. À notre connaissance, *O. oeni* est le premier micro-organisme possédant une telle organisation génétique de ces gènes.

Par ailleurs, ces gènes sont induits par le stress, mais ils présentent une expression différentielle au cours de la croissance. Le transcrit *clpL* constitue un bon marqueur du début de la phase stationnaire. La comparaison des taux d'induction laisse penser qu'il existe des mécanismes de régulation différents pour les gènes *clpP* et *clpL* chez *O. oeni*. Des travaux sont en cours afin d'élucider les mécanismes impliqués.

Une première approche des modes de régulation des gènes de stress chez *O. oeni* suggère une régulation CtsR-dépendante de certains gènes. En effet, l'analyse de la région promotrice des gènes *clpP* et *hsp18* révèle la présence de motifs similaires au site de fixation du régulateur CtsR. Chez *Bacillus subtilis*, CtsR a été identifié comme le répresseur transcriptionnel des gènes de stress dits de classe III [5]. Aucun motif de ce type n'a été identifié au niveau des régions promotrices des gènes *trxA*, *clpL* et *clpX*. Cependant, les analyses par extension d'amorces ont permis d'identifier une région transcrite non traduite à l'extrémité 5' du gène *clpX*. Cette région non traduite pourrait avoir une influence sur la stabilité des ARNm et jouer un rôle sur la régulation post-transcriptionnelle [15]. En conséquence, les mécanismes de régulation des gènes de stress chez *O. oeni* semblent se distinguer de ceux établis chez *Escherichia coli* [1] et *B. subtilis* [5].

RÉFÉRENCES

- [1] Arsene F., Tomoyasu T., Bukau B., The heat shock response of *Escherichia coli*, *Int. J. Food Microbiol.* 55 (2000) 3–9.
- [2] Cavin J.F., Prevost H., Lin J., Schmitt P., Divies C., Medium for screening *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation, *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (1989) 751–753.
- [3] Chastanet A., Prudhomme M., Claverys J.P., Msadek T., Regulation of *Streptococcus pneumoniae clp* genes and their role in competence development and stress survival, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 7295–7307.
- [4] Delmas F., Pierre F., Coucheney F., Divies C., Guzzo J., Biochemical and physiological studies of the small heat shock protein Lo18 from the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3 (2001) 601–610.
- [5] Derre I., Rapoport G., Msadek T., CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacteria, *Mol. Microbiol.* 31 (1999) 117–131.
- [6] Frees D., Ingmer H., ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*, *Mol. Microbiol.* 31 (1999) 79–87.
- [7] Gerth U., Kruger E., Derre I., Msadek T., Hecker M., Stress induction of the *Bacillus subtilis clpP* gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance, *Mol. Microbiol.* 28 (1998) 787–802.
- [8] Gottesman S., Wickner S., Maurizi M.R., Protein quality control: triage by chaperones and proteases, *Genes Dev.* 11 (1997) 815–823.
- [9] Jenal U., Fuchs T., An essential protease involved in bacterial cell-cycle control, *Embo J.* 17 (1998) 5658–5669.
- [10] Jobin M.P., Delmas F., Garmyn D., Divies C., Guzzo J., Molecular characterization of the gene encoding an 18-kilodalton small heat shock protein associated with the membrane of *Leuconostoc oenos*, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 609–614.
- [11] Jobin M.P., Garmyn D., Divies C., Guzzo J., Expression of the *Oenococcus oeni trxA* gene is induced by hydrogen peroxide and heat shock, *Microbiology* 145 (1999) 1245–1251.
- [12] Jobin M.P., Garmyn D., Divies C., Guzzo J., The *Oenococcus oeni clpX* homologue is a heat shock gene preferentially expressed in exponential growth phase, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 6634–6641.
- [13] Kunkee R.E., Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making, *FEMS Microbiol. Rev.* 88 (1991) 55–71.
- [14] Lindquist S., Craig E.A., The heat-shock proteins, *Annu. Rev. Genet.* 22 (1988) 631–677.
- [15] Lundberg U., von Gabain A., Melefors O., Cleavages in the 5' region of the *ompA* and *bla* mRNA control stability: studies with an *E. coli* mutant altering mRNA stability and a novel endoribonuclease, *Embo J.* 9 (1990) 2731–2741.
- [16] Osteras M., Stotz A., Schmid Nuoffer S., Jenal U., Identification and transcriptional control of the genes encoding the *Caulobacter crescentus* ClpXP protease, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 3039–3050.

- [17] Porankiewicz J., Wang J., Clarke A.K., New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond, *Mol. Microbiol.* 32 (1999) 449–458.
- [18] Robertson G.T., Ng W.L., Foley J., Gilmour R., Winkler M.E., Global transcriptional analysis of *clpP* mutations of type 2 *Streptococcus pneumoniae* and their effects on physiology and virulence, *J. Bacteriol.* 184 (2002) 3508–3520.
- [19] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989.
- [20] Vandecasteele S.J., Peetermans W.E., Merckx R., van Eldere J., Quantification of expression of *Staphylococcus epidermidis* house-keeping genes with Taqman quantitative PCR during in vitro growth and under different conditions, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 7094–7101.
- [21] Wawrzynow A., Banecki B., Zylicz M., The Clp ATPases define a novel class of molecular chaperones, *Mol. Microbiol.* 21 (1996) 895–899.