

## ANALYSE COMPARATIVE DE SPECTRES PROTEOMIQUES ET PHYLOGENETIQUES DE 18 SOUCHES DE BACTERIES LACTIQUES A POTENTIEL PROBIOTIQUE ISOLÉES À PARTIR DE POISSONS

RimEl Jeni<sup>1,2</sup>, Karola Bohme<sup>3</sup>, Jorges Velasquez<sup>3</sup>, Monia El Bour<sup>1</sup>, Balkiss Bouhaouala-Zahar<sup>2</sup>

1-Laboratoire de Biodiversité et biotechnologie marines (INSTM Salammbô), 28 rue du 2 mars 1934, 2015 Tunis Tunisie.

2- Institut Pasteur de Tunis, laboratoire des Venins et Molécules Thérapeutiques, 13 Place Pasteur, BP-74, 1002 Tunis, Tunisie. 3- Laboratoire de technologie alimentaire, LHICA, Département de chimie analytique, la nutrition et les sciences de l'alimentation, de l'Université de Santiago de Compostela, Lugo, Espagne

### ABSTRACT

The spectral mass of eighteen lactic bacterial strains recently isolated from freshwater fishes of Tunisia's dams and exhibiting antimicrobial activities against various food-borne pathogens were generated. The intra and inter-specific phyloproteomic relationships among strains were compared to available phylogenetic data based on 16S rRNA genes. Hence, we demonstrated that MALDI-TOF MS is a potent and reliable method for both discrimination and identification of lactic bacterial strains which could be relevant to apply before their use in foods and/or as probiotics in biomedicine and aquaculture.

### RESUME

Le spectre de masse de dix-huit souches de bactéries lactiques, récemment isolées à partir de poissons d'eau douce des barrages de la Tunisie et présentant des activités antimicrobiennes contre divers agents pathogènes d'origine alimentaire, ont été générés. Cette approche a été réalisée par comparaison des empreintes digitales spectrales de nos souches référencées avec six empreintes digitales MALDI-TOF de la base de données USC récemment développée ([www.spectrabank.org](http://www.spectrabank.org)). Ainsi, nous avons démontré que MALDI-TOF MS est une méthode puissante et fiable à la fois pour la discrimination et l'identification des bactéries lactiques qui pourrait être pertinente avant leur utilisation dans les aliments et/ou en tant que probiotique dans le domaine biomédical et de l'aquaculture.

### INTRODUCTION

La microflore du gros intestin complète la digestion par la fermentation, elle protège contre les bactéries pathogènes et stimule le système immunitaire. La bonne santé d'une microbiote est révélée par la présence des bactéries lactiques, comme il a été indiqué chez l'être humain (Fooks *et al.*, 1999) et chez les animaux (Ehrmann *et al.*, 2002).

Dans les dernières décennies, l'identification bactérienne basée sur la biologie moléculaire a émergé et est devenue couramment utilisée afin de surmonter les défaillances de l'identification biochimique (Petti *et al.*, 2005). La spectrométrie de masse MALDI-TOF (matrice désorption laser assistée par ionisation à temps de vol) est une technique analytique qui permet la détection et l'identification de molécules d'intérêt par analyse structurale de protéines intactes obtenues à partir de cellules bactériennes entières (Soro-Yao *et al.*, 2014). Dans la présente étude, nous avons évalué l'utilité de MALDI-TOF MS pour identifier les souches de bactéries lactiques, récemment isolées à partir de poissons d'eau douce.

### MATERIEL ET METHODES

#### Isolément des bactéries lactiques à partir des poisons d'eau douce

Les poissons *Mugil cephalus* et *Oreochromis niloticus* ont été disséqués dans des conditions aseptiques. La peau (2\*1 cm<sup>2</sup>) et les branchies ont été excisées. Le contenu intestinal a été retiré conformément à la méthode décrite par El Jeni *et al.* (2015).

#### Analyse MALDI-TOF MS

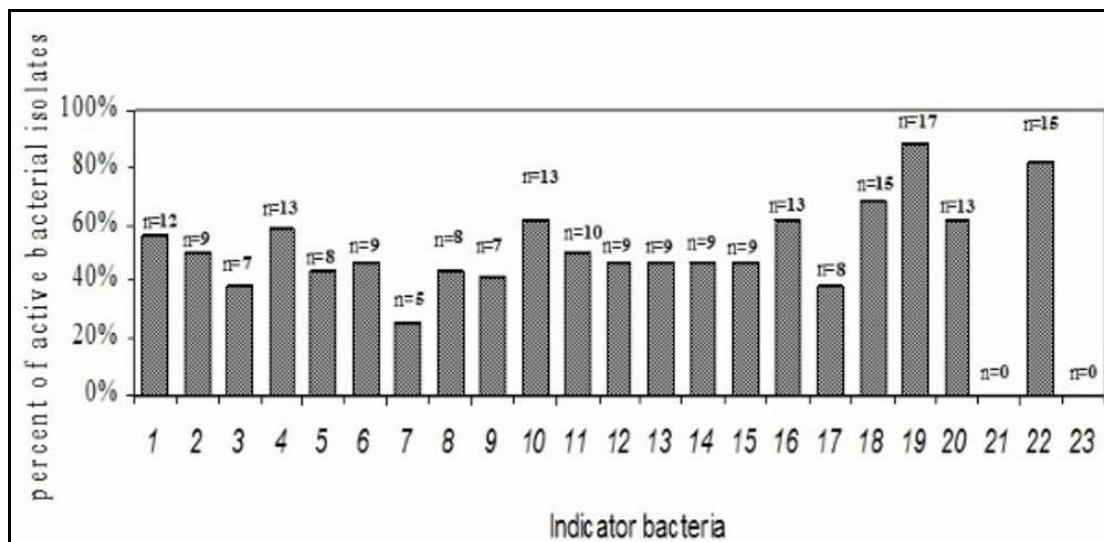
Pour l'analyse MALDI-TOF MS, les souches ont été cultivées sur milieu PCA puis incubées pendant 24 h à 37 °C. Une anse de la biomasse de chaque culture bactérienne a été prise et récolté dans 100 µl d'une solution contenant 50% d'acétonitrile (ACN; Merck, Darmstadt, Allemagne) et 1% d'acide trifluoroacétique aqueux (TFA; Acros Organics, NJ, USA). Après centrifugation à 8000 rpm pendant 10 min, le surnageant a été prélevé et conservé à -20 °C. Pour l'analyse, une aliquote de 2 µl de chaque extrait d'échantillon a été mélangé avec 10 µl de la solution de matrice saturée avec du α-cyano-4-hydroxycinnamique (α-CHCA; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) dans 50% d'ACN et 2,5% de TFA aqueux. Une aliquote de 1 µl de la solution échantillon/matrice a été déposée manuellement sur

une plaque en acier inoxydable pour l'analyse MALDI-TOF. Les spectres de masse ont été obtenus en utilisant un Voyager DE STR MALDI-TOF spectromètre de masse (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). L'analyse des spectres et l'extraction des listes de masse ont été réalisées avec Data Explorer (version 4.0.0.0) et l'application SPECLUST basée sur le Web (<http://bioinfo.thep.lu.se/speclust.html>) (Böhme *et al.*, 2010).

## RESULTATS

### Détection de l'activité antibactérienne

Ces bactéries lactiques présentent des activités antibactériennes contre un grand nombre de bactéries pathogènes d'origine alimentaire affectant les humains et les poissons (collection INSTM) (Fig.1).



**Figure 1.** Pourcentage souches isolées de poissons d'eau douce et actives contre des pathogènes de poissons et de fruits de mer. L'activité antibactérienne est détectée en utilisant la technique des puits. n= nombre de bacteries isolées. 1: *Vibrio Tapetis*, 2: *Streptococcus B*, 3: *Staphylococcus ATCC*, 4: *Vibrio Anguillarum*, 5: *E.Coli ATCC*, 6: *Staphylococcus Aureus ATCC 6538*, 7: TH2, 8: *Pseudomonas Cephasia*, 9: *Staphylococcus*, 10: *Aeromonas hydrophila*, 11: *Salmonella Typhimurium*, 12: *Vibrio alginolyticus*, 13: *Candida albicans*, 14: *Pseudomonas aeruginosa*, 15: *E.Coli 0226*, 16: *Enterococcus faecalis*, 17: *E.Coli ATCC 8739*, 18: *Aureus Salmonicida*, 19: *Listeria innocua ATCC 33090*, 20: *Listeria monocytogenes CECT 4032*, 21: *Staphylococcus aureus ATCC 35845*, 22: *Escherichia coli CECT 4076*, 23: *Bacillus cereus ATCC 14893*.

### Analyse des spectres MALDI TOF-MS

Pour l'analyse des 18 spectres, des moyennes arithmétiques pour les valeurs m/z ont été calculées : la variabilité de masse est inférieure à  $\pm 5$  Da dans la gamme de masse au-dessus de 7000 Da ; et elle est inférieure à  $\pm 3$  Da dans la gamme de masse inférieure à 7000 Da. Les masses maximales de 4 ou 5 espèces spécifiques pourraient être définies. Ainsi, pour les spectres de *Enterococcus faecium*, 5 masses spécifiques de l'espèce sont notées :  $3644 \pm 1$ ,  $3881 \pm 2$ ,  $6341 \pm 2$ ,  $6510 \pm 2$  et  $7292 \pm 6$  m/z ; tandis que pour *E. mundtii*, trois masses spécifiques à l'espèce sont relevées :  $3441 \pm 2$ ,  $6480 \pm 3$  et  $7782 \pm 4$  m/z. Les profils protéomiques de l'espèce *E. faecalis*

étaient divergents de ceux décrits auparavant et présentent 4 masses spécifiques à l'espèce avec des valeurs m/z de  $3429 \pm 1$ ;  $4409 \pm 2$ ;  $6222 \pm 4$  et  $6671 \pm 2$ . D'autre part, les profils protéomiques de *Leuconostoc spp.* ont été analysés en utilisant la même stratégie. Un pic avec une masse de  $5915 \pm 2$  m/z est commun à toutes les espèces *Leuconostoc* et pourrait être considéré comme un pic spécifique au genre. Pour *Leuconostoc mesenteroides* les deux pics de masses spécifiques à l'espèce correspondent à  $5117 \pm 1$  et  $5424 \pm 3$  m/z, respectivement. Pour *Leuconostoc pseudomesenteroides* le seul pic de masse spécifique à l'espèce correspond à une valeur m/z de  $6222 \pm 7$  (Fig. 2).

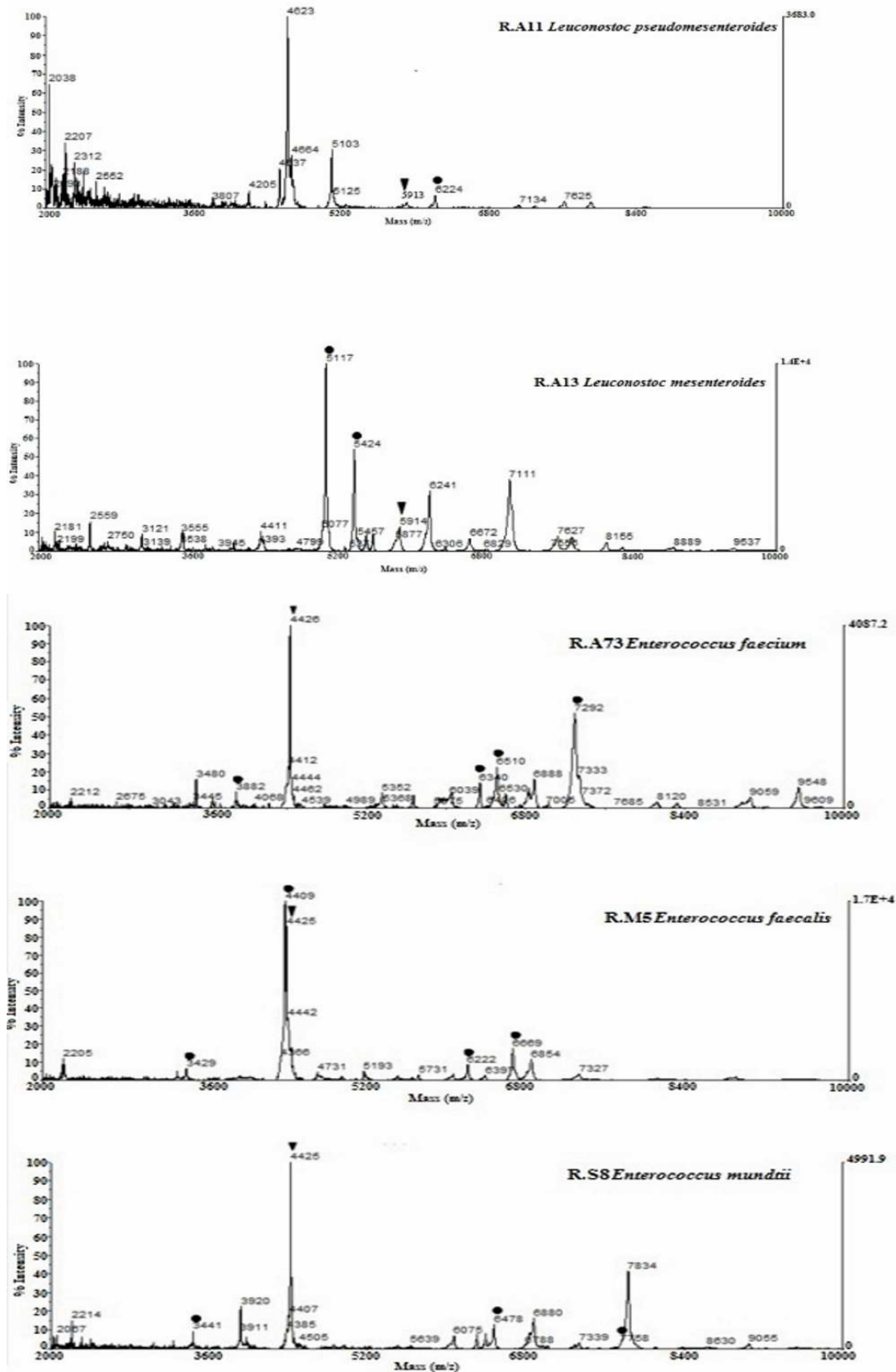


Figure 2. Spectres MALDI-TOF MS des espèces *Leuconostoc* (a) et *Enterococcus* (b). Les pics spécifiques à l'espèce sont indiqués par (●) et ceux spécifique au genre par (▼).

## DISCUSSION

La technique MALDI-TOF MS permet l'analyse des protéines solubles de faible masse moléculaire, qui sont extraites à partir de cellules entières de bactéries et permet l'identification bactérienne en quelques minutes avec une grande précision par rapport à l'analyse génétique de routine. Récemment, cette approche a été utilisée avec succès pour différencier les bactéries lactiques dans des aliments et des yaourts probiotiques (Tanigawa *et al.*, 2010 ; Angelakis *et al.*, 2011) conduisant à l'identification des sous-espèces (*Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* et *Streptococcus thermophilus*). La même stratégie a été employée avec succès pour identifier vingt-trois souches de bactéries lactiques isolées à partir de légumes et de viande fermentés (Nguyen *et al.*, 2013). Dans notre cas d'étude, nos données des spectres sont conformes aux travaux d'Andrés-Barrao *et al.*, (2013). Le pic de masse spécifique au genre *Leuconostoc sp.* a été observé à 5912,92 m/z. Une masse de pic caractéristique correspondant à 6225,18 m/z et deux masses correspondant à 5117,01 et 5424 m/z ont été spécifiquement détectées dans les profils protéomiques de *L. pseudomesenteroides* et *L. mesenteroides*, respectivement.

## CONCLUSION

Nous avons démontré que les espèces bactériennes peuvent être très bien discriminées par l'identification protéomique en utilisant la technique MALDI-TOF MS avec un intérêt d'application dans le contrôle des aliments et dans le secteur biomédical. Cette stratégie permet des gains de temps significatifs et n'a besoin que d'une petite quantité de matériel biologique pour réaliser avec succès (en quelques minutes et à un coût modéré) l'identification bactérienne.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été mené dans le cadre du projet transfrontalier BIOVecQ PS1.3\_08 co-financé par l'UE.

## BIBLIOGRAPHIE

- ANDRÉS-BARRAO C., BENAGLI C., CHAPPUIS M., ORTEGA PE'REZ R., TONOLLA M. and BARJA, F. (2013). Rapid identification of acetic acid bacteria using MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting. *Syst Appl Microbiol* 36(2): 75–81.
- ANGELAKIS E., MILLION M., HENRY M. and RAOULT, D. (2011). Rapid and accurate

bacterial identification in probiotics and yoghurts by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J. Food. Sci.* 76 : 568-71.

- BÖHME K., FERNÁNDEZ-NO I., BARROS-VELÁZQUEZ J., GALLARDO J.M., CALO-MATA P. and CAÑAS, B. (2010). Species differentiation of seafood spoilage and pathogenic Gram-negative bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting. *J. proteome. res.* 9 : 3169-3183.
- EHRMANN M.A., KURZAK P., BAUER J. and VOGEL R.F. (2002). Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J. Appl. Microbiol.* 92: 966-975.
- EL-JENI R, EL BOUR M, CALO-MATA P, BÖHME K, FERNÁNDEZ-NO INMACULADA C., BARROS-VELÁZQUEZ J, BOUHAOUALA-ZAHAR B. (2015). *In-vitro* probiotic profiling of novel *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc mesenteroides* from Tunisian freshwater fishes. *Canadian J. Microb.*(in press).
- FOOKS L.J., FULLER R. and GIBSON G.R. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int. Dairy. J.* 9: 53-61.
- NGUYEN D.T.L., VAN HOORDE K., CNOCKAERT M., DE BRANDT E., AERTS M., LE BINH T., and VANDAMME P. (2013). A description of the lactic acid bacteria microbiota associated with the production of traditional fermented vegetables in Vietnam. *Int. J. Food. Microbiol.* 163: 19-27.
- PETTI C.A., POLAGE C.R. and SCHRECKENBERGER, P. (2005). The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J. Clin. Microbiol.* 43: 6123-6125.
- SORO-YAO A.A., SCHUMANN P., THONART P., DJÈ K.M. and PUKALL, R. (2014). The use of MALDI-TOF Mass Spectrometry, Ribotyping and Phenotypic Tests to Identify Lactic Acid Bacteria from Fermented Cereal Foods in Abidjan (Côte d'Ivoire). *Open. Microbiol. J.* 18: 78-86.
- TANIGAWA K., KAWABATA H., WATANABE K. (2010). Identification and typing of *Lactococcus lactis* by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 4055-62.