

N° d'ordre : 2747

# THÈSE

présentée à

## L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DE SCIENCES DU VIVANT, GEOSCIENCES,  
SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

par Aurélie BALIARDA

POUR OBTENIR LE GRADE DE

## DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : SCIENCES DES ALIMENTS ET NUTRITION

\*\*\*\*\*

**EVALUATION DE LA REPONSE AU STRESS CHEZ  
LES BACTERIES LACTIQUES APPARTENANT AUX GENRES  
*PEDIOCOCCUS* ET *TETRAGENOCOCCUS*  
APPROCHES PHYSIOLOGIQUES ET GENETIQUES**

\*\*\*\*\*

Soutenue le : 5 Décembre 2003

Après avis de :

**Mme Monique ZAGOREC**, Directeur de Recherches, INRA Jouy-en-Josas  
**M Jacques FRERE**, Professeur, Université de Poitiers

**Rapporteur**  
**Rapporteur**

Devant la commission d'examen formée de :

**Mme Pierrette CASSAND**, Professeur, Université de Bordeaux 1  
**Mme Monique ZAGOREC**, Directeur de Recherches, INRA Jouy-en-Josas  
**M Jacques FRERE**, Professeur, Université de Poitiers  
**Mme Michèle CAPDEPUY**, Professeur, Université de Bordeaux 1  
**M Alain DESCHAMPS**, Professeur, Université de Bordeaux 1

**Présidente**  
**Rapporteur**  
**Rapporteur**  
**Examineur**  
**Examineur**



*A la mémoire de Didier Faure  
Maître de Conférences à l'ENITA de Bordeaux*



*Cette thèse a été réalisée à l'Institut des Sciences et Techniques des Aliments de Bordeaux au sein de l'Unité de Sécurité Microbiologique des Aliments dans le cadre d'une allocation de recherche de la région Aquitaine.*



## REMERCIEMENTS

*Je remercie Monsieur le Professeur Alain Deschamps pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, à l'Unité Sécurité Microbiologique des Aliments, et pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.*

*Je suis particulièrement reconnaissante à Mme Monique Zagorec, Directeur de Recherche à l'INRA de Jouy-en-Josas, et M. Jacques Frère, Professeur à l'Université de Poitiers, d'avoir accepté de juger mon travail en tant que rapporteurs ainsi que Mme Michèle Capdepuuy, Professeur à l'Université de Bordeaux 1, et Mme Pierrette Cassand, Professeur à l'ISTAB, d'avoir accepté d'examiner cette thèse.*

*Je tiens à remercier plus particulièrement Madame Claire Le Hénaff, Maître de Conférences à l'ISTAB d'avoir accepté la charge de Directrice de thèse et de m'avoir permis de mener à bien ce travail grâce à son soutien de chaque instant. J'adresse également ma profonde amitié à Hervé Robert qui m'a si gentiment « mis le pied à l'étrier ». Merci pour ton accueil, tes conseils avisés et ta contribution à ce travail.*

*Je ne saurais oublier Hélène Guyonne, Marjorie Saubusse, Sébastien Delgoulet, Isabel Chu et Ludovic Leloup pour leur aide précieuse dans la réalisation de ce travail, leur bonne humeur et leur soutien amical inébranlable.*

*Un grand merci aux membres, permanents et stagiaires, de l'USMA pour leur accueil, leur gentillesse, leur sympathie et leur soutien moral. J'adresse ici un vif remerciement à M. Roland Caubet pour sa participation si joyeuse à mon travail de thèse, et pour m'avoir fait partager son plaisir d'enseigner ainsi qu'aux autres personnes qui m'ont permis de participer à leurs enseignements. Mes remerciements s'adressent aussi à Mme Caubet-Pederos, son soutien et sa gentillesse ont été un appui et un réconfort précieux pour moi. Merci à Maria, Issam, Isabelle, Sandra, Veerle, Ludivine, Diana, Xavier, Ali, Yndra, Laurent, Claude, Bertrand, Céline...*

*Je voudrais également remercier tout ceux qui ont été à mes côtés durant ces années de thésarde, mes amis et mes proches : Nadège & JB, Seb, Hélène, Pierre-François, Muriel, Loïc, Alexandre, Marjorie & Christophe, Sébastien, Lulu, Danièle & Pierre, Vincent, Gaëlle & Eric et leurs filles... et tous ceux que j'oublie aujourd'hui.*





*Enfin, je souhaiterais exprimer ma profonde gratitude à Richard et ma famille. Ils ont été mes souffre-douleur (bien malgré eux) mais surtout mes soutiens les plus précieux dans la réalisation de ce travail.*



# ABREVIATIONS

## ✓ Noms de Genres bactériens :

*B.* : *Bacillus*  
*Br.* : *Brevibacterium*  
*C.* : *Corynebacterium*  
*Ca.* : *Carnobacterium*  
*E.* : *Escherichia*  
*Ect.* : *Ectothiorhodospira*  
*Ent.* : *Enterococcus*  
*H.* : *Halomonas*  
*L.* : *Listeria*  
*P.* : *Pediococcus*  
*Ps.* : *Pseudomonas*  
*S.* : *Staphylococcus*  
*Si.* : *Sinorhizobium*  
*St.* : *Streptococcus*  
*T.* : *Tetragenococcus*  
*Lb.* : *Lactobacillus*  
*Lc.* : *Lactococcus*  
*Leuc.* : *Leuconostoc*  
*O.* : *Oenococcus*

## ✓ Unités de mesures:

atm : atmosphère  
bq : becquerel  
°C : degré Celsius  
Da, kDa : Dalton, kiloDalton  
g : accélération de la pesanteur  
g, mg : gramme, milligramme  
h : heure  
L, mL, µL : litre, millilitre, microlitre  
M, mM : molaire, millimolaire  
min : minutes  
nt : nucléotide  
osm : osmole  
pb, kb : paire de base, kilo paire de base  
ppm : partie par million  
p/v : poids par volume  
sec, msec : seconde, milliseconde  
µS : microSiemens  
v/v : volume par volume

## ✓ Osmoprotectants :

BB :  $\gamma$ -butyrobétaïne  
Car : carnitine  
CB : crotonobétaïne  
Cho : choline  
DMG : diméthylglycine  
DMSA : diméthylsulfonioacétate  
DMSP : diméthylsulfoniopropionate  
Ect : ectoïne  
GB : glycine bétaïne  
HB : homobétaïne  
Pro : proline  
PB : proline bétaïne  
PIP : L-pipécolate  
Tau : taurine

## ✓ Sigles :

aa : acide aminé  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ADN<sub>C</sub> : acide désoxyribonucléique complémentaire  
ADN<sub>R</sub> : acide désoxyribonucléique ribosomal  
Amp : ampicilline  
ARN : acide ribonucléique  
ARN<sub>R</sub> : acide ribonucléique ribosomique  
ARN<sub>m</sub> : acide ribonucléique messager  
ATCC : American Type Culture Collection  
a<sub>w</sub> : activité de l'eau  
BET : bromure d'éthidium  
CCM : chromatographie sur couche mince  
CIP : Collection de l'Institut Pasteur  
CMI : concentration minimale inhibitrice  
CNRZ : Centre National de la Recherche Zootechnique  
DSC : differential scanning calorimetry  
DEPC : diéthylpyrocarbonate  
dNTP : desoxynucléotides  
DM : définate medium  
DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen  
DO<sub>600nm</sub> : densité optique à 600nm  
EDTA : acide diamine-éthylène-tétra-acétique  
EtOH : éthanol



GSP : general stress protein : protéine générale de stress  
IPTG : isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside  
JCM : Japanese Collection Microorganisms  
Km : constante d'affinité  
LB : Luria-Bertani  
L-ATR : Acid Tolerance Response  
MGM : microorganisme génétiquement modifié  
MRS : de Man, Rogosa et Sharpe  
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide  
NCBI : National Center for Biotechnology Information  
NCDO : National Collection of Dairy Organisms  
NCIMB : National Center of Industrial & Marine Bacteria  
OGM : organisme génétiquement modifié  
ORF : open reading frame : cadre ouvert de lecture  
PCR : polymerisation chain reaction : réaction de polymérisation en chaîne  
PM : poids moléculaire  
RF : rate of flow : constante de migration  
RMN : résonance magnétique nucléaire  
RNase : ribonucléase  
RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction :  
transcription inverse- réaction de polymérisation en chaîne  
SDS : dodécyl-sulfate de sodium  
SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis : électrophorèse  
en gel d'acrylamide condition dénaturante  
SSC : tampon citrate de sodium  
ssp. : sous espèce  
TE : tampon Tris-EDTA  
TBE : Tris-Borate-EDTA  
Tm : température de fusion  
Tris : tri-hydroxy-méthyl-éthylène diamide  
TDD : time to detect : temps de détection  
UFC : unité formant colonie  
USMA : Unité Sécurité Microbiologique des Aliments  
UV : ultra violet  
Vm : vitesse maximale  
VNC : viable non cultivable  
X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D galactoside (substrat de la  $\beta$ -  
galactosidase)  
 $\mu$  : taux népérien de croissance ( $h^{-1}$ )



## FIGURES ET TABLEAUX

✓ Figures :

<b>Figure<sub>(i)</sub> 1</b>	Arbre phylogénétique des bactéries lactiques	18	<b>Figure<sub>(i)</sub> 16</b>	Représentation schématique des différents paramètres physiologiques impliqués dans l'osmosensing chez une bactérie à Gram positif	70
<b>Figure<sub>(i)</sub> 2</b>	Modélisation des effets de trois stress sur la croissance, la survie et la mortalité cellulaire.	32	<b>Figure<sub>(i)</sub> 17</b>	Modèle d'activation de BetP chez <i>C. glutamicum</i> en condition hyper-osmotique	71
<b>Figure<sub>(i)</sub> 3</b>	Modélisation de la mort microbienne par une loi exponentielle	34	<b>Figure<sub>(ii)</sub> 1</b>	Effets de la croissance des microorganismes sur la conductance du milieu de culture	78
<b>Figure<sub>(i)</sub> 4</b>	Détermination graphique de la valeur z	35	<b>Figure<sub>(ii)</sub> 2</b>	Représentation graphique reliant les valeurs de numération cellulaire (quatre dilutions décimales différentes de l'échantillon) aux valeurs des temps de détection [UFC/mL=f(TDD)] permettant d'estimer l'activité métabolique de la population par calcul de la pente.	78
<b>Figure<sub>(i)</sub> 5</b>	Modèle de l'hétérogénéité intra-population selon Booth (2002).	46	<b>Figure<sub>(ii)</sub> 3</b>	Modélisation du protocole d'adaptation-challenge au stress létaux en milieu MRS	80
<b>Figure<sub>(i)</sub> 6</b>	Représentation des flux d'eau durant la croissance dans des conditions d'équilibre osmotique, de choc hyper-osmotique et de choc hypo-osmotique	47	<b>Figure<sub>(ii)</sub> 4</b>	Modélisation du protocole d'adaptation-challenge au stress sub-optimaux en milieu DM	81
<b>Figure<sub>(i)</sub> 7</b>	Effet de l'osmolarité sur la structure d'une protéine d'une Halobactérie	46	<b>Figure<sub>(iii)</sub> 1</b>	Arbre phylogénétique consensus des transporteurs BCCT	98
<b>Figure<sub>(i)</sub> 8</b>	Représentation de la stabilisation de la structure d'une protéine d'une Halobactérie à forte osmolarité	54	<b>Figure<sub>(iii)</sub> 2</b>	Stratégie d'inverse PCR suivie pour poursuivre le séquençage de l'opéron <i>opuA</i> de <i>T. halophila</i>	105
<b>Figure<sub>(i)</sub> 9</b>	Représentation schématique d'un transporteur actif primaire de type ABC	56	<b>Figure<sub>(iii)</sub> 3</b>	Effet de l'osmolarité sur l'expression des gènes de transport de la glycine bêtaïne ( <i>butA</i> et <i>opuA</i> ) chez <i>T. halophila</i>	106
<b>Figure<sub>(i)</sub> 10</b>	Origine des solutés compatibles accumulés par les bactéries présentes dans les aliments	58	<b>Figure<sub>(iii)</sub> 4</b>	Proposition d'équipement en systèmes de transport de GB chez <i>T. halophila</i> .	108
<b>Figure<sub>(i)</sub> 11</b>	Représentation schématique du locus codant la machinerie protéique de la voie choline-glycine bêtaïne chez <i>Staphylococcus xylosum</i> CA2 et des loci homologues à <i>cud</i> chez deux souches de <i>Staphylococcus aureus</i> ssp. <i>aureus</i> différentes	60	<b>Figure<sub>(iii)</sub> 5</b>	Définitions des amorces <i>abc1</i> , <i>abc2</i> , <i>abc3</i> (A) et Perm F, PermR (B) et visualisation des amplifiats PCR Perm F + PermR (1C), <i>abc1</i> + <i>abc2</i> (2C) et <i>abc1</i> + <i>abc3</i> (3C et 4C) après migration électrophorétique en gel d'agarose 1%	123
<b>Figure<sub>(i)</sub> 12</b>	Présentation de l'organisation de l'opéron <i>opuC</i> de <i>L. monocytogenes</i> EGD et des homologies protéiques (présentées en parenthèse) de chaque composant avec ceux d' <i>OpuC</i> et d' <i>OpuB</i> de <i>B. subtilis</i>	62	<b>Figure<sub>(iii)</sub> 6</b>	Alignement des séquences nucléotidiques des fragments <i>abc1+abc2</i> obtenues à partir des ADNs génomiques de <i>T. halophila</i> , <i>Ca. piscicola</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> avec la portion du génome de <i>Lc. lactis</i> correspondante	124
<b>Figure<sub>(i)</sub> 13</b>	Voie de biosynthèse de proline chez <i>L. monocytogenes</i> (A) et impacts de mutations dans l'opéron <i>proBA</i> sur la synthèse de proline (B et C)	63	<b>Figure<sub>(iii)</sub> 7</b>	Effets de différents stress sur les paramètres de croissance de <i>P. pentosaceus</i> ATCC 33316 en milieu DM	129
<b>Figure<sub>(i)</sub> 15</b>	Représentation schématique des systèmes de transport de solutés compatibles chez quelques bactéries à Gram positif	67			





<b>Figure<sub>(III)</sub> 8</b>	Effet du sel sur la croissance de <i>P. pentosaceus</i> et la viabilité de <i>P. pentosaceus</i> en phase stationnaire	130	<b>Figure<sub>(III)</sub> 25</b>	Comparaison de l'effet de différentes intensités de stress éthanologique sub-létal sur la croissance de <i>P. pentosaceus</i> ATCC33316 et de son dérivé curé en milieu MRS	149
<b>Figure<sub>(III)</sub> 9</b>	Effets de divers stress de type choc (de nature, d'intensité et de durée différentes) sur la mortalité de cellules de <i>Pediococcus pentosaceus</i> prélevées en phase exponentielle de croissance.	131	<b>Figure<sub>(III)</sub> 26</b>	Comparaison de l'effet de différentes intensités de stress thermique sub-létal sur la croissance de <i>P. pentosaceus</i> ATCC33316 et de son dérivé curé en milieu MRS	149
<b>Figure<sub>(III)</sub> 10</b>	Microcolonies observées après un choc thermique (53°C pendant 1 h en milieu MRS) appliqué sur des cellules de <i>P. pentosaceus</i> en phase exponentielle de croissance.	133	<b>Figure<sub>(III)</sub> 27</b>	Comparaison de l'effet de différentes intensités de stress osmotique sub-létal sur la croissance de <i>P. pentosaceus</i> ATCC33316 et de son dérivé curé en milieu MRS	149
<b>Figure<sub>(III)</sub> 11</b>	Effet d'un stress thermique létal intense sur l'activité métabolique de <i>P. pentosaceus</i>	134	<b>Figure<sub>(III)</sub> 28</b>	Comparaison de l'effet de différentes intensités de stress acide sub-létal sur la croissance de <i>P. pentosaceus</i> ATCC33316 et de son dérivé curé en milieu MRS	149
<b>Figure<sub>(III)</sub> 12</b>	Effet d'un stress thermique létal intense sur l'activité métabolique et la viabilité de <i>P. pentosaceus</i>	134	<b>Figure<sub>(III)</sub> 29</b>	Mortalité exercée par différents stress létaux intenses en milieu MRS sur <i>P. pentosaceus</i> ATCC 33316 (bleu) et de son dérivé curé (bordeaux)	151
<b>Figure<sub>(III)</sub> 13</b>	Détermination de l'intensité et de la durée du stress adaptatif à imposer à <i>P. pentosaceus</i> ATCC33316 pour améliorer la croissance de la bactérie en milieu CD dans des conditions de stress sub-optimal	138	<b>Figure<sub>(III)</sub> 30</b>	Comparaison des facteurs de tolérance de <i>P. pentosaceus</i> ATCC33316 et de son dérivé curé vis-à-vis d'un challenge salin de 20h et de 40h en MRS	152
<b>Figure<sub>(III)</sub> 14</b>	Comparaison des facteurs de variation de croissance pendant les trois premières heures en milieu DM +7,25% éthanol (A), DM pH 3,6 (B), DM à 42°C (C) DM+1,05 M NaCl (D) induit par différentes adaptations (saline : DM+0,7M NaCl ; acide : DM pH 5,1 ; éthanologique : DM+ 5,25% éthanol (v/v) ; thermique : DM à 38°C)	139	<b>Figure<sub>(III)</sub> 31</b>	Gènes portés par pAB10 : un cadre ouvert de lecture codant une protéine de 197 aa homologue à plusieurs recombinaisons/invertases	153
<b>Figure<sub>(III)</sub> 15</b>	Profil de migration d'un extrait d'ADN plasmidique issu de <i>P. pentosaceus</i> ATCC33316 (mélange des plasmides pAB10 et pAB37)	144	<b>Figure<sub>(III)</sub> 32</b>	Séquence partielle de l'insert de pAB37 (fragment <i>PstI/PstI</i> de 7 kb) comportant une région homologue à d'autres plasmides de Pédicoques et un cadre ouvert de lecture codant une protéine de 82 aa homologue à YmgJ de <i>Lc. lactis</i>	154
<b>Figure<sub>(III)</sub> 16</b>	Profils de restriction du mélange pAB10/pAB37 à <i>EcoRV</i> et <i>PstI</i>	144	<b>Figure<sub>(III)</sub> 33</b>	Organisation des opérons codant les protéines de stress de la famille GlS24	154
<b>Figure<sub>(III)</sub> 17</b>	Carte de restriction de l'insert de 10 kb de pA541	144	<b>Figure<sub>(III)</sub> 34</b>	Carte de restriction des inserts <i>PstI</i> des plasmides pA <sub>551</sub> (A), pA <sub>555</sub> (B) et pA <sub>559</sub> (C) à <i>HindIII</i> .	156
<b>Figure<sub>(III)</sub> 18</b>	Vérification de l'origine plasmidique du fragment de 10 kb cloné dans le vecteur pA541 par Southern Blot	144			
<b>Figure<sub>(III)</sub> 19</b>	Etablissement de la carte de restriction de l'insert de 7 kb de pA570	145			
<b>Figure<sub>(III)</sub> 20</b>	Vérification de l'origine plasmidique du fragment de 7 kb cloné dans le vecteur pA570 par Southern Blot	146			
<b>Figure<sub>(III)</sub> 21</b>	Carte de restriction des plasmides pAB10 et pAB37	146			
<b>Figure<sub>(III)</sub> 22</b>	Profil de migration électrophorétique d'un aliquote des extraits d'ADN plasmidique et chromosomique issus de la souche <i>P. pentosaceus</i>	147			
<b>Figure<sub>(III)</sub> 23</b>	Suivi de la croissance de <i>P. pentosaceus</i> ATCC 33316 et de son dérivé curé en milieu MRS et en MRS dilué	148			
<b>Figure<sub>(III)</sub> 24</b>	Suivi de la croissance de <i>P. pentosaceus</i> ATCC 33316 et de son dérivé curé en milieu MRS et en milieu DM	149			



✓ Tableaux :

<b>Tableau<sub>(I)</sub> I</b>	Exemples de produits fermentés ; pays d'origine et microorganisme dominant la fermentation	17	<b>Tableau<sub>(I)</sub> XIX</b>	Principaux solutés compatibles accumulés soit par synthèse endogène soit par transport chez différentes bactéries.	53
<b>Tableau<sub>(I)</sub> II</b>	Principales caractéristiques biologiques et métaboliques des bactéries lactiques	18	<b>Tableau<sub>(I)</sub> XX</b>	Propriétés des systèmes de transport de solutés compatibles des deux bactéries modèles <i>B. subtilis</i> et <i>E. coli</i>	58
<b>Tableau<sub>(I)</sub> III</b>	Principaux producteurs de ferments pour l'industrie agroalimentaire	19	<b>Tableau<sub>(I)</sub> XXI</b>	Mécanismes d'accumulation d'osmoprotectants chez <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>C. glutamicum</i> , <i>Lc. lactis</i> et <i>Lb. plantarum</i>	59
<b>Tableau<sub>(I)</sub> IV</b>	Flore d'altération des poissons conservés congelés ou sur glace	20	<b>Tableau<sub>(I)</sub> XXII</b>	Comparaison des paramètres de croissance utilisés pour évaluer les activités de transport chez deux souches de <i>L. monocytogenes</i>	63
<b>Tableau<sub>(I)</sub> V</b>	Les principaux microorganismes responsables de toxico-infection alimentaire	21	<b>Tableau<sub>(I)</sub> XXIII</b>	Mécanisme d'osmosensing : paramètres « sous surveillance » et signaux de déclenchement de la réponse au stress osmotique	70
<b>Tableau<sub>(I)</sub> VI</b>	Exemples d'application des bactéries lactiques productrices de bactériocine dans différents produits alimentaire	23	<b>Tableau<sub>(II)</sub> I</b>	Souches bactériennes et vecteurs plasmidiques utilisés lors de cette étude	75
<b>Tableau<sub>(I)</sub> VII</b>	Tests évaluant l'innocuité des bactéries lactiques probiotiques	24	<b>Tableau<sub>(II)</sub> II</b>	Amorces utilisées lors de cette étude	81
<b>Tableau<sub>(I)</sub> VIII</b>	Projets de séquençage des génomes de bactéries lactiques	25	<b>Tableau<sub>(II)</sub> III</b>	Adresses des sites Internet utilisés pour accéder aux génomes des bactéries lactiques étudiées (génomome séquencé ou en cours de séquençage)	93
<b>Tableau<sub>(I)</sub> IX</b>	Exemples d'informations portées par différents plasmides de bactéries lactiques	25	<b>Tableau<sub>(III)</sub> I</b>	Estimation des CMI en NaCl en milieu MRS chez différentes bactéries lactique	111
<b>Tableau<sub>(I)</sub> X</b>	Exemples de systèmes de modification génique de type « Food Grade »	28	<b>Tableau<sub>(III)</sub> II</b>	Estimation des CMI en NaCl chez différents Pédicoques en milieu MRS	111
<b>Tableau<sub>(I)</sub> XI</b>	Origines alimentaires des différentes souches de <i>Pediococcus pentosaceus</i> décrites à ce jour.	30	<b>Tableau<sub>(III)</sub> III</b>	Recherche des systèmes de transport de glycine bêtaïne chez les bactéries lactiques étudiées	123
<b>Tableau<sub>(I)</sub> XII</b>	Techniques de biologie moléculaire permettant l'identification inter- et intra-espèce chez les Pédicoques	30	<b>Tableau<sub>(III)</sub> IV</b>	Bilan de la recherche de transporteur de glycine bêtaïne chez les bactéries lactiques étudiées soit par PCR soit par analyse informatique des génomes	125
<b>Tableau<sub>(I)</sub> XIII</b>	Valeurs D et z de quelques bactéries pathogènes	34	<b>Tableau<sub>(III)</sub> V</b>	Choix des paramètres de stress létal modéré (stress adaptatif) et intense (stress de challenge)	135
<b>Tableau<sub>(I)</sub> XIV</b>	pH approximatifs de quelques produits alimentaires	36	<b>Tableau<sub>(III)</sub> VI</b>	Protections homologues et hétérologues au stress de type choc	135
<b>Tableau<sub>(I)</sub> XV</b>	a <sub>w</sub> approximatifs de quelques produits alimentaires	36	<b>Tableau<sub>(III)</sub> VII</b>	Choix des paramètres d'adaptation avant inoculation en condition de stress sub-optimal	139
<b>Tableau<sub>(I)</sub> XVI</b>	Tolérance au froid des bactéries pathogènes rencontrées dans les aliments	36	<b>Tableau<sub>(III)</sub> VIII</b>	Bilan de l'analyse par digestion enzymatique des 27 clones issus de la banque d'ADN plasmidique de <i>P. pentosaceus</i> ATCC33316 à <i>Pst</i> I.	144
<b>Tableau<sub>(I)</sub> XVII</b>	Phénomène de protections homologue et hétérologue chez les bactéries lactiques	38	<b>Tableau<sub>(III)</sub> IX</b>	Recherche de protéines homologues à la protéine putative de 197 aa codée par pAB10	153
<b>Tableau<sub>(I)</sub> XVIII</b>	Structure des principaux solutés compatibles	53			



# SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	15
--------------------	----

## PARTIE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### CHAPITRE I : LES MICROORGANISMES ET LES ALIMENTS

I) LES ALIMENTS FERMENTES.....	17
II) LES AUXILIAIRES TECHNOLOGIQUES : EXEMPLE DES BACTÉRIES LACTIQUES .....	18
A) Généralités sur les bactéries lactiques .....	18
1) Caractéristiques principales et utilisations .....	18
2) Les bactéries lactiques et la sécurité alimentaire.....	18
3) Production de bactéries lactiques pour l'industrie agroalimentaire.....	19
B) Rôles des bactéries dans la préservation des aliments.....	19
1) Les contaminants présents dans l'aliment .....	19
a) Les flores d'altération de l'aliment .....	19
b) Les microorganismes pathogènes.....	21
2) Les molécules à activité antimicrobienne et/ou antifongique synthétisées par les bactéries lactiques .....	21
C) Les probiotiques.....	23
III) BACTÉRIES LACTIQUES : OUTILS GÉNÉTIQUES ET FUTURS DÉVELOPPEMENTS .....	24
A) Les avancées en matière de génétique.....	24
B) Objectifs des nouveaux développements en fermentation alimentaire .....	25
1) Réduire les contaminations à microorganismes pathogènes et sécuriser les produits .....	26
2) Mieux maîtriser la préparation des levains et les procédés de fermentation.....	26
3) Augmenter la valeur ajoutée des produits fermentés en développant de nouvelles applications .....	26
4) Législation et technologie de l'ADN recombinant .....	28
IV) LES DEUX BACTÉRIES LACTIQUES ÉTUDIÉES LORS DE CE TRAVAIL DE THÈSE : <i>TETRAGENOCOCCUS HALOPHILA</i> ET <i>PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS</i> .....	29
A) <i>Tetragenococcus halophila</i> .....	29
B) <i>Pediococcus pentosaceus</i> .....	29

### CHAPITRE II : STRESS ET BACTÉRIES DE L'ALIMENT

I) STRESS ET GÉNÉRALITÉS.....	32
A) Définitions .....	32
B) Modalités d'application du stress.....	33
1) Stress prolongé.....	33
2) Stress de type choc.....	34
II) LES CONTRAINTES RENCONTRÉES EN AGROALIMENTAIRE .....	35
A) Flores microbiennes des aliments soumises aux contraintes.....	35
1) Les flores d'altération/pathogène.....	35
2) Les flores technologiques .....	36
B) Effets du stress sur les bactéries rencontrées dans l'aliment.....	37
1) Effets sur la croissance / survie / morphologie des cellules .....	37
2) Effets sur la virulence des bactéries pathogènes .....	37
3) Adaptation au stress.....	38
III) LA RÉPONSE AU STRESS.....	39
A) Modalités de réponses à quelques stress unitaires.....	39
1) Contrainte thermique .....	39
2) Contrainte acide ou basique .....	42
3) Contrainte osmotique.....	43
4) Contrainte oxydative.....	43
B) Les régulateurs globaux de la réponse au stress.....	44

### CHAPITRE III : LE STRESS OSMOTIQUE CHEZ LES BACTÉRIES DE L'ALIMENT

I) GÉNÉRALITÉS.....	45
A) Osmose et stress osmotique.....	45
1) Définition de l'osmose .....	45
2) Les mouvements d'eau et la pression de turgescence.....	45
3) La notion de stress osmotique .....	45



4)	L'effet du stress osmotique sur la cellule bactérienne.....	46
a)	Environnement hypo-osmotique.....	46
b)	Environnement hyper-osmotique.....	46
B)	Mécanismes d'osmorégulation.....	46
1)	Choc hyper-osmotique.....	47
a)	La stratégie des bactéries halophiles : « salt in cytoplasm ».....	47
b)	L'accumulation intracellulaire de solutés osmotiquement actifs.....	48
i)	La réponse primaire.....	48
ii)	La réponse secondaire.....	49
c)	Autres mécanismes n'impliquant pas une accumulation d'osmoprotectants.....	49
i)	Les porines de la membrane externe.....	49
ii)	L'ajustement membranaire.....	49
iii)	Les MDOs.....	50
iv)	Les osmoprotectants non accumulés.....	50
2)	Choc hypo-osmotique.....	51
a)	Efflux d'eau.....	51
b)	Efflux de solutés compatibles.....	51
II)	LES SOLUTES COMPATIBLES : UN MOYEN DE REPOSE AU STRESS HYPER-OSMOTIQUE.....	52
A)	Les solutés compatibles.....	52
B)	Modalité d'accumulation des solutés compatibles.....	55
1)	La synthèse d'osmoprotectants.....	55
2)	Le transport d'osmoprotectants.....	55
C)	Accumulation des solutés compatibles par transport.....	56
1)	Les systèmes de transport actif primaire : les transporteurs ABC.....	56
2)	Les systèmes de transport actif secondaire.....	57
III)	REPOSE A LA CONTRAINTE OSMOTIQUE CHEZ QUELQUES BACTERIES A GRAM POSITIF RENCONTREE EN ALIMENTAIRE.....	58
A)	LES SOLUTES COMPATIBLES PRESENTS DANS L'ALIMENT.....	58
B)	L'ACCUMULATION D'OSMOPROTECTANTS.....	59
1)	Chez <i>S. aureus</i> .....	59
2)	Chez <i>L. monocytogenes</i> .....	61
3)	Chez <i>C. glutamicum</i> .....	64
4)	Chez les bactéries lactiques.....	66
a)	Chez <i>Lc. lactis</i> .....	66
b)	Chez <i>Lb. plantarum</i> .....	66
c)	Chez <i>T. halophila</i> .....	67
C)	LA REGULATION DE L'ACCUMULATION D' OSMOPROTECTANTS.....	68
1)	Régulation transcriptionnelle du transport des solutés compatibles.....	68
a)	Régulation de l'expression de <i>busA</i> par BusR.....	68
b)	Régulation de l'expression de <i>opuC</i> de <i>L. monocytogenes</i> par $\sigma^B$ .....	69
2)	Activation des systèmes de réponse : perception et transmission du signal stress.....	69
a)	Perception directe /indirecte du signal de stress osmotique.....	70
b)	Nature du signal.....	70
c)	Localisation de la région protéique responsable de la perception.....	71
3)	Inhibition du transport des solutés compatibles par rétro-contrôle.....	71
IV)	CONCLUSION : STRESS OSMOTIQUE ET EFFETS INDUITS.....	72
A)	Effets liés à la présence de sels / d'osmoprotectants.....	72
B)	Effets d'une contrainte osmotique via l'activation de régulateurs centraux.....	73

## PARTIE 2 :MATERIELS & METHODES

I)	MATERIEL BIOLOGIQUE.....	75
II)	MILIEUX DE CULTURE.....	75
A)	MRS.....	75
B)	LB.....	75
C)	DM.....	75
D)	M63.....	76
E)	SOC.....	76
F)	WIB.....	77





III)	ESTIMATION DE LA CONCENTRATION ET DE L'ACTIVITE MICROBIENNES .....	77
A)	Turbidimétrie.....	77
B)	Dénombrement des cellules viables sur gélose MRS.....	77
C)	Estimation de l'activité microbienne par impédancemétrie.....	77
1)	Principe.....	77
2)	Protocole.....	78
3)	Expression des résultats.....	78
D)	Estimation de la concentration minimale inhibitrice.....	78
IV)	PROTOCOLES D'APPLICATION DES STRESS .....	79
A)	Préparation de cellules en phase exponentielle.....	79
B)	Application d'un stress modéré léthal chez <i>P. pentosaceus</i> : développement d'une protection vis-à-vis d'un stress léthal intense en milieu riche .....	79
1)	Détermination de la létalité de différentes contraintes .....	80
2)	Procédure d'adaptation-challenge en MRS (Figure (iii) 3).....	80
C)	Amélioration de la croissance en conditions sub-optimales par une préadaptation des cellules au stress .....	80
1)	Croissance en milieu DM en situation de contrainte .....	81
2)	Définition des paramètres de stress sub-optimaux .....	81
3)	Expression des résultats.....	81
V)	TECHNIQUES DE BIOCHIMIE .....	82
A)	Analyses qualitative et quantitative des solutés compatibles accumulés en situation de contrainte hyper-osmotique.....	82
1)	Mesure de la capacité osmoprotectrice de certains composés .....	82
2)	Extraction hydro-alcoolique des solutés organiques intracellulaires.....	82
3)	Identification des solutés compatibles accumulés .....	82
a)	Par RMN du <sup>13</sup> C .....	82
b)	Par chromatographie sur couche mince.....	82
4)	Mesures du transport de solutés compatibles.....	83
a)	Mesure de l'activité globale de transport .....	83
b)	Mesure de la compétition de transport entre les molécules transportées.....	83
B)	Immunodétection des protéines OpuCA.....	83
1)	Préparation des extraits protéiques .....	83
2)	Estimation de la concentration protéique des extraits .....	84
3)	Technique d'immunoempreintes.....	84
VI)	TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	85
A)	Extraction et quantification des acides nucléiques .....	85
1)	Extraction d'ADN génomique (d'après Luchansky <i>et al.</i> , 1991).....	85
2)	Extraction d'ADN plasmidique.....	85
a)	A partir d' <i>Escherichia coli</i> .....	85
b)	A partir de <i>Pediococcus pentosaceus</i> (d'après Giacomini <i>et al.</i> , 2000) .....	85
3)	Extraction et traitement des ARNs totaux .....	86
a)	Protocole optimisé d'après Cavin <i>et al.</i> , 1997 .....	86
b)	Protocole simplifié : NucleoSpin® RNA II .....	86
c)	Traitement des ARNs totaux.....	87
4)	Quantification des acides nucléiques.....	87
B)	Curage à la novobiocine de <i>P. pentosaceus</i> ATCC33316.....	87
C)	Utilisations d'enzymes, clonages et transformations.....	88
1)	Enzymes .....	88
2)	Préparation de matrice pour la PCR inverse.....	88
3)	Clonage.....	88
a)	A partir de fragments de restriction.....	88
i)	Réalisation de banques chromosomiques de <i>T. halophila</i> .....	88
ii)	Réalisation de banques plasmidiques de <i>P. pentosaceus</i> .....	88
b)	A partir d'amplifiats PCR (cf § VI. D.).....	89
4)	Transformation d' <i>E. coli</i> et sélection des transformants.....	89
a)	Préparation et transformation de cellules thermocompétentes d' <i>E. coli</i> .....	89
b)	Transformation d' <i>E. coli</i> par électroporation .....	89
i)	Mini-dialyse .....	89
ii)	Préparation et transformation de cellules électrocompétentes d' <i>E. coli</i> .....	89
c)	Sélection des transformants.....	90



D)	PCR (Polymerase Chain Reaction) et PCR inverse .....	90
1)	Conditions standard.....	90
2)	Conditions particulières.....	90
a)	PCR sur colonies.....	90
b)	Oligonucléotides dégénérés.....	91
c)	PCR inverse .....	91
E)	Electrophorèses en gel d'agarose.....	91
1)	Electrophorèse des fragments d'ADN.....	91
2)	Electrophorèse des ARNs en conditions dénaturantes.....	91
F)	Techniques d'hybridation ADN/ADN : Hybridation selon Southern (1975).....	92
1)	Transfert sur membrane.....	92
2)	Marquage de la sonde et hybridation .....	92
G)	Suivi d'expression génique par Reverse Transcription-PCR (RT-PCR).....	92
1)	Etape de RT .....	92
2)	Protocole de suivi d'induction en situation de stress (RT-PCR en deux étapes).....	93
H)	Séquençage de l'ADN et traitements informatiques .....	93

### PARTIE 3 :RESULTATS & DISCUSSION

I)	EQUIPEMENT DE <i>T. HALOPHILA</i> EN TRANSPORTEURS DE GB .....	95
A)	Situation des travaux en début de thèse.....	95
B)	Orientation des travaux .....	96
C)	Résultats (résumé de l'article n°1).....	97
1)	Caractérisation de ButA .....	97
a)	Définition du cadre ouvert de lecture du gène <i>butA</i> .....	97
b)	ButA : une perméase de type BCCT spécifique de la GB.....	97
c)	Expression de <i>butA</i> en fonction de l'osmolarité chez <i>E. coli</i> .....	98
2)	Présence d'un système de transport de GB de type OpuA chez <i>T. halophila</i> .....	104
a)	Démarche expérimentale .....	104
b)	Résultats .....	105
3)	Régulation de l'expression d' <i>opuAA</i> par l'osmolarité.....	106
4)	Existe-il un troisième transporteur de GB chez <i>T. halophila</i> ?.....	107
D)	Conclusions et perspectives .....	109
II)	OSMOREGULATION CHEZ <i>P. PENTOSACEUS</i> : TOLERANCE AU SEL ET OSMOPROTECTANTS POTENTIELS .....	111
A)	Effet d'un stress hyper-osmotique sur la croissance de <i>P. pentosaceus</i> et d'autres bactéries lactiques .....	111
B)	Identification des osmoprotectants chez <i>P. pentosaceus</i> (article n°2).....	112
C)	Conclusions et perspectives .....	121
III)	DIVERSITE DES SYSTEMES PUTATIFS DE TRANSPORT DE GB CHEZ LES BACTERIES LACTIQUES .....	122
A)	Recherche de gènes homologues à <i>butA</i> par PCR .....	123
B)	Recherche de transporteurs de type OpuA/BusA.....	124
C)	Autres transporteurs de GB chez les bactéries lactiques .....	124
D)	Cas du transporteur putatif de choline et de GB ChoQ/S .....	125
E)	Conclusions et perspectives .....	126
I)	CHOIX DES PARAMETRES DE STRESS .....	127
A)	Nature des stress .....	127
B)	Intensité des stress.....	127
C)	Influence du milieu de culture.....	128
D)	Méthodes d'évaluation de l'impact des stress .....	128
II)	STRESS SUB-OPTIMAL CHEZ <i>P. PENTOSACEUS</i> .....	128
A)	Détermination des conditions de stress sub-optimal .....	128
B)	Croissance en situation de stress sub-optimal et survie de <i>P. pentosaceus</i> .....	130
III)	LE STRESS DE TYPE CHOC CHEZ <i>P. PENTOSACEUS</i> : SURVIE CELLULAIRE ET ACTIVITE METABOLIQUE .....	131
A)	Effet d'un choc sur la viabilité de <i>P. pentosaceus</i> (MRS).....	131
B)	Effet d'un choc léthal sur l'activité métabolique de <i>P. pentosaceus</i> .....	133
IV)	AMELIORATION DE LA SURVIE/CROISSANCE PAR UNE ADAPTATION PREALABLE .....	134
A)	Amélioration de la survie à un choc .....	135
1)	Approche expérimentale .....	135
2)	Résultats.....	135
3)	Discussion .....	136



B)	Etude de l'impact d'une préadaptation au stress sur le démarrage de croissance en milieu DM hostile .....	137
1)	Approche expérimentale .....	137
2)	Résultats.....	138
a)	Recherche des paramètres de stress (éthanol).....	138
b)	Définition des conditions de stress pour les quatre contraintes testées.....	138
c)	Facteurs de variation de populations obtenus.....	139
V)	CONCLUSION .....	141
I)	PROFIL PLASMIDIQUE DE <i>P. PENTOSACEUS</i> ATCC33316.....	143
A)	Etude du plasmide pAB10 .....	144
B)	Etude du plasmide pAB37 .....	145
C)	Conclusion.....	146
II)	OBTENTION D'UNE SOUCHE CUREE DERIVEE DE <i>P. PENTOSACEUS</i> ATCC33316 .....	147
III)	COMPARAISON DE LA SENSIBILITE AU STRESS DE <i>P. PENTOSACEUS</i> ET DE SON DERIVE CURE.....	148
A)	Evolution en l'absence de contrainte .....	148
1)	Croissance et survie en milieu riche MRS .....	148
2)	Croissance en conditions de carence nutritive .....	148
B)	Impact du stress sur les souches sauvage et curée .....	149
1)	Acclimatation au stress : croissance en situation de stress sub-optimal.....	149
2)	Survie des souches à l'issue d'un stress de type choc.....	150
3)	Comparaison de la capacité adaptative des souches sauvage et curée .....	152
IV)	SEQUENCAGES PARTIELS DES PLASMIDES NATIFS DE <i>P. PENTOSACEUS</i> ATCC33316 .....	153
A)	Initiation du séquençage du plasmide pAB10.....	153
B)	Initiation du séquençage du plasmide pAB37 .....	153
V)	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	154

## PARTIE 4 :DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



# INTRODUCTION





## INTRODUCTION GENERALE

Le secteur des industries agroalimentaires utilise un certain nombre d'auxiliaires technologiques, parmi lesquels les bactéries lactiques, pour élaborer des aliments fermentés. Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène qui rassemble des bactéries capables de produire de l'acide lactique par un métabolisme fermentaire. L'acidification et les procédés enzymatiques accompagnant leur développement influencent les qualités organoleptiques et la préservation de nombreux aliments. Les différentes applications des bactéries lactiques en agroalimentaires reposent sur l'utilisation de six genres-clefs : *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus* et *Streptococcus*.

Les bactéries lactiques sont également retrouvées dans d'autres secteurs d'application. Ainsi certains membres de cette famille (les Lactobacilles notamment) sont utilisés comme probiotiques, c'est-à-dire comme une préparation microbienne vivante ayant une action bénéfique sur l'hôte après ingestion (augmentation de la prise de poids des animaux d'élevage, réductions des infections...). Enfin, un secteur d'avenir concerne l'utilisation des bactéries lactiques comme vecteurs oraux permettant de délivrer des enzymes digestives ou bien des antigènes vaccinaux dans l'organisme.

Les bactéries lactiques occupent donc des niches écologiques extrêmement variées. Ces dernières sont constamment soumises à des fluctuations extérieures (variation quantitative et qualitative des paramètres physico-chimiques environnants) auxquelles les bactéries lactiques doivent répondre efficacement et rapidement afin de pouvoir survivre et se développer. Un des enjeux de la recherche actuelle pour les industries agroalimentaires consiste à mieux comprendre et favoriser la capacité de réponse et d'adaptation des bactéries lactiques à ces variations afin de conditionner la survie et la vitalité ultérieure des souches. L'identification des régulateurs de la réponse au stress et la compréhension des schémas de régulation permettront de contrôler, prédire ou modifier le comportement des bactéries lactiques (dans des conditions environnementales données).

Dans ce contexte, l'Unité de Sécurité Microbiologique des Aliments de l'ISTAB s'intéresse aux mécanismes de réponse au stress chez *Pediococcus pentosaceus* et *Tetragenococcus halophila*. Ces deux bactéries sont employées dans la transformation de nombreux produits d'origine animale ou végétale. Cependant peu de connaissances sont disponibles concernant leur tolérance et modalités de réponse aux contraintes technologiques.



Ce travail de thèse a consisté à poursuivre les recherches initiées au laboratoire sur la réponse spécifique au stress osmotique chez *Tetragenococcus halophila* (anciennement *Pediococcus halophilus*) et à initier des travaux sur la réponse générale au stress chez une bactérie phylogénétiquement proche : *Pediococcus pentosaceus*. *T. halophila*, par son caractère halophile, constitue un outil de choix pour l'étude du stress salin tandis que *P. pentosaceus*, plus ubiquitaire, offre la possibilité d'étudier les éventuelles relations existant entre différentes voies de réponse au stress.

Par des approches physiologiques, biochimiques et génétiques nous avons cherché à (i) identifier les différents acteurs de la réponse au stress salin chez *T. halophila* et *P. pentosaceus* afin de les comparer à ceux d'autres bactéries lactiques, (ii) évaluer l'impact de différents types de contraintes sur la viabilité de *P. pentosaceus*, (iii) mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'adaptation aux stress chez *P. pentosaceus*.

La présentation des résultats de ce travail sera précédée d'une synthèse bibliographique reprenant des connaissances actuelles sur les microorganismes et les aliments, le stress en agroalimentaire, la réponse au stress notamment osmotique chez les bactéries puis d'une description des procédures expérimentales utilisées.



PARTIE 1 :  
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE





**Tableau<sub>(1)</sub> I : exemples de produits fermentés ; pays d'origine et microorganismes dominant la fermentation (d'après la revue Caplice et Fitzgerald, 1999).**

Les bactéries sont figurées en bleu, les levures en vert et les champignons en orange

	Aliment fermenté	Pays d'origine	Microorganisme(s) fermentaire(s)	Matière première
Classe 1	Gari	Afrique de l'Ouest	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Corynebacterium manihot</i>,</li> <li>• bactéries lactiques (<i>Lactobacillus plantarum</i>, <i>Streptococcus</i> spp.),</li> <li>• Levures</li> </ul>	Racine de manioc
	Ogi	Nigeria et Afrique de l'Ouest	<ul style="list-style-type: none"> <li>• bactéries lactiques,</li> <li>• <i>Cephalosporium</i>, <i>Fusarium</i>, <i>Aspergillus</i>, <i>Penicillium</i> spp,</li> <li>• <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, <i>Candida mycoderma</i>, <i>Candida valida</i>, <i>Candida vini</i></li> </ul>	Maïs
	Tempeh	Indonésie Surinam	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Rhizopus oligosporus</i></li> </ul>	Pousses de soja
Classe 2	Sauce au soja	Orient	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus</i>, <i>Tetragenococcus halophila</i></li> <li>• <i>Aspergillus oryzae</i> ou <i>Aspergillus soyae</i>,</li> <li>• <i>Zygosaccharomyces rouxii</i></li> </ul>	Pousses de soja et de blé
	Miso	Japon	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Aspergillus oryzae</i>,</li> <li>• <i>Zygosaccharomyces rouxii</i></li> </ul>	Pousses de soja
Classe 3	Choucroute	International	<ul style="list-style-type: none"> <li>• bactéries lactiques (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>, <i>Lactobacillus brevis</i>, <i>Lactobacillus curvatus</i>, <i>Lactobacillus sakei</i>, <i>Lactobacillus plantarum</i>)</li> </ul>	Chou
	Fromage	International	<ul style="list-style-type: none"> <li>• bactéries lactiques (<i>Lactococcus lactis</i>, <i>Streptococcus thermophilus</i>, <i>Lactobacillus bulgaricus</i>, <i>Propionibacterium shermanii</i>),</li> <li>• occasionnellement <i>Penicillium</i> spp.</li> </ul>	Lait
	Idli	Inde	<ul style="list-style-type: none"> <li>• bactéries lactiques (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>, <i>Enterococcus faecalis</i>),</li> <li>• <i>Torulopsis</i>, <i>Candida</i>, <i>Trichosporon pullulans</i></li> </ul>	Riz et poisson
	Olives	Méditerranéen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• bactéries lactiques (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>, <i>Lactobacillus plantarum</i>),</li> </ul>	Olives vertes
	Pickles	International	<ul style="list-style-type: none"> <li>• bactéries lactiques (<i>Pediococcus cerevisiae</i>, <i>Lactobacillus plantarum</i>)</li> </ul>	Concombre
	Saucisses fermentées	International	<ul style="list-style-type: none"> <li>• bactéries lactiques (<i>Lactobacilles</i> et <i>Pediocoques</i>), Coques catalase positive (<i>Staphylococcus carnosus</i>, <i>Staphylococcus xylosus</i>, <i>Micrococcus varians</i>),</li> <li>• occasionnellement des champignons et/ou des levures</li> </ul>	Porc et/ou bœuf, volaille
	Yaourt	International	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Streptococcus thermophilus</i>, <i>Lactobacillus bulgaricus</i></li> </ul>	Lait
Classe 4	Bière	International	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, <i>Saccharomyces carlbergensis</i></li> </ul>	Malt, houblon
	Vin	International	<ul style="list-style-type: none"> <li>• bactéries lactiques (<i>Leuconostoc</i>, <i>Lactobacillus</i>, <i>Pediococcus</i>, <i>Oenococcus</i>, <i>Streptococcus</i>),</li> <li>• <i>Kloeckera apiculata</i>, <i>Saccharomyces ellipsoideus</i>, <i>Saccharomyces oviformis</i>, <i>Torulospira rosei</i></li> </ul>	Baies de raisin
Classe 5	Cidre	International	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus</i> hétérofermentaires,</li> <li>• <i>Kloeckera</i> spp, <i>Saccharomyces uvarium</i>, <i>Saccharomyces ellipsoideus</i>,</li> </ul>	Pommes
	Vinaigre de vin	International	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Acetobacter</i>, <i>Gluconobacter</i></li> </ul>	Vin
Classe 6	Dawa-dawa	Nigeria	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus</i> spp.</li> </ul>	Graines de Caroubier
	Natto	Japon	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus subtilis</i></li> </ul>	Pousses de soja
Classe 7	Pain	International	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Saccharomyces cerevisiae</i></li> </ul>	Farine de blé
	Pains spéciaux	International	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus</i> spp.</li> <li>• <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, <i>Saccharomyces exigus</i></li> </ul>	Farines de différentes céréales



## CHAPITRE I : LES MICROORGANISMES ET LES ALIMENTS

### I) LES ALIMENTS FERMENTES

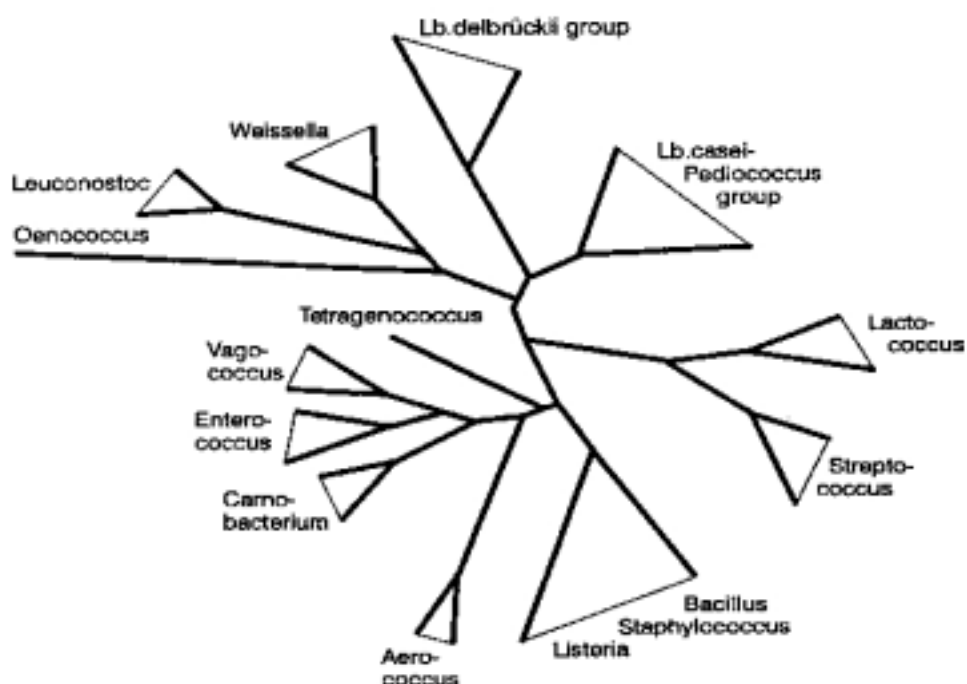
La **fermentation** des aliments est une technique de conservation couramment employée de nos jours et qui dérive de procédés millénaires. Les acteurs essentiels en sont les bactéries, les levures et les moisissures. Il s'agit d'un processus strictement anaérobie. Ce terme désigne cependant aujourd'hui dans le langage courant à la fois les processus aérobie et anaérobie de dégradation des dérivés carbonés.

La fermentation garantit, d'une part, l'amélioration de la durée de vie et de la qualité microbiologique des aliments (inhibition des microorganismes contaminants), et permet, d'autre part, d'en améliorer les propriétés nutritionnelles (meilleure digestibilité du lactose du lait, diminution de la toxicité des racines de manioc) et organoleptiques (flaveur, arôme, texture, apparence...).

De nombreuses classifications des fermentations alimentaires ont été établies suivant des critères différents. Steinkraus (1997) distingue sept classes de fermentations alimentaires (Tableau<sub>(1)</sub> I) :

1. les fermentations à base de protéines végétales provenant de mélanges de végétaux et utilisées comme des substituts de viandes (ex : tempeh et oncom) ;
2. les sauces et les pâtes fermentées salées, riches en acides aminés et en peptides (ex : sauce au soja, miso) ;
3. les fermentations lactiques de végétaux (« pickle », choucroute, olive), de laits (yaourt, fromages), de mélanges à base de poissons (idli), ou de viandes (saucisses fermentées) ;
4. les fermentations alcooliques produisant les vins, les bières, les alcools asiatiques (alcool de riz), les alcools à base de sucre de canne (rhum)... ;
5. les fermentations acétiques produisant les cidres et différents vinaigres (vinaigre de vin, vinaigre de coco, vinaigre de palmier...) ;
6. les fermentations alcalines (dawa-dawa, ou le natto) ;
7. les fermentations à base de levains de panification.

Le tableau<sub>(1)</sub> I rassemble des exemples d'aliments fermentés rencontrés dans le monde. S'y côtoient des produits artisanaux fabriqués en petites quantités et distribués localement, et des produits industriels standardisés et commercialisés dans le monde entier. Pour ces derniers, les substrats



Figure(1) 1 : arbre phylogénétique des bactéries lactiques (d'après Axelsson, 1998).

Les distances évolutives sont calculées par comparaison des séquences des ADN<sub>R</sub>16S. La distance évolutive relative séparant deux genres est la somme des longueurs totales des branches.

Tableau(1) II : principales caractéristiques biologiques et métaboliques des bactéries lactiques (d'après Axelsson, 1998).

B : bacilles ; C : coques ; nd : non déterminé ; +/- : variables selon les espèces

	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetrragenococcus</i>	<i>Weissella</i>
Morphologie	B	B	C	C	C	C	C	C	C	C
Tétrades	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Croissance à 10°C	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+	-	+
Croissance à 45°C	-	+/-	-	+	-	-	+/-	+/-	-	-
Croissance à pH 4,4	nd	+/-	-	+	+/-	+/-	+	-	-	+/-
Croissance à pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Croissance à 6,5% NaCl	nd	+/-	+	+	-	+/-	+	-	+	+/-
Croissance à 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Production de CO <sub>2</sub>	-	+/-	-	-	-	+	-	-	-	+
Production d'acide lactique	L	D, L, DL	L	L	L	D	L, DL	L	L	+/-

majoritaires sont le lait, la viande et les végétaux. Actuellement, une vingtaine de produits fermentés à base de végétaux sont commercialisés en Europe ; les plus rentables étant les fermentations d'olive, de concombre (pickles) et de chou (choucroute) (voir revue Caplice et Fitzgerald, 1999).

## II) LES AUXILIAIRES TECHNOLOGIQUES : EXEMPLE DES BACTERIES LACTIQUES

Les bactéries lactiques interviennent dans de nombreuses fermentations alimentaires. Elles sont présentes à des niveaux élevés au sein des produits fermentés (de l'ordre de  $10^8$  UFC/g dans les fromages, les yaourts, les salamis, les olives, les saucisses... ; voir revue Adams, 1999).

### A) Généralités sur les bactéries lactiques

#### 1) Caractéristiques principales et utilisations

Les bactéries lactiques sont définies comme étant des « bactéries à Gram positif, non mobiles, ne produisant pas de spores, se présentant sous formes de coques ou de bacilles et capables de fermenter les sucres en acide lactique » (voir revue Stiles et Holzapfel, 1997). En se tenant strictement à cette définition, ce groupe taxonomique devrait englober beaucoup plus de genres que ceux généralement sous-entendus sous le terme « lactiques ».

La classification actuelle des bactéries lactiques fait apparaître douze genres : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (voir revue Stiles et Holzapfel, 1997). Les relations phylogéniques existant entre ces différents genres sont présentées dans la figure(1) 1 (Axelsson, 1998).

Les bactéries lactiques sont généralement mésophiles ; certaines sont psychrotolérantes ou thermotolérantes. Elles se développent majoritairement à pH 4,0-4,5 et certaines sont encore actives à pH 9,6 ou pH 3,2. Elles ont des tolérances très variables vis-à-vis du sel (Tableau(1) II). Enfin, les bactéries lactiques possèdent de faibles activités protéolytique et lipolytique et ont une exigence marquée en acides aminés, dérivés de bases puriques et pyrimidiques et vitamines B (voir revue Caplice et Fitzgerald, 1999).

#### 2) Les bactéries lactiques et la sécurité alimentaire

Les bactéries lactiques sont bien tolérées par les animaux et l'homme (statut GRAS pour Generally Recognized As Safe). Les **cas d'infections** humaines décrits restent en effet rares : endocardites (*Lactobacillus* / *Lactococcus lactis* / *Leuconostoc mesenteroides*) ; septicémie d'origine

**Tableau<sup>(1)</sup> III : principaux producteurs de ferments pour l'industrie agroalimentaire (d'après la revue Hansen, 2002).**

Entreprise	Pays
Alice	Italie
ASCRS	Australie
Centro Sperimentale del Latte	Italie
Chr. Hansen	Danemark
CSK	Pays Bas
Danisco	Danemark
Degussa	Allemagne
DSM	Pays Bas
Gewürzmüller	Allemagne
Lallemand	Canada
NZDRI	Nouvelle Zélande
Quest International	Pays Bas
Rhodia	France

bactérienne (*Lactobacillus* / *Lactococcus* / *Enterococcus*) ainsi que quelques cas d'infections urinaires, digestives et de méningites (voir revue Adams, 1999).

L'innocuité des Entérocoques reste discutée (source d'un quart des infections nosocomiales aux USA et la troisième cause de septicémie d'origine bactérienne). Des travaux récents de la plateforme LABIP (Lactic Acid Bacteria Industrial Platform) préconisent de faire subir des analyses complémentaires aux produits alimentaires contenant des Entérocoques afin de démontrer que leur consommation est sans conséquence sur la santé. De même, l'utilisation d'Entérocoques en tant que probiotique en nutrition humaine reste controversée (voir revue Adams, 1999).

### 3) Production de bactéries lactiques pour l'industrie agroalimentaire

Aujourd'hui, les producteurs d'aliments fermentés ont le choix d'acheter des levains prêts à l'emploi, sous forme concentrée, ou de procéder eux mêmes à la propagation des souches dans l'usine. La solution la plus employée reste l'utilisation de levains commerciaux en inoculation directe (produits sous HACCP ; voir revue Hansen, 2002). Les principaux fournisseurs sont décrits dans le tableau<sup>(1)</sup> III. La plus large activité de ces derniers concerne la vente des levains destinés au secteur laitier (250 dollars US sur le marché mondial en 2002 ; voir revue Hansen, 2002).

## B) Rôles des bactéries dans la préservation des aliments

### 1) Les contaminants présents dans l'aliment

La qualité des aliments repose sur l'absence de germes pathogènes (causes d'infections) et/ou indésirables (provoquant des altérations organoleptiques). Nous allons nous intéresser tour à tour aux microorganismes composant la flore d'altération et la flore pathogène de l'aliment.

#### a) Les flores d'altération de l'aliment

La biodégradation est causée par trois sortes de microorganismes (les bactéries, les levures et les moisissures) qui se développent au détriment des aliments, les rendant le plus souvent impropres à la consommation, en altérant l'aspect ou la saveur du produit (par rancissement, putréfaction...). Nous décrirons ici les altérations les plus courantes des produits carnés, des produits de la mer et du lait.

Les altérations des **viandes et des volailles** emballées sous film polyéthylène sont essentiellement liées au développement de *Pseudomonas* ssp. qui produit une odeur de putréfaction caractéristique et un enduit visqueux à la surface des carcasses. Lorsque ces mêmes produits sont conditionnés sous vide, la flore d'altération est composée de microorganismes aéro-anaérobies (*Brochothrix*, certains *Lactobacilles*) (Bourgeois *et al.*, 1996). Lorsque les viandes et les volailles sont

**Tableau<sub>(1)</sub> IV : Flore d'altération des poissons conservés congelés ou sur glace (d'après Gram et Huss, 1996).**

		Microorganismes constituant la flore d'altération des poissons			
		Eaux tempérées		Eaux tropicales	
		Eau de mer	Eau douce	Eau de mer	Eau douce
Conditionnement	aérobie	<i>S. putrefaciens</i> <i>Pseudomonas ssp.</i>	<i>Pseudomonas ssp.</i>	<i>S. putrefaciens</i> <i>Pseudomonas ssp.</i>	<i>Pseudomonas ssp.</i>
	sous vide	<i>S. putrefaciens</i> <i>P. phosphoreum</i>	bactéries à Gram positif bactéries lactiques	bactéries lactiques	bactéries lactiques ?
	sous atmosphère modifiée (CO <sub>2</sub> )	<i>P. phosphoreum</i>	bactéries lactiques	bactéries lactiques	bactéries lactiques ?

réfrigérées, les dégradations surviennent plus tardivement et sont le fait de la flore de surface aérobie, psychrotrophe et psychrotolérante (moisissures : *Sporotrichum canis*, *Penicillium*, *Cladosporium herbarum* ou bactéries : *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*) (Leyral et Vierling, 1997).

L'altération des **produits de la mer**, comme le poisson, résulte essentiellement du développement de bactéries au niveau de la peau ; la chair est envahie uniquement dans les stades avancés de l'altération. La nature de la flore d'altération dépend du mode de conditionnement (aérobie, anaérobie en emballage sous vide ou atmosphère modifiée) ainsi que des zones de pêches (mer, eau douce, eaux tempérées/tropicales) (Tableau<sub>(1)</sub> IV). Lorsque les produits de la mer sont conservés en aérobiose, la flore d'altération est constituée majoritairement de bacilles à Gram négatif psychrophiles non fermentaires, du type *Pseudomonas* ssp. et *Shewanella putrefaciens*. En anaérobiose, elle est composée de différentes bactéries lactiques (essentiellement *Lactobacillus curvatus* mais aussi plus minoritairement *Lactobacillus sakei/bavaricus*, *Lb. plantarum*, *Carnobacterium* ssp. et *Leuconostoc* ssp.) associées à *Photobacterium putrefaciens*, et parfois à *Shewanella putrefaciens* (Gram et Huss, 1996).

**Le lait** obtenu par une traite aseptique n'est pas stérile. Après la traite, il contient  $10^3$  à  $5.10^3$  microorganismes par millilitre, essentiellement des Lactobacilles et des Streptocoques lactiques commensaux du pis et des canaux galactophores (flore originelle du lait). Le lait peut être contaminé par divers microorganismes de l'environnement : Entérobactéries, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, Microcoques, Corynébactéries, *Bacillus*..., et ceci par l'intermédiaire du matériel de traite et de stockage, par le sol, l'herbe ou la litière. Des contaminations d'origine fécale peuvent entraîner la présence de *Clostridium*, d'Entérobactéries coliformes et éventuellement d'Entérobactérie pathogènes : *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter*. Enfin, les laits des animaux malades peuvent contenir des germes pathogènes pour l'homme : *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Brucella*, *Bacillus anthracis*, *Listeria* ainsi que différents virus. Les bactéries de la flore du lait (flore originelle et flore de contamination) sont susceptibles d'altérer cet aliment par trois processus principaux : (1) la fermentation homo- ou hétérolactique du lactose avec acidification du lait (précipitation de la caséine et prise en masse du lait), (2) la protéolyse (perturbation du caillé et de la maturation du fromage), (3) la lipolyse (oxydation des acides gras insaturés issus de la lipolyse altérant l'aspect et l'odeur par rancissement). En marge de ces trois actions principales de la flore microbienne du lait, il convient de mentionner celle qui conduit au « filage ». Ce phénomène est causé par la production d'exopolysaccharides par certaines bactéries comme *Alcaligenes viscosus* ou *Leu. mesenteroides*. Le lait devient filant, il s'écoule comme un sirop et peut même former des masses de consistance proche de la gelée. Outre le « filage » du lait, d'autres altérations mineures du lait ont pu être observées : *Streptococcus lactis maltigenes* donne au lait un goût de caramel, des

**Tableau<sub>(1)</sub> V : les principaux microorganismes responsables de toxi-infection alimentaire.**

	Mode d'action	Symptôme	Origine de la contamination	Mode de contamination	Seuil d'infection	Cas en France en 2001
<i>Salmonella enterica</i>	<u>Invasion de la muqueuse intestinale :</u> 1. adhésion à des récepteurs cellulaires spécifiques 2. internalisation par endocytose 3. multiplication dans les vacuoles d'endocytose	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vomissements</li> <li>• fièvre</li> <li>• diarrhée</li> <li>• douleurs abdominales</li> <li>• voire septicémie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• viandes</li> <li>• volailles</li> <li>• œufs</li> <li>• homme (porteur sain ou atteint de troubles digestifs)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mains</li> <li>• mauvaise hygiène du matériel</li> </ul>	<10 germes/g d'aliment	1726
<i>Clostridium perfringens</i>	<u>entérotoxine non cytolytique</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• produite dans l'intestin uniquement durant la sporulation des formes végétative</li> <li>• provoquant une désorganisation de la perméabilité du tube digestif</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• diarrhée profuse</li> <li>• douleurs abdominales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• sauces</li> <li>• plats en sauces</li> <li>• soupes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mains</li> <li>• légumes mal lavés</li> </ul>	10 <sup>5</sup> germes dans 200g d'aliment	208
<i>Clostridium botulinum</i>	<u>neurotoxine</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• fixation de la toxine sur des récepteurs de la membrane présynaptique</li> <li>• endocytose de la toxine fixée sur ses récepteurs</li> <li>• blocage du relargage des vésicules intracellulaires contenant l'acétylcholine.</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. paralysie oculaire</li> <li>2. paralysie digestive</li> <li>3. athénie physique</li> <li>4. une paralysie vésicale</li> <li>5. une paralysie générale</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• conserves artisanales</li> <li>• conserves familiales</li> <li>• jambons crus</li> <li>• poissons fumés</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• boîte de conserve abîmée</li> </ul>	présence	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	<u>entérotoxines émetisantes</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• produites en phase exponentielle de croissance</li> <li>• thermostables</li> <li>• résistantes aux enzymes protéolytiques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• céphalées</li> <li>• douleurs abdominales</li> <li>• nausées</li> <li>• vomissements violents incoercibles et répétés</li> <li>• diarrhée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• viandes</li> <li>• poissons</li> <li>• charcuteries</li> <li>• crèmes glacées</li> <li>• pâtisseries</li> <li>• aliments à faible a<sub>w</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mains</li> <li>• air</li> <li>• mauvaise hygiène du matériel</li> </ul>	10 <sup>5</sup> germes dans 200g d'aliment	620
<i>Listeria monocytogenes</i>	<u>infection</u> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. entrée dans la cellule hôte par phagocytose</li> <li>2. lyse du phagosome par de la listériolysine</li> <li>3. multiplication intracellulaire</li> <li>4. mouvement intracellulaire par polymérisation de l'actine cellulaire autour de la bactérie</li> <li>5. envahissement des cellules voisines</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• méningites</li> <li>• méningo-encéphalites</li> <li>• encéphalites</li> <li>• septicémies</li> <li>• avortements</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• légumes</li> <li>• viandes</li> <li>• poissons</li> <li>• produits laitiers (via les mammites)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mains</li> <li>• légumes mal lavés</li> <li>• mauvaise hygiène du matériel</li> </ul>	10 <sup>5</sup> germes dans 200g d'aliment	186
<i>Campylobacter jejuni</i>	<u>Invasion / entérotoxine :</u> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. colonisation (flagelle, adhésine)</li> <li>2. production d'entérotoxine</li> <li>3. production de cytotoxine</li> <li>4. invasion</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• fièvre</li> <li>• diarrhée</li> <li>• douleurs abdominales</li> <li>• vomissements</li> <li>• voire perforation intestinale</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• viandes</li> <li>• volailles</li> <li>• lait cru</li> <li>• légumes en contact avec du fumier</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• éviscération lors de l'abattage</li> <li>• main</li> <li>• cuisson insuffisante</li> </ul>	>10 <sup>2</sup> germes	nd



microorganismes pigmentés peuvent colorer le lait en jaune (*Flavobacterium*), rouge (*Brevibacterium erytrogenes*) ou en bleu (*Pseudomonas syncyanea*).

### b) Les microorganismes pathogènes

Le rôle de l'aliment dans la transmission d'agents microbiens infectieux peut être soit uniquement passif (l'aliment n'est qu'un simple vecteur de microorganismes pathogènes), soit actif [l'aliment est alors le siège d'une multiplication des agents pathogènes (bactéries entéroinvasives) avec ou sans production de toxine (bactéries entérotoxiques)].

L'empoisonnement alimentaire ou toxi-infection alimentaire (TIA) se déclare (i) dans les heures qui suivent l'ingestion de l'aliment lorsque les microorganismes pathogènes agissent par sécrétion d'une entérotoxine (**intoxination alimentaire**) (ii) jusqu'à 72 heures après l'ingestion de l'aliment lorsque les microorganismes pathogènes agissent principalement par leur pouvoir invasif (**infection alimentaire**).

Les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) sont définies par l'apparition d'au moins deux cas d'une symptomatologie en général digestive, dominée principalement par la diarrhée, qui peut être rapportée à une même origine alimentaire. La fréquence de ces accidents sanitaires est sous-évaluée du fait de l'absence de consultation médicale ou de déclaration lorsqu'ils interviennent en milieu familial, voire en restauration commerciale, et ne concernent que des individus isolés ou n'ayant pas l'occasion de se revoir après le repas responsable des troubles. Les TIAC répondent à un nombre limité d'étiologies et représentent (i) une cause importante de mortalité dans les pays en voie de développement, (ii) peu de décès identifiés par an dans les pays industrialisés pour lesquels les conséquences sont principalement économiques (arrêts de travail fréquents). Les trois principaux agents pathogènes à l'origine de toxi-infections alimentaires appartiennent aux genres *Salmonella*, *Clostridium* et *Staphylococcus*, même si l'incidence des épidémies de Listériose augmente depuis quelques années en France (Tableau<sub>(1)</sub> V).

## 2) Les molécules à activité antimicrobienne et/ou antifongique synthétisées par les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à **action bactéricide/bactériostatique** comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle, la reutérine et les bactériocines (voir revue De Vuyst et Vandamme 1994). Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments.

**Les acides organiques**, comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, sont produits par les bactéries lactiques au cours de processus de fermentation alimentaire. Leurs effets



antimicrobiens sont bien connus à l'heure actuelle (Davison, 1997). Ces acides, sous leur forme dissociée ou non dissociée, agissent au niveau de la membrane cytoplasmique en perturbant le maintien du potentiel de membrane et en inhibant les systèmes membranaires de transport actif (Alakomi *et al.*, 2000). L'activité antimicrobienne d'un acide organique dépend de sa nature (acide fort, acide faible). L'acide acétique, par exemple, est plus inhibiteur que l'acide lactique ; il inhibe les levures, les moisissures et les bactéries (voir revue Blom et Mortvedt, 1991).

Les bactéries lactiques sont dépourvues de catalases catalysant la décomposition du **peroxyde d'hydrogène** ( $H_2O_2$ ) en eau et en oxygène. En conséquence, l' $H_2O_2$  produit s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes présents (voir revue Condon, 1987). L'action inhibitrice du peroxyde d'hydrogène est principalement due à son fort effet oxydant sur les lipides membranaires et les protéines cellulaires (voir revue Caplice et Fitzgerald, 1999).

Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du **dioxyde de carbone** ( $CO_2$ ) comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui peut être toxique pour les microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Toutefois, le dioxyde de carbone peut aussi, à faible concentration, stimuler la croissance de certaines bactéries (voir revue Lindgren et Dobrogosz, 1990).

Le **diacétyl** est un produit du métabolisme du citrate qui est responsable de l'arôme « beurre » des produits laitiers. Les bactéries à Gram négatif, les levures et les moisissures sont plus sensibles au diacétyl que les bactéries à Gram positif. Le diacétyl inhibe la croissance bactérienne en interférant probablement avec les mécanismes gouvernant l'utilisation de l'arginine (Motlagh *et al.*, 1991). Toutefois, le diacétyl est rarement présent dans l'aliment en quantité suffisante pour y exercer une activité antimicrobienne importante (voir revue Caplice et Fitzgerald, 1999).

Les **bactériocines** sont des produits de la synthèse ribosomique bactérienne libérés dans le milieu extracellulaire sous forme native, ou modifiée. Elles possèdent une activité bactéricide à large spectre (voir revue Jack *et al.*, 1995). Cette définition exclut la substance à activité antimicrobienne produite par *Lactobacillus reuteri*, la reutérine (3-hydroxypropionaldéhyde), de la famille des bactériocines car cette molécule est (i) non protéique, (ii) capable d'inhiber également les virus, les champignons, et les protozoaires (voir revue Caplice et Fitzgerald, 1999). La capacité à produire des substances antimicrobiennes de type bactériocine est un phénomène commun à de nombreux microorganismes isolés d'aliments fermentés. Un grand nombre de bactériocines ont été caractérisées chez les bactéries lactiques ; elles sont classées dans trois groupes distincts suivant leurs différences structurales (voir revue Cleveland *et al.*, 2001). La classe I (lantibiotique) comprend des petits peptides modifiés de façon post-transcriptionnelle qui sont caractérisés par la présence d'acides aminés thioesters modifiés et d'acides aminés insaturés. La classe II est composée de peptides non

**Tableau(1) VI : exemples d'application des bactéries lactiques productrices de bactériocine dans différents produits alimentaire (d'après O'Sullivan *et al.*, 2002).**

Bactériocine	Application	Résultats	Références
<b>• Produits laitiers et fromages</b>			
Pediocine PA1 (AcH)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Utilisation d'un <i>Lc. lactis</i> producteur de pédiocine en tant que ferment dans la production de cheddar</li> <li>Utilisation d'un <i>Lb. plantarum</i> producteur de pédiocine en pulvérisation à la surface du Munster</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Réduction du nombre de <i>L. monocytogenes</i> à 10<sup>2</sup> UFC/g en 1 semaine</li> <li>Suppression de la croissance de <i>L. monocytogenes</i> après 11 jours de maturation et élimination définitive après 21 jours</li> </ul>	<p>Buyong <i>et al.</i>, 1998</p> <p>Ennahar <i>et al.</i>, 1998</p>
Pediocine 5	Incorporation d'un <i>P. acidilactici</i> producteur de pédiocine dans le lait	Réduction du nombre de <i>L. monocytogenes</i> viable	Huang <i>et al.</i> , 1994
Enterocine	Utilisation d'un Entérocoque producteur d'entérocoque dans la production de Talegior Utilisation d'un <i>Ent. faecalis</i> producteur d'entérocoque en tant que ferment dans la production de Manchego	Inhibition de <i>L. innocua</i>  Inhibition de <i>L. monocytogenes</i> Ohio mais pas de <i>L. monocytogenes</i> Scott A	Giraffa <i>et al.</i> , 1993  Nunes <i>et al.</i> , 1997
Nisine	Utilisation d'un <i>Lc. lactis</i> producteur de nisine dans la préparation d'un dessert lacté (quarg)	Réduction du nombre de bactéries sporulantes durant la conservation à 4°C et 20°C	Plocková <i>et al.</i> , 1998
Lacticine 3147	Utilisation d'un <i>Lc. lactis</i> producteur de lacticine dans la production du « cottage cheese »r	Réduction de 99,9% du nombre de <i>L. monocytogenes</i> Scott A <i>L. monocytogenes</i> Scott A après 5 jours à 4°C	McAuliffe <i>et al.</i> , 1994
<b>• Produits carnés</b>			
Pédiocine	<ul style="list-style-type: none"> <li>Incorporation d'un <i>P. acidilactici</i> producteur de pédiocine dans la fabrication de saucisses de Franfort</li> <li>Utilisation d'un <i>P. acidilactici</i> producteur de pédiocine dans la fabrication de saucisses de dinde</li> <li>Utilisation d'un <i>P. acidilactici</i> producteur de pédiocine dans la fabrication de saucisses fermentées</li> <li>Utilisation d'un <i>P. acidilactici</i> producteur de pédiocine dans la fabrication de saucisses de poulet</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Contrôle de la croissance de <i>L. monocytogenes</i> à 15°C en condition d'anaérobie après 15 jours</li> <li>Réduction du nombre de <i>L. monocytogenes</i> de 3,4 unités logarithmique</li> <li>Inhibition de <i>L. monocytogenes</i></li> <li>Réduction du nombre de <i>L. monocytogenes</i> de 2,6 unités logarithmique</li> </ul>	<p>Berry <i>et al.</i>, 1991</p> <p>Luchansky <i>et al.</i>, 1992</p> <p>Foegeding <i>et al.</i>, 1992</p> <p>Baccus-Taylor <i>et al.</i>, 1993</p>
Leucocine A	Inoculation du bœuf emballé sous vide avec de <i>Lc gelium</i>	Retard de l'altération de la viande par <i>Lb. sakei</i> producteur de sulfites jusqu'à 6 semaines	Leisner <i>et al.</i> , 1996
Lactocine 705	Utilisation d'un <i>Lb. casei</i> producteur de lactocine pour contrôler la présence de <i>L. monocytogenes</i> dans la viande	Inhibition de la croissance de <i>L. monocytogenes</i> dans la viande cuite	Vignolo <i>et al.</i> , 1996
Sakacine A	Incorporation d'un <i>Lb. sakei</i> producteur de skacine dans la viande hachée et le porc cru	Inhibition de <i>L. monocytogenes</i>	Schillinger <i>et al.</i> , 1991

modifiés, thermostables. La classe III comprend, quant à elle, les bactériocines thermolabiles. La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible (voir revue O'Sullivan *et al.*, 2002).

L'utilisation de ferments lactiques capables de produire des substances antimicrobiennes, comme les bactériocines, pourrait permettre d'améliorer la qualité et la sécurité des aliments fermentés (Tableau<sub>(1)</sub> VI). La seule bactériocine dont l'utilisation est actuellement autorisée en tant qu'additif alimentaire est la nisine (E234). L'emploi intensif de telles substances est freiné par l'apparition de phénomènes de résistance (voir revue Kuipers *et al.*, 2000). L'analyse de deux mutants de *Listeria monocytogenes* (pédiocine-résistant et leucocine A-résistant) montre que des systèmes de transport de sucres sont impliqués dans le phénomène de résistance à ces bactériocines (Gravesen *et al.*, 2000 ; Ramnath *et al.*, 2000). L'utilisation contrôlée d'un mélange de bactériocines (ou de souches productrices de bactériocines) pourrait permettre de prolonger l'emploi de telles molécules (faible fréquence de mutants multirésistants ; Rekhif *et al.*, 1994).

Certaines bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Pediococcus* sont capables de produire des **molécules à activité antifongique** : des acides organiques (acide propionique, acide phényl-lactique, acide 4-hydroxyphényl-lactique en plus de l'acide lactique ; Lavermicocca *et al.*, 2000 ; Magnusson *et al.*, 2003), des petits peptides cycliques [cyclo-(L Phe-L Pro), cyclo-(L Phe *trans*-4-OH-L Pro), Strom *et al.*, 2002 ; Magnusson *et al.*, 2003] ou des « bacteriocine-like » (pentocine TV35b, Okkers *et al.*, 1999).

### C) Les probiotiques

Fuller (1989) définit les probiotiques comme étant des « préparations microbiennes vivantes, utilisées comme additif alimentaire, ayant une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale ». Guarner et Schaafsma (1998) proposent de modifier cette définition en incluant tous les « microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en un certain nombre, exercent des effets bénéfiques (autres que nutritifs) sur la santé ». Ces auteurs jugent que le passage transitoire d'un probiotique dans le tractus intestinal suffit à conférer un effet positif sur l'hôte. Le sujet doit toutefois ingérer  $10^9$  UFC par jour pour qu'un effet probiotique soit observé (voir revue Ouwehand *et al.*, 2002). La définition actuelle pourrait évoluer dans l'avenir car des travaux récents montrent que des microorganismes (probiotiques) inactivés peuvent aussi avoir un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (Lee *et al.*, 1999 ; voir revue Salminen *et al.*, 1999).

Les probiotiques auraient un effet positif dans le traitement des diarrhées, des vaginites, du cancer du colon, de l'hypertension, de la cholestérolémie, des infections du tractus urinaire mais

**Tableau<sub>(1)</sub> VII : tests évaluant l'innocuité des bactéries lactiques probiotiques (d'après Salminen *et al.*, 1996).**

Domaines étudiés	Test d'innocuité à réaliser
Propriétés intrinsèques	<ul style="list-style-type: none"> <li>• existence de facteurs d'adhésion</li> <li>• capacité à résister aux antibiotiques</li> <li>• existence de plasmides et de possibilité de transfert plasmidique</li> <li>• existence des enzymes nuisibles</li> </ul>
Métabolites produits	<ul style="list-style-type: none"> <li>• estimation de la concentration en métabolites</li> <li>• estimation de l'innocuité des métabolites</li> <li>• existence d'effets autres que probiotiques</li> </ul>
Toxicité	<ul style="list-style-type: none"> <li>• estimation des effets (aigus et subaigus) de l'ingestion d'une grande quantité de bactéries test</li> </ul>
Effets sur les muqueuses	<ul style="list-style-type: none"> <li>• capacité d'adhésion</li> <li>• existence d'un potentiel invasif</li> <li>• capacité de dégrader le mucus intestinal</li> <li>• capacité à infecter des animaux immunodéprimés (irradiés)</li> </ul>
Effet dose-réponse	<ul style="list-style-type: none"> <li>• étude dose-réponse lors d'administration orale sur des volontaires.</li> </ul>
Evaluation clinique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• existence d'effets secondaires potentiels</li> <li>• évaluation clinique sur des volontaires bien portants</li> <li>• études spécifiques sur la maladie ciblée</li> </ul>
Etudes épidémiologiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>• surveillance d'une large population après introduction de nouvelles souches probiotiques ou de nouveaux produits probiotiques.</li> </ul>

aussi dans la modulation du système immunitaire et dans la stimulation de la flore intestinale (voir revue Sanders, 1998).

Les données épidémiologiques des dernières années indiquent que la consommation de bactéries lactiques probiotiques est sans danger pour la santé de l'hôte. Dans un souci de sécurité alimentaire, un ensemble de tests visant à contrôler l'innocuité des souches probiotiques a été proposé par Salminen *et al.* (1996) (Tableau<sup>(1)</sup> VII) En l'absence de modèles précis permettant l'évaluation des modes d'actions, les microorganismes employés aujourd'hui comme probiotiques en alimentation humaine doivent (i) être résistants aux enzymes pancréatiques, à l'acidité et aux sels biliaires (survie au passage dans le tractus intestinal), (ii) être capables d'adhérer aux muqueuses intestinales [rôle immuno-modulateur, exclusion des pathogènes, aide à la guérison des muqueuses, colonisation], (iii) être d'origine humaine (spécificité des interactions avec l'hôte), (iv) avoir une action prouvée sur la santé, (v) être sans danger pour l'hôte, (vi) posséder des bonnes propriétés technologiques (stabilité de la souche, production à grande échelle, tolérance à l'oxygène) (voir revue Ouwehand *et al.*, 2002).

Les différents produits commercialisés en tant que probiotiques humains ou animaux sont constitués soit d'un seul microorganisme (produits dits monosouches) ou d'une association de plusieurs espèces microbiennes (produits dits plurisouches). Les bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus* et *Enterococcus* sont couramment utilisées en tant que probiotiques.

### III) BACTERIES LACTIQUES : OUTILS GENETIQUES ET FUTURS DEVELOPPEMENTS

#### A) Les avancées en matière de génétique

Les premiers travaux en matière de génétique chez les bactéries lactiques datent de 1982, avec le développement d'un protocole de transformation de *Lc. lactis* (Kondo et MacKay, 1982). En seulement une vingtaine d'années les apports de la biologie moléculaire à l'étude des bactéries lactiques ont été considérables. Des procédés de transformation par électroporation ont été décrits chez plusieurs espèces de Lactobacilles [*Lactobacillus helveticus* (Bhowmik *et al.*, 1993), *Lb. casei* (Chassy et Flickinger, 1987), *Lb. acidophilus* (Luchansky *et al.*, 1988 ; Walker *et al.*, 1996), *Lb. sakei* (Berthier *et al.*, 1996), *Lb. delbrueckii* (Serror *et al.*, 2002) et *Lb. plantarum* (Thompson *et al.*, 1997)], d'Entérocoques [*Enterococcus hirae* (Solioz et Waser, 1990) et *Ent. faecalis* (Fujimoto *et al.*, 1991)], de Pédicoques [*Pediococcus pentosaceus* et *P. acidilactici* (Bénachour *et al.*, 1996)], de Streptocoques [*Streptococcus pneumoniae* (LeFrançois *et al.*, 1997 et 1998), *St. thermophilus* (O'Sullivan et Fitzgerald, 1999) et *Lc. lactis* (Simon et Chopin, 1988)], de Leuconostokes (Luchansky *et al.*, 1988) mais aussi chez plusieurs sous-espèces de *Lc. lactis*

**Tableau<sub>(1)</sub> VIII: projets de séquençage des génomes de bactéries lactiques (d'après la revue Klaenhammer *et al.*, 2002).**

Espèce	Souche	Taille du génome	Responsables du projet	Etablissement
<b><u>Séquençage complet</u></b>				
<i>Enterococcus faecalis</i>	V583	3,4 Mb	T. Paulsen	TIGR, Rockeville, Maryland, USA
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC700396	2.0 Mb	T. Klaenhammer, R. Cano	Université de Caroline du Nord, USA et Cal-Poly Technical Université, USA
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	NCC533	2.0 Mb	D. Pridmore	Nestlé, FR
<i>Lactobacillus plantarum</i>	WCFS1	3.3 Mb	M. Kleerebezem	WCFS, NL
<i>Lactococcus lactis</i>	IL103	2.3 Mb	A. Sorokin	INRA et Génoscope, FR
<b><u>Séquençage en cours</u></b>				
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC BAA-472	2,8 mB	P. Richardson	Université de Texas Houston, USA et Université de Californie, USA.
<i>Lactobacillus brevis</i>	ATCC367	2.0 Mb	M. Saier	Université de Californie, USA
<i>Lactobacillus casei</i>	BL23	2.6 Mb	J. Deutscher, A. Hartke	INRA/CNRS, Université de Caen, FR
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC334	>2.2 Mb	J. Broadbent	Université de Utah, USA
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	ATCC11842	2.3 Mb	E. Maguin, M. vd Guchte	Génoscope et INRA, FR
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	DN-100107	2.1 Mb	T. Smokvina	Danone, Vitapole, FR
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	ATCCBAA-365	2.3 Mb	J. Steele	Université du Wisconsin, USA
<i>Lactobacillus gassei</i>	ATCC33323	1.8 Mb	T. Klaenhammer	Université de Caroline du Nord, USA
<i>Lactobacillus helveticus</i>	CNRZ32	2.4 Mb	J. Steele	Université du Wisconsin, USA
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	HN001	2.4 Mb	M. Lubbers	Centre de Recherche de Fonterra et ViaLactia BioSciences, NZ
<i>Lactobacillus sakei</i>	23K	1.9 Mb	M. Zagorec, S. Chaillou	INRA, FR
<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>	MG1363	2.6 Mb	O. Kuipers, M.Gasson, D. van Sinderen	Université de Groningen, NL; IFR, UK et UCC, IRL
<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>	MG1363	2.4 Mb	A. Sorokin, A. Bolotin	INRA, FR
<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>	SK11	2.3 Mb	B. Weimer, L. McKay	Université de Utah et du Minnesota, USA
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ATCC8293	2.0 Mb	F. Breidt, H.P. Fleming	USDA et Université de Caroline du Nord, USA
<i>Oenococcus oeni</i>	IOEB84.13	1.8 Mb	J. Guzzo	Université de Dijon et Bordeaux et Genome Express, FR
<i>Oenococcus oeni</i>	PSU1	1.8 Mb	D. Mills	Université de Californie, USA
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ATCC25745	2.0 Mb	J. Steede, J. Broadbent	Université du Wisconsin et de Utah, USA
<i>Streptococcus thermophilus</i>	LMG18311	1.9 Mb	P. Hols	UCL, Belgique
<i>Streptococcus thermophilus</i>	CNRZ1066	1.8 Mb	A. Bolotin	INRA, FR et Integrated Genomics Inc, USA
<i>Streptococcus thermophilus</i>	ATCCBBA-491	1.8 Mb	R. Hutkins	Université du Nebraska, USA



[*Lc. lactis* ssp. *cremoris* (Holo et Nes, 1989) et *Lc. lactis* ssp. *lactis* (McIntyre et Harlander, 1989)]. Actuellement, peu de bactéries lactiques restent réfractaires à la transformation (*Oenococcus oeni*, *Tetragenococcus halophila*). Les souches industrielles, notamment celles de l'espèce *St. thermophilus*, restent plus difficilement transformables que les souches type de laboratoire (voir revue Delcour *et al.*, 2000). Les alternatives possibles consistent alors à essayer de transférer du matériel génétique par conjugaison (Bénachour *et al.*, 1996).

Désormais, l'implication d'un ou plusieurs gènes dans un mécanisme cellulaire chez les bactéries lactiques peut être démontrée en obtenant des mutants par recombinaison homologue, ou mutagenèse dirigée (les vecteurs de type pGhost sont utilisables chez les genres *Lactococcus*, *Enterococcus* et chez plusieurs espèces appartenant au genre *Lactobacillus* ; Maguin *et al.*, 1996).

L'évolution des techniques de biologie moléculaire permet de disposer actuellement d'un panel de méthodes pour étudier la régulation de l'expression génique chez les bactéries (Northern-Blot, RT-PCR ou recombinaison de fusion de gènes). Enfin, une source importante d'informations supplémentaires est offerte grâce à plusieurs projets de séquençage de génomes (Tableau<sub>(I)</sub> VIII) et de plasmides (Tableau<sub>(I)</sub> IX) des bactéries lactiques qui permettront d'analyser la totalité du transcriptome grâce à la construction de nouvelles puces à ADN (voir revue Hansen, 2002).

Ces techniques de biologie moléculaire permettent des avancées dans la compréhension (i) des voies métaboliques de bactéries lactiques, (ii) des relations des bactéries lactiques entre elles ou avec leur environnement, afin de prédire le comportement de ces microorganismes dans une niche écologique donnée. A long terme, ces techniques de biologie moléculaire permettront de produire des souches modifiées à plus fortes aptitudes technologiques ou d'isoler des souches plus performantes pour certaines activités.

## **B) Objectifs des nouveaux développements en fermentation alimentaire**

L'industrialisation de la fabrication des aliments a fait apparaître de nouvelles contraintes de production (rentabilité, productivité, reproductibilité, compétitivité...) sans pour autant faire disparaître les anciennes (stabilité, innocuité, qualités organoleptiques du produit...). Le consommateur, de son côté, attend des produits alimentaires industriels qu'ils soient aussi goûteux que les produits artisanaux, mais plus sécurisés, plus fonctionnels, plus novateurs ...

**Tableau<sub>(I)</sub> IX : exemples informations portées par différents plasmides de bactéries lactiques.**

Plasmide	Taille (pb)	Espèce bactérienne	Fonctions	Références
pNZ4000	42810	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> NIZO B40	synthèse d'exopolysaccharides	Van Kranenburg <i>et al.</i> , 1997
pCRL1127	8278	<i>Lactococcus lactis</i> CRL1127	fermentation du citrate	Sesma <i>et al.</i> , non publiés
pNZ63	>16000	<i>Leuconostoc lactis</i> NZ6009	métabolisation du lactose	Vaughan <i>et al.</i> , 1996
pER35 et	9531	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST135	réponse putative au stress thermique	Solow et Somkuti, 2000
pER36	3498	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST135	réponse putative au stress thermique	Solow et Somkuti, 2000
pIL105	6499	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> IL964	résistance aux bactériophages	Anba <i>et al.</i> , 1995
pSRQ700	7784	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> DCH-4	résistance aux bactériophages	Boucher <i>et al.</i> , 2001
pSRQ800	7858	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> IL964	résistance aux bactériophages	Boucher <i>et al.</i> , 2001
pSRQ900	10836	<i>Lactococcus lactis</i> W37	résistance aux bactériophages	Boucher <i>et al.</i> , 2001
pAW122	42810	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> W12	résistance aux bactériophages	Madsen <i>et al.</i> , 2000
pLA103	13913	<i>Lactobacillus acidophilus</i> TK8912	production de bactériocine	Kanatani <i>et al.</i> , 1995
pRC18	18101	<i>Lactobacillus casei</i> CRL705	production de bactériocine	Cuozzo <i>et al.</i> , 2000
pMRC01	60232	<i>Lactococcus lactis</i> DPC3147	production de bactériocine	Dougherty <i>et al.</i> , 1998
pMD136	19515	<i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB61	production de bactériocine	Kantor <i>et al.</i> , 1997
pMD5057	10877	<i>Lactobacillus plantarum</i> 5057	résistance à la tétracycline	Danielsen 2002
pLEM3	19389	<i>Lactobacillus fermentum</i> LEM89	résistance à l'erythromycine	Fons <i>et al.</i> , 1997

### **1) Réduire les contaminations à microorganismes pathogènes et sécuriser les produits**

La réduction des contaminations à microorganismes pathogènes et la sécurisation des produits alimentaires passent par l'application de règles sanitaires simples (hygiène des locaux, du matériel et du personnel, désinfection, décontamination, contrôles fréquents...).

L'essor des connaissances (notamment en matière de biologie moléculaire) devrait permettre l'amélioration de la qualité des aliments fermentés en permettant une meilleure (i) identification des flores contaminantes, (ii) compréhension du rôle éventuellement joué par les bactéries exogènes, (iii) connaissance du phénomène de dissémination des antibiorésistances dans les ferments, (iv) évaluation des risques liés à l'utilisation de tels ou tels ferments (présences de gènes codant des toxines, présence d'éléments mobiles dans les génomes...).

### **2) Mieux maîtriser la préparation des levains et les procédés de fermentation**

Les aliments fermentés traditionnels (fermentations locales; voir revue Caplice et Fitzgerald, 1999) consommés à travers le monde diffèrent par la nature des substrats métabolisables ainsi que la flore fermentaire qu'ils contiennent. Les bases biologiques et microbiologiques de ces procédés de fermentation sont peu connues à l'heure actuelle. Les seules informations disponibles concernent souvent la flore primaire des produits finis. Il est indéniable qu'il sera nécessaire dans le futur de caractériser quantitativement et qualitativement les microorganismes impliqués dans ces fermentations afin de mieux maîtriser les procédés fermentaires (voir revue Caplice et Fitzgerald, 1999).

Les fermentations alimentaires « occidentales », pour lesquelles il existe déjà une bonne connaissance du rôle et de l'activité de la microflore endogène (les fromages, les yaourts, et certaines préparations carnées) peuvent, quant à elles, poser des problèmes de reproductibilité. Les développements futurs en matière d'optimisation des levains (augmentation de la stabilité, de la viabilité et des performances technologiques des ferments) devraient permettre de mieux maîtriser les aléas de ces procédés fermentaires et de garantir une meilleure standardisation des produits finis (voir revue Caplice et Fitzgerald, 1999).

### **3) Augmenter la valeur ajoutée des produits fermentés en développant de nouvelles applications**

Le développement de nouveaux produits fermentés et/ou d'aliments à haute valeur ajoutée devrait permettre d'accroître le marché des aliments fermentés et des levains. Ces nécessités industrielles rejoignent les préoccupations des consommateurs qui réclament des produits réduisant



les risques cardiovasculaires, l'hypertension, l'obésité, les risques de cancer, l'ostéoporose ainsi que des produits enrichis en molécules actives (antioxydants, vitamines...) ou encore des produits augmentant les performances athlétiques grâce à un apport énergétique accru (voir revue Hansen, 2002)

Dans l'industrie agroalimentaire, le secteur **probiotique** offre de nouvelles voies de recherche/développement d'aliments à haute valeur ajoutée. La recherche de nouvelles souches à propriété probiotique pourrait permettre d'élargir la gamme de produits proposés actuellement aux consommateurs. Les recherches actuelles dans le domaine des probiotiques visent, d'une part, à améliorer la qualité des souches probiotiques et, d'autre part, à renouveler les critères de sélection (spécificité en fonction de l'âge du sujet, probiotiques non vivants...) et à imaginer de nouvelles voie d'administration (cavité orale, peau, tractus urogénital, nasopharynx) (voir revue Ouwehand *et al.*, 2002).

De plus, l'optimisation de la formulation des compléments alimentaires à base de bactéries lactiques revivifiables pourrait permettre d'améliorer leur action bénéfique sur la santé [meilleure résistance au suc gastrique sous forme de comprimé (Stadler et Viernstein, 2003)]. Enfin, le développement de nouvelles présentations d'aliments probiotiques (gâteaux, barres énergétiques...) pourrait permettre de dynamiser la vente de tels produits.

Les **nutraceutiques**, au même titre que les probiotiques, constituent un bon exemple de nouveau produit alimentaire à haute valeur ajoutée. Il s'agit d'aliments et/ou de composants alimentaires visant à améliorer la santé du consommateur (voir revue Pszczola, 1992). Des recherches réalisées sur les bactéries lactiques ont permis d'utiliser leur métabolisme afin de produire des vitamines (B2, B11, B12), des sucres à faibles valeurs caloriques (mannitol, sorbitol, tagatose...), des (exo)polysaccharides (considérés comme des épaississants naturels, oligosaccharides stimulant la flore intestinale) ou bien afin d'améliorer la digestibilité d'un aliment (dégradation du lactose du lait ou raffinose du soja) (voir revue Hugenholtz *et al.*, 2002).

Les bactéries lactiques trouvent aussi une application dans la lutte contre l'implantation des bactéries pathogènes au niveau de différentes surfaces en industrie agroalimentaire (sol, mur, tapis de convoyage...) (Leriche et Carpentier, 2000 ; Midelet et Carpentier, 2002) ou bien dans les locaux d'élevage. Dans cette optique, la société Cobotex (collaborant avec le laboratoire USMA depuis plusieurs années) développe des produits à base de bactéries lactiques visant à limiter l'installation des pathogènes en élevage par implantation de flores compétitrices créant un biofilm positif.

Dans le secteur médical, les bactéries lactiques pourraient avoir une nouvelle application en **vaccination orale** (voir revue Mercenier *et al.*, 2000). Ce concept vise à développer des systèmes bactériens capables de produire des antigènes immunocompétents et de les libérer dans le milieu

**Tableau<sub>(1)</sub> X : exemples de systèmes de modification génique de type « Food Grade » (d'après la revue de Vos, 1999).**

Systèmes de modification génique	Donneur	Hôte	Fonctionnement	Références
<ul style="list-style-type: none"> <li>Marqueurs de sélection des MGMs</li> </ul>				
<u>marqueur d'utilisation de sucre</u>				
fermentation du xylose	<i>Lb. pentoseus</i>	<i>Lb. casei</i>	sélection des souches <i>xyIRAB</i> <sup>+</sup>	Posno <i>et al.</i> , 1991
fermentation de l'inuline	<i>B. subtilis</i>	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. casei</i>	sélection des souches <i>levA</i> <sup>+</sup>	Hols <i>et al.</i> , 1994 Wanker <i>et al.</i> , 1995
fermentation de saccharose	<i>P. pentosaceus</i>	<i>Lc. lactis</i>	sélection des souches <i>srcA/srcB</i> <sup>+</sup>	Leenhouts <i>al.</i> , 1998
fermentation du lactose	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. helveticus</i>	complémentation du gène <i>lacLM</i>	Hashiba <i>et al.</i> , 1992
fermentation du lactose	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i>	complémentation du gène <i>lacF</i>	de Vos <i>et al.</i> , 1990 MacCormick <i>et al.</i> , 1995 Platteuw <i>et al.</i> , 1996
<u>marqueur auxotrophique</u>				
biosynthèse de purine	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i>	utilisation d'un ARNt suppresseur des mutations non sens dans les gènes purine chromosomiques	Dickley <i>et al.</i> , 1995
<u>marqueur de résistance ou d'immunité</u>				
résistance à la nisine	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i>	sélection des souches Nis <sup>R</sup>	Froseth <i>et al.</i> , 1988 von Wright <i>et al.</i> , 1990 Froseth et McKay 1991 Liu <i>et al.</i> , 1996
résistance au cadmium	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i>	sélection des souches Cd <sup>R</sup>	Liu <i>et al.</i> , 1996
immunité à la lactacin F	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. gasseri</i> <i>Lb. jonsonii</i>	<i>Lb. acidophilus</i>	sélection des souches <i>lafT</i> <sup>+</sup>	Allison et Klaenhammer, 1996
<ul style="list-style-type: none"> <li>Systèmes d'expression génétique</li> </ul>				
inductible par le lactose	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i>	promoteur : <i>lacA</i> / régulateur : LacR	van Rooijen <i>et al.</i> , 1992 Payne <i>et al.</i> , 1996
inductible par le lactose	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i>	promoteur : <i>lacR</i> / régulateur : LacR	van Rooijen <i>et al.</i> , 1992 Eaton <i>et al.</i> , 1993
inductible par le lactose	<i>St. thermophilus</i>	<i>St. thermophilus</i>	promoteur : <i>lacS</i> / régulateur : GalR	Mollet <i>et al.</i> , 1993
inductible par le xylose	<i>Lb. pentoseus</i>	<i>Lb. pentoseus</i>	promoteur : <i>xylA</i> / régulateur : XylR	Lokman <i>et al.</i> , 1994 et 1997
inductible par l'acide chlorhydrique	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i>	promoteur : <i>gadC</i> / régulateur : GadR	Sanders <i>et al.</i> , 1997 et 1998
inductible par le chaud	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i>	promoteur : <i>tec</i> / régulateur : Rro12	Nauta <i>et al.</i> , 1996 et 1997
inductible par une infection phagique	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i>	promoteur : <i>φ31</i> / régulateur : Tac	O'Sullivan <i>et al.</i> , 1996 Walker et Klaenhammer, 1998
inductible par la nisine	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lc. casei</i> <i>Lc. lactis</i>	promoteur : <i>nisA</i> / régulateur : NisR	de Ruyters <i>et al.</i> , 1996 Kleerebezem <i>et al.</i> , 1997

extérieur (lyse bactérienne ou sécrétion de la molécule) ou bien à les exposer à la surface cellulaire (protéine hybride ancrée dans le peptidoglycane). Des expérimentations animales ont montré que de tels vaccins peuvent prévenir les infections vaginales à *Candida albicans* chez la rate (Beninati *et al.*, 2000) ou encore immuniser des souris contre le tétanos lorsque les vaccins sont administrés par voie intra-nasale ou orale (Robinson *et al.*, 1997). Le développement de tels systèmes de vaccination (inoffensifs, peu coûteux, facilement administrables) soulève le problème de l'utilisation d'OGM dans le domaine alimentaire et médical.

#### 4) Législation et technologie de l'ADN recombinant

Le règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil, du 27 janvier 1997, relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires, s'applique à la mise sur le marché de nouveaux aliments ou de nouveaux ingrédients alimentaires pour lesquels la consommation humaine est restée jusqu'à présent négligeable au sein de la Communauté Européenne. Deux classes de nouveaux aliments constitués ou produits à partir de microorganismes peuvent être distingués : les aliments préparés avec de nouvelles souches bactériennes naturelles, et les aliments préparés avec des **MGMs** (Microorganismes Génétiquement Modifiés).

En Europe, les organismes génétiquement modifiés (**OGMs**) sont définis comme « des organismes dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas par multiplication et/ou recombinaison naturelle » (décret CE 258-87). Ainsi, des procédés naturels tels que la conjugaison, la transduction et la transformation ne sont pas considérées comme des procédés de modification génétique (à la condition qu'ils ne transfèrent pas des molécules nucléiques recombinantes).

Selon Johansen (1999), « les constructions génétiques réalisées à partir d'un ADN provenant d'un organisme appartenant au même genre, voire d'un petit fragment d'ADN de synthèse » sont acceptables pour les OGMs et les MGMs à dessein alimentaire. Dans le cadre de cette définition stricte, la souche modifiée de *Lc. lactis* exprimant une aminopeptidase de *Lactobacillus helveticus* (Joutsjoki *et al.*, 2002) ne peut pas être employée en alimentaire, tandis qu'une bactérie modifiée contenant plusieurs exemplaires d'un gène issu d'une bactérie appartenant au même genre peut être consommée, à la condition que ce gène soit situé sur un vecteur de clonage « Food-Grade » (voir revue Kondo et Johansen, 2002). Cette notion de vecteur « Food-Grade » implique que ce dernier soit (1) sans danger pour l'hôte, bien caractérisé, stable et à usage multiple, (2) compatible avec l'aliment et dépourvu de marqueurs d'antibiorésistance, (3) dépourvus de composés nuisibles, (4) applicable à l'échelle industrielle ou dans les produits alimentaires (voir revue de Vos, 1999). Le tableau<sub>(1)</sub> X donne quelques exemples de systèmes de modification génétique dits « Food-Grade ».





Selon Hansen (2002), si l'allégation santé des nouveaux aliments est suffisamment démontrée et attractive, les consommateurs accepteront les MGMs.

#### IV) LES DEUX BACTERIES LACTIQUES ETUDIEES LORS DE CE TRAVAIL DE THESE : *TETRAGENOCOCCUS HALOPHILA* ET *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS*

##### A) *Tetragenococcus halophila*

*Tetragenococcus halophila* ATCC 33315 est une bactérie lactique modérément halophile (Kushner, 1978) utilisée dans la fabrication de nombreux aliments à faible  $a_w$  comme la sauce de soja (Sakaguchi, 1958), les saumures d'anchois (Villar *et al.*, 1985 ; Hanagata *et al.*, 2003), la purée de soja (Roling et Verserveld 1996 ; Hanagata *et al.*, 2003), ou les œufs de poisson fermentés et fumés (Kobayashi *et al.*, 2000). Cette bactérie était initialement classée dans le genre *Pediococcus* sous la dénomination *Pediococcus soyae* (d'après l'aliment duquel elle a été isolée, Sakaguchi *et al.*, 1958) puis *Pediococcus halophilus* (d'après sa capacité à tolérer de fortes concentrations salines, Bergey's manual, 1986). Le séquençage de l'ADN<sub>R</sub> 16S de *P. halophilus* a permis d'exclure cette espèce du genre *Pediococcus*, et de la reclasser dans un nouveau genre : *Tetragenococcus* (Collins *et al.*, 1990). L'espèce *T. halophila* en a été l'unique représentante jusqu'à la découverte récente de l'espèce *Tetragenococcus muriaticus* dans une sauce fermentée de foie de calamar (Satomi *et al.*, 1997).

Comme les autres bactéries lactiques, *T. halophila* est caractérisée par des besoins nutritionnels complexes, comprenant notamment des vitamines et des cofacteurs enzymatiques comme l'acide nicotinique, l'acide pantothénique ou la biotine (Collins *et al.*, 1990).

Kawahara<sup>b</sup> *et al.* (1989) ont analysé le contenu plasmidique de 160 souches de *T. halophila* isolées d'aliments traditionnels japonais. Ils ont ainsi montré que 92 possédaient des plasmides. Dix huit souches présentaient des plasmides dont les tailles n'excèdent pas 11 kb. L'un d'entre eux a été caractérisé chez la souche type *T. halophila* et nommé pUCL287 (Bénachour *et al.*, 1995). Ce plasmide de 8,7 kb se réplique selon le modèle en thêta. Son réplicon appartient à la famille des réplicons de type thêta des bactéries lactiques. Un plasmide de grande taille (25 kb) semble impliqué dans la décarboxylation de l'aspartate chez *T. halophila* D10 (Abe *et al.*, 2002).

##### B) *Pediococcus pentosaceus*

Les Pédiocoques sont homofermentaires. Ces bactéries sont largement utilisées dans l'alimentation humaine [saucisses fermentées (Luchansky *et al.*, 1992 ; Parente *et al.*, 2001), végétaux fermentés (Olsen *et al.*, 1995 ; Tamang et Sarkar, 1996), « pickles » (Back et Stackebrandt, 1978), fromages (Tzanetaki et Litopoulou-Tzanetaki, 1989 ; Bhowmik et Marth, 1990)] pour leurs

**Tableau<sub>(1)</sub> XI : techniques de biologie moléculaire permettant l'identification inter- et intra-espèce chez les Pédicoques.**

TECHNIQUE D'IDENTIFICATION	PRINCIPE	IDENTIFICATION	REFERENCES
<u>hybridation :</u>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>hybridation spécifique</li> </ul>	hybridation de digestions d'ADNs génomiques avec une ou plusieurs sonde(s) spécifique(s)	<ul style="list-style-type: none"> <li>des souches de <i>P. damnosus</i> productrices de glucane</li> <li>de différentes souches appartenant à l'espèce <i>P. acidilactici</i></li> </ul>	Lonvaud-Funel <i>et al.</i> , 1993 Mora <i>et al.</i> , 2002
<ul style="list-style-type: none"> <li>ribotypage</li> </ul>	hybridation de digestions d'ADN génomique avec une sonde localisée dans la région codant l'ARN <sub>R</sub> 5S-16S-23S	<ul style="list-style-type: none"> <li>des Pédicoques au niveau du genre, de l'espèce et parfois de la souche</li> </ul>	Jager et Harlander, 1992 Barney <i>et al.</i> , 2001
<ul style="list-style-type: none"> <li>« riboprinting »</li> </ul>	ribotypage automatisé	<ul style="list-style-type: none"> <li>des différentes espèces de Pédicoques (technique limitée par la richesse de la banque de profils)</li> </ul>	Sakotari <i>et al.</i> , 2000
<u>séquençage :</u>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>séquençage de l'ADN<sub>R</sub> 16S</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>des différentes espèces de Pédicoques (différentiation difficile entre <i>P. pentosaceus</i> et <i>P. acidilactici</i>)</li> </ul>	Collins <i>et al.</i> , 1990 Barney <i>et al.</i> , 2001 Ercolini <i>et al.</i> , 2001 Dobson <i>et al.</i> , 2002
<ul style="list-style-type: none"> <li>séquençage de la région située entre l'ADN<sub>R</sub> 16S et l'ADN<sub>R</sub> 23S</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>des différentes espèces de Pédicoques</li> </ul>	Dobson <i>et al.</i> , 2002
<ul style="list-style-type: none"> <li>séquençage d'un gène codant une protéine de choc thermique</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>des différentes espèces de Pédicoques</li> </ul>	Dobson <i>et al.</i> , 2002
<u>profil électrophorétique après:</u>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>PCR multiplexe</li> </ul>	amplification partielle des gènes codant l'ARN <sub>R</sub> 16S et la D-lactate déshydrogénase	<ul style="list-style-type: none"> <li>souches de <i>P. damnosus</i> productrices de glucane</li> <li>des différentes souches de <i>P. acidilactici</i></li> </ul>	Mora <i>et al.</i> , 1997
<ul style="list-style-type: none"> <li>RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)</li> </ul>	amplification aléatoire de nombreuses régions de l'ADN chromosomique par PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>des différentes espèces de Pédicoques</li> <li>des différentes souches de <i>P. acidilactici</i></li> </ul>	Nigatu <i>et al.</i> , 1998 Mora <i>et al.</i> , 2000

propriétés acidifiantes, aromatisantes et texturantes. Ces bactéries sont également utilisées en alimentation animale en tant que probiotiques (commercialisés sous les marques Fermacton et Bio-Plus Porc ; Gournier-Château *et al.*, 1994) et appétants (Dobson *et al.*, 2002).

Les Pédiocoques peuvent exercer un rôle négatif dans certains aliments comme les boissons alcoolisées (flore d'altération de l'aspect du vin, Manca de Nadra et Strasser de Saad, 1995 ; flore d'altération du goût de la bière Dobson *et al.*, 2002). Enfin, certains travaux soulignent l'émergence des deux espèces *P. acidilactici* et *P. pentosaceus* dans le domaine médical, où ces bactéries sont aujourd'hui considérées comme pathogènes opportunistes chez des sujets immunodéprimés (Sarma et Mohanty, 1998 ; Heinz *et al.*, 2000 ; Barros *et al.*, 2001).

Huit espèces composent actuellement le **genre *Pediococcus*** : *Pediococcus acidilactici*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, *P. urinaeequi* et enfin *P. claussenii* (Dobson *et al.*, 2002). Le séquençage de l'ADN<sub>R</sub> 16S de *P. urinaeequi* et *P. dextrinicus* a montré que ces espèces devraient être reclassées respectivement dans le genre *Aerococcus* (Collins *et al.*, 1990) et *Lactobacillus* (Collins *et al.*, 1990; Dobson *et al.*, 2002 et voir revue Stiles et Holzapfel, 1997). D'un point de vue phylogénétique, les genres *Pediococcus* et *Lactobacillus* forment un super-groupe, qui peut être divisé en deux sous groupes ; toutes les espèces appartenant au genre *Pediococcus* formant le sous groupe *Lactobacillus casei-Pediococcus* (Garvie, 1986 ; Axelsson, 1998).

Les Pédiocoques sont aisément identifiables grâce à leur morphologie caractéristique (coques organisées en tétrades). Cependant l'identification à l'échelle de l'espèce puis de la souche reste difficile et nécessite le recours à des techniques de biologie moléculaire (Tableau<sub>(I)</sub> XI). Les méthodes les plus discriminantes couplent souvent deux techniques, comme l'amplification par PCR de la région variable V3 de l'ADN<sub>R</sub> 16S, suivie d'une analyse en TTGGE (pour Temporal Gradient Gel Electrophoresis ; Ogier *et al.*, 2002).

L'espèce *Pediococcus pentosaceus* est couramment employée dans l'élaboration d'aliments fermentés très différents comme les saucisses, les pickles, les produits traditionnels à base de graines ou de lait de soja, les fromages (flore de maturation) ou l'ensilage (Tableau<sub>(I)</sub> XII). Certaines souches de *P. pentosaceus* sont capables de produire des exopolysaccharides qui peuvent altérer la qualité des vins en conférant un aspect « filant » (Manca de Nadra et Strasser de Saad, 1995).

Les différentes souches de *P. pentosaceus* décrites possèdent entre trois et cinq plasmides résidents (Graham et McKay, 1985), dont certains codent la fermentation de sucres (Bénachour *et al.*, 1996) ou la synthèse de bactériocines (Daeschel et Klaenhammer, 1985 ; Gonzalez et Kunka, 1986). Chez les Pédiocoques, le transfert de gènes peut s'effectuer par conjugaison (Kim *et al.*, 1992 ; Bénachour *et al.*, 1996) ou par transformation par électroporation

**Tableau<sub>(1)</sub> XII : origines alimentaires des différentes souches de *Pediococcus pentosaceus* décrites à ce jour.**

	Origine	Références
Origine végétale	<i>klamir</i> (pain issu de la fermentation de sorgho)	Gassem, 1999
	<i>kisra</i> (pain issu de la fermentation de sorgho)	Mohammed <i>et al.</i> , 1991
	<i>togwa</i> (aliment fermenté à base de sorgho, maïs et millet)	Mugula <i>et al.</i> , 2003
	fourrage servant à l'ensilage (maïs et alfafa)	Cai <i>et al.</i> , 1999
	vin rouge de Bourgogne	Barthelmebs <i>et al.</i> , 2000
	Cafayate (vin argentin)	Manca de Nadra et Straser de Saar, 1987
	pousses de bambou fermentées	Tamang et Sarkar, 1996
	<i>kenkey</i> (maïs fermenté)	Olsen <i>et al.</i> , 1995
	concombre saumuré	Back et Stackebrant, 1978
	pâte de manioc	Miambi <i>et al.</i> , 2003
Origine animale	<i>feta</i>	Tzanetaki et Lipoulous-Tzanetaki, 1982
	<i>cheddar</i>	Dacre <i>et al.</i> , 1958 et Law <i>et al.</i> , 1976
	<i>salers</i>	Duthoit <i>et al.</i> , 2001
	saucisse fermentée	Parente <i>et al.</i> , 2001
	<i>som-fak</i> (mélange de poisson, de sel et d'aromates fermenté)	Paludan-Müller <i>et al.</i> , 1999
	<i>plaa-som</i> (mélange de poisson, de sel, d'huile de palme fermenté)	Paludan-Müller <i>et al.</i> , 2002

(Kim *et al.*, 1992). Cependant les efficacités réduites de ces techniques (de l'ordre de  $10^2$  transformants / $\mu\text{g}$  de plasmide au maximum) restent insuffisantes pour envisager d'effectuer des techniques de recombinaison homologue.

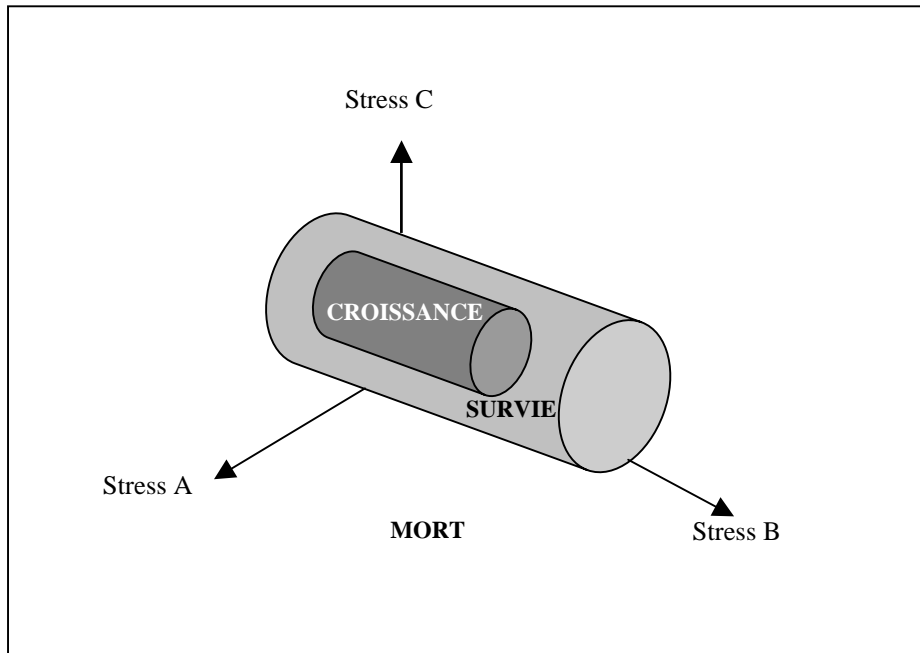


Figure 02 : modélisation des effets de trois stress sur la croissance, la survie et la mortalité cellulaire (d'après la revue Booth, 2002).

## CHAPITRE II : STRESS ET BACTERIES DE L'ALIMENT

### I) STRESS ET GENERALITES

#### A) Définitions

Selon Booth (2002), le stress correspond à « toute modification dans le génome, le protéome ou dans l'environnement, qui provoque une croissance réduite ou affecte la capacité à survivre. De telles modifications conduisent la cellule à tenter de restaurer un profil métabolique qui serait favorable à la survie, ou bien à une croissance plus rapide ». Dans cette définition, Booth précise que toutes les étapes de l'expression des gènes (transcription, traduction et modifications post-traductionnelles) sont incluses dans le terme de métabolisme.

La résistance d'un micro-organisme face à un stress donné dépend de son état physiologique. Les cellules qui ont cessé de croître, qui se développent lentement ou qui sont entrées en phase stationnaire, acquièrent un niveau général de protection au stress supérieur à celui des cellules en pleine croissance (Martin, 1991). L'entrée en phase stationnaire induit des systèmes généraux de la réponse au stress qui préparent les cellules à survivre à différents stress environnementaux sans qu'elles n'y aient été nécessairement exposées (Jenkins *et al.*, 1988, 1990 ; Jouper-Jaan *et al.*, 1992 ; Hartke *et al.*, 1994 ; Giard *et al.*, 1996). La résistance au stress d'une population bactérienne dépend également de la composition du milieu de culture (Annous et Kozempel, 1998 ; Guillot *et al.*, 2000 ; Carvalho *et al.*, 2003). En effet, certains constituants peuvent minimiser l'impact du stress sur la cellule (présence d'osmoprotectants, de thermoprotectants ou de cryoprotectants).

Booth (2002) propose une représentation des effets d'une combinaison de stress sur la croissance et la survie cellulaire (Figure<sub>(1)</sub> 2). Trois zones peuvent être distinguées. La zone la plus *centrale* correspond aux conditions pour lesquelles toutes les cellules se développent (à un taux de croissance défini). La zone *médiane* (ou de survie) correspond aux conditions pour lesquelles il y a peu de mortalité et pas de croissance. Enfin, la zone *extérieure* correspond aux conditions pour lesquelles toutes les cellules meurent. Les dimensions de la zone de confort (zones centrale et médiane) relèvent des paramètres intrinsèques de la bactérie (sensibilité aux stress unitaires ou combinés ; adaptabilité). L'interface entre les zones médiane et extérieure (stress intenses) pourrait correspondre aux conditions pour lesquelles les bactéries sont à l'état **Viables mais Non Cultivables** (VNC ; voir revue Booth, 2002). Ces cellules, demeurées métaboliquement actives, ne sont plus pour autant capables de se développer sur milieu gélosé (Kogure, 1979 ; Xu *et al.*, 1982). Contrairement au phénomène de sporulation, l'entrée en état VNC est indépendante de la division cellulaire ou de l'augmentation de biomasse (Ravel *et al.*, 1994 et voir revue Colwell et Grimes, 2000). Actuellement, deux hypothèses tentent d'expliquer le phénomène VNC : (1) les cellules VNC seraient des cellules moribondes incapables de former des colonies sur milieu gélosé à cause de détériorations cellulaires





diverses, (2) les cellules entreraient en état VNC selon une stratégie de réponse adaptative programmée, visant à améliorer leur survie (Nyström, 2001). Selon cet auteur, cet état correspondrait à une forme de stérilité développée par des bactéries intactes (intégrité membranaire et conservation d'une activité métabolique).

L'état VNC a été observé dans diverses situations de stress (rencontrées notamment en filière alimentaire : carence nutritive, basses températures, pressions élevées, variations du pH ou de la salinité extérieure). Il s'avère que l'évaluation de l'effet d'une contrainte sur les flores présentes dans un aliment par des techniques de numérations directes sur milieu gélosé ne prend pas en compte la proportion de la population à l'état VNC et tend à minimiser le nombre de cellules totales. L'utilisation de procédures d'enrichissement avant numération peut révéler en partie cette population VNC (Asakura *et al.*, 2002).

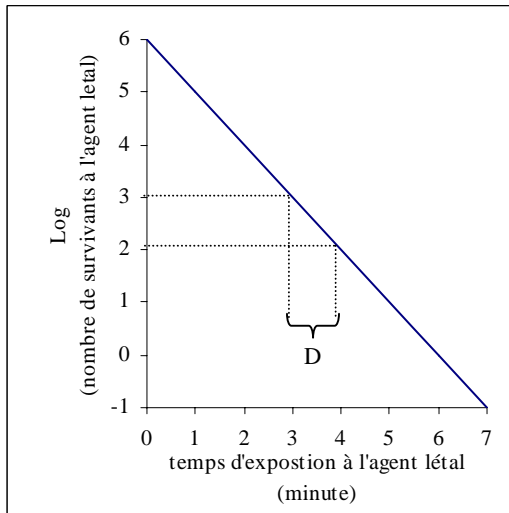
Un certain nombre de techniques alternatives permettent aujourd'hui d'évaluer plus précisément la viabilité bactérienne en situation de contrainte (Bunthof *et al.*, 2001 ; Wouters *et al.*, 2001). Elles sont basées sur l'utilisation de différents colorants fluorescents. La fluorescence émise peut être observée en microscopie à épi-fluorescence (numération des cellules actives et des cellules VNC), ou analysée par cytométrie de flux (cellule photoélectrique analysant 100 à 1000 cellules/seconde). La RT-PCR apparaît également comme une approche intéressante dans le but de détecter des microorganismes en état VNC. Les gènes ciblés sont impliqués dans la virulence de la bactérie (gène *vvh* de *Vibrio vulnificus*, Fischer-Le Saux *et al.*, 2002) ou dans la biosynthèse du peptidoglycane (gène *pbp5* de *Ent. faecalis*, del Mar Lleo *et al.*, 2000).

## **B) Modalités d'application du stress**

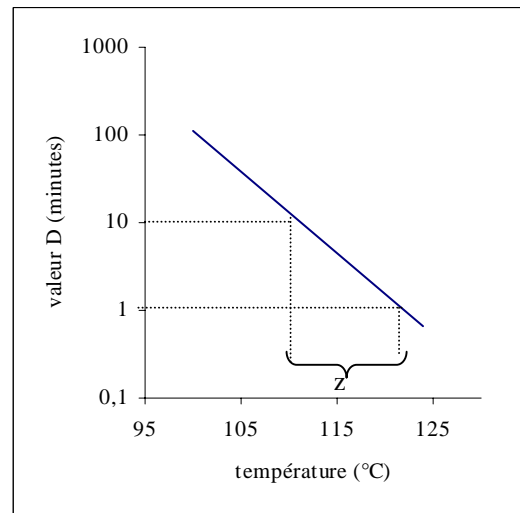
Les études publiées abordent la notion de stress selon deux modalités d'application possibles : l'application prolongée d'une contrainte modeste ou l'application brutale d'un stress léthal.

### **1) Stress prolongé**

Cette modalité d'application du stress consiste à inoculer les bactéries dans un milieu modérément hostile, c'est à dire permettant une croissance. Il s'agit ici de suivre l'adaptation progressive (ou acclimatation) de la bactérie face à un **stress prolongé**. Les paramètres de stress permettant une croissance (réduite) des microorganismes seront appelés **sub-optimaux**. L'évaluation de l'impact du stress prolongé sur la croissance est classiquement réalisée par turbidimétrie en mesurant les effets des variations des paramètres de croissance. Il peut s'agir de l'augmentation du temps de latence (Vasseur *et al.*, 1999 ; Mellefont *et al.*, 2003), ou de la diminution du taux de croissance et de l'absorbance finale (Kim et Dunn, 1997 ; Vasseur *et al.*, 1999 ;



**Figure(1) 3 : modélisation de la mort microbienne par une loi exponentielle (d'après Prescott *et al.*, 1998).**



**Figure(1) 4: détermination graphique de la valeur z (d'après Prescott *et al.*, 1998).**

**Tableau(1) XIII : valeurs D et z de quelques bactéries pathogènes (d'après Bryan, 1996).**

Microorganisme	Substrat	Valeur D (minutes)	Valeur z (°C)
<i>Clostridium botulinum</i>	tampon phosphate	$D_{121^{\circ}\text{C}} = 0,204$	10
<i>Clostridium perfringens</i>	milieu de culture	$D_{90^{\circ}\text{C}} = 3-5$	6-8
<i>Salmonella</i>	poulet à la king	$D_{60^{\circ}\text{C}} = 0,39-0,40$	4,9-5,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	poulet à la king	$D_{60^{\circ}\text{C}} = 5,17-5,37$	5,2-5,8
	dinde farcie	$D_{60^{\circ}\text{C}} = 15,4$	6,8
	NaCl 0,5%	$D_{60^{\circ}\text{C}} = 2,0-2,5$	5,6

Marceau *et al.*, 2003). La mesure de l'absorbance finale n'est cependant pas un bon indicateur pour les bactéries dont la mort ne s'accompagne pas d'une lyse cellulaire (Marceau *et al.*, 2003).

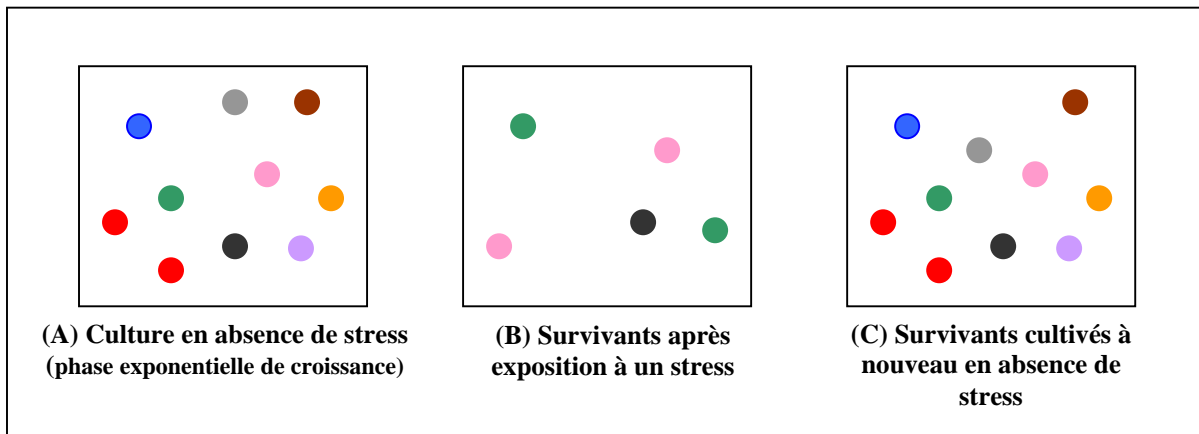
Différentes approches protéomiques ont montré que l'acclimatation au stress s'accompagne de profondes modifications du métabolisme cellulaire (et de la glycolyse notamment) (Marceau *et al.*, 2002 ; Prasad *et al.*, 2003). Ces observations peuvent être reliées au fait que la culture en conditions sub-optimales favorise la survie pendant la phase stationnaire (Marceau *et al.*, 2003). Ces auteurs ont montré que *Lb. sakei* voit sa survie augmenter lorsque la bactérie est cultivée en présence de sel (conditions sub-optimales). La perte totale de viabilité est observée après 10 jours lorsque la croissance est réalisée en milieu minimum contenant 9% de NaCl (p/v) au lieu de trois dans la culture sans NaCl. Le même phénomène est observé pour une croissance à basse température (perte totale de viabilité après 16 jours à 4°C au lieu de 3 à 30°C ; Marceau *et al.*, 2003).

## 2) Stress de type choc

Le stress peut également prendre la forme d'une contrainte intense et de courte durée (**chocs, ou « acute stress »**). La réponse de la bactérie sera évaluée en terme de survie après que la contrainte ait été supprimée, et ceci principalement par numération sur milieu gélosé. Il est à noter que selon Booth (2002), les individus d'une même population réagiraient de façon collégiale aux variations environnementales et seraient probablement capables de développer des mécanismes de signalisation inter-cellulaire. L'impact d'un stress sur la viabilité serait donc susceptible de différer selon que son évaluation soit réalisée sur milieu gélosé ou bien en milieu liquide.

La mortalité d'une population microbienne suit, comme la croissance, une loi exponentielle (Figure<sub>(1)</sub> 3). Il est possible de calculer graphiquement la durée d'application du stress nécessaire pour observer une létalité de 90% (Figure<sub>(1)</sub> 3, valeur D) et l'amplitude de l'augmentation de l'intensité du stress nécessaire pour réduire la valeur D au dixième de sa valeur (valeur z, Figure<sub>(1)</sub> 4). Les valeurs D et z sont couramment employées pour estimer la résistance d'un microorganisme face à un traitement thermique (Tableau<sub>(1)</sub> XIII).

Plusieurs facteurs influencent le taux de survie d'une population bactérienne après un stress de type choc [l'état physiologique des cellules, le genre, l'espèce et parfois même la souche considérée (Kim *et al.*, 1999)]. Lorsque la résistance est évaluée sur des cellules en phase exponentielle de croissance, des différences apparaissent entre les cellules d'une même population. En effet, si on traduit la courbe de survie post-choc selon les représentations classiques (valeurs de D et de z), on observe dans de nombreux cas un phénomène de déviation de la linéarité des courbes, avec la présence d'épaule ou de queue (« tailing ») (Smelt *et al.*, 2002). La modélisation de la mort



**Figure (1) 5 : modèle de l'hétérogénéité intra-population selon la revue Booth (2002).**

- (A) : durant la phase exponentielle de croissance chaque cellule d'une même population possède son propre contenu protéique (indiqué par des points de couleurs différentes). Sachant que le nombre de cellules composant une population en phase exponentielle de croissance ( $10^6$  à  $10^9$  UFC/mL en bouillon) est supérieur au nombre de protéines contenues dans une cellule ( $10^3$ ), chaque type de contenu protéique est probablement représenté par une multitude de cellules.
- (B) : après une brusque transition dans un milieu hostile à la croissance, la majorité des cellules sont tuées et la population résiduelle contient une faible variété de cellules possédant des contenus protéiques différents. La survie est une caractéristique propre à quelques profils protéiques différents.
- (C) : lorsque les cellules survivantes sont transférées dans un milieu de culture propice à la croissance (absence de stress), elles génèrent une population mixte similaire à l'originale car elles possèdent les mêmes potentiels génétiques que les cellules initiales. Ce modèle prédictif prédit que la survie s'achève sans perte de diversité génotypique.

microbienne par une loi exponentielle n'est donc pas toujours vérifiée (Lou et Yousef, 1997; Kim *et al.*, 2002; Smelt *et al.*, 2002). Ces observations trouvent aujourd'hui une explication au travers du modèle de diversité, ou hétérogénéité intra-population transitoire (voir revue Booth, 2002; Kim *et al.*, 2002). Selon ce modèle, les cellules d'une même culture bactérienne ne sont pas toutes exactement dans le même état physiologique si la croissance n'est pas synchronisée. Chacune possède un contenu protéique donné et présente, par conséquent, un niveau de résistance au stress létal différent (Kim *et al.*, 2002). Ainsi, les cellules d'une même population de *Lc. lactis* ayant survécu à un stress intense (99,99% mortalité) sont toutes capables de croître ultérieurement en absence de stress, tandis que seule une proportion peut survivre à un stress intense ultérieur (Kim *et al.*, 2002). Les cellules survivant au premier stress ne possédaient donc pas toutes le même équipement de réponse au stress. Ces auteurs ont confirmé ce postulat en montrant que des cellules prélevées à différents moments d'une culture synchronisée (par repiquages successifs de cellules en phase exponentielle) présentent différents niveaux de survie face au stress.

Différentes hypothèses permettent d'expliquer pourquoi des cellules en phase exponentielle de croissance issues d'une même population ne possèdent pas toutes le même contenu protéique (i) il existe des variations génétiques au sein de cette population, (ii) des altérations transitoires de la transcription et de la traduction apparaissent, (iii) l'activité des protéines chaperonnes et des systèmes protéolytiques varie (voir revue Booth, 2002 ; Figure<sub>(1)</sub> 5A).

Ce modèle d'hétérogénéité intra-population est présenté comme une stratégie permettant à une bactérie de survivre au stress. Il garantit ainsi qu'au moins une partie de la population survivra face un stress donné (Figure<sub>(1)</sub> 5). Dans ce modèle, la population ayant survécu au stress possède les mêmes potentiels génétiques que la population originelle. Lorsqu'elle sera cultivée en absence de stress, elle générera à nouveau l'apparition d'un mélange de cellules présentant des profils protéiques similaires à ceux de la population initiale (Figure<sub>(1)</sub> 5C).

## **II) LES CONTRAINTES RENCONTREES EN AGROALIMENTAIRE**

### **A) Flores microbiennes des aliments soumises aux contraintes**

#### **1) Les flores d'altération/pathogène**

Les aliments sont susceptibles de contenir des flores indésirables, entraînant des altérations diverses des propriétés organoleptiques et/ou provoquant des toxi-infections alimentaires chez les consommateurs. La non-prolifération/destruction de germes indésirables résulte en partie des effets des contraintes physico-chimiques exercées par la matrice alimentaire (pH, disponibilité en eau, température...). Le pH de l'aliment dépend des quantités de substances acides ou basiques présentes mais aussi de l'effet tampon du produit, lequel est surtout lié à sa teneur en protéines

**Tableau<sup>(1)</sup> XIV : pH approximatifs de quelques produits alimentaires (d'après Bourgeois *et al.*, 1996).**

Produit alimentaire	pH
Bœuf	5,3-6,2
Porc	5,3-6,4
Poulet	5,8-6,4
Poisson	6,5-6,8
Lait frais	6,3-6,5
Beurre	6,1-6,4
Carotte	5,2-6,0
Pomme de terre	5,4-6,2
Oignons	5,3-5,8
Tomates	4,2-4,8
Pommes	2,9-3,3
Oranges	3,6-4,3
Raisins	3,4-4,5
Citrons	2,2-2,4

**Tableau<sup>(1)</sup> XV : a<sub>w</sub> approximatives de quelques produits alimentaires (d'après Bourgeois *et al.*, 1996).**

Produit alimentaire	a <sub>w</sub>
Bœuf	0,990-0,980
Porc	0,990
Poisson	0,994-0,990
Charcuterie sèche	0,950-0,850
Lait	0,995
Carotte	0,989-0,983
Concombre	0,998-0,983
Champignon	0,995-0,989
Pomme de terre	0,985
Tomates	0,991
Pommes	0,980
Cerises	0,977
Raisins	0,986-0,963
Citrons	0,984
Melons	0,994-0,988
Oranges	0,988
Pêches	0,985
Confitures	0,800-0,750
Céréales	0,700

**Tableau<sup>(1)</sup> XVI : tolérance au froid des bactéries pathogènes rencontrées dans les aliments (d'après la revue Abee et Wouters, 1999).**

INF : microorganismes provoquant des infections alimentaires ;

INT : microorganismes provoquant des intoxications alimentaires

Température minimale de croissance (approximative)	Microorganismes
entre 0 et 5°C	<i>Aeromonas hydrophila</i> (INF) <i>Bacillus cereus</i> (INF et INT) <i>Clostridium botulinum</i> type E (INT) <i>Listeria monocytogenes</i> (INF) <i>Yersinia enterocolitica</i> (INF)
entre 5 et 10°C	<i>Salmonella</i> (INF) <i>Vibrio par haemolyticus</i> (INF) <i>Escherichia coli</i> entéropathogènes (INF) <i>Staphylococcus aureus</i> (INT)
entre 5 et 10°C	<i>Clostridium botulinum</i> type A et B (INF) <i>Clostridium perfringens</i> (INT)

(Tableau<sub>(I)</sub> XIV). Ainsi, les fermentations basées sur l'utilisation de bactéries lactiques connaissent une chute progressive du pH, créant un environnement peu favorable pour les flores d'altération. Un second paramètre important influant sur la prolifération des germes est l'activité de l'eau ( $a_w$ ). La majorité des produits frais comme les fruits, les légumes, la viande, le lait et les poissons ont une activité de l'eau comprise entre 0,97 et 0,996 (Jay, 1992, Tableau<sub>(I)</sub> XV). Tous ces éléments sont donc favorables au développement des microorganismes. L'abaissement de l' $a_w$  lors de certains procédés de fabrication (salaisons, saumures, confitures, séchages de fruits et des viandes) favorise la préservation de l'aliment. D'autre part, la réduction des flores s'effectue également *via* différents traitements physiques réalisés sur la matière première ou sur l'aliment final (pasteurisation / tyndallisation / micro-ondes / surgélation / réfrigération) (Tableau<sub>(I)</sub> XVI). On assiste aujourd'hui à l'émergence de nouveaux procédés dits athermiques permettant le traitement de la matrice première ou du produit final. Outre la destruction des flores indésirables, ils conservent les qualités organoleptiques de l'aliment (hautes pressions, champs électriques pulsés ...).

Dans ce contexte de destruction/non prolifération, la multiplicité des contraintes présentes au cours du procédé de fabrication augmente la réduction des flores si ces contraintes sont appliquées de manière concertée plutôt que séquentielle. Le principe du « hurdle concept » (littéralement concept des obstacles) consiste à sécuriser les produits alimentaires en combinant différentes techniques de conservation dont les effets seront synergiques (voir revue Leistner, 2000).

## 2) Les flores technologiques

Les bactéries employées en tant qu'auxiliaires technologiques dans les industries fermentaires (bactéries lactiques, bactéries corynéformes ...) sont également susceptibles de subir diverses contraintes physico-chimiques. Les levains, par exemple, sont exposés à de nombreux stress de différentes natures durant leur préparation, l'inoculation dans la matrice alimentaire et/ou lors du stockage de l'aliment. Les capacités de réponse et d'adaptation de ces auxiliaires à ces différentes variations conditionnent leur survie et leur vitalité ultérieures (et par conséquent la qualité de la fermentation et du produit fini).

De nombreuses études visent à identifier et comprendre les schémas de régulation de la réponse au stress afin de contrôler, prédire ou modifier le comportement des bactéries dans des conditions données. C'est le cas pour la famille des bactéries lactiques. Ces auxiliaires technologiques sont au préalable produits sous forme de levains concentrés. Les cellules subissent des étapes de lyophilisation ou d'atomisation, produisant des stress simultanés de nature oxydative et osmotique (voir revue van de Guchte *et al.*, 2002). Les levains sont ensuite stockés au froid. Ces stades de préparation doivent garantir une bonne vitalité des souches lors de l'introduction dans la matière première (lait, moût...). Les procédés alimentaires qui suivront, comme les étapes de





de maturation et de stockage, pourront être à l'origine de nombreux stress. Ainsi, une forte température est appliquée, par exemple, lors de la cuisson des fromages comme le cheddar. La pression osmotique peut également varier *via* l'addition de sucres ou de sels durant le procédé et évoluer au cours du temps. Ainsi, la fabrication de la sauce de soja (en présence de Tétragénocoques) s'opère à des concentrations en NaCl comprises entre 12% et 26% (p/v) (Roling et Van Versveld, 1996). Les procédés de fermentation résultent aussi en l'apparition progressive d'acides. Ainsi, la croissance de *P. pentosaceus* en milieu riche s'accompagne d'une chute de pH de 5,4 à 4,2 en 24 heures (Rodriguez et Manca de Nadra, 1995).

## **B) Effets du stress sur les bactéries rencontrées dans l'aliment**

### **1) Effets sur la croissance / survie / morphologie des cellules**

Les effets du stress dépendent des modalités d'application de ce dernier (acclimatation ou choc). Ils entraînent surtout des défauts de croissance et/ou de viabilité chez les bactéries.

L'observation de cellules stressées par microscopie révèle différents types de modifications morphologiques. Ainsi, un phénomène d'allongement cellulaire a été décrit chez *Lb. acidophilus* en présence d'un stress hypo-thermique (Lorca et Font de Valdez., 1999), chez *Lactobacillus alimentarius* en présence d'un stress acide (Lemay *et al.*, 2000), chez *L. monocytogenes* en présence d'un stress acide, basique ou hyper-osmotique (Isom *et al.*, 1995) et chez *S. aureus* en présence d'un stress hyper-osmotique (Vijaranakul *et al.*, 1995). Au contraire, le raccourcissement cellulaire est observé chez *Lb. sakei* en présence d'un stress hypo-thermique ou hyper-osmotique (Marceau *et al.*, 2003). L'association de ces deux stress a pour conséquence de lisser la surface externe des cellules de *Lb. sakei* (Marceau *et al.*, 2003). Le stress peut également provoquer un événement d'agrégation cellulaire, comme c'est le cas chez *Lb. alimentarius* en présence d'un stress hyper-osmotique (Lemay *et al.*, 2000).

### **2) Effets sur la virulence des bactéries pathogènes**

Certaines contraintes ont un effet direct sur la production de toxines. Ainsi, la production des entérotoxines A et B par *S. aureus* est réduite dans un environnement dont l' $a_w$  est faible (Qi et Miller, 2000). Chez *L. monocytogenes*, la présence de sels (NaCl ou KCl) entraîne une production accrue de catalase, superoxyde dismutase et de listeriolysin O. Cette production accrue n'a pu être corrélée à une augmentation de la virulence de *L. monocytogenes* après injection des cellules chez des souris (Myers *et al.*, 1993).

Les acteurs principaux de la réponse au stress salin (osmoprotectants, systèmes de transport et de synthèse d'osmoprotectants, régulateurs transcriptionnels) semblent représenter d'importants facteurs de virulence chez plusieurs bactéries pathogènes (Kazmierczak *et al.*, 2003 et voir revue

**Tableau<sup>(1)</sup> XVII : phénomène de protections homologue et hétérologue chez les bactéries lactiques.**

<sup>(1)</sup> : Hartke *et al.*, 1994 ; <sup>(2)</sup> : Hartke *et al.*, 1995 ; <sup>(3)</sup> : Flahaut *et al.*, 1996 , <sup>(4)</sup> : O'Sullivan et Condon, 1997 ; <sup>(5)</sup> : Svensater *et al.*, 1997 ; <sup>(6)</sup> : Lorca et et Font de Valdez, 1999 ; <sup>(7)</sup> : Kim *et al.*, 2001 ; <sup>(8)</sup> : Prasad *et al.*, 2003

Nature du 1 <sup>e</sup> stress / Nature du 2 <sup>nd</sup> stress	Stress biliaire	Stress acide	Stress chaud	Stress salin	UV	Stress nutritif
Stress biliaire	<i>Lb. acidophilus</i> <sup>(7)</sup>		<i>Lb. acidophilus</i> <sup>(7)</sup> <i>Ent. faecalis</i> <sup>(3)</sup>	<i>Lb. acidophilus</i> <sup>(7)</sup>		
Stress acide		<i>Lc. lactis</i> <sup>(4)</sup> <i>Ent. faecalis</i> <sup>(3)</sup> <i>Lb. acidophilus</i> <sup>(6)</sup> <i>St. mutans</i> <sup>(5)</sup>	<i>Ent. faecalis</i> <sup>(3)</sup>		<i>Lc. lactis</i> <sup>(2)</sup>	<i>Lc. lactis</i> <sup>(1)</sup>
Stress chaud	<i>Ent. faecalis</i> <sup>(3)</sup> <i>Lb. acidophilus</i> <sup>(7)</sup>	<i>Lc. lactis</i> <sup>(4)</sup>		<i>Lb. acidophilus</i> <sup>(7)</sup>	<i>Lc. lactis</i> <sup>(2)</sup>	<i>Lc. lactis</i> <sup>(1)</sup>
Stress éthanolique		<i>Lc. lactis</i> <sup>(4)</sup> <i>Lb. acidophilus</i> <sup>(6)</sup>			<i>Lc. lactis</i> <sup>(2)</sup>	<i>Lc. lactis</i> <sup>(1)</sup>
Stress salin		<i>Lc. lactis</i> <sup>(4)</sup>				<i>Lc. lactis</i> <sup>(1)</sup>
Stress oxydatif		<i>Lc. lactis</i> <sup>(4)</sup> <i>Lb. acidophilus</i> <sup>(6)</sup>			<i>Lc. lactis</i> <sup>(2)</sup>	<i>Lc. lactis</i> <sup>(1)</sup>
Dessiccation		<i>Lb. acidophilus</i> <sup>(6)</sup>	<i>Lb. rhamnosus</i> <sup>(8)</sup>	<i>Lb. rhamnosus</i> <sup>(8)</sup>		

Sleator et Hill, 2002 ). Ainsi, la carnitine [abondante dans des tissus animaux (voir revue Bieber, 1988)] semble être le principal osmoprotectant utilisé par *L. monocytogenes* pour vivre durant l'infection (Sleator *et al.*, 2001). L'inactivation de certains transporteurs d'osmoprotectants réduit la virulence des bactéries comme *E. coli* (diminution de la capacité de colonisation de la vessie chez les souris ; Culham *et al.*, 1998), *L. monocytogenes* (diminution de la capacité de colonisation de l'intestin de souris, Sleator *et al.*, 2001) ou *Salmonella typhimurium* (perte de la capacité à lyser les macrophages, Lindgren *et al.*, 1996).

Chez *L. monocytogenes*, une exposition au stress acide augmente la virulence de la bactérie (Bolton et Franck, 1999). Ces auteurs supposent que les bactéries adaptées au stress acide survivent mieux durant la digestion dans l'estomac et par conséquent se révèlent plus infectieuses.

Enfin, la sérine-protéase Clp, induite en situation de stress, est essentielle à la survie de *L. monocytogenes* dans les cellules hôtes (Gaillot *et al.*, 2001).

### 3) Adaptation au stress

Les cellules en phase exponentielle de croissance sont capables de développer des mécanismes d'adaptation au stress. Lorsque ces cellules sont placées en contact avec un agent de stress modéré, elles deviennent plus résistantes à ce stress (protection homologue) et parfois à d'autres types de stress (protection hétérologue ou croisée). L'importance du phénomène peut être évaluée en calculant le « **taux de survivants** » (rapport du nombre de cellules pré/post stress), puis le « **facteur de tolérance** » (rapport du taux de survivants parmi les cellules adaptées sur le taux de survivants parmi les cellules non adaptées ; Flahaut<sup>a</sup> *et al.*, 1996). Lou et Yousef (1997) préconisent de mesurer l'impact d'une adaptation sur la survie à un stress donné en fonction du temps d'application de ce stress. Ces auteurs calculent la « zone de protection » (aire située entre la courbe de survie des cellules adaptées et celle des cellules non adaptées).

Pour une espèce donnée, toutes les combinaisons de stress ne sont pas susceptibles d'activer les mécanismes de protection croisée. Les protections ne sont pas toutes dépendantes d'une synthèse protéique. Ainsi chez *Ent. faecalis*, certaines protections sont observées en absence et en présence de chloramphénicol pendant la phase d'adaptation (Flahaut<sup>a</sup> *et al.*, 1996).

La plupart des connaissances sur l'adaptation au stress au sein de la famille des bactéries lactiques concernent *Lc. lactis* (Tableau<sub>(1)</sub> XVII). Cependant certains stress (biliaires, acide, chaud ou salin) ont fait l'objet de travaux sur plusieurs bactéries lactiques. Lorsqu'ils sont employés en tant que stress adaptatifs, ils induisent des phénomènes de protection homologue et/ou hétérologue. Ainsi, une adaptation acide protège d'un stress ultérieur acide, chaud, éthanolique, osmotique (salin ou dessiccation) ou oxydatif. Une adaptation saline protège d'un stress biliaire, chaud, ou d'un stress de



dessiccation. Il est à noter que les données consignées dans le Tableau<sup>(1)</sup> XVII concernent une souche particulière de chaque espèce bactérienne ; elles ne peuvent donc pas être extrapolées à l'espèce. En effet, Kim *et al.* (1999) ont montré que chaque espèce et même chaque sous espèce de *Lc. lactis* possède ses propres capacités d'adaptation.

### III) LA REPONSE AU STRESS

Les bactéries préviennent les dommages plutôt que de les réparer (voir revue Hengge-Aronis, 2002). Aussi, une bactérie dispose de différents systèmes protégeant la cellule des contraintes extérieures dont les activités seront modulées par les variations des paramètres environnementaux. La plupart du temps, il s'agira pour la bactérie de détecter le signal stress puis d'activer ou de réprimer la transcription de différents gènes permettant une réponse rapide et efficace. Cette réponse est spécifique de la nature du stress appliqué et/ou générale (réponse globale indépendante de la nature du stress appliqué).

Les régulateurs potentiels de la réponse au stress chez les bactéries sont nombreux : il en existe par exemple 138 chez *Lc. lactis* (par homologie avec des familles connues de régulateurs ; Guédon *et al.*, 2001). Deux types de régulateurs jouent un rôle important chez les bactéries. Il s'agit des facteurs de transcription et des systèmes à deux composants.

La multiplication des approches (physiologie, créations de mutants, analyse protéomique, transcriptome...) montre que certains acteurs de la réponse au stress peuvent être spécifiques d'un stress donné, tandis que d'autres sont recrutés lors de contraintes diverses (protéines dites générales de stress).

Cette partie abordera les régulateurs du stress chez différentes bactéries rencontrées dans les aliments, en traitant plus particulièrement du cas des bactéries lactiques.

#### A) Modalités de réponses à quelques stress unitaires

##### 1) Contrainte thermique

La conservation par élévation/abaissement de la température provoque des perturbations importantes de la croissance qui font suite à des lésions de la membrane et de la paroi ainsi que des altérations des macromolécules cytoplasmiques (protéines, ADN, ARN, ribosomes) (voir revue van de Guchte *et al.*, 2002). La réponse face au stress thermique se traduit par la synthèse de protéines de type Hsp (pour Heat-shock protein) ou de type Csp (pour Cold-shock protein) réparant les dommages (réduction des surenroulements négatifs de l'ADN, dégradation/repliement des protéines dénaturées) et préparant la bactérie à survivre dans des conditions plus délétères



(maintien du niveau de transcription et de traduction, modification de la proportion d'acide gras courts et/ou insaturés dans les lipides, activation des mécanismes de réponse générale au stress) (voir revues Abee et Wouters, 1999 ; Phadtare *et al.*, 2000 ; van de Gutche *et al.*, 2002).

Un **choc thermique chaud** provoque une dénaturation des protéines et leur agrégation, une déstabilisation des ribosomes et de l'ARN ainsi qu'une modification de la fluidité membranaire (Annous *et al.*, 1999). Les bactéries lactiques présentent une réponse au stress hyper-thermique similaire à celles des autres bactéries à Gram positif (*Lc. lactis*, Whitaker et Batt, 1991 ; Auffray *et al.*, 1992 ; Kilstrup *et al.*, 1997 ; *Leu. mesenteroides*, Salotra *et al.*, 1995 ; *Ent. faecalis*, Flahaut<sup>a</sup> *et al.*, 1996 ; *O. oeni*, Guzzo *et al.*, 1997 ; *Lb. bulgaricus*, Gouesbet *et al.*, 2002). Ainsi, les protéines induites par un choc thermique chaud correspondent principalement à des protéines chaperonnes (DnaK, DnaJ, GrpE, GroES et GroEL) et à différentes protéases (Clp, HtrA, FstH), très conservées dans le monde bactérien. Les gènes correspondants sont inductibles par un choc hyper-thermique et sont répartis en quatre classes chez *Bacillus subtilis*. Les gènes de classe I (*dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *groEL*, *groES*...) possèdent un promoteur végétatif associé à des éléments répétés de neuf paires de bases nommés CIRCE (Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression) qui est reconnu par le répresseur HrcA. Les protéines chaperonnes GroEL et DnaK appartiennent au régulon CIRCE. Ce régulon serait plus généralement induit par la présence de protéines dégradées (Mogk *et al.*, 1998). Les gènes de classe II sont sous le contrôle du facteur alternatif  $\sigma^B$ . Les gènes de classe III (*clpC*, *clpP*, *clpE*, *groEL*, *groES*) possèdent dans leur région promotrice une séquence opératrice de sept paires de bases, reconnue par le répresseur transcriptionnel CtsR (Classe three stress Regulator) (Derré *et al.*, 1999). Enfin, les gènes de classe IV (*trxA*, *ftsH*, *htpG*...) sont exprimés indépendamment de  $\sigma^B$  et ne possèdent pas de séquences opératrices de types CIRCE ou CtsR (Derré *et al.*, 1999 et voir revue Abee et Wouters, 1999 ).

Des régulateurs de type HrcA-CIRCE ont été identifiés en amont de divers gènes chez *Lc. lactis* (van Asseldonk *et al.*, 1993), *St. thermophilus* (Martirani *et al.*, 2001) et chez *St. mutans* (Lemos *et al.*, 2001). Chez *Lc. lactis*, plusieurs éléments suggèrent un rôle de HrcA dans la réponse au choc thermique (i) la présence d'éléments CIRCE en amont des opérons *hrcA-grpE-dnaK* et *groES-groEL* et du gène *dnaJ* (ii) l'induction transcriptionnelle de ces gènes en situation de choc thermique (iii) la démonstration du rôle de l'élément CIRCE dans l'induction thermique de *dnaJ* (Guédon *et al.*, 2001).

Des séquences opératrices de type CtsR ont été également identifiées en amont de gènes codant des protéases de type Clp chez différentes bactéries lactiques : *Lb. sakei*, *Lb. helveticus*, *O. oeni*, *Streptococcus salivarius*, *St. thermophilus* et chez *St. pneumoniae* (Smeds *et al.*, 1998 ; Derré *et al.*, 1999 ; Chastanet *et al.*, 2001 ; Guédon *et al.*, 2001). A l'opposé du régulon HrcA, qui





jouerait un rôle uniquement lors d'un stress thermique, CtsR régulerait des gènes impliqués dans d'autres types de fonctions (synthèse de protéines ribosomales, synthèse de constituants essentiels de l'enveloppe ...) (Chastanet *et al.*, 2001).

La croissance à **basse température** provoque des modifications physiologiques importantes comme la baisse de la fluidité membranaire (et donc une perturbation de l'activité des protéines membranaires) et la stabilisation des structures secondaires des ARNs et de l'ADN dont résulte une chute de l'efficacité de traduction, de transcription et de réplication de l'ADN (voir revues Jaenicke, 1991 et Berry et Foegeding, 1997). Les microorganismes sont capables de développer une réponse adaptative transitoire pendant laquelle un certain nombre de protéines de stress sont synthétisées. Ces protéines de **choc froid** auront des rôles différents au sein de la cellule en assurant par exemple le maintien de la fluidité membranaire par augmentation de la proportion de lipides à courte chaîne carbonée et/ou d'acide gras insaturés (Sinensky, 1974 ; Annous *et al.*, 1997 et 1999). Chez les bactéries lactiques, des approches protéomiques ont conduit à l'identification de 22 protéines chez *Lc. lactis* (Panoff *et al.*, 1997 ; Wouters<sup>a</sup> *et al.*, 1999), 24 chez *St. thermophilus* (Wouters<sup>b</sup> *et al.*, 1999) et 17 chez *Ent. faecalis* (Panoff *et al.*, 1997). Les protéines induites peuvent se révéler différentes (en nombre et/ou en structure et/ou suivant leur fonction) selon que la contrainte est de type choc ou de type croissance prolongée à basse température (acclimatation). Ainsi chez *L. monocytogenes* différentes protéines sont induites en réponse à une diminution de la température de 37°C à 5°C (Phan-Thanh et Gormon, 1995 ; Bayles et Wilkinson., 2000) tandis que seules quatre protéines sont synthétisées en réponse à une croissance prolongée à 5°C (Bayles et Wilkinson, 2000). C'est également le cas chez *Escherichia coli* (Riehle *et al.*, 2003).

Parmi les protéines induites par un choc froid, certaines sont appelées Csp (Cold Shock Protein) et auraient un rôle de régulation et d'induction d'autres protéines de froid. Cinq Csp ont été identifiées chez *Lc. lactis* MG1363 et seulement deux chez *Lc. lactis* IL1403 (Guédon *et al.*, 2001). Ces Csp sont capables structurellement de s'associer soit à l'ADN simple brin soit à l'ARN et de maintenir des niveaux de transcription et de traduction compatibles avec la croissance de la bactérie à basse température (Phadtare *et al.*, 2000 ; van de Gutche *et al.*, 2002). Elles joueraient notamment le rôle de chaperonne à ARN en prévenant la formation de structures secondaires au niveau des ARNs messagers, facilitant la transcription puis la traduction à basse température (Graumann *et al.*, 1997 ; Jiang *et al.*, 1997). Les gènes *csp* induits par le froid, comme *cspA* d'*E. coli*, peuvent posséder une longue région 5' non traduite (5'UTR) qui stabilise l'ARN messager et améliore l'efficacité de sa traduction (voir revue van de Guchte *et al.*, 2002). Les protéines Csp maintiennent également le niveau de surenroulement de l'ADN, par réduction des surenroulements négatifs. Drlica (1992) propose que la modification du surenroulement de l'ADN causé par un abaissement de la



température pourrait participer à la transduction du signal de stress thermique froid *via* des protéines de liaisons à l'ADN comme les topoisomérases et les gyrases.

Certaines des protéines induites par un choc froid jouent un rôle plus général dans la cellule. Une approche par hybridation soustractive a montré que l'acclimatation de *L. monocytogenes* à basse température (10°C) provoque l'induction de gènes dont les produits sont impliqués durant la carence en acides aminés ou le stress oxydatif, en présence de protéines aberrantes, d'altérations de la membrane ou de dégradations du métabolisme cellulaire et lors de l'induction de réponse globale au stress (Liu *et al.*, 2002). Différentes protéines induites par un choc froid chez *Lc. lactis* interviennent également dans le métabolisme des sucres, la transduction du signal et l'adaptation au stress.

Enfin, il faut souligner que les bactéries appartenant au genre *Listeria* sont capables d'accumuler des solutés compatibles (glycine bétaïne, carnitine) en réponse à un stress froid, ce qui augmente leur cryotolérance (Beumer *et al.*, 1994 ; Smith, 1996). *L. monocytogenes* dispose d'un système de transport de solutés compatibles activable par le froid (Ko *et al.*, 1994).

## 2) Contrainte acide ou basique

La diminution du pH extracellulaire agit sur la flore microbienne des aliments en perturbant (i) l'équilibre ionique du milieu extérieur (certains ions métalliques, qui sont des cofacteurs enzymatiques précieux, forment alors des complexes insolubles non utilisables par la bactérie), (ii) la perméabilité membranaire (les perméases cationiques, saturées en ions H<sup>+</sup>, n'assurent alors plus le transport d'autres cations indispensables à la bactérie), (iii) certaines activités enzymatiques essentielles à la croissance microbienne (voir revue Brul et Coote, 1999). Les acides peuvent diffuser passivement à travers la membrane. Après leur entrée dans le cytoplasme, ils se dissocient rapidement en protons et en dérivés chargés, auxquels la membrane est imperméable. La chute de pH du milieu de culture entraîne celle du pH interne (pH<sub>int</sub>). Ainsi, un abaissement du pH du milieu de 6,75 à 5,00 avec de l'acide lactique provoque une chute du pH<sub>int</sub> de *Lc. lactis* de 7,00 à 5,25 (voir revue Sanders et Huis in't Veld, 1999). Cette baisse du pH<sub>int</sub> entraîne des dommages sur les protéines (dont des réductions de l'activité de certaines enzymes) et sur l'ADN (dépurination et dépyrimidination) (voir revue van de Guchte *et al.*, 2002).

Chez les bactéries, la régulation du pH<sub>int</sub> est assurée par différents systèmes d'expulsion de protons, ATP-dépendants, comme la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase (Rastogi et Girvin, 1999 ; Sambongi *et al.*, 1999 ; Stock *et al.*, 1999) ou encore *via* l'activation de voies de production de composés basiques (uréase, arginine désaminase) (Champomier Verges *et al.*, 1999 et voir revue van de Guchte *et al.*, 2002).



### 3) Contrainte osmotique

L'abaissement de l'activité de l'eau extérieure provoque un stress osmotique chez la flore microbienne des aliments qui se matérialise par une diminution de la pression de turgescence pouvant conduire à la plasmolyse cellulaire et une dénaturation des macromolécules causée par l'augmentation de la force ionique. La réponse des bactéries au stress hyper-osmotique consiste principalement à accumuler des composés dits compatibles (par synthèse ou transport) dans leur cytoplasme afin de rétablir une pression de turgescence compatible avec les fonctions cellulaires (voir revue Sleator et Hill, 2002). Les modalités seront développées dans le chapitre suivant.

### 4) Contrainte oxydative

Un des principaux agents responsables de la dégradation des produits alimentaires au cours du temps est l'oxygène. En effet, celui-ci est à l'origine des phénomènes d'oxydation du produit et du développement de microorganismes aérobies. Les conséquences sont multiples : formation de composés indésirables, altération du produit, perte de ses qualités organoleptiques, baisse de sa valeur nutritionnelle. Dans le cas spécifique des lipides, l'oxygène est nécessaire et suffisant pour déclencher et entretenir les réactions en chaîne du phénomène d'auto-oxydation qui conduit à l'apparition du défaut de rance.

La toxicité de l'oxygène vis-à-vis des microorganismes est généralement attribuée aux molécules d'oxygène actives comme  $O_2^-$  (ion superoxyde) ou  $OH^\bullet$  (radical hydroxyle) qui détériorent les protéines, les lipides, les acides nucléiques et constituent ainsi une des causes majeures du vieillissement et de la mort cellulaire (voir revue van de Guchte *et al.*, 2002).

Les mécanismes de défense des bactéries vis-à-vis du stress oxydatif consistent à (i) prévenir la formation des molécules d'oxygène actives en consommant l'oxygène libre [grâce à l'augmentation de l'activité désaturase consommatrice d'oxygène chez *Lb. helveticus* (Guerzoni *et al.*, 2001) ou de l'activité NADH-oxydase chez *Lb. delbruekii* ssp. *bulgaricus* (Yi *et al.*, 1998)] (ii) éliminer les molécules d'oxygène actives par dégradation enzymatique [grâce aux activités catalase/pseudocatalase chez *Lb. bulgaricus* (Engesser et Hammes, 1994), *Lb. sakei* (Knauf *et al.*, 1992) et *Lb. plantarum* (Kono et Fridovich, 1983) ou superoxyde dismutase chez *Lc. lactis* (Sanders *et al.*, 1995)], (iii) protéger les protéines des méfaits du stress oxydatif [protection des groupements thiol grâce au pool de zinc intracellulaire chez *Lc. lactis* (Scott *et al.*, 2000)], (iv) réparer les dommages causés par le stress oxydatif [grâce au système RecA chez *Lc. lactis* (Duwat *et al.*, 1995) et des mécanismes généraux de la réponse au stress (O'Connell-Motherway *et al.*, 2000 ; Irvine *et al.*, 1993)]. L'existence de deux régulateurs des gènes



impliqués dans la tolérance au stress oxydatif est supposée chez les bactéries lactiques et chez *Lc. lactis* en particulier : Fur (Ferric uptake Regulator) et RmaJ (homologue à Ohr de *B. subtilis*).

## B) Les régulateurs globaux de la réponse au stress

Les bactéries répondent aux variations de leur environnement en activant ou en réprimant certains gènes. La détection du signal stress et la régulation des gènes protecteurs supposent l'existence de systèmes plus ou moins généraux de régulation. Deux grandes familles de régulateurs existent : les systèmes dits à deux composants et les facteurs de transcription (facteurs sigma).

**Les systèmes à deux composants** comprennent une protéine Histidine Kinase senseur (HK) et une protéine régulatrice de réponse (RR). Les protéines senseurs intégrées dans la membrane s'autophosphorylent au niveau de résidus histidine lorsqu'elles perçoivent un signal de type stress. Elles sont alors capables d'activer les protéines régulatrices par phosphorylation. Ceci s'effectue au niveau d'un résidu aspartate de la protéine RR. Sous leur état phosphorylé, ces protéines RR activent une réponse cellulaire appropriée, souvent par induction transcriptionnelle (les RR sont pour la plupart des protéines de liaison à l'ADN).

La régulation de la réponse générale au stress est également contrôlée par des **facteurs de transcription (facteurs sigma)** qui, en se fixant à l'ARN polymérase, lui confèrent une spécificité de reconnaissance vis-à-vis de certains promoteurs (voir revue Haldenwang, 1995). Les nombreux facteurs sigma bactériens ont été regroupés dans deux familles d'après leurs similarités protéiques : la famille  $\sigma^{70}$ , facteur végétatif nommé ainsi d'après le facteur  $\sigma$  d'*E. coli* de 70 kDa) et la famille  $\sigma^{54}$  (nommée ainsi d'après le facteur  $\sigma$  d'*E. coli* de 54 kDa) (Wösten, 1998). Ils sont représentés Figure<sub>(1)</sub> 10 et Tableau<sub>(1)</sub> XIX. La famille  $\sigma^{70}$  est elle-même divisée en trois groupes : le premier comprend les facteurs sigma responsables de la transcription de la plupart des gènes exprimés durant la phase exponentielle de croissance bactérienne ; le second est composé des facteurs sigma non essentiels à la croissance bactérienne ; le dernier est celui des facteurs sigma dits « alternatifs » contrôlant la transcription des régulons spécifiques durant des conditions physiologiques particulières (production de flagelles, sporulation), et en réponse à des stress environnementaux (Gruber et Bryant, 1997 ; Wösten, 1998). Les facteurs sigma intervenant dans la réponse au stress se répartissent dans les groupes 2 et 3. Ils sont impliqués dans la réponse aux stress cytoplasmiques ou bien extracytoplasmiques.





## CHAPITRE III : REPONSE A LA CONTRAINTE OSMOTIQUE CHEZ LES BACTERIES

### I) GENERALITES

#### A) Osmose et stress osmotique

##### 1) Définition de l'osmose

Le phénomène d'osmose correspond à la diffusion spontanée, sous la seule influence de l'agitation moléculaire, d'un composé chimique à travers une membrane semi-perméable. Il se produit lorsqu'une substance est présente à des concentrations différentes de part et d'autre de la membrane. Cette différence engendre un excès de pression, appelé **pression osmotique**. La diffusion se fait alors de manière à ce que les deux concentrations tendent à s'égaliser. Le corps dissous dans l'eau franchit la membrane vers la solution la moins concentrée sous l'effet de la pression osmotique. Ce transfert spontané ne nécessite aucune dépense d'énergie et joue un rôle essentiel dans l'activité des cellules. Par osmose, les cellules vivantes peuvent, par exemple, capter des nutriments dont elles ont besoin et rejeter leurs déchets.

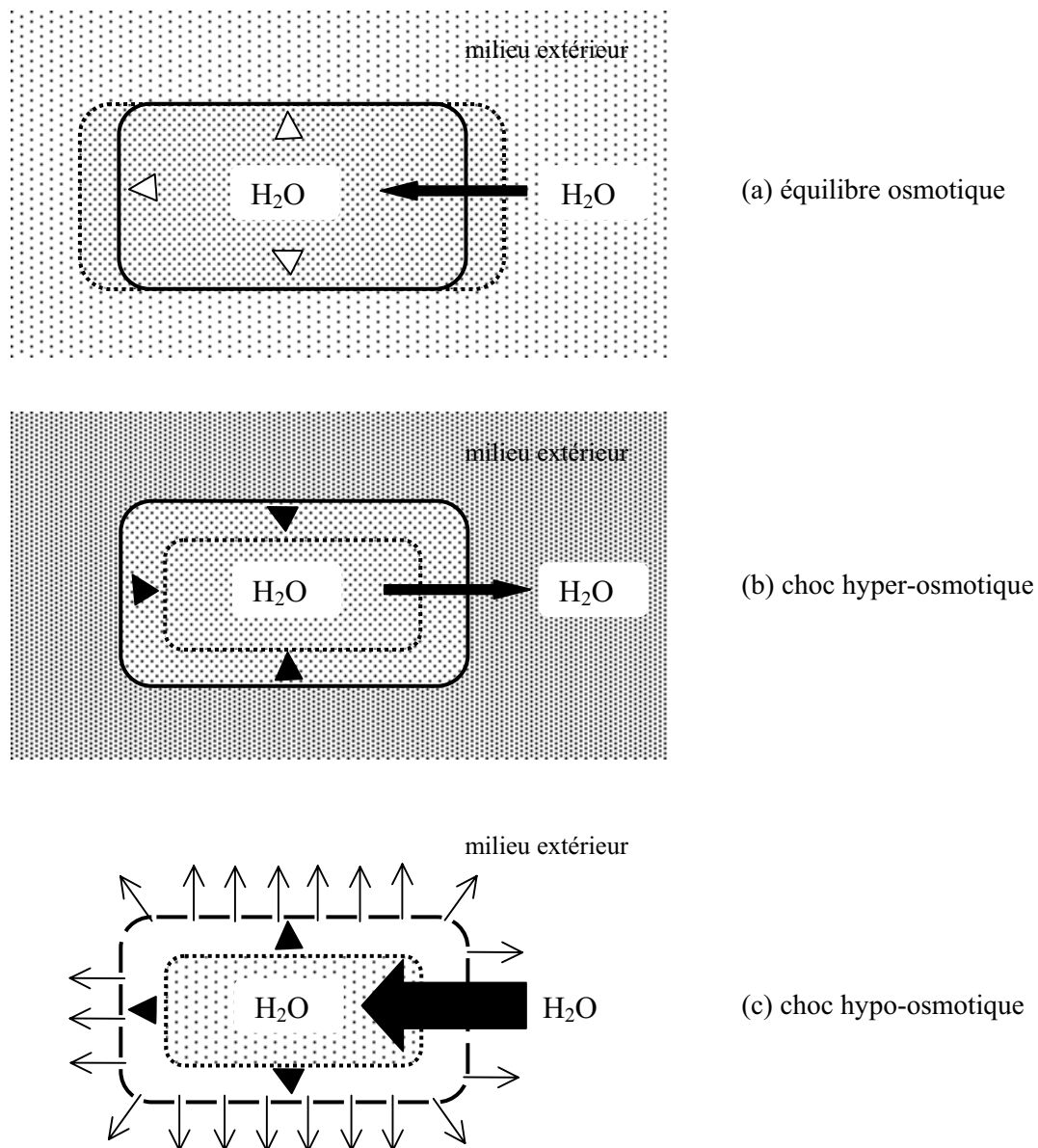
##### 2) Les mouvements d'eau et la pression de turgescence

La membrane cytoplasmique des bactéries est perméable à l'eau mais constitue une barrière efficace vis-à-vis de la plupart des solutés du milieu et des métabolites présents dans le cytoplasme. La circulation des molécules d'eau à travers cette bicouche lipidique est accélérée par la présence de canaux dits aqueux (voir revue O'Byrne et Booth, 2002). Les mouvements d'eau causés par le phénomène d'osmose ont pour conséquence de modifier le volume cellulaire et, par là même, la pression exercée sur la membrane cytoplasmique de la bactérie (appelée **pression de turgescence**).

Le maintien de la pression de turgescence est essentiel à la viabilité cellulaire puisqu'elle est considérée comme la force mécanique nécessaire à l'élongation de la cellule durant la croissance (Koch, 1982). La pression de turgescence des bactéries à Gram positif est estimée à des valeurs comprises entre 20 et 50 atm (voir revues Whatmore et Reed, 1990 et Doyle et Marquis, 1994) alors que celle des bactéries à Gram négatif varie entre 0,8 et 5,0 atm (Koch et Pinette, 1987 ; Overmann *et al.*, 1991 ; Walsby *et al.*, 1995). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que plus la paroi est épaisse, plus la force nécessaire à son étirement doit être importante.

##### 3) La notion de stress osmotique

Le stress osmotique correspond à une diminution ou une augmentation de l'osmolarité de l'environnement de la bactérie (voir revue Csonka, 1989) qui, en modifiant la disponibilité de l'eau de la cellule, affecte sa survie et/ou sa croissance (voir revue Potts, 1994).



**Figure<sub>(1)</sub> 6 : représentation des flux d'eau durant la croissance dans des conditions (a) d'équilibre osmotique, (b) de choc hyper-osmotique, (c) de choc hypo-osmotique (d'après la revue O'Byrne et Booth, 2002).**

La densité plus ou moins importante des points correspond à la concentration plus ou moins forte en solutés osmotiquement actifs.

⋯ : volume cellulaire à la fin des flux d'eau ;

△ : pression de turgescence s'exerçant sur la membrane ;

▲ : forces exercées sur la membrane en réponse à un choc osmotique ;

↗ : efflux des solutés *via* des canaux mécanosensibles.

➡ : mouvement d'eau.

Le degré de disponibilité de l'eau est à corréler avec la notion d'**activité de l'eau** ( $a_w$ ). Cette dernière correspond au  $1/100^{\text{ème}}$  de l'humidité relative de la solution (lorsque l' $a_w$  est exprimée en pourcentage) ou au rapport de la pression de vapeur de la solution à celle de l'eau pure. L'activité de l'eau est inversement proportionnelle à la pression osmotique.

#### 4) L'effet du stress osmotique sur la cellule bactérienne

##### a) Environnement hypo-osmotique

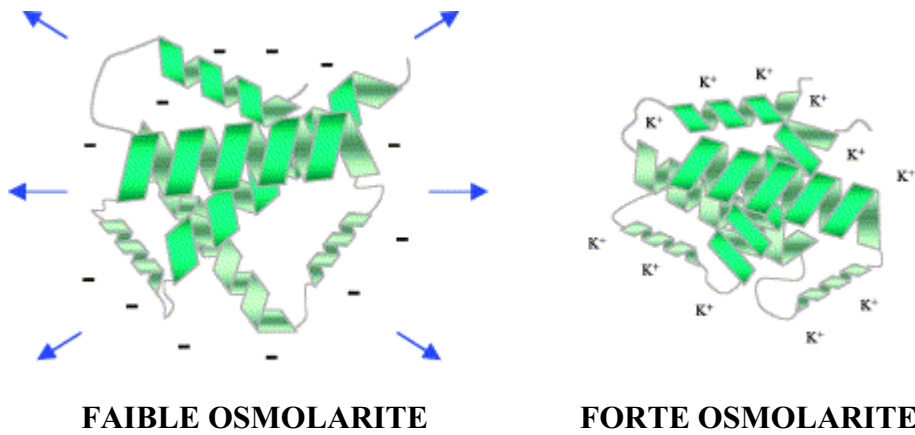
Une diminution rapide de l'osmolarité du milieu extérieur (**choc hypo-osmotique**) provoque un afflux d'eau dans la cellule et par conséquent, une augmentation du volume cellulaire et de la pression de turgescence (Figure<sub>(1)</sub> 6b). Etant donné que la rigidité de la paroi bactérienne permet à la cellule de supporter des pressions élevées [jusqu'à 100 atm chez les bactéries à Gram à négatif (Carpita, 1985)], un choc hypo-osmotique ne provoque, en général, qu'une faible **augmentation** du volume cellulaire.

##### b) Environnement hyper-osmotique

Une augmentation brusque de l'osmolarité du milieu extérieur (**choc hyper-osmotique**) entraîne un rapide flux d'eau vers l'extérieur de la cellule ; le volume du cytoplasme diminue (Figure<sub>(1)</sub> 6c). Ce phénomène de **plasmolyse** peut être détecté instantanément par une augmentation de la turbidité du milieu (Koch, 1984). La cinétique de plasmolyse dépend de l'importance de la variation de l'osmolarité du milieu et de la nature des solutés employés (sels, sucres...). Dans le cas d'un choc hyper-osmotique sévère, la brusque diminution de l'activité de l'eau du cytoplasme inhibe certaines fonctions cellulaires comme l'adsorption de nutriments, la réplication de l'ADN ou la biosynthèse de macromolécules (voir revue Csonka, 1989). En cas de choc hyper-osmotique modéré, la plasmolyse n'est qu'une étape transitoire. En effet, la cellule est capable de s'adapter à ces faibles variations de l'osmolarité du milieu.

#### B) Mécanismes d'osmorégulation

Lors d'un **choc hyper-osmotique**, les **bactéries non halophiles** accumulent dans leur cytoplasme des molécules osmotiquement actives (des ions potassium et du glutamate puis des petites molécules organiques si le choc persiste et/ou augmente en intensité) afin de restaurer une pression de turgescence cellulaire compatible avec les fonctions cellulaires. Les **bactéries halophiles** se sont adaptées, quant à elles, à la vie dans un environnement hyper salé en développant une machinerie cellulaire capable de supporter de fortes concentrations en ions dans le cytoplasme.



**Figure(1) 7 : effet de l'osmolarité sur la structure d'une protéine d'une Halobactérie (d'après la revue Sleator et Hill 2002).**

Dans des conditions de faibles osmolarités, les forces de répulsion dues à la charge nette à la surface de la protéine entraînent une dénaturation de la structure native. Dans des conditions de fortes osmolarités, les ions  $K^+$  neutralisent les charges négatives et réduisent par là même les forces de répulsion à la surface de la protéine.

Lors d'un **choc hypo-osmotique**, les bactéries mettent en place des mécanismes d'efflux (i) de solutés *via* des systèmes spécifiques (transporteurs secondaires) et non spécifiques (canaux mécanosensibles), (ii) d'eau à travers des canaux aqueux appelés aquaporines, afin de diminuer la pression de turgescence cellulaire.

Le terme **osmoadaptation** décrit l'ensemble des manifestations physiologiques et génétiques de l'adaptation à un environnement de forte ou de faible osmolarité (voir revue Galinski, 1995). L'**osmorégulation** est le processus majeur d'osmoadaptation contrôlant l'afflux et l'efflux de solutés de la cellule (les mouvements d'eau étant considérés comme essentiellement passifs) lorsque cette dernière est placée dans des conditions de culture hyper- ou hypo-osmotiquement stressantes (voir revue O'Byrne et Booth, 2002).

### 1) Choc hyper-osmotique

Chez les microorganismes, deux types de stratégie d'osmorégulation ont été décrits pour affronter un choc hyper-osmotique : l'accumulation de sel dans le cytoplasme et l'accumulation de solutés compatibles. Enfin, l'existence de mécanismes n'impliquant pas de phénomènes d'accumulation a été suggérée.

#### a) La stratégie des bactéries halophiles : « salt in cytoplasm »

La stratégie « salt in cytoplasm » est un mécanisme spécifique aux Halobactéries (Martin *et al.*, 1999 et voir revue Galinski, 1995) grâce auquel l'équilibre osmotique est obtenu en maintenant dans le cytoplasme une concentration en sel identique à celle du milieu extérieur. Chez certaines espèces du genre *Halobacterium*, la concentration en KCl dans le cytoplasme peut atteindre 7 M (voir revue Lanyi, 1974). Cependant, l'accumulation de fortes concentrations en ions dans le cytoplasme est susceptible de perturber la physiologie cellulaire en provoquant l'agrégation des macromolécules (interactions hydrophobes) et en réduisant la disponibilité de l'eau (hydratation des ions). Aussi, les Halobactéries ont développé des mécanismes d'adaptation qui leur permettent de disposer d'une machinerie cellulaire capable de supporter de fortes concentrations intracellulaires en ions (voir revue Sleator et Hill, 2002). Ainsi, la malate déshydrogénase de *H. marismortui* contient environ trois fois plus de résidus acides que son équivalent non halophile (Mevarech *et al.*, 1977). La présence de sel dans le cytoplasme aura pour conséquence (i) de stabiliser cette protéine en réduisant les forces de répulsions entre les charges négatives (ii) d'augmenter l'hydratation de cette protéine (Figure<sub>(1)</sub> 7) (Zaccai *et al.* 1989).



### b) L'accumulation intracellulaire de solutés osmotiquement actifs

Les **bactéries modérément halophiles et non halophiles** ont développé des mécanismes d'osmoadaptation leur permettant de survivre dans des habitats dont l'osmolarité peut fluctuer. Ici, les propriétés d'halophilie sont dépendantes des capacités de la bactérie à accumuler des molécules protectrices qui permettent de rétablir l'équilibre osmotique. En situation de stress hyper-osmotique, la cellule restaure une pression de turgescence positive en accumulant du potassium dans le cytoplasme (réponse primaire) et/ou des solutés dits « compatibles ». Cette accumulation peut se réaliser par synthèse endogène ou bien par transport à partir du milieu extérieur.

Les molécules importées par les **bactéries à Gram négatif** doivent traverser la membrane externe puis l'espace périplasmique et enfin la membrane plasmique avant d'être accumulées dans le cytoplasme. Les structures spécifiques (membrane externe et périplasme) possèdent leurs propres mécanismes d'osmorégulation. Les solutés osmotiquement actifs accumulés traversent la membrane externe par diffusion facilitée grâce à des pores protéiques appelés porines dont la quantité varie en fonction de paramètres environnementaux comme l'osmolarité (voir revue Morbach et Krämer, 2002). La bactérie ajuste ainsi les propriétés de « perméabilité » de sa membrane externe aux besoins d'importation.

### i) La réponse primaire

Les **ions  $K^+$**  constituent l'osmolyte cytoplasmique majeur chez de nombreuses espèces bactériennes et participent de façon primordiale au maintien d'une pression de turgescence (voir revue Le Rudulier, 1993). Toutefois, chez certaines bactéries à Gram positif (comme *Corynebacterium glutamicum*, *Lb. plantarum*, *L. monocytogenes* ou *S. aureus*) et chez les bactéries à Gram négatif modérément halophiles (comme *Halomonas elongata* ou *Pseudomonas halosaccharolytica*) la concentration intracellulaire en ion  $K^+$ , bien qu'elle soit liée à l'osmotolérance de ces microorganismes, est indépendante de l'osmolarité du milieu extérieur (Kunin et Rudy, 1991 ; Graham et Wilkinson, 1992 ; Guillouet et Engasser, 1995 ; Glaasker<sup>a</sup> *et al.*, 1996 ; et voir revue Ventosa *et al.*, 1998).

Chez les Entérobactéries (bactéries à Gram négatif non halophiles), il a été établi que le potassium joue le rôle de « messenger secondaire », nécessaire à la mise en place de systèmes plus efficaces assurant la régulation de la pression osmotique interne. Ceci suggère que l'ion potassium participe activement aux phénomènes d'osmorégulation chez certaines bactéries (réponse primaire et mise en place de la réponse secondaire) et présente un niveau de base uniquement nécessaire au maintien d'une pression de turgescence chez d'autres (voir revue Ventosa *et al.*, 1998).





La totalité du pool de potassium cellulaire n'est pas osmotiquement active ; une portion neutralise la charge nette négative des macromolécules cytoplasmiques. Ainsi, seule la fraction du pool de  $K^+$  qui est contrebalancée par un autre ion contribue à rétablir une pression de turgescence positive. Chez *E. coli*, le **glutamate** sert de contre-ion pour le  $K^+$  (McLaggan *et al.*, 1994). Chez *B. subtilis*, la nature du contre ion n'est pas connue contrairement à *E. coli* et les variations de la concentration en glutamate après un choc osmotique sont faibles ; elles ne suffiraient pas à compenser la charge positive du potassium (Whatmore *et al.*, 1990 et voir revue Sleator et Hill, 2002).

## ii) La réponse secondaire

Le terme « **soluté compatible** » a été introduit par Brown et Simpson en 1972 pour décrire des solutés accumulés qui ne présentaient pas d'activité inhibitrice, même à forte concentration, vis-à-vis des fonctions enzymatiques (i.e. compatibles avec le métabolisme cellulaire). L'accumulation de solutés compatibles dans le cytoplasme est donc un phénomène moins perturbant pour la cellule que l'accumulation de sel. Ce mécanisme de réponse au stress hyper-osmotique est donc plus répandu dans le monde du vivant que la stratégie « salt in cytoplasm ». En effet, il a été décrit chez les Eubactéries, les Archéobactéries et également chez les champignons, les plantes et les animaux (Bremer et Krämer, 2000).

## c) Autres mécanismes n'impliquant pas une accumulation d'osmoprotectants

### i) Les porines de la membrane externe

Chez les bactéries à Gram négatif, les solutés compatibles doivent traverser deux membranes avant d'être accumulés dans le cytoplasme. La membrane externe d'*E. coli* est pourvue de deux systèmes de transport par diffusion passive contribuant **indirectement** à l'accumulation de solutés compatibles : OmpF et OmpC. Ces protéines s'associent en homotrimères pour former des canaux (ou porines) par lesquels l'eau et les petites molécules hydrophiles (<500 Da) peuvent diffuser (voir revue Sleator et Hill, 2002). Les taux de OmpF et de OmpC sont fonction de paramètres environnementaux tels que l'osmolarité du milieu extérieur (Hall et Silhavy, 1981), la température (Lundrigan et Earhart, 1984), la source en carbone du milieu de culture (Scott et Harwood, 1980), la disponibilité en oxygène, le pH du milieu (Lugtenberg *et al.*, 1976) ou la disponibilité en nutriments (Ozkanca et Flint, 2002).

### ii) L'ajustement membranaire

La surface externe de la membrane cytoplasmique (comme l'espace périplasmique et la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif) est exposée aux effets délétères du sel pendant



toute la durée du stress hyper-osmotique contrairement au cytoplasme que l'accumulation d'osmoprotectants protège. Une des stratégies d'adaptation membranaire la plus manifeste consiste en l'augmentation de la proportion de phospholipides anioniques. Cet excès de charges négatives sur la face externe de la membrane permet probablement de maintenir un niveau d'hydratation suffisant à son interface (Russell, 1995).

### iii) Les MDOs

Chez les bactéries à Gram négatif, la membrane externe délimite un compartiment supplémentaire, l'espace périplasmique, qui contient des oligosaccharides dérivant de la membrane (les MDOs pour Membrane-Derived Oligosaccharides, Kennedy, 1987). Ces polymères anioniques génèrent un potentiel électrique de part et d'autre de la membrane externe, appelé potentiel de Donnan. Les cations s'accumulent alors dans le périplasmique et augmentent par là même la pression hydrostatique qui s'exerce dans le compartiment périplasmique (voir revue Csonka et Hanson, 1991). En condition hyper-osmotique, le taux de MDOs décroît et avec eux la pénétration de cations dans la cellule (Miller *et al.*, 1986).

### iv) Les osmoprotectants non accumulés

Gouffi et Blanco (2000) ont montré, chez *Sinorhizobium meliloti*, que certaines molécules (ectoïne et disaccharides) ont un effet osmoprotecteur sans pour autant être accumulées dans le cytoplasme. Cette bactérie dégrade l'ectoïne et différents sucres (saccharose, tréhalose, maltose, cellobiose, gentiobiose, turanose et palatinose) en composés endogènes osmotiquement actifs comme le glutamate et le NAGGN (N-acetylglutaminyglutamide amine).

Prasad *et al.* (2003) ont démontré qu'en situation de stress hyper-osmotique la quantité d'oligosaccharides (mono-, di-, tri-, tétra-saccharides) augmente dans le cytoplasme de *Lb. plantarum*. Les di-, tri- et tétra-oligosaccharides existent sous forme native et sous forme modifiée. Des analyses par HPLC et spectrométrie de masse indiquent que la modification correspond à la fixation d'un groupement glycérol par molécule de sucre (la quantité de glycérol « libre » dans le cytoplasme décroît en situation de stress hyper-osmotique, la masse d'un oligosaccharide modifié correspond à la somme de la masse de l'oligosaccharide et de la masse du glycérol). Ces auteurs suggèrent que ces greffages participent à la stabilisation des macromolécules cellulaires en augmentant le nombre de groupements hydroxyles disponibles pour interagir avec ces dernières (*via* des liaisons H).



## 2) Choc hypo-osmotique

Les bactéries sont confrontées à un choc hypo-osmotique lorsque l' $a_w$  de l'environnement extérieur diminue brusquement (lors d'une averse par exemple pour les bactéries du sol). L'eau pénètre alors massivement dans la cellule et peut entraîner la lyse de la bactérie si aucun mécanisme d'osmoadaptation n'est mis en place. L'osmorégulation bactérienne face à un stress hypo-osmotique consiste essentiellement à diminuer la pression de turgescence cellulaire en **rejetant** dans milieu extérieur des solutés ainsi que des molécules d'eau (voir revue Sleator et Hill, 2002).

### a) Efflux d'eau

Les mouvements d'eau à travers les membranes biologiques sont facilités par la présence de canaux aqueux appelés **aquaporines**. Dans un environnement hypo-osmotique, ces canaux permettent de « lever » le stress aqueux sans dissiper le potentiel transmembranaire (voir revue Engel *et al.*, 2000).

Les aquaporines appartiennent à la famille des MIP (pour Major Intrinsic Protein), une famille de canaux membranaires très répandue chez les bactéries, les champignons, les insectes, les animaux et les plantes. Les MIPs comprennent trois sous-groupes dont deux correspondent à des canaux aqueux : les aquaporines et les aquaglycéroporines. Ces dernières diffèrent des aquaporines par le fait qu'elles sont aussi perméables au glycérol et aux petites molécules.

La première aquaporine procaryote identifiée a été AqpZ, un canal aqueux bidirectionnel qui est impliqué dans l'osmorégulation d'*E. coli* (Calamita *et al.*, 1995 ; Delamarche *et al.*, 1999). L'expression du gène *aqpZ* est induite durant la phase exponentielle de croissance dans un environnement hypo-osmotique et réprimée dans un environnement hyper-osmotique (Calamita *et al.*, 1998).

L'existence d'autres aquaporines a été montrée chez *Brucella abortus* (Rodriguez *et al.*, 2000) et a été supposée chez une espèce de *Synerchocytis* (présence d'un gène homologue à *aqpZ* d'*E. coli*, Kaneko *et al.*, 1996). Une aquaglycéroporine de *Lc. lactis*, Gla<sub>Lac</sub>, a été caractérisée en système d'expression hétérologue (Xenope) (Froger *et al.*, 2001). Sous forme monomérique elle facilite le transport de glycérol, tandis que sous forme oligomérique elle facilite le transport d'eau (Thomas *et al.*, 2002).

### b) Efflux de solutés compatibles

Aux canaux aqueux s'ajoutent des systèmes d'efflux de solutés compatibles dont l'activité a été observée chez *E. coli* (Schleyer *et al.*, 1993), *Lb. plantarum* (Glaasker<sup>a</sup> *et al.*, 1996), *C. glutamicum* (Ruffert *et al.*, 1996), *B. subtilis* (Wong *et al.*, 1995) et *L. monocytogenes*



(Verheuil *et al.*, 1997) en réponse à une diminution de l'osmolarité extérieure. Les bactéries possèdent deux types de système d'efflux de solutés compatibles : des **canaux de type mécanosensibles** (système efflux rapide) et des **transporteurs membranaires** (système d'efflux lent). Il est maintenant admis que les canaux mécanosensibles sont la voie principale d'efflux rapide des osmolytes permettant la réduction rapide de la pression de turgescence lors d'un choc hypo-osmotique (Sukharev *et al.*, 1999 et voir revue Blount et Moe, 1999).

Des expériences de patch-clamp ont montré qu'*E. coli* possède au moins trois canaux mécanosensibles appelés MscL, MscS et MscM (Membrane Stretch Channel of Large, Small or Mini conductance ; Sukharev *et al.*, 1993 ; Berrier *et al.*, 1996). L'intervention des canaux mécanosensibles dans la réponse au choc hypo-osmotique a été étudiée chez *E. coli* en inactivant les gènes codant le canal MscL (*mscL*) et/ou le canal MscS (*ygg*). En absence de stress osmotique, les mutants *mscL*<sup>-</sup> *ygg*<sup>+</sup>, *mscS*<sup>+</sup> *ygg*<sup>-</sup>, *mscS*<sup>-</sup> *ygg*<sup>-</sup> ne présentent pas un phénotype différent de celui de la souche sauvage (Sukharev *et al.*, 1994 ; Levina *et al.*, 1999). En présence d'un stress hypo-osmotique sévère, seul le mutant *mscL*<sup>-</sup> *ygg*<sup>-</sup> est incapable de survivre (Levina *et al.*, 1999). Ces expériences démontrent que (i) MscL et MscS sont impliqués dans la réponse au stress hypo-osmotique, (ii) MscM (Membrane Stretch Channel of Mini conductance), le troisième canal mécanosensible identifié chez *E. coli*, n'est pas (ou peu) impliqué dans la réponse au stress hypo-osmotique.

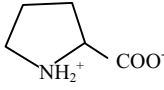
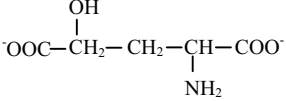
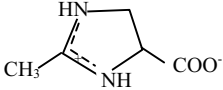
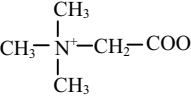
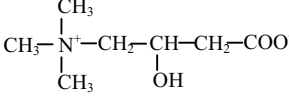
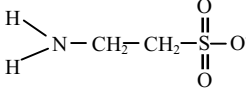
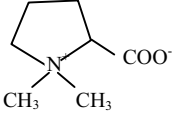
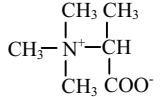
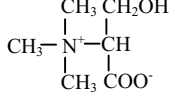
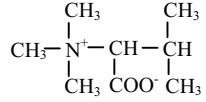
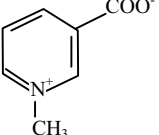
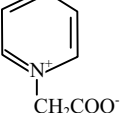
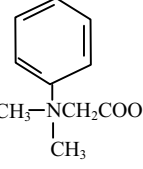
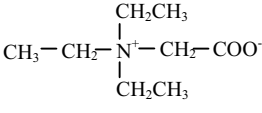
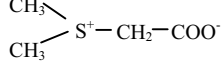
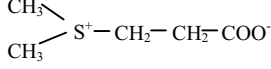
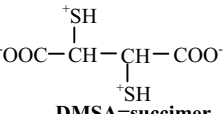
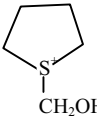
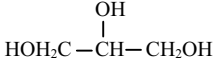
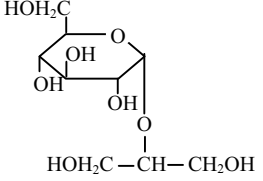
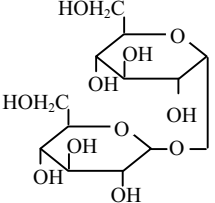
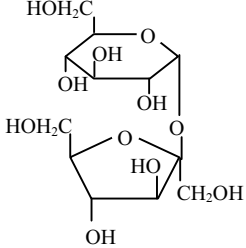
Des cinétiques d'efflux de [<sup>14</sup>C]glycine bêtaïne (GB) en conditions hypo-osmotiques montrent que la GB est rejetée dans le milieu extérieur par (i) des canaux chez *C. glutamicum* (Ruffert *et al.*, 1996) (ii) des canaux et des transporteurs membranaires chez *Lb. plantarum* (Glaasker<sup>a</sup> *et al.*, 1996) et *L. monocytogenes* (Verheuil *et al.*, 1997). Les autres solutés compatibles testés semblent expulsés uniquement pas des systèmes d'efflux de type canal mécanosensible.

## II) LES SOLUTES COMPATIBLES : UN MOYEN DE REPONSE AU STRESS HYPER-OSMOTIQUE

### A) Les solutés compatibles

Les solutés compatibles sont de molécules organiques très hydrosolubles qui (i) possèdent une charge nette nulle au pH physiologique, (ii) n'interagissent pas avec les protéines, (iii) n'interfèrent pas, même à forte concentration (>1 M), avec les fonctions cellulaires vitales (voir revue Sleator et Hill, 2002). Bien que les solutés compatibles aient été décrits comme « inertes » vis-à-vis des macromolécules biologiques, des études réalisées *in vitro* montrent qu'ils stabilisent indirectement les enzymes contre les effets d'agents dénaturants comme le sel, la température ou la dessiccation (Lipper et Galinski, 1992 ; Timasheff, 1993). Ces composés agiraient comme des chaperonnes chimiques en aidant les protéines cytoplasmiques à conserver leur état de compaction (Tatzelt *et al.*, 1996 ; Bourot *et al.*, 2000).

Tableau<sub>(1)</sub> XVIII : structure des principaux solutés compatibles.

Acides aminés et dérivés			
 <p><b>Proline</b></p>	 <p><b>Glutamate</b></p>	 <p><b>Ectoïne</b> (acide 2-méthyl-1,4,5,6-tétrahydropyrimide-4-carboxylique)</p>	
Ammonium quaternaire et dérivés			
 <p><b>Glycine bêtaïne</b></p>	 <p><b>Carnitine</b> (β-hydroxy-γ-butyrobêtaïne)</p>	 <p><b>Taurine</b> (acide 2-aminoéthanesulfonique)</p>	
 <p><b>Proline bêtaïne</b></p>	 <p><b>Alanine bêtaïne</b></p>	 <p><b>Sérine bêtaïne</b></p>	 <p><b>Valine bêtaïne</b></p>
 <p><b>Trigonelline</b></p>	 <p><b>Pyridinium bêtaïne</b></p>	 <p><b>N- Phénylglycine bêtaïne</b></p>	 <p><b>Triéthylglycine bêtaïne</b></p>
 <p><b>Diméthylthétine</b></p>	 <p><b>DMSP</b> (diméthylsulfoniopropionate)</p>	 <p><b>DMSA=succimer</b> (acide meso 2,3-dimercaptosuccinique)</p>	 <p><b>Thiolanium bêtaïne</b></p>
Polyols		Sucres	
 <p><b>Glycérol</b></p>	 <p><b>Glycosylglycérol</b></p>	 <p><b>Tréhalose</b></p>	 <p><b>Saccharose</b></p>



Selon Bremer et Krämer (2000), la gamme de solutés compatibles (ou osmoprotectants) identifiés est composée (Tableau<sub>(1)</sub> XVIII) : (i) d'**acides aminés** (glutamate, proline), et de **dérivés** d'acides aminés (ectoïne), (ii) de **petits peptides** (N-acetylglutaminyglutamine amide,  $\gamma$ -glutamylglutamine), (iii) d'**ammonium quaternaires** appelés bétaïnes (GB, carnitine, taurine), et de dérivés d'ammonium quaternaires [proline bétaïne, alanine bétaïne, sérine bétaïne, valine bétaïne, trigonelline, pyridinium bétaïne, N-phénylglycine bétaïne, triéthylglycine bétaïne, diméthylthetine, diméthylsulfoniopropionate (DMSP), diméthyl-sulfonioacétate (DMSA), thiolanium bétaïne ], (iv) de **sulfate d'ester** (choline-O-sulfate), (v) de **polyols** (glycérol, glycosylglycérol), (vi) de **sucres** (tréhalose, saccharose).

Chez certaines Archéobactéries, l'accumulation d'autre molécules comme le di-*myo*-inositol-1,1'-phosphate, le di-mannosyl-di-inositol-phosphate, le  $\beta$ -mannosylglycérate ou le 2,3 bisphosphoglycérate a été observée en condition d'hyper-osmolarité (voir revue Da Costa *et al.*, 1999).

Il existe un degré de convergence évolutive remarquable entre les catégories de solutés compatibles accumulés par une bactérie et le phylum auquel elle appartient (voir revue Yancey *et al.*, 1982).

La nature des solutés compatibles accumulés par une bactérie dépend (i) du niveau de présence de ces composés (ou de leurs précurseurs) dans le milieu extérieur, (ii) de l'existence de systèmes de transport (ou de synthèse) d'osmoprotectants adéquats (iii) de l'intensité du stress osmotique auquel elle doit faire face. Il existe, en effet, une hiérarchie des osmoprotectants qui est fonction de la valeur de l'osmolarité du milieu. Dans les différents règnes du vivant, la GB et d'un point de vue plus général les ammoniums quaternaires sont les solutés compatibles les plus efficaces (voir revue Galinski, 1995). Chez de nombreuses espèces bactériennes, la réponse au stress osmotique est basée sur l'accumulation de GB, carnitine et proline (citées dans l'ordre croissant de leur capacité d'osmoprotection, Beumer *et al.*, 1994) (Tableau<sub>(1)</sub> XIX).

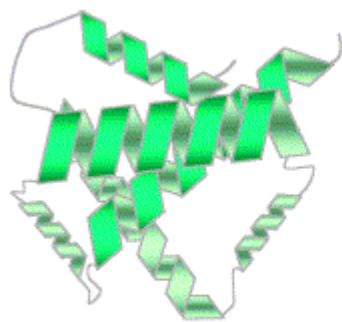
La **GB** est le soluté compatible préférentiellement utilisé chez les Procaryotes, les Plantes et les Animaux. Son rôle dans l'accroissement de l'osmotolérance a été suggéré chez *P. soyae* dès 1960 (Sakaguchi, 1960) mais ce n'est que dernièrement que son rôle osmoprotecteur a été confirmé chez cette bactérie (Robert *et al.*, 2000). La GB est principalement accumulée par transport à partir du milieu extérieur ; quelques bactéries sont cependant capables de la synthétiser soit *de novo* soit à partir de précurseurs comme la choline ou la carnitine.

La **carnitine** peut être utilisée par les bactéries comme un précurseur de la GB mais cet ammonium quaternaire est surtout un osmoprotectant *per se* accumulé en situation hyper-osmotique par transport (voir revue Sleator et Hill, 2002). Les premiers travaux sur son implication dans la

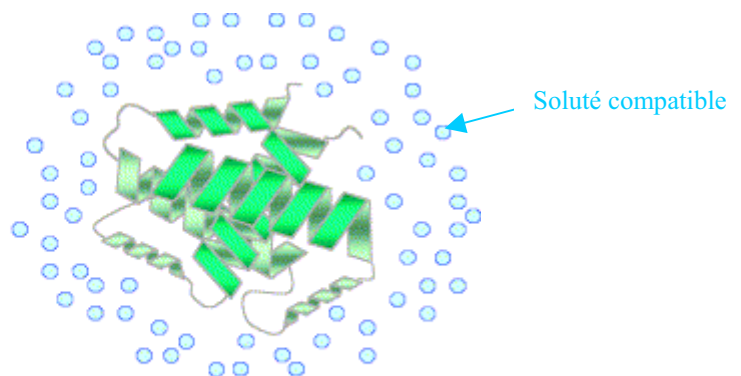
**Tableau(1) XIX : principaux solutés compatibles accumulés soit par synthèse endogène soit par transport chez différentes bactéries.**

GB : glycine bêtaïne, Pro : proline, Carn : carnitine, Cho : choline, Ect : ectoïne, Tau : taurine, DMSA : diméthylsulfonioacétate, DMSP : diméthylsulfoniopropionate

Espèce bactérienne	Solutés compatibles accumulés par synthèse endogène			Solutés compatibles accumulés par transport						
	GB	Pro	Tréhalose	GB	Carn	Cho	Pro	Ect	Tau	DMSA DMSP
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+		+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+		+	+	+	+	+		+
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	+	+	+	+			+	+		
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+		+	+	+	+			
<i>Staphylococcus aureus</i>	+			+	+	+	+		+	
<i>Lactococcus lactis</i>				+	(+)	(+)	+			
<i>Lactobacillus plantarum</i>				+	+		+			+
<i>Brevibacterium linens</i>	+			+	+		+	+		
<i>Tetragenococcus halophila</i>	+			+	+	+	+	+		+



FAIBLE OSMOLARITE



FORTE OSMOLARITE

**Figure(1) 8 : représentation de la stabilisation de la structure d'une protéine d'une Halobactérie à forte osmolarité (d'après la revue Sleator et Hill 2002).**

Les solutés compatibles (cercles bleus), exclus de la surface de la protéine, permettent le maintien de la structure de la protéine dans des conditions de fortes osmolarités.

réponse au stress osmotique chez les bactéries ont été réalisés sur *L. monocytogenes* (démonstration de l'effet stimulateur de croissance en milieu minimum 0,5 M NaCl, Beumer *et al.*, 1994) et sur *Lb. plantarum* (démonstration de l'effet osmoprotecteur en MRS 1 M NaCl, Kets *et al.*, 1994).

Le troisième osmoprotectant majoritairement utilisé par les bactéries est un acide aminé : la **proline**. Elle est synthétisée à de fortes concentrations par les animaux (acide aminé essentiel) et par les plantes (osmoprotectant endogène). Au contact des plantes (exsudats racinaires et décomposition) le sol s'enrichit en proline et devient une source d'osmoprotectant pour les microorganismes le colonisant (voir revue Kempf et Bremer 1998). Le rôle de la proline dans l'osmorégulation des bactéries a été décrit initialement chez *Salmonella oranienburg* par Christian (1955). Chez les bactéries à Gram négatif en général, l'accumulation de proline en condition de stress osmotique résulte de la seule activité de transport (Csonka, 1981). Cet acide aminé a été ensuite identifié comme osmoprotecteur endogène (c'est-à-dire synthétisé) chez plusieurs espèces bactériennes essentiellement à Gram positif : *B. subtilis* (Whatmore et Reed, 1990), *S. epidermidis* (voir revue Galinski, 1993), *Brevibacterium lactofermentum* (Kawahara<sup>a</sup>, 1989), *C. glutamicum* (Guillouet et Engasser, 1995).

L'origine de l'effet protecteur des solutés compatibles repose sur le fait qu'ils sont exclus de l'interface protéine-eau (Figure<sub>(1)</sub> 8). L'incompatibilité stérique semble être à l'origine de leur exclusion de la surface des macromolécules protéiques (voir revue Sleator et Hill, 2002). En effet, la plupart des solutés compatibles sont des molécules rigides de grosses tailles. Elles sont par conséquent écartées de la surface des protéines à la faveur de molécules plus accessibles comme l'eau (petite taille, polaire). Selon Bull et Breese (1974), les solutés compatibles agissent en augmentant la tension de surface de l'eau. Les forces de cohésion au niveau de la structure de l'eau sont plus intenses et les interactions eau-eau deviennent par conséquent énergétiquement plus difficiles à rompre que les complexes protéine-eau. L'eau forme alors à la surface des protéines un maillage épais duquel les solutés compatibles sont exclus. Ainsi, l'accumulation de solutés compatibles en réponse à un choc hyper-osmotique (i) stabilise la structure des protéines en améliorant l'état d'hydratation et de compaction, (ii) participe au maintien de la pression de turgescence en augmentant le volume cellulaire.

Il est important de noter que la stabilisation de la structure des protéines grâce à l'action des solutés compatibles a pour effet d'augmenter la tolérance vis-à-vis du sel mais aussi vis-à-vis d'autres facteurs de stress comme la chaleur, la congélation et la dessiccation (Lipper et Galinski, 1992 ; Welsh, 2000).



## B) Modalité d'accumulation des solutés compatibles

Les bactéries à Gram négatif accumulent des solutés compatibles uniquement lorsqu'elles sont soumises à un choc hyper-osmotique. Cependant, les bactéries à Gram positif tendent à accumuler ces molécules lorsqu'elles sont cultivées en laboratoire en conditions osmotiquement non stressantes (Whatmore et Reed, 1990 ; Glaasker<sup>a</sup> *et al.*, 1996). Ceci semble être le reflet de la différence de pression de turgescence qui existe entre ces deux types bactériens (voir revue Kempf et Bremer, 1998). Ce phénomène pourrait participer au maintien d'une pression de turgescence élevée (plus élevée que chez les bactéries à Gram négatif).

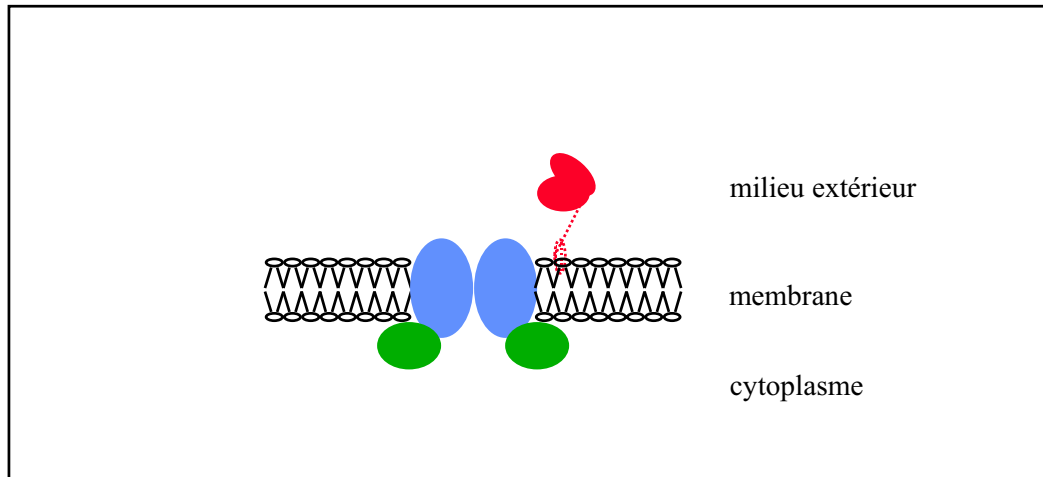
La capacité d'osmoadaptation d'une bactérie dépend d'une part de la disponibilité en solutés compatibles dans le milieu environnant et de son aptitude à les **accumuler** dans le cytoplasme soit par **synthèse** soit par **transport** d'autre part. Etant donné que le transport d'osmolytes est énergétiquement plus favorable la synthèse (voir revue Oren, 1999), l'accumulation de solutés compatibles exogènes inhibe généralement la synthèse endogène. Ainsi, la présence de GB dans le milieu de culture inhibe la synthèse de proline chez *B. subtilis* (Whatmore *et al.*, 1990) ou la synthèse de tréhalose chez *C. glutamicum* (Bernard *et al.*, 1993).

### 1) La synthèse d'osmoprotectants

Rares sont les bactéries capables de synthétiser *de novo* la GB. Cette caractéristique est confinée aux Eubactéries phototrophes et plus particulièrement à celles montrant une forte tolérance au sel comme *Ectothiorhodospira halocloris* (Galinski et Truper, 1982). Cette synthèse est réalisée par méthylation de la glycine, le groupement méthyle provenant de la S-adenosyl méthionine. La plupart des autres Eubactéries synthétisent la GB à partir de précurseurs comme la choline ou la carnitine (voir revue Imhoff, 1986). Certaines bactéries sont également capables de synthétiser de la proline (Fons *et al.*, 1987 ; Buxton, 1980), de l'ectoïne (Peters, 1990 ; Bernard *et al.*, 1993 et voir revue Galinski, 1995) ou du tréhalose (Galinski *et al.*, 1985 ; Larsen *et al.*, 1987 ; Strom et Kaasen 1993 ; Dupray *et al.*, 1995).

### 2) Le transport d'osmoprotectants

Les bactéries sont capables de synthétiser des osmoprotectants endogènes (GB, proline, ectoïne) mais elles peuvent aussi puiser ces derniers dans leurs écosystèmes. Ces composés peuvent être libérés dans le milieu extérieur soit par d'autres microorganismes producteurs suite à une chute de l'osmolarité soit par les cellules végétales, animales ou bactériennes en cours de décomposition soit par les exsudats racinaires soit par les mammifères *via* certains fluides excrétés, comme l'urine par exemple (voir revues Galinski et Trüper, 1994 et Ventosa *et al.*, 1998).



**Figure(9) : représentation schématique d'un transporteur actif primaire de type ABC.**

Les protéines transmembranaires du domaine hydrophobe sont figurées en bleu, les protéines cytoplasmiques du domaine hydrophile en vert et la protéine affine en rouge. La protéine affine peut être libre (trait plein) ou ancrée à la membrane (pointillé).

Les deux protéines transmembranaires identiques (codées par le même gène) ou différentes (codées par deux gènes). Les domaines hydrophile et hydrophobe peuvent être fusionnés (codés par le même gène).

En situation de contrainte osmotique, l'accumulation de solutés compatibles à partir d'une source exogène a pour conséquence de diminuer fortement la synthèse endogène (Dinnbier *et al.*, 1988 ; Whatmore *et al.*, 1990 et voir revue Sleator et Hill, 2002). De plus, certains systèmes de transport de solutés compatibles peuvent être inhibés par les osmoprotectants accumulés dans la cellule jusqu'à ce que la bactérie subisse un nouveau stress hypo-osmotique (Verheul *et al.*, 1997). Les bactéries sont donc capables d'ajuster leurs activités de transport et de synthèse (et probablement d'excrétion) en fonction de l'osmolarité du milieu.

Les transporteurs d'osmoprotectants ont évolué en fonction des contraintes physiologiques imposées par l'environnement. En effet, ils doivent fonctionner efficacement à forte osmolarité et à des concentrations ioniques élevées tandis que les transporteurs de nutriments sont souvent inhibés dans de telles conditions. Dans les écosystèmes naturels, l'augmentation de la quantité de solutés compatibles est faible et aléatoire. Les transporteurs d'osmoprotectants ont donc généralement une forte affinité pour leurs substrats (Km de l'ordre du micromolaire) pour permettre un haut niveau d'accumulation. D'autre part, les bactéries possèdent souvent plusieurs systèmes de transport de solutés compatibles ayant parfois chacun plusieurs substrats potentiels. Ceci permet l'accumulation d'un large spectre d'osmoprotectants à partir de l'environnement.

Ces systèmes se répartissent en deux grandes familles structurales: les **transporteurs ABC** et les **transporteurs actifs secondaires**.

### C) Accumulation des solutés compatibles par transport

#### 1) Les systèmes de transport actif primaire : les transporteurs ABC

La superfamille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette), aussi appelés « traffic ATPases », rassemble des systèmes d'import et d'export de solutés. L'hydrolyse d'ATP, sans intervention d'une phosphorylation protéique, fournit l'énergie nécessaire au transport.

La plupart des transporteurs ABC sont constitués de quatre domaines : deux domaines hydrophobes transmembranaires formant un pore permettant au substrat de traverser la membrane et deux domaines hydrophiles situés sur la face cytoplasmique de la membrane. Ces derniers sont responsables de la fixation d'ATP et du couplage de son hydrolyse au transport. Les systèmes d'import possèdent, en plus, une (ou des) protéine(s) affine(s) extracytoplasmique(s) capable(s) de reconnaître le substrat (voir revue Higgins, 1992). Chez les bactéries à Gram positif, ce(s) récepteur(s) est (sont) lié(s) à la surface externe de la membrane soit par ancrage soit par des interactions électrostatiques (van der Hiede et Poolman, 2000) (Figure<sub>(1)</sub> 9).

**Tableau(1) XX : propriétés des systèmes de transport de solutés compatibles des deux bactéries modèles *B. subtilis* et *E. coli* (d'après la revue Kempf et Bremer, 1998).**

BB :  $\gamma$ -butyrobétaïne, Car : carnitine ; CB : crotonobétaïne, Cho : choline, GB : glycine bétaïne, DMG : diméthylglycine, DMSA : diméthylsulfonioacétate, DMSP : diméthylsulfoniopropionate, Ect : ectoïne, HB : homobétaïne, PB ; proline bétaïne, PIP : L-pipécolate.

Microorganisme	Systèmes de transport	Type de transporteur	Composants	Régulation par osmolarité au niveau de		Substrats
				l'expression génique	l'activité du transport	
<i>Bacillus subtilis</i>						
	OpuA	transporteur ABC	OpuAA (ATPase) OpuAB (protéine membranaire) OpuAC (protéine affine)	+	+	GB, PB, DMSA, DMSP
	OpuB	transporteur ABC	OpuBA (ATPase) OpuBB (protéine membranaire) OpuBC (protéine affine) OpuBD (protéine membranaire)	+	+	Cho
	OpuC	transporteur ABC	OpuCA (ATPase) OpuCB (protéine membranaire) OpuCC (protéine affine) OpuCD (protéine membranaire)	+	+	GB, PB, Car, DMSA, DMSP, Cho, BB, CB, Ect, Choline-O-sulfate
	OpuD	transporteur secondaire	OpuD	+	+	GB, DMSA, DMSP
	OpuE	transporteur secondaire	OpuE	+	-	Pro
<i>Escherichia coli</i>						
	ProU	transporteur ABC	ProV (ATPase) ProW (protéine membranaire) ProX (protéine affine)	+	+	GB, PB, Pro, Car, DMSP, HB, BB, Cho
	ProP	transporteur secondaire	ProP	+	+	GB, PB, Pro, Car, Ect, PIP, DMG, DMSP, HB, BB
	BetP	transporteur secondaire	BetP	+	+	Cho



Les systèmes d'import de type ABC n'ont été identifiés que chez les Procaryotes tandis que les systèmes d'export ont été isolés chez les Procaryotes et les Eucaryotes. La fusion des domaines transmembranaires et cytoplasmiques en une unique chaîne polypeptidique est une caractéristique des transporteurs ABC des cellules Eucaryotes. Chez les Procaryotes, les quatre domaines appartiennent généralement à des chaînes polypeptidiques distinctes (Jones et George, 1999).

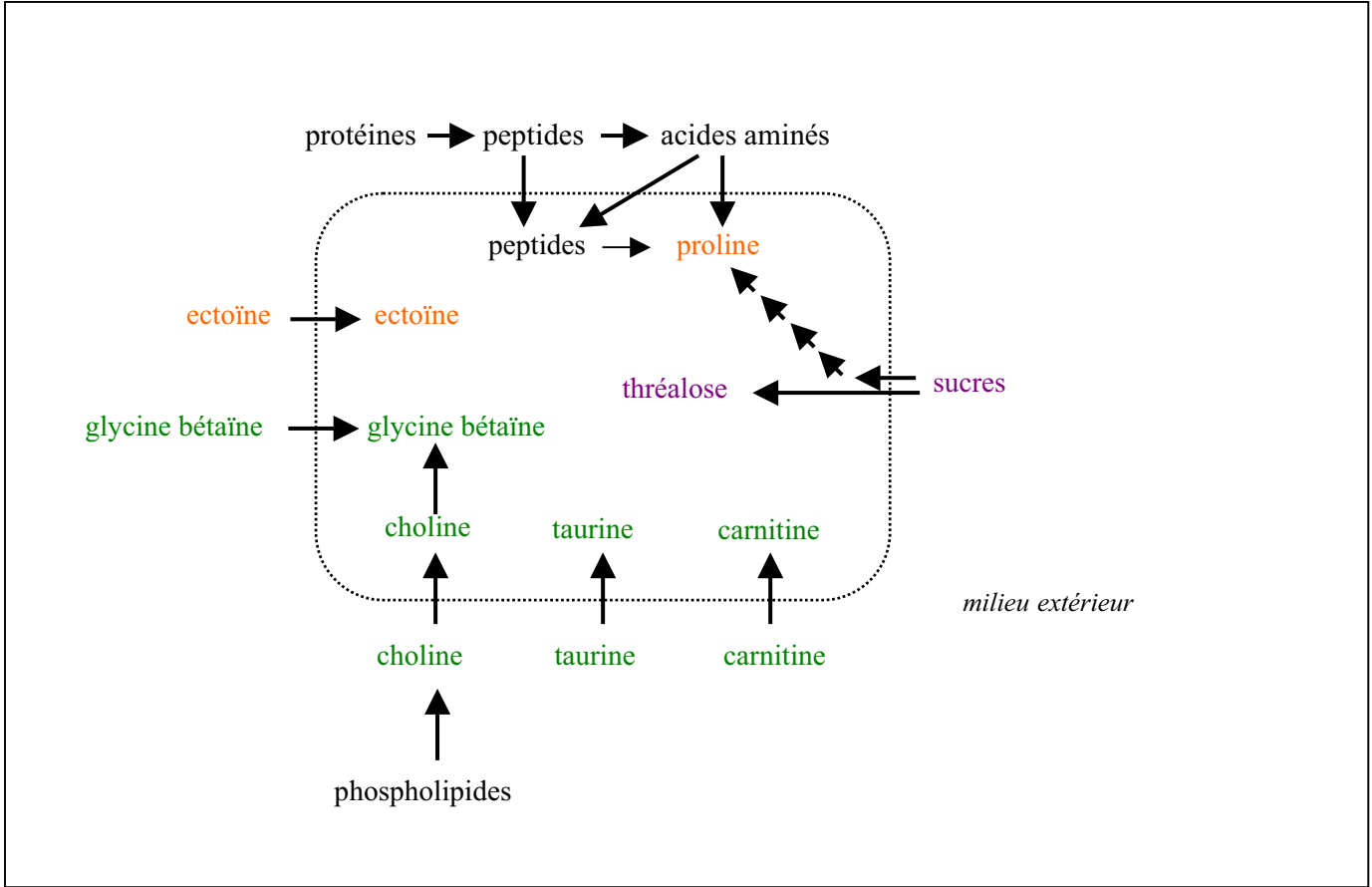
L'analyse informatique des génomes bactériens, basée sur l'identification de trois types de protéines composant les transporteurs ABC et de leur agencement le plus probable, a permis d'estimer que le chromosome de *B. subtilis* code au moins 78 transporteurs ABC (38 systèmes d'import et 40 systèmes d'export) (Quentin *et al.*, 1999). Des études similaires ont permis d'identifier au moins 80 transporteurs chez *E. coli* K12 (Jones et George, 1999), 31 transporteurs chez *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 (voir revue Klaenhammer *et al.*, 2002), 55 transporteurs chez *Lb. plantarum* WCP1, 26 transporteurs chez *Bifidobacterium longum* NCC 2705 et 37 transporteurs chez *Lc. lactis* IL1403 ([www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/Entrez/altik?gi=276](http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/Entrez/altik?gi=276) (ou 254 ou 171)&db=G).

Les trois constituants (cytoplasmique, membranaire, et extracytoplasmique) des transporteurs ABC sont généralement conservés d'un point de vue évolutif. Les séquences des domaines extracytoplasmiques semblent avoir été les plus rapides à diverger par rapport aux domaines cytoplasmiques. Les domaines cytoplasmiques, responsables de l'hydrolyse de l'ATP, possèdent en effet des régions spécifiques à sa fixation très conservées : les motifs Walker A (G-X-S/T-G-K-S/T-S), Walker B (h-h-h-h-D, ou h est un acide aminé hydrophobe) et Walker C (L-S-G-G-Q-Q/R/K-Q-R). Ce dernier serait plus particulièrement responsable de la transduction de l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP (Walker *et al.*, 1982). La région reliant le motif de Walker A au motif de Walker B est composée d'une boucle d'environ 100 aa peu conservée dont la conformation pourrait varier lors de l'hydrolyse de l'ATP et transmettre ainsi un signal de « déclenchement » du transport (voir revue Schneider et Hunke, 1998).

## 2) Les systèmes de transport actif secondaire

Le transport actif secondaire couple la diffusion spontanée d'un ion (ion moteur) au transport actif d'une molécule. L'élément de couplage est une protéine membranaire, un port, qui reconnaît et transporte simultanément les deux solutés. Si la diffusion et le transport s'effectuent dans le même sens, il s'agit d'un symport ou d'un cotransport. Si la diffusion et le transport s'effectuent en sens opposés il s'agit d'un antiport ou d'un contre-transport.

Chez les bactéries, la plupart des transporteurs actifs secondaires de solutés compatibles décrits sont des symports à Na<sup>+</sup> ou à H<sup>+</sup> (Saier *et al.*, 1999). Les symports à Na<sup>+</sup> appartenant à la famille SSS



**Figure(1) 10 : origine des solutés compatibles accumulés par les bactéries présentes dans les aliments (d'après la revue O'Byrne et Booth, 2002).**

Les acides aminés (et leurs dérivés) sont indiqués en orange, les sucres en violet et les ammoniums quaternaires en vert.

(Solute Sodium Symporter) ont une taille variant entre 400 et 700 aa et s'organisent en treize segments transmembranaires.

Les symports à H<sup>+</sup> qui transportent des molécules possédant un groupement ammonium quaternaire (R-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) appartiennent à la famille BCCT (Betaine/Carnitine/Choline Transporter). Ces ports, présents chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, comportent entre 481 et 706 aa et sont formés de douze hélices transmembranaires. Certains membres de la famille BCCT possèdent des propriétés d'osmosensing et d'osmorégulation (cf chapitre III).

Les solutés compatibles peuvent être transportés par des systèmes qui diffèrent selon leur nature (transport actif primaire ou secondaire), leur nombre et/ou l'affinité vis-à-vis du substrat. L'activité globale de transport de solutés compatibles d'une cellule bactérienne est donc la somme des activités des différents transporteurs. Les systèmes de transport de solutés compatibles ont été décrits principalement chez les deux bactéries modèles *E. coli* et *B. subtilis* (Tableau<sub>(1)</sub> XX). Cependant, une partie des recherches se concentre actuellement sur la mise en évidence de systèmes de même nature chez des espèces bactériennes d'intérêt industriel (*C. glutamicum*, *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*...) ou représentant la flore d'altération/pathogène des aliments (*S. aureus*, *L. monocytogenes*).

### III) REPONSE A LA CONTRAINTE OSMOTIQUE CHEZ QUELQUES BACTERIES A GRAM POSITIF RENCONTREE EN ALIMENTAIRE

#### A) LES SOLUTES COMPATIBLES PRESENTS DANS L'ALIMENT

L'aliment constitue une source variée de molécules utilisables dans le cadre d'une réponse primaire et/ou secondaire à une contrainte osmotique. Ainsi, face à un stress osmotique, les bactéries à Gram négatif (Salmonelles et coliformes) accumulent l'ion K<sup>+</sup> et un contre-ion, généralement le glutamate. Ce dernier peut être remplacé par différents benzoates ou acétates présents dans l'aliment en tant qu'agents de conservation.

L'apport de solutés compatibles peut être indirect *via* la présence de différents précurseurs (sucres, protéines, phospholipides) (Figure<sub>(1)</sub> 10). Mais, la plupart de temps, des quantités non négligeables de solutés (directement transportables et osmotiquement actifs) sont retrouvés dans la composition des aliments. Il s'agit de sucres (comme le tréhalose), de peptides, d'acides aminés (dont la proline) ainsi que d'amines quaternaires (GB, carnitine ....).

Certains composés sont spécifiques d'un type d'aliments. C'est le cas de la taurine retrouvée dans les produits de la mer (poissons, crabes) (McLaggan et Epstein, 1991). La viande et les végétaux, quant à eux, contiennent de fortes concentrations en glycine bêtaïne (0,3 à 0,5 nmol/mg de

**Tableau<sub>(1)</sub> XXI : mécanismes d'accumulation d'osmoprotectants chez *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. glutamicum*, *Lc. lactis* et *Lb. plantarum*.**

GB : glycine bêtaïne, Pro : proline, Tre : Tréhalose

	Synthèse	Transport	
		Transporteur ABC	Transporteur secondaire
<i>Staphylococcus aureus</i>	GB	-	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	GB, Pro	+	+
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Pro, Tre	-	+
<i>Lactococcus lactis</i>	-	+	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	(+)	-

viande fraîche ; Smith, 1996 ; Verheul *et al.*, 1997). La viande fraîche est également riche en acides aminés libres et en carnitine (0,2 à 1,0 nmol/mg de poids frais). *L. monocytogenes* peut, à partir de viandes, accumuler dans son cytoplasme de la GB et de la carnitine à des concentrations environ 100 fois plus fortes que dans le milieu extérieur (Smith, 1996).

Face à cette diversité de solutés compatibles, la cellule accumulera la GB préférentiellement à tout autre osmoprotectant (voir revues Le Rudulier, 1993 et Kempf et Bremer, 1998). D'autres molécules pourront ensuite être accumulées si le stress perdure. Ainsi, le suivi de l'accumulation d'osmoprotectants par *L. monocytogenes*, se développant sur des lasagnes à 7°C, montre une accumulation préférentielle de GB durant les dix premiers jours (Smith, 1996). Le pool intracellulaire en carnitine augmente ensuite pour atteindre une concentration identique à celle de GB au bout de vingt jours (Smith, 1996). La carnitine aurait des propriétés osmoprotectrices moindres et ce phénomène serait lié à la longueur excessive de sa chaîne carbonée (Ko *et al.*, 1994).

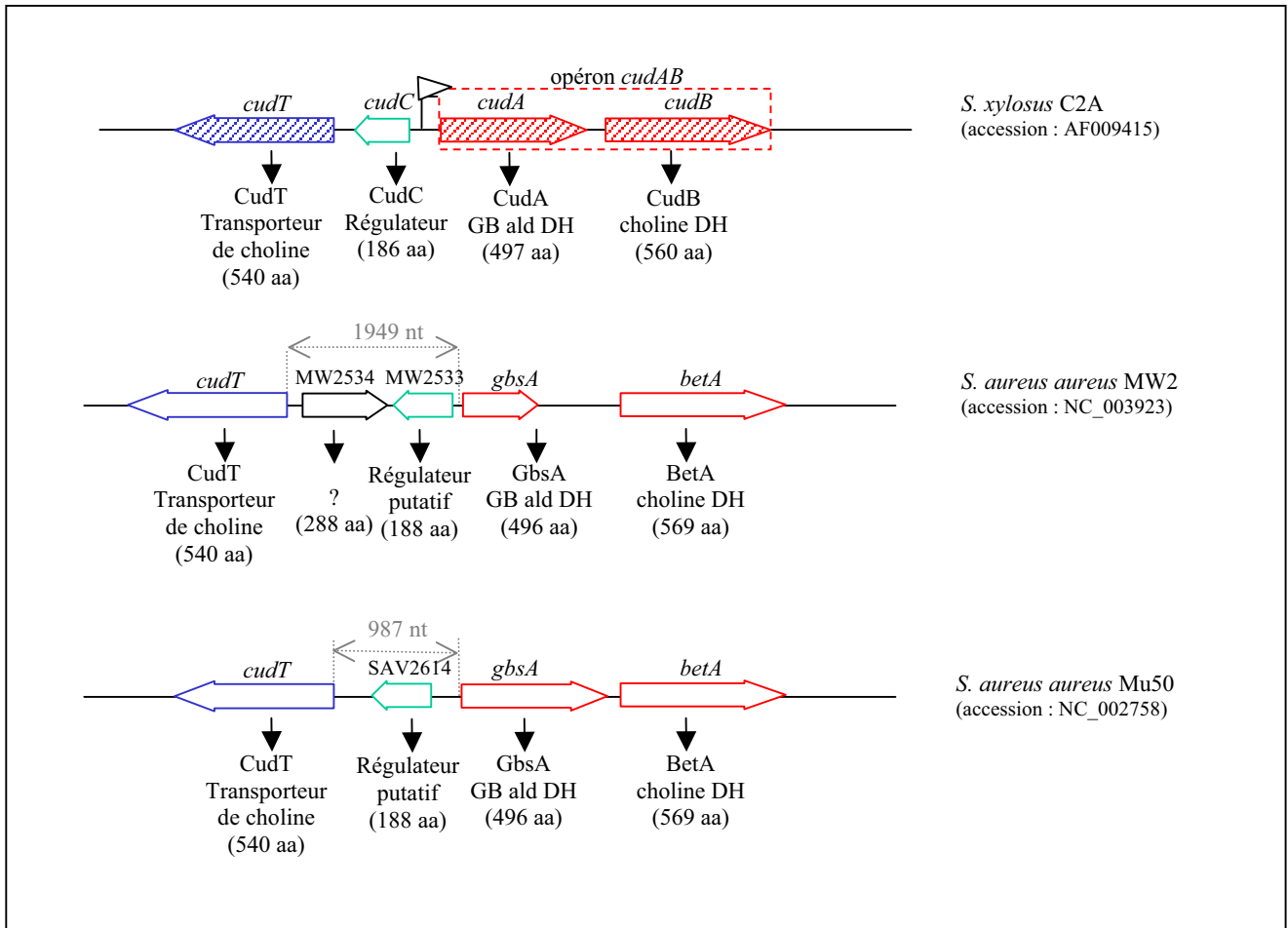
## B) L'ACCUMULATION D'OSMOPROTECTANTS

Parmi les bactéries à Gram positif rencontrées en agroalimentaire nous avons choisi de présenter ici les systèmes d'accumulation d'osmoprotectants de deux bactéries pathogènes (*S. aureus* et *L. monocytogenes*) et de quatre bactéries d'intérêt industriel (*C. glutamicum* et les bactéries lactiques *Lc. lactis* *Lb. plantarum* et *T. halophila*). Ces bactéries ont développé des stratégies différentes d'accumulation : (i) synthèse et transport d'osmoprotectants *via* des transporteurs actifs secondaires, (ii) synthèse et transport d'osmoprotectants *via* des transporteurs actifs secondaires ou un transporteur ABC unique, (iii) transport d'osmoprotectants par des transporteurs ABC (Tableau<sup>(1)</sup> XXI).

### 1) Chez *S. aureus*

*S. aureus* est parmi les plus halotolérantes des Eubactéries non halophiles ; elle est en effet capable de se développer dans des environnements dont l' $a_w$  est de 0,86 (équivalent à 3,5 M NaCl) (Scott, 1953). En présence de fortes osmolarités extérieures, la proline, la GB et la choline stimulent la croissance de *S. aureus* en milieu synthétique (liquide ou solide). La taurine montre elle aussi un effet osmoprotecteur pour *S. aureus* mais uniquement lorsque la croissance est réalisée en conditions de stress hyper-osmotique en milieu solide et ceci en absence d'autres solutés compatibles (Graham et Wilkinson, 1992).

En situation de contrainte osmotique, *S. aureus* accumule majoritairement de la proline et de la GB grâce à deux systèmes de transport : BPI (spécifique de la GB) et BPII (à deux substrats : la proline et la GB) (Bae et Miller, 1990 ; Pourkomialian et Booth, 1992 ; Townsend et Wilkinson,



**Figure 11 :** représentation schématique du locus codant la machinerie protéique de la voie choline-glycine bétaine chez *Staphylococcus xylosoyus* CA2 et des loci homologues à *cud* chez deux souches de *Staphylococcus aureus* ssp *aureus* différentes (interrogation BLASTp).

1992). Ces systèmes de transport ont la particularité d'être synthétisés de façon constitutive et activés en réponse à un stress osmotique. Aucun de ces transporteurs ne semble régulé au niveau génétique par l'osmolarité du milieu extérieur comme c'est cependant le cas chez *B. subtilis* et *C. glutamicum*.

**BPI** est un transporteur secondaire à  $\text{Na}^+$  à haute affinité pour la GB ( $K_m = 3\mu\text{M}$ ,  $V_m = 26 \text{ nmol/min/mg}$  de protéine). Une augmentation de l'osmolarité extérieure a un effet modeste sur l'activité de BPI (activité multipliée par un facteur 5 à 7).

**BPII** est un transporteur à faible affinité pour la GB et la proline. Chez *S. aureus* RN4220, l'activité de transport de GB *via* BPII est (i) détectable lorsque l'osmolarité du milieu extérieur est faible (inférieure à 0,12 osm), (ii) stimulée par l'osmolarité du milieu extérieur (iii) inhibée lorsque l'osmolarité du milieu extérieur est très forte (supérieure à 1,5 osm) (Pourkomialian et Booth, 1992). BPII assure le transport de proline à des fins d'osmoprotection. L'apport de cet acide aminé à des fins anaboliques (source de C, N et énergie) est assuré *via* PutP, un transporteur secondaire à  $\text{Na}^+$ , à forte affinité.

L'existence d'un transporteur secondaire à  $\text{Na}^+$  de la **taurine** a été démontrée chez certaines souches de *S. aureus*. Ce système est spécifique du composé. En effet, seules les molécules de structure très proche (hypotaurine et acide 3-amino-1-propane) entraînent une faible inhibition du transport de taurine. Ce transporteur est lui aussi constitutif et activable par l'osmolarité extérieure (voir revue Bieber, 1988).

Parallèlement à ces capacités de transport, *S. aureus* est également capable de synthétiser la GB à partir de la choline. Les travaux de Roseinstein *et al.* (1999) ont permis de caractériser le locus *cud* codant la machinerie nécessaire au transport puis à la conversion de la choline chez la souche *S. xyloso* C2A. L'existence de loci homologues à *cud* a été montrée dans les génomes de deux souches proches appartenant à la sous-espèce *S. aureus ssp aureus* (Figure(1) 11). L'une d'elles (MW2) a la particularité de posséder un cadre ouvert de lecture supplémentaire entre les gènes codant le transporteur de choline putatif et le régulateur putatif du locus. Le produit de ce cinquième gène n'a pas de fonction connue à l'heure actuelle.

Des essais de transport de [ $^{14}\text{C}$ ]choline, réalisés sur *S. aureus* NCTC 8325 à la suite d'un choc osmotique, montrent que (i) l'accumulation de choline intervient après un délai de plusieurs heures, (ii) la choline est métabolisée en GB (Kaenjak *et al.*, 1993). Ces auteurs en concluent que le système de transport de choline de *S. aureus* est inductible par l'osmolarité du milieu extérieur (contrairement à PutP, BPI et BPII) et intervient dans la biosynthèse de GB. L'inductibilité du transport de choline par *S. aureus* est maximale en présence à la fois d'un stress osmotique et de choline. Elle n'est pas observée sous des conditions d'anaérobiose ; l'expression du (ou des) gène(s) codant le transporteur





de choline de *S. aureus* pourrait être sous le contrôle du potentiel oxydoréducteur du milieu extérieur (Kaenjak *et al.*, 1993). La GB et la proline inhibent le transport de [<sup>14</sup>C]choline ; l'accumulation de GB et/ou de proline en réponse à un choc osmotique est ainsi préférée à celle de la choline plus coûteuse d'un point de vue métabolique (induction de la voie de conversion choline-GB) (Kaenjak *et al.*, 1993).

## 2) Chez *L. monocytogenes*

*L. monocytogenes* présente la particularité d'utiliser des peptides comme sources de solutés compatibles. Les peptones de viandes employées pour reconstituer les milieux de culture en laboratoire contiennent par exemple des peptides renfermant de l'hydroxyproline ou de la glycine qui peuvent être accumulés par *L. monocytogenes* soit sous forme d'acides aminés libres soit sous forme de petits peptides dans le cytoplasme des cellules cultivées dans un milieu à forte osmolarité (Amezaga *et al.*, 1995). Plus l'intensité du stress osmotique est importante, plus cette accumulation est importante. Cependant, l'accumulation de GB et de carnitine provoque la diminution de l'accumulation de peptides osmoprotecteurs (Amezaga *et al.*, 1995).

La présence de GB, carnitine, acétylcarnitine,  $\gamma$ -butyrobétaine, proline bétaine, 3-diméthylsulfonopropiate stimule la croissance de *L. monocytogenes* en milieu synthétique osmotiquement stressant (additionné de 4% NaCl (p/v) ; Bayles et Wilkinson, 2000). Parmi ces osmoprotectants, deux sont particulièrement efficaces : la GB et la carnitine. Les capacités de **transport sont assurées par trois systèmes**: BetL, Gbu, et OpuC qui sont régulés par l'osmolarité du milieu extérieur au niveau transcriptionnel et post-traductionnel (Fraser *et al.*, 2003).

**BetL** est un transporteur secondaire de GB de type symport à Na<sup>+</sup> (Km = 4,4  $\mu$ M, Vm = 700 pmol/min/mg de protéine en absence de stress osmotique) dont l'activité augmente en réponse à choc hyper-osmotique (Gerhardt *et al.*, 1996). BetL appartient à la famille des SSS, cette protéine d'environ 500 aa, est composée d'une douzaine de segments transmembranaires. BetL de *L. monocytogenes* LO28 présente une forte homologie avec d'autres transporteurs de GB comme OpuD de *B. subtilis* 224308 (57% identité, 75% homologie), BetP de *C. glutamicum* ATCC13032 (41% identité, 59% homologie) et BetT d'*E. coli* K12 (37% identité, 58% homologie). L'analyse de la région chromosomique contenant le gène *betL* (codant le transporteur BetL) révèle l'existence d'un promoteur de type  $\sigma^B$  (Sleator *et al.*, 1999).

**Gbu** est un transporteur ABC de GB (Vm < 2 pmol/min/mg de protéine) et de carnitine (Km = 4mM, Mendum et Smith., 2002 ; Angelidis *et al.*, 2002) activé par l'augmentation de l'osmolarité du milieu extérieur et par une diminution de la température extérieure (Km = 15,7  $\mu$ M, Vm = 28 pmol/min/mg de protéine à 4°C) (Gerhardt *et al.*, 2000). Gbu est codé par un opéron de

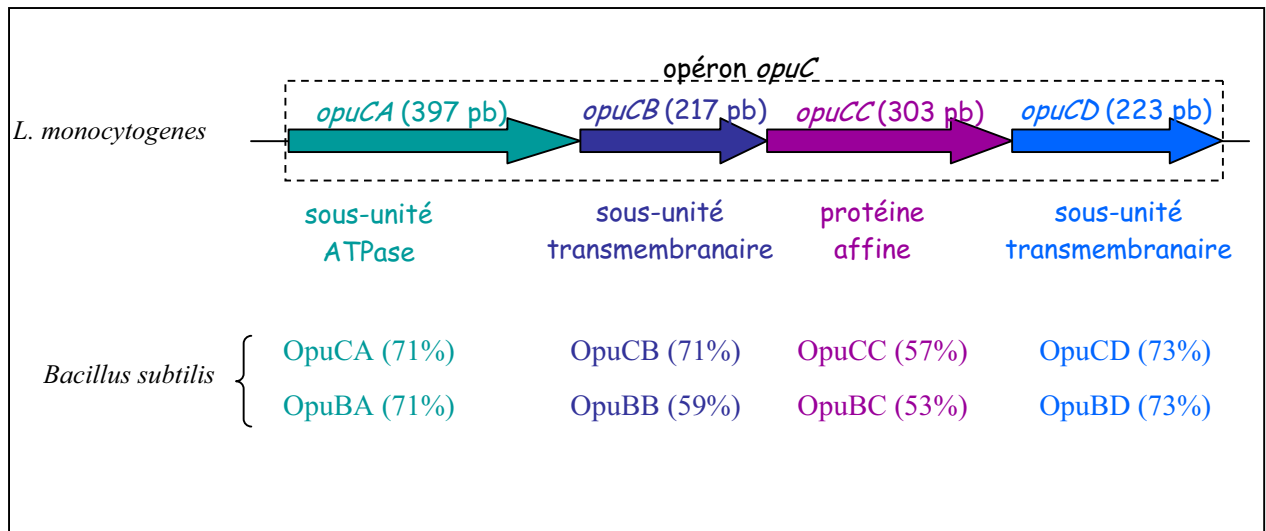


Figure 12 : présentation de l'organisation de l'opéron *opuC* de *L. monocytogenes* EGD et des homologues protéiques (présentées en parenthèse) de chaque composant avec ceux d'OpuC et d'OpuB de *B. subtilis* (d'après Fraser *et al.*, 2000).

→ ORFs ; [ ] : opéron

trois gènes : *gbuA* (codant une ATPase), *gbuB* (codant une protéine membranaire) et *gbuC* (codant une protéine affine) (Ko et Smith, 1999). L'analyse de la séquence de la protéine Gbu de *L. monocytogenes* 10403S (dédoublée à partir de l'opéron *gbuABC*) révèle l'existence d'une forte homologie avec d'autres transporteurs ABC de GB : OpuA de *B. subtilis* 22403S (55% identité et 70% homologie entre les sous unités ATPasiques) et ProU d'*E. coli* K12 (44% identité et 60% homologie entre les sous unités ATPasiques).

**OpuC** est un transporteur ABC de carnitine ( $K_m = 10 \mu\text{M}$ ,  $V_m = 48 \text{ pmol/min/mg}$  de protéine ; Verheul *et al.*, 1995), identifié chez quatre souches de *L. monocytogenes*, qui est régulé par l'osmolarité du milieu extérieur (Fraser *et al.*, 2000 ; Sleator *et al.*, 2001 ; Angelidis *et al.*, 2002) et activé par une diminution de la température extérieure (Sleator *et al.*, 2001). OpuC est composé de quatre protéines : une ATPase (OpuCA, produit du gène *opuCA*), une protéine extracellulaire fixant le substrat (OpuCC, produit du gène *opuCC*) et deux protéines associées à la membrane (OpuCB, produit du gène *opuCB*, OpuCD, produit du gène *opuCD*). Il existe une forte homologie entre les quatre protéines codées par cet opéron et celles codées par les opérons *opuC* et *opuB* de *B. subtilis* (Fraser *et al.*, 2000 ; Figure<sub>(1)</sub> 12). L'analyse de la région du chromosome de *L. monocytogenes* EGD contenant l'opéron *opuC* montre la présence d'un promoteur de type  $\sigma^B$ .

L'étude de l'accumulation d'osmoprotectants chez des mutants affectés au niveau des transporteurs (simple, double et triple mutant) a été réalisée sur deux souches différentes de *L. monocytogenes* : LO28 et ASA7. Il en résulte des résultats contradictoires quant à l'existence d'un quatrième système de transport. Ainsi, un triple mutant  $\text{BetL}^- \text{Gbu}^- \text{OpuC}^-$  issu de LO28 reste capable d'accumuler de la carnitine en réponse à un choc osmotique (existence d'un quatrième système ; Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2002) tandis que le mutant issu de ASA7 perd toute aptitude à accumuler de la GB et de la carnitine et ceci quelle que soit l'osmolarité du milieu extérieur (existence de trois systèmes uniquement, Angelidis et Smith, 2003).

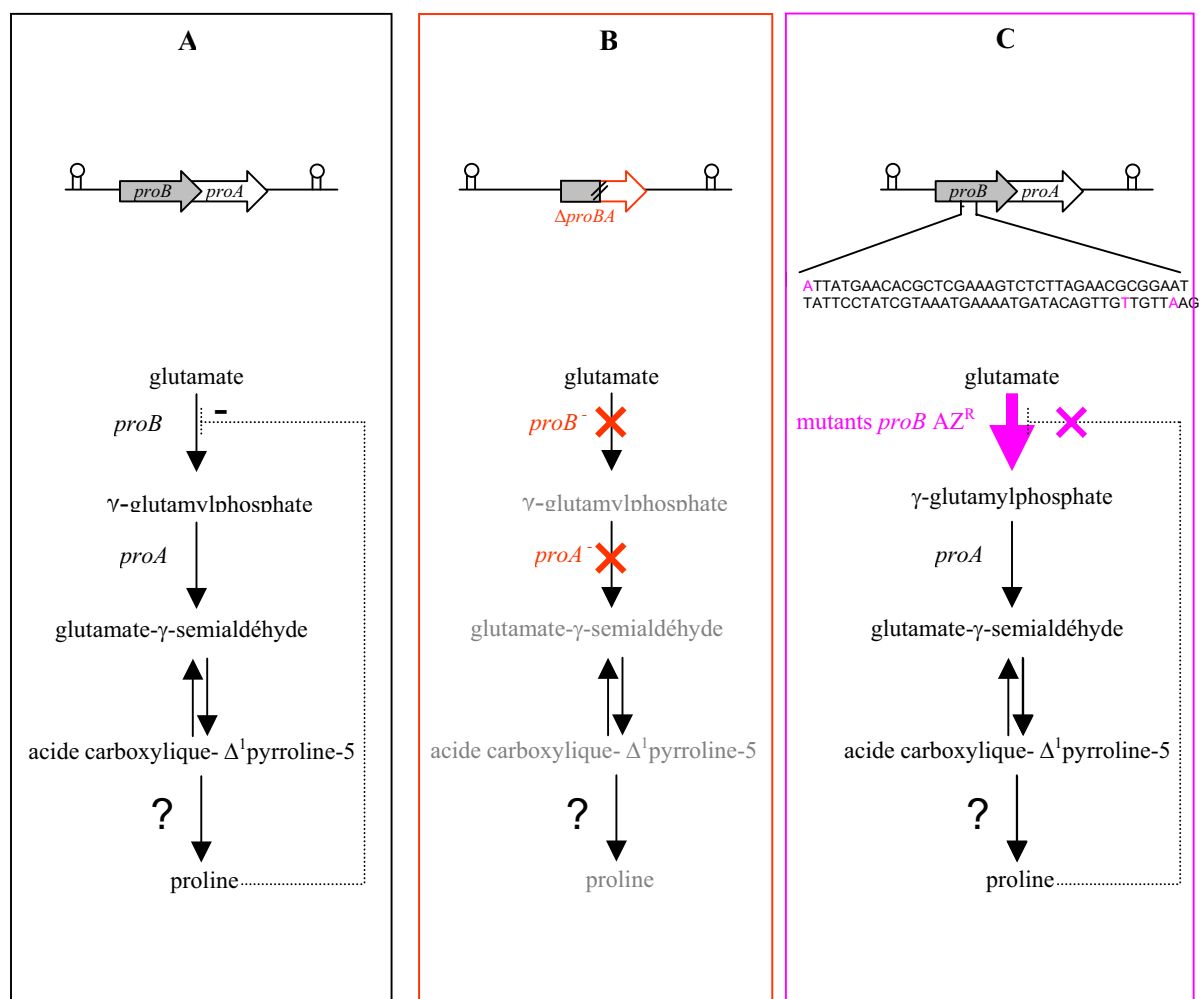
L'existence d'un quatrième système semble l'hypothèse la plus probable. En effet, les conclusions de Wemekamp-Kamphuis *et al.* (2002) s'appuient sur l'existence dans le génome de *L. monocytogenes* EGD-e d'un quatrième type de transporteur homologue à OpuB de *B. subtilis* et structurellement composé de deux protéines comme OpuA/BusA de *Lc. lactis* (fusion entre les protéines affine et de transport). Cet opéron est situé à proximité de l'opéron *opuC*, et est orienté dans le sens opposé. Wemekamp-Kamphuis *et al.* (2002) proposent que OpuB transporte la choline (comme son homologue chez *B. subtilis*) ainsi que la carnitine.

Les résultats contradictoires de Angelidis et Smith (2003) pourraient suggérer que l'équipement en transporteurs soit différent au sein d'une même espèce. Il apparaît plus vraisemblable que le triple

**Tableau<sup>(1)</sup> XXII : comparaison des paramètres de croissance utilisés pour évaluer les activités de transport chez deux souches de *L. monocytogenes*.**

GB : glycine bêtaïne ; Car : carnitine

Référence des travaux	Conditions de culture	NaCl	GB et/ou Car
Angelidis et Smith, 2003	milieu de Pine à 30°C	0,7 M	1mM de GB, ou 1mM de Car, ou 0,5 mM de chaque
Wemekamp-Kamphuis <i>et al.</i> , 2003	milieu BHI à 30°C	0,5M ou 1M	1mM de GB, ou 1 mM de Car, ou 1mM de chaque,



**Figure<sup>(1)</sup> 13 : voie de biosynthèse de proline chez *L. monocytogenes* (A) et impacts de mutations dans l'opéron *proBA* sur la synthèse de proline (B et C).**

(B) délétion dans l'opéron *proBA* entraînant une auxotrophie pour la proline (mutant PSOE)

(C) mutations dans le gène *proB* entraînant un phénotype  $AZ^R$

AZ : acide azetidino-2-carboxylique (analogue de proline)

?: le gène codant la  $\Delta^1$ pyrroline-5-carboxylate-réductase est inconnu chez *L. monocytogenes*

mutant issu de LO28 soit toujours capable d'accumuler la carnitine *via* OpuC et que les conditions de culture utilisées n'activent pas le quatrième transporteur (Tableau<sub>(1)</sub> XXII).

Le fait que trois, et peut être quatre transporteurs d'osmoprotectants sont présents chez *L. monocytogenes* souligne l'importance de l'osmoadaptation chez cette bactérie. Cette diversité est peut être le reflet d'une variation de la disponibilité en tel ou tel composé suivant les niches écologiques colonisées par *L. monocytogenes* (Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2002). Cette bactérie, très répandue dans l'environnement (dans le sol, l'eau ou des végétaux), trouve dans les plantes une source de GB (voir revue Rhodes et Hanson, 1993) et dans les tissus musculaires une source de carnitine (Smith, 1996).

*L. monocytogenes* est également capable d'accumuler des osmoprotectants par **synthèse endogène**. C'est le cas pour la proline. Des expériences de complémentation fonctionnelle réalisées chez *E. coli* CSH26 (mutée dans l'opéron *proBA* et incapable de synthétiser la proline) ont permis d'isoler le locus responsable de l'accumulation de proline à partir d'une banque de génomique de *L. monocytogenes* LO28 (Sleator *et al.*, 2001). Il contient deux gènes (*proB* et *proA*) qui codent les deux premières enzymes de la voie de synthèse de proline à partir de glutamate. La souche mutante de *L. monocytogenes* LO28 délétée dans l'opéron *proBA* (souche PSOE) est incapable de croître en milieu dépourvu de proline. Ceci démontre que l'opéron *proBA* est fonctionnel chez *L. monocytogenes* et que la bactérie possède cette unique voie de biosynthèse de proline (contrairement à *B. subtilis*) (Sleator *et al.*, 2001) (Figure<sub>(1)</sub> 13). L'obtention de mutants de *L. monocytogenes* PSOE touchés dans le gène *proB* et résistants à l'acide azetidine-2-carboxylique (analogue toxique de la proline qui inhibe l'activité de la  $\gamma$ -glutamyl kinase) présentant un phénotype de surproduction de proline ont permis de montrer que ProB est régulé négativement par la proline (Sleator *et al.*, 2001) (Figure<sub>(1)</sub> 13).

La proline **est synthétisée** chez *L. monocytogenes* dans un **but anabolique et osmorégulateur** (Sleator *et al.*, 2001). En effet, la comparaison des paramètres de croissance en milieu BHI additionné de NaCl des souches mutante (PSOE) et sauvage (LO28) montre que le taux de croissance du mutant est plus faible que celui du sauvage pour des concentrations en sels inférieures à 4% et supérieures à 6% (p/v). Les croissances de ces deux souches sont identiques pour des concentrations en sel comprises entre 5% et 6% (p/v). Lors d'un stress osmotique faible, la synthèse de proline est donc réalisée dans un but anabolique, PSOE dont l'unique source de proline provient de son accumulation à partir du milieu de culture croît donc moins vite que LO28. Lors d'un stress osmotique modéré, l'accumulation de proline en tant qu'osmoprotectant supplante sa synthèse ; PSOE et LO28 se développent alors de façon identique. Lors d'un stress osmotique intense, les



systèmes de transport de proline sont saturés : LO28 qui est capable de synthétiser l'osmoprotectant proline croit alors plus vite que PSOE.

### 3) Chez *C. glutamicum*

*Corynebacterium glutamicum* est une bactérie à Gram positif, naturellement présente dans le sol, qui est employée dans la production industrielle d'acides aminés comme le glutamate, la lysine et l'isoleucine (Peter *et al.*, 1997).

En réponse à un stress hyper-osmotique, *C. glutamicum* est capable de synthétiser deux osmoprotectants : le tréhalose et la proline. L'analyse du contenu cellulaire de *C. glutamicum* dans différentes conditions de culture révèle que ces voies de biosynthèse sont régulées par l'osmolarité du milieu extérieur (voir revue Bremer et Krämer, 2000). Des expériences de complémentation fonctionnelle d'un mutant d'*E. coli* incapable de synthétiser de la proline ont permis d'isoler les gènes codant les composants de la voie de biosynthèse de proline chez *C. glutamicum* ATCC14752 (Ankri *et al.*, 1996). Toutefois, peu de données concernant la voie de biosynthèse de tréhalose sont actuellement disponibles.

*C. glutamicum* utilise uniquement des transporteurs actifs secondaires pour accumuler des osmoprotectants à partir du milieu extérieur (contrairement à *B. subtilis*). Trois systèmes de transport de solutés compatibles différents ont été décrits : BetP (transporteur à haute affinité pour la GB), ProP (transporteur à affinité moyenne pour la proline et l'ectoïne) et EctP (transporteur à faible affinité pour l'ectoïne, la GB, et la proline). *C. glutamicum* possède un quatrième transporteur PutP dont le rôle est d'accumuler la proline à des fins anaboliques (comme c'est le cas chez *S. aureus*). PutP n'est pas impliqué dans l'osmoprotection (Peter *et al.*, 1997). Le quadruple mutant de *C. glutamicum* *betP<sup>-</sup> putP<sup>-</sup> proP<sup>-</sup> ectP<sup>-</sup>* est incapable d'accumuler de la proline, de l'ectoïne et de la GB en réponse à un stress hyper-osmotique ; BetP, PutP, ProP et EctP sont donc les seuls transporteurs des solutés compatibles présents chez *C. glutamicum* (Peter<sup>b</sup> *et al.*, 1998).

**BetP** est un système de **transport actif secondaire** à Na<sup>+</sup> très **spécifique de la GB** (Km = 8,6 μM, Vm = 110 nmol/min/mg de protéine en présence de 625 mM NaCl) qui est régulé par l'osmolarité du milieu extérieur (Farwick *et al.*, 1995). Le gène correspondant été isolé à partir d'une banque génomique de *C. glutamicum* ATCC 13032 par complémentation fonctionnelle du mutant d'*E. coli* MKH13 (Peter *et al.*, 1996). BetP possède douze segments transmembranaires ; son extrémité N-terminale hydrophile est chargée négativement tandis que son extrémité C-terminale hydrophile est chargée positivement. Les parties N-terminale et C-terminale de BetP jouent un rôle dans « l'osmosensing » (Peter<sup>a</sup> *et al.*, 1998) (cf. § III.C).





Après délétion partielle des gènes *betP* et *putP*, *C. glutamicum* DHP8 est toujours capable d'accumuler de la proline, de l'ectoïne et de la GB (Peter *et al.*, 1997). Ces travaux indiquent qu'il existe au moins un autre système de transporteur de solutés compatibles chez *C. glutamicum*. Un nouvel essai de complémentation fonctionnelle d'un mutant d'*E. coli* délété des systèmes de transport et de synthèse de proline a alors été réalisé à partir d'une banque génomique de DHP8. Cette stratégie a mené à l'isolement d'un gène codant un **transporteur actif secondaire à H<sup>+</sup>** appelé ProP (Peter<sup>b</sup> *et al.*, 1998). **ProP** s'organise en dix segments transmembranaires. Il transporte uniquement de la proline (K<sub>m</sub> = 48 μM en absence de stress osmotique) et de l'ectoïne (K<sub>m</sub> = 132 μM en absence de stress osmotique). Chez l'hôte hétérologue *E. coli*, l'activité de ProP est régulée par l'osmolarité du milieu extérieur (Peter<sup>b</sup> *et al.*, 1998).

Peter<sup>b</sup> *et al.*, (1998) observent que le triple mutant de *C. glutamicum* *betP putP proP* (DHPP) conserve toujours sa capacité à d'accumuler de la proline, de l'ectoïne et de la GB. Il existe donc un quatrième transporteur chez *C. glutamicum*. Une approche par complémentation homologue d'une souche mutante de *C. glutamicum* déficiente dans l'accumulation de proline, d'ectoïne et de GB a permis d'isoler le gène codant ce quatrième transporteur à partir d'une banque génomique de DHPP. Ce gène (*ectP*) code un **transporteur actif secondaire à Na<sup>+</sup>** appelé **EctP**. La protéine déduite possède douze segments transmembranaires et ses extrémités N-terminale et C-terminale sont situées dans le cytoplasme. EctP transporte l'ectoïne (K<sub>m</sub> = 63 μM, V<sub>m</sub> = 27 nmol/min/mg de protéine en présence de 600 mM NaCl), la GB (K<sub>m</sub> = 333 μM, V<sub>m</sub> = 34 nmol/min/mg de protéine en présence de 600 mM d'NaCl) et de la proline (K<sub>m</sub> = 1200 μM, V<sub>m</sub> = 34 nmol/min/mg de protéine en présence de 600 mM NaCl). *ectP* est exprimé de façon constitutive. EctP est un système de transport à large spectre et est considéré comme le système « d'urgence » permettant aux cellules de survivre à un choc osmotique. Lorsque le stress osmotique se prolonge, des systèmes de transport à spectre plus étroit, comme BetP, sont synthétisés.

BetP, ProP et EctP sont tous les trois régulés au niveau de l'activité du transport par l'osmolarité du milieu extérieur. EctP et BetP appartiennent à la famille des transporteurs SSS. Ils sont très proches (34% d'identité) mais diffèrent par leur temps de réponse face à un stress osmotique : BetP est activé instantanément tandis qu'il faut un délai de dix secondes environ avant qu'EctP ne soit activé (Peter<sup>b</sup> *et al.*, 1998). Seuls BetP et ProP sont également régulés au niveau de l'expression génique. D'autre part, aucun de ces transporteurs n'est actif lorsque l'osmolarité extracellulaire est inférieure à 0,5 osmole/kg ; leur activité maximale est atteinte pour des osmolarités comprises entre 1,1 osmole/kg et 1,4 osmole/kg (Peter<sup>b</sup> *et al.*, 1998).



#### 4) Chez les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ne sont pas capables de synthétiser des osmoprotectants en situation de contrainte osmotique (Roméo *et al.*, 2003), hormis la conversion choline/GB décrite chez *T. halophila* (Robert *et al.*, 2000). Dans cette famille, l'essentiel des connaissances sur la nature des osmoprotectants et des modalités de transport ont été acquises chez les modèles *Lc. lactis* et *Lb. plantarum*.

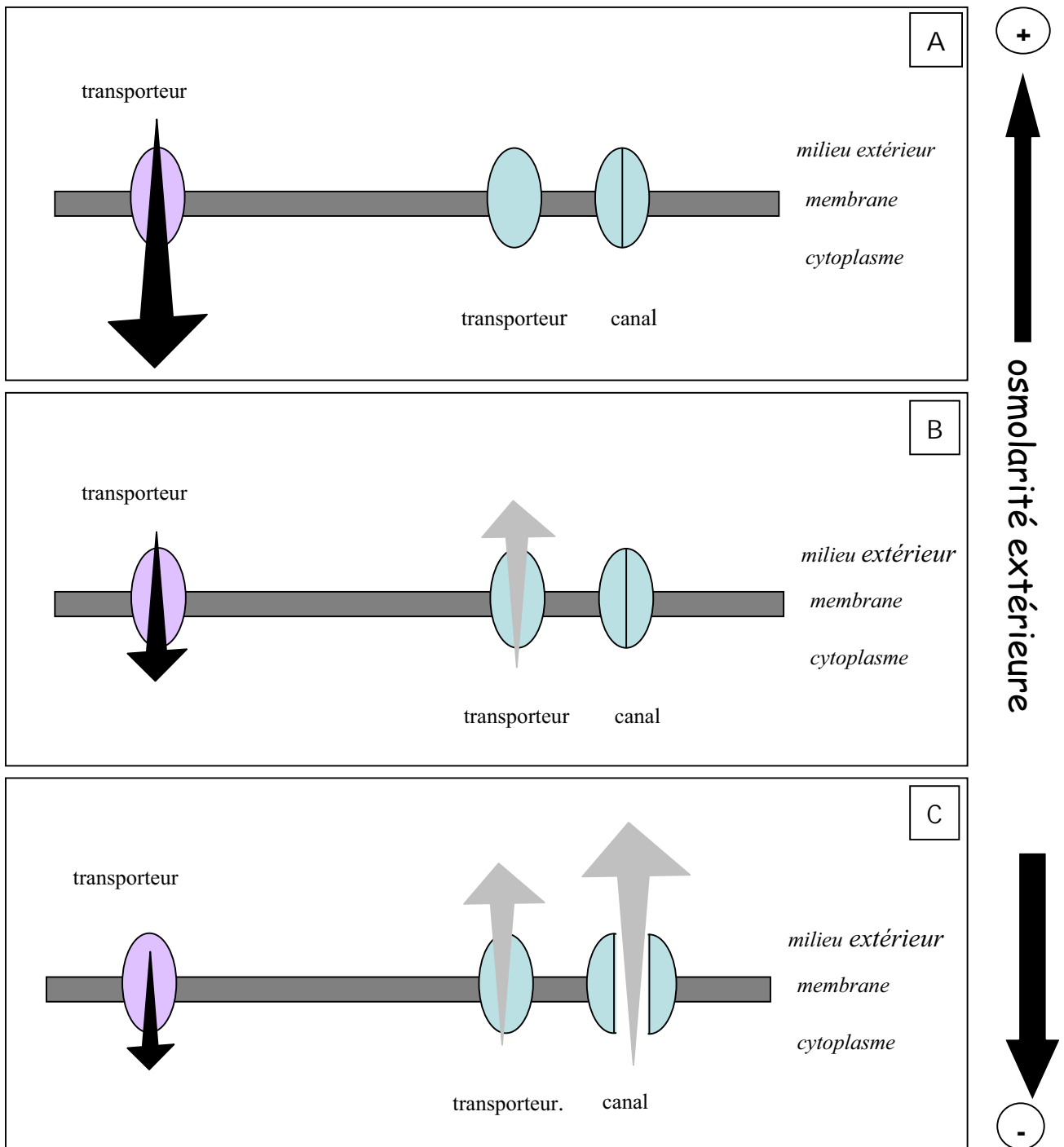
##### a) Chez *Lc. lactis*

L'accumulation de GB et dans une moindre mesure de proline est capable de protéger *Lc. lactis* des effets délétères du stress osmotique (Molenaar *et al.*, 1993). Récemment, un système unique de transport à haute affinité pour la GB a été isolé et caractérisé chez deux souches de *Lc. lactis* : BusA (pour betaine uptake system A ; Obis *et al.*, 1999) aussi appelé OpuA (pour osmoprotectant uptake system A ; Bouvier *et al.*, 2000). Ce transporteur appartient à la famille des transporteurs ABC. Il présente la particularité d'être composé de deux protéines uniquement : une ATPase (BusAA, produit du gène *busAA*) et une protéine membranaire possédant une extension hydrophile liant le substrat (BusAB, produit du gène *busAB*). La protéine BusAB est homologue à ProW d'*E. coli* dans sa partie N-terminale et à ProX dans sa partie C-terminale ; elle est probablement issue de la fusion d'une perméase et une protéine affine (Obis *et al.*, 1999 ; Bouvier *et al.*, 2000).

L'expression de l'opéron *busA* est régulée par l'osmolarité du milieu au niveau de transcriptionnel et post transcriptionnel (Obis *et al.*, 1999 ; Bouvier *et al.*, 2000 ; Van der Heide et Poolman, 2000) (cf § III C.).

##### b) Chez *Lb. plantarum*

Le contenu cytoplasmique de *Lb. plantarum* ATCC 14917 montre que le pool intracellulaire de K<sup>+</sup>, proline, glutamate, alanine et de GB augmente lorsque du KCl est ajouté au milieu de culture (1,51 osmoles/kg) (Glaasker<sup>a</sup> *et al.*, 1996). Lorsque le milieu extérieur est riche en GB, cette dernière est accumulée à forte concentration dans le cytoplasme tandis que la concentration intracellulaire des autres composés compatibles décroît (Glaasker<sup>a</sup> *et al.*, 1996). Sachant que la présence de GB dans le milieu de culture améliore la croissance de *Lb. plantarum* ATCC 14917 à forte osmolarité, Glaasker<sup>a</sup> *et al.* (1996) suggèrent que cet osmoprotectant est préférentiellement accumulé par cette bactérie en réponse à un choc osmotique. Lorsque *Lb. plantarum* ATCC 14917 est placée en conditions hyper-osmotiques, la proline et la GB sont majoritairement accumulées (après un court laps de temps et pour une période dépendant de l'importance du stress) tandis que l'alanine est faiblement accumulée. En conditions hypo-osmotiques, la proline, la glycine et l'alanine accumulées



**Figure 14 : représentation schématique des flux de glycine bêtaïne en fonction de l'osmolarité extérieure chez *Lb. plantarum* (d'après Glaasker<sup>a</sup> et al., 1996).**

A : condition hyper-osmotique ; B: condition iso-osmotique ; C : condition hypo-osmotique  
 Le système d'influx est figuré en violet. Les systèmes d'efflux sont figurés en vert.  
 L'importance des flèches représente l'importance du flux de glycine bêtaïne

dans le cytoplasme sont rejetées dans le milieu extérieur (Glaasker<sup>a</sup> *et al.*, 1996). *Lb. plantarum* ATCC 14917 possède donc des systèmes de transport (efflux et d'afflux) spécifiques de certains solutés compatibles qui sont régulés par l'osmolarité du milieu extérieur.

L'étude des flux de GB suggère que la bactérie dispose (i) d'un système d'afflux activé par un choc hyper-osmotique et réprimé par un choc hypo-osmotique, (ii) de deux systèmes d'efflux : un transporteur activé par un choc hypo-osmotique et inhibé par un choc hyper-osmotique ainsi qu'un canal mécanosensible activé par un choc hypo-osmotique (Figure<sub>(1)</sub> 14 ; Glaasker<sup>a</sup> *et al.*, 1996).

Seul un système d'afflux nommé QacT (Quaternary ammonium compound Transporter ; Glaasker<sup>b</sup> *et al.*, 1998) a été décrit. Il montre une forte affinité pour la GB et la carnitine et une faible affinité pour la proline. L'activité de ce transporteur serait stimulée par un choc hyper-osmotique et réprimée par la présence de GB et de proline dans le milieu de culture (Glaasker<sup>b</sup> *et al.*, 1998).

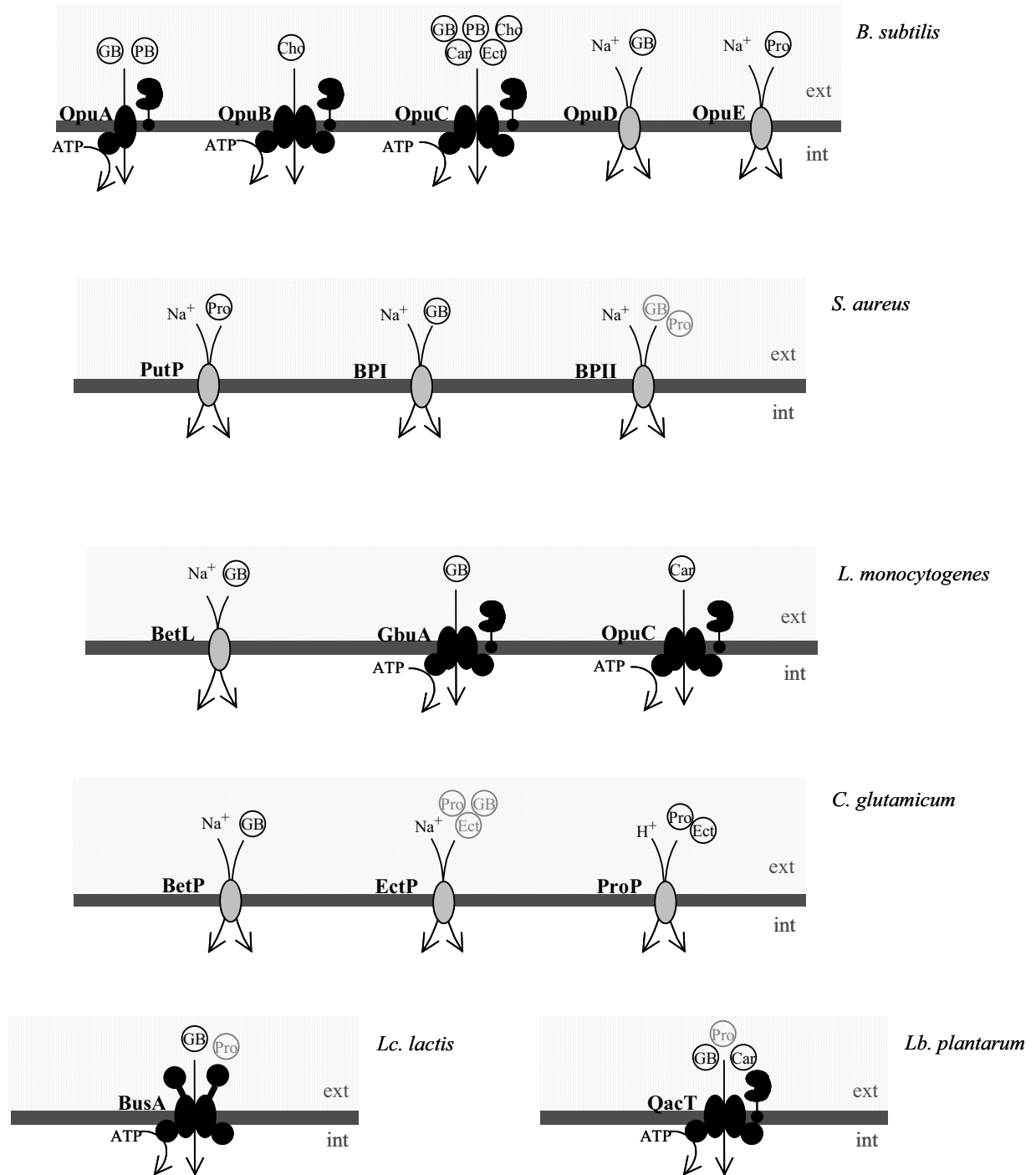
### c) Chez *T. halophila*

*T. halophila* est la seule bactérie lactique modérément halophile. En situation de contrainte hyper-osmotique, cette bactérie accumule un large spectre d'osmoprotectants (GB, DMSA, DMSP, carnitine, choline et ectoïne) (Robert *et al.*, 2000). Les travaux de Robert *et al.* (2000) ont montré que l'accumulation de solutés compatibles régule le contenu intracellulaire en Na<sup>+</sup>/glutamate conférant ainsi à cette bactérie une meilleure tolérance vis-à-vis du stress osmotique.

Deux systèmes de transport de GB ont été identifiés : une perméase spécifique nommée ButA (Betaine uptake in *Tetragenococcus*) codée par le gène *butA* isolé par complémentation fonctionnelle et un transporteur ABC de type OpuA/BusA capable de transporter également la carnitine et la choline partiellement caractérisé au niveau génique (séquençage partiel de 216 pb du gène codant l'ATPase de type OpuAA) (Robert, 2000). L'activité globale de transport de GB n'est régulée par l'osmolarité extérieure chez alors que l'expression de *butA* semble constitutive (voir faiblement inductible) chez l'hôte hétérologue *E. coli* (Robert, 2000). Ces résultats suggèrent que ButA joue un rôle minoritaire dans le transport de GB chez *T. halophila*

### Conclusions :

L'équipement de quelques bactéries à Gram positif en transporteurs d'osmoprotectants est présenté figure<sub>(1)</sub> 15. On y note une grande hétérogénéité au niveau du nombre total de systèmes impliqués et du type de structure (ABC/perméase). Ceci reflète la diversité des niches écologiques



**Figure<sub>(1)</sub> 15 : représentation schématique des systèmes de transport de solutés compatibles chez quelques bactéries à Gram positif.**

Les systèmes de transport actifs primaires sont représentés en noir. Les systèmes de transport actifs secondaires sont représentés en gris. Les solutés transportés à faible affinité sont figuré en gris.

Car : carnitine, Cho : choline, Ect : ectoïne, GB : glycine bétaïne, Pro : proline, PB : proline bétaïne.

colonisées par ces bactéries. En effet, ces niches présentent des différences qualitatives et quantitatives en osmoprotectants et voient leur  $a_w$  fluctuer dans le temps (durée, intensité, fréquence).

La diversité des systèmes s'exprimera également dans les mécanismes de régulation de l'activité globale de transport par l'osmolarité et/ou les osmoprotectants pré-accumulés. Trois niveaux sont connus : la régulation transcriptionnelle des gènes de transport ; l'activation des protéines grâce à la détection de variations de l'osmolarité et enfin la régulation « feed-back » par les solutés accumulés.

### C) LA REGULATION DE L'ACCUMULATION D' OSMOPROTECTANTS

L'osmorégulation correspond à (i) un influx massif de solutés dès que la cellule est dans un environnement hyper-osmotique, (ii) l'arrêt de l'accumulation (voire leur efflux) quand la contrainte s'arrête, ou bien qu'un choc hypo-osmotique apparaît. Un premier niveau de contrôle par l'osmolarité extérieure est obtenu par induction des gènes de transporteurs. Cependant, une synthèse *de novo* de ces protéines reste un phénomène trop lent face à des fluctuations rapides. Chez la plupart des bactéries, les transporteurs sont directement activés par l'osmolarité extérieure. Ce mécanisme est hautement réactif, car instantané et réversible lors du retour vers des conditions iso-osmotiques.

#### 1) Régulation transcriptionnelle du transport des solutés compatibles

La régulation transcriptionnelle du transport de solutés compatibles par l'osmolarité extérieure n'est pas un phénomène commun à toutes les bactéries à Gram positif. Les systèmes OpuA, OpuB, OpuC, OpuD et OpuE de *B. subtilis*, BetP et ProP de *C. glutamicum*, BusA de *Lc. lactis*, OpuC, BetL et Gbu de *L. monocytogenes* sont effectivement osmorégulés au niveau transcriptionnel tandis que les transporteurs d'osmoprotectants de *S. aureus* ne le sont pas. Le contrôle de l'expression de *busA* en fonction des conditions osmotiques extracellulaires a été particulièrement étudié (Obis *et al.*, 1999 ; Van der Heide et Poolman., 2000 ; Obis *et al.*, 2001 ; Roméo *et al.*, 2003).

##### a) Régulation de l'expression de *busA* par BusR

L'analyse par Northern-blot des ARNs extraits d'une culture de *Lc. lactis* NCDO 763 ayant subi un choc hyper-osmotique court (40 min en GM17 0,3 M de NaCl) montre que la transcription de l'opéron *busA* augmente en fonction de l'élévation de l'osmolarité extérieure (Obis *et al.*, 1999). Ces résultats sont confirmés au niveau protéique chez *Lc. lactis* NCDO 763 par l'immunodétection de quantités plus importantes des composants BusAA et BusAB à partir d'extraits cellulaires issus de conditions de culture hyper-osmotiques (Obis *et al.*, 2001).





La recherche de régulateurs de l'opéron *busA* a été menée à partir d'une banque génomique de *Lc. lactis* MG1363 par criblage génétique d'une souche d'*E. coli* modifiée (contenant la séquence promotrice de *busA* fusionnée à *Lac Z*). Un gène dont le produit réprime la transcription de *busA* a été identifié (Roméo *et al.*, 2003). Ce gène, appelé *busR*, est situé sur le chromosome à proximité de l'opéron *busA* (en amont). Chez *Lc. lactis* (i) l'inactivation de *busR* provoque une augmentation de l'expression de *busA* en condition de faible osmolarité extérieure, (ii) la surexpression de *busR* provoque une diminution de l'expression de *busA* en condition de forte osmolarité extérieure. De plus, des expériences de mobilité électrophorétique et de « footprinting » montrent que BusR est capable de se fixer au niveau de la région promotrice de *busA* (Roméo *et al.*, 2003). Tous ces résultats indiquent que BusR est (i) un répresseur transcriptionnel du système de transport de GB chez *Lc. lactis*, (ii) le principal acteur contrôlant l'osmorégulation de *busA* chez *Lc. lactis*.

La séquence protéique de BusR contient un domaine dont la séquence est homologue à des transporteurs putatifs d'ions  $K^+$ . Ce domaine pourrait conférer au transporteur des propriétés d'osmosensing lui permettant de réprimer (ou non) l'expression de *busA* en fonction de l'osmolarité extérieure (Roméo *et al.*, 2003). BusR ressentirait la concentration en ions dans le cytoplasme (Roméo *et al.*, 2003).

#### **b) Régulation de l'expression de *opuC* de *L. monocytogenes* par $\sigma^B$**

L'étude des capacités de transport d'osmoprotectants d'un mutant de *L. monocytogenes* délété dans le gène *sigB* montre une abolition du transport de carnitine et une réduction du transport de GB (Fraser *et al.*, 2003). La transcription d'*opuC* est sous la dépendance de  $\sigma^B$  tandis que celle de *betL* en est indépendante (Fraser *et al.*, 2003). Le facteur de transcription alternatif  $\sigma^B$  joue un rôle majeur dans la régulation de l'accumulation de carnitine chez *L. monocytogenes* mais n'est pas essentiel à l'accumulation de GB par ce pathogène.

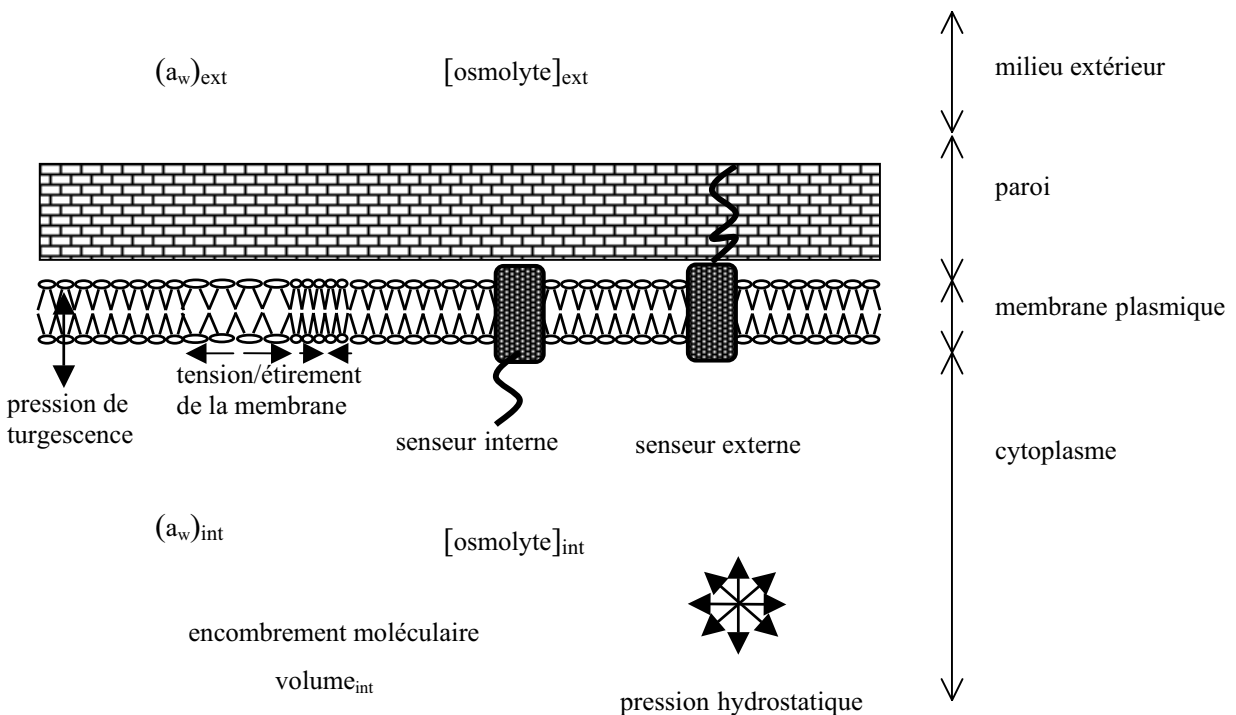
#### **2) Activation des systèmes de réponse : perception et transmission du signal stress**

Le phénomène d'activation des systèmes de transport a été décrit chez de nombreux genres bactériens. Lors d'un stress hyper-osmotique, il permet l'accumulation accrue de solutés compatibles via OpuA, OpuB, OpuC et OpuD chez *B. subtilis*, BPI et BPII chez *S. aureus*, BetL, Gbu et OpuC chez *L. monocytogenes* ou encore BetP, EctP et ProP chez *C. glutamicum*. Il agit également sur les canaux mécanosensibles en intervenant lors de chocs hypo-osmotiques.

Il existe donc un (des) mécanisme(s) conservé(s) de perception des fluctuations de l'osmolarité du milieu extérieur par la cellule. Cette perception ou « osmosensing » peut être directe (perception

**Tableau<sup>(1)</sup> XXIII : mécanisme d'osmosensing : paramètres « sous surveillance » et signaux de déclenchement de la réponse au stress osmotique (d'après la revue Sleator et Hill, 2002).**

Paramètres d'osmosensing « sous surveillance »	Signaux de déclenchement de la réponse au stress osmotique
la pression hydrostatique interne	<ul style="list-style-type: none"> <li>modification des interactions protéine-protéine</li> <li>modification des interactions protéine-ligant</li> </ul>
la pression membranaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>variation de la pression perçue par un senseur situé dans la membrane cytoplasmique</li> </ul>
l'osmolarité intracellulaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>variation du volume cytoplasmique</li> <li>modification de la concentration intracellulaire pour un ou plusieurs solutés (ex : <math>K^+</math>)</li> <li>modification de l'<math>a_w</math> intracellulaire</li> </ul>
l'osmolarité extracellulaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>variation de l'<math>a_w</math> extracellulaire perçue par des protéines transmembranaires exposées à la surface de la cellule</li> </ul>
la superficie de la membrane cytoplasmique	<ul style="list-style-type: none"> <li>variation de l'osmolarité extracellulaire</li> </ul>



**Figure<sup>(1)</sup> 16 : représentation schématique des différents paramètres physiologiques impliqués dans l'osmosensing chez une bactérie à Gram positif (d'après la revue Sleator et Hill, 2002).**  
 Deux systèmes de transport avec des domaines d'osmosensing (externe ou interne) sont représentés par des rectangles à coins arrondis.

de variations de l' $a_w$  extracytoplasmique) ou indirecte (modifications de la membrane, variations des propriétés du cytoplasme).

#### a) Perception directe /indirecte du signal de stress osmotique

Sleator et Hill (2002) suggèrent que les variations de l'osmolarité extracytoplasmique causées par un stress osmotique pourraient être « ressenties » par des protéines transmembranaires grâce à leurs parties extracytoplasmiques. Dans le cas des transporteurs membranaires, cette hypothèse a déjà été vérifiée : les parties N-terminale et C-terminale du système de transport de GB BetP de *C. glutamicum* possèdent en effet des propriétés d'osmosensing (Peter<sup>a</sup> *et al.*, 1998).

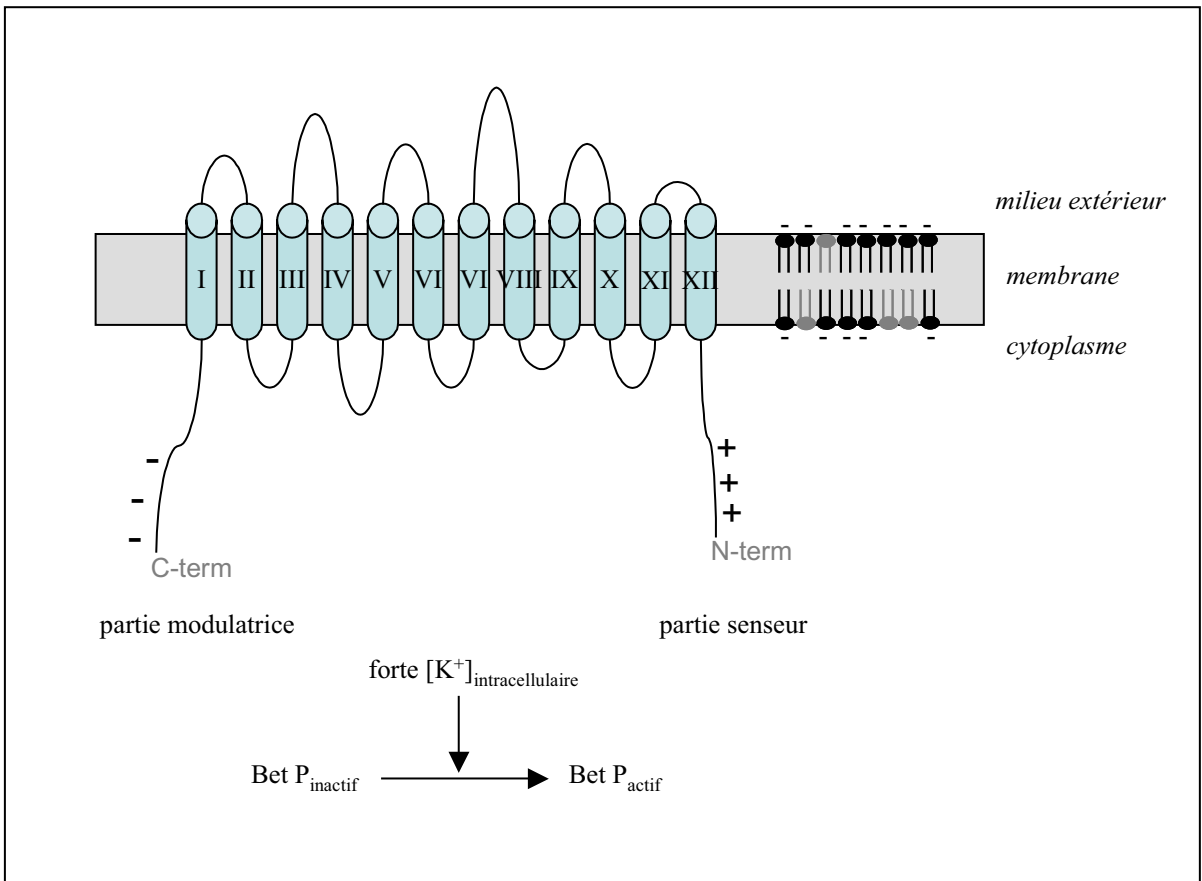
Les modifications de la membrane cytoplasmique (pression et superficie) liées à un stress osmotique peuvent entraîner un relâchement des interactions lipide-lipide et lipide-protéine. Ceci permet de laisser alors des molécules d'eau pénétrer à proximité des parties hydrophobes des protéines membranaires (voir revue Poolman, 2002). Placées dans un environnement aqueux, ces protéines adoptent de nouvelles conformations spatiales qui sont autant de signaux d'osmosensing.

#### b) Nature du signal

Sleator et Hill (2002) ont dressé la liste des paramètres pouvant servir de signaux déclencheurs de la réponse au stress osmotique (Tableau I-XXIII ; Figure<sub>(1)</sub> 16). Tous ces paramètres n'agissent pas simultanément ; la plupart paraissent liés par une relation de causalité. Ainsi, un afflux d'eau dans la cellule (augmentation de l' $a_w$  extracellulaire) entraîne une augmentation du volume cellulaire : la paroi cellulaire se déforme et la membrane s'étire (diminution de son épaisseur et augmentation de sa courbure). Au contraire, un efflux d'eau de la cellule (diminution de l' $a_w$  extracellulaire) entraîne une diminution du volume cellulaire : la force ionique, l'osmolarité et la concentration moléculaire augmentent alors dans le cytoplasme. Ces variations des paramètres structuraux de la cellule et des propriétés du cytoplasme sont autant de stimuli de la réponse au stress osmotique (voir revue Bremer et Krämer, 2000).

La nature du signal perçu a été discutée par Poolman (2002). Les hypothèses et conclusions résultent principalement des études de transport *via* QacT/MscL chez *Lb. plantarum* et OpuA chez *Lc. lactis*. Elles incluent également des études de transport de ces protéines purifiées incorporées dans des protéoliposomes.

En situation de choc hyper-osmotique, une fuite d'eau s'organise hors de la cellule, entraînant une chute de la pression de turgescence. Cette dernière ne peut être retenue comme signal. En effet, les vésicules membranaires et (protéo)liposomes ne peuvent supporter que des basses pressions, ce qui entraînerait donc une activité de transport maximale continue des transporteurs incorporés



**Figure<sub>(1)</sub> 17 : modèle d'activation de BetP chez *C. glutamicum* en condition hyper-osmotique (d'après la revue Morbach et Krämer, 2002).**

Une augmentation de la concentration intracellulaire en K<sup>+</sup> est un stimulus d'activation de BetP. L'environnement de BetP en lipides chargés (positivement ou négativement) agit sur le niveau d'activation de BetP. Les régions C et N terminales sont aussi impliquées dans les phénomènes osmosensing (partie C-term a un rôle modulateur de l'activité de BetP en réponse au stress osmotique tandis que la partie N-term a un rôle de senseur du stress osmotique).

(« activité constitutive »). Or, de nombreux systèmes osmorégulés, dont OpuA de *Lc. lactis*, conservent les mêmes modalités d'activation lorsqu'ils sont incorporés dans des protéoliposomes.

Des modifications de pression de turgescence conduisent à une modification de l' $a_w$  intracellulaire, de la force ionique et de l'encombrement du cytoplasme (dépendant de l'élasticité de l'enveloppe) ainsi que des propriétés de la membrane. Le signal déclencheur est donc un ou plusieurs de ces événements. Actuellement, les propriétés de la membrane ne sont pas considérées comme étant de prime importance dans l'activation d'OpuA de *Lc. lactis*. L'épaisseur de la membrane (variation de la longueur des chaînes acylées), la position et la configuration des insaturations ne modifient pas l'activation du transporteur (Guillot *et al.*, 2000).

### c) Localisation de la région protéique responsable de la perception

La localisation de la région protéique responsable de la perception du signal de stress a été particulièrement étudiée sur le modèle BetP de *C. glutamicum*. Peter<sup>a</sup> *et al.* (1998) ont montré que le transporteur tronqué au niveau N-terminal voit son osmosensibilité diminuée (nécessité d'un stress osmotique plus intense pour l'activer). Lorsque la protéine BetP est déletée de sa partie C-terminale, son activité n'est plus osmorégulée et le système reste activé quelles que soient les conditions extérieures. La partie N-terminale de BetP aurait un rôle de senseur du stress tandis que la partie C-terminale de BetP aurait un rôle modulateur de l'activité de transport de GB chez *C. glutamicum*.

D'autre part, l'incorporation de protéines BetP de *C. glutamicum* dans des protéoliposomes composés de lipides issus d'*E. coli* a permis de montrer que (i) BetP est bien régulé par l'osmolarité du milieu extérieur, prouvant par là même la pertinence du modèle choisi, (ii) l'activation de BetP est fonction de l'environnement lipidique (plus il est riche en charges négatives plus le niveau d'activation est forte), (iii) l'augmentation du pool intracellulaire de  $K^+$  est le signal d'activation de BetP (Rübenhagen *et al.*, 2000 et 2001). Ces travaux permettent d'établir le modèle d'activation de BetP de *C. glutamicum* représenté dans la figure<sub>(1)</sub> 17.

### 3) Inhibition du transport des solutés compatibles par rétro-contrôle

La régulation du transport de solutés compatibles peut également se faire par un mécanisme de rétro-contrôle négatif agissant sur l'activité des transporteurs. Nous prendrons l'exemple du transport de GB chez *S. aureus* pour illustrer ce phénomène.

*S. aureus* possède deux systèmes de transport de GB : le transporteur spécifique de la GB nommé BPI (haute affinité pour la GB) et le transporteur de GB et de proline nommé BPII (faible affinité pour la GB) (Pourkomialian et Booth, 1992 ; voir II. A.). La mise en évidence d'un mécanisme de régulation de l'activité des transporteurs de GB par rétrocontrôle négatif a été rendue



possible grâce à l'obtention de mutants de *S. aureus* RN4220 résistants à l'azétidine (analogue toxique de la proline) (Pourkomialian et Booth, 1994). Ces mutants résistants ont une activité BPII considérablement réduite (diminution du Km et du Vm) tandis que leur activité BPI est totalement conservée. Chez ces mutants, le transport de GB est faible et ce soluté n'est pas accumulé en grande quantité dans le cytoplasme en réponse à un stress osmotique. Seule BPII est donc à l'origine de l'accumulation osmorégulée de GB.

Les cinétiques de transport réalisées à partir de cellules pré-incubées en présence de GB montrent que les vitesses maximales de transport de BPII et de BPI sont réduites (par un facteur 5 pour BPI et par un facteur 10 pour BPII). L'activité des deux systèmes de transport de GB de *S. aureus* est donc inhibée par le pool de GB pré-accumulé. En présence d'un stress osmotique, cette inhibition est levée par l'activation de BPII. *S. aureus* est donc capable d'ajuster la quantité de GB accumulée en fonction des besoins cellulaires (réponse à un stress osmotique ou à une carence en GB).

Le contrôle du système de transport BPII s'exerce vraisemblablement par activation en réponse à la diminution de la pression de turgescence et inactivation en réponse à l'accumulation d'une quantité de GB suffisante pour restaurer la turgescence cellulaire.

Le phénomène d'inhibition du transport des solutés compatibles par rétro-contrôle a également été observé chez *Lb. plantarum* (Poolman et Glaasker, 1998) et chez *C. glutamicum* (Verheul *et al.*, 1997).

#### **IV) CONCLUSION : STRESS OSMOTIQUE ET EFFETS INDUITS**

Nous avons rassemblé, dans cette dernière partie, les effets liés à la présence de sel ainsi que les effets induits par le déclenchement des mécanismes de la réponse au stress. En effet, si l'accumulation de solutés compatibles reste la solution de choix, d'autres mécanismes de protection vis-à-vis du stress osmotique existent.

##### **A) Effets liés à la présence de sels / d'osmoprotectants**

Chez *L. monocytogenes*, la survie à un traitement thermique (56-60°C) est fortement augmentée si du NaCl est rajouté au milieu (Anderson *et al.*, 1991 ; Juneja et Eblen, 1999 ; Knight *et al.*, 1999). Des effets protecteurs similaires ont été observés lorsque *Salmonella enteritidis*, *E. coli* O157:H7 (Blackburn *et al.*, 1997) ou *S. aureus* (Shebuski *et al.*, 2000) sont traités





thermiquement en présence d'une concentration croissante en sel. La technique de DSC (Differential Scanning Calorimetry) a été utilisée pour examiner les modifications macromoléculaires apparaissant dans des cellules de *L. monocytogenes* chauffées. La plupart des changements (probablement liés à la dénaturation) sont observés vers de plus fortes températures lorsque les bactéries sont chauffées en présence de NaCl (Anderson *et al.*, 1991). Des études *in vitro* ont montré que la thermostabilité des protéines augmente lorsque l' $a_w$  du milieu extérieur diminue (Knubovets *et al.*, 1999 ; Castro, 2000). De ce fait, dans un contexte alimentaire, il paraît essentiel de tenir compte des effets d'un choc osmotique sur la thermosensibilité des bactéries lors du choix du traitement thermique à imposer pour inactiver les microorganismes contaminants (voir revue O'Byrne et Booth, 2002).

En réponse à une contrainte osmotique, toute cellule bactérienne va accumuler des solutés compatibles. Ce phénomène permettra à la cellule de développer parallèlement une cryotolérance et une thermoprotection *via* la stabilisation de protéines essentielles (Santoro *et al.*, 1992 ; Ko *et al.*, 1994 ; Caldas *et al.*, 1999 et voir revue O'Byrne et Booth, 2002). Il a été suggéré que la GB joue un rôle similaire à celui des chaperonnes (malgré un mécanisme d'interaction différent). *In vivo*, les osmoprotectants et les chaperonnes pourraient agir en synergie lors d'une situation de stress (Bourot *et al.*, 2000).

### **B) Effets d'une contrainte osmotique *via* l'activation de régulateurs centraux**

L'obtention de mutants sensibles au sel a permis de comprendre que l'accumulation de solutés compatibles s'accompagne d'autres mécanismes (plus ou moins concertés) de protection.

Ainsi, la contrainte osmotique est susceptible de stimuler différents **systèmes à deux composants** comme c'est le cas de DegS/DegU chez *B. subtilis* ou de KinD/IlrD chez *Lc. lactis* (Dartois *et al.*, 1998 ; O'Connell-Motherway *et al.*, 2000). Dès lors, de nombreuses fonctions faisant partie de ces régulons verront leur expression modifiée à leur tour. Ainsi, chez *B. subtilis*, le stress osmotique stimule, *via* le système DegS/DegU, l'expression de *sacB* (codant une levane-saccharase) et réprime l'expression de *aprE* (codant une protéase alcaline) (Kunst et Rapoport, 1995).

La contrainte osmotique peut également activer des **facteurs sigma alternatifs**. C'est le cas chez *E. coli*, chez qui un choc hyper-osmotique induit les régulons  $\sigma^H$  et  $\sigma^E$  qui co-opèrent ensuite de façon étroite dans le contrôle de ce type de stress (Bianchi et Baneyx, 1999). L'activation de régulons correspondants va permettre une meilleure survie et/ou croissance de bactérie. Dans certains cas, elle permettra à la bactérie de survivre en biofilm. Ainsi, chez *S. aureus*, la contrainte osmotique favorise la formation de biofilms grâce à l'activation du facteur  $\sigma^B$  (Rachid *et al.*, 2000). L'inactivation de  $\sigma^B$  résulte en un phénotype « biofilm négatif » (Rachid *et al.*, 2000).



Chez les bactéries à Gram positive, l'activation du régulon  $\sigma^B$  provoque la transcription accrue de gènes de transport de solutés compatibles et d'autres acteurs de la réponse. Chez *L. monocytogenes*, l'inactivation du gène *ctc*, dont la transcription est régulée par  $\sigma^B$ , provoque un phénotype d'osmosensibilité (Gardan *et al.*, 2003). La protéine homologue Ctc de *B. subtilis* est décrite comme étant une protéine générale de stress dont le rôle est de permettre une meilleure traduction en situation de contrainte (Schmalish *et al.*, 2002). Un rôle identique est proposé chez *L. monocytogenes* mais il serait restreint à la contrainte osmotique. En effet, aucune différence entre la souche sauvage de *L. monocytogenes* LO28 et un dérivé *ctc*<sup>-</sup> n'a été observée en condition de stress thermique (Gardan *et al.*, 2003).

Plusieurs études ont montré un rôle central du pool de guanosine tetraphosphate (ppGpp) dans l'osmotolérance bactérienne. Chez *L. monocytogenes*, l'inactivation du gène *rel* codant la ppGpp synthase provoque un phénotype d'osmosensibilité (Nilsson *et al.*, 1989 ; Okada *et al.*, 2002). Chez *B. subtilis*, RelA est l'enzyme-clé de l'activation nutritionnelle de  $\sigma^B$  (Zhang *et al.*, 2003).

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de **facteurs sigma alternatifs**. Chez *Ent. faecalis*, des mutants osmosensibles ont été obtenus par Le Breton *et al.* (2002). Les mutations insertionnelles sont localisées au niveau de gènes codant potentiellement des transporteurs d'oligosaccharides (ce type de molécule n'ayant pas de propriétés osmoprotectrices démontrées chez les bactéries lactiques), la biosynthèse d'acides aminés aromatiques, une hydrolase de paroi et deux autres fonctions inconnues.



PARTIE 2 :  
MATERIELS & METHODES





**Tableau<sub>(II)</sub> I : souches bactériennes et vecteurs plasmidiques utilisés lors de cette étude.**

Souches et vecteurs	Caractéristiques/Conditions de culture	Source
<b>• Souches bactériennes</b>		
<i>Bacillus subtilis</i> JH642	croissance en LB à 37°C	U. Marburg (Pr. Bremer)
<i>Carnobacterium piscicola</i> NCDO2762	croissance en MRS à 30°C	ENITIAA, Nantes (Pr. Prévot)
<i>Enterococcus faecalis</i> CIP76117	croissance en MRS à 30°C	Institut Pasteur
<i>Escherichia coli</i> NM522 MC4100 MKH13 QA-competent cells	croissance en LB à 37°C <i>supE</i> , <i>thi</i> , $\Delta(lac-proAB)hsd\Delta5(F'proAB^+lacI^dZ\Delta M15)$ , <i>F araD139 \Delta(argF-lac)U169rspL150relA1deoC1ptsF25flbB5301rsbR</i> MC4100 $\Delta(putPA)101\Delta(proU)608$ <i>recA1endA1 hsdR [F'(Tet<sup>R</sup>)]</i>	Mead <i>et al.</i> , 1985 Casabadan, 1976 Haardt <i>et al.</i> , 1995 Qbiogène
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCIMB8826	croissance en MRS à 30°C	U. Louvain (Pr. Delcour)
<i>Lactococcus lactis</i> FACC1630	croissance en MRS à 30°C	U. bordeaux 1 USMA
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B512-F	croissance en MRS à 26°C	INRA, Toulouse (Dr. Dols)
<i>Oenococcus oeni</i> ATCC23279	croissance en MRS pH5,3 à 26°C	U. Bordeaux 2 (Pr. Lonvaud-Funel)
<i>Pediococcus acidilactici</i> CIP1033408	croissance en MRS à 30°C	CIP
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC33316	croissance en MRS à 37°C	ATCC
<i>Pediococcus pentosaceus</i> curée	croissance en MRS à 37°C	Cette étude
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ICP02	croissance en MRS à 37°C	Cobiotex, Pessac (Dr. Hyronimus)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ICP02	croissance en MRS à 37°C	Cobiotex, Pessac (Dr. Hyronimus)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB61	croissance en MRS à 37°C	U. Bologne (Dr. Piva)
<i>Tetragenococcus halophila</i> ATCC33315	croissance en MRS à 30°C	ATCC
<i>Tetragenococcus halophila</i> 1-13	MRS à 0,8M NaCl, pH 7,5 à 30°C	U. Tokyo (Dr. Yamato)
<i>Tetragenococcus muriaticus</i> JCM10006	MRS à 0,8M NaCl, pH 7,5 à 30°C	JCM
<b>• Vecteurs de clonage</b>		
pUC18 coupé par <i>Hind</i> III déphosphorylé	<i>lacZ</i> , Amp <sup>R</sup>	Qbiogène
pUC19	<i>lacZ</i> , Amp <sup>R</sup>	Qbiogène
pUC19 coupé par <i>Sma</i> I déphosphorylé	<i>lacZ</i> , Amp <sup>R</sup>	Qbiogène
pGEM-T easy system	<i>lacZ</i> , Amp <sup>R</sup>	Proméga
pBluescript M13(+) SK	<i>lacZ</i> , Amp <sup>R</sup>	Stratagène
pBluescript M13(+) KS	<i>lacZ</i> , Amp <sup>R</sup>	Stratagène



## MATERIELS ET METHODES

### I) MATERIEL BIOLOGIQUE

Les souches bactériennes utilisées et leurs conditions de culture ainsi que les vecteurs plasmidiques employés dans ce travail sont indiqués dans le tableau II-I.

Les souches bactériennes sont conservées à -20°C, sous forme d'aliquotes de 2 mL de milieu de culture glycérolé (20% v/v).

### II) MILIEUX DE CULTURE

#### A) MRS

Le milieu MRS (milieu de de Man, Rogosa et Sharpe, de Man *et al.*, 1960) est composé de 10 g/L de peptone de protéose n°3, de 10 g/L d'extrait de bœuf, de 5 g/L d'extrait de levure, de 20 g/L de glucose, de 1 g/L de polysorbate 80, de 2 g/L de citrate d'ammonium, de 5 g/L d'acétate de sodium, de 0,1 g/L de sulfate de magnésium, de 0,05 g/L de sulfate de manganèse et de 2 g/L de phosphate dipotassique. Le pH final de ce milieu est de 6,5. Le milieu est ensuite stérilisé par autoclavage durant 15 min à 1 bar.

#### B) LB

Le milieu LB (Luria-Bertani ; Miller, 1972) contient 10 g/L de bactotryptone, 5 g/L d'extrait de levure et 10 g/L de chlorure de sodium. Son pH final est de 7,0. Le milieu est ensuite stérilisé par autoclavage durant 15 min à 1 bar.

#### C) DM

La composition du milieu DM est basée sur celle définie par Kets *et al.* (1994) pour l'étude de la croissance de *Lb. plantarum*. Un litre de ce milieu chimiquement défini est reconstitué en supplémentant une base minérale avec 25 mL d'une solution de sucre à 200 g/L, 5 mL d'une solution vitaminique et 0,5 mL d'une solution d'oligoéléments.

La base minérale est composée de 3 g/L d'acétate de sodium, 2 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mg/L de MgSO<sub>4</sub>, 50 mg/L de MnSO<sub>4</sub>, 1,25 g/L de Tween 80, 300 mg/L de L-cystéine, 100 mg/L de L-alanine, de L-acide aspartique, de L-acide glutamique, de L-glycine, de L-isoleucine, de L-leucine, de L-lysine, de L-méthionine, de L-proline, de L-thréonine, de L-tryptophane, de



L-tyrosine, de L-valine, 50 mg/L de L-arginine, de L-histidine, de L-phénylalanine, de L-sérine et 10 mg/L d'adénine, de guanine, d'uracile et de xanthine. Cette base est ensuite stérilisée par autoclavage durant 15 min à 1 bar.

La solution vitaminique est composée quant à elle de 500 mg/L de pyridoxamine-HCl, de 200 mg/L d'acide nicotinique et de thiamine, 100 mg/L d'acide 4-aminobenzoïque, d'acide pantothénique, de vitamine B12 et de riboflavine, 50 mg/L d'acide folique, d'acide lipoïque et de pyridoxine et de 2 mg/L de biotine.

La solution d'oligoéléments contient: 0,025% de HCl (v/v), 1,5 g/L de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 190 mg/L de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 100 mg/L de  $\text{MnCl}_2$ , 70 mg/L de  $\text{ZnCl}_2$ , 6 mg/L de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 36 mg/L de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 24 mg/L de  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  et 2 mg/L de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Le sucre (glucose, maltose, mélibiose, saccharose ou raffinose) est autoclavé séparément durant 30 min à 0,5 bar. Les solutions vitaminique et d'oligoéléments sont stérilisées par filtration sur membrane d'acétate de cellulose 0,2  $\mu\text{m}$  (Millipore, Molsheim, France). Le milieu est ajusté à pH 6,4 avant utilisation, avec une solution de KOH.

#### D) M63

Le milieu chimiquement défini M63 (Miller, 1972) est composé de 13,6 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 250 mg/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg/L de thiamine-HCl et 0,5 mg/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Le pH est ajusté à la valeur de 7,3 avec une solution de KOH. Le milieu est ensuite stérilisé par autoclavage durant 30 min à 0,5 bar puis du glucose stérile est ajouté à la concentration finale de 4 g/L.

#### E) SOC

Les cellules d'*E. coli* ayant subi un choc électrique ou thermique nécessaire à leur transformation sont placées en culture d'expression dans le milieu riche SOC. Sa composition est la suivante : 20,0 g/L de bactotryptone, 5,0 g/L d'extrait de levure, 580 mg/L de NaCl, 186 mg/L de KCl, 950 mg/L de  $\text{MgCl}_2$  et 3,7 g/L de glucose. Le pH est ajusté à la valeur de 7,0 avec une solution de NaOH. Le milieu est ensuite stérilisé par autoclavage durant 15 min à 1 bar.



## **F) WIB**

La composition du milieu WIB (« Whitley Impedance Broth ») n'est pas communiquée par le fournisseur Don Whitley Scientific n° GS0001)

Les milieux décrits ci-dessus sont employés sous forme de bouillon ou de gélose après addition d'agar (15 g/L final). Les milieux MRS et LB utilisés lors de cette étude sont commercialisés par la société DIFCO (Becton, Dickinson, Maryland, Etats-Unis).

## **III) ESTIMATION DE LA CONCENTRATION ET DE L'ACTIVITE MICROBIENNES**

### **A) Turbidimétrie**

La croissance bactérienne d'une culture est estimée en mesurant l'absorbance de l'échantillon à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre U-2000 (Hitachi, Vélizy, France).

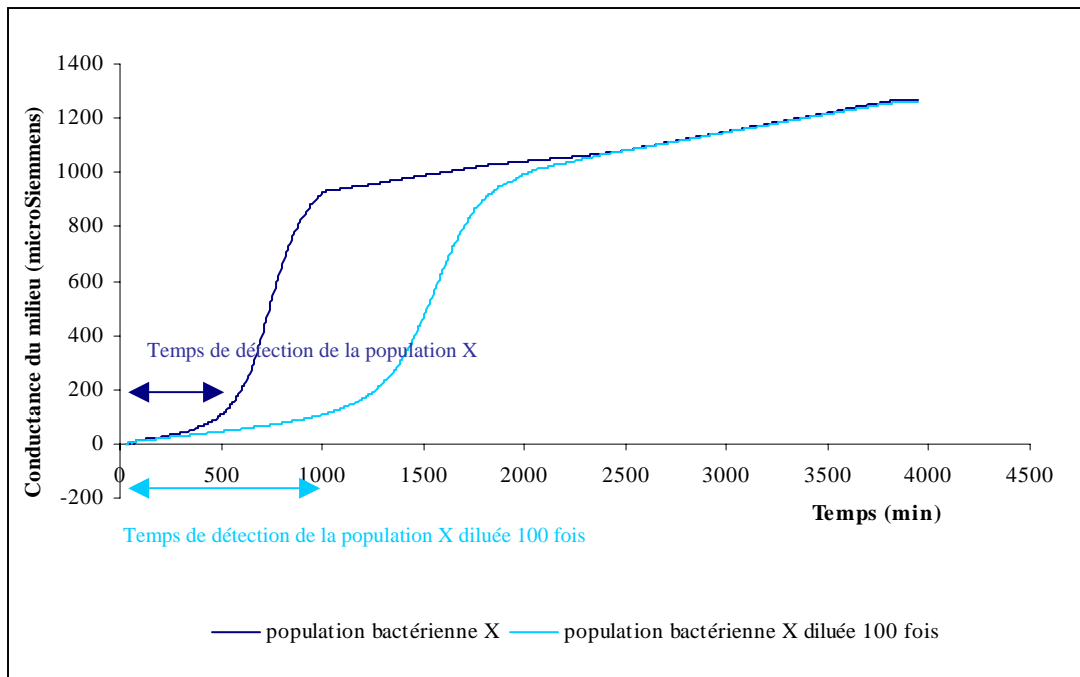
### **B) Dénombrement des cellules viables sur gélose MRS**

Afin de procéder au dénombrement d'un échantillon, des dilutions décimales sont réalisées dans de l'eau physiologique stérile [0,9% NaCl (p/v)]. Des aliquotes de ces dilutions (50-100 ou 200 µL) sont ensuite appliquées en surface sur des géloses MRS en boîtes de Pétri, grâce à un ensemenceur automatique Spiral WASP (Whitley Automatic Spiral Plater ; Don Whitley Scientific Limited, Shipley, Royaume-Uni). Ce procédé d'ensemencement normalisé (NF V 08.100, Oct 87) permet une économie des consommables, un gain de temps et assure une bonne reproductibilité des dénombrements.

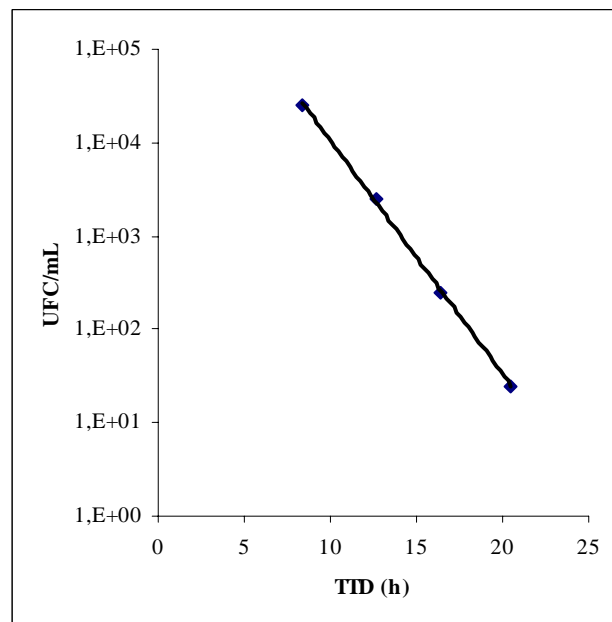
### **C) Estimation de l'activité microbienne par impédancemétrie**

#### **1) Principe**

L'analyseur d'impédance utilisé est le RABIT (« Rapid Automated Bacterial Impedance Technique ») (AES Laboratoires, Combourg, France). Ce système détecte les variations de conductance liées au métabolisme microbien dans un milieu de culture. Au cours de la croissance, certains nutriments du milieu de culture (sucres, protéines) sont dégradés en molécules ionisées plus petites (acides...), ce qui se traduit par une augmentation des dipôles électriques dans le milieu de culture. Il y a alors modifications des propriétés électriques du milieu, qui sont mesurées par l'intermédiaire de deux électrodes. Le RABIT suit ces variations et enregistre la cinétique de



**Figure<sub>(II)</sub> 1 : effets de la croissance des microorganismes sur la conductance du milieu de culture.**



**Figure<sub>(II)</sub> 2 : représentation graphique reliant les valeurs de numération cellulaire (quatre dilutions décimales différentes de l'échantillon) aux valeurs des temps de détection [UFC/mL=f(TDD)] permettant d'estimer l'activité métabolique de la population par calcul de la pente.**

conductance (conductance =  $1/Z$  impédance), qui est de forme sigmoïdale pour de nombreuses bactéries. La première partie de la courbe correspond au temps nécessaire à la bactérie pour induire une modification significative de l'impédance. Ce temps nécessaire est appelé temps de détection (Figure<sub>(II)</sub> 1). Il s'en suit généralement une montée rapide, puis un ralentissement de la conductance. Ces différentes phases de la cinétique (temps de détection, amplitude et forme du signal) dépendent des conditions physico-chimiques d'incubation (température, nature du milieu) et de multiples paramètres relatifs à la bactérie comme l'état physiologique ou la quantité initiale de cellules.

## 2) Protocole

Les cellules de mesure et le milieu non sélectif WIB (« Whitley Impedance Broth ») sont stérilisés par autoclavage à 115°C pendant 15 min. Des volumes de 4 mL de milieu sont répartis stérilement dans des cellules de mesure et 0,1 mL de suspension bactérienne est ensuite introduit. Une fois fermés, les tubes sont connectés à un module préalablement thermostaté à 37°C. Après une période de 30 min de stabilisation de la température (sans acquisition de données), la variation de conductance est suivie par des acquisitions de mesures (en  $\mu$ Siemens) toutes les 6 min.

## 3) Expression des résultats

L'estimation de l'activité métabolique d'une population bactérienne est réalisée en (i) dénombrant les cellules viables et cultivables présentes dans l'essai, (ii) mesurant les temps de détection (TDD) obtenus pour plusieurs dilutions de l'essai.

L'estimation de l'activité métabolique d'une population bactérienne est obtenue en traçant la droite reliant les valeurs de numération cellulaire aux valeurs des temps de détection [i. e.  $\text{Log (UFC/mL)} = f(\text{TDD})$  ; Figure<sub>(II)</sub> 2]. Plus la pente de cette droite est forte, plus la population testée est métaboliquement active.

### D) Estimation de la concentration minimale inhibitrice

Des cellules issues d'une préculture de nuit sont employées pour inoculer des bouillons MRS salé (concentration en NaCl de 0,1 M à 3,5 M) de façon à obtenir une  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  initiale de 0,1. Les pH des différents milieux sont ajustés soit à 5,3 pour *O. oeni* soit à 6,5 pour les autres bactéries lactiques étudiées. La croissance bactérienne est suivie par mesure de la densité optique à  $\text{DO}_{600\text{nm}}$ . La concentration inhibitrice (CMI) correspond à la plus faible concentration en NaCl empêchant la croissance bactérienne.





#### IV) PROTOCOLES D'APPLICATION DES STRESS

Les conditions de stress sont considérées comme modérées lorsqu'elles produisent une faible létalité sur la population testée (entre 5% et 60% de mortalité, soit une perte d'environ 0,25-0,5 log) ou un simple ralentissement de la croissance (sub-optimal). Pour les stress létaux, les conditions entraînant une létalité accrue (environ 99,9% de mortalité, soit une perte d'environ 3 à 4 log) sont retenues.

Quatre stress différents, dont l'intensité et la durée varient, ont été appliqués à des cellules de *P. pentosaceus* en phase exponentielle de croissance afin d'établir si une pré-exposition à stress modéré induit un phénomène d'adaptation à un stress intense ultérieur.

Deux approches expérimentales ont été suivies. La première a consisté à étudier les capacités d'adaptation de *P. pentosaceus* vis-à-vis d'un choc léthal en milieu riche (application d'un stress modéré léthal puis stress intense léthal). La seconde approche vise à étudier les capacités de croissance de *P. pentosaceus* en milieu DM après une préadaptation en conditions sub-optimales de croissance.

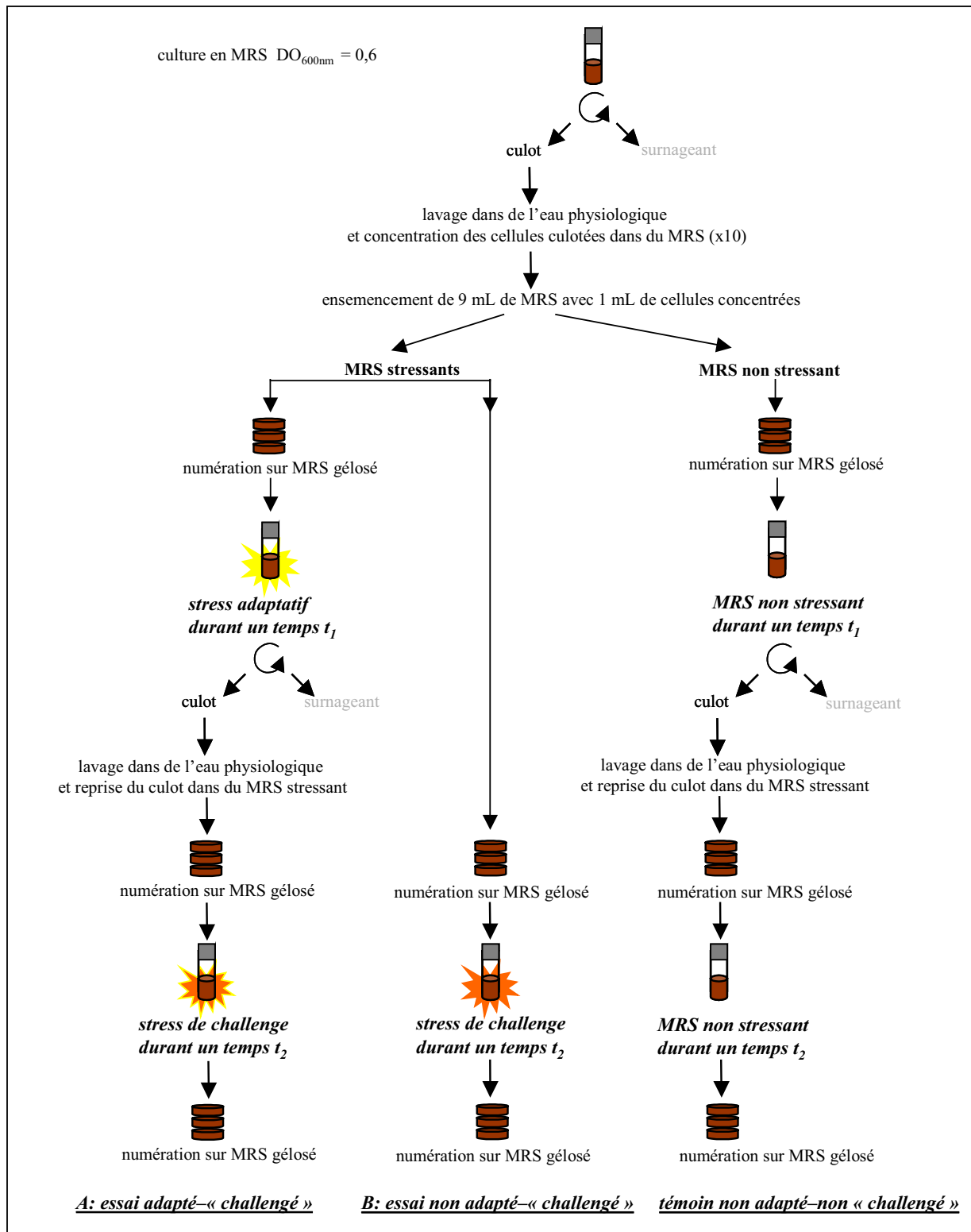
##### A) Préparation de cellules en phase exponentielle

Un volume de 50 mL de bouillon MRS ou DM est inoculé de façon à obtenir une  $DO_{600nm}$  initiale de 0,1. Lorsque l'absorbance atteint 0,6 (début de phase exponentielle), 40 mL de cette culture sont centrifugés (5000 g pendant 10 min) et le culot est rincé par 10 mL d'eau physiologique. Après une nouvelle centrifugation, les cellules sont resuspendues dans 4 mL d'eau physiologique.

Les cellules ainsi concentrées ( $\times 10$ ) seront ensuite diluées dans différents milieux MRS ou DM (générant une  $DO_{initiale} = 0,6$ ) où elles subiront un « panel » de contraintes différentes en nature et en intensité.

##### B) Application d'un stress modéré léthal chez *P. pentosaceus* : développement d'une protection vis-à-vis d'un stress léthal intense en milieu riche

L'effet de l'application d'un stress modéré sur la capacité d'adaptation de *P. pentosaceus* à un stress intense de même nature, ou de nature différente, a été évalué. L'intensité et la durée des stress modérés (adaptation) et intenses (challenge) ont été déterminées en étudiant l'impact de différentes contraintes (thermique, éthanologique, saline et acide) sur la mortalité cellulaire.



Figure<sub>(II)</sub> 3 : modélisation du protocole d'adaptation-challenge aux stress létaux en milieu MRS.

$$\text{Facteur de tolérance} = \frac{\% \text{ de survivants A}}{\% \text{ de survivants B}}$$

### 1) Détermination de la létalité de différentes contraintes

Les cellules bactériennes concentrées sont diluées et soumises à quatre contraintes différentes, selon des couples temps d'application / intensité variables.

- ✓ **Contrainte thermique** : un volume de 1 mL de cellules concentrées est ajouté à 9 mL de bouillon MRS pré-chauffé, et l'ensemble est incubé à 42°C, 50°C ou 53°C.
- ✓ **Contraintes éthanolique, saline et acide** : l'ensemencement se fait de façon identique dans 9 mL de bouillon MRS contenant respectivement 10 ou 15% d'éthanol (v/v) (pH 6,5), 1 ou 2 M de NaCl (pH 6,5), ou acidifié à l'aide de HCl (pH 3,0 ; 3,5 ou 4,0).

Les quatre contraintes sont appliquées pendant des temps variables (de 20 à 180 min). La concentration cellulaire (en Unités Formant Colonies/mL ou UFC/mL) est estimée au temps  $T_0$  d'application du stress et à son issue. La létalité du traitement est traduite par la formule  $(\text{UFC/mL à } T_0 - \text{UFC/mL en fin de stress}) / \text{UFC/mL à } T_0$  et est exprimée en pourcentage.

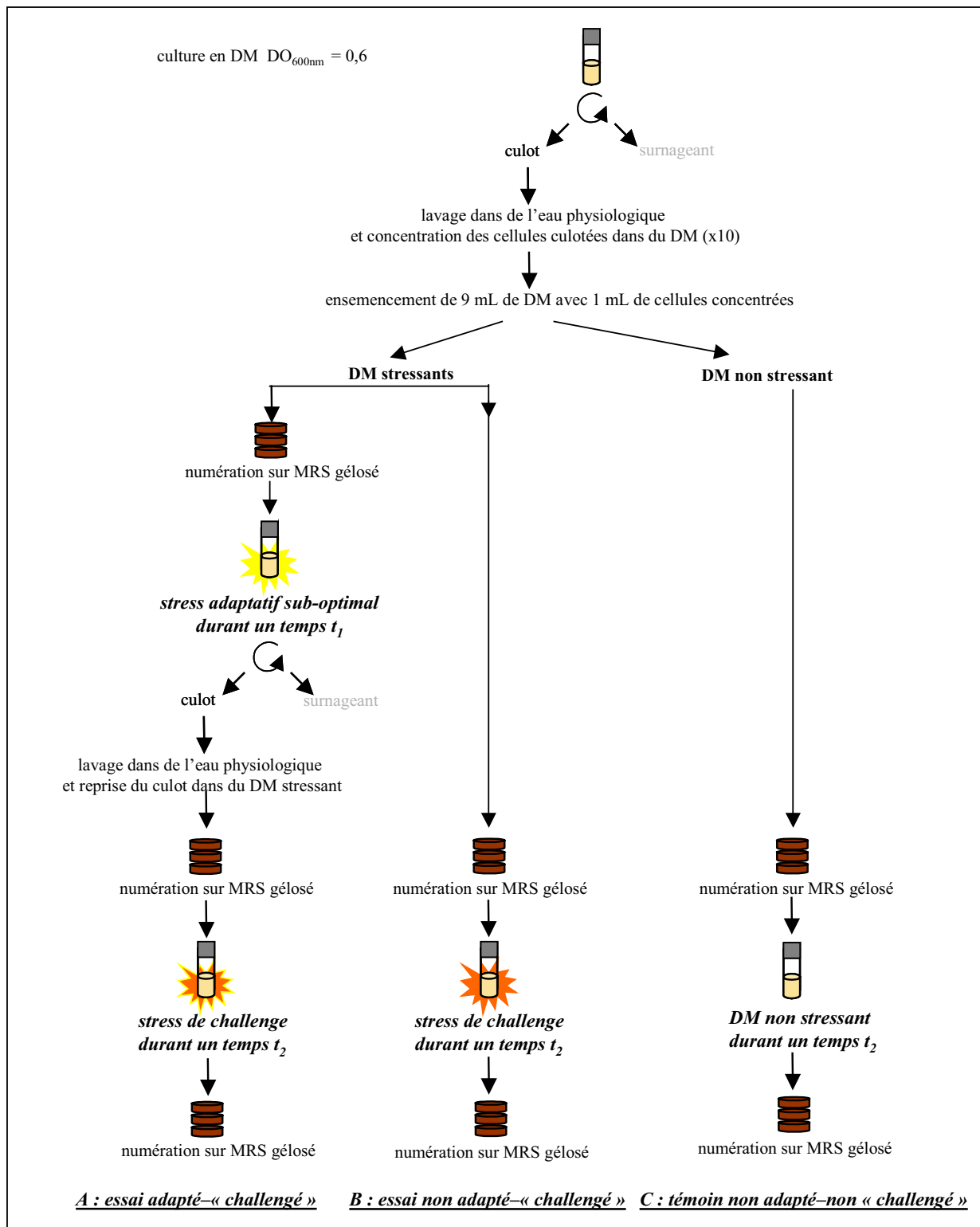
### 2) Procédure d'adaptation–challenge en MRS (Figure (II) 3)

Trois échantillons sont préparés. Le premier (A) subit un stress modéré visant à induire une adaptation pendant une durée  $t_1$ . Il est ensuite placé en conditions de stress intense pendant un temps  $t_2$ . Le second échantillon (B) ne subit pas d'adaptation ; il est uniquement placé en conditions de stress intense pendant un temps  $t_2$ . Le troisième échantillon (témoin) ne subit ni adaptation ni challenge ; il s'agit d'un témoin de croissance en conditions non stressantes. L'intensité du stress adaptatif est vérifiée en numérant l'échantillon A à l'inoculation et à l'issue de la période d'adaptation  $t_1$ .

Les pourcentages de cellules survivant au challenge sont calculés pour l'essai adapté et pour l'essai non adapté  $(\text{UFC fin de challenge } (t_2) / \text{UFC début de challenge} \times 100)$ . Le facteur de tolérance induit par l'adaptation est déduit en calculant le rapport du pourcentage de survie des cellules adaptées (A) / cellules non adaptées (B) (Figure(II) 3).

### C) Amélioration de la croissance en conditions sub–optimales par une préadaptation des cellules au stress

L'existence d'une réponse adaptative aux stress non létaux chez *P. pentosaceus* a été mise en évidence en étudiant l'impact d'une pré-exposition au stress sur l'aptitude de cette bactérie à se développer dans des conditions sub-optimales de croissance.



Figure<sub>(II)</sub> 4 : modélisation du protocole d'adaptation-challenge aux stress sub-optimaux en milieu DM.

$$\text{Facteur de variation de population} = \frac{\text{variation de la quantité de cellule A ou C}}{\text{variation de la quantité de cellule B}}$$

L'intensité des stress employés lors de ces expériences d'amélioration de croissance a été choisie en fonction du niveau de réduction du taux de croissance qu'ils occasionnent sur *P. pentosaceus*.

### 1) Croissance en milieu DM en situation de contrainte

Des volumes de 25 mL de DM stressant sont préparés comme suit : NaCl 0,16 M à 1,10 M (pH 6,4) ; éthanol 0% à 10% (v/v) (pH 6,4) ; pH de 6,4 à 3,5 (HCl) ; DM préchauffé entre 30°C et 42°C. Ces différents milieux sont inoculés par une préculture de nuit (en fin de phase exponentielle) de façon à obtenir une  $DO_{600nm}$  initiale de 0,1. La croissance bactérienne est suivie pendant 24 h. Pour chaque condition de culture, la  $DO_{600nm}$  maximale atteinte est consignée et le taux de croissance ( $\mu$ ) est déterminé graphiquement.

### 2) Définition des paramètres de stress sub-optimaux

Le but de cette étude est de favoriser la croissance de *P. pentosaceus* en milieu hostile (10 à 20% du  $\mu_{max}$ ). Pour cela, les cellules sont pré-adaptées, ou non, dans un milieu modérément hostile à leur croissance (10 à 20% du  $\mu_{max}$ ) avant d'être inoculées en milieu hostile.

### 3) Expression des résultats

La procédure d'adaptation au stress sub-optimaux et le mode de calcul du facteur de variation de population sont représentés dans la figure(II) 4.

L'effet d'une pré-exposition à un stress modéré (adaptation) sur la capacité de croissance de *P. pentosaceus* en conditions hostiles est évalué en comparant les facteurs de variation de population des cellules adaptées et des cellules non adaptées.

Un facteur de variation de population supérieur à 0 montre que l'adaptation améliore la croissance de la bactérie en conditions hostiles. Un facteur de variation de population inférieur à 0 montre que l'adaptation sensibilise de la bactérie aux conditions hostiles.



## V) TECHNIQUES DE BIOCHIMIE

### A) Analyses qualitative et quantitative des solutés compatibles accumulés en situation de contrainte hyper-osmotique

#### 1) Mesure de la capacité osmoprotectrice de certains composés

Des cellules cultivées en milieu DM sont employées pour inoculer 40 mL de milieu DM salé en présence d'un osmoprotectant potentiel (2 mM). L'évolution de la croissance bactérienne est suivie par turbidimétrie à intervalle de temps régulier jusqu'à l'entrée en phase stationnaire. La capacité osmoprotectrice des molécules testées est estimée en comparant les valeurs du taux de croissance et de la  $DO_{600nm}$  finale avec celles du témoin sans osmoprotectants.

#### 2) Extraction hydro-alcoolique des solutés organiques intracellulaires

Les cellules bactériennes sont centrifugées pendant 15 min à 6000 g à 4°C. Le culot obtenu est lavé deux fois avec une solution saline de même osmolarité que le milieu de culture, puis centrifugé. Le culot cellulaire est extrait au moins deux fois avec une solution d'éthanol à 80% (v/v), sous agitation intense, à température ambiante pendant 30 min. L'extrait cellulaire brut est centrifugé à 8000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant contenant les solutés organiques est évaporé à sec, sous vide partiel, à 40°C. Le résidu obtenu est repris dans un volume minimum de  $D_2O$ . Cette solution constitue la fraction soluble totale (FST). Le culot d'extraction (FIT) rassemble les débris membranaires et pariétaux, ainsi que les macromolécules insolubles dans le solvant utilisé.

#### 3) Identification des solutés compatibles accumulés

##### a) Par RMN du $^{13}C$

La FST est reprise dans un volume minimum de  $D_2O$  et est analysée par spectroscopie RMN du  $^{13}C$ , en abondance naturelle, à 75,4 Mhz (Bruker AC 300P). Le spectre obtenu est comparé à des spectres de référence correspondant à des solutés compatibles connus.

##### b) Par chromatographie sur couche mince

Les chromatographies sont réalisées sur couches minces (gel de silice 60 F254 de 0,22 mm d'épaisseur, Merck euromab, Fontenay sous bois, France). Elles sont réalisées en utilisant comme solvants différents mélanges monophasiques : (i) éthanol-acide acétique-eau (70 : 5 : 25) pour séparer la glycine bêtaïne, la choline et la carnitine, (ii) méthanol-ammoniaque (75 : 25) pour séparer la proline et le glutamate.

La quantité de FST déposée est calculée afin de s'affranchir des différences de turbidité entre les différentes cultures. Après migration (phase ascendante), les solvants sont éliminés par séchage





des chromatogrammes (sous hotte aspirante ou au four à 110°C). La révélation est réalisée par pulvérisation (i) d'une solution de ninhydrine (0,4% dans du butanol) pour la coloration des acides aminés ; (ii) du réactif de Dragendorff [mélange de carbonate de bismuth 0,2% (p/v) et d'iodure de potassium 1,5% (p/v) en solution dans du HCl 1N) afin de mettre en évidence des composés à groupement onium (amines quaternaires).

#### **4) Mesures du transport de solutés compatibles**

##### **a) Mesure de l'activité globale de transport**

Des cellules cultivées en milieu DM sont récoltées en milieu de phase exponentielle et concentrées à  $DO_{600nm} = 5$  par centrifugation (5000 g pendant 10 min). 400  $\mu$ L de cette suspension sont ensuite mises en contact avec de la [méthyl- $^{14}C$ ]glycine bétaïne (2,07 Gbq/mM) ou de la L-[méthyl- $^{14}C$ ]carnitine (1,86 Gbq/mM ; Sigma Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France) à une concentration finale de 10  $\mu$ M. Une aliquote (50  $\mu$ L) du mélange préalablement homogénéisé est alors prélevée à  $t = 0, 1, 2$  et 3 min. Ce volume est filtré sous vide sur filtre Whatman GFA (Sigma Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France) et lavé avec 500  $\mu$ L d'un milieu isotonique. La radioactivité retenue par le filtre est ensuite mesurée en scintillation liquide dans un appareil Packard tri-Carb 3380.

La [méthyl- $^{14}C$ ]glycine bétaïne est préparée à partir de la [méthyl- $^{14}C$ ]choline (NEN, Dupont de Nemours, France) selon le protocole d'Ikuta *et al.*, 1977.

##### **b) Mesure de la compétition de transport entre les molécules transportées**

L'effet de molécules froides (glycine bétaïne, carnitine, choline, DMSA ; Sigma Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France) sur l'activité de transport de la [méthyl- $^{14}C$ ]glycine bétaïne ou de la L-[méthyl- $^{14}C$ ]carnitine a été déterminé comme précédemment (cf § V.A.4.a.). La concentration des molécules froides utilisées correspond à 100 fois (1000  $\mu$ M) celle des solutés compatibles marqués.

#### **B) Immunodétection des protéines OpuCA**

##### **1) Préparation des extraits protéiques**

Les protéines totales de *B. subtilis* et *T. halophila* destinées à la détection des protéines OpuCA par immunodétection ont été préparées à partir de cellules en phase exponentielle de croissance ( $0,5 < DO_{600nm} < 0,7$ ). Chaque culture est répartie en quatre lots de 50 mL. Après centrifugation (5000 g pendant 5 min à 4°C), les cellules sont remises en suspension 50 mL de MRS salé [*B. subtilis* : 0 M (témoin) et 1,5M NaCl ; *T. halophila* : 0,8 M (témoin) /1,2M /1,5M à 2,0 M NaCl]. Après 40 min d'exposition au stress, les cellules sont récoltées par centrifugation (5000 g pendant 5 min à 4°C),



lavées dans de l'eau physiologique et reprises dans 1 mL de ce diluant. 250 µL de ces cellules sont mélangés à 150 µL de tampon Tris-SDS [10 mM Tris-HCl, 4% SDS (v/v), pH 8,0] et lysées à l'aide de 100 mg de billes en verre dans un ribolyseur (Ribolyser Hybaid) pendant 3 x 45 sec à une intensité de 6. Après plusieurs centrifugations (10000 g pendant 5 min à 4°C), les surnageants (extraits protéiques totaux) sont récupérés et conservés à -20°C avant d'être analysés par SDS-PAGE.

## 2) Estimation de la concentration protéique des extraits

Les concentrations protéiques des extraits sont estimées selon la méthode colorimétrique du Biuret (Sambrook et Russell, 2001), en utilisant une gamme étalon de sérum albumine bovine. Cette méthode repose sur l'absorbance à 552 nm du complexe protéine-cuivre-réactif du Biuret. Les résultats sont exprimés en mg de protéines par mL.

## 3) Technique d'immunoempreintes

Trente µg de protéines totales sont séparés par SDS-PAGE (4,8%-12,5%) sur un système Mini Protéan III (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) selon la méthode de Laemmli (1970). Les protéines ainsi séparées sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Hybond N+, Amersham, Buckinghamshire, Grande Bretagne) dans du tampon de transfert (48 mM Tris-HCl, 39 mM glycine, 1,3 mM SDS) à voltage constant (16 volts) pendant 15h.

Les protéines transférées sont visualisées par coloration réversible au rouge Ponceau S selon la méthode décrite par Salinovich (1986). La membrane est incubée pendant 10 minutes dans une solution de coloration [0,2% rouge Ponceau S (p/v), 8% acide trichoroacétique (v/v)]. L'excès de colorant est éliminé par des rinçages successifs dans de l'eau distillée. Les protéines colorées au rouge Ponceau S sont ensuite décolorées pendant 30 minutes dans du tampon PST [10mM phosphate de sodium, 145 mM NaCl, 0,05% Tween 20 (v/v), pH 7,5].

Les sites d'adsorption aspécifiques de la membrane sont ensuite saturés avec une solution de sérum albumine bovine à 1% (v/v) dans du PBS (Phosphate Buffer saline : 10mM phosphate de sodium, 145 mM NaCl, pH 7,5). Le premier marquage immunologique est réalisé en présence d'un sérum de lapin contenant des anticorps anti-OpuA (fourni par le Pr. Bremer de l'Université de Marburg) dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans du tampon PST. La membrane est ensuite lavée durant 10 minutes avec du tampon PSL. Ce lavage est renouvelé trois fois puis la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire de porc anti-lapin couplé à une peroxydase (dilué au 1/2000<sup>ème</sup>, Sigma Alderich, L'isle d'Abeau Chesnes, France) dans 10 mL de tampon PLT. La détection des complexes



formés est réalisée à l'aide d'un mélange composé de 4,87 mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de 2,8 mM de chloro-1-naphtol en solution dans un tampon méthanol/PBS (20 :80).

## VI) TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

### A) Extraction et quantification des acides nucléiques

#### 1) Extraction d'ADN génomique (d'après Luchansky *et al.*, 1991)

L'extraction est réalisée à partir de cellules en phase stationnaire (DO<sub>600nm</sub> d'environ 5). Trois mL sont centrifugés à 15000 g pendant 5 min. Le culot obtenu est resuspendu dans 1 mL de tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM d'EDTA). Le mélange est centrifugé à nouveau à 15000 g pendant 5 min. Le culot est repris dans 900 µL de tampon de lyse [50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 25% saccharose(p/v)] et 100 µL de lysozyme à 50 mg/mL sont ajoutés. Le mélange est incubé pendant 30 min à 37°C. 20 µL de protéinase K à 20 mg/mL et 25 µL de SDS à 20% sont ajoutés et le mélange obtenu est incubé à 55°C pendant 1h. Le lysat clair et visqueux obtenu subit ensuite deux extractions au phénol/chloroforme. L'ADN est alors précipité avec de l'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et de l'isopropanol. Après centrifugation, le culot est lavé à l'éthanol 70% (v/v). L'ADN obtenu est dissous dans 100 µL de tampon TE contenant 2 µL de RNase à 2 mg/mL, et conservé à 4°C.

#### 2) Extraction d'ADN plasmidique

##### a) A partir d'*Escherichia coli*

Une culture de nuit d'*E. coli* (3 mL, phase stationnaire) est centrifugée et le culot cellulaire est lavé dans 0,5 mL de Tris 0,5 M pH 8. Après centrifugation, le culot est resuspendu dans 50 µL de TES [10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 20% saccharose (p/v)] auquel du lysozyme a été ajouté (2 mg/mL final). Après 5 min à température ambiante, 200 µL de solution dénaturante [NaOH 0,1 M et SDS 1% (v/v)] sont ajoutés. L'ADN est précipité à l'alcool après addition d'acétate de sodium (0,3 M final pH 4,8). La solution est centrifugée. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est séché. Ce dernier est repris dans 150 µL d'acétate de sodium 0,3 M pH 6,2 et précipité à l'éthanol absolu. Le mélange est ensuite centrifugé puis le culot est récupéré et séché. Ce dernier est ensuite dissous dans 40 µL d'eau ultra pure stérile.

##### b) A partir de *Pediococcus pentosaceus* (d'après Giacomini *et al.*, 2000)

Une culture de nuit de *P. pentosaceus* (20 mL) est centrifugée et les cellules sont lavées dans 1 mL de tampon 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 25% saccharose (p/v), pH 8. L'échantillon est centrifugé et les cellules du culot sont remises en suspension dans 500 µL de ce



même tampon. Après addition de 6 mg de lysozyme et de 40  $\mu\text{L}$  de RNase (10 mg/mL), la suspension est incubée à 37°C pendant 1h. Les cellules sont lysées après ajout de 500  $\mu\text{L}$  de solution contenant 0,2 M de NaOH et 1% de SDS (v/v). Après agitation et incubation à 37°C pendant 1h, 500  $\mu\text{L}$  d'acétate de potassium (pH 4,8) sont ajoutés aux échantillons. Les protéines ainsi précipitées sont éliminées par centrifugation. L'ADN plasmidique est ensuite purifié à partir du surnageant à l'aide du kit Qiagen® Plasmid Midi Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

### 3) Extraction et traitement des ARNs totaux

#### a) Protocole optimisé d'après Cavin *et al.*, 1997

Les cultures sont refroidies dans la glace/ $\text{CaCl}_2$  puis centrifugées pendant 5 min à 10000 g à 4°C. Le culot cellulaire est ensuite repris dans 1 mL d'un mélange monophasique thiocyanate de guanidine et de phénol (Tri-reagent, Sigma Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France) auquel 150 mg de microbilles de verre à pH 7,5 sont ajoutées. A l'issue de 5 cycles de ribolyse (force 6 durant 40 sec, ribolyseur, Hybaid) entrecoupés de périodes de 2 min de refroidissement dans la glace, le surnageant est récolté après une centrifugation de 15 min à 10 000 g à 4°C puis mélangé à dans 1 volume de chloroforme. A l'issue d'une nouvelle étape de centrifugation (15 min à 10 000 g à 4°C), la phase aqueuse est transférée dans un microtube. Les ARNs sont précipités par l'ajout de 0,7 volume d'isopropanol. Ils sont ensuite lavés deux fois avec de l'éthanol à 70% (v/v), séchés au évaporateur centrifuge et dissous dans de l'eau traitée au DEPC.

L'avantage majeur de ce protocole d'extraction d'ARNs réside dans l'efficacité de son étape de lyse. Cependant, les fréquentes contaminations par de l'ADN génomique (dégradable par traitement DNase) nous ont poussé à coupler la lyse mécanique des cellules à une seconde méthode d'extraction d'ARNs basée sur l'utilisation d'une résine chargée (du kit NucleoSpin® RNA II).

#### b) Protocole simplifié : NucleoSpin® RNA II

Les ARNs totaux sont extraits à partir de cultures bactériennes en phase exponentielle de croissance ( $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,6$ ). Un échantillon de  $10^9$  cellules est prélevé et rapidement refroidi dans un mélange glace/ $\text{CaCl}_2$ . Cet échantillon est ensuite centrifugé, remis en suspension dans 100  $\mu\text{L}$  de tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Après addition du tampon de lyse (fourni dans le kit NucleoSpin® RNA II) et de 3,5  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoéthanol, les cellules sont lysées à l'aide de billes en verre dans un ribolyseur (Ribolyser Hybaid) pendant 40 sec à une intensité de 6. Le lysat est ensuite centrifugé et le surnageant est récupéré. Les ARNs totaux sont extraits de ce lysat à l'aide du kit NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Un traitement final par DNase est inclus, permettant de dégrader l'ADN génomique bactérien éventuellement présent.





### c) Traitement des ARNs totaux

En cas de contamination persistante des échantillons par de l'ADN génomique à l'issue de l'extraction (PCR ADN<sub>R</sub>16S positive), l'ARN est traité de nouveau à la DNase soit par la RQ1 RNase-free™ (Proméga, Courtaboeuf, France) soit par la RNA-free™ (Ambion, Austin, TX, Etats-Unis) à 37°C pendant 20 min. La RQ1 RNase-free™ DNase est inactivée par traitement thermique (80°C pendant 10 min) puis les ARNs sont précipités à l'éthanol absolu. La DNase RNase-free™ est inactivée par l'ajout d'un tampon d'inactivation fourni par Ambion, évitant ainsi une phase supplémentaire de précipitation des ARNs.

Les ARNs totaux extraits sont additionnés d'inhibiteur de RNase (RNasin® Proméga, Courtaboeuf, France), aliquotés et conservés à -80°C.

### 4) Quantification des acides nucléiques

Les préparations d'ADN génomique et d'ARNs totaux sont quantifiées par spectrophotométrie UV à 260 nm. Une solution diluée de ces préparations (50 µL) est placée dans une cuve UVette® (Eppendorf, Hambourg, Allemagne). Une unité de DO<sub>260nm</sub> correspond à une concentration en ADN de 50 µg/mL ou en ARN de 40 µg/mL.

Alternativement, l'ADN est quantifié par fluorimétrie avec le réactif PicoGreen (Molecular Probes, Leiden, Pays-Bas). La fluorescence est mesurée à l'aide d'un fluorimètre Versa-Fluor™ (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) équipé de filtres d'excitation et d'émission respectivement de 490 et 520 nm. Cette fluorescence est ensuite comparée à celle obtenue avec une gamme d'étalonnage réalisée à partir de l'ADN purifié du phage λ.

### B) Curage à la novobiocine de *P. pentosaceus* ATCC33316

La novobiocine est un inhibiteur de gyrase. Sa présence dans le milieu de culture peut induire le curage de plasmides (Kojic *et al.*, 1992). Les bactéries porteuses de plasmides sont repiquées toutes les 24h environ en bouillon MRS supplémenté en novobiocine (200 µg/mL) puis étalées après dilution sur gélose MRS supplémentée en novobiocine (200 µg/mL). Les clones ainsi isolés, potentiellement curés, sont analysés quant à leur aptitude à métaboliser le maltose, le mélibiose, le saccharose et le raffinose selon Benachour *et al.* (1996). Le dérivé curé est ensuite analysé par galerie API 50 CHL, par séquençage partiel de l'ADN<sub>R</sub> 16S puis par hybridation ADN-ADN (les sondes correspondant à des fragments de restriction d'ADN plasmidique).



## C) Utilisations d'enzymes, clonages et transformations

### 1) Enzymes

Les enzymes de restriction et de modification sont utilisées selon les indications fournies par les fabricants (Roche Diagnostics, Meylan, France ; Proméga, Courtaboeuf, France ; Qbiogène, Illkirch, France).

Les délétions partielles et progressives à partir d'une extrémité d'un insert ont été réalisées grâce au système Erase-a-base (Proméga, Courtaboeuf, France).

### 2) Préparation de matrice pour la PCR inverse

Le chromosome bactérien (3 µg) est digéré par une enzyme de restriction dans un volume de 200 µL pendant 2 h. A l'issue de cette digestion, l'ADN est précipité à l'éthanol absolu pendant une nuit à -20°C. La solution est centrifugée à 10 000 g et le culot est lavé à l'éthanol à 70% (v/v). Après une nouvelle centrifugation, le culot d'ADN est séché et repris dans 35 µL d'eau. Les fragments linéaires d'ADN génomique (10 µL soit environ 1 µg) sont circularisés pendant une nuit à 4°C en présence de 4 unités de T4 DNA ligase (Qbiogène, Illkirch, France). Des témoins sans ligase sont également réalisés. Après une étape d'extraction phénol/chloroforme, l'ADN est précipité à l'éthanol et repris dans 25 µL d'eau ultrapure.

### 3) Clonage

#### a) A partir de fragments de restriction

##### i) Réalisation de banques chromosomiques de *T. halophila*

Lors de la construction de banques, l'ADN chromosomique est digéré partiellement par les endonucléases de restriction suivantes *HindIII* et *BamHI/BgIII*. Les conditions de digestion sont choisies afin d'obtenir des fragments majoritaires de taille proche de 5 kb. L'ADN digéré est précipité avec une solution d'éthanol-acétate de sodium 0,3 M, lavé avec une solution de 70% d'éthanol (v/v), séché et repris dans un volume de tampon TE pour obtenir une concentration en ADN de 100 à 200 µg/mL. La digestion est mise en présence de T4 DNA ligase et de plasmide pUC19 (linéarisé par *HindIII*, ou *BamHI/BgIII* puis déphosphorylé) en respectant un rapport insert/vecteur de 5/1. Seules les banques dont le taux de recombinants est supérieur à 75% et contenant plus de 20 000 transformants sont retenues.

##### ii) Réalisation de banques plasmidiques de *P. pentosaceus*

L'ADN plasmidique extrait de *P. pentosaceus* (mélange de pAB10 et pAB37) est soumis à l'action d'endonucléases de restriction (*PstI* ou *HindIII*) puis il est précipité avec une solution



d'éthanol-acétate de sodium 0,3 M, lavé avec une solution de 70% d'éthanol (v/v), séché et repris dans du tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA ajusté à pH 8). Le mélange de fragments est ensuite mis en présence d'ADN ligase T4 et de plasmide pUC19 linéarisé (à *Pst*I ou à *Hind*III et déphosphorylé).

#### **b) A partir d'amplifiats PCR (cf § VI. D.)**

Les amplifiats obtenus par PCR sont analysés par électrophorèse. La bande d'intérêt est découpée et purifiée à l'aide du kit GeneClean® Turbo (Qbiogene, Illkirch, France). Le fragment est ensuite cloné dans le vecteur pGEM®-T Easy System II (Proméga, Courtaboeuf, France) en présence de T4 DNA ligase à 4°C pendant une nuit.

### **4) Transformation d'*E. coli* et sélection des transformants**

#### **a) Préparation et transformation de cellules thermocompétentes d'*E. coli***

Un erlen de 300 mL de LB estensemencé à 1% avec une préculture de nuit et incubé à 37°C sous agitation jusqu'à ce que la  $DO_{600nm}$  atteigne 0,3. Les cellules sont alors récoltées par centrifugation (5000 g pendant 15 min à 4°C), resuspendues dans 100 mL de  $CaCl_2$  50mM froid et incubées 1 heure dans la glace. Après une nouvelle centrifugation (5000 g pendant 15 min à 4°C), les cellules sont reprises dans 10 mL de  $CaCl_2$  50mM et 1,9 mL de glycérol 80% (v/v) et réparties en aliquotes de 200  $\mu$ L. Les cellules d'*E. coli* thermocompétentes sont alors soit directement utilisées pour la transformation, soit conservées à -80°C.

La transformation d'*E. coli* est réalisée par choc thermique (passage à 42°C pendant 45 sec). Les bactéries sont ensuite placées dans 800  $\mu$ L SOC à 37°C, sous agitation, pendant 1h.

#### **b) Transformation d'*E. coli* par électroporation**

##### **i) Mini-dialyse**

En vue d'une électrotransformation du mélange de ligation, une mini-dialyse est nécessaire afin d'éliminer les sels de ligation qui peuvent perturber l'électroporation. Une partie du mélange de ligation est déposée sur un filtre Type White VSWP (13 mm; porosité : 0,025  $\mu$ m, Millipore, Molsheim, France) et les sels sont éliminés par dialyse contre de l'eau ultrapure stérile pendant 30 min.

##### **ii) Préparation et transformation de cellules électrocompétentes d'*E. coli***

Un erlen de 300 mL de LB estensemencé à 1% avec une préculture de nuit et incubé à 37°C sous agitation jusqu'à ce que la  $DO_{600nm}$  atteigne 0,6-0,8. Les cellules sont alors récoltées par

**Tableau<sub>(II)</sub> II : amorces utilisées lors de cette étude.**

Ce tableau présente les amorces utilisées lors des différentes réactions de PCR, leur séquence, leur T<sub>m</sub> et le gène dont elles sont spécifiques. Les positions soulignées sont dégénérées : R : A ou T ; M : A ou C ; K : G ou T ; S : G ou C ; W : A ou T ; H : A, T ou C ; B : G, T ou C ; D : G, A ou T ; V : G, A ou C.

GB : glycine bétaine

Ces amorces sont synthétisées par QIAGEN Opéron Europe (Collogne, Allemagne)

Amorce	locus cible	Séquence	T <sub>m</sub>
PU1 PU2	gène codant l'ARN <sub>R</sub> 16S	AGAGTTT <u>G</u> ATCATGGCTCAG GGTTACCTTGT <u>T</u> ACGACTT	53,4°C 50,6°C
DnaKF DnaKR	<i>dnaK</i>	TTGGTATTGACTTAGGTACAAC GCTGAAATTTCTTGTGGTGT	52,5°C 51,3°C
PermF PermR	transporteur secondaire à GB	TGGACV <u>D</u> T <u>B</u> TTTTATTGGGCW <u>T</u> GG GAATCAG <u>H</u> W <u>G</u> AGG <u>T</u> RATAAAGAA	62,3°C 56,5°C
BUT1 BUT2 BUT3	<i>butA</i>	CAGAAGCAAGCGAGAAAAGG AGAAGCCCGAGCGCGTAAAG GCCATTCTGCACCTTAATAA	63,9°C 69,5°C 62,6°C
abc1 abc2 abc3	transporteur ABC de GB de type OpuA	G <u>A</u> RAT <u>W</u> TTTTGTTAT <u>M</u> ATGGG TTTTCD <u>A</u> A <u>W</u> AT <u>B</u> GTT <u>C</u> KAT <u>G</u> BGG GA <u>S</u> CAAAGTTTTCCAAAACCAT	52,2°C 57,7°C 56,5°C
OpuAA4D OpuAA6R	<i>opuAA</i> de <i>T. halophila</i> (pour PCR-I)	ATGGTTTTCAAATTTTGGTC GAACCAGATAGACCCATGATGA	62,5°C 56,3°C
PAB10 dir PAB10 rev	locus de pAB10 contenant le site <i>Pst</i> I	TTACGAACGCAGCAAGAAATC TGACTTCTAAATGACCGCCTT	58,6°C 58,7°C

centrifugation (5000 g pendant 15 min à 4°C) puis lavées dans 300 mL d'eau ultrapure stérile puis dans 150 mL d'eau ultrapure stérile et enfin dans 10 mL de glycérol stérile à 10% (v/v). Les cellules sont ensuite reprises dans 3 mL de glycérol stérile à 10% (v/v) et réparties en aliquotes de 100 µL. Les cellules d'*E. coli* électrocompétentes sont alors soit directement utilisées pour la transformation, soit conservées à -80°C.

L'électroporation est utilisée lorsqu'un rendement optimal est requis. Elle est réalisée avec l'appareil Gene PulserII® (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) dans des cuves de 2 mm de largeur. Les paramètres sont les suivants : 2500 V, 10 µF, 600 Ohms et génèrent un temps de passage de 5 msec. Les bactéries sont ensuite diluées avec 800 µL de milieu SOC refroidi, et incubées pendant 1h à 37°C avant d'être étalées sur milieu sélectif.

### **c) Sélection des transformants**

Les transformants sont sélectionnés par étalement sur des géloses LB contenant 50 µg/mL d'ampicilline, 40 µg/mL d'IPTG et 40 µg/mL de X-gal.

## **D) PCR (Polymerase Chain Reaction) et PCR inverse**

### **1) Conditions standard**

Le mélange réactionnel contient 2,5 µL de tampon 10X fourni, 1,25 µL de la solution de MgCl<sub>2</sub> fournie (1,25 mM final), 5 ng d'ADN matrice, 10 pmol de chacune des amorces oligonucléotidiques, 5 nmol de chacun des quatre dNTP's et 1 unité de Taq DNA Polymérase (Qbiogène, Illkirch, France). Le volume final est ajusté à 25 µL par addition d'eau qualité biologie moléculaire (Eurobio, Les Ulis, France).

Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau<sup>(II)</sup> II. La réaction est menée dans un thermocycleur "i-cycler" (Biorad, Marnes-la-Coquette, France), permettant la réalisation de gradients de températures. Le programme utilisé est le suivant : dénaturation (5 min à 94°C), 35 cycles (94°C 1 min, x°C 1 min, 72°C y min) et 72°C pendant 10 min. La température « x » est fonction des amorces utilisées et le temps « y » dépend de la longueur du fragment à amplifier (généralement 1 min 30 sec par kb à amplifier).

### **2) Conditions particulières**

#### **a) PCR sur colonies**

Le mélange réactionnel est le même que celui précisé ci-dessus, à l'exception de l'ADN, qui est remplacé par des bactéries entières, prélevées à partir de colonies sur un isolement de moins de 24h et resuspendues dans le mélange.





### **b) Oligonucléotides dégénérés**

Pour les PCR réalisées avec des oligonucléotides dégénérés (i) le mélange réactionnel est enrichi en  $MgCl_2$  (concentration doublée par rapport au mélange standard) et en oligonucléotides (concentrations quadruplées par rapport au mélange standard), (ii) un gradient de température (température d'hybridation) est réalisé afin d'obtenir des conditions d'amplification optimales.

### **c) PCR inverse**

La technique de PCR inverse est utilisée afin de cloner les régions 5' et/ou 3' de gènes dont seule la séquence centrale est connue. L'ADN génomique, digéré par une enzyme de restriction puis circularisé (cf § VI. C. 2.), sert de matrice à la PCR inverse. La quantité d'amorces est également doublée par rapport à des conditions standard.

## **E) Electrophorèses en gel d'agarose**

L'électrophorèse en gel d'agarose est utilisée afin de séparer les fragments d'ADN ou d'ARN suivant leur taille.

### **1) Electrophorèse des fragments d'ADN**

La séparation des fragments d'ADN suivant leur taille est obtenue par électrophorèse en gel d'agarose dans du tampon TBE 1X (89 mM de Tris borate, 2 mM EDTA ajusté à pH 8,3 ; Genaxis Biotechnology, Saint-Cloud, France). La concentration d'agarose (Genagarose, Genaxis Biotechnology, Saint-Cloud, France) dans le gel est comprise entre 0,7 et 1,2% (p/v). L'ajout de bromure d'éthidium permet de révéler les acides nucléiques après exposition du gel aux UV.

### **2) Electrophorèse des ARNs en conditions dénaturantes**

La qualité des ARN est estimée par électrophorèse en conditions dénaturantes. A 5,0  $\mu$ L d'échantillon d'ARN (8 à 10  $\mu$ g) sont ajoutés 2  $\mu$ L de tampon 10X (20 mM MOPS, 10 mM acétate de sodium, 10mM EDTA ajusté à pH 7 avec du NaOH), 4  $\mu$ L de formaldéhyde à 37%, 10  $\mu$ L de formamide et 1  $\mu$ L de BET. Les ARNs sont dénaturés 10 min à 65°C, refroidis 5 min dans la glace. 1/10<sup>ème</sup> de volume de tampon de charge est ajouté aux échantillons d'ARN avant dépôt dans les puits du gel.

Les ARN sont séparés en gel d'agarose-formaldéhyde 1,2% réalisé dans du tampon 1X contenant 6% de formaldéhyde (v/v).



## **F) Techniques d'hybridation ADN/ADN : Hybridation selon Southern (1975)**

### **1) Transfert sur membrane**

Des fragments d'ADN digérés par différentes enzymes de restriction sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. La dénaturation et le transfert des fragments d'ADNs sont réalisés comme décrit par Sambrook *et al.* (2001). Le transfert est réalisé par capillarité sur des membranes de nitrocellulose (Hybond N+, Amersham, Buckinghamshire, Grande Bretagne). L'ADN est ensuite fixé par passage aux UV (312 nm-1,6 kJ/m<sup>2</sup>) dans un transilluminateur Fluo-Link (Viller Lourmat, Marne-La-Vallée, France).

### **2) Marquage de la sonde et hybridation**

Les expériences d'hybridation sont menées avec le kit ECL<sup>TM</sup> direct (Amersham Buckinghamshire, Grande Bretagne) selon les instructions du fabricant. La sonde d'ADN est marquée à l'aide d'une enzyme, la peroxydase. Cette dernière est réduite en présence de son substrat : le peroxyde d'hydrogène. Cette réaction est couplée à une seconde réaction d'oxydation du luminol, détectée sur film par autoradiographie.

La membrane est préhybridée 1 heure à 42°C, puis hybridée une nuit à la même température en présence de 10 ng/mL de sonde dans du tampon d'hybridation. Après hybridation, la membrane est lavée deux fois 20 minutes à 42°C sous agitation dans une solution contenant du SDS (0,4% v/v), de l'urée (6 M) et du SSC (0,5X) puis deux fois 5 minutes dans du SSC 2X à température ambiante. Après séchage sur papier Whatman, le signal est révélé selon les instructions du fabricant et la membrane est exposée avec un film photographique dans une cassette d'autoradiographie pendant une durée qui varie selon l'intensité du signal émis.

## **G) Suivi d'expression génique par Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)**

### **1) Etape de RT**

Nous avons utilisé des réactions de RT-PCR en une seule étape (en présence d'amorces spécifiques d'un gène donné) ou en deux étapes (création d'une banque d'ADNc utilisée comme matrice pour des PCR spécifiques). L'emploi d'une méthode de RT-PCR en deux étapes permet de suivre simultanément l'expression de plusieurs gènes à partir d'une même banque d'ADNc (et donc de comparer de façon plus fiable leur situation d'induction/répression en fonction du stress appliqué).

L'étape de RT-PCR en une étape est réalisée à l'aide du kit Access RT-PCR système<sup>TM</sup> (Proméga, Courtaboeuf, France).

**Tableau<sup>(11)</sup> III : adresses des sites Internet utilisés pour accéder aux génomes des bactéries lactiques étudiées (génomé séquencé ou en cours de séquençage).**

Microorganismes	Adresse internet
<i>Lc lactis</i> IL1403	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi/bin/Entrez/framik?db=Genome&amp;gi=171">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi/bin/Entrez/framik?db=Genome&amp;gi=171</a>
<i>Lb. plantarum</i> WCFS1	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi/bin/Entrez/framik?db=Genome&amp;gi=276">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi/bin/Entrez/framik?db=Genome&amp;gi=276</a>
<i>Ent. faecalis</i> V583	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi/bin/Entrez/framik?db=Genome&amp;gi=292">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi/bin/Entrez/framik?db=Genome&amp;gi=292</a>
<i>P. pentosaceus</i> ATCC25745	<a href="http://www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/pediococcus/pedioc_mainpage.html">http://www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/pediococcus/pedioc_mainpage.html</a>
<i>O. oeni</i> PSU1	<a href="http://www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/oenococcus/oenoc_mainpage.html">http://www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/oenococcus/oenoc_mainpage.html</a>
<i>Leu. mesenteroides</i> ATCC8293	<a href="http://www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/pediococcus/pedioc_mainpage.html">http://www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/pediococcus/pedioc_mainpage.html</a>

Lorsque des procédures à deux étapes sont nécessaires le kit Reverse-iT™ 1st Strand Synthesis Kit (ABgene, Surrey, Grande Bretagne) a été utilisé. Ce choix a été déterminé en fonction de la taille des amorces aléatoires présentes, des décamères, qui assurent une plus grande taille et homogénéité des ADNc synthétisés, par rapport à l'utilisation d'amorces plus courtes (hexa et nonamères) présentes dans d'autres kits.

## **2) Protocole de suivi d'induction en situation de stress (RT-PCR en deux étapes)**

Le suivi de l'expression d'un gène en fonction de l'intensité du stress nécessite de vérifier que des quantités identiques des différentes banques d'ADNc (non induite, induites) seront analysées en PCR. Pour cela, une PCR ciblant l'ADN<sub>R</sub>16S est réalisée sur les différentes banques d'ADNc. Les quantités donnant des amplifiats d'intensités identiques sont ensuite soumises aux PCR spécifiques.

Lorsque l'expression de deux (ou plusieurs) gènes doit être comparée dans une même situation de stress, un niveau de contrôle supplémentaire sera rajouté. Dans ce cas, il est en effet impératif de vérifier que les PCRs spécifiques des différents gènes ont les mêmes efficacités. Ceci peut être démontré en choisissant des amorces générant des amplifiats de taille proche et obtenant des intensités semblables lors des différentes PCRs spécifiques réalisées à partir d'un même échantillon d'ADN génomique.

## **H) Séquençage de l'ADN et traitements informatiques**

Les séquences nucléotidiques sont déterminées par la société Genome-Express (Grenoble, France) selon la technique enzymatique décrite par Sanger (1977).

L'analyse informatique de ces séquences est faite grâce à l'aide du logiciel Vector NTI® (Informax, Bethesda, MD, Etats Unis) et des programmes BLAST et CLUSTAL.

Les séquences des génomes complets ou partiels sont disponibles sur l'internet aux adresses indiquées dans le tableau<sub>(II)</sub> III.



PARTIE 3 :  
RESULTATS & DISCUSSION





La thématique « contraintes technologiques et bactéries lactiques » a été initiée au sein de l'Unité Sécurité Microbiologique des Aliments en 1999 par l'étude de la réponse au stress salin chez *Tetragenococcus halophila* ATCC33315 (Robert, 2000).

Dans une première partie de cette thèse, l'étude des modalités d'accumulation de GB par *T. halophila* a été poursuivie en caractérisant l'ORF codant ButA et en continuant le clonage du locus *opuA*. La régulation de l'expression des gènes codant ButA et OpuA en fonction de l'osmolarité extérieure a ensuite été évaluée. La capacité d'osmoadaptation de *T. halophila* a alors été comparée avec celle de *Pediococcus pentosaceus* et d'autres bactéries lactiques. Ces résultats font l'objet de deux articles scientifiques joints.

Dans les parties suivantes, nous nous sommes attachés à étudier quelques aspects de la réponse générale au stress chez *P. pentosaceus* en mettant en évidence (i) les interrelations existant entre les réponses à différents stress, (ii) la participation putative des plasmides natifs de cette souche dans la réponse aux stress.



**CHAPITRE I : REPONSE SPECIFIQUE AU STRESS SALIN : MODALITES  
D'ACCUMULATION D'OSMOPROTECTANTS CHEZ LES BACTERIES LACTIQUES  
*TETRAGENOCOCCUS HALOPHILA* ET *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS***

**I) EQUIPEMENT DE *T. HALOPHILA* EN TRANSPORTEURS DE GB**

**A) Situation des travaux en début de thèse**

*Lactococcus lactis* a longtemps été présentée et utilisée comme bactérie lactique modèle dans l'étude de la réponse au stress, et à la contrainte osmotique en particulier. Aujourd'hui, les tendances observées en matière de régulation doivent être comparées chez d'autres bactéries lactiques, et particulièrement chez les espèces trouvées dans des environnements radicalement différents (voir revue van de Guchte *et al.*, 2002). C'est le cas de *T. halophila*, seule bactérie lactique modérément halophile [optimum de croissance entre 0,4 M et 0,8 M NaCl selon Kushner (1978)], qui est utilisée dans l'élaboration de sauces de soja, de saumures d'anchois ou de purée de soja.

L'étude de la réponse à la contrainte hyper-osmotique chez cette bactérie a été initiée au laboratoire en 1999 (Robert, 2000 ; Robert *et al.*, 2000). En milieu riche (MRS), la bactérie se développe en présence de fortes concentrations salines, jusqu'à 3,2 M NaCl. L'optimum de croissance est situé entre 0,6 et 0,8 M NaCl. La bactérie est également capable de se développer en milieu chimiquement défini (DM) et ceci en l'absence de composés connus pour leur activité osmoprotectrice. Dans le milieu DM, *T. halophila* montre également une bonne tolérance au sel. La croissance est obtenue jusqu'à 1,4 M NaCl et l'optimum est situé entre 0,4 M et 0,8 M NaCl (Robert *et al.*, 2000).

En situation de contrainte hyper-osmotique, aucune activité de synthèse endogène d'osmoprotectants n'a lieu. *T. halophila* accumule un large spectre de solutés compatibles à partir de son milieu de culture. Leur nature a été définie en démontrant l'aptitude de chaque molécule à restaurer la croissance sur une large gamme d'osmolarités et en montrant que chacune d'entre elles est accumulée à l'intérieur de la cellule. Ces expériences ont été menées en milieu DM, dépourvu de solutés compatibles, contrairement au MRS qui est source de GB et de carnitine notamment. Robert *et al.* (2000) ont ainsi montré que le spectre d'osmoprotectants comporte les ammonium quaternaires suivants : la GB, la carnitine, la choline, le DMSA, le DMSP, ainsi que l'ectoïne. Ces molécules améliorent la croissance pour des stress d'intensité moyenne et permettent une croissance à forte salinité d'autre part. En situation de contrainte osmotique, l'accumulation de GB et de carnitine supprime l'accumulation de glutamate et de proline, observée en situation basale. Dès les années 1960, ces deux composés (la GB et la carnitine) étaient déjà décrits comme ayant un effet



bénéfique sur la croissance de *T. halophila* (Sakaguchi, 1960 et 1962). Cependant ces auteurs proposaient un rôle de facteur de croissance pour ces molécules.

En situation de contrainte hyper-osmotique, *T. halophila* se développe en présence d'une large gamme de molarité en NaCl. La concentration intracellulaire en Na<sup>+</sup> est alors corrélée aux aptitudes de la bactérie à se développer dans un milieu salé. Elle est basse pour les molarités en NaCl permettant la croissance. Elle est élevée (4 à 10 fois plus) aux deux extrêmes ne permettant pas la croissance (0 M et 2 M NaCl). L'accumulation de GB ou de carnitine favorise le maintien d'une faible concentration en Na<sup>+</sup> et étend ainsi la gamme de molarités pour laquelle la croissance peut s'opérer. Ce phénomène est probablement rendu possible par l'existence de système(s) d'expulsion des ions Na<sup>+</sup> (Robert *et al.*, 2000).

Les voies d'accumulation de GB, l'osmoprotectant le plus efficace, ont été étudiées plus spécifiquement. Une première voie d'import de choline puis d'oxydation du composé en GB a été décrite. Cette activité est osmorégulée (par activation et/ou induction). La GB est également accumulée, telle qu'elle, par transport. Cette activité globale de transport de GB n'est pas osmorégulée (pas d'induction, pas ou très peu d'activation). Le transport de la GB est assuré par au moins deux systèmes : un système spécifique et un second capable de transporter également la carnitine et la choline. Le premier système pourrait correspondre à la perméase ButA (pour Betaine Uptake in *T*etragenococcus) dont le gène a été cloné par complémentation fonctionnelle d'un mutant d'*E. coli* dépourvu en systèmes de transport de GB (et de choline). Le second système pourrait, quant à lui, correspondre à un transporteur de type OpuA/BusA. En effet, un fragment partiel (216 pb) correspondant à une zone conservée des ATPases des systèmes OpuA de bactérie à Gram positif est présent dans le génome de *T. halophila*.

## B) Orientation des travaux

Les travaux menés durant cette thèse ont consisté à :

- ✓ compléter la caractérisation de la perméase ButA (i) en définissant le cadre ouvert de lecture du gène *butA* (deux codons d'initiation possibles de la traduction étant présents dans l'ORF de 2392 pb définie par Robert, 2000), (ii) en vérifiant la spécificité de ce transporteur chez *T. halophila*, (iii) en déterminant si le gène *butA* est régulé au niveau transcriptionnel par l'osmolarité du milieu extérieur chez *T. halophila* ;



- ✓ confirmer la présence d'un système de transport de GB de type OpuA/BusA en poursuivant le clonage de l'opéron et en étudiant sa possible régulation par l'osmolarité extérieure chez *T. halophila* ;
- ✓ évaluer la présence d'un troisième transporteur de GB *T. halophila*.

### C) Résultats (résumé de l'article n°1)

#### 1) Caractérisation de ButA

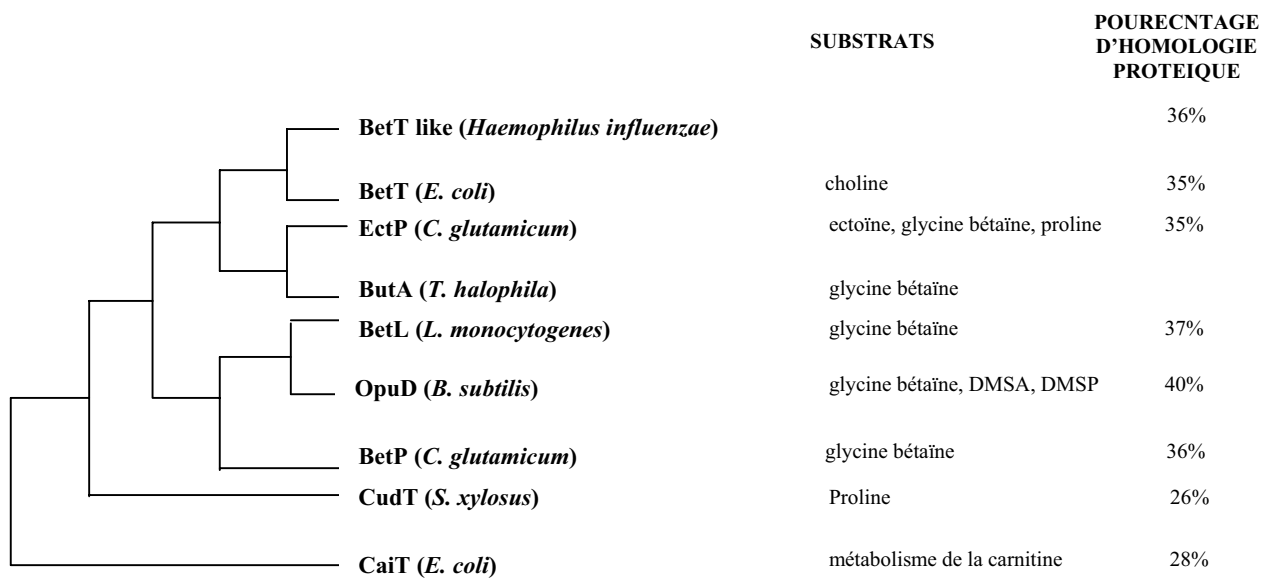
##### a) Définition du cadre ouvert de lecture du gène butA

Un fragment de 4 kb (*HindIII*<sub>1</sub>-*HindIII*<sub>2</sub>) du génome de *T. halophila* cloné dans le vecteur pUC19 (pA<sub>2</sub>) contient un gène dont le produit assure le transport de GB chez *E. coli* MKH13 (déficient en transporteur). La carte de restriction de ce fragment a été réalisée. Des délétions ont permis de localiser une des extrémités de l'ORF dans le sous fragment *PstI*-*HindIII*<sub>2</sub> de 0,4 kb. Afin de localiser l'autre extrémité de cette ORF, nous avons réalisé des délétions progressives à partir de l'extrémité opposée de l'insert grâce au kit Erase-a-base®. Le plus petit insert portant un gène fonctionnel (plasmide pA<sub>262</sub> capable de compléter *E. coli* MKH13) a une taille de 2,4 kb. La séquence nucléotidique de ce fragment (2392 pb) a révélé un cadre ouvert de lecture (dans le sens *HindIII*<sub>1</sub>→*HindIII*<sub>2</sub>), présentant deux codons d'initiation possibles : un ATG et un TTG. L'analyse d'autres constructions obtenues avec le système Erase-a-base® a permis de sélectionner deux plasmides pA<sub>223</sub> et pA<sub>224</sub> (taille de l'insert légèrement inférieure à 2,4 kb). Leur séquençage a montré que pA<sub>223</sub> contient le cadre ouvert de lecture pourvu des deux codons d'initiation potentiels, tandis que pA<sub>224</sub> contient le cadre ouvert de lecture présentant uniquement le codon ATG. L'identification du codon d'initiation de la traduction de *butA* a été réalisée en sous-clonant les « inserts » de pA<sub>223</sub> et pA<sub>224</sub> dans les vecteurs pBluescript M13 KS et SK. Le gène *butA* est alors sous le contrôle d'un promoteur *lac* inductible par l'IPTG (ceci dans les constructions à orientation SK uniquement). Des expériences de restauration de croissance en condition de stress osmotique ont permis de montrer que chez *E. coli* MKH13, le gène *butA* débute par le codon ATG.

Cette hypothèse a été vérifiée chez *T. halophila* en réalisant des essais de RT-PCR sur un extrait d'ARNs totaux.

##### b) ButA : une perméase de type BCCT spécifique de la GB

Le cadre ouvert de lecture de 1826 pb code la protéine ButA de 608 aa (masse moléculaire calculée de 66,8 kDa). Sa séquence protéique présente de fortes homologues avec les différents membres de la famille BCCT : OpuD de *B. subtilis*, BetL de *L. monocytogenes*, BetP de



**Figure<sub>(III)</sub> 1 : arbre phylogénétique consensus des transporteurs BCCT (réalisé avec le programme PHYLIP/FITCH avec une valeur de bootstrap de 50).**



*C. glutamicum*, BetT d'*E. coli* et EctP de *C. glutamicum*, CudT de *Staphylococcus xylosus*, CaiT d'*E. coli*, BetT-like de *Haemophilus influenzae* (Figure<sub>(III)</sub> 1).

Comme tous les transporteurs BCCT, ButA s'organise en douze segments transmembranaires. L'homologie avec les autres membres de la famille BCCT est particulièrement forte au niveau du huitième segment transmembranaire qui pourrait être impliqué dans la fixation du substrat et sa translocation à travers la membrane (présence d'un motif signature WTLFYWAWW) (Saier *et al.*, 1999). Les extrémités C- et N-terminales sont quant à elles peu conservées.

Des essais de restauration de croissance réalisés en contrainte saline chez l'hôte hétérologue *E. coli* MKH13 contenant le plasmide pA<sub>2</sub> (porteur du gène *butA*) ont montré que ButA ne transporte aucun des autres osmoprotectants décrits chez *T. halophila*. Ceci a été vérifié en n'observant aucune inhibition de transport de GB radioactive en présence d'autres osmoprotectants non radioactifs. La perméase ButA est donc spécifique de la GB

### c) Expression de *butA* en fonction de l'osmolarité chez *E. coli*

La régulation du gène *butA* a été étudiée chez *E. coli* grâce à la réalisation d'une fusion *butA* :: *uidA* (Robert, 2000). Ces travaux ont indiqué que l'expression de *butA* est constitutive, sans exclure une possible faible induction par l'osmolarité.

Ces travaux constituent la première caractérisation d'une perméase jouant un rôle dans l'osmorégulation et l'accumulation de GB chez les bactéries lactiques. Les résultats détaillés de cette étude sont présentés dans l'article « Isolation and Characterization of ButA, a secondary glycine betaine transport system operating in *Tetragenococcus halophila* » paru dans la revue *Current Microbiology*.



## Isolation and Characterization of ButA, a Secondary Glycine Betaine Transport System Operating in *Tetragenococcus halophila*

Aurélie Baliarda,<sup>1</sup> Herve´ Robert,<sup>1,2</sup> Mohamed Jebbar,<sup>3</sup> Carlos Blanco,<sup>3</sup> Claire Le Marrec<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unite´ Sécurité Microbiologique des Aliments, ISTAB, Université Bordeaux I, Avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France

<sup>2</sup>COBIOTEX, Parc scientifique UNITEC 1, Allée du Doyen Brus, 33600 Pessac cedex, France

<sup>3</sup>De´partement Osmorégulation chez les bactéries, Campus de Beaulieu, Université Rennes I, UMR-CNRS 6026, 35042 Rennes, France

Received: 19 November 2002/Accepted: 19 December 2002

**Abstract.** Through functional complementation of an *Escherichia coli* mutant defective in glycine betaine uptake, we identified a single-component glycine betaine transporter from *Tetragenococcus halophila*, a moderate halophilic lactic acid bacterium. DNA sequence analysis characterized the ButA protein as a member of the betaine choline carnitine transporter (BCCT) family, that includes a variety of previously characterized compatible solute transporters such as OpuD from *Bacillus subtilis*, EctP and BetP from *Corynebacterium glutamicum*, and BetL from *Listeria monocytogenes*. When expressed in the heterologous host *E. coli*, the permease is specific for glycine betaine and does not transport the other osmoprotectants previously described for *T. halophila* (*i.e.* carnitine, choline, dimethylsulfonioacetate, dimethylsulfoniopropionate, and ectoine). In *E. coli*, statement of ButA is mainly constitutive and maximal uptake activity may result from a weak osmotic induction. This is the first study demonstrating a role for a permease in osmoregulation, and GB uptake, of a lactic acid bacterium.

In the lactic acid bacteria family (LAB), quaternary ammonium compounds, and especially glycine betaine (GB), are physiologically the most relevant molecules for osmoprotection [8, 13, 15, 18]. Accumulation of GB is achieved by transport from the medium rather than by *de novo* synthesis by the cell. While much information regarding the physiological characterization of the GB transport is available, genetic analysis of the uptake systems remains scarce. The only transporter so far characterized at a molecular level is a high-affinity ATP-binding cassette (ABC) system described as BusA and OpuA in *Lc. lactis* subsp. *cremoris* NCDO763 and MG1363, respectively [4, 13]. Disruption of the first gene in this operon abolished protection by GB against elevated osmolarity [4, 13]. More detailed study of 34 *Lc. lactis* subsp. *lactis* and *cremoris* strains confirmed that a defect in tolerance to high osmolarity could be related to the activity of BusA [14]. Similarly, research by Glaasker *et al.* [8] have also provided physiological evidence for an ATP-driven uptake of GB in *Lb. plantarum*, which is believed to be mediated by a single binding-protein-dependent system named QacT (quaternary ammonium compound

transporter). Taken together, these data demonstrate that (i) there is a main (if not unique) system contributing to the accumulation of GB and protecting both LAB against hyperosmotic stress and (ii) that this major system is a member of the ABC transporter superfamily. Recently, we described the physiological characterization of the accumulation of GB from the external medium by *T. halophila* [18]. This lactic acid bacterium is frequently associated with Japanese soy sauce brewing, or fermented food and is characterized by specific nutritional requirements [18]. This work demonstrated the existence of at least two GB carriers, contributing to the overall capacity of the bacteria to take advantage of GB available in its environment: the first system transports GB only, and the second also transports the betaines choline and carnitine [18]. This communication reports the cloning and characterization of the *butA* gene, encoding a permease specific for GB.

### Materials and Methods

**Bacterial strains and vectors.** Cloning of putative GB transporters from *T. halophila* ATCC 33315 was carried out by functional complementation of the *E. coli* mutant strain MKH13 [9]. The *E. coli* strains NM522 or MC4100 were used for the hosts of recombinants made by pUC19 [25] or pBluescript M13 (+) (Stratagene).

Correspondence to: C. Le Hénaff-Le Marrec; [Email: c.lehenaff@yahoo.fr](mailto:c.lehenaff@yahoo.fr)



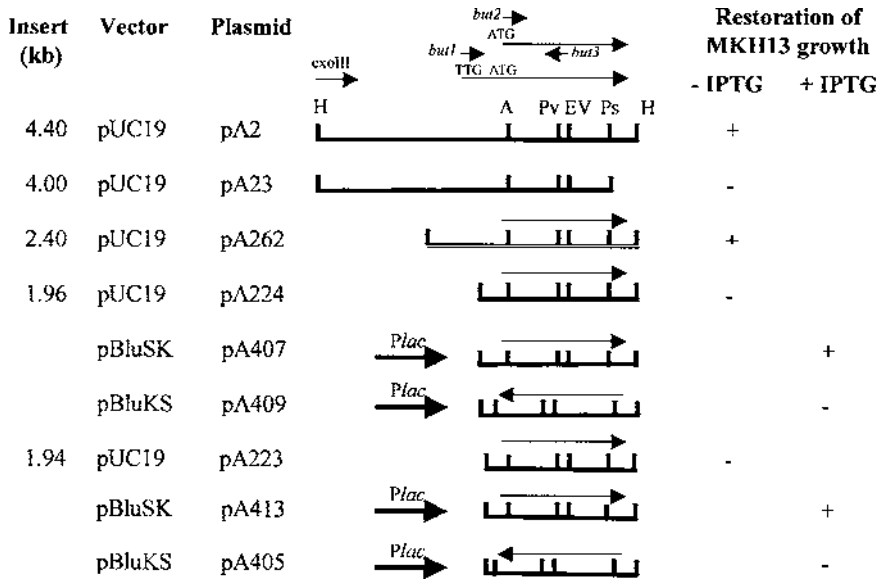


Fig. 1. Graphic illustration of the cloned fragment of *T. halophila* genomic DNA and constructs mentioned in the text. Deletion derivatives were constructed using the internal *Pst*I site, or the exonuclease III. A, *Ava*I; EV, *EcoRV*; H, *Hind*III; Ps, *Pst*I; Pv, *Pvu*I.

**Media, culture conditions, and transport assays.** *E. coli* cells were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) broth with shaking. *T. halophila* was routinely grown in MRS (Difco), pH 7.5, supplemented with 0.8 M NaCl. When required, the defined medium DM was used [18]. Where indicated L-carnitine, choline, GB (Sigma), ectoine, and DMSA, prepared as described previously [15], were added to DM as filter sterilized solutions to a final concentration of 2 mM. Uptake studies and cross-competition experiments were done as described previously [15, 18].

**DNA manipulations, sequencing, and computer analysis.** A *Hind*III genomic bank of *T. halophila* was constructed in the pUC19 vector and transferred by transformation into strain *E. coli* MKH13 following standard procedures [21]. Clones were selected on LB medium containing ampicillin (50 µg ml<sup>-1</sup>). Approximately 2 X 10<sup>4</sup> colonies were replica-plated on M63 minimal medium containing 0.4% glucose, 0.7 M NaCl, and 2 mM GB. Colonies of *E. coli* containing recombinant plasmids were grown overnight in LB medium supplemented with ampicillin. Plasmid DNA and restriction fragments were isolated with the QIAprep spin miniprep kit and the Qiaex II gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), respectively. Bases were deleted from cloned fragments using the Erase-a-Base System (Promega, Courta boeuf, France). Genomic DNAs were isolated according to Luchansky *et al.* [12]. Southern blot hybridizations were performed using Hy bond-N- nucleic transfer membranes (Amersham, Orsay, France), and the DIG-High Prime DNA labelling kit (Roche Applied Science, Mey lan, France).

The UIDK1 cassette containing a promoterless *uidA* gene [2] was used to generate a transcriptional fusion in *butA*. The *uidA*-Km cassette of pUIDK1 (Ap<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>) was released by *Sma*I and ligated to *EcoRV*-digested pA2. The corresponding plasmid named pA2-GUS was transformed into *E. coli* MC4100, and Ap<sup>R</sup> Km<sup>R</sup> resistant *uidA*~ clones were selected. Localization and orientation were confirmed by restriction analysis. β glucuronidase activity was measured as described previously [2]. Specific activity was expressed as nanomoles of *p*-nitrophenol liberated by minute per mg of proteins. Protein content was determined by the Bradford method [5]. Experiments to drive transcription of *butA* under the control of the IPTG-inducible *Plac* were carried out using plasmids pA407, pA409, pA413, and pA405. Briefly, exonuclease III treatment of *Sac*I-*Xba*I di-

gested pA2 yielded plasmids pA223 and pA224. Corresponding deleted inserts (1.94 and 1.96 kb, respectively) were subcloned as *Eco*RI-*Hind*III fragments in phagemid pBluescript M13 (+) SK yielding pA413 and pA407, respectively, and in pBluescript M13 (+) KS, yielding pA405 and pA409, respectively (Fig 1).

Nucleotide sequencing with pUC19 templates was accomplished by Genome Express (Grenoble, France). Computer-assisted nucleotide and protein sequence analyses were done with the Vector NTI<sup>®</sup> Suite program (InforMax, Bethesda, Md). For sequence homology searches, the EMBL data bank program BLASTX was used. Amino acid se quences were aligned with the CLUSTAL W program [24].

**Isolation of total RNA from *T. halophila* and RT-PCR.** Cells were grown in MRS supplemented with 0.8 M NaCl. Total RNA was extracted from exponentially growing cells as previously described [6]. To remove any contaminating DNA during RT-PCR experiments, 1 µg of total RNA was incubated with 1 U of RQ1 RNase-free DNase (Promega). Residual DNase was inactivated at 80°C for 10 min. An aliquot of diluted DNase-treated RNA (approximately 5 X 10<sup>3</sup> pg) was subjected to reverse transcription and PCR using the Access RT-PCR System (Promega). The antisense oligonucleotide but3 (5'-GCCCCAT-TCCTGCACCTTAATAA-3') was used in combination with either primer but1 (5'-CAGAAGCAAGCGAGAAAAGG-3') or but2 (5'-AGAAGCCCGAGCGGTAAAG-3'), both located in the 5' region of the *butA* gene (Fig. 1). The sets of primers but1-but3 and but2-but3 used on genomic DNA yielded fragments of 0.5 and 0.4 kb, respec tively (data not shown). As a control, a RT-PCR reaction was per formed where AMV reverse transcriptase was omitted, to check for any DNA contamination.

**Nucleotide accession number.** The sequence reported here has been deposited in the EMBL database under accession number AY254894.

**Results and Discussion**

**Cloning of a GB transporter from *T. halophila*.** Four clones were selected by functional complementation of *E. coli* MKH13 from approximately 2 x 10<sup>4</sup> clones. The



corresponding plasmids were isolated, transformed in *E. coli* MKH13 and tested again for complementation. Restriction analysis revealed they all contained the same *Hind*III insert. One such plasmid was designated pA2, and further characterized. Southern blot hybridization analysis showed that pA2 contained a 4.4 kb *Hind*III fragment of *T. halophila* chromosome and that no rearrangements had occurred (data not shown). Osmoprotection by GB requires the intracellular accumulation of this compound. We therefore measured the initial  $^{14}\text{C}$ -GB uptake in cultures of strain MKH13 (pA2) grown in DM-0.4 M NaCl, at a final substrate concentration of 10  $\mu\text{M}$ . The  $^{14}\text{C}$ -GB uptake activity was calculated to be 0.4 nmol/min/mg (dry weight). Thus, plasmid pA2 encodes an uptake system for GB from *T. halophila*. Apart from GB, other molecules (i.e. carnitine, choline, DMSA, DMSP, and ectoine) have also been described as potent osmoprotectants in *T. halophila* [1, 18]. Unlike GB, these molecules were not able to restore growth to *E. coli* MKH13 (pA2) grown in M63 with 0.7 M NaCl. In low osmolarity DM (0.4 M NaCl), no transport activity was observed in the presence of the labeled osmoprotectants DMSA, DMSP, choline, and carnitine (10  $\mu\text{M}$ ) (data not shown). The specificity of the carrier system was further studied by observing the initial rates of  $^{14}\text{C}$ -GB uptake in the presence of a 100-fold excess unlabelled choline, carnitine, ectoine, DMSA, or DMSP, the assay medium containing 0.4 M NaCl. The uptake of  $^{14}\text{C}$ -GB was not inhibited by choline and ectoine (8 and 4%, respectively). Competitions of DMSA (33%) and carnitine (25%) for  $^{14}\text{C}$ -GB uptake were noted. Since no transport activity was observed for these compounds, the observed inhibition is suggested to result from a non specific binding to the carrier system. Cumulatively, these results indicate that the cloned insert encodes the system specific for GB transport observed previously in *T. halophila* [18]. The corresponding gene was further named *butA* (for Betaine Uptake in *Tetragenococcus*) and the gene product, ButA protein. Hybridization studies using the *butA* cloned fragment from *T. halophila* as a probe demonstrated the absence of any homologous gene in the chromosome of *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *E. faecalis*, *P. acidilactici*, and *P. pentosaceus* (data not shown), although most of these strains were also demonstrated to accumulate GB under osmotic constraint [1, 8, 15].

**Nucleotide sequence of the *butA* gene.** A number of deletion derivatives were constructed and electrotransformed in *E. coli* MKH13 (Fig. 1). A minimal fragment of approximately 2.4 kb carried on pA262 was sufficient to complement *E. coli* MKH13 (Fig. 1). Determination of the DNA sequence of the 2,392-bp corresponding insert re-

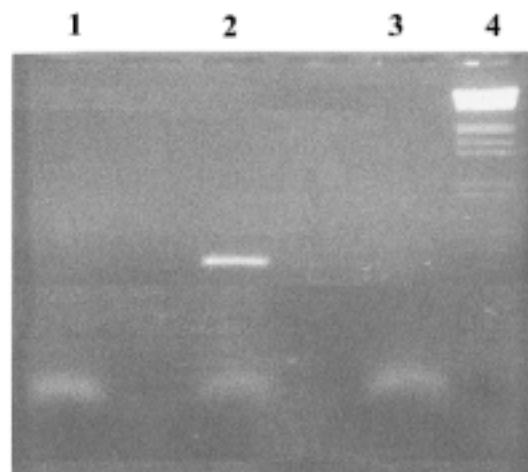


Fig. 2. RT-PCR of the *butA* region from *Tetragenococcus halophila*. Total RNA was purified from cells grown in MRS supplemented with 0.8 M NaCl. Lane 1, negative control (where reverse transcriptase was omitted) with but2–but3; lane 2, reaction with but2–but3; lane 3, reaction with but1–but3; and lane 4, RNA molecular weight marker (Promega).

vealed a G+C content of 37.1 mol%, which is typical of published *T. halophila* DNA sequences [23]. Computer-assisted analysis revealed an open reading frame (ORF) with two possible start sites, one TTG (position 343) and one ATG (position 469) (Fig. 1). Only the TTG start codon was preceded by a putative ribosome binding site (5'-AAAGGA-3'), complementary to the 3' extremity of the 16S rRNA from *Lb. plantarum* (3'-UUUCCUCCA-5') (underlined). However, based on the multiple alignments, the ATG codon must be the translation start *in vivo* (see above). To address this question in more detail, the two non-complementing derivatives, pA223 and pA224, which carry only the ATG codon were used (Fig. 1). The corresponding *Eco*RI-*Hind*III inserts were subcloned in pBluescript M13 (+) SK and KS, carrying the *lacI* gene (Fig. 1). The transporter gene was under the control of the IPTG-inducible *lac* promoter in the "SK" orientation. Complementation of the MKH13 mutant was obtained after IPTG induction for both "SK" constructs and not with "KS" constructs. These results strongly favor the use of the ATG codon in *E. coli*. The use of this particular translation site was further demonstrated in *T. halophila* by RT-PCR experiments. The forward primers but1 and but2, located downstream from the TTG and ATG codons, respectively, were used in combination with the antisense oligonucleotide but3, internal to *butA* (Fig. 1). Total RNA was extracted from *T. halophila* cells grown in MRS in the presence of 0.8 M NaCl and subjected to RT-PCR. An amplicon of the expected size (0.4 kb) was obtained with primers but2 and but3 while the reaction using but1 and but3 yielded no product (Fig. 2). This result clearly shown that TTG is not





present in *butA* mRNA and that the transcription start is located between *but1* and *but2* sequences.

Upstream of the ORF, the potential promoter sequence 5'-AGATCA (16) TTGAAT-3' (deviations underlined) was identified, which resembles the *xyl* promoter from *T. halophila* 5'-TGGACA (17) TAGAAT-3' [23]. The position of this putative sequence is consistent with the RT-PCR results described above, which located the +1 transcription initiation site between the *but1* sequence and the ATG codon. This hypothesis is also supported by the non-complementing phenotype observed for plasmids pA223 and pA224, both of which lack the proposed promoter sequence. Downstream of *butA* (between positions 2,309 and 2,364), a potential *rho*-independent transcription termination signal ( $\Delta G$  of -38.4 kcal) was identified.

**The ButA permease is a new member of the BCCT family.** The *butA* gene encodes a 608-residue protein with a calculated molecular mass of 66.8 kDa and a pI of 4.96. Eight members of the Betaine Choline Carnitine Transporter (BCCT) family exhibited a high amino acid sequence identity (>25%) with the *T. halophila* ButA sequence. These proteins, found in Gram positive and Gram negative bacteria, are specific for compounds containing a quaternary nitrogen atom, and form a separate subfamily in the sodium/solute/symporter superfamily (SSSS) [20]. The transporters mentioned above include OpuD from *B. subtilis* [10] (40% identity), BetL from *L. monocytogenes* [22] (37%), BetP from *C. glutamicum* [16] (36%), BetT from *E. coli* [11] (35%), EctP from *C. glutamicum* [17] (35%), CudT from *Staphylococcus xylosus* [19] (28%), CaiT from *E. coli* [7] (26%), and the product of a BetT-like protein from *Haemophilus influenzae* [20] (36%). Like all members of the BCCT family, ButA is predicted to be an integral membrane-bound protein containing 12 putative transmembrane segments (TMSs). Multiple alignments of the nine proteins mentioned above showed a high degree of relatedness over the length of these 12 TMSs. In particular, the eighth segment and the connecting loop to the ninth segment are highly conserved. It harbors the signature sequence WTLFYWAWW which is proposed to be involved in the binding of the trimethylammonium substrate and translocation across the membrane [20]. Interestingly, both amino and carboxyl parts are poorly conserved.

**Osmotic activation and induction of ButA-mediated GB transport in *E. coli*.** We previously observed no effect of chloramphenicol on the global transport of GB elicited by osmotic stressing *T. halophila*, while a slight activation of the transport of GB was suggested [18]. In this study, osmotic activation and induction of ButA-mediated GB transport were studied in *E. coli*. No stim

Table 1. Effect of medium osmolarity and glycine betaine on *butA* expression in *E. coli*. Strain MC4100 transformed with plasmid pA2GUS was cultured in M63 medium with ampicillin. Overnight cultures were diluted in the same medium. At the end of the exponential phase, indicated amounts of NaCl were added and  $\beta$ -glucuronidase activity was assayed 150 min after the osmotic upshift and is expressed in nanomoles of *p*-nitrophenol liberated per minute and per milligram of proteins. Results are the means of three assays (standard deviation did not exceed 10% of the mean)

[NaCl] (M)	Osmoprotectant	$\beta$ -glucuronidase activity (nmol/min/mg protein)
0	None	250
0.4 M	None	700
0.4 M	Glycine betaine 2 mM	450

ulation of the rate of GB uptake was observed after exponentially growing cells of strain *E. coli* MKH13 (pA2) were subjected to a sudden osmotic upshock (data not shown). The transcriptional regulation of permease expression was analysed in *E. coli* MC4100 (pA2-GUS) whose plasmid carries a *butA::uidA* transcriptional fusion. Expression was observed in the absence of osmotic constraint (Table 1), which is consistent with our RT PCR experiments carried out in *T. halophila* at optimal growth (0.8 M NaCl). Maximal reporter activity was observed between 0.4 M and 0.6 M NaCl and corresponded to a 2.5-fold increase compared to that observed in the absence of NaCl (Table 1). The measured activity increased immediately after an upshift to 0.4 M NaCl and remained constant for at least seven hours (Table 1). Addition of GB reduced the level of induction, the activity representing 60% of the maximal level observed in the absence of the osmoprotectant (Table 1). Hence, the *butA* sequence upstream from the internal *EcoRV* site contains a promoter sequence that is expressed and poorly sensitive to osmolarity in *E. coli*. Such results also suggest that osmoregulatory signals and effectors are conserved within *E. coli* and *T. halophila*. From these experiments it was concluded that statement of ButA is mainly constitutive and that maximal uptake activity may result from a weak osmotic induction.

## Conclusion

The identification of ButA from *T. halophila* as a BCCT system is original compared to previous reports on the LAB *Lc. lactis* and *Lb. plantarum*, where uptake of GB depends exclusively on the activity of an ABC transporter [4, 8, 13]. The absence of sequences homologous to *butA* in *Lc. lactis* is consistent with the analysis of the



recently published genome sequence of strain IL 1403 [3]. In the moderate halophilic *T. halophila*, ButA represents one of the component of the overall betaine uptake activities in response to salt stress [18]. *Tetragenococcus* is characterized by a resistance to electroporation or other transformation procedures. Hence, in that no mutants with defects in the glycine betaine transporters can be easily obtained and further characterized, it is difficult to evaluate the number and the structural diversity of systems involved in the accumulation of GB, and then to assess the individual contribution of each to osmoprotection in *T. halophila*. Using an alternative PCR strategy, we cloned a fragment that corresponds to a highly conserved amino acid sequence present in the OpuA ABC transporters from different Gram positive bacteria, including *Lc. lactis*, *L. monocytogenes*, and *B. subtilis*. Complete characterization of this component (nucleotide sequence, spectrum of compatible solutes, osmotic regulation) is in progress and will help understanding the overall mechanisms of the salt tolerance of *T. halophila*.

#### ACKNOWLEDGMENTS

A.B. is supported by a grant from the Conseil Régional Aquitaine.

#### Literature Cited

- Baliarda A, Robert H, Jebbar M, Blanco C, Deschamps A, Le Marrec C (2002) Potential osmoprotectants for the lactic acid bacteria *Pediococcus pentosaceus* and *Tetragenococcus halophila*. *Int J Food Microbiol* (in press)
- Bardonnet N, Blanco C (1992) *uidA*-antibiotic-resistance cassettes for insertion mutagenesis, gene fusions and genetic constructions. *FEMS Microbiol Lett* 93:243–248
- Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malarme K, Weisenbach J, et al. (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* 11:731–753
- Bouvier J, Bordes P, Romeo Y, Fourcans A, Bouvier L, Gutierrez C (2000) Characterization of OpuA, a glycine-betaine uptake system of *Lactococcus lactis*. *J Mol Microbiol* 2:199–205
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye blue. *Anal Biochem* 72:248–254
- Cavin JF, Barthelmebs L, Divies C (1997) Molecular characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: Gene cloning, transcriptional analysis, over-expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization. *Appl Environ Microbiol* 63:1939–1944
- Eichler K, Bourgis F, Buchet A, Kleber HP, Mandrand-Berthelot MA (1994) Molecular characterization of the *cai* operon necessary for carnitine metabolism in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 13:775–786
- Glaasker E, Heuberger EH, Konings WN, Poolman B (1998) Mechanism of osmotic activation of the quaternary ammonium compound transporter (QacT) of *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* 180:5540–5546
- Haardt M, Kempf B, Faatz E, Bremer E (1995) The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding protein dependent transport system ProU of *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* 246:783–786
- Kappes R M, Kempf B, Bremer E (1996) Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: Characterization of OpuD. *J Bacteriol* 178:5071–5079
- Lamark T, Kaasen L, Eshoo MW, Falkenberg P, McDougall J, Strom AR (1991) DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 5:1049–1064
- Luchansky JB, Tennant MC, Klaenhammer TR (1991) Molecular cloning and deoxyribonucleic acid polymorphisms in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus gasseri*. *J Dairy Sci* 74:3293–3302
- Obis D, Guillot A, Gripon JC, Renault P, Bolotin A, Mistou MY (1999) Genetic and biochemical characterization of a high affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters. *J Bacteriol* 181:6238–6246
- Obis D, Guillot A, Mistou MY (2001) Tolerance to high osmolality of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *cremoris* is related to the activity of a betaine transport system. *FEMS Microbiol Lett* 202:39–44
- Pichereau V, Bourot S, Flahaut S, Blanco C, Auffray Y, Bernard T (1999) The osmoprotectant glycine betaine inhibits salt-induced cross-tolerance towards lethal treatment in *Enterococcus faecalis*. *Microbiology* 145:427–435
- Peter H, Burkovski A, Kramer R (1996) Isolation, characterization, and expression of the *Corynebacterium glutamicum betP* gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine. *J Bacteriol* 178:5229–5234
- Peter H, Weil B, Burkovski A, Kramer R, Morbach S (1998) *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: Identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. *J Bacteriol* 180:6005–6012
- Robert H, Le Marrec C, Blanco C, Jebbar M (2000) Glycine betaine, carnitine, and choline enhance salinity tolerance and prevent the accumulation of sodium to a level inhibiting growth of *Tetragenococcus halophila*. *Appl Environ Microbiol* 66:509–517
- Rosenstein R, Futter-Bryniok D, Gotz F (1999) The choline-converting pathway in *Staphylococcus xylosum* C2A: Genetic and physiological characterization. *J Bacteriol* 181:2273–2278
- Saier MH, Eng BH, Fard S, Garg J, Haggerty DA, Hutchinson WJ, et al. (1999) Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim Biophys Acta* 1422:1–56
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning. In: Argentine J, Irwin N, Janssen KA (eds) A laboratory manual, third edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sleator RD, Gahan CG, Abee T, Hill C (1999) Identification and disruption of BetL, a secondary glycine betaine transport system linked to the salt tolerance of *Listeria monocytogenes* LO28. *Appl Environ Microbiol* 65:2078–2083
- Takeda Y, Takase K, Yamato I, Abe K (1998) Sequencing and characterization of the *xyl* operon of a gram positive bacterium, *Tetragenococcus halophila*. *Appl Environ Microbiol* 64:2513–2519
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Yannisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103–119



## 2) Présence d'un système de transport de GB de type OpuA chez *T. halophila*

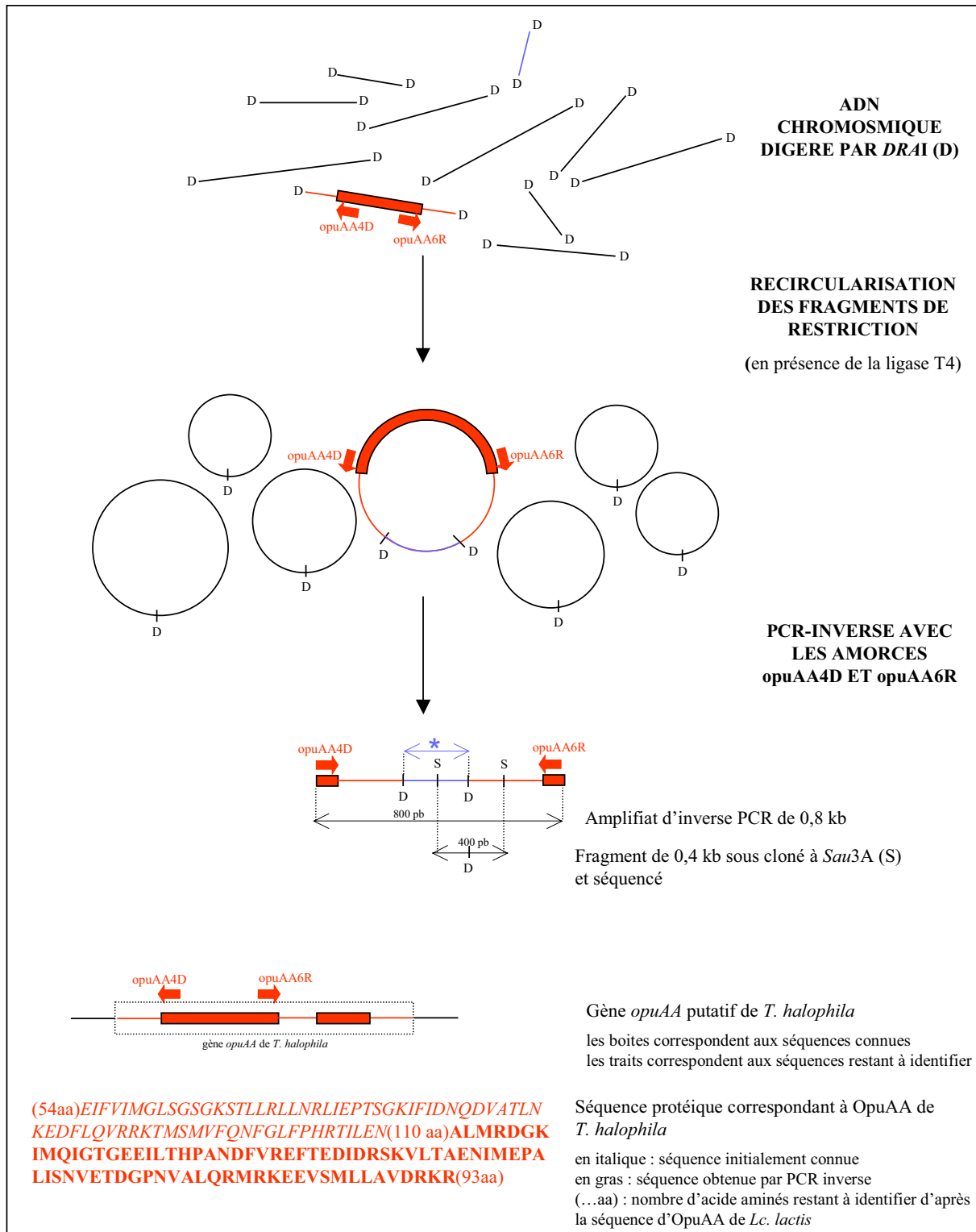
### a) Démarche expérimentale

ButA assure le transport spécifique de GB chez *T. halophila*. Les travaux de Robert *et al.* (2000) ont suggéré l'existence d'au moins un transporteur supplémentaire de GB permettant également l'accumulation de carnitine et de choline. Afin de caractériser ce système, Robert (2000) a émis l'hypothèse qu'il s'agissait d'un transporteur ABC, de type OpuA, sur les bases suivantes :

- ✓ la stratégie de complémentation fonctionnelle utilisée lors du clonage de *butA* s'est appuyée sur la réalisation de banques d'ADN chromosomique contenant des inserts de 3 à 4 kb. Tous les clones sélectionnés sur milieu salé additionné de GB contenaient le gène *butA*. De plus, les essais de complémentation fonctionnelle menés sur milieu salé additionné de carnitine ou de DMSA (deux osmoprotectants utilisés par *T. halophila* et non transportés *via* ButA) n'ont permis d'obtenir aucun clone. Ces résultats suggéraient que le(s) système(s) de transport de GB dont l'activité est complémentaire à celle de ButA pourrai(en)t correspondre à des systèmes codés par des opérons dont la taille est supérieure à 3-4 kb, comme c'est le cas des transporteurs ABC ;
- ✓ un système ABC de type OpuA, nommé BusA, assure le transport de GB chez *Lc. lactis* (Obis *et al.*, 1999), tandis qu'un système ABC nommé QacT (gène non cloné en 2000) transporte la GB, la carnitine et la proline chez *Lb. plantarum* (Glaasker<sup>b</sup> *et al.*, 1998).

La recherche d'un système OpuA chez *T. halophila* a été menée par PCR en définissant deux amorces dégénérées correspondant à une région protéique conservée au niveau des ATPases OpuAA des transporteurs OpuA identifiés chez les bactéries suivantes : *Lc. lactis* (BusA), *B. subtilis* (OpuA), *L. monocytogenes* (GbuA) et *E. coli* (ProV). Un fragment PCR de 216 pb a été obtenu à partir du génome de *T. halophila* et de l'espèce proche *T. muriaticus*. La séquence déduite correspond bien à la zone ciblée des ATPases des systèmes OpuA (région allant du 55<sup>ème</sup> au 125<sup>ème</sup> acide aminé de BusAA de *Lc. lactis*) (Robert, 2000).

Afin de confirmer la présence d'un locus *opuA* complet et fonctionnel, la présence d'une protéine de type OpuAC a été recherchée par Western-blot (parallèlement à la poursuite de son clonage). Des études préliminaires concernant la régulation du gène *opuAA* de *T. halophila* par l'osmolarité extérieure ont été également réalisées.



**Figure (III) 2 : stratégie d'inverse PCR suivie pour poursuivre le séquençage de l'opéron *opuA* de *T. halophila*.**

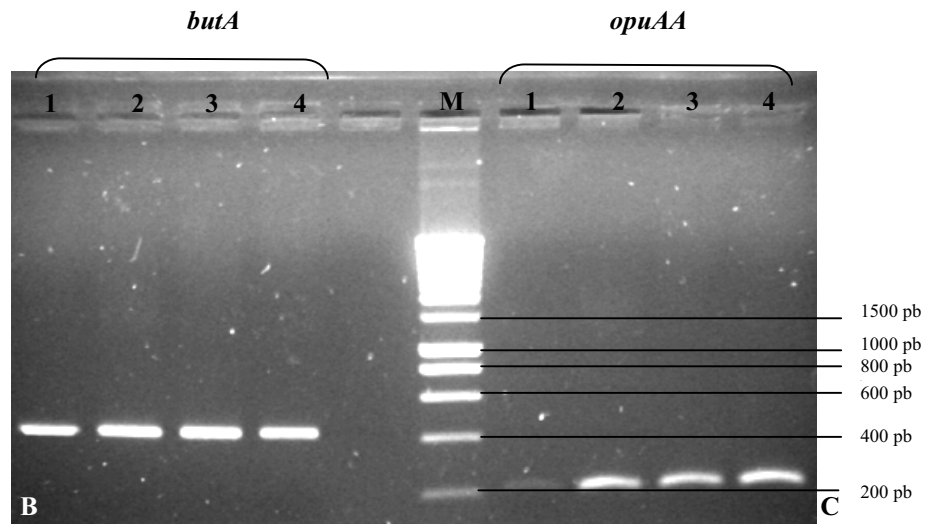
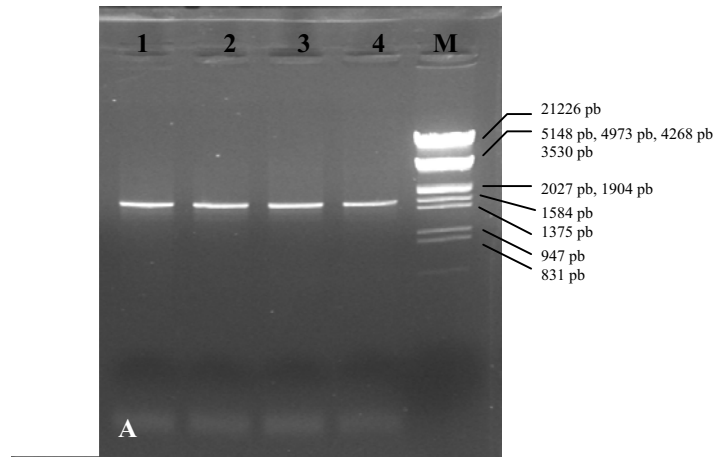
\* : lors de la récircularisation un petit fragment *DraI-DraI* (figuré en bleu) ne faisant pas partie de l'opéron *opuA* a été reliqué.

## b) Résultats

Des extraits protéiques totaux issus de *T. halophila* ont été analysés par immunodétection en présence d'un sérum de lapin contenant des anticorps anti-OpuAC (protéine affine du système OpuA) de *B. subtilis*. Aucune immunodétection n'a pu être observée à partir des protéines totales de *T. halophila* tandis qu'un signal de détection a bien été visualisé à partir des protéines totales de *B. subtilis* utilisées comme témoin (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent que *T. halophila* ne possède pas de système de transport de type OpuA complet ou que la protéine affine du transporteur de type OpuA putatif de *T. halophila* diffère d'OpuAC de *B. subtilis*. Ces mêmes anticorps anti-OpuAC de *B. subtilis* n'ont donné qu'un faible signal d'immunodétection à partir des protéines membranaires de *Lc. lactis* (Obis *et al.*, 1999). Ces auteurs suggèrent que la fusion des composants OpuAB et OpuAC au sein du transporteur de type OpuA de *Lc. lactis* est à l'origine du faible signal de détection observé.

La poursuite du séquençage du locus *opuA* de *T. halophila* a été menée à partir de la séquence partielle codant l'ATPase du système par une stratégie de PCR-inverse. Deux amorces (OpuAA4D et OpuAA6R) ont été définies sur les extrémités de la séquence de 216 pb clonée au laboratoire (Figure<sub>(III)</sub> 2). Des digestions de l'ADN chromosomique de *T. halophila* à *Bam*HI, *Dra*I et *Hind*III ont été recircularisées, puis utilisées comme ADN matrice dans une réaction PCR en présence des amorces OpuAA4D et OpuAA6R. Des amplifiats uniques ont été obtenus pour les digestions recircularisées à *Dra*I (0,8 kb) et *Hind*III (1,7 kb). Les témoins sans ligase étant négatifs, ces amplifiats résultent bien d'une recircularisation de fragments de restriction. Malgré plusieurs essais et utilisation de vecteurs de clonage différents (pGEM<sup>®</sup>-T Easy System II de Proméga, et Topo TA cloning kit<sup>®</sup> d'Invitrogen), ces amplifiats n'ont pu être clonés. Une alternative a consisté à sous-cloner l'amplifiat de PCR inverse de 0,8 kb (obtenus à partir d'une digestion chromosomique à *Dra*I recircularisée), après hydrolyse partielle à *Sau*3A, dans le vecteur pUC19 ouvert à *Bam*HI. Cette méthode a permis le clonage d'un fragment *Sau*3A d'environ 400 pb, contenant un site *Dra*I. Le séquençage de ce fragment de 0,4 kb a permis d'obtenir une portion supplémentaire du gène *opuAA* de *T. halophila* ATCC33315. Cette nouvelle portion correspond à la région située entre le 237<sup>ème</sup> et le 316<sup>ème</sup> acide aminé de la protéine putative OpuAA (par comparaison avec la protéine BusAA de *Lc. lactis* de 407 aa) (Figure<sub>(III)</sub> 2). La séquence protéique déduite montre de fortes homologies avec BusAA de *Lc. lactis* (91% d'homologie), GbuA de *L. monocytogenes* (69% d'homologie) et avec des sous-unités ATPase de transporteurs putatifs de GB de type ABC d'*Ent. faecalis* (92% d'homologie), *St. pyogenes* (85% d'homologie), *St. mutans* (85% d'homologie) et d'*Oceanobacillus iheyensis* (76% d'homologie).

Ce résultat montre qu'un gène *opuAA* (et donc potentiellement un opéron *opuA*) semble présent chez *T. halophila*. Ces premiers résultats confirment que le fragment de 216 pb initialement



**Figure<sub>(III)</sub> 3 : effet de l'osmolarité sur l'expression des gènes de transport de la glycine bêtaïne (*butA* et *opuA*) chez *T. halophila*.**

Puits 1 : ARNs extraits sans induction au NaCl

Puits 2 à 4 : induction par le NaCl : puits 2 : 2 M ; puits 3 : 3 M et puits 4 : 4 M.

Les banques d'ADNc correspondantes ont été soumises à une PCR 16S (A). Les mêmes quantités ont alors été soumises aux PCRs *butA* (B) et *opuAA* (C).



caractérisé est bien représentatif de l'opéron *opuA* (validation du couple d'amorces ayant permis son amplification). Des amorces situées au sein du fragment de 216 pb initial pourront donc être utilisées afin de suivre l'expression du gène *opuAA* chez *T. halophila* en fonction de l'osmolarité extérieure.

### 3) Régulation de l'expression d'*opuAA* par l'osmolarité

Le suivi de l'expression d'*opuAA* en fonction de l'osmolarité extérieure a été effectué par RT-PCR. Une première étude de la régulation de l'expression de *butA* avait été réalisée par Robert (2000) en utilisant une fusion de gène *butA :: uidA*. Toutefois cette technique pose deux problèmes majeurs : (i) la  $\beta$ -glucuronidase est instable lors de chocs salin et thermique, (ii) les fusions *butA :: uidA* sont présentes sur un plasmide multicopie, alors que le gène étudié est unique dans la génome de *T. halophila*. Ce dernier type de problèmes peut parfois être contourné en recombinant la fusion dans le chromosome. Ceci ne peut être envisagé chez *T. halophila* par manque de protocole de transformation suffisamment efficace (Bénachour *et al.*, 1996).

Les phases préliminaires à la mise au point du protocole de RT-PCR ont consisté à (i) mettre au point une technique fiable pour extraire les ARNs totaux de *T. halophila*, (ii) réaliser des banques d'ADNc afin de pouvoir suivre simultanément l'expression de plusieurs gènes dans une condition de stress donnée, (iii) valider notre technique en démontrant l'induction du gène *dnaK* en situation de stress thermique chez *T. halophila* (démonstré par Fukuda *et al.*, 2002). Afin de normaliser les concentrations en ADNc présentes dans les différentes banques (représentant les ARNs totaux issus de différentes conditions de culture), nous avons choisi de suivre l'expression d'un gène de ménage : le gène codant l'ARN<sub>R</sub> 16S. Ce gène est classiquement employé en tant que contrôle de non induction lors d'expériences récentes de Northern Blot (Liu *et al.*, 2002) ou de RT-PCR (Fraser *et al.*, 2003). Cependant, le caractère constitutif de ce gène est actuellement controversé. Des travaux visant à évaluer la stabilité des ARN<sub>R</sub> cellulaire par hybridation *in situ* ont montré que les ARN<sub>S</sub> 16S sont dégradés en présence d'un stress thermique chaud (Tolker-Nielsen *et al.*, 1997 ; Hansen *et al.*, 2001).

L'expression de *butA* a été réalisée en parallèle afin de confirmer le caractère constitutif légèrement inductible de son expression (Robert, 2000). L'expression des gènes *butA* et *opuAA* a été suivie en fonction de différents chocs salins d'une heure. Quatre molarité en NaCl différentes ont été testées : 0,8 M (témoin sans stress), 2,0 M, 3,0 M et 4,0 M (Figure<sub>(III)</sub> 3).

Une expression stable de *butA* est observée en absence et en présence de chocs salins (Figure<sub>(III)</sub> 3B). **L'expression de *butA* est donc constitutive** dans les conditions testées.



L'expression d'*opuAA* est détectée faiblement en l'absence de stress osmotique. Elle augmente de manière significative après un choc à 2 M NaCl (facteur  $\approx 3$ , Figure (III) 3C piste 2) et reste stable à 3 M et 4 M NaCl. **L'expression d'*opuAA* est donc induite par l'osmolarité** extérieure. Un profil d'expression similaire a été mis en évidence pour *busA/opuAA* de *Lc. lactis* (Obis *et al.*, 1999 ; Bouvier *et al.*, 2000). L'opéron correspondant est réprimé par BusR (Roméo *et al.*, 2003). La surexpression de BusR provoque une répression accrue de *busA* et augmente l'osmosensibilité de la souche. La délétion de *busR* provoque quant à elle une surexpression de *busA* et augmente l'activité de transport BusA d'un facteur 2,7 (Roméo *et al.*, 2003). Une augmentation de l'osmolarité du milieu extérieur déplace BusR de son site de fixation, *busA* est alors exprimé : la GB s'accumule par conséquent dans la cellule. Dès que la pression de turgescence cellulaire est restaurée par l'accumulation de GB, on observe un arrêt de l'induction de l'expression de *busA*. Les expériences menées par Roméo *et al.* (2003) montrent que cet arrêt intervient dans l'heure. L'expression de *busA* retrouve alors son niveau basal. Le profil d'expression d'*opuAA* établi en fonction de l'osmolarité extérieure chez *T. halophila* montre que l'induction d'*opuAA* est toujours visualisable après une heure de choc. Ce phénomène n'exclut pas la possibilité d'une régulation similaire chez *T. halophila* et *Lc. lactis*. L'accumulation de GB par *T. halophila* pendant une heure (durée du stress osmotique testée) pourrait se révéler insuffisante pour restaurer une pression de turgescence et provoquer l'arrêt de l'expression de l'opéron *opuA*. L'expression du gène *opuAA* devra donc être suivie durant une période supérieure à une heure.

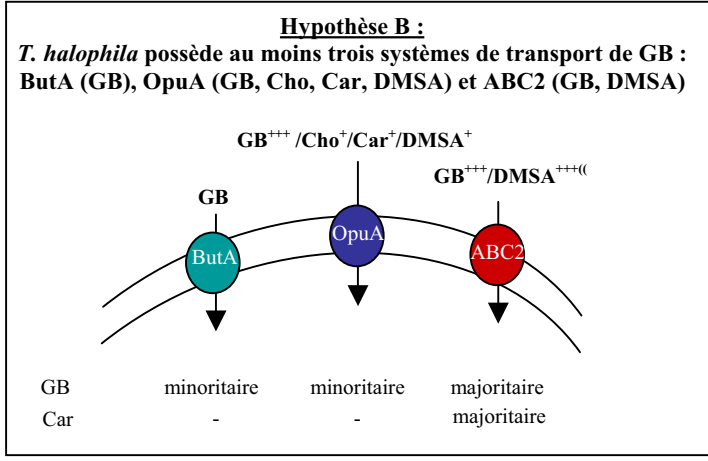
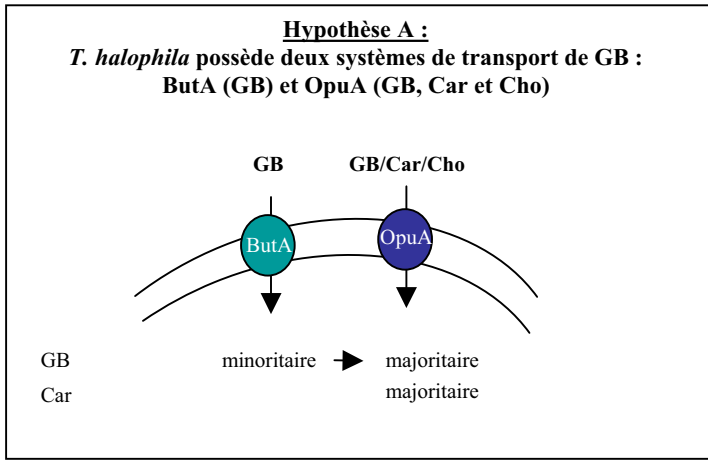
Chez *Lc. lactis*, *busR* est situé à proximité de l'opéron *opuA/busA* (Roméo *et al.*, 2003). La poursuite du clonage de l'opéron *opuA* chez *T. halophila* devrait donc permettre de confirmer ou d'infirmer la présence d'un locus codant un régulateur de type BusR en amont du gène *opuAA*.

Le protocole de RT-PCR permettant de suivre l'expression d'*opuAA* et de *butA* mis au point devrait permettre d'apprécier le rapport d'expression entre ces deux gènes. Or, les témoins de PCR réalisés sur la même quantité d'ADN génomique matrice ne montrent pas des intensités similaires. Il nous faudra donc reconduire ces manipulations au laboratoire avec de nouveaux couples d'amorces ayant la même « efficacité ». D'autre part, Robert (2000) a montré l'absence d'induction de l'activité globale de transport de GB chez *T. halophila*. Il est donc probable que si *opuAA* est induit d'un facteur trois par un choc salin alors sa contribution au transport global de GB reste modeste chez cette bactérie.

#### 4) Existe-il un troisième transporteur de GB chez *T. halophila* ?

Les résultats de Robert *et al.* (2000) ont montré que le transport de GB est assuré par au moins deux systèmes. Deux transporteurs ont d'ores et déjà été identifiés : la perméase spécifique ButA

	% d'inhibition du transport par :			
	Car	GB	Cho	DMSA
GB*	2	89	25	63
Car*	85	70	59	36



Figure(III) 4 : proposition d'équipement en systèmes de transport de GB chez *T. halophila*.

(pas de transport observé de carnitine, choline, DMSA et DMSP *via* ButA chez l'hôte hétérologue *E. coli*) et un transporteur ABC potentiel de type OpuA, capable de cotransporter la GB, la carnitine et la choline (Figure<sub>(III)</sub> 4).

Nous avons considéré dans un premier temps l'hypothèse selon laquelle seuls ButA et OpuA transportent la GB chez *T. halophila*. Les essais d'inhibition de transport montrent que le transport de [<sup>14</sup>C]GB n'est pas (ou peu) inhibé en présence de carnitine (2%, Figure<sub>(III)</sub> 4). ButA étant spécifique de la GB, ces données suggèrent qu'OpuA aurait une très faible affinité pour la carnitine et une forte affinité pour la GB. Ce postulat est en accord avec la forte inhibition de transport de la [<sup>14</sup>C]carnitine par la GB mesurée (70%, Figure<sub>(III)</sub> 4) (Robert *et al.*, 2000).

L'activité de transport de GB *via* ButA chez l'hôte hétérologue *E. coli* est de 0,4 nmol/min/mg de poids sec tandis que l'activité globale de transport de GB est de 3,2 nmol/min/mg chez *T. halophila* (Robert, 2000). ButA contribuerait donc de façon minoritaire au transport de GB chez *T. halophila*. OpuA serait par conséquent le système majeur de transport de GB. Cette hypothèse est cependant infirmée par les analyses de l'expression des gènes *butA* et *opuAA* réalisées dans le cadre de nos travaux. En effet, l'expression de *butA* est constitutive tandis que celle de *opuAA* est inductible. Si l'activité de OpuA est réellement majoritaire, alors cette situation devrait permettre de visualiser un effet d'induction du transport global de GB. Or, Robert *et al.* (2000) ont montré l'absence d'induction du transport global de GB chez *T. halophila*.

Ces constatations orientent vers une seconde hypothèse dans laquelle au moins trois systèmes de transport de GB sont opérationnels. L'un des schémas envisageables est présenté dans la figure<sub>(III)</sub> 4. *T. halophila* accumulerait la GB *via* ButA (transporteur minoritaire), OpuA et un troisième transporteur. OpuA transporterait la GB mais également la carnitine et la choline (Figure<sub>(III)</sub> 4). Il aurait une forte affinité pour la GB et une faible affinité pour la carnitine (70% d'inhibition du transport de [<sup>14</sup>C]carnitine par la GB, 2% d'inhibition du transport de [<sup>14</sup>C]GB par la carnitine ; Figure<sub>(III)</sub> 4). La participation d'OpuA au transport de GB serait minoritaire (aucune induction significative de l'activité globale de transport de GB mesurée bien qu'*opuAA* soit légèrement inductible). Le troisième système de transport de GB serait probablement de type ABC (cf. § I.C.2.). Il assurerait la grande majorité du transport de GB mais ne participerait pas à l'accumulation de carnitine (2% d'inhibition du transport de [<sup>14</sup>C]GB par la carnitine ; Figure<sub>(III)</sub> 4).

Ce modèle à trois transporteurs devra être confronté à de nouvelles expériences de compétition de transport à l'aide d'autres osmoprotectants radioactifs. Le travail a été initié avec le DMSA. Ces essais montrent une forte inhibition du transport de [<sup>14</sup>C]GB. Le DMSA serait donc transporté par OpuA et par le second système ABC (Figure<sub>(III)</sub> 4).



## D) Conclusions et perspectives

*Tetragenococcus halophila* ATCC 33315 possède un transporteur de GB nommé ButA (produit du gène *butA*) appartenant à la famille BCCT. ButA présente de fortes homologues avec OpuD de *B. subtilis*, BetL de *L. monocytogenes*, BetP de *C. glutamicum*, BetT d'*E. coli* et EctP de *C. glutamicum*. L'étude de cette perméase chez l'hôte hétérologue *E. coli* montre que ButA transporte spécifiquement la GB (comme c'est le cas de BetL de *Listeria monocytogenes* et de BetP de *C. glutamicum*). ButA constitue avec BetL de *Listeria monocytogenes* et BetP de *C. glutamicum* les seuls représentants de la famille BCCT spécifiques de la GB. La mesure de l'activité de transport de ButA chez l'hôte hétérologue *E. coli* a montré que cette perméase a une faible activité de transport (Robert, 2000). Nous n'avons pas démontré d'activation transcriptionnelle du gène *butA* par l'osmolarité extérieure.

Nos travaux suggèrent l'existence d'un second transporteur de GB de type ABC chez *T. halophila* comme c'est le cas chez *B. subtilis* et *L. monocytogenes* (Robert, 2000). Ce second système, de type OpuA, semble régulé par l'osmolarité extérieure au niveau transcriptionnel (induction du gène *opuAA* codant l'ATPase de ce système d'un facteur trois en présence de 4 M de NaCl). La poursuite du séquençage de la région du chromosome de *T. halophila* contenant le gène *opuAA* (par PCR inverse associée à la PCR classique) devrait permettre de déterminer (i) combien de gènes composent le locus *opuA* (fusion des gènes codant les protéines membranaire et affine comme chez BusA de *Lc. lactis*?), (ii) s'il existe chez *T. halophila* un gène de type *busR* en amont du locus *opuA*. OpuA jouerait un rôle minoritaire dans l'accumulation de glycine chez *T. halophila* car aucune induction de l'activité globale de transport de GB par l'osmolarité extérieure n'a été observée (Robert *et al.*, 2000).

L'ensemble de ces données suggère l'existence d'autre(s) système(s) de transport de GB chez *T. halophila* dont la contribution à l'accumulation de cet osmoprotectant en situation de stress hyperosmotique serait elle majoritaire.

Nos données actuelles ne nous permettent pas de conclure sur le nombre exact de transporteurs de GB présents chez *T. halophila*. L'obtention d'un dérivé muté dans les systèmes de transport de GB de type ButA et OpuA nous permettrait (i) de vérifier l'existence de systèmes supplémentaires impliqués dans l'accumulation de GB chez *T. halophila*, (ii) d'étudier la contribution de chacun de ces systèmes à l'osmorégulation de *T. halophila* ATCC 33315. Cette approche est irréalisable à l'heure actuelle chez *T. halophila* du fait notamment de la très faible efficacité de transformation de cette bactérie.





Une alternative possible consisterait à compléter nos expériences de compétition de transport en employant d'autres solutés compatibles radioactifs afin d'évaluer « physiologiquement » le nombre de transporteurs impliqués dans l'accumulation de GB chez *T. halophila*. Une autre alternative consisterait à rechercher ces transporteurs chez une bactérie lactique proche de *T. halophila* qui serait à la fois plus aisément manipulable génétiquement, et présente dans une plus grande variété de matrices alimentaires afin de pouvoir envisager d'élargir le sujet à l'étude des mécanismes de réponse aux stress et de leur régulation : *Pediococcus pentosaceus*.

**Tableau<sub>(III)</sub> I : estimation des CMI en NaCl en milieu MRS chez différentes bactéries lactiques.**

Espèce bactérienne	CMI en NaCl
<i>Carnobacterium piscicola</i> NCDO2762	1,5 M
<i>Enterococcus faecalis</i> CIP76117	1,7 M
<i>Oenococcus oeni</i> ATCC23279	1,0 M
<i>Lactococcus lactis</i> FACC1630	0,6 M
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCIMB 8826	1,5 M
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B512-F	1,6 M
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC33316	1,5 M
<i>Tetragenococcus halophila</i> ATCC33315	3,5 M

**Tableau<sub>(III)</sub> II : estimation des CMI en NaCl chez différents Pédiocoques en milieu MRS.**

Espèce bactérienne	CMI en NaCl
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC33316	1,5 M
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ICP01	1,6 M
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ICP02	1,6 M
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB61	1,8 M

## II) OSMOREGULATION CHEZ *P. PENTOSACEUS* : TOLERANCE AU SEL ET OSMOPROTECTANTS POTENTIELS

### A) Effet d'un stress hyper-osmotique sur la croissance de *P. pentosaceus* et d'autres bactéries lactiques

Les capacités de *P. pentosaceus* ATCC33316 à se développer en situation de contrainte osmotique ont été étudiées en milieu riche (MRS) et en milieu chimiquement défini (DM) par suivi d'absorbance. En milieu MRS salé, le taux de croissance de cette bactérie diminue fortement (réduction d'environ 70% en présence de 0,8 M NaCl et de 80% en présence de 1,25 M NaCl). La croissance de *P. pentosaceus* est totalement inhibée par l'ajout de 2,5 M de NaCl. Toutefois, le MRS contient des sources en osmoprotectants (extrait de levure, extrait de viande, peptones) pouvant minimiser l'impact du stress salin sur les capacités de croissance de *P. pentosaceus*. En milieu chimiquement défini (DM), *P. pentosaceus* conserve de bonnes capacités de croissance en absence de stress (taux de croissance de 0,46 h<sup>-1</sup> en MRS et de 0,36 h<sup>-1</sup> en DM). Comme nous l'avons constaté en milieu riche, l'ajout de sel dans le milieu DM provoque une forte diminution du taux de croissance de cette bactérie (réduction d'environ 80% en présence de 0,8 M NaCl).

L'estimation de la CMI en NaCl au sein du **groupe des bactéries lactiques** montre une différence importante en matière de tolérance au sel (Tableau<sub>(III)</sub> I). Trois groupes bactériens peuvent être distingués : le premier comprend l'espèce halophile de *T. halophila* (CMI de 3,5 M NaCl), le second rassemble les genres *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (CMI entre 1,5 M et 1,7 M NaCl) tandis que le dernier groupe est composé des genres *Lactococcus* et *Oenococcus* (CMI inférieure ou égale à 1M NaCl). Dans le **genre *Pediococcus***, la tolérance vis-à-vis du sel de *P. pentosaceus* ATCC33316 est identique à celle à *P. acidilactici* CIP103408 et est supérieure à celle de *P. damnosus* CIP102264 (Robert, 2000). La tolérance vis-à-vis du sel est donc un caractère propre à chaque espèce du genre *Pediococcus*. L'estimation de la CMI en NaCl au sein de **l'espèce *P. pentosaceus*** est souche dépendante (Tableau<sub>(III)</sub> II). Elle varie entre 1,5 M et 1,8 M NaCl. Il est à noter que les souches de *P. pentosaceus* les plus tolérantes vis-à-vis du sel sont celles qui ont été isolées de litières animales (souches ICP01 et ICP02). Nous pouvons supposer que cet environnement, particulièrement stressant (faible a<sub>w</sub>, urine), favorise le développement de bactéries présentant une bonne tolérance vis-à-vis du stress hyper-osmotique.

La tolérance vis-à-vis du sel chez les Lactobacilles est, comme chez les Pédicoques, espèce-dépendante [*Lb. acidophilus* LA1-1 : forte diminution de la croissance en MRS en présence de 0,35 M NaCl, inhibition de la croissance en MRS en présence de 0,7 M NaCl (Kim *et al.*, 2001) ; *Lb. rhamnosus* HN001 : réduction du taux de croissance en MRS de 40% en présence de 0,7 M NaCl



(Prasad *et al.*, 2003) ; *Lb. alimentarius* BJ33 : très forte diminution de la croissance en MRS en présence de 0,8 M NaCl (dose sub-létale) (Lemay *et al.*, 2000)].

O'Callaghan et Condon (2000) ont également constaté que la tolérance vis-à-vis du sel chez *Lc. lactis* est souche-dépendante. Ils proposent de classer les différentes souches de *Lc. lactis* suivant leur capacité à se développer en présence de concentrations en NaCl inférieures ou égales à 0,35 M (souche sensible) ou à 0,7 M (souche tolérante).

### **B) Identification des osmoprotectants chez *P. pentosaceus* (article n°2)**

Un inventaire des osmoprotectants utilisés par *P. pentosaceus* a été réalisé. La bactérie a été cultivée en milieu DM sous contrainte osmotique (réduction d'environ 80% du taux de croissance). Dans cet environnement, l'ajout de GB, de DMSA, de choline, de proline ou de carnitine permet de restaurer la croissance de *P. pentosaceus* ATCC33316. Dans un second temps, ces molécules potentiellement osmoprotectrices ont été classées selon leur effet sur l'augmentation de la DO<sub>600nm</sub> finale et du taux de croissance de la bactérie. Leur rôle osmoprotecteur a ensuite été confirmé en démontrant que ces molécules sont accumulées dans le cytoplasme de *P. pentosaceus* en réponse à un stress hyper-osmotique. Enfin, des expériences de compétition de transport suggèrent que la GB, le DMSA, la choline, la proline et la carnitine sont co-transportées. L'ensemble des résultats obtenus chez *P. pentosaceus* ATCC33316 a été comparé aux données disponibles chez d'autres bactéries lactiques.

Ces résultats sont présentés dans la publication ci-jointe « Potential osmoprotectants for the lactic acid bacteria *P. pentosaceus* and *T. halophila* » parue dans *International Journal of Food Microbiology*.





## Potential osmoprotectants for the lactic acid bacteria *Pediococcus pentosaceus* and *Tetragenococcus halophila*

Aurélie Baliarda<sup>a</sup>, Hervé Robert<sup>a,b,1</sup>, Mohamed Jebbar<sup>c</sup>, Carlos Blanco<sup>c</sup>,  
Alain Deschamps<sup>a</sup>, Claire Le Marrec<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Unité Sécurité Microbiologique des Aliments, ISTAB, Université Bordeaux 1, Avenue des Facultés, F-33405 Talence Cedex, France

<sup>b</sup>COBIOTEX, Parc Scientifique, UNITEC 1, Allée du Doyen Brus, 33600 Pessac Cedex, France

<sup>c</sup>UPRES-A CNRS 6026, Département Membranes and Osmoregulation, Université Rennes I, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex, France

Received 21 September 2001; received in revised form 5 July 2002; accepted 18 July 2002

### Abstract

The physiological responses of the lactic acid bacteria *Pediococcus pentosaceus* and *Tetragenococcus halophila* (formerly known as *P. halophila*), subjected to osmotic stress in the presence of molecules known to act as osmoprotectants for other bacteria were studied. In a defined medium, glycine betaine, dimethylsulfonioacetate, choline, proline and L-carnitine were able to relieve inhibition of growth at 0.8 M NaCl. The five compounds were shown to efficiently compete with glycine betaine transport, suggesting the existence of common transporter(s) for these molecules. *T. halophila*, the most tolerant strain, exhibited a larger spectrum of compatible solutes including dimethylsulfonioacetate, dimethylsulfoniopropionate and ectoine. Preliminary data suggest that restoration of growth by ectoine under osmotic constraint seems specific to the genus *Tetragenococcus*.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Osmotic stress; Glycine betaine; Carnitine; Ectoine; Choline

### 1. Introduction

Like all living organisms, bacteria have evolved complex stress responses that can promote their survival under growth restrictive conditions due to, for example, starvation, high temperatures, changes in pH

or salinity. The response mechanisms to growth-inhibiting salt concentrations have been studied extensively (see for review Csonka, 1989; Bremer and Kramer, 2000). Bacteria adapt to hyperosmolarity by accumulation, synthesis and transport of compatible solutes to restore turgor. It is now well documented that osmoprotectants can play additional positive roles, and beneficial effects have been demonstrated on membrane integrity, protein folding and stability (Bremer and Kramer, 2000), thermoprotection (Caldas et al., 1999) or survival after drying (Kets and de Bont, 1994). From these studies, accumulation of osmoprotectants has been considered to be a potential

\* Corresponding author. Tel.: +33-5-5684-8902; fax: +33-55684-8919.

E-mail address: [c\\_lehenaff@yahoo.fr](mailto:c_lehenaff@yahoo.fr) (C. Le Marrec).

<sup>1</sup> Present address: Département Génie Biologique, IUT Auch, Université Paul Sabatier, 24, Rue d'Embaquès, F-32000 Auch, France.





solution to stabilize frozen or freeze-dried starter cultures used in the food industry, such as lactic acid bacteria (LAB).

Growth at low water activity has been investigated in detail only for a limited number of LAB: *Lactobacillus plantarum* (Kets et al., 1994, 1997; Kets and de Bont, 1994, 1997; Glaasker et al., 1996a,b); *Lactococcus lactis* (Obis et al., 1999, 2001; O'Callaghan and Condon, 2000; van der Hiede and Poolman, 2000); *Tetragenococcus halophila* (Robert et al., 2000); and the opportunistic pathogen *Enterococcus faecalis* (Pichereau et al., 1999). Analyses by HPLC and NMR have revealed that there are only a limited number of compounds used by LAB as compatible solutes such as free amino acids (e. g. proline and glutamate), quaternary amines and their sulfonium analogues (e. g. glycine betaine, carnitine, dimethylsulfonioacetate, dimethylsulfoniopropionate) (Kets and de Bont, 1994; Kets et al., 1994; Glaasker et al., 1996a,b; Obis et al., 1999; Pichereau et al., 1999; Robert et al., 2000). As observed for other eubacteria subjected to salt stress, glycine betaine (GB) is the major effective osmoprotectant for LAB (Kets and de Bont, 1994; Kets et al., 1994; Glaasker et al., 1996a,b; Obis et al., 1999; Pichereau et al., 1999; Robert et al., 2000). Interestingly, the spectrum of other accumulated osmoprotectants differ according to the genus studied. Hence, choline is an osmoprotectant *per se* only in *Lb. plantarum* (Kets et al., 1997) while *T. halophila* is the only known LAB which has a choline–glycine pathway, allowing the bacteria to accumulate GB through the conversion of its precursor choline (Robert et al., 2000). Similar observations have been made concerning other betaines such as carnitine, and methylated onium compounds structurally related to GB, i.e. carnitine, dimethylsulfonioacetate (DMSA), and dimethylsulfoniopropionate (DMSP) (Kets et al., 1994, 1997; Pichereau et al., 1999; Obis et al., 1999; Robert et al., 2000).

Pediococci form a diverse group of Gram-positive homofermentative lactic acid bacteria whose osmoregulation is poorly documented. The two main industrially used species, *Pediococcus pentosaceus* and *Pediococcus acidilactici*, are involved as starter cultures in meat and vegetable fermentations. *P. pentosaceus* is particularly associated with different traditional food such as fermented maize (kenkey) (Halm et al., 1993; Olsen et al., 1995) and fermented bread (Gassem,

1999). The strain also acts as a non-starter flora and contributes to cheese ripening (Bhowmik and Marth, 1990).

The aim of our study is to understand the mechanisms by which *P. pentosaceus* maintains growth under conditions of increased osmolarity. The growth response of the bacterium to osmotic stress was analysed in complex and defined media, with or without supplementation of molecules known to act as osmoprotectants for *Escherichia coli* and other bacteria. Results were compared to other LAB species and especially *T. halophila*, previously known as *P. halophila* (Collins et al., 1990).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and growth conditions

*P. pentosaceus* ATCC 33316 (auxotrophic for proline), *Lb. plantarum* NCIMB 8826, *T. halophila* ATCC 33315, *T. halophila* I-13 and *Tetragenococcus muriaticus* JCM 10006 were grown in MRS broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). When required, a chemically defined medium (DM) based upon that of Kets et al. (1994) was used. DM contained (per liter of deionized water), 2 g of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3 g of sodium acetate, 2 g of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 100 mg of  $\text{MgSO}_4$ , 50 mg of  $\text{MnSO}_4$ , 1.25 g of Tween 80, 300 mg of L-cysteine, 100 mg of L-alanine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, glycine, L-isoleucine, L-leucine, L-lysine, L-methionine, L-proline, L-threonine, L-tryptophan, L-tyrosine, and L-valine, 50 mg of L-arginine, L-histidine, L-phenylalanine, and L-serine, and 10 mg of adenine, guanine, uracil and xanthine. The medium was supplemented with (per liter) 10 g of glucose, 5 ml of a solution of vitamins described by Kets and de Bont (1994), and 0.5 ml of a solution of trace elements containing (per liter of deionised water) 0.25% (w/v) HCl, 1.5 g of  $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 190 mg of  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 100 mg of  $\text{MnCl}_2$ , 70 mg of  $\text{ZnCl}_2$ , 6 mg of  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 36 mg of  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  and 2 mg of  $\text{CuCl}_2$ . Glucose was heat-sterilized separately. The vitamin and the trace element solutions were sterilized by passage through a 0.22- $\mu\text{m}$  pore-size sterile filter (Millipore) and added to the other components. Media were supplemented with 0.5 M NaCl and the pH adjusted to 7.5 for the



growth of *Tetragenococcus* strains. When necessary, the osmotic strength of the media was increased by addition of salt (NaCl) from highly concentrated stock solutions.

### 2.2. Survey of compounds for osmoprotective activity

Appropriate overnight cultures in DM medium of *P. pentosaceus* and *T. halophila* were used to inoculate 40 ml of fresh DM medium containing 0.8 and 2 M NaCl, respectively, and the candidate osmoprotectant at a final concentration of 2 mM. Compatible solutes used in this study included the following: L-carnitine, choline, glycine betaine, pipercolic acid, L-proline, sarcosine, taurine (Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, France). Dimethylsulfonylacetate (DMSA) and dimethylsulfonylpropionate (DMSP) were synthesized as described previously (Pichereau et al., 1999). Ectoine was prepared as described by Bernard et al. (1993).

Bacteria were grown aerobically without agitation at 37 °C. Growth was monitored by optical density determinations at 600 nm of appropriately diluted cultures (cuvettes with a 100-mm lightpass), using a U-2000 spectrophotometer (Hitachi, Velizy, France). Sampling intervals were 2.5 and 6 h for *P. pentosaceus* and *T. halophila*, respectively. Measurements were continued until cultures reached stationary phase (20 h for *P. pentosaceus* and 72 h for *T. halophila*). Growth yield of cells cultivated in defined medium supplemented with NaCl was expressed as the percentage of the final optical density (600 nm) against that of the control culture without NaCl.

### 2.3. Extraction of cellular solutes

Bacteria grown in MRS broth or in DM broth were harvested during exponential growth by centrifugation and washed with a solution iso-osmotic with the corresponding culture medium. The cell pellet was extracted at least twice with 80% (v/v) ethanol, under vigorous magnetic stirring, at room temperature, for 30 min (Robert et al., 2000). After centrifugation, the supernatants [ethanol-soluble fraction (ESF)] were pooled and evaporated to dryness under reduced pressure at 40 °C. The dried residue was finally dissolved in a minimal volume of distilled water and stored at -20 °C until use for further analysis (Robert et al., 2000).

### 2.4. Identification of osmoprotectant by NMR spectroscopy analysis and thin layer chromatography

NMR spectroscopy analysis of the ethanol-soluble cell extract were performed as described previously (Robert et al., 2000). The natural-abundance <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded in a pulsed-Fourier transform mode at an operational frequency of 75.4 MHz. Alternatively, osmoprotectants contained in the ESF were separated by thin layer chromatography (TLC) on Silica Gel G plates by ascending development, using suitable mobile phases. Separation of betaine, choline and carnitine was improved with a solvent system containing ethanol, acetic acid and water (70:5:25), and separation of proline and glutamate was obtained with a phase containing methanol/0.88 M ammonia (75:25). Amino acids were identified by reaction with ninhydrine (0.4% in butanol) and methylated onium compounds with an ammonium potassium permanganate solution, as previously described (Bernard et al., 1993).

### 2.5. Transport competition assays

Uptake assays were performed as previously described (Robert et al., 2000), using [methyl-<sup>14</sup>C]glycine betaine (2.07 GBq mM<sup>-1</sup>).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Growth of *P. pentosaceus* at high salinity

*P. pentosaceus* was cultured in MRS broth containing up to 2.5 M NaCl. Growth rates were significantly affected by sodium chloride and decreased from 0.46 h<sup>-1</sup> in the absence of NaCl to 0.14 and 0.09 h<sup>-1</sup> at 0.8 and 1.25 M NaCl, respectively. Growth was totally inhibited at 2.5 M (data not shown). Similar observations were reported for *Lb. plantarum* and *E. faecalis* in rich medium (Glaskers et al., 1996a,b; Pichereau et al., 1999). *Lc. lactis* strains are less tolerant of NaCl, despite the heterogeneity observed in their response. Hence, *Lc. lactis* strains have recently been divided into two groups based on their ability to grow in the presence of an upper limit of either 0.3 M NaCl (sensitive) or 0.6 M NaCl (tolerant) (O'Callaghan and Condon, 2000). In con-



trast, the salt tolerance of *P. pentosaceus* is far different from that reported for *T. halophila*. In MRS, this bacterium tolerates up to 3.2 M (Robert et al., 2000).

MRS medium contains sources of free amino acids, while some components (i. e. yeast extract and beef extract) are known to provide many LAB with significant amounts of GB, choline and carnitine (Kets et al., 1994). Therefore, MRS is not well suited to identify the osmoprotectants efficiently scavenged from the environment under osmotic constraint. Hence, a defined proline-containing medium (DM) lacking betaines was further used (Robert et al., 2000). Both growth rate and growth yield levels were observed to be lower than those obtained with cultures in MRS media. *P. pentosaceus* showed optimal growth in the absence of NaCl ( $\mu = 0.36 \text{ h}^{-1}$  and  $\text{OD}_{600} = 2.5$ ) (Table 1). At 0.8 and 1.25 M NaCl, growth rate and maximal  $\text{OD}_{600}$  were reduced by approximately 80%, and 90%, respectively (Table 1).

### 3.2. Survey for potential osmoprotectants

At 0.8 M NaCl, *P. pentosaceus* cells were submitted to a qualitative assay, carried out with 10 candidate osmoprotectants added at a final concentration of 2 mM. Growth parameters were compared

with those obtained with *T. halophila* cultivated in DM with 2 M NaCl. This molarity was previously shown to correspond to a similar constraint, decreasing the growth rate by about 70% (Robert et al., 2000). None of the compounds tested had a significant effect on bacterial growth in the defined medium without added NaCl (data not shown).

#### 3.2.1. *P. pentosaceus*

As summarized in Table 1, addition of DMSP, ectoine, pipercolic acid, sarcosine and taurine did not relieve inhibition of growth at 0.8 M NaCl. Similar results were obtained at 0.6 and 1 M NaCl. On the contrary, the following compounds, in approximate rank order, were efficient in growth recovery: GB>DMSA>choline ~ proline>L-carnitine. Glycine betaine was the most effective compound in reducing the inhibitory effects of NaCl. Growth yield and  $\mu$  values were increased to 170% and 135%, respectively (Table 1). The less effective compound was L-carnitine which reduced the effects of NaCl slightly. The optimal OD was stimulated to a small extent (125%) (Table 1). As previously observed for *Lb. plantarum* (Kets et al., 1994), no stereo-specific effect of carnitine was observed since both D- and L-carnitine configuration showed similar results (data not shown).

Table 1

Effect of various compounds on growth of *P. pentosaceus* and *T. halophila* subjected to 0.8 and 2 M NaCl, respectively

NaCl (M) and compound added to culture	<i>P. pentosaceus</i>		NaCl (M) and compound added to culture	<i>T. halophila</i>	
	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$\text{OD}_{600}$		$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$\text{OD}_{600}$
0 M + no additive <sup>a</sup>	0.360 F 0.030	2.50 F 0.10	0.8 M + no additive <sup>a</sup>	0.090 F 0.005	0.60 F 0.05
0.8 M + no additive	0.074 F 0.002	0.56 F 0.04	2 M + no additive	0.020 F 0.002	0.05 F 0.01 <sup>b</sup>
0.8 M + L-carnitine	0.078 F 0.003	0.70 F 0.06	2 M + L-carnitine	0.090 F 0.005 <sup>c</sup>	1.35 F 0.09 <sup>c</sup>
0.8 M + choline	0.086 F 0.005	0.77 F 0.05	2 M + choline	0.065 F 0.005 <sup>c</sup>	1.10 F 0.06 <sup>c</sup>
0.8 M + DMSA	0.096 F 0.003	0.88 F 0.01	2 M + DMSA	0.110 F 0.006	1.20 F 0.05
0.8 M + DMSP	0.071 F 0.005	0.63 F 0.01	2 M + DMSP	0.090 F 0.007	0.90 F 0.03
0.8 M + ectoine	0.065 F 0.006	0.68 F 0.05	2 M + ectoine	0.065 F 0.003	0.70 F 0.03
0.8 M + GB	0.100 F 0.002	0.94 F 0.02	2 M + GB	0.130 F 0.005 <sup>c</sup>	1.50 F 0.05 <sup>c</sup>
0.8 M + pipercolate	0.076 F 0.003	0.69 F 0.05	2 M + pipercolate	0.020 F 0.003	0.05 F 0.03
0.8 M + proline	0.082 F 0.005	0.74 F 0.06	2 M + proline	0.019 F 0.003	0.04 F 0.03
0.8 M + sarcosine	0.070 F 0.005	0.55 F 0.05	2 M + sarcosine	0.019 F 0.003	0.05 F 0.03
0.8 M + taurine	0.069 F 0.006	0.60 F 0.02	2 M + taurine	0.020 F 0.003	0.05 F 0.03

Cells were cultivated in defined medium (DM) supplemented with NaCl. Growth rates and final  $\text{OD}_{600}$  (20 h for *P. pentosaceus* and 72 h for *T. halophila*) are indicated. Data are the means of at least three independent experiments.

DMSA, dimethylsulfonyacetate; DMSP, dimethylsulfonypropionate; GB, glycine betaine.

<sup>a</sup> Optimal growth in the absence of additive was observed at 0 M for *P. pentosaceus*, and 0.8 M for the moderate halophilic bacterium *T. halophila*.

<sup>b</sup> Slower growth was observed for the control without additive, and final OD reached 0.12 after 96 h. <sup>c</sup> Data obtained from Robert et al. (2000).



Choline was identified as a potential osmoprotectant for *P. pentosaceus*, although less effective than GB. Contrary to the observations made for GB and carnitine, the growth yield in the presence of choline doubled when cells were allowed to pre-accumulate the osmoprotectant before inoculation of the DM medium (data not shown). This would suggest that the systems involved in the accumulation and/or transformation of choline are inducible. Further experiments will be conducted to analyze whether choline is osmoprotective per se, as the case for *Lb. plantarum* (Kets et al., 1997), or whether the molecule must be further converted into betaine to display osmoprotective properties in *P. pentosaceus*.

### 3.2.2. *T. halophila*

Although formerly classified in the genus *Pediococcus*, *T. halophila* exhibits a higher salt tolerance than *P. pentosaceus*. The bacterial growth is efficiently restored by GB, choline and carnitine under osmotic constraint (Robert et al., 2000). In this study, we showed that the spectrum of compatible solutes also includes DMSA and DMSP, which are GB structural analogues. All three compounds (GB, DMSA and DMSP) are highly osmoprotective since they increased the growth rate by 6.5-, 5.5- and 4.5-fold, respectively (Table 1). As already observed for GB (Robert et al., 2000), DMSA and DMSP improved both the growth rate and the growth yield of *T. halophila* over a wide range of salinity, i.e. 0–3 M (data not shown). Surprisingly tetrahydropyrimidine ectoine was also identified as a potent osmoprotectant for *T. halophila* grown at 2 M (Table 1). The growth rate was increased by threefold. Ectoine is a potent osmoprotectant synthesized by moderately halophilic eubacteria such as *Marinococcus halophilus* and *Halomonas elongata* (Bremer and Krämer, 2000). *T. halophila*, like *E. coli*, *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*, does not produce ectoine and is able to accumulate the molecule from the environment for osmoprotective purposes through transport processes.

### 3.3. Accumulation of glycine betaine and proline in *P. pentosaceus*

Growth-stimulatory properties of proline were observed on salt-stressed *P. pentosaceus* cells. This strain is auxotrophic for this amino acid. Hence,

discrimination between growth stimulation due to osmoprotection and that due to the supply of proline for biosynthesis required the study of proline accumulation under osmotic constraint. Cellular solutes of salt-stressed cells grown in MRS were extracted, and analysed by natural-abundance  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy (Fig. 1). Weak signals corresponding to lactic acid, which does not have the characteristics required for an osmoprotectant, were observed at low and high salinities (Fig. 1). Weak peaks attributed to proline

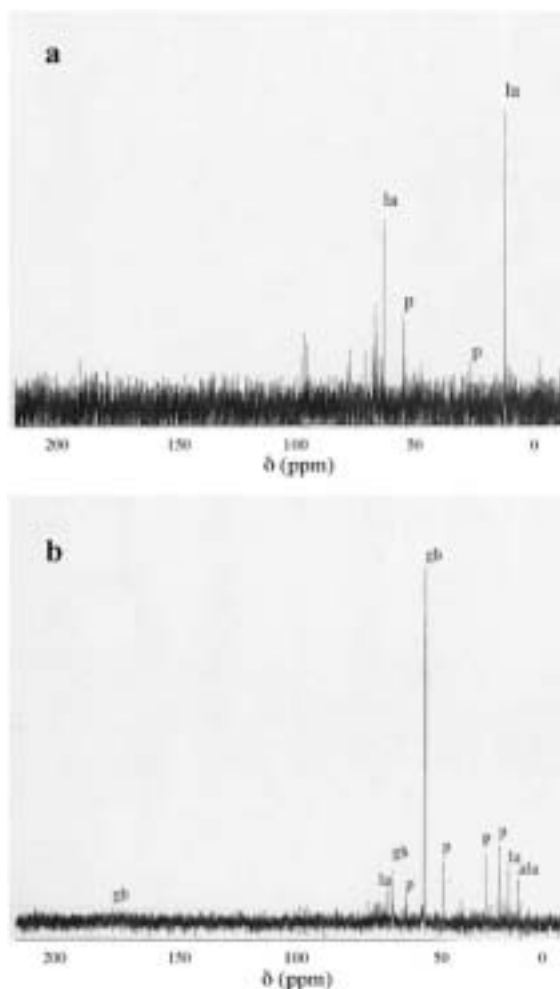


Fig. 1.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of ethanolic extract of *P. pentosaceus* cells grown in MRS medium (a) or MRS medium supplemented with 1 M NaCl (b). The peaks were identified from spectra obtained with authentic compounds (chemical shifts are given in ppm), and are glycine betaine (gb), proline (p), alanine (ala) and lactate (la).





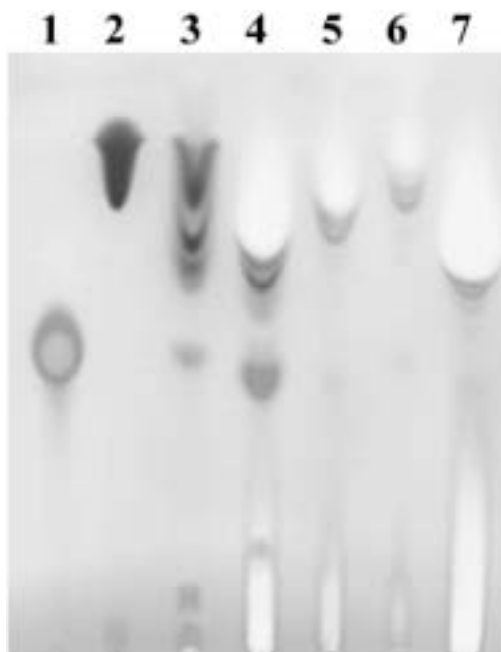


Fig. 2. Accumulation of proline by *P. pentosaceus*. Ethanolic extracts of cells grown in DM were analysed by TLC. DM 0 M NaCl (lane 3), DM 1 M NaCl (lane 4), DM 1 M NaCl + choline (lane 5), DM 1 M NaCl + carnitine (lane 6), and DM 1 M NaCl + glycine betaine (lane 7). Extracts were obtained from equivalent amounts of cells so that direct comparison can be made. Proline was detected after spraying a solution of ninhydrin onto chromatograms followed by heating at 80 jC. Authentic proline (0, 12 mg) and glutamate (0, 12 mg) were used as controls (lanes 1 and 2, respectively).

were detected in the absence of sodium chloride (Fig. 1a). In the presence of 1 M NaCl, signals of GB were dominant. Since this compound is present in MRS and that it accumulates intracellularly only when the osmolarity is raised, an osmodependent GB transport must occur. Major signals were also attributed to alanine and proline, both of which are supplied by

the rich medium (Fig. 1b). Taken together, our results show that in rich medium, proline is a major accumulated compound under osmotic constraint, even though other osmoprotectants are supplied and accumulated, as the case for glycine betaine.

To establish the role of proline as an osmoprotectant, the organic osmolytes accumulated by cells grown in proline-containing DM, without or with NaCl (1 M), were analysed (Fig. 2). An increased accumulation of proline under osmotic constraint was observed (Fig. 2, lanes 3 and 4). Hence, proline may serve a significant function in osmoregulation in *P. pentosaceus*. At 1 M NaCl, we observed that the addition of another compound to proline-containing DM, i.e. GB, carnitine or choline, strongly reduced the accumulation of proline (Fig. 2, lanes 5, 6 and 7). Such data may suggest that accumulation of GB, carnitine or choline is energetically more favourable, or that common transporter(s) are used by proline and these molecules. In *Lb. plantarum* and *Lc. lactis*, the main GB transporters QacT and BusA, respectively, were found to display an osmodependant proline transport activity (Glaasker et al., 1998; Obis et al., 1999). To examine the situation in *P. pentosaceus*, we analysed the uptake of GB and performed cross-competition uptake assays to determine whether carnitine, choline and proline had similar or different uptake pathways (Table 2). Inhibitory effects were observed for proline, carnitine and choline (91%, 80% and 26% inhibition, respectively, when supplied at a 100-fold excess over radiolabelled GB). These results are consistent with the existence of a common transporter. The potential osmoprotectant DMSA also inhibited [<sup>14</sup>C]GB uptake (72% inhibition). Ectoine, which was not osmoprotective for *P. pentosaceus* did not compete with GB transport (Table 2).

Table 2  
Effect of unlabeled competitors on the uptake of [<sup>14</sup>C]glycine betaine by *P. pentosaceus*

Osmoprotectant	% inhibition by:					
	Glycine betaine	Proline	L-Carnitine	DMSA	Choline	Ectoine
[ <sup>14</sup> C]Glycine betaine	94	91	80	72	26	0

Bacteria were grown in DM 0.4 M NaCl. Uptake assays were carried out as previously described with [<sup>14</sup>C]glycine betaine 10 AM (Robert et al., 2000). Unlabeled competitors were added in 100-fold excesses. Results are given as the percent reductions of the uninhibited uptake rate, which was 0.65 nmol/min/OD unit. The results are the mean of three independent experiments. The standard deviations were less than 5%.



Table 3  
Potential osmoprotectants for lactic acid bacteria

Additives	[NaCl] and corresponding reduction of growth yield				
	<i>P. pentosaceus</i> <sup>a</sup> (0.8 M = 80%)	<i>T. halophila</i> <sup>a,b</sup> (2.0 M = 70%)	<i>Lc. lactis</i> <sup>c,d</sup> (0.4 M = 70%)	<i>Lb. plantarum</i> <sup>a,e,f</sup> (0.4 M = 58%)	<i>E. faecalis</i> <sup>g</sup> (0.75 M = 90%)
L-Carnitine	+	+ <sup>b</sup>	+ <sup>c, d</sup>	+ <sup>e</sup>	+
Choline	+	+ <sup>b</sup>	- <sup>c,d</sup>	+ <sup>e</sup>	nd
DMSA	+	+ <sup>a</sup>	+ <sup>c</sup>	nd	+
DMSP	-	+ <sup>a</sup>	+ <sup>c</sup>	nd	+
Ectoine	-	+ <sup>a</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>a</sup>	-
Glycine betaine	+	+ <sup>b</sup>	+ <sup>c</sup>	+ <sup>e,f</sup>	+
Pipecolic acid	-	- <sup>a</sup>	- <sup>c</sup>	nd	-
Proline	+	- <sup>a</sup>	- <sup>c, d</sup>	+ <sup>f</sup>	-
Sarcosine	-	- <sup>a</sup>	nd	- <sup>e</sup>	nd
Taurine	-	- <sup>a</sup>	- <sup>d</sup>	nd	nd

Presence (+) or absence (-) of growth stimulatory properties (increased growth rate and maximal OD) of different osmoprotectants on LAB at high osmolarity.

DMSA, dimethylsulfonioacetate; DMSP, dimethylsulfoniopropionate; nd, not determined.

References and strains are as follows: <sup>a</sup> this study; <sup>b</sup> Robert et al. (2000); <sup>c</sup> Uguen et al. (1999) (*Lc. lactis* ADRIA 85 LO 30); <sup>d</sup> Obis et al. (1999) (*Lc. lactis* NCDO 763); <sup>e</sup> Kets et al. (1994) (*Lb. plantarum* P743); <sup>f</sup> Glaasker et al. (1996b) (*Lb. plantarum* ATCC 14917); <sup>g</sup> Pichereau et al. (1999).

#### 3.4. Comparisons with related bacteria and conclusion

Osmoprotectants reported for LAB are summarized in Table 3. *P. pentosaceus* and *T. halophila* exhibit striking differences in their tolerance to salt in defined media, and spectrum of compatible solutes. The behaviour of *P. pentosaceus* is similar to that of *Lb. plantarum*. The main difference was the weaker effect of L-carnitine on the growth of *P. pentosaceus* than that obtained for *Lb. plantarum* (Kets et al., 1994; Glaasker et al., 1996a,b). *T. halophila* has a wider spectrum of compatible solutes including DMSA, DMSP and also ectoine. Further experiments demonstrated that ectoine also significantly restored the growth of *T. halophila* I-13 and *T. muriticus* stressed cells (data not shown). An increase in growth parameters similar to *T. halophila* ATCC33315 was obtained. According to previous data, ectoine has no osmoprotective activity for *Lc. lactis* and *E. faecalis* (Table 3). Preliminary analyses conducted on *Lb. plantarum* NCIMB 8826 provided similar observations at 0.4 and 0.8 M NaCl (data not shown). Taken together, these results suggest that among LAB cited in Table 3, restoration of growth by ectoine under osmotic constraint may be specific to the genus *Tetragenococcus*. This evaluation could provide additional taxonomic information to differentiate *Pediococcus* and *Tetrag*

*nococcus*. Mikkhat et al. (2000) recently proposed the use of glucosylglycerol to similarly differentiate closely related pseudomonads.

#### Acknowledgements

A.B. is the recipient of a fellowship from the Région Aquitaine.

We thank Dr. Yasuji Koyama (Kikkoman Corporation, Japan) and Prof. Jean Delcour (Université Catholique de Louvain, Belgique) for providing the *T. halophila* I-13 and *Lb. plantarum* NCIMB strains, respectively. We are indebted to Kathryn Mayo (ISTAB-Université Bordeaux 1) for critical reading of the manuscript.

#### References

- Bernard, T., Jebbar, M., Rassouli, Y., Himdi-Kabbab, S., Hamelin, J., Blanco, C., 1993. Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 129–136.
- Bhowmik, T., Marth, E.H., 1990. Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: a review. *J. Dairy Sci.* 73, 859–866.
- Bremer, E., Kramer, R., 2000. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In: Storz, G., Hengge-Aronis, R.



- (Eds.), *Bacterial Stress Responses*. ASM Press, Washington, DC, pp. 79–97.
- Caldas, T., Dermont-Caulet, N., Ghazi, A., Richarme, G., 1999. Thermoprotection by glycine betaine and choline. *Microbiology* 145, 2543–2548.
- Collins, M.D., Williams, A.M., Wallbanks, S., 1990. The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* 58, 255–262.
- Csonka, L.N., 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* 53, 121–147.
- Gassem, M.A.A., 1999. Study of the micro-organisms associated with the fermented bread (khamir) produced from sorghum in Gizan region, Saudi Arabia. *J. Appl. Microbiol.* 86, 221–225.
- Glaasker, E., Konings, W.N., Poolman, B., 1996a. Glycine betaine fluxes in *Lactobacillus plantarum* during osmotic and hyperand hypo-osmotic shock. *J. Biol. Chem.* 271, 10060–10065.
- Glaasker, E., Konings, W.N., Poolman, B., 1996b. Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 178, 575–582.
- Glaasker, E., Heuberger, E.H.M.L., Konings, W.N., Poolman, B., 1998. Mechanism of osmotic activation of the quaternary ammonium compound transporter (QacT) of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 180, 5540–5546.
- Halm, M., Lillie, A., Sorensen, A.K., Jakobsen, M., 1993. Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize doughs for kenkey production in Ghana. *Int. J. Food Microbiol.* 19, 135–143.
- Kets, E.P.W., de Bont, J.A.M., 1994. Protective effects of betaine on survival of *Lactobacillus plantarum* subjected to drying. *FEMS Microbiol. Lett.* 116, 251–256.
- Kets, E.P.W., de Bont, J.A.M., 1997. Effects of carnitine on *Lactobacillus plantarum* subjected to osmotic stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 146, 205–209.
- Kets, E.P.W., Galinski, E.A., de Bont, J.A.M., 1994. Carnitine: a novel compatible solute in *Lactobacillus plantarum*. *Arch. Microbiol.* 162, 243–248.
- Kets, E.P.W., Nierop Groot, M., Galinski, E.A., de Bont, J.A.M., 1997. Choline and acetylcholine: novel cationic osmolytes in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 94–98.
- Mikkhat, S., Galinski, E.A., Berg, G., Minkwitz, A., Schoor, A., 2000. Salt adaptation in Pseudomonads: characterization of glucosylglycerol-synthetizing isolates from Brackish coastal waters and the rhizosphere. *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 31–40.
- Obis, D., Guillot, A., Gripon, J.C., Renault, P., Bolotin, A., Mistou, M.Y., 1999. Genetic and biochemical characterization of a high affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters. *J. Bacteriol.* 181, 6238–6246.
- Obis, D., Guillot, A., Mistou, M.Y., 2001. Tolerance to high osmolarity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *cremoris* is related to the activity of a betaine transport system. *FEMS Microbiol. Lett.* 202, 39–44.
- O'Callaghan, J., Condon, S., 2000. Growth of *Lactococcus lactis* strains at low water activity: correlation with the ability to accumulate glycine betaine. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 127–131.
- Olsen, A., Halm, M., Jakobsen, M., 1995. The antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermented maize (kenkey) and their interactions during fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 506–512.
- Pichereau, V., Bourot, S., Flahaut, S., Blanco, C., Auffray, Y., Bernard, T., 1999. The osmoprotectant glycine betaine inhibits salt-induced cross-tolerance towards lethal treatment in *Enterococcus faecalis*. *Microbiology* 145, 427–435.
- Robert, R., Le Marrec, C., Blanco, C., Jebbar, M., 2000. Glycine betaine, carnitine and choline enhance salinity tolerance and prevent the accumulation of sodium to a level inhibiting growth of *Tetragenococcus halophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 509–517.
- Uguen, P., Hamelin, J., Le Pennec, J.P., Blanco, C., 1999. Influence of osmolarity and the presence of osmoprotectant on *Lactococcus lactis* growth and bacteriocin production. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 291–293.
- Van der Heide, T., Poolman, B., 2000. Glycine betaine transport in *Lactococcus lactis* is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity. *J. Bacteriol.* 182, 203–206.

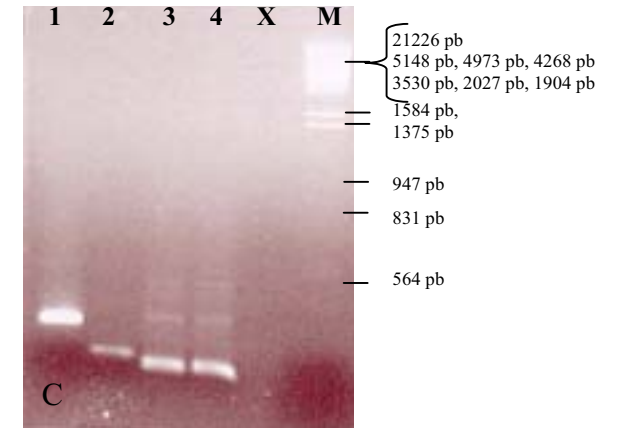
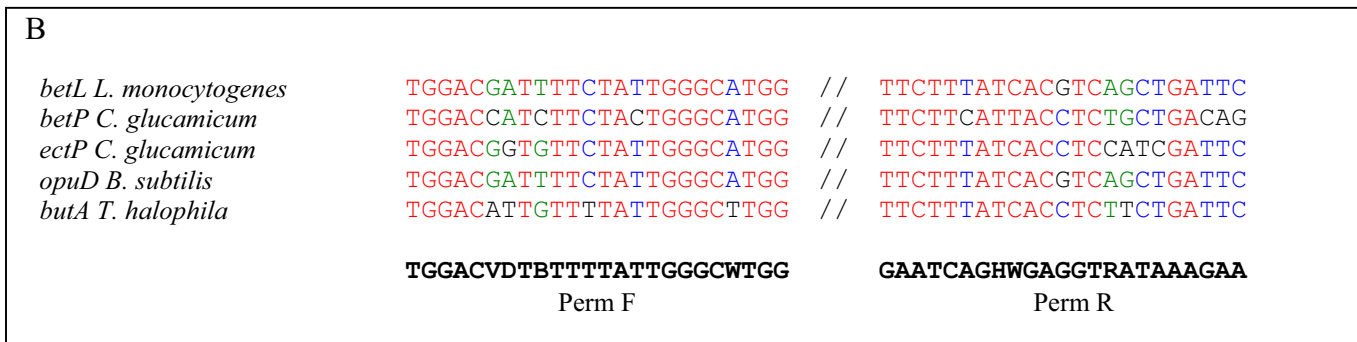
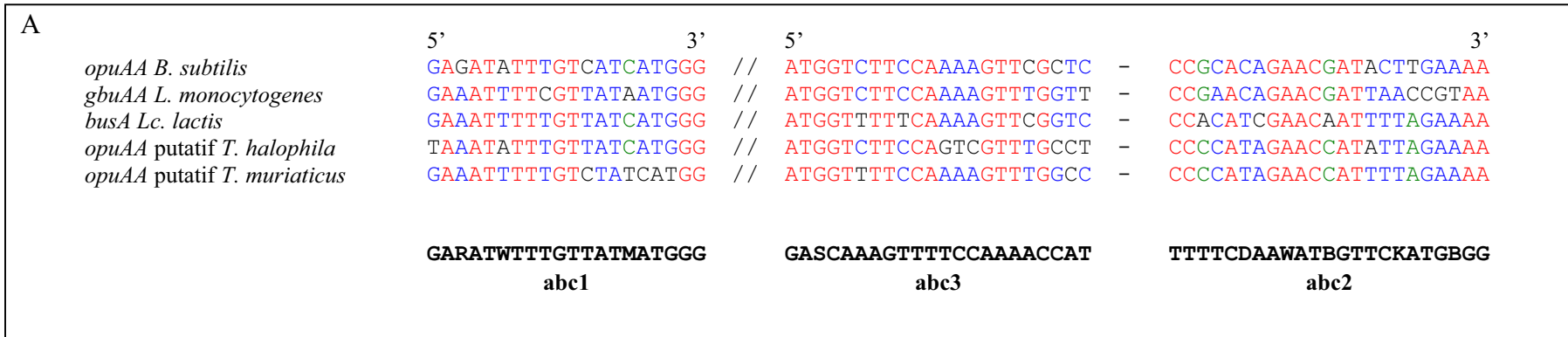


### C) Conclusions et perspectives

Le comportement de *P. pentosaceus* en milieu salin se rapproche de celui de *Lb. plantarum* (Kets *et al.*, 1994 ; Glaasker<sup>b</sup> *et al.*, 1996). Ces bactéries présentent en effet des similitudes en matière de niveaux de tolérances vis-à-vis du sel (CMI en NaCl de l'ordre de 1,5 M ; Tableau<sub>(III)</sub> II) et de spectres de solutés compatibles accumulés (hormis la carnitine dont l'efficacité est moins bonne chez *P. pentosaceus*). D'autre part, elles possèdent toutes deux un système de transport commun pour la GB, la carnitine, et la proline (Glaasker<sup>a</sup> *et al.*, 1998 ; Baliarda *et al.*, 2003). Ces ressemblances peuvent être corrélées au fait que *P. pentosaceus* et *Lb. plantarum* appartiennent au même phylum dans l'arbre phylogénétique des bactéries lactiques. Des bactéries plus éloignées comme *Lc. lactis* ou *O. oeni* semblent moins tolérantes à une élévation de la l'osmolarité extérieure.

Chez les bactéries lactiques pour lesquelles un inventaire des osmoprotectants a été effectué (*P. pentosaceus* / *T. halophila* / *Lc. lactis* / *Lb. plantarum* / *Ent. faecalis*), on note la prépondérance de l'accumulation de GB, de carnitine, de choline et de proline en situation de contrainte hyper-osmotique. L'état des recherches actuelles laisse supposer que chaque membre du groupe des bactéries lactiques possède son propre spectre de solutés compatibles préférentiels. L'ectoïne, par exemple, semble spécifique du genre *Tetragenococcus*, ce qui est probablement à relier au caractère halophile de ce groupe. La choline, quant à elle, n'est pas osmoprotectrice chez *Lc. lactis* tandis qu'elle l'est chez *P. pentosaceus*, *T. halophila*, *Lb. plantarum* et *Ent. faecalis*. La proline intervient dans l'osmoadaptation de *P. pentosaceus* et *Lb. plantarum* mais son rôle est controversé chez *Lc. lactis*. Son taux important dans le vin laisse suggérer un rôle dans l'osmotolérance d'*O. oeni*.

Ces différences en matière de spectre de solutés compatibles accumulés sont probablement basées sur des différences d'équipement en transporteurs en terme de structure, de nombre ou encore d'affinité. Afin de déterminer s'il est possible d'établir une relation entre la capacité de transport d'osmoprotectants et la tolérance au sel au sein du groupe des bactéries lactiques, nous avons initié une recherche de systèmes permettant l'accumulation de GB, un osmoprotectant ubiquitaire chez les bactéries lactiques. Cette recherche a été réalisée par PCR (après identification des motifs conservés) ou par interrogation des banques de données. Les résultats sont présentés dans la partie III suivante.



**Figure<sub>(III)</sub> 5:** définitions des amorces abc1, abc2, abc3 (A) et Perm F, PermR et visualisation des amplifiats PCR Perm F + PermR (1C), abc1 + abc2 (2C) et abc1 +abc3 (3C et 4C) après migration électrophorétique en gel d'agarose 1%.

Les PCR Perm F + PermR, abc1 + abc2 et abc1 +abc3 ont été réalisées sur un échantillon d'ADN génomique de *T. halophila*.

M : marqueur de poids moléculaire Lambda/*EcoRI/HindIII* (Qbiogène)



### III) DIVERSITE DES SYSTEMES PUTATIFS DE TRANSPORT DE GB CHEZ LES BACTERIES LACTIQUES

Les données actuelles sur la réponse des bactéries lactiques au stress osmotique concernent essentiellement les deux modèles *Lc. lactis* et *Lb. plantarum*. A la différence des Entérobactéries et des bactéries à Gram positif comme *B. subtilis*, les bactéries lactiques ne possèdent pas de voies de biosynthèse de solutés compatibles : leur accumulation en réponse à un choc hyper-osmotique est exclusivement due au transport (Robert 2000 ; Roméo *et al.*, 2003). La capacité de réponse au stress hyper-osmotique des bactéries lactiques dépendra donc à la fois de paramètres extrinsèques (nature du pool de solutés compatibles présents dans le milieu, niveau de stress imposé) et de paramètres intrinsèques (nombre de systèmes de transport, spectre et modalité de régulation).

Chez les bactéries lactiques, il existe des différences en matière de CMI en sel et de spectre de solutés compatibles accumulés. La GB est un osmoprotectant de choix (voir revue Galinski, 1995). Il était intéressant d'examiner si la complexité des systèmes de transport d'osmoprotectants peut être corrélée avec les différences de comportement observées en milieu salin. Chez les bactéries lactiques, la composition en transporteurs peut varier tant quantitativement (nombre de systèmes présents), que qualitativement (transporteurs actifs primaires ou secondaires, à large spectre ou à spectre étroit). Chez *Lc. lactis* (CMI = 0,6 M NaCl) et *Lb. plantarum* (CMI = 1,5 M NaCl), un transporteur unique de GB (système à haute affinité) a été décrit. La situation est plus complexe chez *T. halophila* (CMI = 3,5 M NaCl) puisqu'elle utilise une perméase nommée ButA et deux transporteurs ABC potentiels (un système homologue à OpuA partiellement isolé et un système inconnu à l'heure actuelle).

Ainsi, nous disposons aujourd'hui de peu de données permettant de comparer les capacités osmoadaptatives des différentes bactéries lactiques entre elles. Ce groupe bactérien constitue cependant un bon outil d'étude de la réponse au stress osmotique car les microorganismes le composant font preuve d'une grande capacité d'adaptation en s'implantant dans des niches écologiques très variées (végétaux, animaux, sol, aliments...). Lors de cette étude, nous avons évalué l'éventuelle relation entre la composition de l'équipement en systèmes de transport d'osmoprotectants d'une bactérie et sa tolérance vis-à-vis d'un stress hyper-osmotique. Nous avons choisi de nous intéresser aux systèmes de transport de GB chez les bactéries lactiques car (i) la GB est l'osmoprotectant majoritairement employé chez les bactéries [certains transporteurs de GB ont déjà été identifiés : QacT de *Lb. plantarum* (Glaasker<sup>b</sup> *et al.*, 1998), BusA de *Lc. lactis* (Obis *et al.*, 1999) et ButA de *T. halophila* (Baliarda *et al.*, 2003)], (ii) certains de ces systèmes co-transportent d'autres osmoprotectants (Glaasker<sup>a</sup> *et al.*, 1996, Obis *et al.*, 1999).

Nous avons cherché à mettre en évidence la présence de gènes codant des systèmes de transport de GB de type actif secondaire (perméase homologue à ButA de *T. halophila*) et de type

**Tableau<sub>(III)</sub> III : recherche des systèmes de transport de glycine bêtaïne chez les bactéries lactiques étudiées.**

Bactéries	CMI en NaCl	Perméase (Perm F+PermR)	Transporteur ABC (abc1+abc2)	Transporteur ABC (abc1+abc3)
<i>T. halophila</i>	3,5 M	+	+	+
<i>Ent. faecalis</i>	1,7 M	-	+	+
<i>Ca. piscicola</i>	1,5 M	-	-	+
<i>Lb. plantarum</i>	1,5 M	-	-	-
<i>Leu. mesenteroides</i>	1,6 M	-	-	+
<i>O. oeni</i>	1,0 M	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i>	1,5 M	-	-	-

actif primaire (transport ABC homologue à OpuA de *T. halophila* / *Lc. lactis*) chez différentes bactéries lactiques. Il s'agit de bactéries d'intérêt en agro-alimentaire se développant dans des niches écologiques variées (matrices alimentaires différentes) et sur lesquelles peu de données sont disponibles concernant l'osmorégulation et les transporteurs de GB en particulier (*Carnobacterium*, *Leuconostoc* et *Oenococcus*). L'étude de ces systèmes de transport a été menée par PCR et/ou par interrogation des banques données.

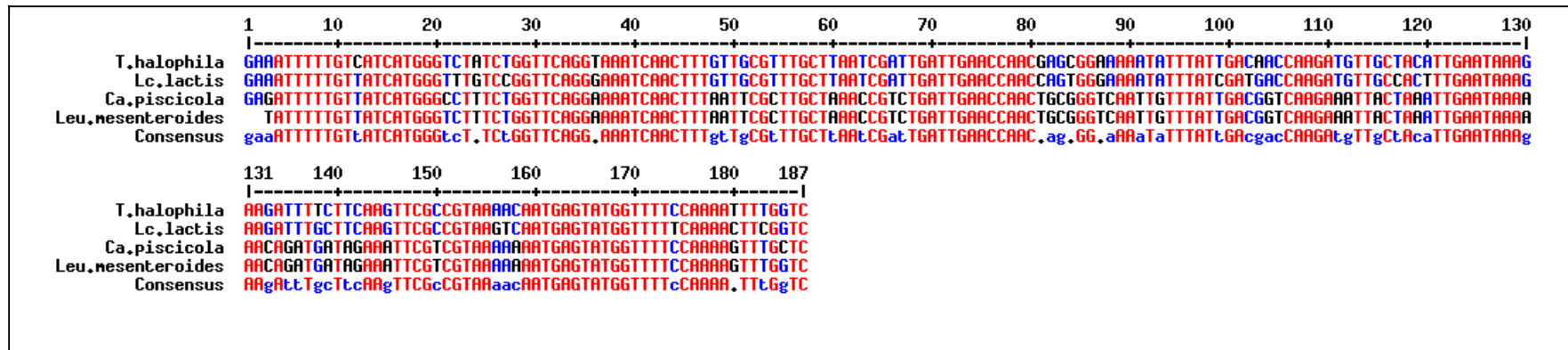
### A) Recherche de gènes homologues à *butA* par PCR

ButA appartient à la famille BCCT et sa séquence protéique montre une très forte homologie avec les systèmes OpuD de *B. subtilis*, BetL de *L. monocytogenes*, BetP de *C. glutamicum*, BetT d'*E. coli* et EctP de *C. glutamicum* (Baliarda *et al.*, 2003). Les comparaisons des séquences protéiques ont révélé la présence de motifs particulièrement conservés :

- ✓ <sup>358</sup>W-T-(L ou I)-F-Y-W<sup>363</sup> : cette séquence correspond aux sept premiers acides aminés du segment transmembranaire VIII des perméases de type ButA ; cette séquence est hautement conservée et potentiellement impliquée dans la translocation du substrat (Saier *et al.*, 1999);
- ✓ <sup>483</sup>F-F-(I ou V)-T-S-(S ou A)-D-S<sup>490</sup> : région moins bien conservée, reliant le dixième segment transmembranaire à un domaine cytoplasmique.

Deux amorces dégénérées (PermF et PermR) ont été définies à partir de ces motifs ; elles permettent d'amplifier un fragment unique de 330 pb à partir des ADNs témoins (*Listeria innocua*, *C. glutamicum*, *B. subtilis* et *T. halophila*) (Figure<sub>(III)</sub> 5C). L'optimisation des paramètres de PCR réalisée sur l'ADN génomique de *T. halophila* montre une amplification optimale pour des températures d'hybridation comprises entre 51°C et 53°C. Des essais d'hybridation réalisés précédemment ont montré l'absence de gènes homologues à *butA* dans les génomes des bactéries lactiques suivantes : *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Ent. faecalis*, *P. acidilactici* et *P. pentosaceus* (Robert, 2000). Aucun amplifiat co-migrant avec ce fragment de 330 pb n'a été obtenu à partir des ADNs de *P. pentosaceus*, *Carnobacterium piscicola*, *Leu. mesenteroides*, *O. oeni*, *Lb. plantarum* ou *Ent. faecalis* (Tableau<sub>(III)</sub> III). La diminution progressive de la température d'hybridation (jusqu'à 42°C) ne conduit pas à l'apparition d'amplifiats susceptibles de correspondre à un fragment correspondant au gène du transporteur recherché.

Enfin, l'analyse informatique des génomes (complets ou en cours de séquençage) des bactéries lactiques (Tableau<sub>(I)</sub> IX) confirme qu'aucun transporteur de GB de type perméase n'est présent chez les bactéries étudiées.



Figure(III) 6 : alignement des séquences nucléotidiques des fragments abc1+abc2 obtenues à partir des ADNs génomiques de *T. halophila*, *Ca. piscicola*, *Leu. mesenteroides* avec la portion du génome de *Lc. lactis* correspondante (Multalin version 5.4.1 ; Corpet, 1988)

## B) Recherche de transporteurs de type OpuA/BusA

Une stratégie similaire a été utilisée pour rechercher la présence d'un transporteur ABC de type OpuA/BusA chez les bactéries lactiques étudiées. OpuA/BusA est le transporteur unique de GB chez *Lc. lactis* (Obis *et al.*, 1999) et un fragment du gène codant l'ATPase du système (OpuAA) a été identifié chez *T. halophila* et *T. muriaticus* (Robert, 2000). Le couple d'amorce utilisé (abc1 et abc2) avait été initialement proposé après alignement des séquences protéiques OpuAA de *B. subtilis*, BusAA de *Lc. lactis*, et GbuAA de *L. monocytogenes*. La spécificité de cette PCR vis-à-vis des génomes des bactéries lactiques a été augmentée en employant un second couple d'amorces (abc1+abc3). L'amorce abc3 a été définie en amont d'abc2, en incluant dans les comparaisons les séquences nucléotidiques des amplifiats abc1+abc2 de *T. halophila* et *T. muriaticus* (Figure<sub>(III)</sub> 5A).

Les amplifiats obtenus sur les différents ADNs témoins ont une taille de 216 pb (abc1+abc2) et 187 pb (abc1+abc3) (Figure<sub>(III)</sub> 5C). L'optimisation des paramètres de PCR réalisée sur l'ADN génomique de *T. halophila* montre une amplification optimale pour une température d'hybridation de 48°C pour ces deux couples d'amorces.

La recherche du gène *opuAA* par PCR chez les bactéries lactiques a été menée en employant le couple d'amorce abc1+abc2 et le couple d'amorce abc1+abc3. Des amplifiats de taille attendue ont été observés à partir des ADNs génomique de *Leu. mesenteroides* (amorces abc1+abc3, T<sub>m</sub> de 48°C) et *Ca. piscicola* (amorces abc1+abc2 et abc1+abc3, T<sub>m</sub> de 48°C) et leur séquence déterminée. Les séquences protéiques sont fortement homologues aux séquences OpuA/BusA des bactéries à Gram positif (Figure<sub>(III)</sub> 6). Aucun signal n'a été obtenu à partir des ADNs chromosomiques d'*O. oeni*, de *P. pentosaceus* et de *Lb. plantarum*, et ceci quelle que soit la spécificité de la réaction de PCR (diminution de la température d'hybridation de 48°C à 42°C) (Tableau<sub>(III)</sub> III).

L'analyse informatique des génomes (complet ou en cours de séquençage) confirme la présence d'un système de type OpuA chez *Leu. mesenteroides* et son absence chez *O. oeni*, *P. pentosaceus* et *Lb. plantarum*.

## C) Autres transporteurs de GB chez les bactéries lactiques

Les espèces *Lb. plantarum*, *O. oeni* et *P. pentosaceus* ne possèdent pas de transporteurs de types ButA et OpuA. Or, elles accumulent de la GB en situation de contrainte osmotique (Baliarda *et al.*, 2003). Ces données suggèrent donc l'existence d'un troisième type de transporteur de GB chez ces trois bactéries. Des travaux préalables ont établi que *Lb. plantarum* possède un système de transport de GB nommé QacT capable de transporter aussi la carnitine et la proline (Glaasker<sup>b</sup> *et al.*, 1998). L'examen du génome montre qu'il pourrait s'agir d'un système de type

**Tableau<sup>(III)</sup> IV : bilan de la recherche de transporteur de glycine bétaine chez les bactéries lactiques étudiées soit par PCR soit par analyse informatique des génomes.**

Les bactéries pour lesquelles les génomes sont en cours de séquençage sont figurées en souligné

Microorganisme	ButA		OpuA		OpuC	ChoQ/S
	PCR	Génome	PCR	Génome	Génome	Génome
<i>T. halophila</i>	+	nd	+	nd	nd	nd
<i>Ent. faecalis</i>	-	-	+	+	+	+
<i>Ca. piscicola</i>	-	nd	+	nd	nd	nd
<i>Lb. plantarum</i>	-	-	-	-	+	+
<u><i>Leu. mesenteroides</i></u>	-	-	+	+	-	+
<u><i>O. oeni</i></u>	-	-	-	-	-	-
<u><i>P. pentosaceus</i></u>	-	-	-	-	+	+
<i>Lc. lactis</i>	-	-	+	+	-	+

OpuC (dont les quatre composants sont nommés OpuA, OpuB, OpuC et OpuD), homologue aux systèmes OpuC de *L. monocytogenes*, de *B. subtilis* et de *S. aureus*. Chez *B. subtilis*, OpuC est un système dit d'urgence, présentant un large spectre (GB, ectoïne, carnitine et choline ; voir revue Bremer et Krämer, 2000) mais incapable de transporter la proline (rôle spécifique d'OpuE ; Von Blohn *et al.*, 1997).

Une recherche informatique visant à déterminer s'il existe des systèmes de transport de GB de type OpuC chez les bactéries lactiques étudiées dont les génomes sont séquencés (ou en cours de séquençage) a alors été menée. Elle montre que *P. pentosaceus*, *Lb. plantarum*, *Leu. mesenteroides*, *O. oeni*, *Ent. faecalis* possèdent des loci de type *opuC* au sein de leur génome (système à quatre composants) (Tableau<sub>(III)</sub> IV). *Lc. lactis* n'en possède pas (BusA étant l'unique transporteur de GB ; Obis *et al.*, 1999). OpuC pourrait correspondre au troisième transporteur de GB dont l'existence est suggérée chez *T. halophila*. La recherche d'un tel système chez les bactéries lactiques dont les génomes ne sont pas séquencés (ou en cours de séquençage) nécessite la définition de nouvelles amorces PCR spécifiques du locus *opuC*. Une première série d'alignement des séquences nucléotidiques des gènes codant l'ATPase du système n'a pas permis de localiser des motifs conservés suffisamment distants pour être employés pour dessiner des amorces PCR.

De ces résultats émerge une classification possible des bactéries lactiques en quatre groupes (Tableau<sub>(III)</sub> IV). Le premier groupe comprend les bactéries ButA<sup>+</sup> OpuA<sup>+</sup> OpuC<sup>+</sup> (*T. halophila* en serait l'unique représentante). Le second regroupe les bactéries ButA<sup>-</sup> OpuA<sup>+</sup> OpuC<sup>+</sup> comme *Ent. faecalis* et *Leu. mesenteroides*. Le troisième groupe rassemble les bactéries ButA<sup>-</sup> OpuA<sup>-</sup> OpuC<sup>+</sup> comme *Lb. plantarum*, *O. oeni* et *P. pentosaceus*. Le dernier groupe comprend les bactéries ButA<sup>-</sup> OpuA<sup>+</sup> OpuC<sup>-</sup> comme *Lc. lactis*. Le génome de *Ca. piscicola* n'étant actuellement pas séquencé, il n'est pas possible de déterminer si cette bactérie appartient au deuxième ou au quatrième groupe.

#### D) Cas du transporteur putatif de choline et de GB ChoQ/S

L'analyse des génomes de *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *Ent. faecalis*, *Leu. mesenteroides* révèle également l'existence d'un locus de type *choQ/S* annoté comme transporteur putatif de choline et de GB. ChoQ est une protéine de fixation de l'ATP qui ressemble à celles de systèmes OpuC et OpuB des bactéries à Gram positif. Les protéines ChoQ de *Lc. lactis* et de *Lb. plantarum* sont fortement homologues à OpuBA de *L. monocytogenes*. ChoS est la perméase du système, elle a également des homologues dans les génomes des bactéries lactiques *Ent. faecalis*, *Ent. faecium*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans* et *Leu. mesenteroides*. Chez *Lc. lactis*, le rôle osmoprotecteur de la choline reste controversé. Il est plus clair chez *P. pentosaceus* et *T. halophila*. Chez *Lc. lactis* et





*Lb. plantarum*, il existe un seul transporteur de GB, il est donc peu probable que le système ChoQ/S co-transporte la GB et la choline.

### E) Conclusions et perspectives

Notre étude démontre l'existence d'équipement en transporteur différents au sein de la famille des bactéries lactiques tant quantitativement (trois systèmes de transport chez *T. halophila* pour un seul chez *Lb. plantarum*, *Leu. mesenteroides*, *P. pentosaceus* et *Lc. lactis*) que qualitativement (transporteurs actifs primaire ou secondaire). Quatre groupes distincts sont suggérés selon la présence de systèmes ButA, OpuA et/ou OpuC [groupe 1 : présence du locus *butA* (*T. halophila*), groupe 2 : présence du locus *opuAA* (*Leu. mesenteroides* et *Lc. lactis*), groupe 3 : présence du locus *opuC* (*Lb. plantarum* et *P. pentosaceus*), groupe 4 : présence des loci *opuAA* et *opuC* : *Ent. faecalis*]. Cette diversité suppose l'existence de mécanismes de régulation de ces systèmes de transport différents suivant les microorganismes.

La connaissance des voies de transport d'autres osmoprotectants pourrait améliorer cette classification. La démonstration d'un rôle de ChoQ/ChoS dans l'osmorégulation chez les bactéries lactiques et la caractérisation du spectre de solutés compatibles transportés pourrait ajouter un critère supplémentaire dans la classification initiée. Ces résultats pourraient alors offrir une méthode alternative en matière d'identification rapide des bactéries lactiques en matrice alimentaire complexe (PCR multiplexe suivie d'une électrophorèse dénaturante sous gradient ou DGGE par exemple).

La diversité de transporteurs suppose l'existence de mécanismes de régulation différents suivant la bactérie lactique considérée. Ainsi, une bactérie ne possédant qu'un seul transporteur de GB, comme *Lc. lactis*, doit contrôler rapidement son activité/expression en fonction de l'osmolarité extérieure. *T. halophila*, qui possède plusieurs systèmes de transport de GB, assure un contrôle différent du transport de GB. Il repose sur une expression globalement constitutive des transporteurs ainsi que sur une diversité dans les spectres d'osmoprotectants et/ou les affinités vis-à-vis des osmoprotectants différents.



## CHAPITRE II : REPOSE AU STRESS CHEZ *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS*

### I) CHOIX DES PARAMETRES DE STRESS

#### A) Nature des stress

L'espèce *P. pentosaceus* est une bactérie lactique d'intérêt industriel. Elle est utilisée comme ferment en industrie agroalimentaire, en tant que probiotique ou encore participe à l'implantation de biofilms positifs en élevage ; *P. pentosaceus* est également un contaminant notoire de certains alcools.

Nous avons choisi d'étudier la réponse de cette bactérie à quatre stress qu'elle est susceptible de rencontrer dans des contextes agroalimentaires ou biotechnologiques : le stress osmotique (salage, déshydratation de l'aliment, lyophilisation des ferments), le stress acide (abaissement du pH en fin de fermentation, acidité de l'estomac), le stress thermique (chauffage de l'aliment) et le stress éthanolique (présence de différents degrés d'alcool dans les boissons de type bière ou vin).

#### B) Intensité des stress

Dans leur environnement alimentaire, les bactéries sont soumises à différents types de variations du milieu extérieur. En effet ces dernières peuvent être plus ou moins intenses, et également plus ou moins progressives (diminution du pH en cours de fermentation, réfrigération des denrées alimentaires...). Nous pouvons distinguer les **stress long-terme** (durée d'exposition supérieure à plusieurs heures) des stress **court-terme** (durée d'exposition inférieure à quelques heures).

Le second paramètre est l'**intensité**.

Une condition de stress est donc définie suivant un couple durée/intensité qui sera à même de ralentir la croissance (**stress sub-optimal**), de la stopper (**stress sub-létal**) ou de provoquer la mort du microorganisme (**stress létal**).

Lors de cette étude, nous avons étudié différents chocs provoquant une létalité massive et brutale. Nous avons recherché les conditions de préadaptation permettant d'augmenter la survie de *P. pentosaceus*. Nous avons ensuite étudié la croissance de ce dernier en milieu hostile (stress sub-optimal). Les conditions de préadaptation favorisant cette croissance ont été recherchées.



### C) Influence du milieu de culture

Le milieu MRS (de Man *et al.*, 1960), milieu complexe et très riche, est couramment utilisé pour cultiver les bactéries lactiques auxotrophes. Cependant, ce milieu contient des sources en osmoprotectants (extraits de levure, extraits de viande, peptones) pouvant minimiser l'impact des stress, notamment celui du stress salin. Un second milieu, dépourvu de sources importantes d'osmoprotectants, a donc été choisi pour étudier la physiologie du stress (notamment salin) chez *P. pentosaceus* ATCC 33316. Il s'agit du milieu chimiquement défini ou DM (Robert *et al.*, 2000).

### D) Méthodes d'évaluation de l'impact des stress

La mesure de la turbidité de la suspension bactérienne au cours du temps (mesure de la valeur de DO<sub>600nm</sub> finale et du taux de croissance  $\mu$ ) permettra d'évaluer l'effet d'un stress sur la croissance de *P. pentosaceus* (définition des paramètres de stress sub-optimal ou sub-létal).

L'impact d'un stress létal sur la viabilité de *P. pentosaceus* sera mesuré, par dénombrement des cellules viables et cultivables sur milieu gélosé non stressant (gélose MRS), afin de calculer le taux de mortalité à l'issue de chaque traitement (i. e. concentration cellulaire avant le stress/concentration cellulaire après le stress).

L'évaluation de l'impact d'un stress de type choc sur l'activité métabolique de *P. pentosaceus* sera réalisée par impédancemétrie (mesure de la conductance du milieu de culture au cours de la croissance).

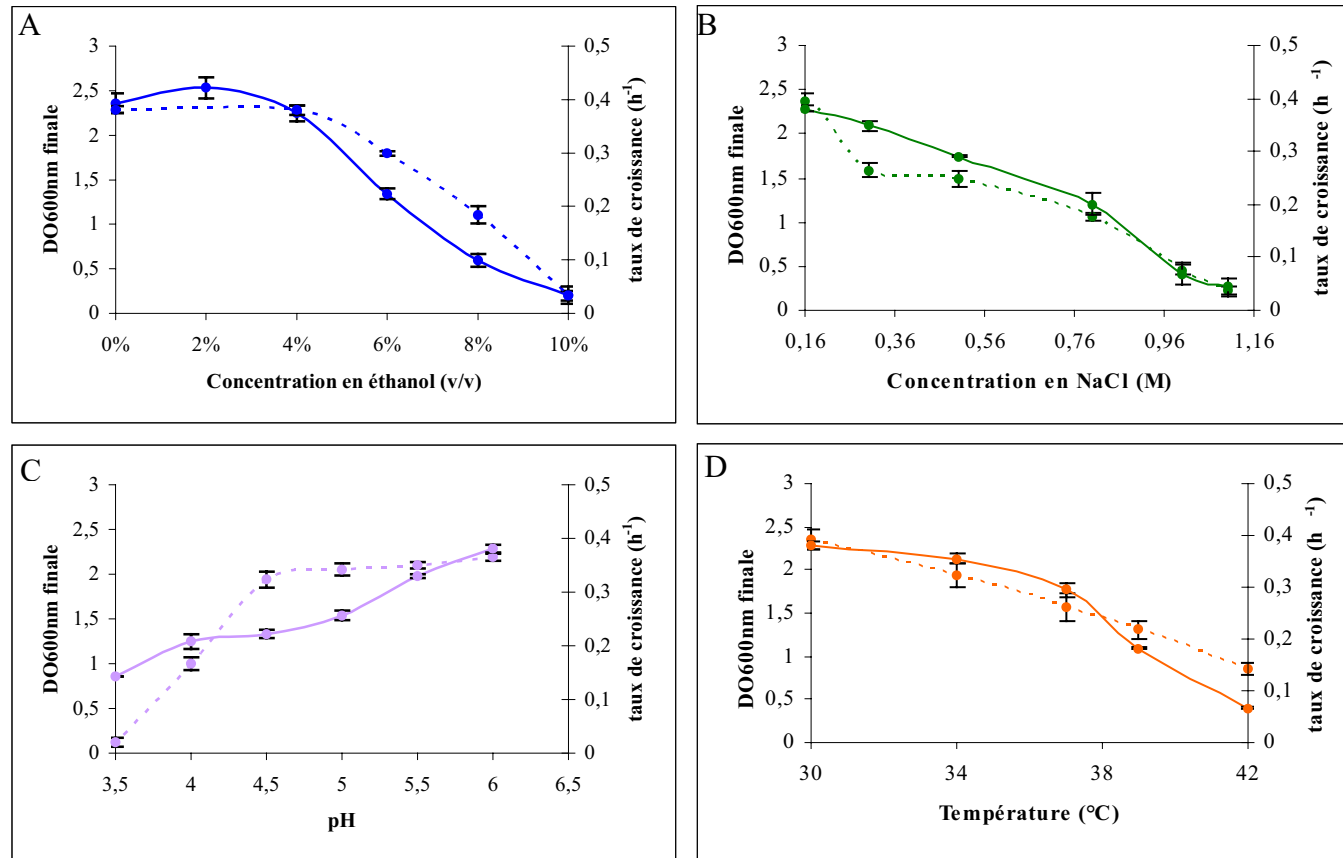
## II) STRESS SUB-OPTIMAL CHEZ *P. PENTOSACEUS*

L'impact de différents stress (acide, éthanolique, chaud ou salin) sur la croissance de *P. pentosaceus* a été étudié en milieu DM. Le milieu jouera un moindre rôle dans l'apport immédiat de molécules aidant à surmonter le stress.

Les effets recherchés le sont en terme de réduction des paramètres de croissance et de modification de la survie des cellules en phase stationnaire.

### A) Détermination des conditions de stress sub-optimal

Des cellules issues d'une préculture de nuit en milieu DM sont employées pour inoculer différentes aliquotes de ce même milieu : DM salé [concentration en NaCl de 0,16 M (optimum de croissance) à 1,10 M], DM alcoolisé [concentration en éthanol (v/v) de 0% (optimum de croissance) à 8%], DM acide [pH de 6,4 (optimum de croissance) à 3,5] ou DM chauffé [température



**Figure<sub>(III)</sub> 7 : effets de différents stress sur les paramètres de croissance de *P. pentosaceus* ATCC 33316 en milieu DM.**

Les valeurs de la DO<sub>600nm</sub> finales sont représentées en ligne pointillée. Les valeurs de taux de croissance sont représentées en trait plein.

(A) stress éthanolique. (B) stress salin. (C) stress acide. (D) stress thermique chaud.

Ces valeurs sont le résultat d'au moins trois expériences différentes, les écart types sont indiqués au niveau de chaque point.

d'incubation de 30°C (optimum de croissance) à 42°C]. L'impact de tels stress sur les valeurs de  $\mu$  et de  $DO_{600nm}$  finale atteintes est représenté dans la figure(III) 7.

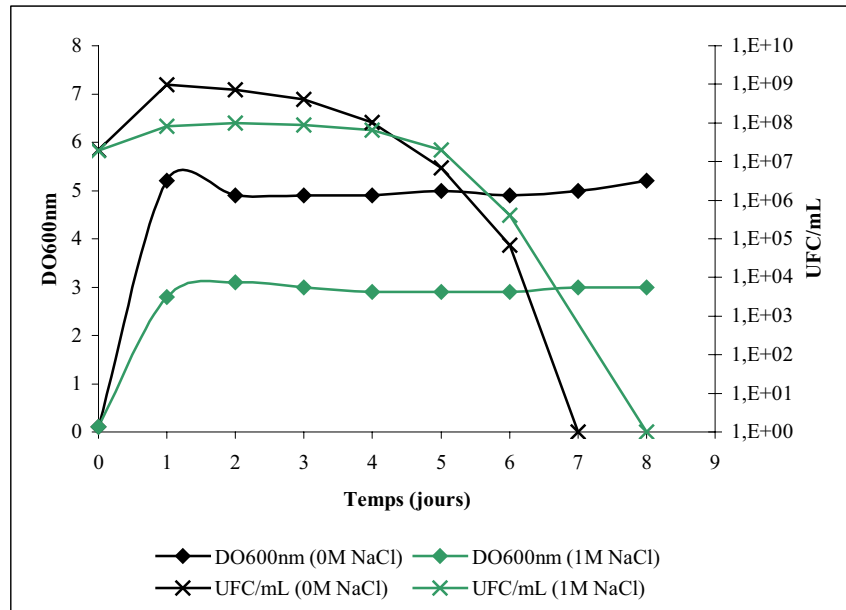
Le **stress thermique** provoque une diminution progressive du  $\mu$  et de la  $DO_{600nm}$  maximale (Figure(III) 7A). On observe une relation quasi linéaire entre l'augmentation de la température d'incubation et la diminution de la  $DO_{600nm}$  finale ( $R^2 = 0,99333$  ; Figure(III) 7B).

Le **stress éthanolique** provoque, quant à lui, une réduction du  $\mu$  et de la  $DO_{600nm}$  maximale pour des concentrations supérieures à 4% (v/v) (Figure(III) 7B).

La croissance de *P. pentosaceus* à un **stress hyper-osmotique** est un phénomène biphasique : le taux de croissance de la souche décroît progressivement pour des concentrations en NaCl inférieures à 0,8 M puis plus rapidement au-delà. Les valeurs de  $DO_{600nm}$  finale diminuent lentement pour des concentrations en NaCl inférieures à 0,3 M, puis rapidement au-delà. Ce double impact du stress hyper-osmotique sur la physiologie de la bactérie suggère que l'ajout de NaCl dans le milieu modifie les capacités de la souche à utiliser les nutriments du milieu (la DO finale atteinte est affectée avant le taux de croissance). Des travaux réalisés chez *Lactobacillus sakei* dans un milieu de culture synthétique similaire au DM ont montré que l'ajout de NaCl dans le milieu provoque la diminution de la densité cellulaire et du taux de croissance de la bactérie (Marceau *et al.*, 2003) comme c'est le cas chez *P. pentosaceus*. Toutefois, ces expériences, réalisées seulement avec deux concentrations salines différentes (0,7 M et 1,5 M NaCl), ne permettent donc pas de déterminer si la réponse au stress hyper-osmotique sub-optimal est également un phénomène biphasique chez *Lb. sakei*.

Le **stress acide** provoque une diminution du taux de croissance. Cette chute est significative pour des valeurs de pH supérieures à pH 5,5 et inférieures à pH 4,5 (stabilisation du  $\mu$  pour des valeurs de pH comprises entre pH 5,5 et pH 4,5). La  $DO_{600nm}$  finale décroît uniquement pour de très faibles valeurs de pH (pH inférieur à 3,5).

En milieu chimiquement défini, *P. pentosaceus* est capable de croître entre 0,16 M et 1,10 M NaCl, 0% et 8% d'éthanol (v/v), pH 6,4 et 3,5, 30°C et 42°C. La résistance de ce microorganisme vis-à-vis du sel, de la chaleur et de l'acide semble caractéristique des bactéries non halotolérantes (Kuchner, 1978), mésophiles (Bergey's manual, 1996) appartenant à la famille des bactéries lactiques (Axelsson, 1998 ; van de Gutche, 2002). La souche *P. pentosaceus* ATCC33316, isolée à partir de bière, est capable de se développer dans un environnement alcoolisé (jusqu'à plus de 8% d'éthanol).



Figure<sub>(III)</sub> 8 : effet du sel sur la croissance de *P. pentosaceus* (mesure de DO<sub>600nm</sub> au cours du temps) et la viabilité de *P. pentosaceus* en phase stationnaire (numération du nombre de cellules viables et cultivables sur milieu gélosé).



Ces données permettent une première estimation des conditions minimales de culture inhibant la croissance de *P. pentosaceus* en milieu DM [concentration en NaCl >1,10M ; concentration en éthanol >8% (v/v) ; pH <3,5 et température d'incubation >42°C]. Ces valeurs sont cohérentes avec celles qui ont été estimées en milieu MRS [concentration en NaCl=1,5 M ; concentration en éthanol >10% (v/v) ; pH <4 et température d'incubation =50°C]. Ces résultats préliminaires indiquent que le milieu chimiquement défini DM ne sensibilise pas particulièrement *P. pentosaceus* aux stress étudiés. Aussi, nous pouvons conclure que la résistance de cette bactérie observée en milieu DM reflète ses capacités intrinsèques de tolérance vis-à-vis du stress (pas de biais dû à la composition du milieu sauf probablement pour le stress salin).

### **B) Croissance en situation de stress sub-optimal et survie de *P. pentosaceus***

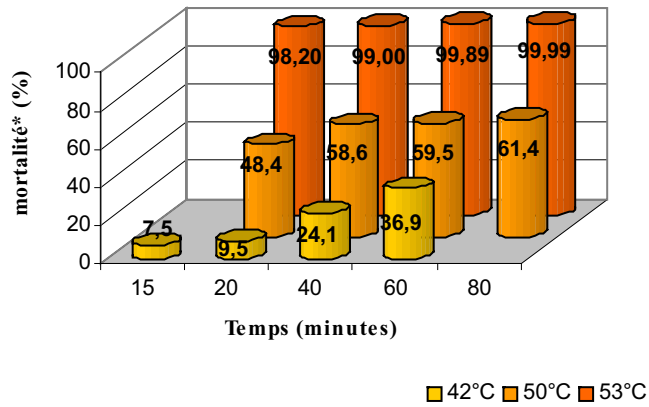
Des cellules issues d'une préculture de nuit en milieu MRS sont inoculées soit dans du MRS salé (condition de stress sub-optimal : 1 M NaCl < CMI en NaCl) soit dans du MRS non stressant. L'évolution de chacune de ces populations est estimée journalièrement par mesure de la turbidimétrie du milieu et numération. Le résultat de ces expériences est représenté dans la figure(III) 8.

L'entrée en phase stationnaire s'accompagne d'une chute de la survie des cellules cultivées en MRS 0 M NaCl: elle est lente entre le second et le quatrième jour de culture, puis elle est rapide entre le cinquième et le septième jour. La valeur de DO<sub>600nm</sub> atteinte à l'entrée de la phase stationnaire ne décroît pas par la suite. La perte de viabilité ne s'accompagne donc pas de la lyse cellulaire chez *P. pentosaceus* ATCC33316.

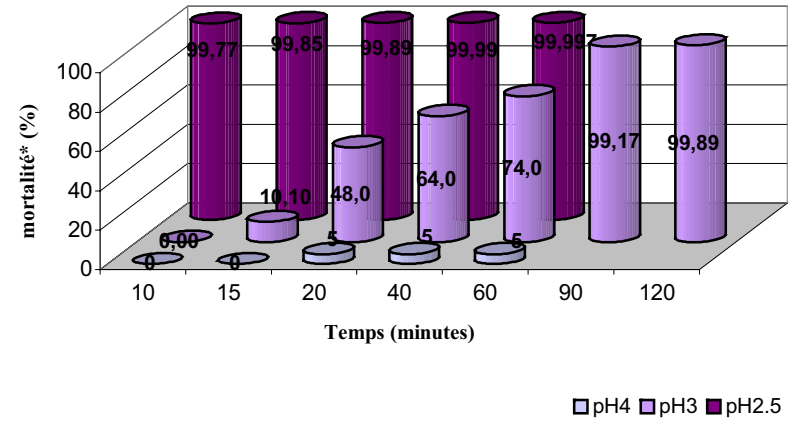
Lorsque *P. pentosaceus* est cultivée en MRS 1 M NaCl (contrainte hyper-osmotique sub-optimale) ses capacités de croissance sont diminuées (ralentissement de la croissance et réduction de la DO<sub>600nm</sub>). Sa survie en phase stationnaire est cependant meilleure (stabilisation de ce nombre entre le second et le cinquième jour de culture et décroissance rapide du nombre de cellules viables et cultivables entre le sixième et le huitième jour). La survie est prolongée d'un jour par rapport aux cellules cultivées en MRS 0 M NaCl.

Ces résultats suggèrent que le stress hyper-osmotique sub-optimal utilisé (1 M NaCl en milieu MRS) améliore la survie de *P. pentosaceus* en phase stationnaire et prolonge sa durée de vie. Des résultats similaires ont été obtenus chez *Lb. sakei* 23K en présence d'un stress hyper-osmotique (0,7 M ou 1,5 M NaCl) et/ou d'un stress thermique (diminution de la température en dessous de 30°C) (Marceau *et al.*, 2003). Les cellules stressées voient leur croissance en phase exponentielle ralentir (diminution du taux de croissance) et leur survie en phase stationnaire augmenter

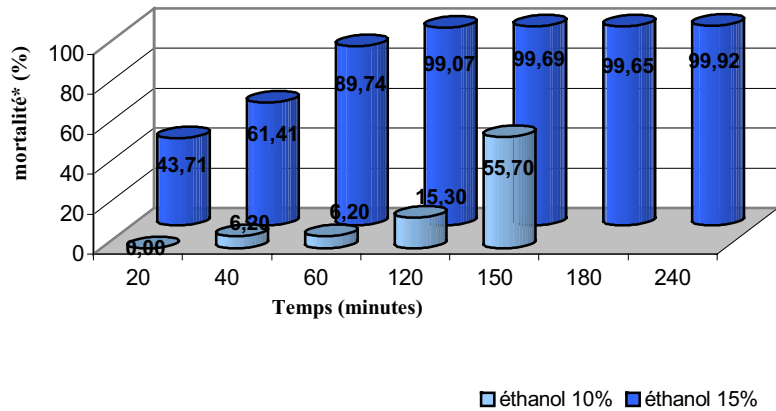
**A : CONTRAINTE THERMIQUE**



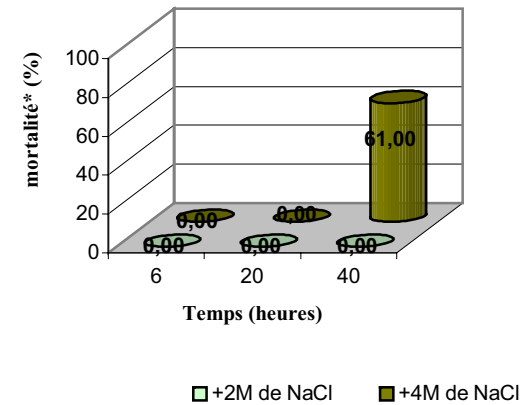
**B : CONTRAINTE ACIDE**



**C : CONTRAINTE ETHANOLIQUE**



**D : CONTRAINTE SALINE**



**Figure<sub>(III)</sub> 9 : effets de divers stress de type choc (de nature, d'intensité et de durée différentes) sur la mortalité de cellules de *Pediococcus pentosaceus* prélevées en phase exponentielle de croissance.**

A : stress thermique, B: stress acide, C: stress éthanolique, D: stress salin.

\* mortalité: perte de l'aptitude à se développer sur milieu riche (cellules mortes + cellules VNC).

chute de la population d'une unité logarithmique : 90% de mortalité ; chute de la population de deux unités logarithmique : 99% de mortalité , chute de la population de trois unités logarithmique : 99,9% de mortalité

(prolongation de la durée de vie jusqu'à 15 jours supplémentaires). Les auteurs de ces travaux supposent que les stratégies de réponse aux stress développées par *Lb. sakei* visent à améliorer sa survie plutôt que sa croissance. Cette bactérie ralentirait certaines de ses activités métaboliques pour s'engager pleinement dans les mécanismes d'adaptation au stress. Marceau *et al.* (2002) ont montré, par une approche protéomique, que la 6-P- fructokinase de *Lb. sakei* (enzyme clef de la glycolyse) est réprimée en présence d'un stress osmotique ou thermique.

### III) LE STRESS DE TYPE CHOC CHEZ *P. PENTOSACEUS* : SURVIE CELLULAIRE ET ACTIVITE METABOLIQUE

Des stress de nature différente, dont l'intensité et la durée varient, ont été appliqués à des cellules de *P. pentosaceus* prélevées en phase exponentielle de croissance. Leur effet sur la survie a été mesuré.

Dans un second temps, nous avons cherché à améliorer la survie à un choc intense en pré-adaptant les cellules dans des conditions de stress modéré.

#### A) Effet d'un choc sur la viabilité de *P. pentosaceus* (MRS)

Des cellules en phase exponentielle précoce sont brutalement exposées à différents stress : thermique (42°C, 50°C, 53°C), acide (pH 4,0 ; 3,0 et 2,5) éthanolique (10% et 15% d'éthanol) et osmotique (2M et 4M NaCl). Chaque condition est appliquée pendant des durées différentes. Les pourcentages de mortalité associés à chaque traitement sont représentés dans la figure<sub>(III)</sub> 9.

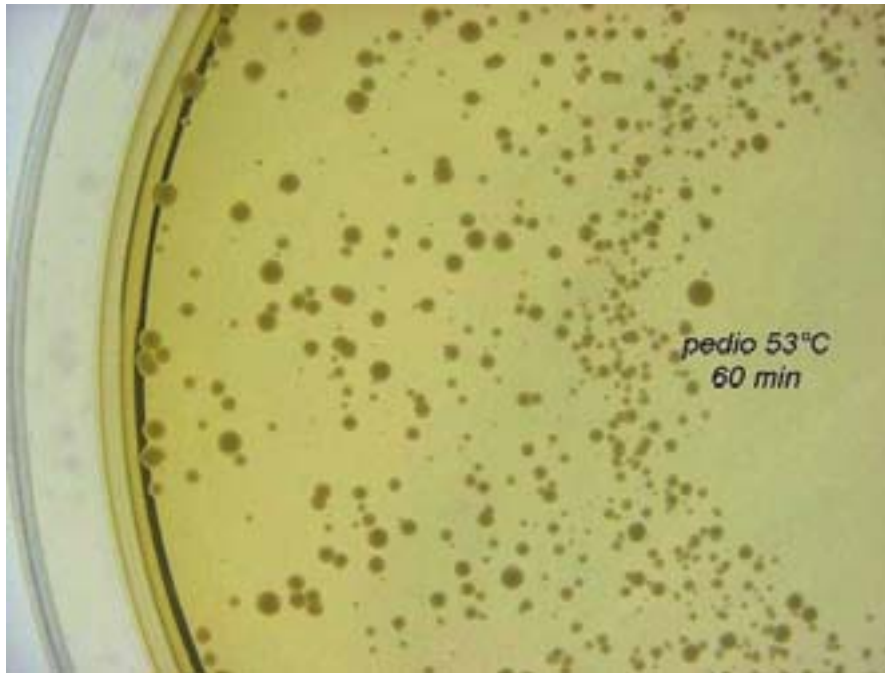
**Un choc thermique** consistant à augmenter brutalement la température d'incubation de 37°C à 42°C ou à 50°C n'entraîne qu'une faible mortalité (inférieure à une unité logarithmique, Figure<sub>(III)</sub> 9A). L'augmentation de la température à 53°C produit une forte mortalité (supérieure à une unité logarithmique, Figure<sub>(III)</sub> 9A). Les paramètres de stress les plus drastiques testés dans cette étude (53°C pendant 80 min) produisent la mortalité la plus importante (de l'ordre de trois unités logarithmique, Figure<sub>(III)</sub> 9A). La tolérance de *P. pentosaceus* ATCC33316 à la chaleur (98,2% de mortalité après un traitement de 20 min à 53°C, Figure<sub>(III)</sub> 9A) est proche de celle observée chez *O. oeni* LOD004 (99,6% de mortalité après un traitement de 30 min à 53°C ; Garbay et Lonvaud-Funel, 1996). La bactérie apparaît plus sensible à la chaleur que *Lb. acidophilus* LA1-1 (pas de mortalité après un traitement de 30 min à 53°C ; Kim *et al.*, 2001).



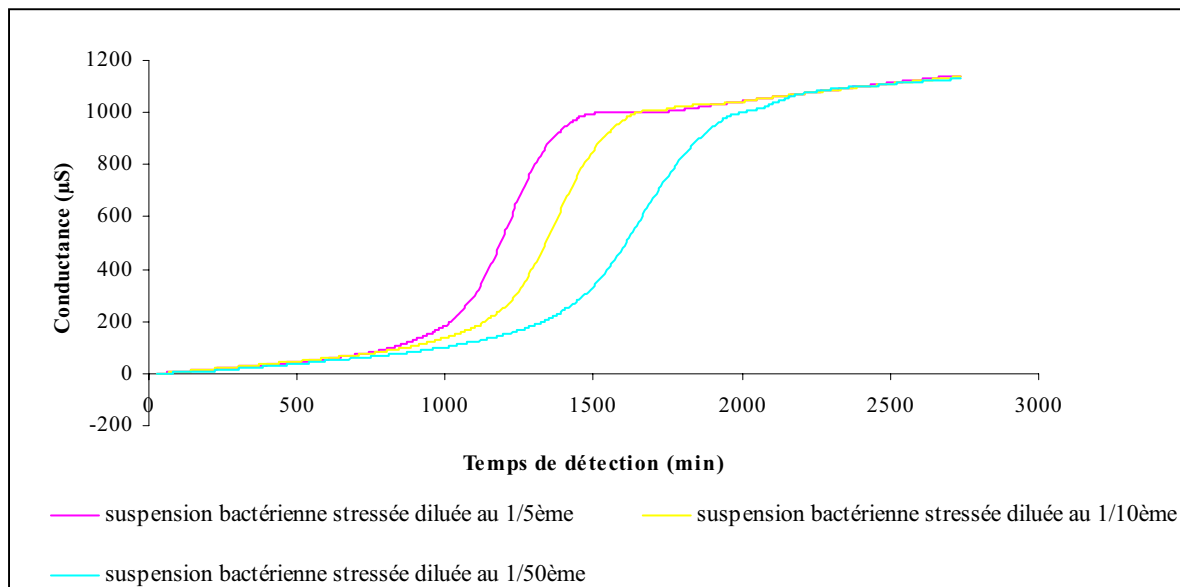
**Un choc acide** consistant à réduire le pH du milieu de culture pH 6,5 à pH 4,0 est très faiblement létal pour *P. pentosaceus* (5% de mortalité après un traitement de 60 min, Figure<sub>(III)</sub> 9B). Lorsque le pH du milieu de culture est abaissé à pH 3,0 on observe que la mortalité augmente avec le temps d'incubation (de 10,1 % pour un traitement de 15 min à 99,89% pour un traitement de 120 min, Figure<sub>(III)</sub> 9B). La mortalité la plus importante dans cette série d'expériences est observée pour une réduction du pH du milieu de culture de pH 6,5 à pH 2,5 (mortalité supérieure à 99% après des traitements supérieurs ou égaux à 10 min, Figure<sub>(III)</sub> 9B). *P. pentosaceus* ATCC3316 présente ici un bon niveau de tolérance au stress acide (74% et 99,89% de mortalité après des traitements de 60 et 120 min à pH 3,0, Figure<sub>(III)</sub> 9B) comparativement à *Lc. lactis* spp *lactis* LL41-1 (99% et moins de 99,99% de mortalité après 60 et 120 min de traitements à pH 2,8, Kim *et al.*, 2002), *Lb. acidophilus* CRL639 (environ 99% de mortalité après 60 min de traitement à pH 3,0, Lorca et Font de Valdez, 2001) et *Ent. faecalis* ssp *faecalis* ATCC19433 (99,994% de mortalité après 30 min de traitement à pH3,2, Flahaut<sup>b</sup> *et al.*, 1996).

**Un choc éthanolique** consistant à ajouter 10% d'éthanol (v/v) au milieu de culture n'entraîne qu'une faible mortalité (inférieure à une unité logarithmique, Figure<sub>(III)</sub> 9C). Lorsque 15% d'éthanol sont ajoutés au milieu de culture, 120 minutes de traitement suffisent pour atteindre une forte mortalité (supérieure à une unité logarithmique, Figure<sub>(III)</sub> 9C). Parmi les paramètres testés, la plus forte mortalité est obtenue pour une période d'exposition à 15% éthanol de 240 minutes (mortalité de trois unités logarithmique). Ces données suggèrent que la tolérance au choc éthanolique de *P. pentosaceus* ATCC33316 (99,92% de mortalité après 240 min de traitement à 15% éthanol, Figure<sub>(III)</sub> 9C) est proche de celle de *Lc. lactis* ssp *cremoris* NCDO712 (plus de 99% de mortalité après 240 min de traitement à 15% éthanol, O'Sullivan et Condon, 1997).

Contrairement aux autres stress étudiés, **un choc hyper-osmotique** [2 M NaCl et 4 M NaCl (limite de solubilité du NaCl dans le MRS)], a peu d'effet sur la viabilité des cellules stressées. Aucune mortalité n'est observée après 6h, 20h ou 40h d'exposition à 2 M NaCl. Une mortalité de 45% est obtenue après 20h d'exposition à 4 M NaCl (Figure<sub>(III)</sub> 9D). Ces données suggèrent que les cellules de *P. pentosaceus* sont particulièrement résistantes au choc hyper-osmotique en milieu complexe, comparativement à *Ent. faecalis* (45% de mortalité après 2h d'exposition à 1,1 M en milieu BHI, Flahaut<sup>a</sup> *et al.*, 1996), *Lb. acidophilus* CRL639 (99,6% de mortalité après 24h d'exposition à 3 M NaCl en milieu MRS, Lorca et Font de Valdez, 2001), *Lb. acidophilus* LA1-1 (54% de mortalité après 2h d'exposition à 3 M NaCl en milieu MRS, Kim *et al.*, 2001) et *Lc. lactis* ssp *cremoris* NCDO712 (99,7% de mortalité après 2h d'exposition à 3,5 M NaCl en milieu TYG, O'Sullivan et Condon, 1997). *P. pentosaceus* est donc capable de survivre à des stress salins intenses de longue durée.



**Figure<sub>(III)</sub> 10** : microcolonies observées après un choc thermique (53°C pendant 1 h en milieu MRS) appliqué sur des cellules de *P. pentosaceus* en phase exponentielle de croissance.



**Figure<sub>(III)</sub> 11** : effet d'un stress thermique létal intense (53°C pendant 1h en MRS) sur l'activité métabolique de *P. pentosaceus*.

Mesure de la conductance du milieu de culture induite par la croissance d'une population bactérienne ayant subi un stress thermique létal intense.

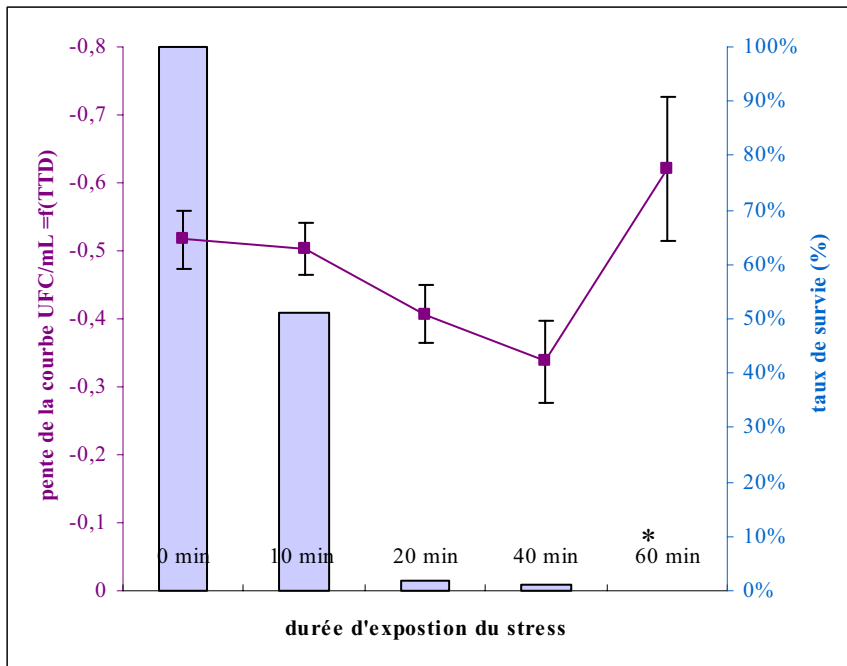
Afin de déterminer si cette forte résistance au stress hyper-osmotique est due à la présence de molécules potentiellement osmoprotectrices dans le milieu de culture, l'évaluation de l'impact d'un stress salin létal sur la viabilité de *P. pentosaceus* a été également réalisée en milieu chimiquement défini DM. Ces essais indiquent qu'aucune mortalité n'est obtenue pour des périodes d'incubation de 1h et 2h à 2 M, 2,5 M ou 3 M NaCl (stress court terme) et pour des périodes d'incubation de 20h ou 40h d'exposition à 3 M NaCl (stress long terme). Ces données montrent donc que *P. pentosaceus* est particulièrement résistant au choc hyper-osmotique quelle que soit la « richesse » du milieu de culture.

### **B) Effet d'un choc létal sur l'activité métabolique de *P. pentosaceus***

L'application de chaque type de contrainte létale sur des cellules de *P. pentosaceus* en phase exponentielle de croissance (contrainte saline, acide, éthanolique et thermique) a entraîné l'apparition de colonies hétérogènes en taille, lors de la numération post-stress des survivants (Figure<sub>(III)</sub> 10). Les colonies les plus petites ont été ré-isolées sur milieu MRS non stressant et ont restauré une morphologie classique après 48h d'incubation à 37°C. L'apparition de petites colonies ne semble donc pas liée à l'apparition de mutants stables. La seconde hypothèse serait que le stress rende une partie des cellules viables mais non cultivables, et que l'inoculation de ces cellules VNC en milieu non stressant permette le démarrage de croissance plus tardif de cette sous population.

Pour étudier cette possibilité, nous avons réalisé des mesures d'impédancemétrie en parallèle à des numérations sur milieu gélosé sur des cellules ayant subi un traitement à 53°C pendant 60 minutes. La courbe conductance = f(temps) traduit l'activité métabolique globale de la population cellulaire ayant survécu au choc thermique. Elle est représentée dans la figure<sub>(III)</sub> 11. Cette courbe ne présente pas d'épaule dans la phase d'augmentation. L'apparition des microcolonies n'est pas un phénomène séquentiel dû à la croissance d'une première partie de la population puis du « réveil » d'une autre partie une fois le stress thermique levé.

Dans un second temps, nous avons donc étudié l'effet du stress thermique létal sur l'activité métabolique de *P. pentosaceus* à l'issue de 10, 20, 40 et 60 minutes de traitement à 53°C. Afin de relier l'activité métabolique globale au nombre de cellules viables et cultivables, des mesures d'impédancemétrie et des numérations sur milieu gélosé (sans faire de distinction sur la taille de colonies) ont été réalisées en parallèle. Les résultats de ces expériences sont présentés dans la figure<sub>(III)</sub> 12.



**Figure<sub>(III)</sub> 12 : effet d'un stress thermique létal intense sur l'activité métabolique et la viabilité de *P. pentosaceus*.**

L'activité métabolique cellulaire est représentée par la courbe violette.

Le taux de survie est figuré en histogramme bleu.

L'activité métabolique cellulaire est évaluée en mesurant de la pente de la courbe UFC/mL = f(TDD)

La viabilité cellulaire est évaluée en mesurant le taux de survie exprimé en pourcentage (quantité de cellules viables et cultivables après le stress/ nombre de cellules viables et cultivables avant le stress). La viabilité cellulaire après 60 minutes de traitement est de 0,1% (\*)

Les mesures de conductance ont été répétées au moins trois fois ; les valeurs des écarts type sont indiquées au niveau de chaque point.



La survie chute en fonction de la durée d'exposition au stress thermique. L'activité métabolique cellulaire globale est progressivement ralentie durant les quarante premières minutes de stress avant de retrouver une valeur proche de sa valeur initiale à l'issue de 60 minutes de stress. Ces résultats indiquent que le traitement thermique létal permet sélectionner la sous-population la plus apte à survivre à des conditions de stress thermique durable. Cette sous-population, minoritaire au début de l'expérience, prend petit à petit le pas sur les autres sous-populations qui meurent progressivement durant les quarante premières minutes à 53°C (Figure<sub>(III)</sub> 12).

Des études similaires ont montré que l'activité métabolique de *Lactobacillus acidophilus* CRL639 est ralentie en présence d'un stress thermique chaud, acide, oxydatif, éthanolique ou osmotique mais pas en présence d'un stress thermique froid (Lorca et Font de Valdez, 1999). Ces travaux n'ayant été réalisés que pour une condition donnée de chaque stress (une intensité de stress, une durée d'application), nous ne pouvons savoir si la durée d'application du stress influe sur l'activité métabolique de *Lb. acidophilus* CRL639 comme nous avons pu l'observer chez *P. pentosaceus* ATCC33316.

#### IV) AMELIORATION DE LA SURVIE/CROISSANCE PAR UNE ADAPTATION PREALABLE

Le but de cette étude est de définir si une pré-exposition à un stress modéré peut améliorer la réponse de *P. pentosaceus* à un stress intense ultérieur.

Lors de cette étude, les conditions de stress adaptatif et de stress intense ont été sélectionnées suivant deux approches expérimentales distinctes ayant pour objectif d'étudier l'impact d'un stress modéré sur l'amélioration (i) de la survie de la bactérie vis-à-vis d'un choc létal, (ii) du démarrage de croissance de la bactérie dans un environnement hostile.

Une des applications possibles de ces travaux consisterait à favoriser l'implantation de Pédicoques en milieu hostile afin d'optimiser les procédés de fermentation alimentaire ou biotechnologique comme ce peut être le cas pour *Oenococcus oeni* dans le vin (Guzzo *et al.*, 2002). D'autre part, la connaissance de ces phénomènes permettra d'éviter certaines applications séquentielles de stress qui favoriseraient la survie des Pédicoques d'altération.

**Tableau<sub>(III)</sub> V : choix des paramètres de stress létal modéré (stress adaptatif) et intense (stress de challenge).**

CONTRAINTES	MODEREES	INTENSES
Thermique	42°C pendant 15 min ou 1h	53°C pendant 1h
Ethanolique	10% (v/v) pendant 1h ou 2h	15% (v/v) pendant 2h ou 3h
Acide	pH 3,5 ou pH 4,0 pendant 1h	pH 2,5 pendant 15 min
Saline	1M ou 2M NaCl pendant 1h	nr

nr : non réalisable [la limite de solubilité du NaCl dans le MRS (4 M) n'entraîne pas rapidement de létalité importante]

**Tableau<sub>(III)</sub> VI : protections homologues et hétérologues au stress de type choc.**

		CONTRAINTE INTENSE : CHALLENGE					
		Thermique	Ethanolique		Acide	Saline	
		1h à 53°C	2h à 15%	3h à 15%	15 min à pH2,5	20h à 4M NaCl	40h à 4M NaCl
CONTRAINTE MODEREE : ADAPTATION	Thermique 15 min à 42°C 1h à 42°C	8,7 2,0	nd 4,0	nd 4,8	nd 55,0	nd 0,6	nd 2,2
	Ethanolique 1h à 10% éthanol 2h à 10% éthanol	nd 10,0	1138,0 225,0	1342,0 488,0	nd nd	nd 0,8	nd 2,6
	Acide 1h à pH 4,0 1h à pH 3,5	3,0 26,0	20,5 11,7	21,7 11,3	62,0 26,0	0,5 nd	1,2 nd
	Saline 1h à 1 M NaCl 1h à 2M NaCl	nd nd	752,2 2,1	397,5 3,3	nd nd	0,9 nd	0,2 nd

$$\text{facteur de tolérance} = \frac{\frac{\text{quantité de cellules viables et cultivable après un challenge précédé d'une période d'adaptation}}{\text{quantité de cellules viables et cultivable après la période d'adaptation}}}{\frac{\text{quantité de cellules viables et cultivable après un challenge sans adaptation préalable}}{\text{quantité de cellules viables et cultivable au début de l'expérience}}}$$

nd : non déterminé

Les expériences ont été répétées trois fois, l'écart type entre les valeurs de facteur de tolérance obtenues est inférieur à 10%.

## A) Amélioration de la survie à un choc

### 1) Approche expérimentale

Les conditions de stress adaptatif et de stress de challenge employées lors de cette étude ont été définies grâce aux résultats obtenus figure<sub>(III)</sub> 9. Nous avons retenu comme contrainte :

- ✓ **adaptative : des stress modérés** réduisant la population de  $\frac{1}{2}$  à  $\frac{1}{4}$  **unité logarithmique** (soit environ 60 % de mortalité) en accord avec les travaux de menés sur *Ent. faecalis* (Flahaut<sup>a</sup> *et al.*, 1996) et sur *Lb. alimentarius* (Lemay *et al.*, 2000) ;
- ✓ **de challenge : des stress intenses** réduisant rapidement (en 1 à 2h) la population de **2-4 unités logarithmique** (soit 99 à 99,99% de mortalité).

Des conditions de stress acide, thermique et éthanolique entraînant rapidement des niveaux de mortalité importante ont été déterminées (plus de 99% de mortalité en quelques minutes ou quelques heures ; Figure<sub>(III)</sub> 9A, B et C). Cependant, dans le cas du stress osmotique, l'application de chocs intenses (jusqu'à 4 M NaCl) n'entraîne pas de létalité importante sur quelques heures (Figure<sub>(III)</sub> 9D). Nous avons alors choisi de suivre l'effet des différentes adaptations testées sur la viabilité des cellules à plus long terme (20h et 40h). Les paramètres de stress adaptatifs et de challenge choisis sont présentés dans le tableau<sub>(III)</sub> V.

Des cellules en phase exponentielle précoce ont été employées afin d'étudier le développement du phénomène d'adaptation au stress chez *P. pentosaceus*. Un lot de cellules en phase exponentielle précoce subit successivement une phase d'adaptation puis une phase de challenge. Un lot de cellules témoin en phase exponentielle précoce est soumis à la phase de challenge sans adaptation préalable. Une numération de la population bactérienne est effectuée avant et après le challenge pour les deux lots de cellules. L'impact de chacun des traitements adaptatifs sur la survie de *P. pentosaceus* post-challenge est évalué grâce au **facteur de tolérance** (i. e. pourcentage de survie après challenge chez les cellules adaptées / pourcentage de survie après challenge chez les cellules non adaptées ; Flahaut<sup>a</sup> *et al.*, 1996). Le résultat de ces expériences est consigné dans le tableau<sub>(III)</sub> VI.

### 2) Résultats

Un phénomène de **protection homologue** est clairement observé après les adaptations thermique, éthanolique et acide. L'efficacité de la protection homologue est variable selon la nature de la contrainte : les facteurs de tolérance optimaux sont d'environ 9, 60 et 1340 pour les stress thermique, acide et éthanolique, respectivement (Tableau<sub>(III)</sub> VI).



L'établissement de ces protections homologues est un phénomène rapide (15 min d'adaptation thermique suffisent). Il est également transitoire : le facteur de tolérance thermique/thermique et éthanol/éthanol chute si on prolonge l'adaptation de 15 min à 1h et de 1 à 2h respectivement.

L'intensité du stress modéré est également un paramètre important (une adaptation d'1h à pH 4,0 induit une protection plus forte qu'une adaptation de 1h à pH 3,5).

Les résultats partiels de **protection hétérologue** montrent que les quatre types de contraintes adaptatives (stress thermique, éthanolique, acide et salin modérés) induisent des phénomènes de protection croisée (Tableau<sub>(III)</sub> VI). Ceci est particulièrement observé entre les stress thermique et acide (facteur de tolérance thermique/acide de 55 ; acide/thermique de 26), thermique et éthanolique (facteur de tolérance thermique/éthanolique de 4,8 ; éthanolique/thermique de 10), éthanolique et salin (facteur de tolérance éthanolique/salin de 2,6 ; thermique/éthanolique de 752,2). Certaines combinaisons de stress hétérologues donnent des facteurs de tolérance supérieurs à ceux observés pour des stress adaptatifs et de challenge de même nature (facteur de tolérance thermique/thermique de 2, thermique/acide de 55 ; thermique/éthanolique de 4,8 par exemple).

Ces données suggèrent l'existence de protéines de stress communes à des stress différents (réponse générale au stress).

### 3) Discussion

Des travaux similaires ont permis de mettre en évidence l'existence des phénomènes de protection homologue et hétérologue chez *Ent. faecalis* ssp. *faecalis* ATCC19433 (adaptation thermique/challenge thermique, adaptation acide/challenge acide et adaptation saline/challenge thermique ou éthanolique ; Flahaut<sup>b</sup> *et al.*, 1996), *Lb. acidophilus* LA1-1 (adaptation thermique/challenge thermique et adaptation saline/ challenge thermique ; Kim *et al.*, 2001) et *Lc. lactis* ssp. *cremoris* NCDO712 (adaptation acide/challenge acide, adaptation thermique/ challenge acide et adaptation acide/challenge thermique, éthanolique et salin; O'Sullivan et Condon, 1997). Toutefois, selon Flahaut<sup>b</sup> *et al.* (1996), une adaptation acide n'augmente pas la tolérance d'*Ent. faecalis* ssp. *faecalis* ATCC19433 vis-à-vis du challenge thermique (et inversement) comme c'est le cas chez *P. pentosaceus* ATCC33316. Ces auteurs ont montré que l'ajout de chloramphénicol inhibe la protection à la chaleur induit par une adaptation saline mais pas la protection à l'éthanol induite pas une adaptation saline. Ces données indiquent que les mécanismes de réponse au stress n'impliquent pas nécessairement la synthèse de nouvelles protéines. Il serait donc intéressant de répéter nos expériences d'adaptation aux stress de type choc létal en ajoutant du chloramphénicol dans nos milieu de culture afin d'étudier si un phénomène similaire existe chez *P. pentosaceus*.



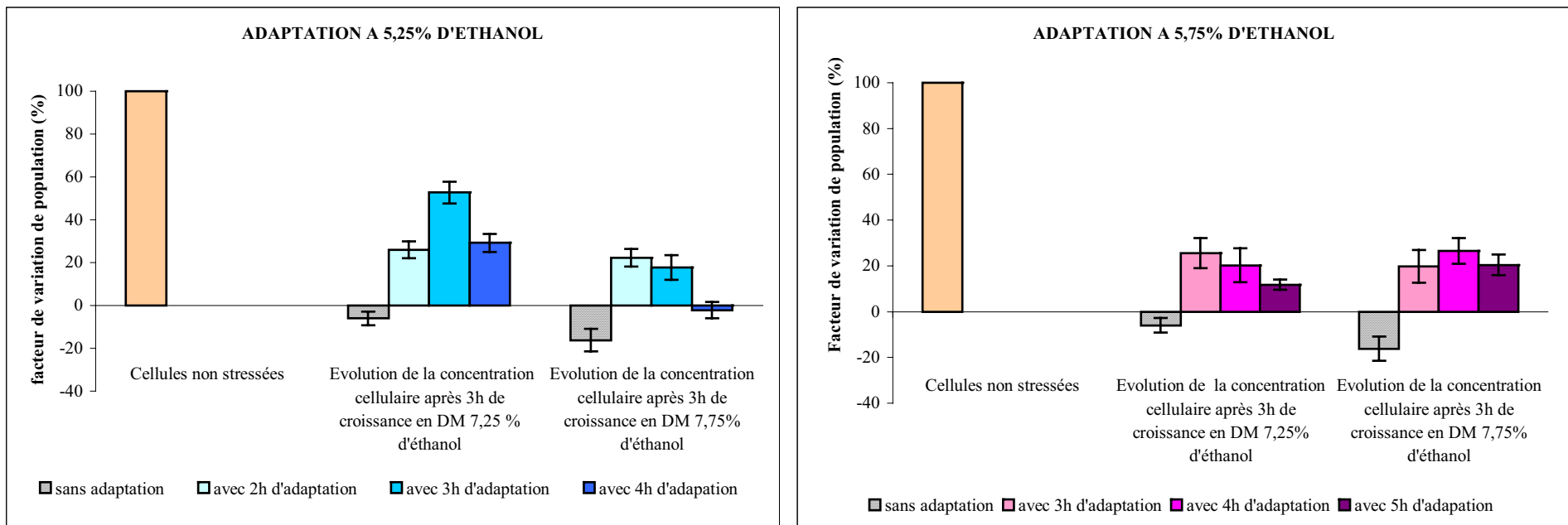
Van de Guchte *et al.* (2002) rapportent que les combinaisons de stress induisant des protections croisées varient dans la famille des bactéries lactiques. Il existe donc des interrelations différentes entre les voies de réponse au stress. Toutefois, certaines de ces différences peuvent résulter du choix de l'**intensité** du stress adaptatif utilisé. En effet, certains auteurs choisissent des stress sub-létaux et d'autres des stress modérément létaux (comme dans notre cas). Le second élément pouvant expliquer ces dissimilitudes réside dans les conditions adaptatives utilisées pour rechercher l'existence de phénomènes de protection hétérologue. Les conditions retenues par de nombreux auteurs sont celles induisant un maximum de protection homologue. Or, si l'on considère dans nos résultats le cas de l'**adaptation acide**, on s'aperçoit qu'une adaptation de 1h à pH 4,0 est plus efficace qu'une adaptation de 1h à pH 3,5 pour protéger *P. pentosaceus* du stress acide (facteur de tolérance de 62 et 3 respectivement). Elle est cependant moins efficace qu'une adaptation de 1h à pH 3,5 pour protéger *P. pentosaceus* du stress thermique (facteur de tolérance de 3 et 26 respectivement).

## **B) Etude de l'impact d'une préadaptation au stress sur le démarrage de croissance en milieu DM hostile**

*P. pentosaceus* est capable de s'adapter à des chocs intenses en milieu riche (effet de l'adaptation visible sur la survie). Or, les niveaux de stress de challenge employés lors de cette étude sont rarement rencontrés dans la nature, dans l'agroalimentaire ou dans l'élevage. Dans un second temps, nous avons donc déterminé si ce phénomène d'adaptation au stress était également observable pour des challenges moins intenses (croissance en condition de stress sub-optimal). Ce travail a été réalisé en milieu DM, milieu chimiquement défini mimant un inoculum en milieu hostile à la croissance bactérienne. Les effets des adaptations ont été recherchés sur le démarrage de la croissance.

### **1) Approche expérimentale**

Des cellules de *P. pentosaceus* issues d'une même culture en début de phase exponentielle sont soumises à une phase d'adaptation avant d'être inoculées en DM stressant (cellules test). Un second lot de cellules est directement inoculé en milieu DM stressant sans adaptation préalable (cellules témoin non adaptées - « challengées »). Un troisième lot de cellules est inoculé en milieu DM en conditions optimales de croissance (cellules témoin non adaptées - non « challengée »). L'impact de chacun des traitements adaptatifs sur la capacité de croissance de *P. pentosaceus* en conditions hostiles est évalué en dénombrant les cellules viables et cultivables dans les trois lots au temps  $t_0$  d'inoculation et après 3h de croissance. Cette méthode d'estimation de la concentration bactérienne présente l'avantage par rapport à la mesure de la turbidité du milieu de culture de permettre d'évaluer



**Figure<sub>(III)</sub> 13 : détermination de l'intensité (5,75% ou 5,25% d'éthanol) et de la durée du stress adaptatif (2, 3, 4 ou 5h) à imposer à *P. pentosaceus* ATCC33316 pour améliorer la croissance de la bactérie en milieu DM dans des conditions de stress sub-optimal (7,25% ou 7,75% d'EtOH).**

Ces valeurs sont le résultat d'au moins trois expériences différentes, les écart types sont indiqués au niveau de chaque point

$$\text{facteur de variation de population} = \frac{dX_{\text{essai}}}{dX_{\text{témoin}}} = \left[ \frac{(\ln X - X_0)_{\text{essai}}}{(\ln X - X_0)_{\text{témoin}}} \right] \times 100$$

✓ si le facteur de variation de population > 0 : il s'agit d'une amélioration

✓ si le facteur de variation de population < 0 : il s'agit d'une sensibilisation

✓ un facteur de variation de population de 100% équivaut à la variation de croissance obtenue en milieu DM non stressant (histogramme orange)



la quantité de cellules prêtes à démarrer une croissance et non pas la quantité de cellules totales (cellules viables + cellules mortes).

Le **facteur de variation de population** est calculé grâce au dénombrement des cellules viables et cultivables dans les trois lots. Un facteur de variation de population de 100% correspond à la variation de croissance des cellules témoin non adaptées - non « challengée ». Lorsque le facteur de variation de population est (i) positif, la population bactérienne a augmenté pendant les trois premières heures suivant l'inoculation en milieu DM stressant, (ii) négatif, la population bactérienne a diminué pendant les trois premières heures suivant l'inoculation en milieu DM stressant. Plus ce facteur se rapproche de 100 %, meilleure a été l'adaptation.

## 2) Résultats

### a) Recherche des paramètres de stress (éthanol)

Les intensités des stress rencontrées pendant la phase d'adaptation puis dans le milieu DM stressant inoculé ont été définies en s'appuyant sur la figure<sub>(III)</sub> 7.

Deux conditions de stress sub-optimal ont été choisies suivant leur impact sur le taux de croissance de la bactérie : 7,25% éthanol (v/v) (20% du  $\mu_{\max}$ ) et 7,75% éthanol (v/v) (10% du  $\mu_{\max}$ ).

Des conditions plus modérées ont été choisies pour l'adaptation : 5,25% éthanol (v/v) (60% du  $\mu_{\max}$ ) et 5,75% éthanol (v/v) (50% du  $\mu_{\max}$ ). Des périodes d'adaptation variant de 2h à 5h ont été testées. Les résultats sont présentés dans la figure<sub>(III)</sub> 13.

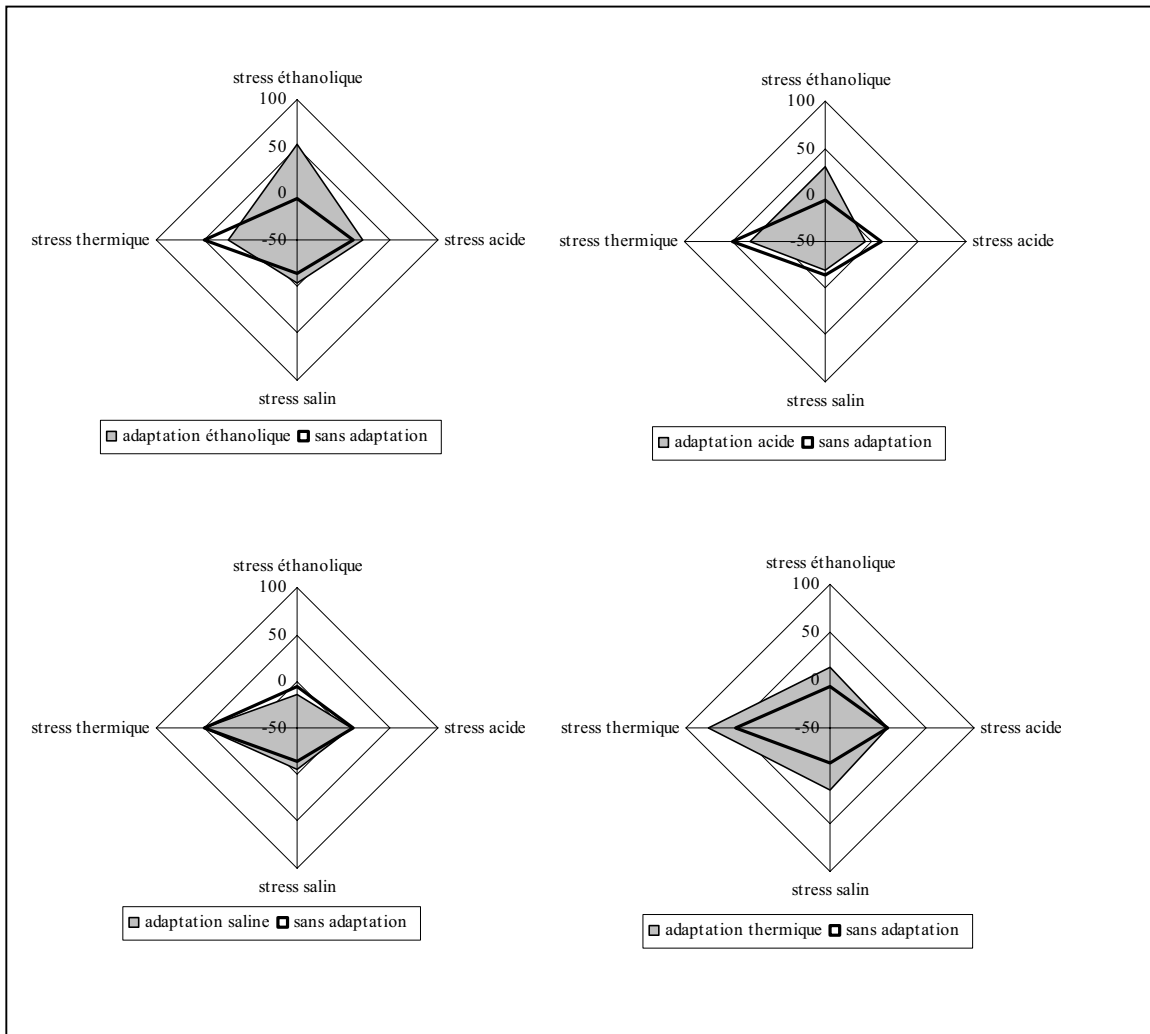
Sans adaptation préalable, la croissance de *P. pentosaceus* en milieu DM contenant 7,25% éthanol (v/v) ou 7,75% éthanol (v/v) ne démarre pas au bout de 3h d'incubation ; la quantité de cellules viables et cultivables diminue. A contrario, lorsque les cellules sont pré-adaptées au stress avant d'être inoculées en milieu DM stressant [DM 7,25% éthanol (v/v) ou DM 7,75% éthanol (v/v)] la croissance démarre dès les trois premières heures de culture. Le traitement adaptatif le plus efficace correspond à une adaptation de 3h à 5,25% d'éthanol suivi d'un challenge à 7,25% d'éthanol (facteur de variation de population de 52,7%). Des expériences complémentaires ont montré que ces effets perdurent pour des périodes de challenge supérieures à 3h.

### b) Définition des conditions de stress pour les quatre contraintes testées

A partir de ces premiers essais, les conditions de stress sélectionnées pour les expériences suivantes ont été définies ainsi :

**Tableau<sub>(III)</sub> VII : choix des paramètres d'adaptation avant inoculation en condition de stress sub-optimal.**

CONTRAINTES	INTENSITE DU STRESS SUB-OPTIMAL A L'INOCULATION	PARAMETRES D'ADAPTATION
Thermique	42 °C	38°C pendant 3h
Ethanolique	7,25% (v/v)	5,25% (v/v) pendant 3h
Acide	pH 3,6	pH 5,1 pendant 3h
Osmotique	1,05 M NaCl	0,7 M NaCl pendant 3h



**Figure<sub>(III)</sub> 14 : comparaison des facteurs de population de croissance pendant les trois premières heures en milieu DM +7,25% éthanol (A), DM pH 3,6 (B), DM à 42°C (C) DM+1,05 M NaCl (D) induit par différentes adaptations (saline : DM+0,7M NaCl ; acide : DM pH 5,1 ; éthanologique : DM+5,25% éthanol (v/v) ; thermique : DM à 38°C).**

Le facteur de variation de population obtenu pour des cellules non adaptées directement ensemencées en milieu hostile est représenté sous forme d'un trait. Les facteurs de variation de population obtenus pour des cellules adaptées ensemencées en milieux hostiles sont représentés sous forme de cible. Ces valeurs sont le résultat d'au moins trois expériences différentes, les écarts types sont indiqués au niveau de chaque point.

$$\text{facteur de variation de population} = \frac{\Delta X_{\text{essai}}}{\Delta X_{\text{témoin}}} = \left[ \frac{\ln(X - X_0)_{\text{essai}}}{\ln(X - X_0)_{\text{témoin}}} \right] \times 100$$

✓ si le facteur de variation de population > 0 : il s'agit d'une amélioration

✓ si le facteur de variation de population < 0 : il s'agit d'une sensibilisation

✓ un facteur de variation de population de 100% équivaut à la variation de population obtenue sans exposition au stress

- ✓ les **conditions hostiles de croissance** sont celles pour lesquelles la valeur du taux de croissance de la bactérie correspond à **20% de la valeur atteinte en absence de stress** ;
- ✓ les **conditions d'adaptation** sont celles pour lesquelles la valeur du taux de croissance de la bactérie correspond à **60% de la valeur atteinte en absence de stress**.

Les conditions d'adaptation ainsi que les milieux DM hostiles inoculés utilisés lors de cette étude sont présentées dans le tableau<sub>(III)</sub> VII.

### c) Facteurs de variation de populations obtenus

Les résultats de ces essais sont représentés dans la figure<sub>(III)</sub> 14.

Les différents stress sub-optimaux choisis sur la base d'une réduction du taux de croissance de 80% (20% du  $\mu_{\max}$ ) ont des impacts différents sur la viabilité cellulaire après 3h de culture. Certaines induisent une mort cellulaire pendant les premières heures d'application (facteur de population de croissance de -6,0% pour le stress éthanolique et de -13,5% pour le stress salin) avant que la croissance ne démarre tandis que d'autres ralentissent la croissance de la bactérie (facteur de variation de croissance de 9,9% pour le stress acide et de 48,3% pour le stress chaud). Ces données indiquent, d'une part, que les mécanismes de résistance au stress long-terme (Figure<sub>(III)</sub> 8) et court-terme diffèrent chez *P. pentosaceus* et confirment, d'autre part, que les capacités de résistance au stress chez cette bactérie dépendent de la nature de ce dernier. La période d'incubation (long-terme/court-terme) agit donc sur la réponse au stress au même titre que l'état physiologique de la cellule (phase exponentielle/phase stationnaire ; Giard *et al.*, 1996 ; Duwat *et al.*, 2001) ou que les conditions de culture (voir revue Sleator et Hill, 2002).

Dans ces conditions de stress sub-optimaux, l'effet attendu d'une préadaptation peut donc être soit une réduction de la létalité (existence d'un plus grand nombre de cellules qui pourront assurer une croissance ultérieure) soit une augmentation du nombre de cellules viables et cultivables dans les trois premières heures de culture.

L'amélioration de croissance en condition de stress sub-optimal dépend de la nature du stress adaptatif (Figure<sub>(III)</sub> 14). Des **protections homologues** sont observées pour les essais d'adaptation éthanolique (facteur de variation de population de 52,7% contre -6,0% en absence d'adaptation), thermique (facteur de variation de population de 76,7% contre 48,3% en absence d'adaptation) et saline (facteur de variation de population de -5,4% contre -13,5% en absence d'adaptation). Le



couple de paramètres de stress appliqué en protection homologue acide/acide ne révèle pas d'amélioration de croissance dans les trois premières heures de culture en condition hostiles. Au contraire une chute accrue du nombre de cellules viables et cultivables (facteur de variation de population de -7,4% contre 9,9% en absence d'adaptation) est observée.

Seules certaines combinaisons de stress font apparaître des phénomènes de **protections hétérologues**. Aucune protection hétérologue n'a pu être observée après une adaptation saline ; le stress salin a pas, ou peu, d'interrelations avec les trois autres stress testés. Une adaptation éthanolique protège faiblement contre des challenges acide (facteur de variation de population de 20,7% contre 9,9% en absence d'adaptation) et osmotique (facteur de variation de population de -3,7% contre -13,5% en absence d'adaptation) mais sensibilise *P. pentosaceus* au challenge thermique (facteur de variation de population de 22,5% contre 48,3% en absence d'adaptation). D'autre part, une adaptation thermique accélère le démarrage de croissance en conditions de challenge éthanolique (facteur de variation de population de 13,7% contre -6,0% en absence d'adaptation) et salin (facteur de variation de population de 15,4% contre -13,5% en absence d'adaptation) mais est sans effet contre le challenge acide (facteur de variation de population de -9,9% contre 9,9% en absence d'adaptation). Alors que les conditions d'adaptation par un stress acide modéré sont sans effet sur la croissance de la bactérie en milieu acide, une protection hétérologue acide/éthanol a pu être mise en évidence (facteur de variation de population de 29,4% contre -6,0% en absence d'adaptation).

Ces résultats montrent que *P. pentosaceus* est capable de développer des mécanismes d'adaptation au stress sub-optimaux en milieu DM. Les stress adaptatifs testés améliorent la croissance de la bactérie dans les conditions de stress de même nature (protection homologue) ou/et de nature différentes (protection hétérologue). Ces données suggèrent que les stress modérés utilisés diffèrent par leur capacité à induire des mécanismes de réponse spécifique et/ou générale au stress chez *P. pentosaceus*.

Dans nos conditions expérimentales, le stress adaptatif le plus efficace est le stress thermique (i.e. la protection est effective vis-à-vis de tous les challenges testés à l'exception du stress acide intense). Un prétraitement thermique pourrait donc s'avérer utile pour améliorer le démarrage de croissance de *P. pentosaceus* et de favoriser son implantation dans une matrice alimentaire salée ou alcoolisée.

A l'inverse, le stress adaptatif salin employé est le moins efficace des stress testés pour induire des phénomènes de protections hétérologues. Ces résultats sont en contradiction avec de nombreux travaux montrant qu'un stress osmotique déclenche des mécanismes de protection croisée (induction



de l'expression du facteur alternatif de transcription de la réponse générale au stress) et plus particulièrement une thermotolérance chez des bactéries comme *L. monocytogenes*, *E. coli* ou encore *S. epidermidis* (voir revue O'Byrne et Booth, 2002). Il est possible que l'intensité du stress salin modéré utilisé lors de cette étude soit insuffisante (ou excessive) pour déclencher les mécanismes de la réponse au stress chez *P. pentosaceus*.

## V) CONCLUSION

L'application d'une étape d'adaptation avant un choc léthal ou avant l'inoculation des cellules en condition de stress a donné des résultats identiques concernant l'existence de certaines protections homologues (éthanol/éthanol et chaleur/chaleur) et hétérologues (acide/éthanol, chaleur/éthanol et chaleur/sel). Ces essais confirment qu'il existe bien des interrelations entre les réponses aux stress éthanologique, thermique et acide chez *P. pentosaceus* ATCC33316. L'existence de protections hétérologues (ou protections croisées) suggère que *P. pentosaceus* possède de protéines générales de stress qui sont inductibles par des stress de nature différente, comme c'est le cas notamment chez *Ent. faecalis* (Giard *et al.*, 2000 et 2002 ; Rincé *et al.*, 2001 et 2002 ; Le Breton *et al.*, 2002). Les protéines induites par les stress de type choc ou d'acclimatation ne sont probablement pas les mêmes (en tout cas pour une partie d'entre elles).

En effet, l'ensemble des essais montre que certaines combinaisons de stress sont efficaces pour améliorer la survie de la bactérie à un choc mais ne le sont pas pour améliorer son démarrage de croissance. Ainsi, il a été observé que (i) aucun des stress adaptatifs testés, hormis le stress éthanologique, ne favorise la croissance de *P. pentosaceus* en présence d'une contrainte acide sub-optimale, (ii) la tolérance au choc acide peut être induite par une adaptation acide ou thermique; une faible létalité ( $\leq 1$  unité logarithmique) de ce traitement est alors suffisante pour déclencher la réponse L-ATR et une réponse plus générale au stress chez *P. pentosaceus*. Ces différences peuvent provenir de l'environnement (milieu chimiquement défini ou complexe) et/ou de l'intensité des stress adaptatifs (stress sub-optimaux ou létaux) qui diffèrent dans les deux types d'expériences.





### CHAPITRE III : CONTRIBUTION DES PLASMIDES NATIFS DE *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS* DANS LA REPONSE AU STRESS

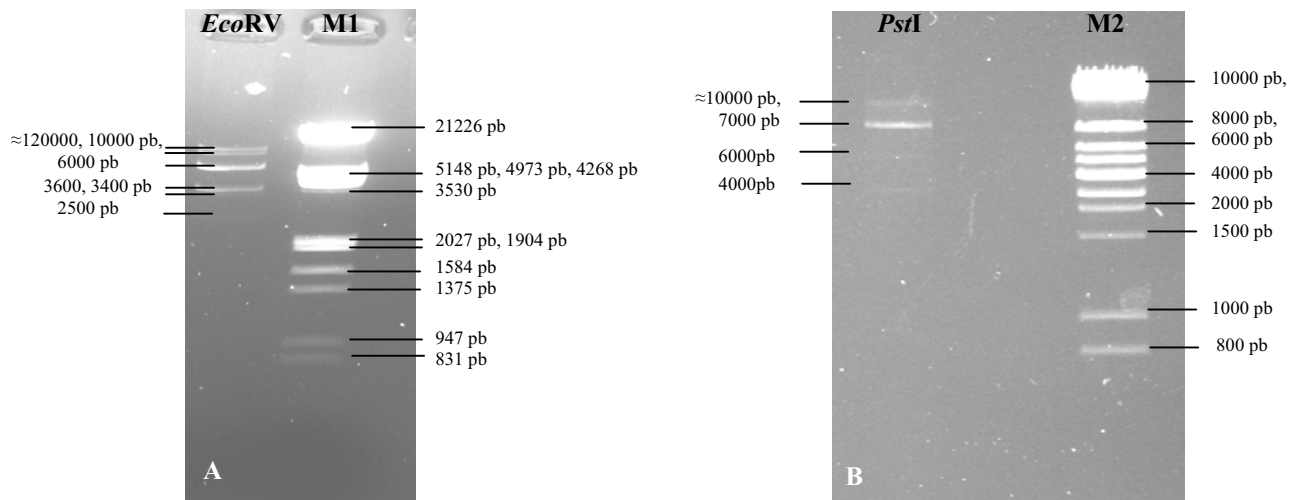
Une bactérie présente dans une niche écologique donnée sera rarement en conditions optimales de croissance. En effet, toute niche écologique est susceptible de connaître des fluctuations qui pourront agir en tant que pression de sélection sur les bactéries présentes : modifications des paramètres physico-chimiques du milieu, présence d'autres bactéries entraînant une compétition vis-à-vis des nutriments, présence de bactériophage... La survie, voire la prédominance d'une bactérie dépendra alors de ses capacités intrinsèques de réponse, à savoir la présence de fonctions conférant par exemple une résistance aux métaux lourds, aux phages, aux antibiotiques ou encore la synthèse d'agents anti-bactériens (Mergeay *et al.*, 2003 et voir revues Coffey et Ross, 2002 ; Chopra *et al.*, 2003 et Silver, 2003).

L'analyse comparative des génomes bactériens et la réalisation de cartes physiques soulignent le dynamisme de ces structures (Hugues, 2000 ; Campo *et al.*, 2002). Ainsi, de nombreuses fonctions essentielles à l'adaptation évolutive à un nouvel environnement peuvent être acquises par transfert horizontal *via* des mécanismes de transduction, de transposition, de conjugaison ou de transformation.

Dans la famille des bactéries lactiques, de nombreux gènes codant des fonctions métaboliques (Lac<sup>+</sup>, Cit<sup>+</sup>, Prt<sup>+</sup>), la synthèse de bactériocines, des mécanismes de résistance aux phages, aux composés cytotoxiques ou aux métaux lourds sont localisés sur des plasmides ou des transposons, conjugatifs ou non (Sami *et al.*, 1997 ; Kelly *et al.*, 2000 ; Guédon *et al.*, 2000 ; Liu *et al.*, 2002 ; et voir revues Davidson *et al.*, 1996 et Coffey et Ross, 2002). A l'heure actuelle, seuls quelques travaux suggèrent que des gènes de réponse aux stress environnementaux de types thermique, acide, osmotique, ou oxydatif puissent être transmis d'une bactérie lactique à une autre par des mécanismes de transferts horizontaux. Ainsi, *St. thermophilus* ST134 possède un plasmide de 2798 pb (pER341) codant une protéine dont l'expression est induite à température élevée et à pH acide, nommée sHsp16.4 (small Heat Shock Protein) (Somkuti *et al.*, 1998, Geis *et al.*, 2003). De nombreux plasmides issus de différentes souches de *St. thermophilus* présentant des homologies au niveau des fonctions répliquatives (RepA), possèdent un ou deux gènes *hsp* homologues à *shsp16-4* (O'Sullivan *et al.*, 1999; Somkuti et Steinberg, 1999; Solow et Somkuti, 2000 ; Geis *et al.*, 2003). C'est également le cas d'un plasmide isolé chez *Lc. lactis* ssp. *cremoris* ATCC 14362 (O'Sullivan *et al.*, 1996). L'effet protecteur de la présence d'un plasmide codant ce type de Hsp de



**Figure<sub>(III)</sub> 15 : profil de migration d'un extrait d'ADN plasmidique issu de *P. pentosaceus* ATCC33316 (mélange des plasmides pAB10 et pAB37).**



**Figure<sub>(III)</sub> 16 : profils de restriction du mélange pAB10/pAB37 à *EcoRV* (A) et *PstI* (B).  
M1 : marqueur de poids moléculaire Lambda/*EcoRI*/*HindIII* (Qbiogène)  
M2 : marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (Eurogentec)**

faible poids moléculaire vis-à-vis d'un choc thermique a été démontré chez la souche *St. thermophilus* NDI-6 (O'Sullivan *et al.*, 1996).

La présence d'éléments mobiles susceptibles de porter et de transférer des gènes présentant un rôle plus général dans la réponse au stress chez les bactéries lactiques a été suggérée lors de l'étude de la protéine générale de stress Gls24 d'*Ent. faecalis* JH2-2 (Hartke *et al.*, 1998 ; Giard *et al.*, 2000 et 2002). La synthèse de Gls24 est induite en situation de carence nutritive (dont la carence au glucose) ainsi que par différents stress chimiques (Giard *et al.*, 2000). La protéine homologue YtgH jouerait un rôle similaire chez *Lc. lactis*. Chez *Ent. faecalis*, *gls24* (542 nt) est l'avant dernier gène d'un opéron composé de six cadres ouverts de lecture. L'examen de la séquence nucléotidique de *gls24* d'*Ent. faecalis* (GenBank AJ000042) montre une homologie importante (87% d'identité sur 300 nt) avec une séquence d'insertion identifiée chez *Ent. hirae*. D'autre part, l'existence d'un second gène homologue à *gls24* a été décrite ultérieurement dans le chromosome d'*Ent. faecalis* et de *Lc. lactis* (Giard *et al.*, 2002). Chez *Ent. faecalis*, le second gène est présent au sein d'un îlot de pathogénicité contenant 129 cadres ouverts de lecture (Shankar *et al.*, 2002). Chez *Lc. lactis*, le second gène homologue à *gls24* est situé sur un élément Tn-like (Kelly *et al.*, 2000 ; Giard *et al.*, 2002). Ces travaux suggèrent donc des réarrangements *via* des éléments IS, pouvant résulter en un transfert, et parfois en une duplication, de fonctions liées à la tolérance au stress.

Dans le cadre de notre étude, nous avons souhaité déterminer si des fonctions portées par les deux plasmides natifs de *P. pentosaceus* ATCC33316 (Bénachour *et al.*, 1996) pouvaient être impliquées dans la réponse au stress chez cette souche. La présence de telles fonctions sur des plasmides offrirait un moyen simple d'introduire des gènes de stress dans différents hôtes, augmentant ainsi la tolérance spécifique ou générale au stress chez des bactéries lactiques d'importance industrielle. El Demerdash *et al.* (2003) proposent quant à eux d'utiliser de telles fonctions comme marqueurs de sélection chez les bactéries lactiques. Le second intérêt de cette approche concerne l'impact du stress sur la réplication des plasmides. En effet, de nouvelles applications des bactéries lactiques dans l'expression hétérologue de protéines d'intérêt nécessiteront le clonage des gènes correspondants sur des plasmides de bactéries lactiques. Il sera donc essentiel de connaître l'impact du stress sur la réplication de ces plasmides, afin d'optimiser la production de telles protéines (Wegrzyn et Wegrzyn, 2002 ; Lee et Moon, 2003).

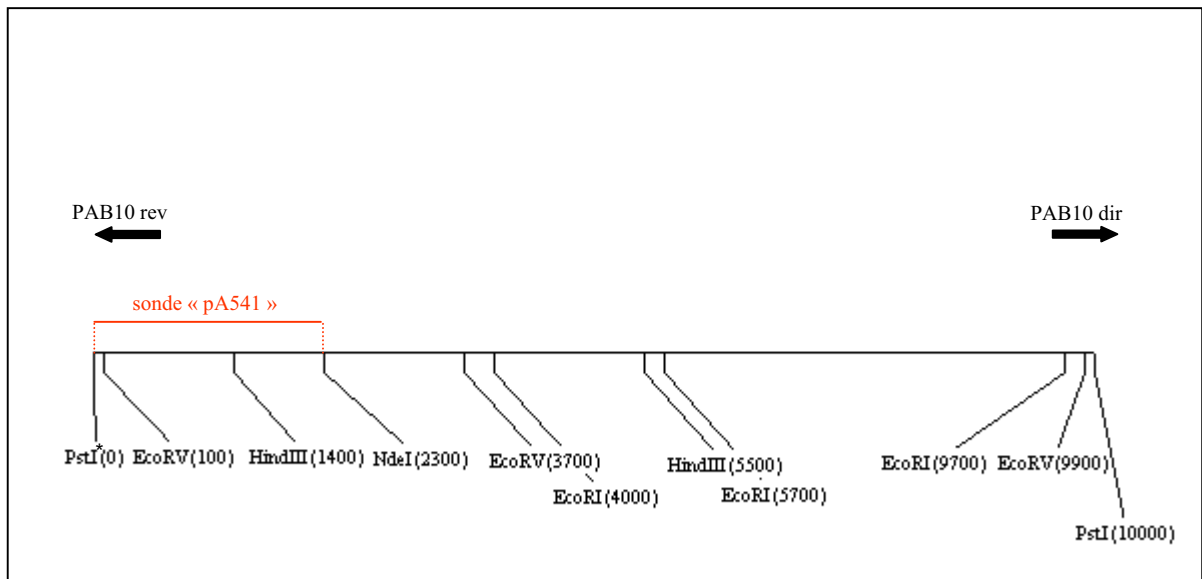
#### **I) PROFIL PLASMIDIQUE DE *P. PENTOSACEUS* ATCC33316**

Bénachour *et al.* (1996) ont montré que *P. pentosaceus* ATCC33316 possède deux plasmides natifs, dont les tailles ont été estimées à 10,5 kb et 37 kb (nommés respectivement pAB10 et pAB37



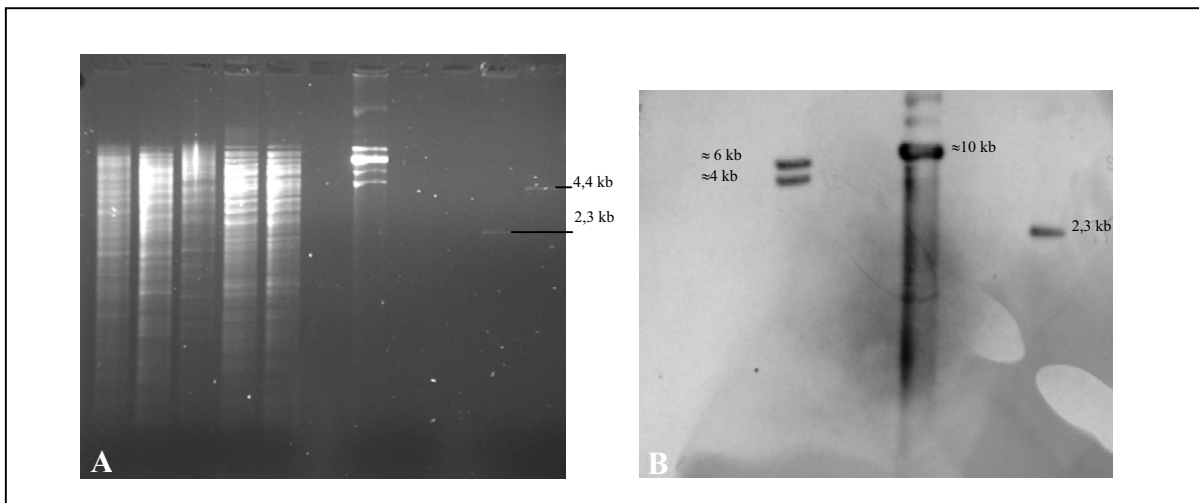
**Tableau<sup>(III)</sup> VIII : bilan de l'analyse par digestion enzymatique des 27 clones issus de la banque d'ADN plasmidique de *P. pentosaceus* ATCC33316 à *Pst*I.**

Taille de l'insert	Vecteur	Evaluation de la taille des fragments de restriction visibles sur gel d'agarose 1% après une digestion à...	
		<i>Pst</i> I	<i>Eco</i> RI
10kb	pA <sub>541</sub>	3 kb / 10 kb	3 kb / 4 kb /6 kb
	pA <sub>548</sub>	3 kb / 10 kb	3 kb / 4 kb /6 kb
	pA <sub>550</sub>	3 kb / 10 kb	3 kb / 4 kb /6 kb
	pA <sub>552</sub>	3 kb / 10 kb	3 kb / 4 kb /6 kb
	pA <sub>556</sub>	3 kb / 10 kb	3 kb / 4 kb /6 kb
	pA <sub>565</sub>	3 kb / 10 kb	3 kb / 4 kb /6 kb
	pA <sub>566</sub>	3 kb / 10 kb	3 kb / 4 kb /6 kb
	pA <sub>567</sub>	3 kb / 10 kb	3 kb / 4 kb /6 kb
	pA <sub>573</sub>	3 kb / 10 kb	3 kb / 4 kb /6 kb
	pA <sub>574</sub>	3 kb / 10 kb	3 kb / 4 kb /6 kb
	pA <sub>554</sub>	3 kb / 10 kb	5,5 kb / 7,5 kb
	pA <sub>564</sub>	3 kb / 10 kb	5,5 kb / 7,5 kb
	pA <sub>571</sub>	3 kb / 10 kb	5,5 kb / 7,5 kb
	pA <sub>572</sub>	3 kb / 10 kb	5,5 kb / 7,5 kb
7 kb	pA <sub>568</sub>	3 kb / 7kb	6 kb / 4,5 kb
	pA <sub>570</sub>	3 kb / 7kb	6 kb / 4,5 kb
	pA <sub>551</sub>	3 kb / 7 kb	2,3 kb / 6 kb/ ?
	pA <sub>553</sub>	3 kb / 7 kb	2,3 kb / 6 kb/ ?
	pA <sub>555</sub>	3 kb / 7 kb	1,7 kb / 1,8kb / 2,6 kb / 4,1 kb
4 kb	pA <sub>559</sub>	3 kb/ 4 kb	6,5 kb / ?
	pA <sub>560</sub>	3 kb/ 4 kb	6,5 kb/ ?
2 kb	pA <sub>558</sub>	3 kb/ 2 kb	5 kb
1 kb	pA <sub>542</sub>	3 kb/ 1 kb	2,8 kb / 1 kb / ?
≤ 0,1 kb	pA <sub>543</sub>	3 kb / ?	3 kb / ?
	pA <sub>549</sub>	3 kb / ?	3 kb / ?
	pA <sub>557</sub>	3 kb / ?	3 kb / ?
	pA <sub>569</sub>	3 kb / ?	3 kb / ?



**Figure<sub>(III)</sub> 17 : carte de restriction de l'insert de 10 kb de pA541.**

Chaque site enzymatique reconnu par *PstI*, *EcoRV*, *HindIII*, *NdeI* et *EcoRI* est marqué par un trait et sa localisation (par rapport au site *PstI*\*) est indiquée entre parenthèse.



**Figure<sub>(III)</sub> 18 : vérification de l'origine plasmidique du fragment de 10 kb cloné dans le vecteur pA<sub>541</sub>.**

**A : migration électrophorétique**

**B : autoradiographie après hybridation avec le fragment interne *PstI/NdeI* de 2,3 kb**

pistes 1 à 5: digestions par *HindIII* des ADNs chromosomiques de *B. subtilis* JH642, *Lc. lactis* FACC1630, *Ent. faecalis* CIP80371, *P. pentosaceus* ATCC33316, et de la souche curée dérivée de *P. pentosaceus* ATCC33316 ; pistes 6 et 7: digestions par *PstI* des ADNs plasmidiques de *P. pentosaceus* ATCC33316 et de la souche curée dérivée de *P. pentosaceus* ATCC33316 ; piste 8 : fragment *PstI/NdeI* de 2,3 kb interne à l'insert du vecteur pA<sub>541</sub> (sonde) ; piste 9 : fragment *PstI/NdeI* de 4 kb compris dans l'insert du vecteur pA<sub>570</sub> (insert *PstI/PstI* de 7 kb issu de pAB37).  
X : piste sans dépôt

dans cette étude). Un profil plasmidique caractéristique de *P. pentosaceus* ATCC33316 obtenu en gel d'agarose 0,7% après révélation aux UV est présenté sur la figure<sub>(III)</sub> 15. Les bandes correspondant aux diverses formes de pAB10 et de pAB37 sont difficiles à distinguer. Cependant, il apparaît que les bandes migrant le plus loin sont les plus intenses : le plasmide pAB10 pourrait donc être majoritaire dans nos extraits.

L'hydrolyse du mélange plasmidique pAB10-pAB37 par différentes endonucléases de restriction (*EcoRV* et *PstI*) fait apparaître nettement six fragments *EcoRV* (12 / 10 / 6 / 3,6 / 3,4 et 2,5 kb environ) et 4 fragments *PstI* (10 / 7 / 6 et 4 kb environ). Des fragments de taille plus petite sont également présents sur gel, mais ne sont pas visualisables sur nos clichés. Une plus forte intensité est observée pour les fragments *EcoRV* de 6 et 3,6 kb, et *PstI* de 7 kb (Figure<sub>(III)</sub> 16). Ceci peut s'expliquer par le fait que ces fragments plus intenses appartiennent au plasmide majoritaire dans nos extraits, et/ou par la co-migration de fragments de taille identique.

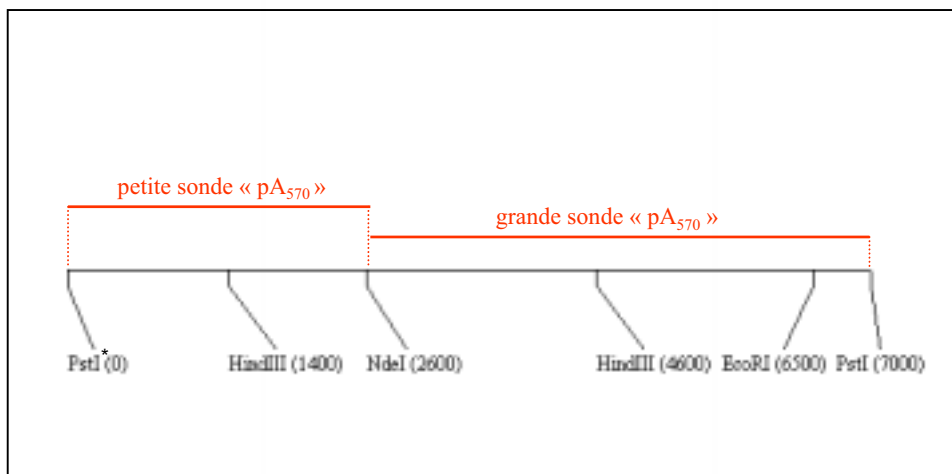
#### A) Etude du plasmide pAB10

Les fragments issus de la digestion de l'ADN plasmidique extrait de *P. pentosaceus* ATCC33316 (mélange des plasmides pAB10 et pAB37) par l'enzyme de restriction *PstI* ont été clonés dans le vecteur pUC19 (linéarisé à *PstI* et déphosphorylé). L'analyse de 27 clones issus de cette banque est présentée dans le tableau<sub>(III)</sub> VIII. Quatorze vecteurs recombinants possèdent un insert de même taille, estimée à 10 kb (Tableau<sub>(III)</sub> VIII). Une carte de restriction de l'insert de l'un de ces vecteurs, pA<sub>541</sub>, a été réalisée avec les enzymes de restriction *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII* et *NdeI* (Figure<sub>(III)</sub> 17). Cette carte a permis de montrer que le même fragment est porté par les treize autres vecteurs portant un insert *PstI* de 10 kb (les deux orientations de clonage sont présentes).

Afin de vérifier l'origine plasmidique de l'insert de pA<sub>541</sub>, une recherche d'homologie a été réalisée entre le sous-fragment *PstI/NdeI* de 2,3 kb (utilisé comme sonde) et les ADNs plasmidiques issus de *P. pentosaceus* ATCC33316 (Figure<sub>(III)</sub> 17). Le profil obtenu est présenté dans la figure<sub>(III)</sub> 18. La présence d'un signal d'hybridation unique (dont la taille est de 10 kb) dans la piste contenant les ADNs plasmidiques extraits de *P. pentosaceus* ATCC33316 et hydrolysés à *PstI* (piste 6) confirme que l'insert de pA<sub>541</sub> correspond à de l'ADN plasmidique. La présence de signaux d'hybridation dans la piste 4 contenant un extrait d'ADN chromosomique de *P. pentosaceus* ATCC33316 digéré à *HindIII* montre que cet extrait contient aussi de l'ADN plasmidique. En effet, la visualisation de deux signaux d'hybridation est conforme avec l'existence d'un site *HindIII* dans la portion *PstI/NdeI* de l'insert de pA<sub>541</sub> utilisée comme sonde. Le premier signal (environ 4 kb) correspond au fragment *HindIII* de 4,1 kb interne au segment *PstI* cloné (Figure<sub>(III)</sub> 17). Le second signal correspond à un fragment *HindIII* dont la taille est proche de 6 kb. La somme des tailles des deux fragments *HindIII* reconnus par la sonde correspond à la taille de l'insert de pA<sub>541</sub> (10 kb). Ceci

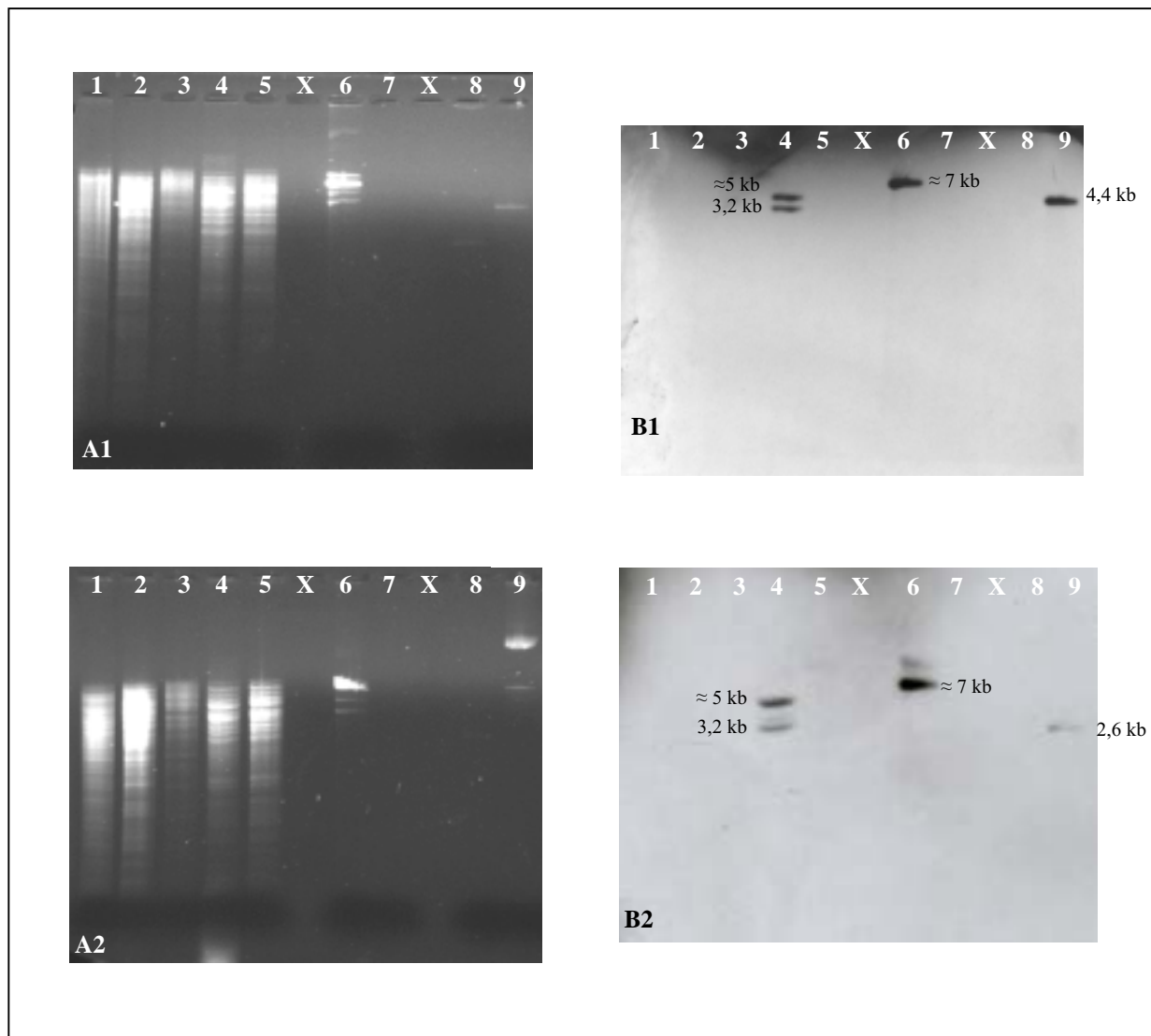






**Figure<sub>(III)</sub> 19 : carte de restriction de l'insert de 7 kb de pA<sub>570</sub>.**

Les sites enzymatiques *PstI*, *HindIII*, *EcoRI* et *NdeI* sont représentés par un trait et leur localisation (par rapport site *PstI*\* choisi comme position 0) est indiquée entre parenthèse.



**Figure<sub>(III)</sub> 20 : vérification de l'origine plasmidique du fragment de 7 kb cloné dans le vecteur pA<sub>570</sub>.**

**(A) : migration électrophorétique**

**(B) : autoradiographie après hybridation avec le fragment interne *PstI/NdeI* de 4,4 kb (B1) ou de 2,6 kb (B2)**

pistes 1 à 5: digestions par *HindIII* des ADNs chromosomiques de *B. subtilis* JH642, *Lc. lactis* FACC1630, *Ent. faecalis* CIP80371, *P. pentosaceus* ATCC33316, et de la souche curée dérivée de *P. pentosaceus* ATCC33316 ; pistes 6 et 7: digestions par *PstI* des ADNs plasmidiques de *P. pentosaceus* ATCC33316 et de la souche curée dérivée de *P. pentosaceus* ATCC33316 ; piste 8 : fragment *PstI/NdeI* de 2,3 kb interne à l'insert du vecteur pA<sub>541</sub> ; piste 9(1) : fragment *PstI/NdeI* de 4,4 kb compris dans l'insert du vecteur pA<sub>570</sub> (grande sonde « pA<sub>570</sub> ») ou piste 9(2) : fragment *PstI/NdeI* de 2,6 kb compris dans l'insert du vecteur pA<sub>570</sub> (petite sonde « pA<sub>570</sub> »)  
X : piste sans dépôt

permet de suggérer que l'insert de pA<sub>541</sub> appartient à pAB10 et correspond à la totalité (ou la très grande majorité du moins) du plasmide. Afin de vérifier cette hypothèse, une amorce PCR a été définie à chaque extrémité de la séquence du fragment *PstI* de 10 kb cloné (Figure<sub>(III)</sub> 17). L'utilisation de ce couple d'amorces sur un extrait plasmidique issu de *P. pentosaceus* ATCC33316 a permis d'obtenir un amplifiat de taille attendue (303 pb), dont la séquence contient un site *PstI* unique. Le fragment d'ADN plasmidique de 10 kb cloné correspond donc à la forme linéarisée du plasmide pAB10.

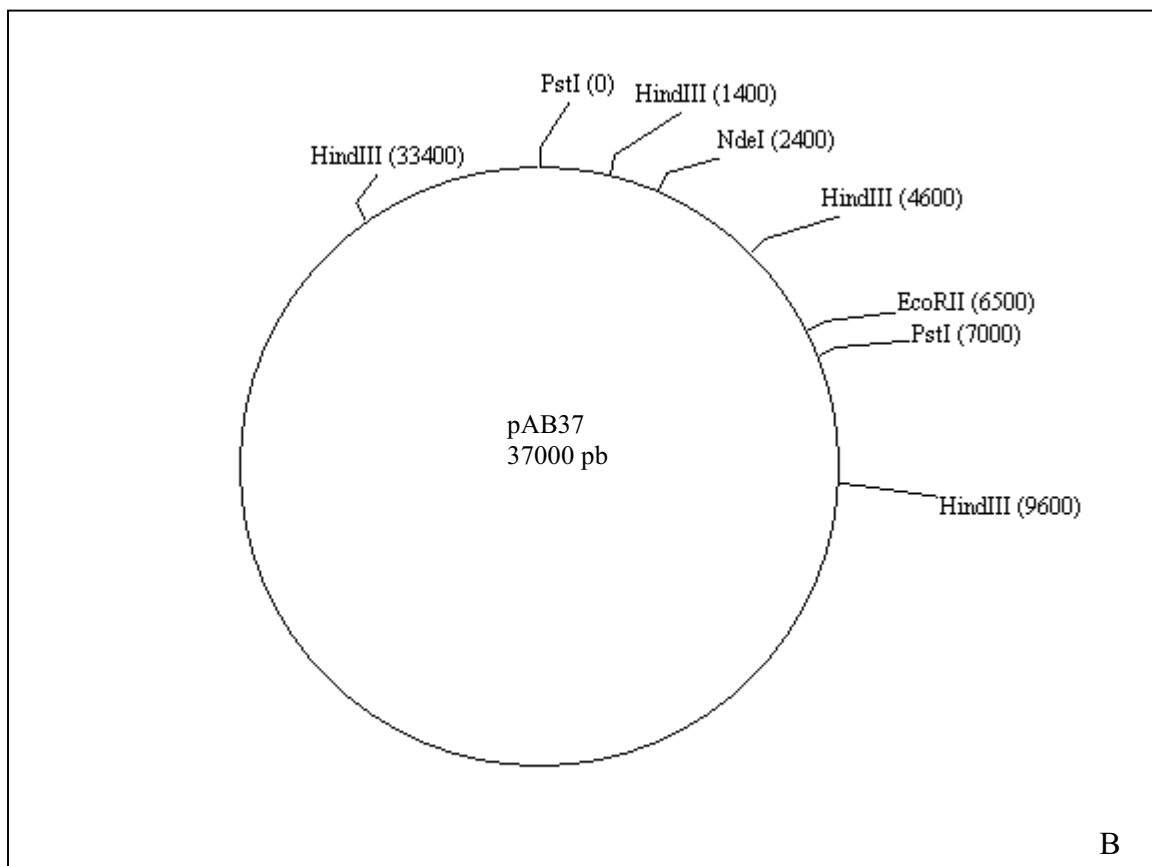
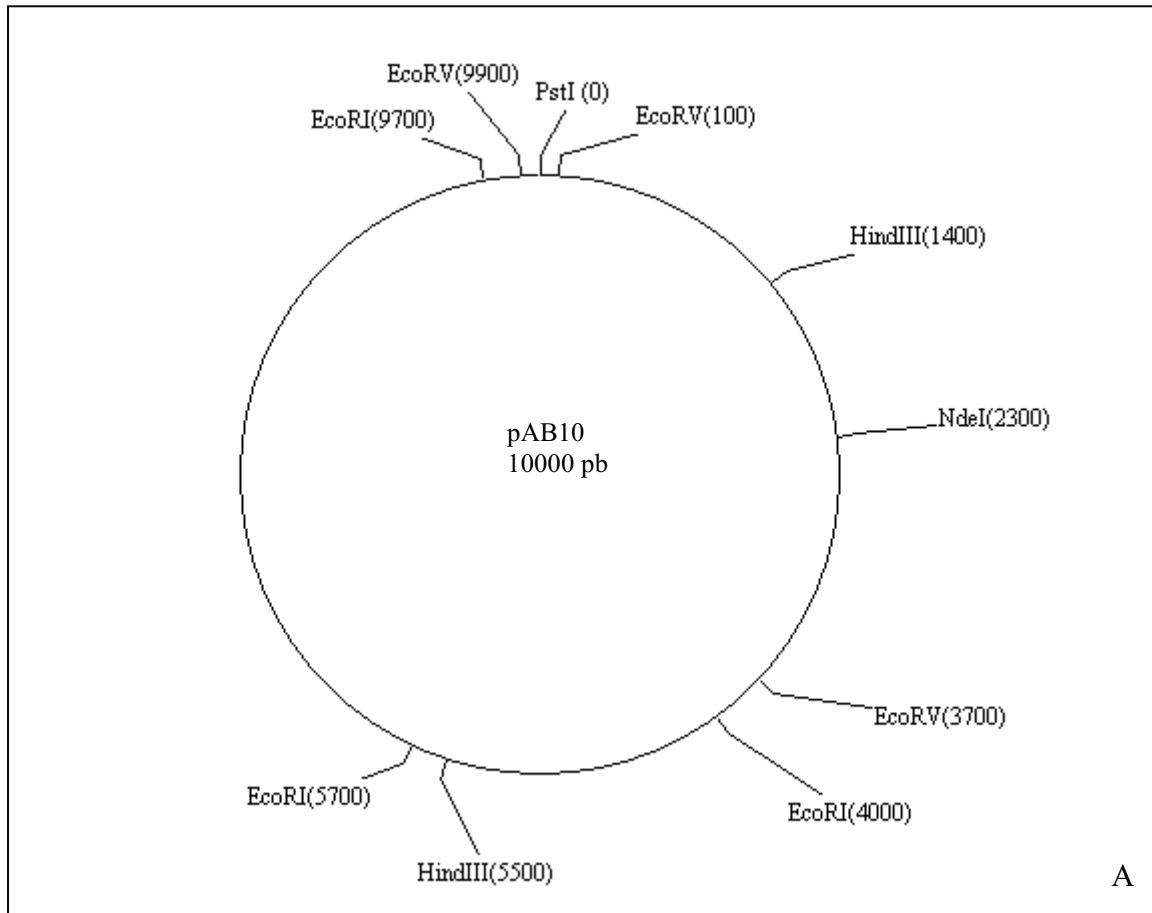
pAB10, sous la forme d'un fragment *PstI* de 10 kb a donc été cloné majoritairement dans notre banque (14 clones/27 analysés). Ce phénomène a été également observé lors de la réalisation de banques à *HindIII*, où les fragments d'environ 6 et 4 kb étaient largement représentés. D'autre part, l'observation de la carte montre que pAB10 est constitué de deux fragments *EcoRV* de 6,2 et 3,6 kb, qui correspondent en taille aux deux fragments intenses observés après digestion *EcoRV* du mélange pAB10-pAB37 (Figure<sub>(III)</sub> 17). Ces éléments supportent donc l'hypothèse d'une plus forte représentation de pAB10 dans nos extraits. L'étude ne permet toutefois pas d'apprécier les quantités relatives des plasmides chez *P. pentosaceus* ATCC33316 ; la surabondance de pAB10 (plus petit plasmide) pouvant être inhérente à la méthode d'extraction.

### B) Etude du plasmide pAB37

Parmi les fragments observés après hydrolyse enzymatique à *EcoRV* et *PstI* du mélange pAB10-pAB37, les fragments *EcoRV* de 6,2 et 3,6 kb et le fragment *PstI* de 10 kb appartiennent à pAB10 (Figure<sub>(III)</sub> 16). Les autres fragments qui étaient visibles sur gel (*EcoRV* : 12 / 10 / 3,4 et 2,5 kb ; et *PstI* : 7 / 6 et 4 kb) peuvent donc être attribués à pAB37. De plus, il est probable que la forte intensité du signal *PstI* de 7 kb mentionnée précédemment, résulte de la co-migration de plusieurs fragments de même taille, tous issus de pAB37.

L'examen de la banque plasmidique créée à *PstI* (Tableau<sub>(III)</sub> VIII) suggère que certains fragments de pAB37 ont été également clonés. En effet, différents vecteurs portent des inserts de tailles compatibles avec celles des fragments de pAB37 définis plus haut (7 / 6 et 4 kb). La recherche et le positionnement des sites *EcoRI* et *HindIII* internes a montré que trois fragments distincts de 7 kb (pA<sub>570</sub>, pA<sub>553</sub> et pA<sub>555</sub>) et un fragment de 4 kb (pA<sub>560</sub>) ont été clonés (Tableau<sub>(III)</sub> VIII). Les plasmides pA<sub>558</sub> et pA<sub>542</sub> portent quant à eux des inserts *PstI* de 2 et 1 kb, respectivement. Si tous ces fragments proviennent bien de pAB37, 28 kb ont été clonés, représentant 75 % de la taille du pAB37.

L'étude d'un premier fragment de 7 kb (pA<sub>570</sub>) a été initiée. Une carte de restriction partielle réalisée avec les enzymes de restriction *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, et *NdeI* est présentée Figure<sub>(III)</sub> 19. L'origine plasmidique de l'insert de 7 kb a été testée par Southern-blot, selon la même démarche que



**Figure<sub>(III)</sub> 21: carte de restriction des plasmides pAB10 et pAB37.**

A : plasmide pAB10 ; B : plasmide pAB37.

Les distances sont exprimées en paires de bases (pb).

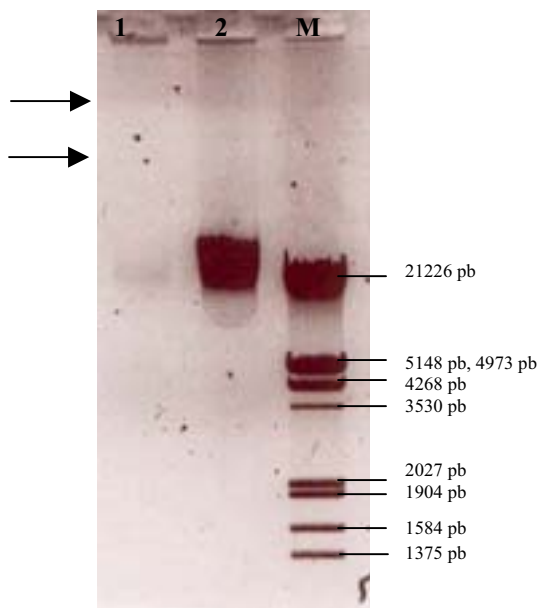
celle utilisée dans le paragraphe I. A. Les deux sous-fragments *PstI/NdeI* (un sous-fragment de 2,6 kb et un autre de 4,4 kb) ont été utilisés comme sondes (nommés respectivement petite sonde « pA<sub>570</sub> » et grande sonde « pA<sub>570</sub> » ; Figure<sub>(III)</sub> 20 A et B). Ils présentent le même signal d'hybridation unique dans la piste 6 contenant les ADNs plasmidiques issus de *P. pentosaceus* ATCC33316 et hydrolysés à *PstI*. Ceci confirme que l'insert de 7 kb *PstI* correspond à de l'ADN plasmidique. D'autre part, le signal est bien différent de celui observé avec la sonde correspondant à l'ADN de pAB10. La présence d'un double signal d'hybridation pour chaque sonde (petite sonde « pA<sub>570</sub> » et grande sonde « pA<sub>570</sub> ») est conforme avec l'existence d'un site *HindIII* dans chaque portion *PstI/NdeI* de l'insert de pA<sub>570</sub> (Figure<sub>(III)</sub> 19). Les deux sondes reconnaissent un fragment commun *HindIII* de environ 3,2 kb, interne au segment *PstI* de 7 kb cloné. Le second fragment *HindIII* reconnu par les sondes correspond au fragment *HindIII* chevauchant le fragment *PstI* cloné, au niveau de chaque extrémité.

### C) Conclusion

Cette première partie du travail a permis de cloner et de cartographier la totalité du plasmide pAB10. Malgré sa surabondance dans les extraits, différents fragments de restriction potentiellement issus de pAB37 ont également été clonés. L'analyse complète d'un premier fragment *PstI* de 7 kb (cartographie et hybridations) permet de proposer une carte partielle d'une région d'environ 13 kb (Figure<sub>(III)</sub> 21). La réalisation d'une carte totale de pAB37 nécessite l'étude des autres fragments *PstI* clonés (en cours au laboratoire).

Le clonage de la totalité de pAB10 montre que ses fonctions répliquatives sont compatibles avec une origine de réplication de type ColEI portée par le vecteur de clonage utilisé. Les travaux de Bénachour *et al.* (1995) ont montré une forte homologie entre les extraits plasmidiques de *P. pentosaceus* ATCC33316 (NCDO990) et le réplicon minimum du plasmide pUCL287 issu de *T. halophila* (Bénachour *et al.*, 1995). Le réplicon de pAB10 ou de pAB37 appartiendrait donc à la famille des réplicons thêta de type pUCL287. Ce dernier est rare chez les bactéries lactiques. Il a été décrit chez *Lb. sakei* RV332 (Alpert *et al.*, 2003) et reste supposé chez *Lb. plantarum* IB137 (Bénachour *et al.*, 1995).

La démonstration d'un rôle éventuel des plasmides pAB10 et/ou pAB37 dans la tolérance au stress de *P. pentosaceus* nécessite l'obtention d'un dérivé curé. Le clonage d'un fragment de restriction issu de chaque plasmide offrira la possibilité de vérifier l'absence d'ADN plasmidique dans un tel dérivé.



**Figure<sub>(III)</sub> 22 : profil de migration électrophorétique d'un aliquote des extraits d'ADN plasmidique (piste 1) et chromosomique (piste 2) issus de la souche *P. pentosaceus* ATCC33316 en cours de curage.**

M : marqueur de poids moléculaire Lambda/*EcoRI*/*Hind*III (Qbiogène)

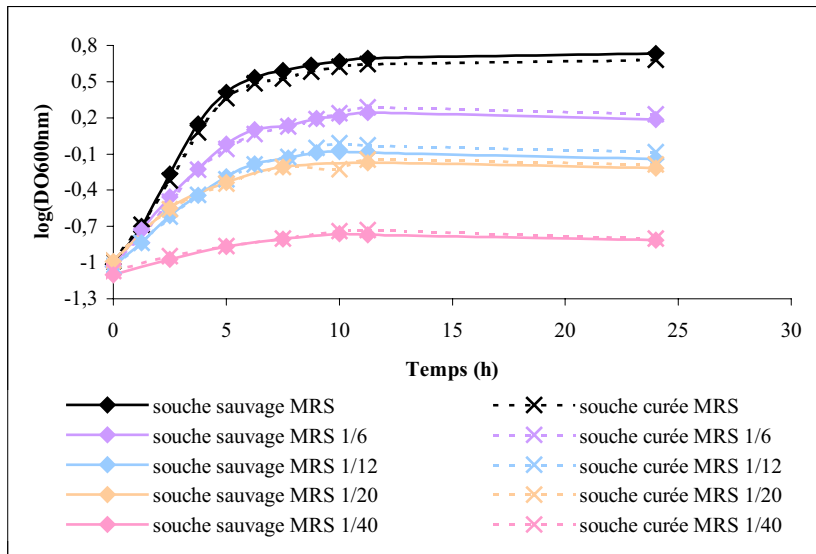
Les flèches indiquent les bandes pouvant correspondre à de l'ADN plasmidique

## II) OBTENTION D'UNE SOUCHE CURÉE DERIVÉE DE *P. PENTOSACEUS* ATCC33316

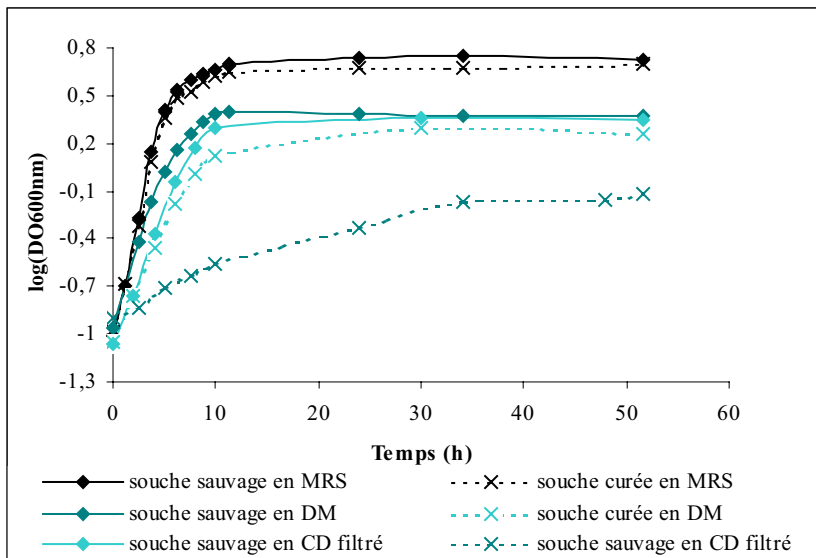
Bénachour *et al.* (1996) ont rapporté une méthode de curage appliquée à *P. pentosaceus* ATCC33316 basée sur l'utilisation d'un antibiotique, la novobiocine (Nov), inhibant l'action de la gyrase et donc la réplication des ADNs surenroulés. Ces auteurs ont montré que la souche curée dérivant de *P. pentosaceus* ATCC33316 perdait la capacité à utiliser le maltose, le mélibiose, le saccharose et le raffinose. Ces fonctions sont également plasmidiques chez *P. pentosaceus* PPE1 (pSRQ1 de 30 MDa; Gonzalez et Kunka, 1983), *P. pentosaceus* ATCC25744 (pSRQ12 de 28 MDa; Gonzalez et Kunka, 1986) et *P. pentosaceus* PPE5.0 (pSRQ17 de 23 MDa; Gonzalez et Kunka, 1986). Le dérivé curé obtenu par Bénachour *et al.* (1996) était également partiellement affecté dans sa capacité à métaboliser le lactose, suggérant que cette fonction est codée à la fois par des déterminants chromosomiques et plasmidiques.

Les données décrites par Bénachour *et al.* (1996) nous ont permis d'obtenir plusieurs dérivés curés de *P. pentosaceus* ATCC33316. Après traitement à la novobiocine, les bactéries incapables de se développer en présence de chacun des quatre sucres utilisés comme seule source de carbone ont été recherchées. Trente repiquages successifs en bouillon MRS Nov ont été nécessaires pour obtenir un clone incapable de se développer dans les conditions indiquées. Cependant, le profil électrophorétique de l'extrait plasmidique réalisé à ce stade du curage a montré qu'une faible quantité de plasmides subsistait (Figure<sub>(III)</sub> 22). Deux repiquages supplémentaires en MRS Nov ont permis d'obtenir une souche qui est à la fois incapable d'utiliser les sucres et est dépourvue de plasmides visibles sur gel d'agarose 0,7% après révélation aux UV. Il semble donc que la disparition des capacités de métabolisation des sucres précède la disparition complète des plasmides. Ce décalage pourrait être causé par l'absence d'un nombre suffisant de copies des plasmides porteurs des gènes impliqués. Une seconde hypothèse serait la perte préférentielle du plasmide porteur des gènes impliqués dans l'utilisation de ces sucres (probablement le grand plasmide, Bénachour *et al.*, 1996). Toutefois, la perte concomitante des deux plasmides endogènes de *P. pentosaceus* ATCC33316 a été observée par Gonzalez et Kunka (1986) et Bénachour *et al.* (1996).

La perte de capacité à métaboliser le maltose, le mélibiose, le saccharose et le raffinose de la souche curée a été vérifiée en réalisant une galerie API 50 CHL. La détermination de la séquence de l'ADN<sub>R</sub>16S a confirmé qu'il s'agissait bien d'un clone issu de *P. pentosaceus*. L'absence d'ADN plasmidique dans la souche curée dérivée de *P. pentosaceus* ATCC33316 a été quant à elle démontrée par l'absence de signal d'hybridation entre l'ADN extrait de cette souche (extraction plasmidique) et les deux fragments plasmidiques *Pst*I clonés de 10 et 7 kb, issus respectivement de pAB10 et de pAB37, utilisés comme sondes (Figure<sub>(III)</sub> 18 et III-20, pistes 7).



Figure(III) 23 : suivi de la croissance de *P. pentosaceus* ATCC 33316 (carré) et de son dérivé curé (triangle) en milieu MRS et en MRS dilué.



Figure(III) 24 : suivi de la croissance de *P. pentosaceus* ATCC 33316 (carré) et de son dérivé curé (triangle) en milieu MRS (avec remplissage) et en milieu DM (sans remplissage).



### III) COMPARAISON DE LA SENSIBILITE AU STRESS DE *P. PENTOSACEUS* ET DE SON DERIVE CURE

#### A) Evolution en l'absence de contrainte

##### 1) Croissance et survie en milieu riche MRS

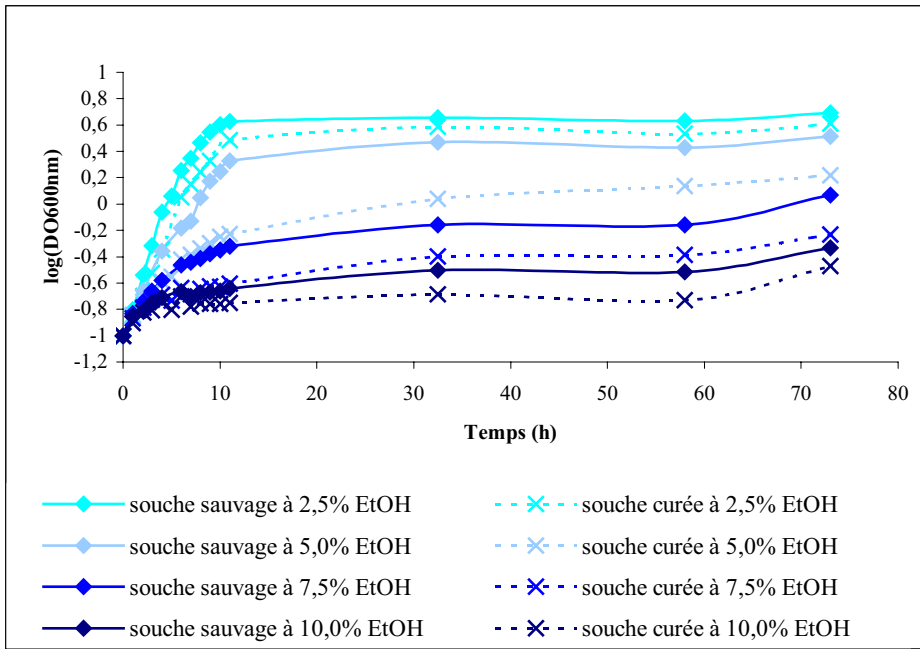
L'évolution de la croissance de *P. pentosaceus* ATCC33316 et de son dérivé curé en milieu MRS est représentée dans la figure<sub>(III)</sub> 23. Les deux souches présentent sensiblement les mêmes caractéristiques de croissance et de pH final en milieu MRS. Une croissance légèrement plus importante est toutefois notée pour la souche sauvage ( $\mu=0,68 \text{ h}^{-1}$ ,  $\text{DO}_{\text{max à } 600\text{nm}}=5,2$ ) par rapport au dérivé curé ( $\mu=0,64 \text{ h}^{-1}$ ,  $\text{DO}_{\text{max à } 600\text{nm}}=5,0$ ). Le cas contraire est souvent observé, à savoir une croissance plus rapide du dérivé curé (Wegrzyn et Wegrzyn, 2002; Lee et Moon, 2003). En effet, il est considéré que les cellules contenant des plasmides ont besoin de plus d'énergie et de nutriments pour synthétiser plus d'ADN, d'ARNm et de protéines que les cellules dépourvues de plasmides. Le plasmide est en compétition avec le chromosome vis-à-vis des ressources limitantes de la cellule servant à la réplication de l'ADN et à l'expression.

La concentration en cellules cultivables a été comparée pendant la croissance. En phase exponentielle de croissance ( $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,6$ ) les valeurs moyennes sont de  $1,2 \cdot 10^8$  UFC/mL pour la souche sauvage et de  $8,5 \cdot 10^7$  UFC/mL pour la souche curée. Une différence de taille entre les cellules sauvages et curées peut expliquer l'écart observé entre les valeurs en UFC/mL. En phase stationnaire, l'évolution de la concentration en cellules cultivables après 20 h est de + 1000 % pour la souche sauvage (par rapport à la concentration initiale). Un déclin est ensuite observé après 40 h : la concentration en cellules cultivables est alors inférieure à la concentration initiale (survie de 79%). Les valeurs de la souche curée sont légèrement supérieures (+ 1420 % et + 226% à 20h et 40h, respectivement). Malgré une croissance en MRS légèrement plus faible (voir partie III. 1.), la proportion de cellules cultivables en phase stationnaire est donc légèrement plus forte pour la souche curée.

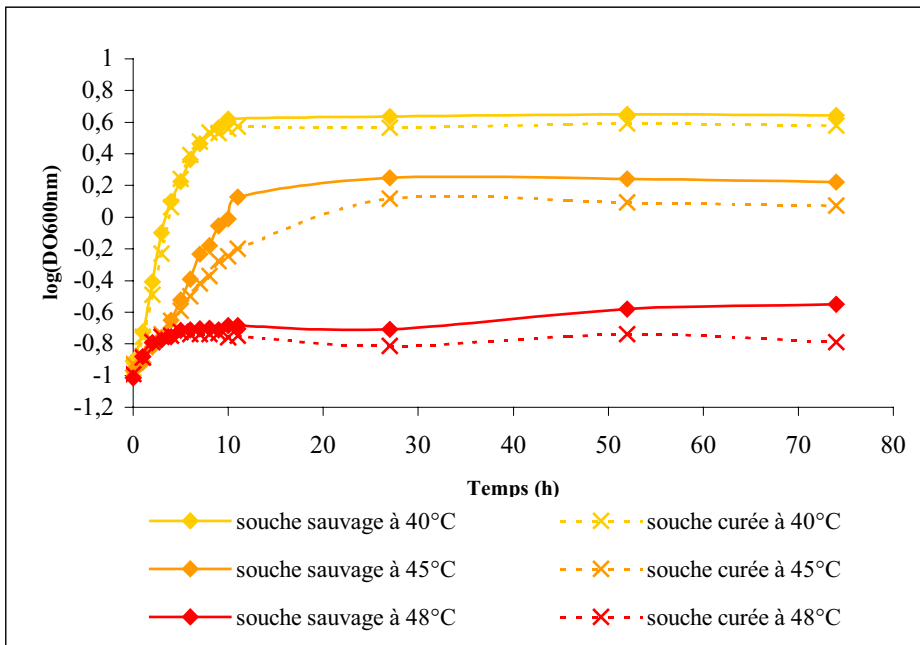
##### 2) Croissance en conditions de carence nutritive

Des conditions de carence nutritive ont été créées, en diluant progressivement le milieu MRS (Figure<sub>(III)</sub> 23). La carence s'exerce vis-à-vis de tous les composés présents (sucre, phosphate, acides aminés...). Nous avons retenu des dilutions situées entre  $1/6^{\text{ème}}$  et  $1/40^{\text{ème}}$  (aucune croissance n'étant observée au-delà de cette dernière dilution). Des croissances similaires ont été observées pour la souche sauvage et le dérivé curé pour les dilutions au  $1/6^{\text{ème}}$ ,  $1/12^{\text{ème}}$  et au  $1/20^{\text{ème}}$ . La souche curée a cependant une croissance légèrement supérieure à la souche sauvage (Figure<sub>(III)</sub> 23).

Des croissances de *P. pentosaceus* ATCC33316 et de son dérivé curé ont été également réalisées en milieu chimiquement défini (DM) dont la seule source en sucre est le glucose. Ce milieu,



Figure<sub>(III)</sub> 25 : comparaison de l'effet de différentes intensités de stress éthanolique sub-optimal sur la croissance de *P. pentosaceus* ATCC33316 et de son dérivé curé en milieu MRS.



Figure<sub>(III)</sub> 26 : comparaison de l'effet de différentes intensités de stress thermique sub-optimal sur la croissance de *P. pentosaceus* ATCC33316 et de son dérivé curé en milieu MRS.

moins riche que le MRS, contient des sources minérales en azote et en phosphate, différents ions, vitamines et acides aminés ainsi que du glucose (10 g/L) (voir Matériel et Méthodes). La croissance de *P. pentosaceus* ATCC33316 y est réduite par rapport à celle observée en MRS ( $\mu=0,46 \text{ h}^{-1}$ ,  $\text{DO}_{\text{max à } 600\text{nm}}=2,5$ ). La souche curée est quant à elle beaucoup plus affectée dans sa croissance ( $\mu=0,09 \text{ h}^{-1}$ ,  $\text{DO}_{\text{max à } 600\text{nm}}=0,7$ ) (Figure(III) 24). Cependant, la croissance du dérivé curé est partiellement restaurée lorsque le milieu DM est filtré avant inoculation ( $\mu=0,40 \text{ h}^{-1}$ ,  $\text{DO}_{\text{max à } 600\text{nm}}=2,3$  ; Figure(III) 24). La souche curée, comme cela a été observé en milieu MRS, se développe toujours plus lentement que la souche sauvage, et atteint une DO en phase stationnaire plus faible ( $\text{DO}_{\text{max à } 600\text{nm}}=2,0$  et  $2,3$  pour les dérivés curé et sauvage, respectivement).

Les fonctions d'origine plasmidique impliquées dans les légères différences de croissance de *P. pentosaceus* et de son dérivé curé restent à identifier. La fermentation du citrate est connue chez *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Oenococcus* où elle est couplée à la régénération de la force protomotrice. La capacité à transporter le citrate (CitP perméase) est codée par des plasmides chez de nombreuses bactéries lactiques (voir revue Konings, 2002). D'autre part chez *Leu. mesenteroides*, un co-métabolisme du glucose et du citrate a été observé après addition de citrate, augmentant les paramètres de croissance de la souche (Lin *et al.*, 1991). Cependant l'examen de la composition du DM montre qu'il ne contient pas de citrate : la source d'ions  $\text{NH}_4^+$  est le sulfate d'ammonium (2 g/L) alors que le MRS contient une concentration identique de citrate d'ammonium. Ces données suggèrent donc que le métabolisme du citrate ne peut être impliqué dans la différence de croissance entre *P. pentosaceus* et son dérivé curé en milieu DM.

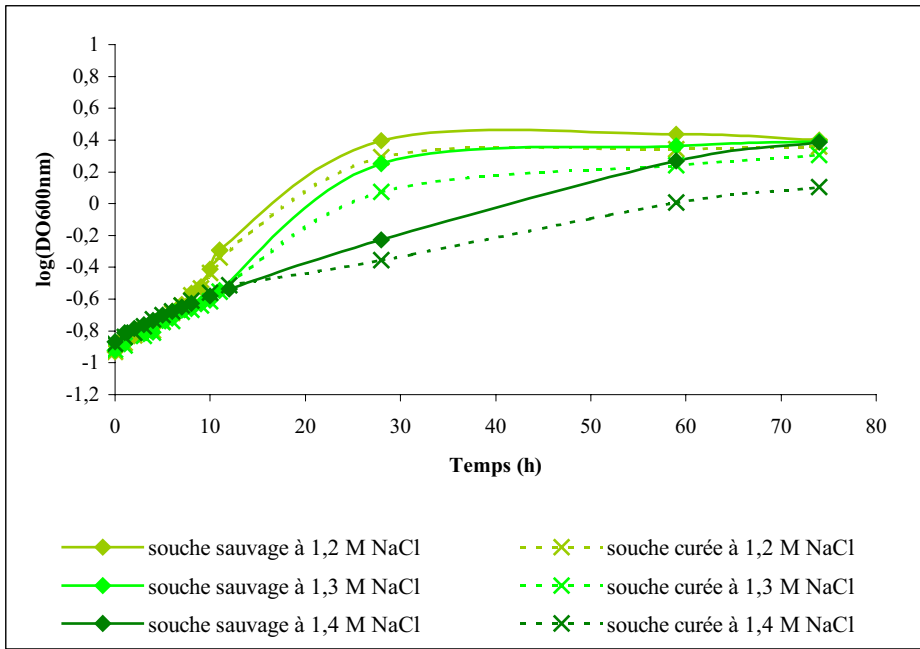
Suite à nos observations selon lesquelles le mode de préparation du milieu DM peut entraîner des variations de croissance chez le dérivé curé, l'étude comparative de la réponse aux stress entre *P. pentosaceus* ATCC33316 et son dérivé a été réalisée en milieu MRS.

## **B) Impact du stress sur les souches sauvage et curée**

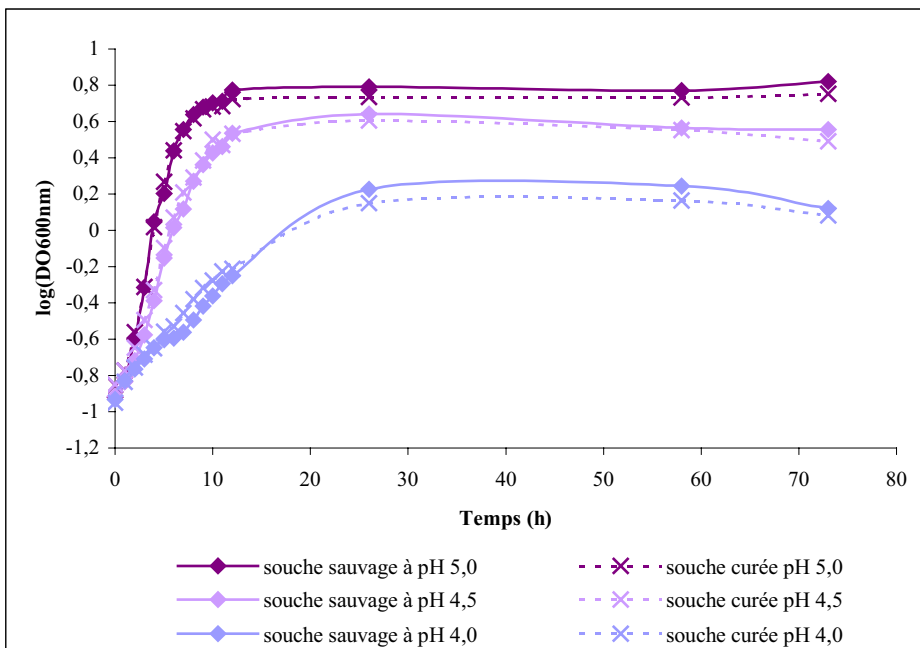
### **1) Acclimatation au stress : croissance en situation de stress sub-optimal**

Des cellules de *P. pentosaceus* ATCC33316 et de son dérivé curé en phase exponentielle ont été inoculées en MRS (i) alcoolisé (2,5% ; 5,0% ; 7,5% et 10,0% v/v), (ii) chauffé (40°C ; 45°C et 48°C), (iii) salé (1,2 M ; 1,3M et 1,4M NaCl) et enfin en MRS acidifié (pH 5,0 ; 4,5 et 4,0). La croissance des deux souches bactériennes est suivie par mesure d'absorbance durant trois jours. Les résultats comparatifs sont présentés dans les figures III-25, 26, 27 et 28.

La croissance de la souche curée est plus affectée en présence de stress modérés de nature éthanolique (Figure(III) 25), thermique (Figure(III) 26) et saline (Figure(III) 27). Ceci se traduit par une diminution du taux de croissance et de la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  en phase stationnaire de la souche curée par



Figure<sub>(III)</sub> 27 : comparaison de l'effet de différentes intensités de stress osmotique sub-optimal sur la croissance de *P. pentosaceus* ATCC33316 et de son dérivé curé en milieu MRS.



Figure<sub>(III)</sub> 28 : comparaison de l'effet de différentes intensités de stress acide sub-optimal sur la croissance de *P. pentosaceus* ATCC33316 et de son dérivé curé en milieu MRS.

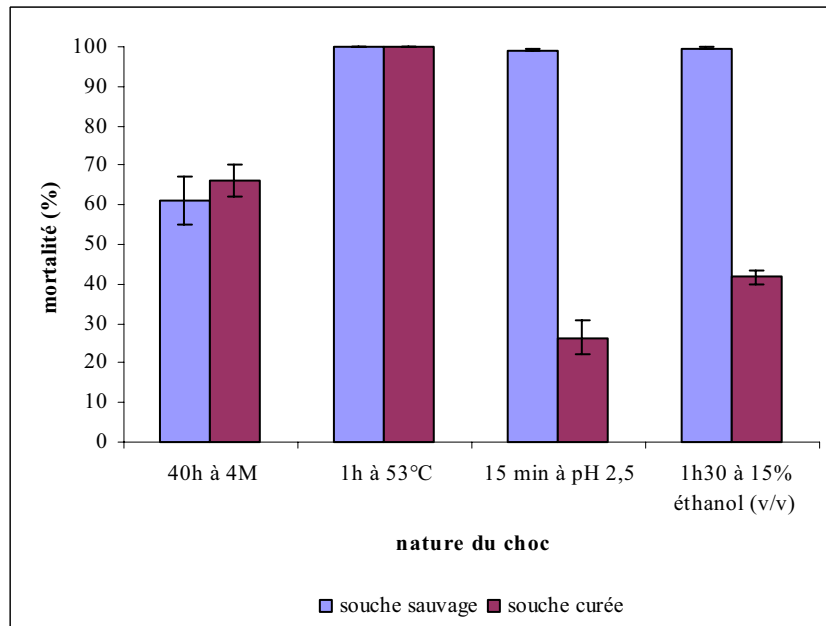
rapport à la souche sauvage. Les écarts les plus importants sont observés pour les conditions suivantes : éthanol 5%, 45°C, et 1,4 M NaCl. Ces résultats suggèrent donc une implication des plasmides dans l'adaptation progressive, ou acclimatation, au stress. Cette « protection » *via* la présence de plasmides n'est pas effective pour tous les types de stress étudiés. Ainsi, aucune différence significative de croissance (sauvage/curée) n'a été observée en milieu acidifié (Figure<sub>(III)</sub> 28).

L'identification des mécanismes sous-jacents par lesquels pAB10 et/ou pAB37 joue(nt) un rôle dans l'acclimatation au stress est délicate à l'issue de ces seuls travaux. Il peut s'agir d'un rôle direct et actif *via* la présence de protéines de stress sur ces plasmides. Un rôle plus indirect, lié à l'altération de fonctions d'origine plasmidique de transport et/ou de métabolisation peut être également envisagé. L'identification de ces mécanismes est également rendue difficile par le fait que les fonctions essentielles au phénomène d'acclimatation sont peu connues à l'heure actuelle. Les premières études globales sur le sujet montrent que des fonctions très diverses sont impliquées (métabolisme des acides aminés, catabolisme, anabolisme, propriétés de surface...). Ces activités sont souvent différentes de celles impliquées dans la réponse au stress brutal (ou « acute stress »). Ainsi, après culture de *E. coli* à 41,5°C, il apparaît que l'expression des gènes codant les protéines chaperonnes et les protéases ATP-dépendantes, essentielles dans la réponse cytoplasmique au stress brutal, varie peu en situation de stress long terme. Ce sont les activités périplasmiques qui montrent des modifications significatives de leur expression, suggérant un rôle clé de la réponse extra-cytoplasmique dans le phénomène d'adaptation aux températures élevées chez *E. coli* (Riehle *et al.*, 2003). D'autre part, certaines protéines dont l'expression est modifiée en situation d'acclimatation ont un rôle jusqu'à présent inconnu et sont parfois spécifiques du genre étudié. C'est le cas de quatre protéines de *L. monocytogenes* impliquées dans l'acclimatation à 4°C (Liu *et al.*, 2002).

## 2) Survie des souches à l'issue d'un stress de type choc

Le rôle des plasmides dans la protection vis-à-vis de stress de type choc a été démontré chez *St. thermophilus*. Ainsi, à l'issue d'un choc de 2 heures à 62°C, une survie réduite d'un facteur 10<sup>5</sup> a été observée pour le dérivé curé du plasmide pCI65st par rapport à la souche sauvage, portant un plasmide sHsp<sup>+</sup> (O'Sullivan *et al.*, 1996). Nous avons donc comparé l'impact de différents chocs sur la concentration en cellules (appréciée par numération) de *P. pentosaceus* ATCC33316 et de son dérivé curé.

Des lots identiques de cellules en phase exponentielle de croissance (DO<sub>600nm</sub> = 0,6) ont été soumis à différents chocs létaux brefs en MRS : stress acide (pH 2,5 pendant 15 min), stress éthanolique (15% éthanol (v/v) pendant 1h30), et stress thermique (53°C pendant 1h). La mortalité engendrée par chacun de ces traitements a été calculée (ratio nombre de cellules viables et cultivables



**Figure<sub>(III)</sub> 29 : mortalité exercée par différents stress létaux intenses en milieu MRS sur *P. pentosaceus* ATCC 33316 (bleu) et de son dérivé curé (bordeaux).**

La quantité de cellules initiales dans ces expériences était de l'ordre de  $1,0 \cdot 10^8$  UFC/mL ( $1,26 \cdot 10^8 \pm 5,6 \cdot 10^7$ )

Ces valeurs sont le résultat d'au moins trois expériences différentes, les écart types sont indiqués au niveau de chaque point

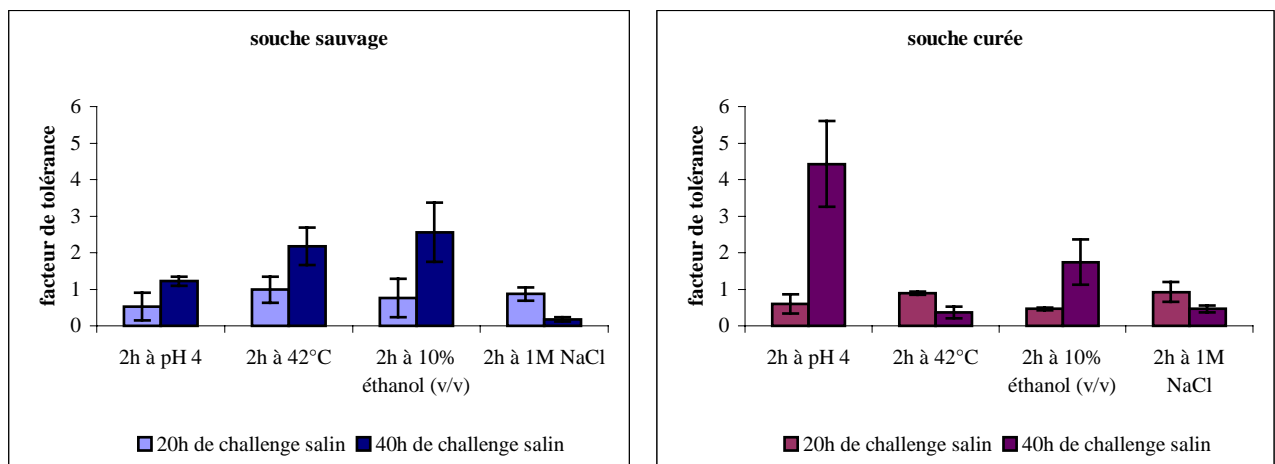
mortalité = (nombre de cellules viables et cultivables au début de l'expérience - nombre de cellules viables et cultivables à l'issue du challenge) / nombre de cellules viables et cultivables au début de l'expérience

avant application /nombre de cellules viables et cultivables à l'issue du choc, exprimé en pourcent). La figure<sub>(III)</sub> 29 reprend les résultats de cette étude. La souche sauvage est plus sensible au choc acide (mortalité de  $99,12\% \pm 0,23\%$  pour la sauvage et de  $26,46\% \pm 4,17\%$  pour le dérivé curé). Le même phénomène est observé pour le choc éthanolique (mortalité de  $99,69\% \pm 0,08\%$  pour la sauvage et de  $41,8\% \pm 1,8\%$  pour le dérivé curé). Il est peu probable que ces deux chocs intenses (entraînant environ  $2 \log_{10}$  de létalité) laissent à la cellule la possibilité d'induire des fonctions spécifiques de protection. La capacité de réponse est plutôt liée à l'équipement protéique de chaque cellule et à son niveau énergétique au moment de l'application du choc. L'absence des plasmides apparaît ici comme un avantage pour la survie de *P. pentosaceus*. On peut envisager que l'action de dérouter de l'énergie vers l'activité de maintien/expression des plasmides se fasse au détriment de l'expression des gènes chromosomiques, et réduise ainsi la capacité ultérieure de survie de la souche sauvage à un choc. L'existence de relations entre la réponse au choc et le contrôle de la réplication de l'ADN plasmidique peut être également envisagée. La quantité de protéines essentielles à la réponse au stress chez la sauvage pourrait être moindre si ces protéines interviennent également dans la réplication plasmidique.

Une létalité identique entre *P. pentosaceus* ATCC33316 et son dérivé curé a été mesurée après application du choc thermique (mortalité de  $99,94\% \pm 0,06\%$  pour la sauvage et de  $99,93\% \pm 0,08\%$  pour le dérivé curé). L'absence de différence significative entre les deux souches peut suggérer l'absence d'interférences entre la capacité de survie et la présence de plasmides **pour ce type de choc**, ou bien pour **ce niveau d'intensité de choc**. En effet, le choc thermique appliqué réduit la survie de plus de  $3 \log_{10}$ . Il est donc plus intense que les chocs acides et éthanoliques appliqués précédemment. L'impact d'un choc à  $53^{\circ}\text{C}$  plus bref (20 minutes d'application) a donc été testé sur les deux souches. Il réduit de  $2 \log_{10}$  la population de la souche sauvage (mortalité de  $99,51\%$ ). Dans les mêmes conditions, la mortalité de la souche curée est seulement de  $49,12\%$ .

L'étude comparative des survies des deux souches a été également réalisée en choc salin (4M NaCl) sur une durée plus importante. En effet, la concentration de *P. pentosaceus* ATCC33316 dans ce milieu n'est réduite qu'à partir de 40h de traitement (mortalité de  $61,50\% \pm 5,82\%$  pour la sauvage et de  $67,05\% \pm 3,70\%$  pour le dérivé curé). Il s'agit donc dans ce cas de figure d'un stress intense prolongé. Après 20h de choc salin, on observe des valeurs très proches de viabilité ( $118,66\% \pm 24,70\%$  pour la sauvage et de  $109,44\% \pm 25,52\%$  pour le dérivé curé). Aucune différence significative n'est donc observée en matière de survie long terme dans le MRS salé.

L'analyse d'extraits plasmidiques issus de cellules de *P. pentosaceus* ATCC33316 en phase exponentielle de croissance ayant subies un stress thermique (1h à  $53^{\circ}\text{C}$ ), éthanolique [1h30 à 15% d'éthanol (v/v)], acide (15 min à pH 2,5) ou osmotique (20h à 4M NaCl) montre la persistance des



**Figure<sub>(III)</sub> 30 : comparaison des facteurs de tolérance de *P. pentosaceus* ATCC33316 (bleu) et de son dérivé curé (bordeaux) vis-à-vis d'un challenge salin de 20h (clair) et de 40h (foncé) en MRS.**

Ces valeurs sont le résultat d'au moins trois expériences différentes, les écart types sont indiqués au niveau de chaque point.

```

atgaaatcatgtatccggttttgtagaggagagaccatttcaatgagttataatgtacaaccattacgaaacgcagcaagaa
M K S C I R F V R G E T I S M S Y N V Q P L R T Q Q E
atcaacgactttttattctgtttgagacgcaacaaaaacgccgaacgcgacggttttctgtttttgatcggcattaatagc
I N D F L F C L R R N K N A E R D V F L F L I G I N S
ggtttgcgcattgtccgatatcgtgaaattaaagaaaaaacgctgatttctcgaacacacgtattgtggagcaaaaa
G L R M S D I V K L K K K D V I S S K N P R I V E Q K
accggaaaaacacgcattttatatttaagcagcctgcaggagttgatccaggactacagaaagacctggagccagaagat
T G K T R I L Y L S S L Q E L I Q D Y T K D L E P E D
tatttgtttccagactaaaggcgtcatttagaagtcaatacggctatcagatggtttcaaaaagtcgcccgaatatta
Y L F P S T K G G H L E V N T V Y Q M F Q K V A A I L
gatcgggacgatatcggcacacacagctgcaagacatttggttaccactattacaagaaaaccaaagcgtggctaca
D R D D I G T H T L R K T F G Y H Y Y K K T K D V A T
ctcatggaatattcggtcacagcagcaaaaaatcaccaaacgctatatcgggatcaatgaagatgaaatcagtgagaca
L M E I F G H S S E K I T K R Y I G I N E D E I S E T
ttgttgaacttccggttttaggtttctaa
L L N F R L G F *

```

**Figure<sub>(III)</sub> 31 : gènes portés par pAB10 : un cadre ouvert de lecture codant une protéine de 197 aa homologue à plusieurs recombinases/invertases.**

Le codon stop de la séquence nucléotidique (écrite en minuscule)est inscrit en rose.

La séquence en acide aminé déduite est inscrite sous la séquence nucléotidique en code à une lettre.

La terminaison de cette protéine est matérialisée par un astérisque.



plasmides pAB10 et pAB37 (résultats non montrés). Des essais de stabilité plasmidique réalisés sur une centaine de colonies obtenues à partir de cultures de *P. pentosaceus* ATCC33316 stressées [1h à 53°C, 1h30 à 15% d'éthanol ou 15 min à pH 2,5) confirment que les intensités de stress employées sont insuffisantes pour induire le curage de la souche sauvage (les 100 colonies se développant sur DM maltose, DM mélibiose, DM saccharose et DM raffinose). Ces données indiquent que les létalités identiques mesurées entre les souches sauvage et curée après application d'un stress létal thermique ou salin ne peuvent être attribuées au curage de la souche sauvage.

### 3) Comparaison de la capacité adaptative des souches sauvage et curée

*P. pentosaceus* montre une plus forte sensibilité que son dérivé curé aux chocs acide, éthanolique et thermique. Cette observation n'exclut pas pour autant l'hypothèse selon laquelle les plasmides de *P. pentosaceus* ATCC33316 seraient porteurs de fonctions de protection au stress inductibles par un stress modéré. Il convient donc de réitérer ces expériences en pré-adaptant les cellules à un stress modéré avant de procéder aux chocs.

Ces manipulations ont été initiées au laboratoire. Les critères de pré-adaptations choisis correspondent à des stress réduisant la population de 0,25-0,5 log<sub>10</sub> : stress acide : pH 4,0 pendant 2h; stress thermique : 42°C pendant 2h; stress éthanolique : 10% éthanol (v/v) pendant 2h et stress salin : 1 M NaCl pendant 2h. Tous ces traitements ont montré au préalable une aptitude à développer une protection vis-à-vis de différents challenges (thermique, éthanolique et acide; cf chapitre précédent).

L'effet de ces stress adaptatifs a été évalué sur la survie de *P. pentosaceus* ATCC33316 et de son dérivé curé à l'issue d'un choc salin (20 ou 40h à 4M NaCl). Les résultats sont exprimés par le facteur de tolérance, qui traduit le rapport existant entre les survies des cellules adaptées et non adaptées (Figure<sub>(III)</sub> 30). Une valeur supérieure à 1 traduit donc un phénomène d'adaptation.

Les deux souches (non adaptées) exhibent une résistance naturelle analogue face au choc salin après 20h d'exposition (+118,66% ± 24,70% pour la sauvage et +109,44% ± 25,52% pour le dérivé curé) ou 40h d'exposition (+ 61,50% ± 5,82% pour la souche sauvage et +67,05% ± 3,70% pour le dérivé curé).

Aucun effet protecteur des périodes d'adaptation n'est observé après 20 h (Figure<sub>(III)</sub> 30). Après une exposition de 40h en MRS 4M NaCl, des effets modestes sur la survie ont été mesurés. Ainsi, la survie à 40h de la souche sauvage en MRS salé est légèrement améliorée par une pré-adaptation thermique (x 2) ou éthanolique (x 2,5). Aucun effet protecteur n'est observé après adaptation acide, tandis qu'un effet de sensibilisation est observé après adaptation saline.

Chez le dérivé curé, un effet identique de sensibilisation au sel est retrouvé. Deux différences

**Tableau<sub>(III)</sub> IX : recherche de protéines homologues à la protéine putative de 197 aa codée par pAB10 (interrogation BLASTp).**

	Longueur de la protéine	% d'identité avec la protéine putative codée par pAB10	% d'homologie avec la protéine putative codée par pAB10	N° accession
protéine hypothétique d' <i>Ent. faecium</i>	205 aa	60% sur 191 aa	73% sur 191 aa	ZP_00036382.1
intégrase/recombinase de <i>Lb. plantarum</i>	186 aa	53% sur 182 aa	70% sur 182 aa	NP_784925.1
protéine hypothétique de <i>B. cereus</i> (codée par le plasmide pBC-Tim)	190 aa	41% sur 184 aa	64% sur 184 aa	BAC57065.1
intégrase/recombinase/invertase du bactériophage phBC6A52 de <i>B. cereus</i>	180 aa	41% sur 180 aa	65% sur 180 aa	NP_832333.1
intégrase/recombinase du bactériophage LambdaSa2 de <i>St. agalactiae</i>	183 aa	42% sur 183 aa	61% sur 183 aa	NP_688849.1
intégrase/recombinase phagique putative de <i>St. pyogenes</i> appartenant à la famille XerC/XerD	191 aa	40% sur 190 aa	57% sur 190 aa	BAC64243.1
intégrase/recombinase de <i>Clostridium tetani</i>	202 aa	39% sur 202 aa	59% sur 202 aa	NP_783821.1
intégrase/recombinase de <i>Clostridium acetobutylicum</i> appartenant à la famille XerC/XerD	186 aa	36% sur 176 aa	62% sur 176 aa	NP_348222.1

XerC/XerD sont des recombinases à site spécifique appartenant à la famille des intégrases du phage Lambda et qui sont impliquées dans le maintien des réplicons circulaires à l'état monomérique.

sont notables. Elles concernent d'une part, les phénomènes de protection thermique et éthanolique observés pour la souche sauvage, qui sont absents pour le dérivé curé. Il est donc possible que des fonctions plasmidiques aient été induites par ces deux types de stress modéré, favorisant la survie au choc salin prolongé. Ces fonctions ne seraient « recrutées » que tardivement pendant la phase stationnaire (c'est à dire entre 20 et 40 h). Le second élément intéressant est le facteur d'adaptation proche de 4,5 observé après adaptation acide, et ceci uniquement chez le dérivé curé. Cette tolérance au sel inductible par l'acidité n'est donc plus visualisable lorsque *P. pentosaceus* abrite des plasmides.

En conclusion, la bactérie *P. pentosaceus* montre une très grande tolérance au stress salin intense à long terme. Sa survie est en effet peu affectée après 20 et 40 h d'incubation en MRS 4M NaCl. Les fonctions d'origine chromosomique impliquées dans cette survie étaient probablement déjà exprimées dans les cellules lors de leur introduction dans le MRS salé (cellules en phase exponentielle cultivées en MRS). Cette tolérance au sel ne peut être que faiblement améliorée par une pré-adaptation thermique ou éthanolique, recrutant des fonctions plasmidiques. Une tolérance supérieure peut également être obtenue avec une pré-adaptation acide, mais uniquement si les plasmides sont absents.

Ces résultats seront complétés par l'étude de l'impact des adaptations sur la survie après des chocs plus létaux (acide, éthanolique et thermique).

#### IV) SEQUENCAGES PARTIELS DES PLASMIDES NATIFS DE *P. PENTOSACEUS* ATCC33316

Les données obtenues lors des études physiologiques suggèrent certains niveaux d'interaction des fonctions plasmidiques avec la réponse au stress chez *P. pentosaceus* ATCC33316. Nous avons donc initié le séquençage des plasmides pAB10 et pAB37, au niveau des deux fragments *PstI* clonés.

##### A) Initiation du séquençage du plasmide pAB10

Un premier cadre ouvert de lecture a été localisé au niveau du site *PstI* (Figure<sub>(III)</sub> 31). L'analyse par le programme BLAST de la séquence protéique déduite de 197 aa montre qu'elle est homologue à différentes intégrases/recombinases, dont certaines sont impliquées dans la résolution de conglomerats plasmidiques (Tableau<sub>(III)</sub> IX).

##### B) Initiation du séquençage du plasmide pAB37

Une homologie de 89 % a été observée entre l'extrémité de 240 nt du fragment *PstI* de

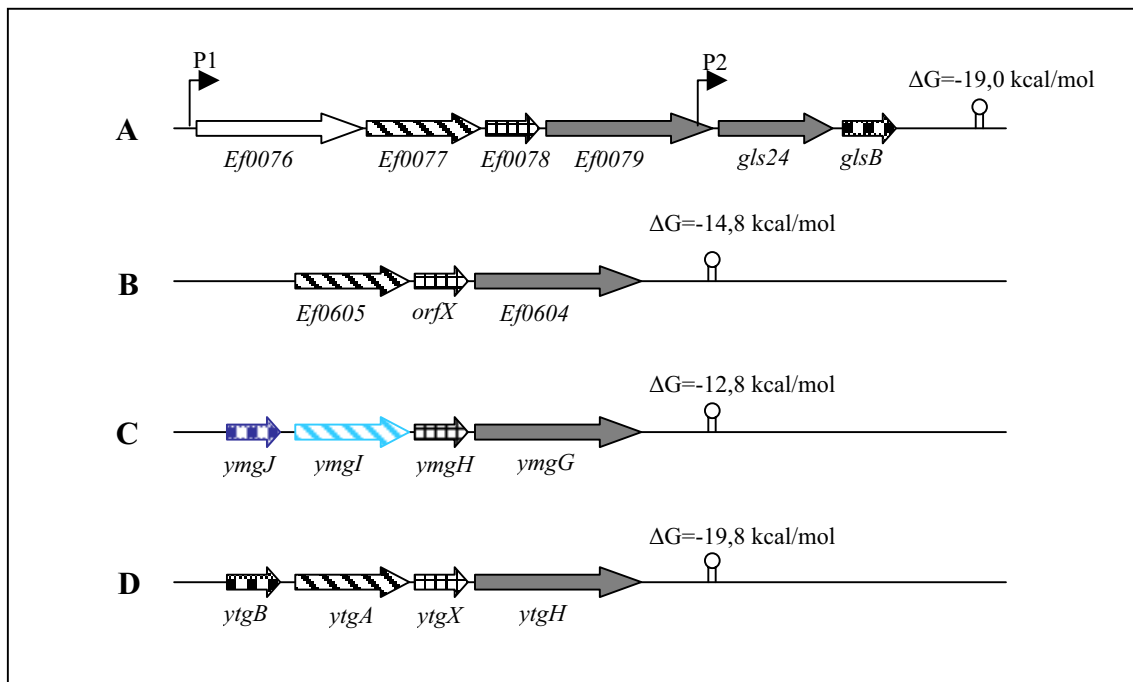
```

ctatTTTTTggctagtaagatggccgctcgctTTTaaatttcgTTTTcttctcCAAAAatagcgagacgAAAAactaattgcttgac
CcaaagagcaatagaatctTTTTgaaggccCAAAatcctctgccaatgatttaagttaacgtccttcttggtgaagttaaccagtga
AtctTTTaaatcttTgtgaataacgaattgacataAAAAactcctatactttcatttcacggactgaacAAAAatagtccattTTTT
tagtataagagcattAAAAacttgAAAatcctgtatttagAAAatggggattatttggaccttaatagtcggtgcaataattgga
M G I I W T L I V G A I I G
gcagtagccggagcgcttactagtcgaggtgctgctatgggttgattagcaatatacttgctggattaattggctcatggttaggc
A V A G A L T S R G A A M G W I S N I L A G L I G S W L G
gaaagtttgtaggtaactgggggcctagtccttgctggcatggcattagtgcttctgcataggagcagttattctagtaattatt
E S L L G N W G P S L A G M A L V P S V I G A V I L V I I
gttcttgatcacaactcgaatcaaacatTgaataaaagggggaattttgatcatagcagaagAAAataattaagtaaaaaagcaa
V S W I T T R I K H *
aataaaaaagatgatcctaaatcctaataagataaaagAAAatTTTTgatcataatgatcagcc
M I L N L M I K K I F L I I M I S

```

**Figure(III) 32 : séquence partielle de l'insert de pAB37 (fragment *PstI/PstI* de 7 kb) comportant une région homologue à d'autres plasmides de *Pédiocoques* (en vert) et un cadre ouvert de lecture codant une protéine de 82 aa homologue à YmgJ de *Lc. lactis* (en bleu) et un cadre de lecture putatif codant les premiers acides aminés d'une protéine homologue à YmgI de *Lc. lactis* (en bleu clair).**

Le codon stop est inscrit en rose. La séquence en acide aminé déduite est inscrite sous la séquence nucléotidique en code à une lettre. La terminaison de cette protéine est matérialisée par un astérisque.



**Figure(III) 33 : organisation des opérons codant les protéines de stress de la famille Glis24 (d'après Giard *et al.*, 2002).**

(A) et (B) : *Ent. faecalis*

(C) et (D) : *Lc. lactis*

Les trois groupes d'homologie protéique différents sont représentés par des flèches de différents motifs.

Groupe 1 : *Ef0077* ; *Ef0605* ; *ymgI* ; *ytgA*. Groupe 2 : *Ef0604* ; *gls24* ; *ymgG* ; *ytgH*. Groupe 3 : *glsB*, *ymgJ* ; *ytgB*.

P1 et P2 représentent les promoteurs inducibles respectivement par des stress environnementaux,

(CdCl<sub>2</sub> et sels biliaires) et par la carence en glucose.

7 kb et une séquence présente sur les plasmides pSMB74 et pSRQ11 de *P. acidilactici* H et *P. acidilactici* PAC1.0, impliqués respectivement dans la production des pédiocines Ach et PA-1. Cette séquence est suivie d'un premier cadre de lecture codant une protéine putative de 82 aa, homologue à YmgJ de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403 (92% homologie, 63% identité) (Figure<sub>(III)</sub> 31). *ymgJ* est le dernier gène de l'opéron *ymg* (*ymgG-ymgH-ymgI-ymgJ*), qui est situé dans un transposon conjugatif de 70 kb (Tn 5306) et dont l'origine est atypique des Lactocoques (Kelly *et al.*, 2000). L'analyse de la séquence de pAB37 montre que l'ORF *ymgJ*-like est suivie d'une seconde ORF, codant pour une protéine dont la séquence partielle actuellement disponible pourrait correspondre à *ymgI* (Figure<sub>(III)</sub> 32).

Parmi les gènes qui composent l'opéron *ymg* de *Lc. lactis* ssp. *lactis* IL1403, *ytgG* présente de fortes homologies avec *gls24* d'*Ent. faecalis* JH2-2. *Gls24* est considérée comme une protéine générale de stress (Giard *et al.*, 2000 et 2002). Un mutant *gls24* montre une réduction sévère de ses capacités de croissance en présence d'un stress biliaire, et une diminution du nombre de coques composant les chaînettes caractéristiques des Entérocoques (Giard *et al.*, 2000). D'autre part, au moins neuf protéines sont présentes en plus forte quantité chez ce même mutant, suggérant un phénomène de répression *via* *Gls24* (Giard *et al.*, 2000). Ce rôle régulateur interviendrait dans le métabolisme du pyruvate (Giard *et al.*, 2000 et 2002).

La famille des protéines *Gls24* a été récemment élargie (Figure<sub>(III)</sub> 33). En effet, l'orthologue *ytgH* contenu dans l'opéron *ytg* (*ytgB-ytgA-ytgX-ytgH*) a été identifié chez *Lc. lactis*. L'analyse du génome d'*Ent. faecalis* V583 a également permis de découvrir le paralogue *Ef0604* présent dans l'opéron *Ef0605-orfX-Ef0604* (absent chez la souche utilisée par Giard et collaborateurs). Cet opéron est situé dans un îlot de pathogénicité (Shankar *et al.*, 2002).

Dans la famille des protéines de type *Gls24*, seules *Gls24* d'*Ent. faecalis* et *YtgG* de *Lc. lactis* sont présentées comme ayant un rôle dans la tolérance au stress (Giard *et al.*, 2002). Chez *Lc. lactis* ssp. *lactis* IL1403, *ytgH* voit sa transcription augmentée en présence d'un choc thermique, salin, ou éthanolique (Giard *et al.*, 2002). Ce n'est pas le cas pour *ymgG*, qui est transcrit uniquement en absence de stress. Les travaux de Giard *et al.* (2002) restent préliminaires puisque la transcription de *ymgG* a été uniquement étudiée dans quelques situations de contraintes, ces dernières étant de type choc. Un rôle dans l'acclimatation ne peut donc être exclu.

## V) CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'examen du rôle éventuel des plasmides pAB10 et/ou pAB37 dans la tolérance au stress de *P. pentosaceus* ATCC33316 a nécessité le clonage des plasmides, leur cartographie, ainsi que



l'obtention d'un dérivé curé. Les souches sauvage et curée ont montré des comportements différents suivant la nature, l'intensité et la durée du stress appliqué.

Ainsi, la présence des plasmides pAB10 et pAB37 diminue les capacités de survie de *P. pentosaceus* vis-à-vis des chocs acide, éthanologique et thermique intenses. Les activités cellulaires propres aux plasmides (maintien et de réplication des plasmides et/ou d'expression des fonctions plasmidiques) pourraient, dans ce cas de figure, sensibiliser la bactérie au stress en (i) puisant dans les réserves énergétiques cellulaires diminuant par là même le niveau d'énergie disponible pour répondre aux choc acide, éthanologique et thermique, (ii) en détournant certaines protéines de leur rôle dans la réponse aux chocs acide, éthanologique et thermique pour les faire participer aux processus de maintien/réplication des plasmides.

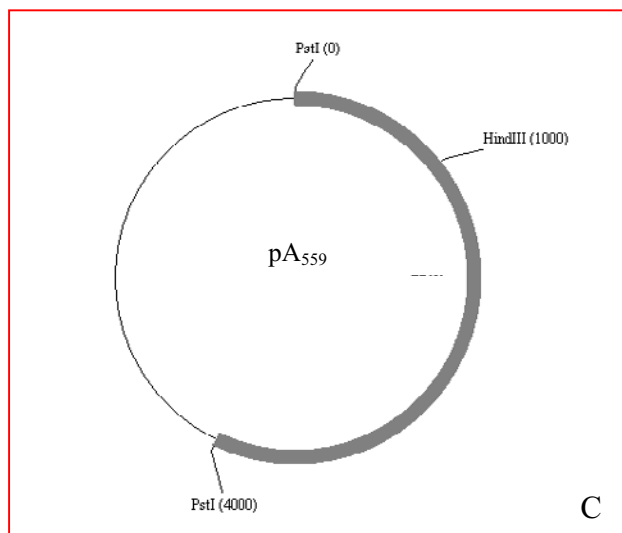
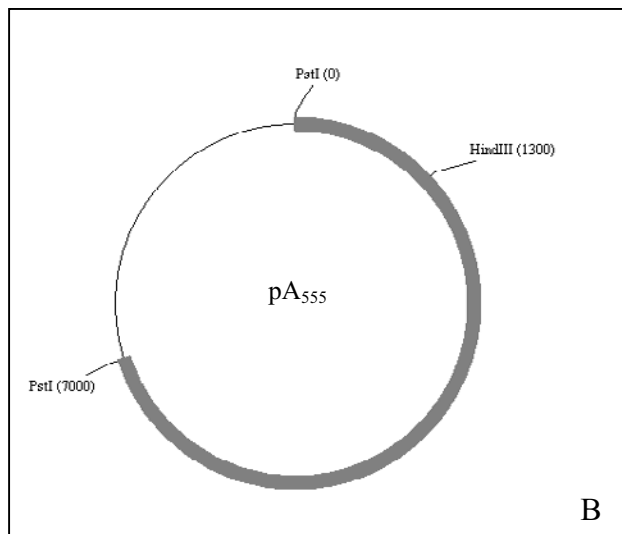
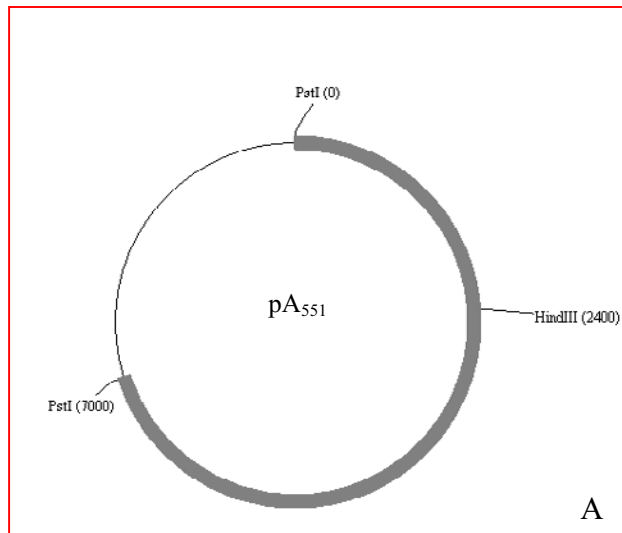
Aucune différence significative de réponse au choc osmotique n'a été observée entre les souches sauvage et curée dans le cadre de ces travaux. Ce résultat peut être lié à sa faible létalité (différente de celles des chocs acide, éthanologique et éthanologique testés).

Il est possible que la stratégie d'application des chocs brutaux et létaux ne permette pas de démontrer la présence de protéines de stress d'origine plasmidique si l'expression de ces dernières est inductible par des stress modérés. Dans ce cas de figure, il faudrait que les chocs soient précédés d'une période d'induction pour que l'existence de gènes de stress sur pAB10 et/ou pAB37 puisse être mise en évidence. Ce travail devra être mené au laboratoire.

Un rôle protecteur des plasmides a été mis en évidence dans le phénomène d'acclimatation de la bactérie au stress osmotique, éthanologique et thermique. Ceci se traduit par une croissance plus importante de la souche sauvage en conditions sub-optimales de stress.

Suite à ces observations, la détermination de la séquence nucléotidique des plasmides a été initiée. Les premiers résultats suggèrent la présence sur pAB37 d'un opéron de type *ymg* identifié précédemment chez *Lc. lactis*, dont le dernier gène code la protéine YmgG, membre de la famille Gls24, protéine générale de stress chez *Ent. faecalis*. La séquence de l'extrémité du fragment *Pst*I de 7 kb issu de pAB37 révèle en effet la présence d'un gène dont le produit est homologue à YmgJ, et d'une partie d'une seconde ORF (extrémité 5') dont le produit partiel pourrait correspondre à YmgI.

Si la totalité de l'opéron *ymg* est bien présente sur pAB37 alors l'extrémité 3' de *ymgI* ainsi que les gènes *ymgH* et *ymgG* devraient être localisés sur un fragment *Pst*I contigu à celui de 7kb partiellement séquencé. Les expériences d'hybridation ADN-ADN réalisées avec la « petite sonde pA<sub>570</sub> » (portant les gènes *ymgJ* et *ymgI* partiel), ayant permis de localiser un site *Hind*III en amont



**Figure<sub>(III)</sub> 34: carte de restriction des inserts *PstI* des plasmides pA<sub>551</sub> (A), pA<sub>555</sub> (B) et pA<sub>559</sub> (C) à *HindIII*.**  
 Les deux constructions encadrées de rouges présentent un intérêt pour la poursuite du séquençage de l'opéron *gls24*-like.



de la région de l'opéron *ymg*-like déjà connu, nous ont guidé pour sélectionner deux vecteurs recombinants dans la banque plasmidique réalisée à *Pst*I. Il s'agit de pA<sub>551</sub> et pA<sub>559</sub> (Figure<sub>(III)</sub> 34). Les inserts *Pst*I portés par ces clones contiennent un site *Hind*III interne dont le positionnement est conforme avec les résultats d'hybridation obtenus sur la figure<sub>(III)</sub> 20. Il conviendra par la suite d'examiner l'expression de l'opéron putatif de type *gls24* chez *P. pentosaceus* ATCC33316 en situation de stress (et notamment en acclimatation).



# DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES



## DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail se proposait de caractériser la tolérance aux contraintes technologiques de deux bactéries lactiques peu étudiées dans ce contexte de recherches, *P. pentosaceus* et *T. halophila*. L'utilisation de *T. halophila* reste confinée à des produits alimentaires de type asiatique (sauce soja). L'utilisation de l'espèce *P. pentosaceus* en tant que levain est plus répandue. D'autre part, cette bactérie est capable de s'adapter à des niches différentes (*P. pentosaceus* est un contaminant des alcools, tandis que différents travaux soulignent l'émergence de la bactérie comme pathogène opportuniste en milieu hospitalier).

Les enjeux des travaux étaient de définir les niveaux de tolérance à différentes contraintes technologiques et de comprendre les mécanismes de réponse développés chez ces deux genres bactériens. Ces connaissances sont essentielles dans l'optique de favoriser la prolifération et/ou la survie de ces bactéries utilisées en tant que levains dans des matrices hostiles ; ou au contraire de contrôler la multiplication de ces micro-organismes, lorsqu'ils sont présents en tant que flores d'altération.

Dans un contexte alimentaire, *T. halophila* et *P. pentosaceus* sont utilisées dans des matrices dont les concentrations en sel sont relativement élevées. Aussi, la première partie du travail a concerné l'impact d'une contrainte osmotique et la caractérisation de la réponse bactérienne *via* l'accumulation d'osmoprotectants chez *P. pentosaceus* et *T. halophila*. Les deux bactéries étudiées sont capables de se développer en présence de fortes concentrations en sel. En milieu riche, les valeurs de CMI en NaCl de *P. pentosaceus* et *T. halophila* sont respectivement de 1,5 M et 3 M (et sont supérieures à celle observée chez *Lc. lactis*, CMI 0,3-0,6). Ce niveau de tolérance au sel est assuré en partie par une accumulation de solutés compatibles à partir du milieu. La glycine bêtaïne (GB) est le soluté compatible préférentiel chez les deux espèces. La gamme de molécules accumulées par *P. pentosaceus* se révèle toutefois plus modeste que celle de *T. halophila*. Des différences sont également retrouvées en matière d'équipement en transporteurs de GB. La bactérie halophile *T. halophila* dispose d'une perméase spécifique de la GB, d'un système ABC de type OpuA, et nous avons suggéré l'existence d'un troisième système majeur (de type ABC). L'activité globale de transport de GB n'étant pas, ou peu régulée, par l'osmolarité, *T. halophila* baserait ses capacités d'adaptation sur l'existence de trois systèmes, dont l'activité de base ainsi que les spectres diffèrent. Chez *P. pentosaceus*, la GB serait accumulée par un système unique, co-transportant la carnitine, la choline et la proline. Ces données sont confirmées par l'absence de gènes de type *butA* et



*opuA* dans le génome de cette bactérie. Les données du programme de séquençage du génome de *P. pentosaceus* permettent de proposer que le système impliqué soit de type ABC-OpuC. Les différences observées entre *P. pentosaceus* et *T. halophila* en matière de spectres d'osmoprotectants employés et de transporteurs de GB nous ont conduit à étendre notre analyse à d'autres bactéries lactiques dont l'environnement présente des différences en matière de variations de la pression osmotique et/ou des apports qualitatifs en solutés compatibles (*Lc. lactis*, *C. piscicola*, *Leu. mesenteroides* et *O. oeni*). L'élargissement de l'étude suggère une répartition des six espèces en quatre groupes, suivant la présence de systèmes putatifs de transport de GB de types ButA et/ou OpuA et/ou OpuC. La fonctionnalité de ces transporteurs reste à présent à définir (activité, spectre, régulation). La poursuite de ces travaux nécessitera également d'aborder le rôle éventuel d'autres systèmes (ne transportant pas la GB) afin d'avoir une compréhension globale de l'osmorégulation chez les bactéries lactiques. Leur rôle avait déjà été soulevé chez *Lc. lactis* où il semble peu probable que seule l'activité de BusA (transporteur unique de GB) restaure la pression de turgescence en situation de contrainte hyper-osmotique. L'étude en particulier de systèmes de transport de choline, et de carnitine est à mener. Enfin, il sera intéressant d'étudier la hiérarchisation de l'utilisation des solutés lorsque plusieurs types de molécules sont présents dans le milieu.

La deuxième partie du travail s'est inscrite dans un contexte technologique d'amélioration de la croissance ou de la survie de *P. pentosaceus* à différentes contraintes technologiques (thermique, éthanologique, acide, saline). Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact de chocs sur la survie et l'activité métabolique des cellules. Les conditions d'adaptation permettant de protéger les cellules de *P. pentosaceus* vis-à-vis d'un choc létal ont ensuite été recherchées. Des conditions de stress sub-létaux ont souvent été utilisées pour développer le phénomène de protection. Lors de ces travaux nous avons montré que des contraintes faiblement létales pouvaient également donner lieu à des phénomènes de protection, homologue et hétérologue. Il est à noter que dans ces conditions, un stress adaptatif donné n'induit pas forcément une protection homologue plus importante qu'une protection hétérologue. L'existence de protections croisées souligne l'existence d'acteurs communs dans les différentes réponses au stress chez *P. pentosaceus*. Enfin, il a été montré qu'une phase d'adaptation se révèle efficace pour favoriser le démarrage de croissance de la souche en milieu hostile. La pré-accumulation de certaines molécules pendant cette phase d'adaptation a donc un effet bénéfique sur l'acclimatation de *P. pentosaceus* au stress. L'ensemble de nos travaux constitue une base de travail permettant à présent une identification de certains acteurs de la réponse au stress. La séquence complète du génome de *P. pentosaceus* sera un autre élément important dans cette optique. Enfin, l'approche physiologique menée dans le cadre de la thèse devra être suivie à l'avenir d'une approche protéomique.





Les résultats acquis dans cette partie du travail soulignent l'hétérogénéité des niveaux intrinsèques de tolérance au stress chez les bactéries lactiques selon le genre, l'espèce ou la souche considérée. Parmi les souches de *P. pentosaceus* étudiées dans ce travail, la souche ATCC33316 contient deux plasmides natifs, pAB10 et pAB37. L'étude du rôle éventuel de ces plasmides dans la capacité de réponse de *P. pentosaceus* ATCC33316 fait l'objet du dernier chapitre. Un dérivé curé a été obtenu, permettant une comparaison des réponses entre les dérivés sauvage et curé. En situation de choc léthal (mortalité  $\leq 2 \log_{10}$  pour la souche sauvage), l'absence de plasmides serait un avantage pour les cellules. Pour des chocs plus intenses, aucune différence n'est plus observée. Il est possible que le maintien des plasmides réduise le niveau énergétique des cellules, et réduise ainsi le potentiel de survie vis-à-vis d'un choc léthal intense (mortalité  $\leq 2 \log_{10}$  pour la souche sauvage). En situation de contrainte sub-optimale, un phénomène inverse est observé. Ainsi la croissance de la bactérie est favorisée lorsque les plasmides pAB10 et pAB37 sont présents chez *P. pentosaceus*. La détermination de la séquence des plasmides pAB10 et pAB37 permettra l'identification des fonctions plasmidiques impliquées dans ces phénomènes. La caractérisation partielle des deux plasmides réalisée lors de nos travaux (clonages, hybridations, cartes de restriction) a permis d'initier le séquençage de chaque plasmide. Les premiers résultats suggèrent des événements de transfert horizontal (présence d'une ORF codant une intégrase/recombinase et d'une séquence nucléotidique homologue à celles de plasmides de *P. acidilactici*). Enfin, la présence d'un opéron susceptible de coder une protéine de la famille des protéines générales de stress Gls24 pourrait expliquer la croissance plus importante du dérivé sauvage en conditions sub-optimales de stress.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



## A

- Abe, K., F. Ohnishi, K. Yagi, T. Nakajima, T. Higuchi, M. Sano, M. Machida, R. I. Sarker, and P. C. Maloney. 2002. Plasmid-encoded asp operon confers a proton motive metabolic cycle catalyzed by an aspartate-alanine exchange reaction. *J Bacteriol.* **184**(11):2906-13.
- Abee, T., and J. A. Wouters. 1999. Microbial stress response in minimal processing. *Int J Food Microbiol.* **50**(1-2):65-91.
- Adams, M. R. 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *J Biotechnol.* **68**(2-3):171-8.
- Alakomi, H. L., E. Skytta, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm, K. Latva-Kala, and I. M. Helander. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol.* **66**(5):2001-5.
- Allison, G. E., and T. R. Klaenhammer. 1996. Functional analysis of the gene encoding immunity to lactacin F, lafI, and its use as a *Lactobacillus*-specific, food-grade genetic marker. *Appl Environ Microbiol.* **62**(12):4450-60.
- Alpert, C. A., A. M. Crutz-Le Coq, C. Malleret, and M. Zagorec. 2003. Characterization of a theta-type plasmid from *Lactobacillus sakei*: a potential basis for low-copy-number vectors in lactobacilli. *Appl Environ Microbiol.* **69**(9):5574-84.
- Amezaga, M. R., I. Davidson, D. McLaggan, A. Verheul, T. Abee, and I. R. Booth. 1995. The role of peptide metabolism in the growth of *Listeria monocytogenes* ATCC 23074 at high osmolarity. *Microbiology.* **141**(Pt 1):41-9.
- Anba, J., E. Bidnenko, A. Hillier, D. Ehrlich, and M. C. Chopin. 1995. Characterization of the lactococcal abiD1 gene coding for phage abortive infection. *J Bacteriol.* **177**(13):3818-23.
- Anderson, W. A., N. D. Hedges, M. V. Jones, and M. B. Cole. 1991. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* studied by differential scanning calorimetry. *J Gen Microbiol.* **137**(Pt 6):1419-24.
- Andresen, P. A., I. Kaasen, O. B. Styrvold, G. Boulnois, and A. R. Strom. 1988. Molecular cloning, physical mapping and expression of the bet genes governing the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol.* **134**(Pt 6):1737-46.
- Angelidis, A. S., and G. M. Smith. 2003. Three transporters mediate uptake of glycine betaine and carnitine by *Listeria monocytogenes* in response to hyperosmotic stress. *Appl Environ Microbiol.* **69**(2):1013-22.
- Angelidis, A. S., L. T. Smith, L. M. Hoffman, and G. M. Smith. 2002. Identification of opuC as a chill-activated and osmotically activated carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* **68**(6):2644-50.
- Ankri, S., I. Serebrijski, O. Reyes, and G. Leblon. 1996. Mutations in the *Corynebacterium glutamicum* proline biosynthetic pathway: a natural bypass of the proA step. *J Bacteriol.* **178**(15):4412-9.
- Annous, B. A., L. A. Becker, D. O. Bayles, D. P. Labeda, and B. J. Wilkinson. 1997. Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl Environ Microbiol.* **63**(10):3887-94.
- Annous, B. A., M. F. Kozempel, and M. J. Kurantz. 1999. Changes in membrane fatty acid composition of *Pediococcus* sp. strain NRRL B-2354 in response to growth conditions and its effect on thermal resistance. *Appl Environ Microbiol.* **65**(7):2857-62.
- Arnoldi, M., M. Fritz, E. Bauerlein, M. Radmacher, E. Sackmann, and A. Boulbitch. 2000. Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics.* **62**(1 Pt B):1034-44.
- Asakura, H., S. Makino, T. Takagi, A. Kuri, T. Kurazono, M. Watarai, and T. Shirahata. 2002. Passage in mice causes a change in the ability of *Salmonella enterica* serovar *Oranienburg* to survive NaCl osmotic stress: resuscitation from the viable but non-culturable state. *FEMS Microbiol Lett.* **212**(1):87-93.
- Auffray, Y., X. Gansel, B. Thammavongs, and P. Boutibonnes. 1992. Heat-shock induced protein synthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr. Microbiol.* **24**:281-284.
- Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria : classification and physiology. *Lactic Acid Bacteria : Microbiology and Functional Aspects* (Salminen S. et von Wright A. (Editeurs), Marcel Dekker.).

## B

- Baccus-Taylor, G., K. A. Glass, J. B. Luchansky, and A. J. Maurer. 1993. Fate of *Listeria monocytogenes* and pediococcal starter cultures during the manufacture of chicken summer sausage. *Poult Sci.* **72**(9):1772-8.
- Back, W., and E. Stackebrandt. 1978. DNS-DNS-homologiestudien innerhalb der Gattung *Pediococcus*. *Arch. Microbiol.* **118**:79-85.
- Bacteriology., B. s. m. o. s. 1996. Sneath P.H.A., Mair, N.S., Sharpe M.E and Holt J.G. (Eds). Williams and Wilkins, Baltimore. 2.
- Bae, J. H., and K. J. Miller. 1992. Identification of two proline transport systems in *Staphylococcus aureus* and their possible roles in osmoregulation. *Appl Environ Microbiol.* **58**(2):471-5.
- Baliarda, A., H. Robert, M. Jebbar, C. Blanco, A. Deschamps and C. Le Marrec. 2003. Potential osmoprotectants for the lactic acid bacteria *Pediococcus pentosaceus* and *Tetragenococcus halophila*. *Int. J. Food Microbiol.* **84**: 3-20
- Baliarda, A., H. Robert, M. Jebbar, C. Blanco, and C. Le Marrec. 2003. Isolation and characterisation of ButA, a secondary glycine betaine transport system operating in *Tetragenococcus halophila*. *Curr. Microbiol.* **47**:347-351
- Barney, M., A. Volgyi, A. Navarro, and D. Ryder. 2001. Riboprinting and 16S rRNA gene sequencing for identification of brewery *Pediococcus* isolates. *Appl Environ Microbiol.* **67**(2):553-60.
- Barros, R. R., M. D. Carvalho, J. M. Peralta, R. R. Facklam, and L. M. Teixeira. 2001. Phenotypic and genotypic characterization of *Pediococcus* strains isolated from human clinical sources. *J Clin Microbiol.* **39**(4):1241-6.
- Barthelmebs, L., B. Lecomte, C. Divies, and J. F. Cavin. 2000. Inducible metabolism of phenolic acids in *Pediococcus pentosaceus* is encoded by an autoregulated operon which involves a new class of negative transcriptional regulator. *J Bacteriol.* **182**(23):6724-31.
- Bayles, D. O., and B. J. Wilkinson. 2000. Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol.* **30**(1):23-7.
- Belitsky, B. R., J. Brill, E. Bremer, and A. L. Sonenshein. 2001. Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **183**(14):4389-92.
- Bénachour, A., S. Flahaut, J. Frère, and G. Novel. 1996. Plasmid tranfert by electroporation and conjugation in *Tetragenococcus* and *Pediococcus* genera and evidence of plasmid-linked metabolic traits. *Curr. Microbiol.* **32**:188-194.



- Bénachour, A., J. Frere, and G. Novel.** 1995. pUCL287 plasmid from *Tetragenococcus halophila* (*Pediococcus halophilus*) ATCC 33315 represents a new theta-type replicon family of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* **128**(2):167-75.
- Beninati, C., M. R. Oggioni, M. Boccanera, M. R. Spinosa, T. Maggi, S. Conti, W. Magliani, F. De Bernardis, G. Teti, A. Cassone, G. Pozzi, and L. Polonelli.** 2000. Therapy of mucosal candidiasis by expression of an anti-idiotypic in human commensal bacteria. *Nat Biotechnol.* **18**(10):1060-4.
- Bernard, T., M. Jebbar, Y. Rassouli, S. Himdi-Kabbab, J. Hamelin, and C. Blanco.** 1993. Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens*. *J. Gen. Microbiol.* **139**:129-136.
- Berrier, C., M. Besnard, B. Ajouz, A. Coulombe, and A. Ghazi.** 1996. Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure. *J Membr Biol.* **151**(2):175-87.
- Berry, E. D., R. W. Hutkins, and R. W. Mandigo.** 1991. The use of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* to control post-processing *Listeria monocytogenes* contamination of Frankfurters. *J. Food Prot.* **54**:681-686.
- Berry, E. D., and P. M. Foegeding.** 1997. Cold temperature adaptation and growth of microorganisms. *J. Food Protect.* **60**:1583-1594.
- Berthier, F., M. Zagorec, M. Champomier-Verges, S. D. Ehrlich, and F. Morel-Devill.** 1996. Efficient transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *Microbiology.* **142**:1273-1279.
- Besnard, V., M. Federighi, and J. M. Cappelier.** 2000. Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol.* **31**(1):77-81.
- Beumer, R. R., M. C. Te Giffel, L. J. Cox, F. M. Rombouts, and T. Abee.** 1994. Effect of exogenous proline, betaine, and carnitine on growth of *Listeria monocytogenes* in a minimal medium. *Appl Environ Microbiol.* **60**(4):1359-63.
- Bhowmik, T., L. Fernandez, and J. L. Steele.** 1993. Gene replacement in *Lactobacillus helveticus*. *J Bacteriol.* **175**(19):6341-4.
- Bianchi, A. A., and F. Baneyx.** 1999. Hyperosmotic shock induces the sigma32 and sigmaE stress regulons of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **34**(5):1029-38.
- Bieber, L.L.** 1988. Carnitine. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:261-283.
- Blackburn, C. W., L. M. Curtis, L. Humpheson, C. Billon, and P. J. McClure.** 1997. Development of thermal inactivation models for *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. *Int J Food Microbiol.* **38**(1):31-44.
- Blom, H., and C. Mortvedt.** 1991. Anti-microbial substances produced by food associated micro-organisms. *Biochem Soc Trans.* **19**(3):694-8.
- Blount, P., and P. C. Moe.** 1999. Bacterial mechanosensitive channels: integrating physiology, structure and function. *Trends Microbiol.* **7**(10):420-4.
- Boch, J., B. Kempf, R. Schmid, and E. Bremer.** 1996. Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the gbsAB genes. *J Bacteriol.* **178**(17):5121-9.
- Boch, J., G. Nau-Wagner, S. Kneip, and E. Bremer.** 1997. Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Arch Microbiol.* **168**(4):282-9.
- Bolotin, A., P. Wincker, S. Mauger, O. Jaillon, K. Malarne, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich, and A. Sorokin.** 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* **11**(5):731-53.
- Bolton, L. F., and J. F. Frank.** 1999. Simple method to observe the adaptive response of *Listeria monocytogenes* in food. *Lett Appl Microbiol.* **29**(5):350-3.
- Booth, I. R.** 2002. Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *Int J Food Microbiol.* **78**(1-2):19-30.
- Boucher, I., E. Emond, M. Parrot, and S. Moineau.** 2001. DNA sequence analysis of three *Lactococcus lactis* plasmids encoding phage resistance mechanisms. *J Dairy Sci.* **84**(7):1610-20.
- Bourgeois, C. M., and J. P. Larpent.** 1996. *Microbiologie Alimentaire*. 5ème édition. Collection Sciences et techniques agroalimentaire.
- Bourot, S., O. Sire, A. Trautwetter, T. Touze, L. F. Wu, C. Blanco, and T. Bernard.** 2000. Glycine betaine-assisted protein folding in a lysA mutant of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **275**(2):1050-6.
- Bouvier, J., P. Bordes, Y. Romeo, A. Fourcans, I. Bouvier, and C. Gutierrez.** 2000. Characterization of OpuA, a glycine-betaine uptake system of *Lactococcus lactis*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **2**(2):199-205.
- Bowmik, T., and E. H. Marth.** 1991. Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening. *J. Dairy Sci.* **73**:859-866.
- Bremer, E., and R. Krämer.** 2000. Coping with osmotic challenges : osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In Storz G., Hengge-Aronis R (eds). *Bacterial Stress Responses*. ASM Press Washington DC:79-97.
- Brown, A. D., and J. R. Simpson.** 1972. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J Gen Microbiol.* **72**(3):589-91.
- Brul, S., and P. Coote.** 1999. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int J Food Microbiol.* **50**(1-2):1-17.
- Bull, H. B., and K. Breese.** 1974. Surface tension of amino acid solutions: a hydrophobicity scale of the amino acid residues. *Arch Biochem Biophys.* **161**(2):665-70.
- Bunthof, C. J., S. van den Braak, P. Breeuwer, F. M. Rombouts, and T. Abee.** 1999. Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* **65**(8):3681-9.
- Buxton, R. S.** 1980. Selection of *Bacillus subtilis* 168 mutants with deletions of the PBSX prophage. *J Gen Virol.* **46**(2):427-37.
- Buyong, N., J. Kok, and J. B. Luchansky.** 1998. Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, To control *Listeria monocytogenes* in cheddar cheese. *Appl Environ Microbiol.* **64**(12):4842-5.

## C

**Cai, Y., S. Kumai, M. Ogawa, Y. Benno, and T. Nakase.** 1999. Characterization and identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. *Appl Environ Microbiol.* **65**(7):2901-6.

**Calamita, G., W. R. Bishai, G. M. Preston, W. B. Guggino, and P. Agre.** 1995. Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **270**(49):29063-6.





- Calamita, G., B. Kempf, M. Bonhivers, W. R. Bishai, E. Bremer, and P. Agre.** 1998. Regulation of the *Escherichia coli* water channel gene *aqpZ*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(7):3627-31.
- Caldas, T., N. Demont-Caulet, A. Ghazi, and G. Richarme.** 1999. Thermoprotection by glycine betaine and choline. *Microbiology.* **145**(Pt 9):2543-8.
- Campo, N., M. J. Dias, M. L. Daveran-Mingot, P. Ritzenthaler, and P. Le Bourgeois.** 2002. Genome plasticity in *Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **82**(1-4):123-32.
- Canovas, D., C. Vargas, M. I. Calderon, A. Ventosa, and J. J. Nieto.** 1998. Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. *Syst Appl Microbiol.* **21**(4):487-97.
- Canovas, D., C. Vargas, L. N. Csonka, A. Ventosa, and J. J. Nieto.** 1996. Osmoprotectants in *Halomonas elongata*: high-affinity betaine transport system and choline-betaine pathway. *J Bacteriol.* **178**(24):7221-6.
- Canovas, D., C. Vargas, S. Kneip, M. J. Moron, A. Ventosa, E. Bremer, and J. J. Nieto.** 2000. Genes for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from choline in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043, USA. *Microbiology.* **146**(Pt 2):455-63.
- Caplice, E., and G. F. Fitzgerald.** 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int J Food Microbiol.* **50**(1-2):131-49.
- Carpita, N. C.** 1985. Tensile strength of cell walls of living cells. *Plant Physiol.* **79**:485-488.
- Carvalho, A. S., J. Silva, P. Ho, P. Teixeira, F. X. Malcata, and P. Gibbs.** 2003. Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *J Appl Microbiol.* **94**(6):947-52.
- Casadaban, M. J.** 1976. Regulation of the regulatory gene for the arabinose pathway, *araC*. *J Mol Biol.* **104**(3):557-66.
- Castro, G. R.** 2000. Properties of soluble alpha-chymotrypsin in neat glycerol and water. *Enzyme Microb Technol.* **27**(1-2):143-150.
- Cavin, J. F., L. Barthelmebs, and C. Divies.** 1997. Molecular characterization of an inducible p-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: gene cloning, transcriptional analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization. *Appl Environ Microbiol.* **63**(5):1939-44.
- Chassy, B. M., and Flickinger.** 1987. Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **44**:172-177.
- Chastanet, A., M. Prudhomme, J. P. Claverys, and T. Msadek.** 2001. Regulation of *Streptococcus pneumoniae* *clp* genes and their role in competence development and stress survival. *J Bacteriol.* **183**(24):7295-307.
- Chopra, I., A. J. O'Neill, and K. Miller.** 2003. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist Updat.* **6**(3):137-45.
- Champomier Verges, M.C., M. Zuniga, F Morel-Deville., Perez-Martinez G., M. Zagorec and Ehrlich S.D.** 1999. Relationships between arginine degradation, pH and survival in *Lactobacillus sakei*. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**(2):297-304
- Christian, J. H. B.** 1955. The influence of nutrition on the water relations of *Salmonella oranienburg* at 30°C. *Austr. J. Biol. Sci.* **8**:490-497.
- Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes, and M. L. Chikindas.** 2001. Bacteriocins : safe, natural antimicrobial for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **71**:1-20.
- Coffey, A., and R. P. Ross.** 2002. Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **82**(1-4):303-21.
- Collins, M. D., A. M. Williams, and S. Wallbanks.** 1990. The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS Microbiol Lett.* **58**(3):255-62.
- Colwell, R. R., and D. J. Grimes.** 2000. Semantics and strategies. In Colwell R.R., Grimes D.J. (Eds). Non culturable microorganisms in the environment. ASM Press, Washington DC(1-6).
- Condon, S.** 1987. Response of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**:269-280.
- Corpet, F.** 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**(22):10881-90.
- Csonka, L. N.** 1981. The role of proline in osmoregulation in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Basic Life Sci.* **18**:533-42.
- Csonka, L. N.** 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev.* **53**(1):121-47.
- Csonka, L. N., and A. D. Hanson.** 1991. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu Rev Microbiol.* **45**:569-606.
- Culham, D. E., C. Dalgado, C. L. Gyles, D. Mamelak, S. MacLellan, and J. M. Wood.** 1998. Osmoregulatory transporter ProP influences colonization of the urinary tract by *Escherichia coli*. *Microbiology.* **144**(Pt 1):91-102.
- Cuozzo, S. A., F. Sesma, J. M. Palacios, A. P. de Ruiz Holgado, and R. R. Raya.** 2000. Identification and nucleotide sequence of genes involved in the synthesis of lactocin 705, a two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL 705. *FEMS Microbiol Lett.* **185**(2):157-61.

## D

- Da Costa, M. S., H. Santos, and E. Galinski.** 1998. An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archea. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **61**:117-153.
- Dacre, J. C.** 1958. A note on the *Pediococci* in New Zealand cheddar cheese. *J. Dairy Res.* **25**:414-417.
- Daeschel, M. A., and T. Klaenhammer.** 1985. Association of a 13,6 megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:1528-1541.
- Dandekar, A. M., and S. L. Uratsu.** 1988. A single base pair change in proline biosynthesis genes causes osmotic stress tolerance. *J Bacteriol.* **170**(12):5943-5.
- Danielsen, M.** 2002. Characterization of the tetracycline resistance plasmid pMD5057 from *Lactobacillus plantarum* 5057 reveals a composite structure. *Plasmid.* **48**(2):98-103.
- Dartois, V., M. Debarbouille, F. Kunst, and G. Rapoport.** 1998. Characterization of a novel member of the DegS-DegU regulon affected by salt stress in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **180**(7):1855-61.
- Davidson, B. E., N. Kordias, M. Dobos, and A. J. Hillier.** 1996. Genomic organization of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **70**(2-4):161-83.



- de Man, J. C., M. Rogosa, and S. M.E.** 1960. A medium for cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* **23**(130-135).
- de Ruyter, P. G., O. P. Kuipers, and W. M. de Vos.** 1996. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol.* **62**(10):3662-7.
- de Vos.** 1999. Safe and sustainable systems for food-grade fermentations by genetically modified lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **9**:3-10.
- De Vuyst, L., and E. J. Vandamme.** 1994. Bacteriocin of lactic acid bacteria. Blackies Academic and Professional London.
- Del Mar Lleo, M., S. Pierobon, M. C. Tafi, C. Signoretto, and P. Canepari.** 2000. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Appl Environ Microbiol.* **66**(10):4564-7.
- Delamarche, C., D. Thomas, J. P. Rolland, A. Froger, J. Gouranton, M. Svelto, P. Agre, and G. Calamita.** 1999. Visualization of AqpZ-mediated water permeability in *Escherichia coli* by cryoelectron microscopy. *J. Bacteriol.* **181**(14):4193-7.
- Delcour, J., T. Ferain, and P. Hols.** 2000. Advances in the genetics of thermophilic lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotechnol.* **11**(5):497-504.
- DeMaio, J., Y. Zhang, C. Ko, and W. R. Bishai.** 1997. *Mycobacterium tuberculosis* sigF is part of a gene cluster with similarities to the *Bacillus subtilis* sigF and sigB operons. *Tuber Lung Dis.* **78**(1):3-12.
- Derre, I., G. Rapoport, and T. Msadek.** 1999. CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls clp and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* **31**(1):117-31.
- Dickely, F., D. Nilsson, E. B. Hansen, and E. Johansen.** 1995. Isolation of *Lactococcus lactis* nonsense suppressors and construction of a food-grade cloning vector. *Mol Microbiol.* **15**(5):839-47.
- Dinnbier, U., E. Limpinsel, R. Schmid, and E. P. Bakker.** 1988. Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch Microbiol.* **150**(4):348-57.
- Dobson, C. M., H. Deneer, S. Lee, S. Hemmingsen, S. Glaze, and B. Ziola.** 2002. Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*, including *Pediococcus clausenii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from beer. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**(Pt 6):2003-10.
- Dougherty, B. A., C. Hill, J. F. Weidman, D. R. Richardson, J. C. Venter, and R. P. Ross.** 1998. Sequence and analysis of the 60 kb conjugative, bacteriocin-producing plasmid pMRC01 from *Lactococcus lactis* DPC3147. *Mol Microbiol.* **29**(4):1029-38.
- Doyle, R. J., and R. E. Marquis.** 1994. Elastic, flexible peptidoglycan and bacterial cell wall properties. *Trends Microbiol.* **2**(2):57-60.
- Drilca.** 1992. Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* **6**:425-433.
- Dupray, E., A. Derrien, and R. Pichon.** 1995. Osmoregulation by trehalose synthesis in *Salmonella manhattan* after exposure to waste waters. *Lett Appl Microbiol.* **20**(3):148-51.
- Duthoit, F., J. J. Godon, and M. C. Montel.** 2003. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Appl Environ Microbiol.* **69**(7):3840-8.
- Duwat, P., S. D. Ehrlich, and A. Gruss.** 1995. The recA gene of *Lactococcus lactis*: characterization and involvement in oxidative and thermal stress. *Mol Microbiol.* **17**(6):1121-31.
- Duwat, P., S. Sourice, B. Cesselin, G. Lamberet, K. Vido, P. Gaudy, Y. Le Loir, F. Violet, P. Loubiere, and A. Gruss.** 2001. Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J. Bacteriol.* **183**(15):4509-16.
- ## E
- Eaton, T. J., C. A. Shearman, and M. J. Gasson.** 1993. The use of bacterial luciferase genes as reporter genes in *Lactococcus*: regulation of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* lactose genes. *J. Gen. Microbiol.* **139**(Pt 7):1495-501.
- El Demerdash, H. A., K. J. Heller, and A. Geis.** 2003. Application of the shsp gene, encoding a small heat shock protein, as a food-grade selection marker for lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **69**(8):4408-12.
- Engel, A., Y. Fujiyoshi, and P. Agre.** 2000. The importance of aquaporin water channel protein structures. *Embo J.* **19**(5):800-6.
- Engesser, D. M., and W. P. Hammes.** 1994. Non-heme catalase activity of lactic acid bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**:11-19.
- Ennahar, S., O. Assobhel, and C. Hasselmann.** 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. *J. Food Prot.* **61**(2):186-91.
- Ercolini, D., G. Moschetti, G. Blaiotta, and S. Coppola.** 2001. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Curr Microbiol.* **42**(3):199-202.
- Eshoo, M. W.** 1988. lac fusion analysis of the bet genes of *Escherichia coli*: regulation by osmolarity, temperature, oxygen, choline, and glycine betaine. *J. Bacteriol.* **170**(11):5208-15.
- ## F
- Farwick, M., R. M. Siewe, and R. Kramer.** 1995. Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **177**(16):4690-5.
- Fischer-Le Saux, M., D. Hervio-Heath, S. Loaec, R. R. Colwell, and M. Pommepuy.** 2002. Detection of cytotoxin-hemolysin mRNA in nonculturable populations of environmental and clinical *Vibrio vulnificus* strains in artificial seawater. *Appl Environ Microbiol.* **68**(11):5641-6.
- Flahaut<sup>a</sup>, S., A. Benachour, J. C. Giard, P. Boutibonnes, and Y. Auffray.** 1996. Defense against lethal treatments and de novo protein synthesis induced by NaCl in *Enterococcus faecalis* ATCC 19433. *Arch Microbiol.* **165**(5):317-24.
- Flahaut<sup>b</sup>, S., A. Hartke, J. C. Giard, A. Benachour, P. Boutibonnes, and Y. Auffray.** 1996. Relationship between stress response toward bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol Lett.* **138**(1):49-54.
- Foegeding, P. M., A. B. Thomas, D. H. Pilkington, and T. R. Klaenhammer.** 1992. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. *Appl Environ Microbiol.* **58**(3):884-90.
- Fons, M., B. Cami, J. C. Patte, and M. Chippaux.** 1987. Cloning in *Escherichia coli* of genes involved in the synthesis of proline and leucine in *Desulfovibrio desulfuricans* Norway. *Mol Gen. Genet.* **206**(1):141-3.
- Fons, M., T. Hege, M. Ladire, P. Raibaud, R. Ducluzeau, and E. Maguin.** 1997. Isolation and characterization of a plasmid from



- Lactobacillus fermentum* conferring erythromycin resistance. Plasmid. **37**(3):199-203.
- Fraser, K. R., D. Harvie, P. J. Coote, and C. P. O'Byrne.** 2000. Identification and characterization of an ATP binding cassette L-carnitine transporter in *Listeria monocytogenes* [In Process Citation]. Appl Environ Microbiol. **66**(11):4696-704.
- Fraser, K. R., D. Sue, M. Wiedmann, K. Boor, and C. P. O'Byrne.** 2003. Role of sigmaB in regulating the compatible solute uptake systems of *Listeria monocytogenes*: osmotic induction of opuC is sigmaB dependent. Appl Environ Microbiol. **69**(4):2015-22.
- Froger, A., J. P. Rolland, P. Bron, V. Lagree, F. Le Caherec, S. Deschamps, J. F. Hubert, I. Pellerin, D. Thomas, and C. Delamarche.** 2001. Functional characterization of a microbial aquaglyceroporin. Microbiology. **147**(Pt 5):1129-35.
- Froseth, B. R., R. E. Herman, and L. L. McKay.** 1988. Cloning of nisin resistance determinant and replication origin on 7.6-kilobase EcoRI fragment of pNP40 from *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* DRC3. Appl Environ Microbiol. **54**(8):2136-9.
- Froseth, B. R., and L. L. McKay.** 1991. Molecular characterization of the nisin resistance region of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* DRC3. Appl Environ Microbiol. **57**(3):804-11.
- Fujimoto, S., H. Hashimoto, and Y. Ike.** 1991. Low cost device for electrotransformation and its application to the highly efficient transformation of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*. Plasmid. **26**(2):131-5.
- Fukuda, D., M. Watanabe, Y. Aso, K. Sonomoto, and A. Ishizaki.** 2002. The groESL operon of the halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophila*. Biosci Biotechnol Biochem. **66**(5):1176-80.
- Fuller, R.** 1989. Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol. **66**(5):365-78.
- ## G
- Gaillot O., S. Bregenholt, F. Jaubert, J.P. Di Santo and P. Breche.** 2001. Stress-induced ClpP serine protease of *Listeria monocytogenes* is essential for induction of lysteriolysine O-dependent protective immunity. Infect. Immun. **69**(8) : 4938-43.
- Galinski, E. A., and H. G. Truper.** 1982. Betaine, a compatible solutes in extremely halophilic photobacterium *Ectothiorhodospira halochloris*. FEMS Microbiol. Lett. **13**:357-360.
- Galinski, E. A., H. P. Pfeiffer, and H. G. Truper.** 1985. 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. Eur J Biochem. **149**(1):135-9.
- Galinski, E. A.** 1993. Compatible solutes of halophilic eubacteria : molecular principles, water-solute interaction, stress protection. Experientia. **49**:487-496.
- Galinski, E. A., and H. G. Truper.** 1994. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. FEMS Microbiol. Rev. **15**:95-108.
- Galinski, E. A.** 1995. Osmoadaptation in bacteria. Adv Microb Physiol. **37**:272-328.
- Garbay, S., and Lonvaud-Funel. A.** 1996. Response of *Leuconostoc oenos* to environmental changes. J. Appl. Bacteriol. **81**:619-625.
- Gardan, R., O. Duche, S. Leroy-Setrin, and J. Labadie.** 2003. Role of ctc from *Listeria monocytogenes* in osmotolerance. Appl Environ Microbiol. **69**(1):154-61.
- Garvie, E. I.** 1986. Genus *Pediococcus*. In Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds). Bergey's manual of systematic bacteriology. 9th edition. Williams and Wilkins, Baltimore. **2**:1075-1079.
- Gassem, M. A.** 1999. Study of the micro-organisms associated with the fermented bread (khamir) produced from sorghum in Gizan region, Saudi Arabia. J Appl Microbiol. **86**(2):221-5.
- Geis, A., H. A. El Demerdash, and K. J. Heller.** 2003. Sequence analysis and characterization of plasmids from *Streptococcus thermophilus*. Plasmid. **50**(1):53-69.
- Giacomini, A., A. Squartini, and M. P. Nuti.** 2000. Nucleotide sequence and analysis of plasmid pMD136 from *Pediococcus pentosaceus* FBB61 (ATCC43200) involved in pediocin A production. Plasmid. **43**(2):111-22.
- Giard, J. C., A. Hartke, S. Flahaut, A. Benachour, P. Boutibonnes, and Y. Auffray.** 1996. Starvation-induced multiresistance in *Enterococcus faecalis* JH2-2. Curr Microbiol. **32**(5):264-71.
- Giard, J. C., A. Rince, H. Capioux, Y. Auffray, and A. Hartke.** 2000. Inactivation of the stress- and starvation-inducible gls24 operon has a pleiotrophic effect on cell morphology, stress sensitivity, and gene expression in *Enterococcus faecalis*. J Bacteriol. **182**(16):4512-20.
- Giraffa, G., E. Neviani, and G. T. Tarelli.** 1993. Antilisterial activity by enterococci in a model predicting the temperature evolution of Taleggio, an Italian soft cheese. J. Dairy Sci. **77**:1176-1182.
- Glaasker<sup>a</sup>, E., W. N. Konings, and B. Poolman.** 1996. Glycine betaine fluxes in *Lactobacillus plantarum* during osmolarity and hyper- and hypo-osmotic shock. J Biol Chem. **271**(17):10060-5.
- Glaasker<sup>b</sup>, E., W. N. Konings, and B. Poolman.** 1996. Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. J Bacteriol. **178**(3):575-82.
- Glaasker<sup>a</sup>, E., F. S. Tjan, P. F. Ter Steeg, W. N. Konings, and B. Poolman.** 1998. Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress. J Bacteriol. **180**(17):4718-23.
- Glaasker<sup>b</sup>, E., E. H. Heuberger, W. N. Konings, and B. Poolman.** 1998. Mechanism of osmotic activation of the quaternary ammonium compound transporter (QacT) of *Lactobacillus plantarum*. J Bacteriol. **180**(21):5540-6.
- Goller, K., A. Ofer, and E. A. Galinski.** 1998. Construction and characterization of an NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis. FEMS Microbiol Lett. **161**(2):293-300.
- Gonzalez, C. F., and B. S. Kunka.** 1983. Plasmid transfer in *Pediococcus* spp.: intergeneric and intragenic transfer of pIP501. Appl Environ Microbiol. **46**(1):81-9.
- Gonzalez, C. F., and B. S. Kunka.** 1986. Evidence of plasmid linkage of raffinose utilisation and associated alpha-galactosidase and sucrose hydrolase activity in *Pediococcus pentosaceus*. Appl. Environ. Microbiol. **51**:105-109.
- Gouesbet, G., G. Jan, and P. Boyaval.** 2002. Two-dimensional electrophoresis study of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thermotolerance. Appl Environ Microbiol. **68**(3):1055-63.
- Gouffi, K., and C. Blanco.** 2000. Is the accumulation of osmoprotectant the unique mechanism involved in bacterial osmoprotection? Int J Food Microbiol. **55**(1-3):171-4.
- Gournier-Château, N., J. M. Larpent, M. I. Castellanos and J.L. Larpent.** 1994. Les probiotiques en alimentation animale et humain. Technique et documentation.



- Graham, D. C., and L. L. McKay.** 1985. Plasmid DNA in strains of *Pediococcus cerevisiae* and *Pediococcus pentosaceus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:532-534.
- Graham, J. E., and B. J. Wilkinson.** 1992. *Staphylococcus aureus* osmoregulation: roles for choline, glycine betaine, proline, and taurine. *J Bacteriol.* **174**(8):2711-6.
- Gram, L., and H. H. Huss.** 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int J Food Microbiol.* **33**(1):121-37.
- Graumann, P., T. M. Wendrich, M. H. Weber, K. Schroder, and M. A. Marahiel.** 1997. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Mol Microbiol.* **25**(4):741-56.
- Gravesen, A., P. Warthoe, S. Knochel, and K. Thirstrup.** 2000. Restriction fragment differential display of pediocin-resistant *Listeria monocytogenes* 412 mutants shows consistent overexpression of a putative beta-glucoside-specific PTS system. *Microbiology.* **146**(Pt 6):1381-9.
- Gruber, T. M., and D. A. Bryant.** 1997. Molecular systematic studies of eubacteria, using sigma70-type sigma factors of group 1 and group 2. *J Bacteriol.* **179**(5):1734-47.
- Guarner, F., and G. J. Schaafsma.** 1998. Probiotics. *Int J Food Microbiol.* **39**(3):237-8.
- Guédon, G., F. Bourgoïn, V. Burrus, A. Pluvinet, and B. Decaris.** 2000. Implication of horizontal transfers in genetic polymorphism of lactic acid bacteria. *Sciences des Aliments.* **20**:85-95.
- Guédon, E., E. Jamet, and P. Renault.** 2002. Gene regulation in *Lactococcus lactis*: the gap between predicted and characterized regulators. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **82**(1-4):93-112.
- Guertzoni, M. E., R. Lanciotti, and P. S. Cocconcelli.** 2001. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology.* **147**(Pt 8):2255-64.
- Guillot, A., D. Obis, and M. Y. Mistou.** 2000. Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress. *Int J Food Microbiol.* **55**(1-3):47-51.
- Guillouet, S., and J. M. Engasser.** 1995. Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as a response to an osmotic saline upshock. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**:315-320.
- Gutierrez, C., M. Ardourel, E. Bremer, A. Middendorf, W. Boos, and U. Ehmann.** 1989. Analysis and DNA sequence of the osmoregulated *treA* gene encoding the periplasmic trehalase of *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet.* **217**(2-3):347-54.
- Guzzo, J., F. Delmas, F. Pierre, M. P. Jobin, B. Samyn, J. Van Beeumen, J. F. Cavin, and C. Divies.** 1997. A small heat shock protein from *Leuconostoc oenos* induced by multiple stresses and during stationary growth phase. *Lett Appl Microbiol.* **24**(5):393-6.
- H**
- Haardt, M., B. Kempf, E. Faatz, and E. Bremer.** 1995. The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-dependent transport system ProU of *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet.* **246**(6):783-6.
- Haldenwang, W. G.** 1995. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev.* **59**(1):1-30.
- Hall, M. N., and T. J. Silhavy.** 1981. Genetic analysis of the major outer membrane proteins of *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet.* **15**:91-142.
- Hanagata, H., O. Shida, and H. Takagi.** 2003. Taxonomic homogeneity of a salt-tolerant lactic acid bacteria isolated from shoyu mash. *J Gen Appl Microbiol.* **49**(2):95-100.
- Hansen, M. C., A. K. Nielsen, S. Molin, K. Hammer, and M. Kilstrup.** 2001. Changes in rRNA levels during stress invalidates results from mRNA blotting: fluorescence in situ rRNA hybridization permits renormalization for estimation of cellular mRNA levels. *J Bacteriol.* **183**(16):4747-51.
- Hansen, E. B.** 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int J Food Microbiol.* **78**(1-2):119-31.
- Hartke, A., S. Bouche, X. Gansel, P. Boutibonnes, and Y. Auffray.** 1994. Starvation-induced stress resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3474-3478.
- Hartke, A., S. Boucher, X. Gansel, P. Boutibonnes, and Y. Auffray.** 1995. UV-inducible proteins and UV-induced cross-protection against acid, ethanol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or heat treatments in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3474-3478.
- Hartke, A., J. C. Giard, J. M. Laplace, and Y. Auffray.** 1998. Survival of *Enterococcus faecalis* in an oligotrophic microcosm: changes in morphology, development of general stress resistance, and analysis of protein synthesis. *Appl Environ Microbiol.* **64**(11):4238-45.
- Hashiba, H., R. Takiguchi, K. Jyoho, and K. Aoyama.** 1992. Establishment of a host-vector system in *Lactobacillus helveticus* with beta-galactosidase activity as a selection marker. *Biosci Biotechnol Biochem.* **56**(2):190-4.
- Hayzer, D. J., and T. Leisinger.** 1980. The gene-enzyme relationships of proline biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol.* **118**(2):287-93.
- Hayzer, D. J., and T. Leisinger.** 1982. Proline biosynthesis in *Escherichia coli*. Purification and characterisation of glutamate-semialdehyde dehydrogenase. *Eur J Biochem.* **121**(3):561-5.
- Heinz, M., F. von Wintzingerode, A. Moter, E. Halle, H. Lohbrunner, U. Kaisers, and P. Neuhaus.** 2000. A case of septicemia with *Pediococcus acidilactici* after long-term antibiotic treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **19**(12):946-8.
- Hengge-Aronis, R.** 2002. Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **4**(3):341-6.
- Higgins, C. F.** 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol.* **8**:67-113.
- Holo, H., and I. F. Nes.** 1989. High-frequency transformation by electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine betaine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:3119-3123.
- Hols, P., T. Ferain, D. Garmyn, N. Bernard, and J. Delcour.** 1994. Use of homologous expression-secretion signals and vector-free stable chromosomal integration in engineering of *Lactobacillus plantarum* for alpha-amylase and levanase expression. *Appl Environ Microbiol.* **60**(5):1401-13.
- Horlacher, R., and W. Boos.** 1997. Characterization of TreR, the major regulator of the *Escherichia coli* trehalose system. *J Biol Chem.* **272**(20):13026-32.
- Huang, J., C. Lacroix, H. Daba, and R. E. Simard.** 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* in milk and its control by pediocin 5 produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. *Int. Dairy J.* **4**:429-443.
- Hughenoltz, J., W. Sybesma, M. N. Groot, W. Wisselink, V. Ladero, K. Burgess, D. van Sinderen, J. C. Piard, G. Eggink, E. J. Smid, G. Savoy, F. Sesma, T. Jansen, P. Hols, and M.**





**Kleerebezem.** 2002. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **82**(1-4):217-35.

## /

**Ikuta, S., K. Matura, S. Imamura, H. Misaki, and Y. Horiuti.** 1977. Oxidative pathway of choline to betaine in the soluble fraction prepared from *Arthrobacter globidiformis*. *J. Biochem.* **82**:157-163.

**Imhoff, J. F.** 1986. Survival strategies of microorganisms in extreme saline environments. *Adv Space Res.* **6**(12):299-306.

**Irvine, A. S., and J. R. Guest.** 1993. *Lactobacillus casei* contains a member of the CRP-FNR family. *Nucleic Acids Res.* **21**(3):753.

**Isom, L. L., Z. S. Khambatta, J. L. Moluf, D. F. Akers, and S. E. Martin.** 1995. Filament formation in *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* **9**:1031-1033.

**Iuchi, S., and E. C. Lin.** 1993. Adaptation of *Escherichia coli* to redox environments by gene expression. *Mol Microbiol.* **9**(1):9-15.

## J

**Jack, R. W., J. R. Tagg, and B. Ray.** 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev.* **59**(2):171-200.

**Jaenicke, R.** 1991. Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur J Biochem.* **202**(3):715-28.

**Jager, K., and S. Harlander.** 1992. Characterization of bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PC and comparison of bacteriocin-producing strains using molecular typing procedures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**:631-637.

**Jay.** 1992. Intrinsic and extrinsic parameters of food that affect microbial growth. *In Modern Food Microbiology.* Avi Book, NY.:38-62.

**Jebbar, M., C. Champion, C. Blanco, and S. Bonnassie.** 1998. Carnitine acts as a compatible solute in *Brevibacterium linens*. *Res Microbiol.* **149**(3):211-9.

**Jenkins, D. E., J. E. Schultz, and A. Matin.** 1988. Starvation-induced cross protection against heat or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **170**(9):3910-4.

**Jenkins, D. E., S. A. Chaisson, and A. Matin.** 1990. Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **172**(5):2779-81.

**Jiang, W., Y. Hou, and M. Inouye.** 1997. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J Biol Chem.* **272**(1):196-202.

**Johansen, E.** 1999. Genetic engineering. Modification of bacteria. *In* Robinson R., Batt C. and Patel P. (Eds). *Encyclopedia of Food Microbiology.* Academic Press, London:917-921.

**Jones, P. M., and A. M. George.** 1999. Subunit interactions in ABC transporters: towards a functional architecture. *FEMS Microbiol Lett.* **179**(2):187-202.

**Jouper-Jaan, A., A. E. Goodman, and S. Kjelleberg.** 1992. Bacteria starved for prolonged periods develop increased protection against lethal temperature. *FEMS Microbiol. Ecol.* **101**:229-236.

**Joutsjoki, V., S. Luoma, M. Tamminen, M. Kilpi, E. Johansen, and A. Palva.** 2002. Recombinant *Lactococcus* starters as a potential source of additional peptidolytic activity in cheese ripening. *J Appl Microbiol.* **92**(6):1159-66.

**Juneja, V. K., and B. S. Eblen.** 1999. Predictive thermal inactivation model for *Listeria monocytogenes* with temperature,

pH, NaCl, and sodium pyrophosphate as controlling factors. *J Food Prot.* **62**(9):986-93.

## K

**Kaenjak, A., J. E. Graham, and B. J. Wilkinson.** 1993. Choline transport activity in *Staphylococcus aureus* induced by osmotic stress and low phosphate concentrations. *J Bacteriol.* **175**(8):2400-6.

**Kanatani, K., T. Tahara, M. Oshimura, K. Sano, and C. Umezawa.** 1995. Identification of the replication region of *Lactobacillus acidophilus* plasmid pLA103. *FEMS Microbiol Lett.* **133**(1-2):127-30.

**Kaneko, T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirose, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, M. Yamada, M. Yasuda, and S. Tabata.** 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**(3):109-36.

**Kantor, A., T. J. Montville, A. Mett, and R. Shapira.** 1997. Molecular characterization of the replicon of the *Pediococcus pentosaceus* 43200 pediocin A plasmid pMD136. *FEMS Microbiol Lett.* **151**(2):237-44.

**Kappes, R. M., B. Kempf, S. Kneip, J. Boch, J. Gade, J. Meier-Wagner, and E. Bremer.** 1999. Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* **32**(1):203-16.

**Kawahara<sup>a</sup>, Y., T. Ohsumi, Y. Yoshihara, and S. Ikeda.** 1989. Proline in the osmoregulation of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem.* **53**:2475-2479.

**Kawahara<sup>b</sup>, K., T. Hamaoka, S. Suzuki, M. Nakamura, S. Y. Murayama, T. Arai, N. Terakado, and H. Danbara.** 1989. Lipopolysaccharide alteration mediated by the virulence plasmid of *Salmonella*. *Microb Pathog.* **7**(3):195-202.

**Kawano, M., R. Abuki, K. Igarashi, and Y. Kakinuma.** 2000. Evidence for Na<sup>+</sup> influx via the NtpJ protein of the KtrII K(+) uptake system in *Enterococcus hirae*. *J Bacteriol.* **182**(9):2507-12.

**Kazmierczak, M.J., S.C. Mithoe, K.J. Boor and M. Wiedmann.** 2003. *Listeria monocytogenes* sigma B regulates stress response and virulence functions. *J. Bacteriol.* **185**(19) : 5722-34.

**Kelly, W. J., G. P. Davey, and L. J. Ward.** 2000. Novel sucrose transposons from plant strains of *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett.* **190**(2):237-40.

**Kempf, B., and E. Bremer.** 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol.* **170**(5):319-30.

**Kennedy, E. P.** 1987. Metabolism and function of membrane lipids. *Klin Wochenschr.* **65**(5):205-12.

**Kets, E. P. W., and J. A. M. de Bont.** 1994. Protective effect of betaine on survival of *Lactobacillus plantarum* subjected to drying. *FEMS Microbiol. Lett.* **116**:251-256.

**Killham, K., and M. K. Firestone.** 1984. Proline transport increases growth efficiency in salt-stressed *Streptomyces griseus*. *Appl Environ Microbiol.* **48**(1):239-41.

**Kilstrup, M., S. Jacobsen, K. Hammer, and F. K. Vogensen.** 1997. Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* **63**(5):1826-37.



- Kim, W. J., B. Ray, and M. C. Johnson.** 1992. Plasmid transfers by conjugation and electroporation in *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* **72**:201-207.
- Kim, W. S., and N. W. Dunn.** 1997. Identification of a cold shock gene in lactic acid bacteria and the effect of cold shock on cryotolerance. *Curr Microbiol.* **35**(1):59-63.
- Kim, W. S., J. Ren, and N. W. Dunn.** 1999. Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiol Lett.* **171**(1):57-65.
- Kim, W. S., J. H. Park, J. Ren, P. Su, and N. W. Dunn.** 2001. Survival response and rearrangement of plasmid DNA of *Lactococcus lactis* during long-term starvation. *Appl Environ Microbiol.* **67**(10):4594-602.
- Kim, W. S., J. H. Park, J. E. Tandianus, J. Ren, P. Su, and N. W. Dunn.** 2002. A distinct physiological state of *Lactococcus lactis* cells that confers survival against a direct and prolonged exposure to severe stresses. *FEMS Microbiol Lett.* **212**(2):203-8.
- Klaenhammer, T., E. Altermann, F. Arigoni, A. Bolotin, F. Breidt, J. Broadbent, R. Cano, S. Chaillou, J. Deutscher, M. Gasson, M. van de Guchte, J. Guzzo, A. Hartke, T. Hawkins, P. Hols, R. Hutkins, M. Kleerebezem, J. Kok, O. Kuipers, M. Lubbers, E. Maguin, L. McKay, D. Mills, A. Nauta, R. Overbeek, H. Pel, D. Pridmore, M. Saier, D. van Sinderen, A. Sorokin, J. Steele, D. O'Sullivan, W. de Vos, B. Weimer, M. Zagorec, and R. Siezen.** 2002. Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **82**(1-4):29-58.
- Kleerebezem, M., M. M. Beerthuyzen, E. E. Vaughan, W. M. de Vos, and O. P. Kuipers.** 1997. Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol.* **63**(11):4581-4.
- Klein, W., U. Ehmann, and W. Boos.** 1991. The repression of trehalose transport and metabolism in *Escherichia coli* by high osmolarity is mediated by trehalose-6-phosphate phosphatase. *Res Microbiol.* **142**(4):359-71.
- Knauf, H. J., R. F. Vogel, and W. P. Hammes.** 1992. Cloning, sequence, and phenotypic expression of *katA*, which encodes the catalase of *Lactobacillus sake* LTH677. *Appl Environ Microbiol.* **58**(3):832-9.
- Knight, K. P., F. M. Bartlett, R. C. McKellar, and L. J. Harris.** 1999. Nisin reduces the thermal resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A in liquid whole egg. *J Food Prot.* **62**(9):999-1003.
- Knubovets, T., J. J. Osterhout, P. J. Connolly, and A. M. Klibanov.** 1999. Structure, thermostability, and conformational flexibility of hen egg-white lysozyme dissolved in glycerol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(4):1262-7.
- Ko, R., L. T. Smith, and G. M. Smith.** 1994. Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol.* **176**(2):426-31.
- Ko, R., and L. T. Smith.** 1999. Identification of an ATP-driven, osmoregulated glycine betaine transport system in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* **65**(9):4040-8.
- Kobayashi, T., B. Kimura, and T. Fujii.** 2000. Differentiation of *Tetragenococcus* populations occurring in products and manufacturing processes of puffer fish ovaries fermented with rice-bran. *Int J Food Microbiol.* **56**(2-3):211-8.
- Koch, A. L.** 1982. On the growth and form of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol.* **128**(Pt 11):2527-39.
- Koch, A. L.** 1984. Shrinkage of growing *Escherichia coli* cells by osmotic challenge. *J Bacteriol.* **159**(3):919-24.
- Koch, A. L., and M. F. Pinette.** 1987. Nephelometric determination of turgor pressure in growing gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* **169**(8):3654-63.
- Kogure, K., U. Simidu, and N. Taga.** 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can J Microbiol.* **25**(3):415-20.
- Kojic, M., M. Vujcic, A. Banina, P. Cocconcelli, J. Cerning, and L. Topisirovic.** 1992. Analysis of exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11, isolated from cheese. *Appl Environ Microbiol.* **58**(12):4086-8.
- Kondo, J. K., and L. L. McKay.** 1982. Transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts by plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**:1213-1215.
- Kondo, J. K., and E. Johansen.** 2002. Product development strategies for foods in the era of molecular biotechnology. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **82**(1-4):291-302.
- Konings, W. N.** 2002. The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **82**(1-4):3-27.
- Kono, Y., and I. Fridovich.** 1983. Functional significance of manganese catalase in *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol.* **155**(2):742-6.
- Kortstee, G. J.** 1970. The aerobic decomposition of choline by microorganisms. I. The ability of aerobic organisms, particularly coryneform bacteria, to utilize choline as the sole carbon and nitrogen source. *Arch Mikrobiol.* **71**(3):235-44.
- Kuhlmann, A. U., and E. Bremer.** 2002. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol.* **68**(2):772-83.
- Kuipers, O. P., G. Buist, and J. Kok.** 2000. Current strategies for improving food bacteria. *Res Microbiol.* **151**(10):815-22.
- Kunin, C. M., and J. Rudy.** 1991. Effect of NaCl-induced osmotic stress on intracellular concentrations of glycine betaine and potassium in *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and staphylococci. *J Lab Clin Med.* **118**(3):217-24.
- Kunst, F., and G. Rapoport.** 1995. Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **177**(9):2403-7.
- Kunte, H. J., R. A. Crane, D. E. Culham, D. Richmond, and J. M. Wood.** 1999. Protein ProQ influences osmotic activation of compatible solute transporter ProP in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* **181**(5):1537-43.
- Kushner, D. J.** 1978. Life in high salt and solute concentrations : halophilic bacteria. In "Microbial life in extreme environments". Academic Press, New York, N.Y.:317-368.

## L

- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
- Laimins, L. A., D. B. Rhoads, and W. Epstein.** 1981. Osmotic control of *kdp* operon expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **78**(1):464-8.
- Lamark, T., I. Kaasen, M. W. Eshoo, P. Falkenberg, J. McDougall, and A. R. Strom.** 1991. DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **5**(5):1049-64.
- Lanyi, J. K.** 1974. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev.* **38**(3):272-90.
- Larsen, P. I., L. K. Sydnes, B. Landfald, and A. R. Strom.** 1987. Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of



- organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. *Arch Microbiol.* **147**(1):1-7.
- Lavermicocca, P., F. Valerio, A. Evidente, S. Lazzaroni, A. Corsetti, and M. Gobbetti.** 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl Environ Microbiol.* **66**(9):4084-90.
- Law, B. A., M. Castanon, and M. E. Sharpe.** 1976. The effect of non starter bacteria on the chemical composition and flavour of cheddar cheese. *J. Dairy Res.* **43**:117-125.
- Le Breton, Y., V. Pichereau, S. Flahaut, Y. Auffray, and A. Rincé.** 2002. Identification of new genes related to osmotic adaptation in *Enterococcus faecalis*. *Sciences des Aliments.* **22**:97-96.
- Le Rudulier, D.** 1993. L'osmorégulation chez les bactéries : aspects physiologiques et génétiques. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **8**(3):167-169.
- Lee, Y. K., K. Nomoto, S. Salminen, and S. L. Gorbach.** 1999. Handbook of probiotics. John Wiley and sons. Inc. NY.
- Lee, K., and S. H. Moon.** 2003. Growth kinetics of *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis* harboring different plasmid content. *Curr Microbiol.* **47**(1):17-21.
- Leenhouts, K., A. Bolhuis, G. Venema, and J. Kok.** 1998. Construction of a food-grade multiple-copy integration system for *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **49**(4):417-23.
- LeFrancois, J., A. M. Gasc, and M. Sicard.** 1997. Electrotransformation of *Streptococcus pneumoniae*: evidence for restriction of the DNA on entry. *Microb Drug Resist.* **3**(1):101-4.
- Leistner, J.J., G.G. Greer, and M.E. Styles** 1996. Control of beef spoilage by a sulfide-producing *Lactobacillus sake* strain with bacteriocinogenic *Leuconostoc gelidum* UAL187 during anaerobic storage at 2°C. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2610-2614.
- Leistner, L.** 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int J Food Microbiol.* **55**(1-3):181-6.
- Leloup, L.** 2003. Contraintes technologiques chez les bactéries lactiques *Pediococcus pentosaceus* et *Tetragenococcus halophila*. Suivi de l'expression de gènes codant des protéines de stress. DEA Sciences des Aliments et Nutrition, Université Bordeaux 1.
- Lemay, M. J., N. Rodrigue, C. Gariépy, and L. Saucier.** 2000. Adaptation of *Lactobacillus alimentarius* to environmental stresses. *Int J Food Microbiol.* **55**(1-3):249-53.
- Lemos, J. A., Y. Y. Chen, and R. A. Burne.** 2001. Genetic and physiologic analysis of the *groE* operon and role of the *HrcA* repressor in stress gene regulation and acid tolerance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* **183**(20):6074-84.
- Leriche, V., and B. Carpentier.** 2000. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *J Appl Microbiol.* **88**(4):594-605.
- Levina, N., S. Totemeyer, N. R. Stokes, P. Louis, M. A. Jones, and I. R. Booth.** 1999. Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of *MscS* and *MscL* mechanosensitive channels: identification of genes required for *MscS* activity. *Embo J.* **18**(7):1730-7.
- Leyral, G., and E. Vierling.** 1997. Microbiologie et toxicologie des aliments. Collection Biosciences et Techniques. Doin.
- Limauro, D., A. Falcioro, A. L. Basso, G. Forlani, and M. De Felice.** 1996. Proline biosynthesis in *Streptococcus thermophilus*: characterization of the *proBA* operon and its products. *Microbiology.* **142**(Pt 11):3275-82.
- Lin, M. Y., D. Savaiano, and S. Harlander.** 1991. Influence of nonfermented dairy products containing bacterial starter cultures on lactose maldigestion in humans. *J Dairy Sci.* **74**(1):87-95.
- Lindgren, S. E., and W. J. Dobrogosz.** 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol Rev.* **7**(1-2):149-63.
- Lindgren, S. W., I. Stojilkovic, and F. Heffron.** 1996. Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**(9):4197-201.
- Lipper, K., and E. A. Galinski.** 1992. Enzyme stabilisation by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. .
- Liu, C. Q., V. Leelawatcharamas, M. L. Harvey, and N. W. Dunn.** 1996. Cloning vectors for lactococci based on a plasmid encoding resistance to cadmium. *Curr Microbiol.* **33**(1):35-9.
- Liu, C. Q., P. Charoedchai, N. Khunajakr, Y. M. Deng, Widodo, and N. W. Dunn.** 2002. Genetic and transcriptional analysis of a novel plasmid-encoded copper resistance operon from *Lactococcus lactis*. *Gene.* **297**(1-2):241-7.
- Lokman, B. C., R. J. Leer, R. van Sorge, and P. H. Pouwels.** 1994. Promoter analysis and transcriptional regulation of *Lactobacillus pentosus* genes involved in xylose catabolism. *Mol Gen Genet.* **245**(1):117-25.
- Lokman, B. C., M. Heerikhuisen, R. J. Leer, A. van den Broek, Y. Borsboom, S. Chaillou, P. W. Postma, and P. H. Pouwels.** 1997. Regulation of expression of the *Lactobacillus pentosus* *xylAB* operon. *J Bacteriol.* **179**(17):5391-7.
- Lonvaud-Funel, A., Y. Guilloux, and A. Joyeux.** 1993. Isolation of a DNA probe for identification of glucan-producing *Pediococcus damnosus* in wines. *J. Appl. Bacteriol.* **74**:41-47.
- Lorca, G. L., and G. F. de Valdez.** 1999. The effect of suboptimal growth temperature and growth phase on resistance of *Lactobacillus acidophilus* to environmental stress. *Cryobiology.* **39**(2):144-9.
- Lorca, G. L., and G. F. Valdez.** 2001. A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus* CRL 639. *Curr Microbiol.* **42**(1):21-5.
- Lou, Y., and A. E. Yousef.** 1997. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl Environ Microbiol.* **63**(4):1252-5.
- Louis, P., and E. A. Galinski.** 1997. Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. *Microbiology.* **143**(Pt 4):1141-9.
- Lucas, J. J., S. W. Burchiel, and I. H. Segel.** 1972. Choline sulfatase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Biochem Biophys.* **153**(2):664-72.
- Lucchesi, G. I., T. A. Lisa, C. H. Casale, and C. E. Domenech.** 1995. Carnitine resembles choline in the induction of cholinesterase, acid phosphatase, and phospholipase C and in its action as an osmoprotectant in *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Microbiol.* **30**(1):55-60.
- Luchansky, J. B., P. M. Muriana, and T. R. Klaenhammer.** 1988. Application of electroporation for transfer of plasmid DNA to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Propionibacterium*. *Mol Microbiol.* **2**(5):637-46.
- Luchansky, J. B., M. C. Tennant, and T. R. Klaenhammer.** 1991. Molecular cloning and deoxyribonucleic acid polymorphisms in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus gasseri*. *J Dairy Sci.* **74**(10):3293-302.
- Luchansky, J. B., K. A. Glass, K. D. Harsono, A. J. Degnan, N. G. Faith, B. Cauvin, G. Baccus-Taylor, K. Arihara, B. Bater, A. J. Maurer, and et al.** 1992. Genomic analysis of *Pediococcus*



starter cultures used to control *Listeria monocytogenes* in turkey summer sausage. *Appl Environ Microbiol.* **58**(9):3053-9.

**Lugtenberg, B., R. Peters, H. Bernheimer, and W. Berendsen.** 1976. Influence of cultural conditions and mutations on the composition of the outer membrane proteins of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* **147**(3):251-62.

**Lundrigan, M. D., and C. F. Earhart.** 1984. Gene *envY* of *Escherichia coli* K-12 affects thermoregulation of major porin expression. *J Bacteriol.* **157**(1):262-8.

## M

**MacCormick, C. A., H. G. Griffin, and M. J. Gasson.** 1995. Construction of a food-grade host/vector system for *Lactococcus lactis* based on the lactose operon. *FEMS Microbiol Lett.* **127**(1-2):105-9.

**Madsen, A., C. Westphal, and J. Josephsen.** 2000. Characterization of a novel plasmid-encoded HsdS subunit, S.LlaW12I, from *Lactococcus lactis* W12. *Plasmid.* **44**(2):196-200.

**Magnusson, J., K. Strom, S. Roos, J. Sjogren, and J. Schnurer.** 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* **219**(1):129-35.

**Maguin, E., H. Prevost, S. D. Ehrlich, and A. Gruss.** 1996. Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *J Bacteriol.* **178**(3):931-5.

**Manca de Nadra, M. C., and A. M. Strasser de Saad.** 1987. Evolution of lactic acid bacteria during the different stage of vinification of Cayate (Argentina) wine. *Microbiol. Alim. Nut.* **5**:235-240.

**Manca de Nadra, M. C., and A. M. Strasser de Saad.** 1995. Polysaccharide production by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *Int J Food Microbiol.* **27**(2-3):101-6.

**Marceau, A., M. Zagorec, and M. C. Champomier-Verges.** 2002. Analysis of *Lactobacillus sakei* adaptation to its environment by a proteomic approach. *Sciences des Aliments.* **22**:97-105.

**Marceau, A., M. Zagorec, and M. C. Champomier-Verges.** 2003. Positive effects of growth at suboptimal temperature and high salt concentration on long-term survival of *Lactobacillus sakei*. *Res Microbiol.* **154**(1):37-42.

**Martirani, L., R. Raniello, G. Naclerio, E. Ricca, and M. De Felice.** 2001. Identification of the DNA-binding protein, HrcA, of *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol Lett.* **198**(2):177-82.

**McAuliffe, O., C. Hill, and R. P. Ross.** 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lactacin 3147-producing starter culture. *J Appl Microbiol.* **86**(2):251-6.

**McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston, and R. K. Wilson.** 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature.* **413**(6858):852-6.

**McIntyre, D. A., and S. K. Harlander.** 1993. Construction of first-generation lactococcal integrative cloning vectors. *Appl Microbiol Biotechnol.* **40**(2-3):348-55.

**McLaggan, D., and W. Epstein.** 1991. *Escherichia coli* accumulates the eukaryotic osmolyte taurine at high osmolarity. *FEMS Microbiol Lett.* **65**(2):209-13.

**McLaggan, D., J. Naprstek, E. T. Buurman, and W. Epstein.** 1994. Interdependence of K<sup>+</sup> and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **269**(3):1911-7.

**Mead, D. A., E. S. Skorupa, and B. Kemper.** 1985. Single stranded DNA SP6 promoter plasmids for engineering mutant RNAs and proteins: synthesis of a 'stretched' preproparathyroid hormone. *Nucleic Acids Res.* **13**(4):1103-18.

**Mecas, J., P. E. Rouviere, J. W. Erickson, T. J. Donohue, and C. A. Gross.** 1993. The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev.* **7**(12B):2618-28.

**Mellefont, L. A., T. A. McMeekin, and T. Ross.** 2003. The effect of abrupt osmotic shifts on the lag phase duration of foodborne bacteria. *Int J Food Microbiol.* **83**(3):281-93.

**Mendum, M. L., and L. T. Smith.** 2002. Gbu glycine betaine porter and carnitine uptake in osmotically stressed *Listeria monocytogenes* cells. *Appl Environ Microbiol.* **68**(11):5647-55.

**Mercenier, A., H. Muller-Alouf, and C. Grangette.** 2000. Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr Issues Mol Biol.* **2**(1):17-25.

**Mergeay, M., S. Monchy, T. Vallaes, V. Auquier, A. Benotmane, P. Bertin, S. Taghavi, J. Dunn, D. van der Lelie, and R. Wattiez.** 2003. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol Rev.* **27**(2-3):385-410.

**Mevarech, M., H. Eisenberg, and E. Neumann.** 1977. Malate dehydrogenase isolated from extremely halophilic bacteria of the Dead Sea. I. Purification and molecular characterization. *Biochemistry.* **16**(17):3781-5.

**Miambi, E., J. P. Guyot, and F. Ampe.** 2003. Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. *Int J Food Microbiol.* **82**(2):111-20.

**Midelet, G., and B. Carpentier.** 2002. Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. *Appl Environ Microbiol.* **68**(8):4015-24.

**Miller, J. H.** 1972. A short course in bacterial genetic. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor NY.

**Miller, K. J., E. P. Kennedy, and V. N. Reinhold.** 1986. Osmotic adaptation by Gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science.* **231**:48-51.

**Mitchell, P., and J. Moyle.** 1956. Osmotic structure and function in bacteria. *In Bacteria Anatomy 6th Symposium of the Society of General Microbiology.* **134**:3049-3060.

**Mogk, A., A. Volker, S. Engelmann, M. Hecker, W. Schumann, and U. Volker.** 1998. Nonnative proteins induce expression of the *Bacillus subtilis* CIRCE regulon. *J Bacteriol.* **180**(11):2895-900.

**Mohammed, S. I., L. R. Steenson, and A. W. Kirleis.** 1991. Isolation and characterization of microorganisms associated with the traditional sorghum fermentation for production of Sudanese kisra. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2529-2533.

**Molenaar, D., A. Hagting, H. Alkema, A. J. Driessen, and W. N. Konings.** 1993. Characteristics and osmoregulatory roles of uptake systems for proline and glycine betaine in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol.* **175**(17):5438-44.

**Mollet, B., J. Knol, B. Poolman, O. Marciset, and M. Delley.** 1993. Directed genomic integration, gene replacement, and integrative gene expression in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol.* **175**(14):4315-24.

**Mora, D., M. G. Fortina, C. Parini, and P. L. Manachini.** 1997. Identification of *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus*





*pentosaceus* based on 16S rRNA and *ldhD* gene-targeted multiplex PCR analysis. *FEMS Microbiol Lett.* **151**(2):231-6.

**Mora, D., M. G. Fortina, C. Parini, D. Daffonchio, and P. L. Manachini.** 2000. Genomic subpopulations within the species *Pediococcus acidilactici* detected by multilocus typing analysis: relationships between pediocin AcH/PA-1 producing and non-producing strains. *Microbiology.* **146**(Pt 8):2027-38.

**Mora, D., C. Parini, M. G. Fortina, and P. L. Manachini.** 2002. Multilocus hybridization typing in *Pediococcus acidilactici* strains. *Curr Microbiol.* **44**(2):77-80.

**Morbach, S., and R. Kramer.** 2002. Body shaping under water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria. *Chembiochem.* **3**(5):384-97.

**Motlagh, A. M., M. C. Johnson, and B. Ray.** 1991. Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites. *J. Food Protect.*:873-878.

**Mugula, J. K., S. A. Nnko, J. A. Naryhus, and T. Sorhaug.** 2003. Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. *Int J Food Microbiol.* **80**(3):187-99.

**Myers, E. R., A. W. Dallmier, and S. E. Martin.** 1993. Sodium chloride, potassium chloride, and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* **59**(7):2082-6.

## N

**Nakamura, T., R. Yuda, T. Unemoto, and E. P. Bakker.** 1998. KtrAB, a new type of bacterial K(+) uptake system from *Vibrio alginolyticus*. *J Bacteriol.* **180**(13):3491-4.

**Nauta, A., D. van Sinderen, H. Karsens, E. Smit, G. Venema, and J. Kok.** 1996. Inducible gene expression mediated by a repressor-operator system isolated from *Lactococcus lactis* bacteriophage r1t. *Mol Microbiol.* **19**(6):1331-41.

**Nauta, A., B. van den Burg, H. Karsens, G. Venema, and J. Kok.** 1997. Design of thermolabile bacteriophage repressor mutants by comparative molecular modeling. *Nat Biotechnol.* **15**(10):980-3.

**Ng, W. L., K. M. Kazmierczak, G. T. Robertson, R. Gilmour, and M. E. Winkler.** 2003. Transcriptional regulation and signature patterns revealed by microarray analyses of *Streptococcus pneumoniae* R6 challenged with sublethal concentrations of translation inhibitors. *J Bacteriol.* **185**(1):359-70.

**Nigatu, A., S. Ahrne, B. A. Gashe, and G. Molin.** 1998. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for discrimination of *Pediococcus pentosaceus* and *Pediococcus acidilactici* and rapid grouping of *Pediococcus* isolates. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**:412-416.

**Nilsson, L. E., O. Molin, and S. Ansehn.** 1989. Bioluminescent assay of bacterial ATP for rapid detection of bacterial growth in clinical blood cultures. *J Biolumin Chemilumin.* **3**(3):101-4.

**Nunez, M., J. L. Rodriguez, E. Garcia, P. Gaya, and M. Medina.** 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *J Appl Microbiol.* **83**(6):671-7.

## O

**Obis, D., A. Guillot, J. C. Gripon, P. Renault, A. Bolotin, and M. Y. Mistou.** 1999. Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters. *J Bacteriol.* **181**(20):6238-46.

**Obis, D., A. Guillot, and M. Y. Mistou.** 2001. Tolerance to high osmolality of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *cremoris* is related to the activity of a betaine transport system. *FEMS Microbiol Lett.* **202**(1):39-44.

**O'Byrne, C. P., and I. R. Booth.** 2002. Osmoregulation and its importance to food-borne microorganisms. *Int J Food Microbiol.* **74**(3):203-16.

**O'Callaghan, J., and S. Condon.** 2000. Growth of *Lactococcus lactis* strains at low water activity: correlation with the ability to accumulate glycine betaine. *Int J Food Microbiol.* **55**(1-3):127-31.

**O'Connell-Motherway, M., D. van Sinderen, F. Morel-Deville, G. F. Fitzgerald, S. D. Ehrlich, and P. Morel.** 2000. Six putative two-component regulatory systems isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Microbiology.* **146**(Pt 4):935-47.

**Ogier, J. C., O. Son, A. Gruss, P. Tailliez, and A. Delacroix-Buchet.** 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* **68**(8):3691-701.

**Ogura, M., M. Kawata-Mukai, M. Itaya, K. Takio, and T. Tanaka.** 1994. Multiple copies of the *proB* gene enhance *degS*-dependent extracellular protease production in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **176**(18):5673-80.

**Okkers, D. J., L. M. Dicks, M. Silvester, J. J. Joubert, and H. J. Odendaal.** 1999. Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *J Appl Microbiol.* **87**(5):726-34.

**Olsen, A., M. Halm, and M. Jakobsen.** 1995. The antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermented maize (kenkey) and their interactions during fermentation. *J Appl Bacteriol.* **79**(5):506-12.

**Oren, A.** 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**(2):334-48.

**Osteras, M., E. Boncompagni, N. Vincent, M. C. Poggi, and D. Le Rudulier.** 1998. Presence of a gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti* bet operon: choline-O-sulfate is metabolized into glycine betaine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(19):11394-9.

**O'Sullivan, D. J., S. A. Walker, S. G. West, and T. R. Klaenhammer.** 1996. Development of an expression strategy using a lytic phage to trigger explosive plasmid amplification and gene expression. *Biotechnology (N Y).* **14**(1):82-7.

**O'Sullivan, E., and S. Condon.** 1997. Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* **63**(11):4210-5.

**O'Sullivan, T. F., and G. F. Fitzgerald.** 1999. Electrotransformation of industrial strains of *Streptococcus thermophilus*. *J Appl Microbiol.* **86**(2):275-83.

**O'Sullivan, L., R. P. Ross, and C. Hill.** 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie.* **84**(5-6):593-604.

**Ouwehand, A. C., S. Salminen, and E. Isolauri.** 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **82**(1-4):279-89.

**Overmann, J., S. Lehmann, and N. Pfennig.** 1991. *Arch. Microbiol.* **157**:29.

**Ozkanca, R., and K. P. Flint.** 2002. The effect of starvation stress on the porin protein expression of *Escherichia coli* in lake water. *Lett Appl Microbiol.* **35**(6):533-7.



## P

- Paludan-Muller, C., H. H. Huss, and L. Gram.** 1999. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Thai low-salt fermented fish product and the role of garlic as substrate for fermentation. *Int J Food Microbiol.* **46**(3):219-29.
- Paludan-Muller, C., M. Madsen, P. Sophanodora, L. Gram, and P. L. Møller.** 2002. Fermentation and microflora of plaasom, a Thai fermented fish product prepared with different salt concentrations. *Int J Food Microbiol.* **73**(1):61-70.
- Panoff, J. M., D. Corroler, B. Thammavongs, and P. Boutibonnes.** 1997. Differentiation between cold shock proteins and cold acclimation proteins in a mesophilic gram-positive bacterium, *Enterococcus faecalis* JH2-2. *J Bacteriol.* **179**(13):4451-4.
- Parente, E., S. Grieco, and M. A. Crudele.** 2001. Phenotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages produced in Basilicata (Southern Italy). *J Appl Microbiol.* **90**(6):943-52.
- Payne, J., C. A. MacCormick, H. G. Griffin, and M. J. Gasson.** 1996. Exploitation of a chromosomally integrated lactose operon for controlled gene expression in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett.* **136**(1):19-24.
- Peter, H., A. Burkovski, and R. Kramer.** 1996. Isolation, characterization, and expression of the *Corynebacterium glutamicum* betP gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine. *J Bacteriol.* **178**(17):5229-34.
- Peter, H., A. Bader, A. Burkovski, C. Lambert, and R. Kramer.** 1997. Isolation of the putP gene of *Corynebacterium glutamicum* and characterization of a low-affinity uptake system for compatible solutes. *Arch Microbiol.* **168**(2):143-51.
- Peter<sup>a</sup>, H., A. Burkovski, and R. Kramer.** 1998. Osmo-sensing by N- and C-terminal extensions of the glycine betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem.* **273**(5):2567-74.
- Peter<sup>b</sup>, H., B. Weil, A. Burkovski, R. Kramer, and S. Morbach.** 1998. *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. *J Bacteriol.* **180**(22):6005-12.
- Peters, P., G. E.A., and T. H.G.** 1990. The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiol. Lett.* **71**:157-162.
- Phadtare, S., K. Yamanata, and M. Inouye.** 2000. The cold-shock response. In Storz G. and Hengge-Aronis R. (Eds). *Bacterial Stress Response*. ASM Press, Washington DC:33-45.
- Phan-Thanh, L., and T. Gormon.** 1995. Analysis of heat and cold shock proteins in *Listeria* by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* **16**(3):444-50.
- Platteeuw, C., I. van Alen-Boerrigter, S. van Schalkwijk, and W. M. de Vos.** 1996. Food-grade cloning and expression system for *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* **62**(3):1008-13.
- Plockova, M., Z. Rihakova, and E. Svirakova.** 1998. The efficacy of nisin and nisin-producing strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in thermized quarg desserts. *Adv. Food. Sci.* **20**:17-22.
- Pocard, J. A., N. Vincent, E. Boncompagni, L. T. Smith, M. C. Poggi, and D. Le Rudulier.** 1997. Molecular characterization of the bet genes encoding glycine betaine synthesis in *Sinorhizobium meliloti* 102F34. *Microbiology.* **143**(Pt 4):1369-79.
- Poolman, B., and E. Glaesker.** 1998. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol Microbiol.* **29**(2):397-407.
- Poolman, B.** 2002. Transporters and their roles in LAB cell physiology. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **82**(1-4):147-64.
- Posno, M., P. T. Heuvelmans, M. J. van Giezen, B. C. Lokman, R. J. Leer, and P. H. Pouwels.** 1991. Complementation of the inability of *Lactobacillus* strains to utilize D-xylose with D-xylose catabolism-encoding genes of *Lactobacillus pentosus*. *Appl Environ Microbiol.* **57**(9):2764-6.
- Potts, M.** 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev.* **58**(4):755-805.
- Pourkomialian, B., and I. R. Booth.** 1992. Glycine betaine transport by *Staphylococcus aureus*: evidence for two transport systems and for their possible roles in osmoregulation. *J Gen Microbiol.* **138**(Pt 12):2515-8.
- Pourkomialian, B., and I. R. Booth.** 1994. Glycine betaine transport by *Staphylococcus aureus*: evidence for feedback regulation of the activity of the two transport systems. *Microbiology.* **140**(Pt 11):3131-8.
- Prasad, J., P. McJarrow, and P. Gopal.** 2003. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Appl Environ Microbiol.* **69**(2):917-25.
- Prescott, L. M., J. Harley, and D. Klein.** 1998. *Microbiology*. WCB, Mc Graw-Hill Compagny. **Fourth edition**.
- Pszczola, D. E.** 1992. The nutraceutical initiative: a proposal for economic and regulatory reform. *Food Biotechnol.* **46**(4):77-79.

## Q

- Qi, Y., and K. J. Miller.** 2000. Effect of low water activity on staphylococcal enterotoxin A and B biosynthesis. *J Food Prot.* **63**(4):473-8.
- Quentin, Y., G. Fichant, and F. Denizot.** 1999. Inventory, assembly and analysis of *Bacillus subtilis* ABC transport systems. *J Mol Biol.* **287**(3):467-84.

## R

- Rachid, S., S. Cho, K. Ohlsen, J. Hacker, and W. Ziebuhr.** 2000. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by environmental factors: the possible involvement of the alternative transcription factor sigB. *Adv Exp Med Biol.* **485**:159-66.
- Ramnath, M., M. Beukes, K. Tamura, and J. W. Hastings.** 2000. Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* **66**(7):3098-101.
- Rastogi, V. K., and M. E. Girvin.** 1999. Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature.* **402**(6759):263-8.
- Ravel, J., R. T. Hill, and R. R. Colwell.** 1994. Isolation of a *Vibrio cholerae* transposon-mutant with an altered viable but nonculturable response. *FEMS Microbiol Lett.* **120**(1-2):57-61.
- Rekhif, N., A. Atrih, and G. Lefebvre.** 1995. Activity of plantaricin SA6, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* SA6 isolated from fermented sausage. *J Appl Bacteriol.* **78**(4):349-58.
- Rhodes, D., and Hanson.** 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compound in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol.* **24**:357-384.



- Riehle, M. M., A. F. Bennett, R. E. Lenski, and A. D. Long.** 2003. Evolutionary changes in heat-inducible gene expression in lines of *Escherichia coli* adapted to high temperature. *Physiol Genomics*. **14**(1):47-58.
- Rincé, A., J. C. Giard, V. Pichereau, S. Flahaut, and Y. Auffray.** 2001. Identification and characterization of *gsp65*, an organic hydroperoxide resistance (*ohr*) gene encoding a general stress protein in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*. **183**(4):1482-8.
- Rincé, A., M. Uguen, Y. Le Breton, J. C. Giard, S. Flahaut, A. Dufour, and Y. Auffray.** 2002. The *Enterococcus faecalis* gene encoding the novel general stress protein *Gsp62*. *Microbiology*. **148**(Pt 3):703-11.
- Robert, H., C. Le Marrec, C. Blanco, and M. Jebbar.** 2000. Glycine betaine, carnitine, and choline enhance salinity tolerance and prevent the accumulation of sodium to a level inhibiting growth of *Tetragenococcus halophila*. *Appl Environ Microbiol*. **66**(2):509-17.
- Robert, R.** 2000. Contrainte osmotique chez la bactérie lactique *Tetragenococcus halophila*. Identification des solutés compatibles accumulés et caractérisation préliminaire du transporteur ButA de la glycine bêtaïne. Thèse Université Bordeaux I.
- Robinson, K., L. M. Chamberlain, K. M. Schofield, J. M. Wells, and R. W. Le Page.** 1997. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat Biotechnol*. **15**(7):653-7.
- Rodriguez, A. V., and M. C. Manca de Nadra.** 1995. Effect of pH and hydrogen peroxide produced by *Lactobacillus hilgardii* on *Pediococcus pentosaceus* growth. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**:59-62.
- Rodriguez, M. C., A. Froger, J. P. Rolland, D. Thomas, J. Agüero, C. Delamarque, and J. M. Garcia-Lobo.** 2000. A functional water channel protein in the pathogenic bacterium *Brucella abortus*. *Microbiology*. **146 Pt 12**:3251-7.
- Roling, W. F., and H. W. Van Versveld.** 1996. Characterization of *Tetragenococcus halophila* population in Indonesian soy mash (kecap) fermentation. *Appl. Environ. Microbiol*. **62**:1203-1207.
- Romeo, Y., D. Obis, J. Bouvier, A. Guillot, A. Fourcans, I. Bouvier, C. Gutierrez, and M. Y. Mistou.** 2003. Osmoregulation in *Lactococcus lactis*: BusR, a transcriptional repressor of the glycine betaine uptake system BusA. *Mol Microbiol*. **47**(4):1135-47.
- Rosenstein, R., D. Futter-Bryniok, and F. Gotz.** 1999. The choline-converting pathway in *Staphylococcus xylosum* C2A: genetic and physiological characterization. *J Bacteriol*. **181**(7):2273-8.
- Rubenhagen, R., H. Ronsch, H. Jung, R. Kramer, and S. Morbach.** 2000. Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *J Biol Chem*. **275**(2):735-41.
- Rubenhagen, R., S. Morbach, and R. Kramer.** 2001. The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K<sup>+</sup>. *Embo J*. **20**(19):5412-20.
- Ruffert, S., C. Lambert, H. Peter, V. F. Wendisch, and R. Kramer.** 1997. Efflux of compatible solutes in *Corynebacterium glutamicum* mediated by osmoregulated channel activity. *Eur J Biochem*. **247**(2):572-80.
- Russell, S. M.** 1995. The effect of refrigerated and frozen storage on populations of mesophilic and coliform bacteria on fresh broiler chicken carcasses. *Poult Sci*. **74**(12):2057-60.
- S**
- Saier, M. H., Jr., J. T. Beatty, A. Goffeau, K. T. Harley, W. H. Heijne, S. C. Huang, D. L. Jack, P. S. Jahn, K. Lew, J. Liu, S. S. Pao, I. T. Paulsen, T. T. Tseng, and P. S. Virk.** 1999. The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol*. **1**(2):257-79.
- Sakaguchi, K.** 1958. Studies on the activities of bacteria in soy sauce brewing. Part III. Taxonomic studies on *Pediococcus soyae* nov. sp., the soy sauce lactic acid bacteria. *Bull Agri Chem Soc Jpn*. **22**:353-362.
- Sakaguchi, K.** 1960. Betaine as a growth factor for *Pediococcus soyae*. Studies on the activities of bacteria in soy sauce brewing. *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn*. **24**:489-496.
- Sakaguchi, K.** 1962. Carnitine as a growth factor for *Pediococcus soyae*. VII. Studies on the activities of bacteria in soy sauce brewing. *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn*. **26**:72-74.
- Salinovich, O. M. R.** 1986. Comparison of glycoproteins by two-dimensional mapping of glycosylated peptides. *Annal in Biochemistry*. **15**:19-27.
- Salminen, S., E. Isolauri, and E. Salminen.** 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **70**(2-4):347-58.
- Salminen, S., A. Ouwehand, Y. Benno, and Y. Lee.** 1999. Probiotics: how should they be defined? *Trends Food Sci. Technol*. **10**:107-110.
- Salotra, P., D. K. Singh, K. P. Seal, N. Krishna, H. Jaffe, and R. Bhatnagar.** 1995. Expression of DnaK and GroEL homologs in *Leuconostoc mesenteroides* in response to heat shock, cold shock or chemical stress. *FEMS Microbiol Lett*. **131**(1):57-62.
- Sambongi, Y., Y. Iko, M. Tanabe, H. Omote, A. Iwamoto-Kihara, I. Ueda, T. Yanagida, Y. Wada, and M. Futai.** 1999. Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F0F1): direct observation. *Science*. **286**(5445):1722-4.
- Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular cloning*. A Laboratory Manual third edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor NY.
- Sami, M., K. Suzuki, K. Sakamoto, H. Kadokura, K. Kitamoto, and K. Yoda.** 1998. A plasmid pRH45 of *Lactobacillus brevis* confers hop resistance. *J Gen Appl Microbiol*. **44**(5):361-363.
- Sanders, J. W., K. J. Leenhouts, A. J. Haandrikman, G. Venema, and J. Kok.** 1995. Stress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *J Bacteriol*. **177**(18):5254-60.
- Sanders, J. W., G. Venema, and J. Kok.** 1997. A chloride-inducible gene expression cassette and its use in induced lysis of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*. **63**(12):4877-82.
- Sanders, M. E.** 1998. Development of consumer probiotics for the US market. *Br J Nutr*. **80**(4):S213-8.
- Sanders, M. E., and J. Huis in't Veld.** 1999. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **76**(1-4):293-315.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **74**(12):5463-7.
- Santoro, M. M., Y. Liu, S. M. Khan, L. X. Hou, and D. W. Bolen.** 1992. Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochemistry*. **31**(23):5278-83.



- Sarma, P. S., and S. Mohanty.** 1998. *Pediococcus acidilactici* pneumoniae and bacteremia in a pregnant woman. *J Clin Microbiol.* **36**(8):2392-3.
- Satokari, R., T. Mattila-Sandholm, and M. L. Suihko.** 2000. Identification of pediococci by ribotyping. *J Appl Microbiol.* **88**(2):260-5.
- Satomi, M., B. Kimura, M. Mizoi, T. Sato, and T. Fujii.** 1997. *Tetragenococcus muriaticus* sp. nov., a new moderately halophilic lactic acid bacterium isolated from fermented squid liver sauce. *Int J Syst Bacteriol.* **47**(3):832-6.
- Schillinger, U., M. Kaya, and F. K. Lucke.** 1991. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. *J Appl Bacteriol.* **70**(6):473-8.
- Schleyer, M., R. Schmid, and E. P. Bakker.** 1993. Transient, specific and extremely rapid release of osmolytes from growing cells of *Escherichia coli* K-12 exposed to hypoosmotic shock. *Arch Microbiol.* **160**(6):424-31.
- Schmalisch, M., I. Langbein, and J. Stulke.** 2002. The general stress protein Ctc of *Bacillus subtilis* is a ribosomal protein. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **4**(5):495-501.
- Schneider, E., and S. Hunke.** 1998. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev.* **22**(1):1-20.
- Scott, W. O.** 1953. Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30°C. *Aust. J. Biol. Sci.* **6**:549-564.
- Scott, C., H. Rawsthorne, M. Upadhyay, C. A. Shearman, M. J. Gasson, J. R. Guest, and J. Green.** 2000. Zinc uptake, oxidative stress and the FNR-like proteins of *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett.* **192**(1):85-9.
- Serror, P., T. Sasaki, S. D. Ehrlich, and E. Maguin.** 2002. Electrotransformation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* with various plasmids. *Appl Environ Microbiol.* **68**(1):46-52.
- Severin, J., A. Wohlfarth, and E. A. Galinski.** 1992. The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *J. Gen. Microbiol.* **138**:1629-1638.
- Shankar, N., A. S. Baghdayan, and M. S. Gilmore.** 2002. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature.* **417**(6890):746-50.
- Shebuski, J. R., O. Vilhelmsson, and K. J. Miller.** 2000. Effects of growth at low water activity on the thermal tolerance of *Staphylococcus aureus*. *J Food Prot.* **63**(9):1277-81.
- Silver, S.** 2003. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev.* **27**(2-3):341-53.
- Simon, D., and A. Chopin.** 1988. Construction of a vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie.* **70**(4):559-66.
- Sinensky, M.** 1974. Homeoviscous adaptation—a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **71**(2):522-5.
- Sleator, R. D., C. G. Gahan, T. Abee, and C. Hill.** 1999. Identification and disruption of BetL, a secondary glycine betaine transport system linked to the salt tolerance of *Listeria monocytogenes* LO28. *Appl Environ Microbiol.* **65**(5):2078-83.
- Sleator, R. D., J. Wouters, C. G. Gahan, T. Abee, and C. Hill.** 2001. Analysis of the role of OpuC, an osmolyte transport system, in salt tolerance and virulence potential of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* **67**(6):2692-8.
- Sleator, R. D., and C. Hill.** 2002. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev.* **26**(1):49-71.
- Smeds, A., P. Varmanen, and A. Palva.** 1998. Molecular characterization of a stress-inducible gene from *Lactobacillus helveticus*. *J Bacteriol.* **180**(23):6148-53.
- Smelt, J. P., J. C. Hellemons, P. C. Wouters, and S. J. van Gerwen.** 2002. Physiological and mathematical aspects in setting criteria for decontamination of foods by physical means. *Int J Food Microbiol.* **78**(1-2):57-77.
- Smith, L. T., J. A. Pocard, T. Bernard, and D. Le Rudulier.** 1988. Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* **170**(7):3142-9.
- Smith, L. T.** 1996. Role of osmolytes in adaptation of osmotically stressed and chill-stressed *Listeria monocytogenes* grown in liquid media and on processed meat surfaces. *Appl Environ Microbiol.* **62**(9):3088-93.
- Soliz, M., and M. Waser.** 1990. Efficient electrotransformation of *Enterococcus hirae* with a new *Enterococcus-Escherichia coli* shuttle vector. *Biochimie.* **72**(4):279-83.
- Solow, B. T., and G. A. Somkuti.** 2000. Comparison of low-molecular-weight heat stress proteins encoded on plasmids in different strains of *Streptococcus thermophilus*. *Curr Microbiol.* **41**(3):177-81.
- Somkuti, G. A., D. K. Solaiman, and D. H. Steinberg.** 1998. Structural and functional properties of the hsp16.4-bearing plasmid pER341 in *Streptococcus thermophilus*. *Plasmid.* **40**(1):61-72.
- Somkuti, G. A., and D. H. Steinberg.** 1999. Distribution of plasmid-borne stress protein genes in *Streptococcus thermophilus* and other lactic acid bacteria. *Curr Microbiol.* **38**(1):43-7.
- Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* **98**(3):503-17.
- Stadler, M., and H. Viernstein.** 2003. Optimization of a formulation containing viable lactic acid bacteria. *Int J Pharm.* **256**(1-2):117-22.
- Steinkraus, K. H.** 1997. Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control.* **8**(5/6):311-317.
- Stiles, M. E., and W. H. Holzapfel.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol.* **36**(1):1-29.
- Stock, D., A. G. Leslie, and J. E. Walker.** 1999. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science.* **286**(5445):1700-5.
- Strauch, K. L., K. Johnson, and J. Beckwith.** 1989. Characterization of degP, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *J Bacteriol.* **171**(5):2689-96.
- Strom, A. R., and I. Kaasen.** 1993. Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Mol Microbiol.* **8**(2):205-10.
- Strom, K., J. Sjogren, A. Broberg, and J. Schnurer.** 2002. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Appl Environ Microbiol.* **68**(9):4322-7.
- Strom, A. R., D. Le Rudulier, M. W. Jakowec, R. C. Bunnell, and R. C. Valentine.** 1983. Osmoregulatory (*osm*) genes and protective compounds. In Kosuge T., Meredith C.P. and Hollaender A. (Eds). *Genetic engineering of plants. An agricultural perspective.* Plenum Publishing Corp. N.Y.





- Sukharev, S. I., B. Martinac, V. Y. Arshavsky, and C. Kung.** 1993. Two types of mechanosensitive channels in the *Escherichia coli* cell envelope: solubilization and functional reconstitution. *Biophys J.* **65**(1):177-83.
- Sukharev, S. I., P. Blount, B. Martinac, F. R. Blattner, and C. Kung.** 1994. A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by *mscL* alone. *Nature.* **368**(6468):265-8.
- Sukharev, S. I., M. J. Schroeder, and D. R. McCaslin.** 1999. Stoichiometry of the large conductance bacterial mechanosensitive channel of *E. coli*. A biochemical study. *J Membr Biol.* **171**(3):183-93.
- Svensater, G., U. B. Larsson, E. C. Greif, D. G. Cvitkovitch, and I. R. Hamilton.** 1997. Acid tolerance response and survival by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* **12**(5):266-73.
- Svensater, G., B. Sjogreen, and I. R. Hamilton.** 2000. Multiple stress responses in *Streptococcus mutans* and the induction of general and stress-specific proteins. *Microbiology.* **146**(Pt 1):107-17.
- T**
- Tamang, J. P., and P. K. Sarkar.** 1996. Microbiology of mesu, a traditional fermented bamboo shoot product. *Int J Food Microbiol.* **29**(1):49-58.
- Thompson, J. K., K. J. McConville, C. McReynolds, and M. A. Collins.** 1997. Electrotransformation of *Lactobacillus plantarum* using linearized plasmid DNA. *Lett Appl Microbiol.* **25**(6):419-25.
- Timasheff, S. N.** 1993. The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **22**:67-97.
- Tolker-Nielsen, T., M. H. Larsen, H. Kyed, and S. Molin.** 1997. Effects of stress treatments on the detection of *Salmonella typhimurium* by in situ hybridization. *Int J Food Microbiol.* **35**(3):251-8.
- Townsend, D. E., and B. J. Wilkinson.** 1992. Proline transport in *Staphylococcus aureus*: a high-affinity system and a low-affinity system involved in osmoregulation. *J Bacteriol.* **174**(8):2702-10.
- Tzanetakis, N., and Litopoulou-Tzanetakis.** 1989. Biochemical activities of *Pediococcus pentosaceus* isolated of dairy origin. *J. Dairy Sci.* **72**:859-863.
- V**
- van Asseldonk, M., A. Simons, H. Visser, W. M. de Vos, and G. Simons.** 1993. Cloning, nucleotide sequence, and regulatory analysis of the *Lactococcus lactis* *dnaJ* gene. *J Bacteriol.* **175**(6):1637-44.
- van de Guchte, M., P. Serror, C. Chervaux, T. Smokvina, S. D. Ehrlich, and E. Maguin.** 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **82**(1-4):187-216.
- van Der Heide, T., and B. Poolman.** 2000. Glycine betaine transport in *Lactococcus lactis* is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity. *J Bacteriol.* **182**(1):203-6.
- van Kranenburg, R., M. Kleerebezem, and W. M. de Vos.** 2000. Nucleotide sequence analysis of the lactococcal EPS plasmid pNZ4000. *Plasmid.* **43**(2):130-6.
- van Rooijen, R. J., M. J. Gasson, and W. M. de Vos.** 1992. Characterization of the *Lactococcus lactis* lactose operon promoter: contribution of flanking sequences and LacR repressor to promoter activity. *J Bacteriol.* **174**(7):2273-80.
- Ventosa, A., J. J. Nieto, and A. Oren.** 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**(2):504-44.
- Verheul, A., F. M. Rombouts, R. R. Beumer, and T. Abee.** 1995. An ATP-dependent L-carnitine transporter in *Listeria monocytogenes* Scott A is involved in osmoprotection. *J Bacteriol.* **177**(11):3205-12.
- Verheul, A., E. Glaasker, B. Poolman, and T. Abee.** 1997. Betaine and L-carnitine transport by *Listeria monocytogenes* Scott A in response to osmotic signals. *J Bacteriol.* **179**(22):6979-85.
- Vignolo, G., S. Fadda, M. N. de Kairuz, A. A. de Ruiz Holgado, and G. Oliver.** 1996. Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by 'Lactocin 705', a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705). *Int J Food Microbiol.* **29**(2-3):397-402.
- Vijaranakul, U., M. J. Nadakavukaren, B. L. de Jonge, B. J. Wilkinson, and R. K. Jayaswal.** 1995. Increased cell size and shortened peptidoglycan interpeptide bridge of NaCl-stressed *Staphylococcus aureus* and their reversal by glycine betaine. *J Bacteriol.* **177**(17):5116-21.
- Villar, M., A. P. de Ruiz Holgado, J. J. Sanchez, R. E. Trucco, and G. Oliver.** 1985. Isolation and characterization of *Pediococcus halophilus* from salted anchovies (*Engraulis anchoita*). *Appl Environ Microbiol.* **49**(3):664-6.
- Voelker, U., A. Voelker, B. Maul, M. Hecker, A. Dufour, and W. G. Haldenwang.** 1995. Separate mechanisms activate sigma B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *J Bacteriol.* **177**(13):3771-80.
- Volker, U., B. Maul, and M. Hecker.** 1999. Expression of the sigmaB-dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **181**(13):3942-8.
- von Blohn, C., B. Kempf, R. M. Kappes, and E. Bremer.** 1997. Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Mol Microbiol.* **25**(1):175-87.
- von Wright, A., S. Wessels, S. Tynkkynen, and M. Saarela.** 1990. Isolation of a replication region of a large lactococcal plasmid and use in cloning of a nisin resistance determinant. *Appl Environ Microbiol.* **56**(7):2029-35.
- W**
- Walker, D. C., K. Aoyama, and T. R. Klaenhammer.** 1996. Electrotransformation of lactobacillus acidophilus group A1. *FEMS Microbiol Lett.* **138**(2-3):233-7.
- Walker, S. A., and T. R. Klaenhammer.** 1998. Molecular characterization of a phage-inducible middle promoter and its transcriptional activator from the lactococcal bacteriophage phi31. *J Bacteriol.* **180**(4):921-31.
- Walsby, A. E.** 1971. The pressure relationships of gas vacuoles. *Proceedings of the Royal Society of London.* **B178**:201-206.
- Walsby, A. E., P. K. Hayes, and R. Boje.** 1995. **30**:87.
- Wanker, E., R. J. Leer, P. H. Pouwels, and H. Schwab.** 1995. Expression of *Bacillus subtilis* levanase gene in *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **43**(2):297-303.
- Wegrzyn, G., and A. Wegrzyn.** 2002. Stress responses and replication of plasmids in bacterial cells. *Microbial Cell Factories.* **1**:1-10.
- Welsh, D. T.** 2000. Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev.* **24**(3):263-90.



**Wemekamp-Kamphuis, H. H., J. A. Wouters, R. D. Sleator, C. G. Gahan, C. Hill, and T. Abee.** 2002. Multiple deletions of the osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC of *Listeria monocytogenes* affect virulence and growth at high osmolarity. *Appl Environ Microbiol.* **68**(10):4710-6.

**Whatmore, A. M., J. A. Chudek, and R. H. Reed.** 1990. The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol.* **136**(Pt 12):2527-35.

**Whatmore, A. M., and R. H. Reed.** 1990. Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K<sup>+</sup> in turgor regulation. *J Gen Microbiol.* **136**(Pt 12):2521-6.

**Whitaker, R. D., and C. A. Batt.** 1991. Characterization of the heat shock response in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol.* **57**:1408-1412.

**Wong, L. S., M. S. Johnson, L. B. Sandberg, and B. L. Taylor.** 1995. Amino acid efflux in response to chemotactic and osmotic signals in *B. subtilis*. *J. bacteriol.* **179**:2410-2417.

**Wösten, M. M.** 1998. Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev.* **22**(3):127-50.

**Wouters<sup>a</sup>, J. A., B. Jeynov, F. M. Rombouts, W. M. de Vos, O. P. Kuipers, and T. Abee.** 1999. Analysis of the role of 7 kDa cold-shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 in cryoprotection. *Microbiology.* **145**(Pt 11):3185-94.

**Wouters<sup>b</sup>, J. A., F. M. Rombouts, W. M. de Vos, O. P. Kuipers, and T. Abee.** 1999. Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. *Appl Environ Microbiol.* **65**(10):4436-42.

**Wouters, P. C., A. P. Bos, and J. Ueckert.** 2001. Membrane permeabilization in relation to inactivation kinetics of *Lactobacillus species* due to pulsed electric fields. *Appl Environ Microbiol.* **67**(7):3092-101.

## X

**Xu, H. S., N. Roberts, F. L. Singleton, R. W. Attwell, D. J. Grimes, and R. R. Colwell.** 1982. Survival and viability of non culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the marine environment. *Microbial. Ecol.* **8**:313-323.

## Y

**Yancey, P. H., M. E. Clark, S. C. Hand, R. D. Bowlus, and G. N. Somero.** 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science.* **217**(4566):1214-22.

**Yi, X., E. Kot, and A. Bezkoravainy.** 1998. Properties of NADH oxidase from *Lactobacillus delbrueckii*. *J. Sci. Food. Agric.* **78**(527-534).

**Yoshinaga, F., Y. Takeda, and S. Okumura.** 1967. Glutamate kinase activity in *Brevibacterium flavum*: relationship between L-proline and L-glutamine biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* **27**(2):143-9.

## Z

**Zaccai, G., F. Cendrin, Y. Haik, N. Borochoy, and H. Eisenberg.** 1989. Stabilization of halophilic malate dehydrogenase. *J Mol Biol.* **208**(3):491-500.

**Zhang, S., and W. G. Haldenwang.** 2003. RelA is a component of the nutritional stress activation pathway of the *Bacillus subtilis* transcription factor sigma B. *J Bacteriol.* **185**(19):5714-21.

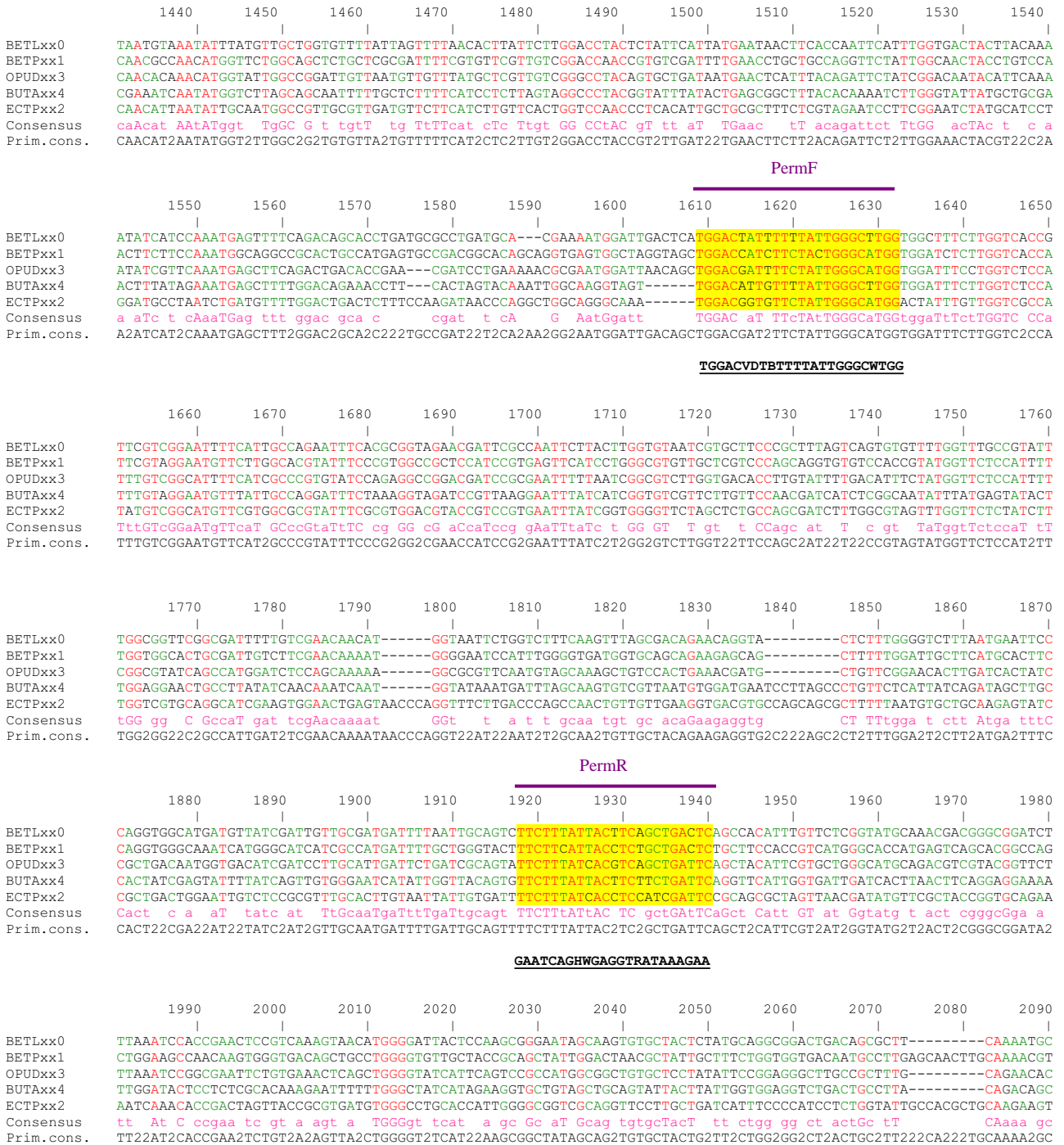


# ANNEXES



# ANNEXE 1

## Définition des amorces PermF et PermR



### Annexe 1 : alignement des séquences nucléotidiques des transporteurs secondaires de la famille BCCT avec le gène *butA* de *T. halophila* ATCC33315 (programme Multalin).

- BETL : *betL* de *L. monocytogenes* EGD-e
- BETP : *betP* de *C. glucamicum* ATCC13032
- ECTP : *ectP* de *C. glucamicum* ATCC13032
- OPUD : *opuD* de *B. subtilis* 168
- BUTA : *butA* de *T. halophila* ATCC33315

La localisation des amorces PermF et PermR est représentée en jaune. La séquence des amorces PermF et PermR est indiquée sur le schéma en noir gras souligné.





ANNEXE 2  
Analyse de la séquence nucléotidique du locus *butA*

```

1      TGCTTATAGCTTAACAAAGCTCTGAGTTTAGTACAAAGTTTTTTCTAGTAAACGTAACAACAGTATACCATAATGCTTGAGAAAACGCTTTTTATCTTTA
101    GAAACTAGTCAATGAAATTTAGTGAATGATCCTTTATTTCACTCATTATAACTAAAAAATAATTTAGATATTTGATTACAGAAATGAAAATGATATAA
201    TACTTCTGATTATATTATATTTTGGTTGTTTATGAATGAGAACATGAGAAAAGAGAAGGAATTGCCTCTCTTTTTTAATGAACTCCTAAAGACAATCATCA
      P1 -10      P2 -35      P2 -10      P1 -35
301    CGAGCGCTACATTAATAAAAAATAAGAAAGGAAATCAAATATTGCCTGAAAACAAAGAGAATCATACTCAGAAGCAAGCGAGAAAAGGAAATCGTAGAC
401    GTGAAAAGAAAATACAAGATCAAAACGTAACCCAGAACTTGAATCAGAACGCGAATTAGCTAGAAAAATGCGCAAAGAAGAAGCCCGAGCGCGTAAAGA
501    AGCCATAGAAAATCGGCCACCATTTAGAGGTTTGCAAATAAATCCTACGACGCTTTTATTTCGATGAAGAAGGAAAAGAAGAAATTGGGGAACGTAATTGG
601    AAAGGATGGGGCGTTGATATTCACCCCCAAGTTACCATTCCCTGCGACTATCATCTTGTTATTATTATTCATCATTTTTATTATCAATATTTTCGCAAGAAGCAA
701    ATGTCGTTTTTGATTACATTTTAGACGCTGTTACAAATTACACAGGTTGGTTTATGATTTTAGCAACCGCCATATTTATTGGCGCAGGTCTCTTTTTTGC
801    TTTCAGCCGTTATGGAAAATCGTCATCGGCGGTAACGATGCTAAGCCAGAATTTCCAGGTGGGGCTGGTTTGCGATGTTATTAAGTGCAGGAATGGGC
901    ATCGGACTTGTTTTCTGGAGTGTCGCAGAACCCATCTCACACTTAGGTGAACCTTCTCCCATGTTAATGTTGATCCAAATTCTGCTGGAGCGGTTAAAA
1001   CAGCATTGACCTCATCTTTCTTCCACTGGGGGATACATCCCTGGGCAATTTATGCGATCGTAGGTTTAGGGCTTGCTTTCTTTTCTTATAATAAGGGGCT
1101   TCCTTTAACAATACGCTCCCTTTTTTACCCTTTGATAGGAAATAAGATATACGGCTGGTGGGGTAACATCATTGATATATTATCTGTTTTAGCAACCATG
1201   ACGGGATTGGCCACCTCTCTTGGACTTGGCGTTTCACAAGTTAATGCTGGTTAAATTATCTTTTCGGGATATCAATAAGTCCAGGCATTCAGATTGTAT
1301   TAATCATTGTAATTACCGCTTTTGCAACAACTTCAGTCGTTTTAGGGCTTGATAAGGGTGTACAAAATTAAGCGAAATCAATATGGTCTTAGCAGCAAT
1401   TTTTGCTCTTTTCATCTCTTAGTAGGCCCTACGGTATTTATACTGAGCGGCTTTACACAAAATCTTGGGTATTATGCTGCGAACTTTATAGAAATGAGC
1501   TTTTGACAGAAACCTTCACTAGTACAAATTTGGCAAGGTAGTTGGACATTGTTTTATTGGGCTTGGTGGATTTCTTGGTCTCCATTTGTAGGAATGTTTA
1601   TTGCCAGGATTTCTAAAGGTAGATCCGTTAAGGAATTTATCATCGGTGTCGTTCTTGTTCCAACGATCATCTCGGCAATATTTATGAGTATACTTGGAGG
1701   AACTGCCTTATATCAACAAATCAATGGTATAAATGATTTAGCAAGTGTGTTAATGTGGATGAATCCTTAGCCCTGTTCTCATTATCAGATAGCTTGCCA
1801   CTATCGAGTATTTTATCAGTTGTGGGAATCATATTGGTTACAGTGTCTTTATTACTTCTTCTGATTCAGGTTCATTGGTGATTGATCACTTAACTTCAG
1901   GAGGAAAATTTGGATACTCCTCTCGCACAAAGAATTTTTTGGGCTATCATAGAAGGTGCTGTAGCTGCAGTACTTATTGGTGGAGGTCTGACTGCCTT
2001   ACAGACAGCTTCGATTATTACCGGGCTACCGTTTACCTTTGTTTTACTTGCTATGGTTTATTTCCTTATACCTAGGATTAAGACAAGAGTTCTTGATCGAA
2101   CGAGCGGTTAGAGAAAACTCCGCAAAGTCAGAAATGATCATATTACACTGAAGTCGTACAATCTAATGTTGAAGACAAGGCTTTAGTCGAAAATGTTG
2201   CTGAAAAACTTGCTGAAGAAGAAGATCCTGAAGAAGATACAAACGAAGAAACAAATGAAGATGACTACAATACAGAAAGTCAAAGCTCGCAGTAGAGTTC
2301   TTCAATTAAAAAAGAGAGGATCGTTAGGTTTACTTACTGTGAACCTAACGATCCTCTCTTTTTTTGTCAATCTATTGTTAGCTCAATAAGCTT

```

**Annexe 2 : analyse de la séquence nucléotidique du locus *butA* de *T. halophila* ATCC33315 d'après Robert, 2000)**

Les codons TTG et ATG putatifs sont représentés en rouge.

Les sites de fixation des ribosomes putatifs situés en amont des deux codons d'initiation putatifs sont représentés en rose.

Les deux séquences promotrices putatives (P1, P2) sont représentées en vert.

La longue séquence répétée inversée (représentée en gris) présentant un ΔG de -38,4 kcal remplit probablement le rôle de terminateur.



# ANNEXE 3

## Analyse de la séquence protéique de ButA

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
ButAxx0	-----MRKEEARKEAIEENRPPFRGLQINPTTSLFDEEGKEEIGERNWKGWVDIHPQVITPATIILLFIIILLSIFSQEANVVDYILDVAVTNYTG									
BetPxx3	MTTSDPNPKPIVEDAQPEQITATEELAGLLENPTNLEGLKLADEEEIILEGEDTQASLNWSVIVPALVIVLATVWVGIGFKDSFTNFASSALSAVVDNLG									
OpuDxx1	-----MLKHISSVFWIVIAITAAAVLWGVISPDLSLQVNSQSAQAFITDSFG									
BetLxx2	-----MKKLTNVFWGSGFLVLLAVLFGAFLPQEFETFNHIIQKFLTSNFG									
betTxx4	-----MTDLSHSREK---KINPVVYFYSAGLILFLSLTILFRDFAWLGRTLWDVSKTFG									
BetTlike	-----MTKRT---SFNPLVIGVTLFFILLMAMFIAPQEQALLNQAKSGIFANFS									
EctPxx5	-----MSSNIAITTEPEGKNNKG--LKSDPFIIFSISVGFIVVFIATIALGKARTTFSAIAGWLLLENLG									
CudTxx6	-----MEKNKVMWDTTFIGSSIIILLIAVIMPMVFPKASQDIITKMNDAVSSSIG									
CaiTxx7	-----MKNEKRRKTGIEPKVFFPPLIIVGILCWLTVRDLDAANVVINAVFSYVTVNVWG									
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
ButAxx0	WFMILATAIFIGAGLFFAFSRYGKIVIGGNDAKPEFSRWGFAMLLSAGMGIGLVFWSVAEPIISHLGEPSPMFNVDPNSAGAVKALTSSFFHWGIHPWA									
BetPxx3	WAFILFGTVFVFFIVVIAASKFGTIRLGRIDEAPEFRVSWISMMFAAGMGIGLMFYGTTEPLTFYRNGVP---GHDEHNVG---AMSTTFHWTLHPWA									
OpuDxx1	WYYLLVLSLFGVFCFLFLFSPIGKIKLGPDEKPEFGLLSWFAMLFSAAGMGIGLVFYGAEEPIISHVAISSP---SGETEFPQAFRDALRYTFHWHGLHAWA									
BetLxx2	WYYLIVVAIIIFCLFLVLSPIGSRIRLKGPEEPEGYSNKSWFAMLFSAAGMGIGLVFWGAAPLPSHYAVQAP---GGEVGTQAAMKDALRYSFHWHGISAWS									
betTxx4	WYYLLAATLYIVFVVICACSRFGSVKLGPEQSKPEFSSLSWAAMLFAAGIGIDLMMFFSVAEPVTQY---MQPPEGAGQTIEAAR---QAMVWTLFHYGLTGS									
BetTlike	WFYVLTFSVFLGFLILLSVSSLGNIKLQDEEPEFSSLSWLAAMLFAAGMGIGLMFFGVAEPLTHY---LSDIT---AGSAEHKQ---EALLHTLPHWHGIHAWA									
EctPxx5	WMIYGGVSLVFIPLMGIFASRYGRVKLGDDEEPEHTLIVWFCMLFAGGVCGLVFWGVAEPINHA---FNVPMANEESMSEAAIVQAFAYTFYHFGIHMVW									
CudTxx6	SIYLLIGLATLIFVLYIAFGYGNVTLGKATDKPEFNNFSAAMLFACIASDILYWGIIEWAFY---QDPHGGKGMTDSALNYATMYGMFWGPIAWA									
CaiTxx7	WAFEWYVMVMLFGVFWLFGPYAKRKLG---NEPPEFSTASWIFMMFASCTSAAVLFWGSI---IYYIISTPPFGLPEPNTGAKELGLAYSLFHWGLPLWA									
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
ButAxx0	IYAIIVGLGLAFPSYKGLPL-TIRSLFYPLIGNK-IYGWGNIIDILSVLATMTGLATSLGLGVSQVNAAGLNYLFGISISPGIQIVLII-VITAFATTSV									
BetPxx3	IYAIIVGLAIAYSTFRVGRKQ-LLSSAFVPLIGEKGAEGWGLKIDILAIATVFGTACSLGLGALQIGAGLSAANIIEDPSDWTIVGIVSVLTLAFIFSA									
OpuDxx1	IYAIIVALCIAYQFRKGAAG-LISSLSPILGDK-VNGPIKAIICIAVFAVTVGVSTSLGLGATQINGGLNYLFGIPNAFIVQLVLI---IVTVLFLLSA									
BetLxx2	IYAIIVALALAYFKFRKNAPG-LISATLYPILGKH-AKGPICQLIDIIAVFAVTVGVATLGLGAQQINGGLTYLFGVNNFTVQFTIIV-IVTILFMSA									
betTxx4	MYALMGALGYFSYRNLPL-TIRSAFYPIFGKR-INGPIGHSVDIAAVIGTIFGIATTLGIGVVQLNYGLSVLFDIP---DSMAAKAALIALSVIATISV									
BetTlike	VYGTIALALAYGFRYKLP-ALRSCFYPLKDR-INGKIDAIIDVMAALLATLFGIITLGLFGSSQLGAGLEQIGWISQNSFALQWIVVVMCLAVFSA									
EctPxx5	IMALPGLSLGYFIYRKLPP-RLSSVFPILGKH-IYSTPKGLIDVLAIVTFFGIIVASVGLGVQLINAGMKNLWSTPQVSW-VQLLIIITAVACISV									
CudTxx6	TFVLPALCIGYLVFVKNKPVYKISQTLRPIKQG-TDGIIVGKIVDIIFIFGLLGAATSLALGVPMITAGIERLTGIDGDNMLMKSILLVITAFAYSS									
CaiTxx7	TYSFLSVAFAYFFVRKMEVIRPSSTLVPLVGEKHAKGLFGTIVDNFYLVALIIFAMGTSGLGLATPLVTECMQWLFGIP-HTLQLDAIITTCWIIILNAICV									
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
ButAxx0	VLGLDKGVQKLSSEINMVAALFALFILLVGPVTFVILSGFTQNLGYAANFIEMSFWTETP-----TSTNWQGSWTLFYWAWWISWSPFVGMFIARISKG									
BetPxx3	ISGVGKGIQYLSNANMVAALLAIFFVVGPTVSIINLNLPGSIGNYLSNFFQMGARTMSAD---GTAGEWLGSWTIFYWAWWISWSPFVGMFLARISRG									
OpuDxx1	WSGLGKGIKYLSTNMVLAGLMLFVVGPTVLMNSFTDSIGQYIQIVQMSFRLTPNDP---EKREWINSWTIFYWAWWISWSPFVGMFIARISRG									
BetLxx2	MSGLDKGIQLLSNVNIYVAGVLLVLTLLGPTLFFIMNFTNSFGDYLQNI IQMSFQTAPDAP---DARKWIDSWTIFYWAWWISWSPFVGMFIARISRG									
betTxx4	TSGVDKGIKRVLSLNLVALGLLILFVLFMGDTSFLLNALVLNVGDYVNRFMGMTLNSFAFDR---P-VEVMNNTLFFWAWWVWVWSPFVGLFLARISRG									
BetTlike	ISGVGKGVKILSEINLTLAFCLLFLVLSGPTLYLLSAFSDNIGNYFNSLVQLSKTYAYEQ---EHTSWFSGWTVLYWAWWCSWAPVGLFARISKG									
EctPxx5	ASGLDKGKLLSNINIAMAVLMMFFLFTGPTLTLRLFLVESFGIYASWMPNLMFWTDSF-Q---DNPQWQGWTFYWAWWICWSPYVGMFVARIISRG									
CudTxx6	YSGLKGKIKVLSGDNVILSFLLLGFPVIVGPTVFTMETTITSGMNFKNFQMATWIEPFGGIGGREETMFPQKWTIFYWAWWIVYAPFGLFIARISKG									
CaiTxx7	ACGLQKGVRIASDVSRYLSFLMLGWVIVS GASFIMNYFTDSVGMMLMYPRLMFLYTDPI-----AKGGFPQGWTFYWAWWVVIYAIQMSIFLARIISRG									
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
ButAxx0	RSVKEFIIIGVVLVPTIISAI FMSILGGTALYQQINGINDLAS--VVNVDESALFSLSDSLPLSSILSVVGIILVTVFFITSSDSGSLVIDHLLTSGGKLD									
BetPxx3	RSIREFILGVLVLPAGVSTVWFSIFGGTAIVFEQNGESIWDG--GAAEQ---LFGLLHALPGGQIMGLIAMILLGTFPITSADASTVMGMTSQQHGLE									
OpuDxx1	RTIREFLIGVLVTPCILTFLWFSIFGVSAMDQQKGFANVAK--LSTETM---LFGTLDHYPLTMVTSILALILIAVFFITADSATSFLVGMQTSYGSLN									
BetLxx2	RTIRQFLLVGIVLVPALVSVFVFAVFGGSAIFVEQHGNSGLSS--LATEQV---LFGVFNEFPGGMMSIVAMILIAVFFITADSATSFLVGMQTTGGSLN									
betTxx4	RTIRQFVLGTLIIPFTFLLLWSVFGNSALYIEIHGGAFAEEMVHPER--GFYSLLAQYPAFTFSASVATITGLLFYVTSADSGALVGLNFTSGLKDI									
BetTlike	RTIREFIFGVLVIPSLFGILWTFVFGNTAVWLNDGIAAGGLGEPFISSPEI--LFFKFLNYLPLPTITGFVSLVILLFFITADSAGIYVLLNIIASRDKSL									
EctPxx5	RTVREFIGGVLALPAIFGVVWFSIFGRAGIEVELSNPGFLTQPTVVEGDVPAALFNLVQEPYPLTGIVSAFALVIIVFFITSDSAAALVNDMFATGAENQ									
CudTxx6	RTLKELVLGTLVYGTGLCMLFFGIFGNAYAVLQISGQFNVIE-FLNSHTTEATIEVLHHLPPNVLVIVLFLISAILFLATTFDSGSIYLLAASQKQKIVG									
CaiTxx7	RTVRELFCGMVLGLTASTWILWTVLGSNTLLIDKNIINIPN-LIEQYVARAIETWAALPLSTATMWGFFILCFIATVTLVNACSYTLAMSTCREVRD									
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
ButAxx0	T---PLAQRIFWAIIEGAVAAVLLIGGG---LTAQTASITIGLPTFFVLLAMVYSLYLGLRQEFLIERAVREKLRKVRNDHIITEVQVSNVEDKALVEN									
BetPxx3	A---NKWVTAAGVATAAIGLTLSSGGDNALSNLQNVTVVAATPFLFVILGMLFALVKDLSND-VIYLEYREQQRFNARLARERRVHNEHRKRELAAKR									
OpuDxx1	P---ANSVKLSWGIQSAMAAVLLYSGG---LAAQLNTAIIAALPFSIVILMIIASLYQSLSKE-RREIKKAEKLDKPRSPRVKKAY-----									
BetLxx2	P---PNSVKVWGLLQAGIASVLLYAGG---LTAQNASIIAFAFPFVILVILMIVSLVSLTRE-QEKGLVYRPPKKSQRSQL-----									
betTxx4	NSDAPQLRVFWVAIGLLT---LGMLMTNGISALQNTVIMGLPFSFVIFVFMAGLYKSLKVEDYRRESANRDTAPRPLGLQDRLSWKKRLSRLMNYPG									
BetTlike	AS---PAWQAIMWGTMSVVA---IVLMQSGLANLQMTLIVLPAFLFALLVMCFSLWKGLIADKKYFSTKVNPTSI FWSGDK---WKSHLEQMMNQTO									
EctPxx5	T---PTSRYVMWACTISGAVAGSLIIIPSSGGTALQEVVIVIAFPFVILVQFVMMFSLKGMSED---AAAVRRVQTQWKEKTD---TPEKLEHSSQPA									
CudTxx6	EP---LKANRLYWAFALCCLLPALMLVGGERALDVLKTA SVLASVPLVIVFVMMMSIFLRTLSEDRLKLHHRADKYREVERRSLRITQVREKKEKEDNL---									
CaiTxx7	GEEPPLLVRIGWSIILVGIIGVLLLAGG---LKPITAIAGGCLPFFVNIIMVTLSPFIKDAKQNKD-----									

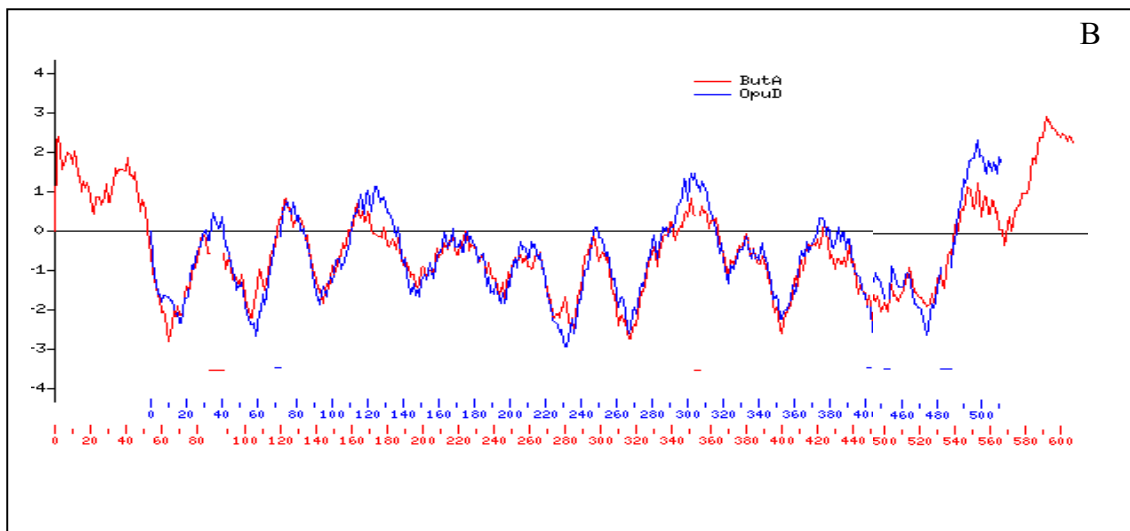
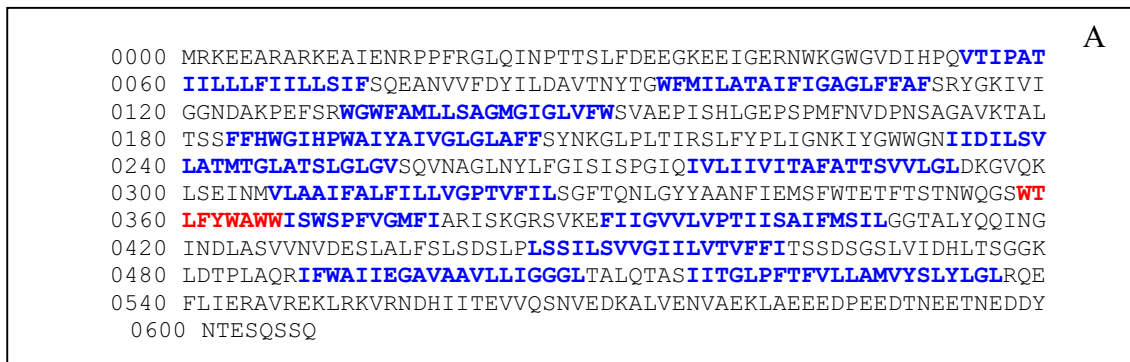
motif signature



	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	
ButAxx0	VAEKLAEEEDPEEDTNEETNEDDYNTESQSSQ	-----									
BetPxx3	RRERKASGAGKRR	-----									
OpuDxx1		-----									
BetLxx2		-----									
betTxx4	TRYTKQMMETVCYPAMEEVAQELRLRGAYVELKSLPPEEGQQLGHLDDLVMGEEQNFVYQIWPQQYSVPGFTYRARS	----GKSTYYRLETFFLEGSQ									
BetTlike	EKDILRFLKNTALPAMRELRLQELT	--GKYNLSVEINTLFEQEPALELVIHKESMRDFMYGIKSVGREVSEQLINDENLPHIQHSATYEPYTYFFDGRVG									
EctPxx5	PGYDDEG-NPLPMPALEHDEDEGNIVIPGNVVIEGDLGVVGDVDDPEEAQEMGSRFKIVEQTRPQSRDEYDI	-----									
CudTxx6		-----									
CaiTxx7		-----									
	710	720	730	740							
ButAxx0		-----									
BetPxx3		-----									
OpuDxx1		-----									
BetLxx2		-----									
betTxx4	NDLMDYSKEQVITDILDQYERHLNFIH-LHREAPGHSVMFPDA	-----									
BetTlike	YDVQYMDQDELIADMLKQYERYLSLLDDVGQELMAHEQTELAE	-----									
EctPxx5		-----									
CudTxx6		-----									
CaiTxx7		-----									

**Annexe 3 : alignement des séquences protéique des transporteurs secondaire de la famille BCCT [BetP (*C. glukanicum* ATCC13032), OpuD (*B. subtilis* 168), BetL (*L. monocytogenes* EGD-e), BetT (*E. coli* K12), BetT-like (*Haemophilus influenzae* Rd KW20), CudT (*S. xylosus* C2A), EctP (*C. glukanicum* ATCC13032)] avec la protéine ButA de *T. halophila* ATCC33315 (programme Multalin).**

Le motif signature de la famille BCCT est représenté en violet.



**Annexe 3bis : Etude de la protéine ButA de *T. halophila* ATCC33315 (d'après Robert, 2000).**

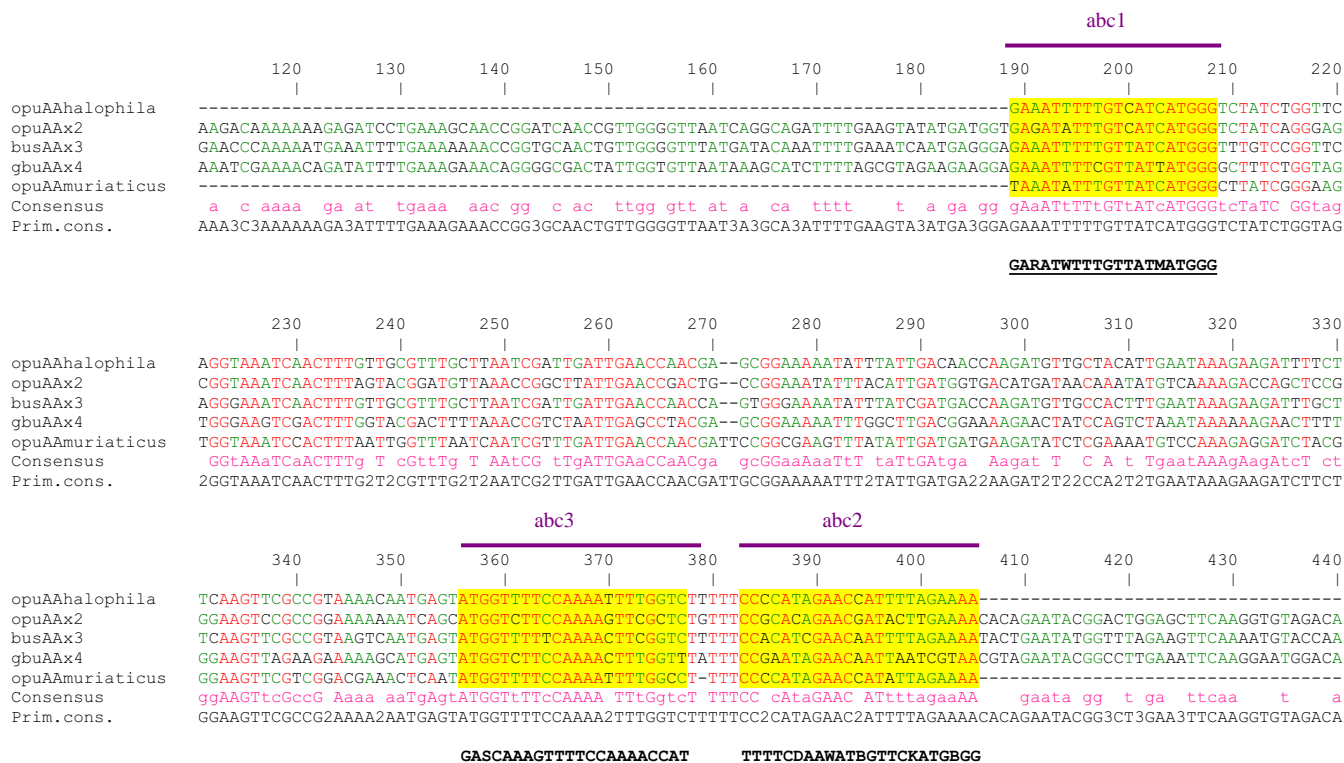
A : comparaison des Profils d'hydrophilicité des protéines OpuD et ButA (calculé sur une fenêtre de 19 acides aminés avec la méthode de Kyte et Doolittle, 1982).

B : prédiction des fragments transmembranaires (en bleu) de la protéine ButA. En rouge est représenté le 8<sup>ème</sup> fragment transmembranaire, signature de la famille BCCT (d'après le logiciel PRED-TMR2).



## ANNEXE 4

### Définition des amorces abc1, abc2 et abc3



#### Annexe 4 : alignement des séquences nucléotidiques des ATPases des transporteurs ABC de type OpuA avec les gènes opuAA putatifs de *T. muriaticus* JCM10006 *T. halophila* ATCC33316 (programme Multalin).

opuAA : opuAA de *B. subtilis* JH642

busAA : busAA de *Lc. lactis* NCDO763

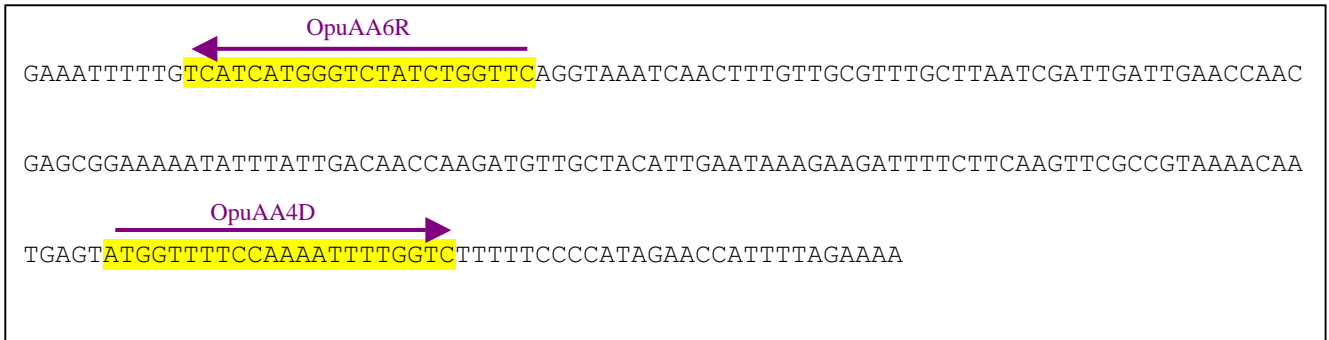
gbuAA : gbuAA de *L. monocytogenes* 1639

La localisation des amorces abc1, abc2 et abc3 est représentée en jaune. La séquences des amorces abc1, abc2 et abc3 est indiquée sur le schéma en noir gras souligné.





ANNEXE 5  
Localisation des amorces OpuAA4D et OpuAA6R



**Annexe 5 : localisation des amorces OpuAA4D et OpuAA6R sur la portion du gène *opuAA* de *T. halophila* ATCC33315.**



## ANNEXE 6

Recherche de protéines homologues à la protéine de 197 aa putative codée par pAB10

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110																																																																																
hyptEntfaecium	MIMVKYIYNHELRI	FLRRETIVSYNV	QPLRTNEEI	QDFQFWR	LRRTSNPER	DSFLFLFG	INNGLRMSD	IIGLKVGD	I-----	RGKSKPI	VEHKTG	KRKP	P	F	I	D	-	N	L	R	E	E																																																																					
intrecLbplantarum	-----	MERMHYN	VEPLR	TQDEI	DDFLWAV	SQARYGER	NRMI	VLVGIN	TGLRMSD	ILRLKVG	QV-----	RGKDRVM	IMEQ	KTG	K	R	W	L	F	L	K	-	N	L	K	T	E																																																																
hyptBcereus	-----	MNKKPHL	IDVQPI	RSKEQI	EDMKWAL	KRHCS-ER	DYILFX	FGIHT	GLRVSD	LLQIETQ	TIK-L	KRKR	K	E	F	K	I	K	E	G	T	K	K	E	R	I	N	L	T	-	S	I	F	D	E																																																								
intrecCacetobutylicu	-----	MVVEPI	RDKKK	KIQI	YLYNG	KDI-KYG	-VLF	FKGL	NTGLR	ISDIL	PVKVD	IFN-P	NYE	Y	K	Y	F	T	L	K	E	K	T	G	K	V	K	K	I	K	L	N	P	A	I	K	K	T																																																					
intrecinvphBC6A52	-----	MNFVQPI	RDPEQ	IQQ	LKDYF	KEK-S-	LRNY	ILF	IMG	INTGLR	ISDIL	LKLVG	VDV-----	K-G	SH	I	S	M	R	E	E	K	T	G	K	Q	K	R	I	Q	I	T	A	A	L	K	R	E																																																					
intrecLambdaSa2	-----	MNI	VEPLR	DKDDI	QAMKDY	LSSW-N-	EKY	YML	FLLG	INTG	FRVGD	ILKLVK	VDV-----	Q-G	W	H	I	K	V	R	E	Q	T	G	K	Y	K	S	I	K	M	T	R	P	L	K	N	E																																																					
intrecSpyogenes	-----	MKIVQPI	RD	TQID	MMKDY	LKGW-N-	PRN	FLL	LLFG	LNTGLR	IGDIL	PLK	VK	VDV-----	T	A	G	N	Y	I	D	I	E	Q	T	G	K	Q	K	R	F	P	I	N	K	T	L	R	R	E																																																			
intrecCtetani	-----	MKS	VEPLR	DIKT	IKSMR	AILKSQ-N-	TRN	ELL	FILG	INAGLR	ISDIL	LKLVG	VDV	IN	F	N	K	M	K	V	L	D	Y	V	I	I	K	E	K	T	K	K	F	L	S	S	I	V	Q	K	L																																																		
Consensus		V#P	iRd	I	m	l	k	r	l	f	g	i	n	t	g	l	r	i	s	d	i	l	k	v	d	i	e	k	t	g	k	x	i	l	l	e																																																							
Prim.cons.	MIMVKYIYNHELRI	FL223333M3	2V2P2	RDKEQ	IQDMKDY	LK324N2	ERNY3	LFLFG	INTGLR	ISDIL	LKLV2	DVIN	F3N3	KG2	2YI2	I	K	E	Q	T	G	K	Q	K	2	I	2	L	2	L	2	L	2	K	2	E																																																							
		120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220																																																																															
hyptEntfaecium	ILLYTEG	KEE---ND	WLFPS	-----	RQ	GRHIT	TRDRV	QIYAD	IAEKLGR	-----	DD	IG	TH	L	R	K	T	F	G	Y	H	Y	K	K	T	R	-	D	I	A	T	L	M	F	I	N	H	S	S	Q	A	I	T	K	R	Y	I	G	I																																										
intrecLbplantarum	LAHFTRY	RGA---NE	PLFCS	-----	GR	GA-	LT	V	NG	VYRV	FQT	A	G	E	Y	L	E	R	-----	DD	IG	TH	L	R	K	T	F	G	Y	H	Y	Q	K	T	R	-	D	I	A	L	M	M	I	F	N	H	S	S	E	Q	V	T	K	R	Y	I	G																																		
hyptBcereus	VYSYAQ	KLE---DI	WLFPS	-----	R	K	G	E-	K	P	I	S	K	I	Q	A	Y	R	L	Q	K	A	G	D	F	A	G	V	-----	E	S	IG	TH	T	M	R	K	T	F	G	Y	W	F	Y	K	Q	T	K	-	D	V	A	M	L	Q	E	I	L	N	H	S	T	P	Q	I	T	L	K	Y	I	G																				
intrecCacetobutylicu	LLGFV	KKQMS-M	DSYLF	YS-----	R	K	G	G-	H-	L	E	R	V	Q	A	Y	R	I	L	K	E	A	A	I	C	G	V	-----	E	N	F	G	TH	S	L	R	K	T	G	W	Y	T	Y	K	A	S	K	Y	N	I	G	L	M	D	T	F	N	H	S	S	Q	A	I	T	L	R	Y	I	G																						
intrecinvphBC6A52	LKWFIE	EEREDN--E-	YLLQS	-----	R	Q	G	R	N	R	P	I	G	R	S	M	A	K	I	L	S	G	A	A	D	F	L	-----	D	E	IG	TH	L	R	K	T	F	G	Y	H	M	Y	Q	T	K	-	N	I	A	L	L	M	E	I	F	N	H	S	S	E	K	V	T	L	R	Y	I	G																							
intrecLambdaSa2	LREFVK	DKELH--E-	YLFQS	-----	R	V	G	K	N	K	A	L	S	Y	K	T	V	W	F	L	K	R	A	E	D	L	G	I	-----	D	N	V	G	TH	T	M	R	K	T	F	G	Y	H	Y	K	Y	K	-	N	V	A	D	L	M	S	L	F	N	H	S	S	P	A	V	T	L	I	Y	I	C																					
intrecSpyogenes	IDKYIK	DKQLK	PWD-Y	LF	S	Q	K	K	T	E	P	G	K	E	G	Q	K	P	I	S	R	E	Q	A	W	I	L	N	K	A	A	Q	F	G	I	-----	H	H	IG	TH	S	M	R	K	S	F	G	Y	H	Y	Q	T	Q	-	D	I	A	M	L	M	E	M	F	N	H	S	S	P	D	I	T	L	R	Y	I	G															
intrecCtetani	IEKYIK	E	F	D	S	I	S	R	E	M	V	F	K	S	-----	N	K	G	E	N	K	P	I	S	R	Q	H	A	W	I	L	N	T	A	E	M	I	G	L	V	K	R	D	S	G	K	I	Q	G	E	I	G	TH	T	M	R	K	T	F	G	Y	H	A	Y	Q	N	G	T	-	S	L	E	L	L	M	D	I	F	N	H	S	C	K	S	E	T	L	R	Y	I	G
Consensus	%	k	#	y	l	f	S	r	g	k	p	i	s	r	a	y	i	l	a	a	g	i	g	t	h	t	s	r	k	t	f	g	y	h	y	k	k	t	r	-	d	i	a	l	m	i	f	n	h	s	i	t	l	r	y	i	g																																		
Prim.cons.	LLK2	IK3	KEL5	2325	YLF2	SQ	K	K	T	E	P	G	R	G	3	N	K	P	I	S	R	3	Q	A	Y	R	L	32	A	E	D	L	64	V	K	R	D	S	G	K	I	Q	D	3	I	G	T	H	2	R	K	T	F	G	Y	H	Y	K	K	T	Y	D	I	A	L	L	M	E	I	F	N	H	S	S	P	A	I	T	L	R	Y	I	G								
		230																																																																																									
hyptEntfaecium	TE	E	I	G	A	S	L	R	G	F	K	L	G	G																																																																													
intrecLbplantarum	ER	D	N	L	E	R	Q	L	W	D	F	K	L	G	V																																																																												
hyptBcereus	N	K	E	K	D	N	I	L	D	T	F	Q	I	--																																																																													
intrecCacetobutylicu	N	Q	E	Q	D	N	L	Y	S	L	V	Q	F	--																																																																													
intrecinvphBC6A52	N	Q	D	A	M	D	K	A	M	T	R	F	K	I	--																																																																												
intrecLambdaSa2	R	Q	D	E	L	D	T	K	M	S	N	F	S	L	--																																																																												
intrecSpyogenes	N	Q	E	R	I	D	D	A	V	A	D	F	S	L	--																																																																												
intrecCtetani	T	E	E	K	R	D	V	Y	L	H	S	N	L	G	--																																																																												
Consensus	n	#	e	d	f	l																																																																																					
Prim.cons.	NQ2	E	K	D	2	A	L	S	D	F	K	L	G	2																																																																													

### Annexe 6 : alignement des protéines homologues à la protéine de 197 aa putative codée par pAB10 (programme Multalin).

- hyptEntfaecium : protéine hypothétique d'Ent. faecium 1352
- intrecLbplantarum : intégrase / recombinase de Lb. plantarum WCFS1
- hyptBcereus : protéine hypothétique de B. cereus Tim-r01
- intrecCacetobutylicu : intégrase / recombinase de Clostridium acetobutylicum ATCC824
- intrecinvphBC6A52 : intégrase / recombinase / invertase de du bactériophage phBC6A52 de B. cereus
- intrecLambdaSa2 : intégrase / recombinase de du bactériophage LambdaSa2 de St. pyogenes 2603V/R
- intrecSpyogenes : intégrase / recombinase phagique putative de St. pyogenes SSI-1
- intrecCtetani : intégrase / recombinase de Clostridium tetani 1513



## ANNEXE 7

### Recherche d'homologies avec la séquence partielle de l'insert de pAB37 (fragment de *Pst*I / *Pst*I de 7 kb)

- ✓ Alignement des séquences nucléotiques de la région de pAB37 située en amont du premier cadre ouvert de lecture (query) et un portion du plasmide pSMB74 de *P. acidilactici* H (sbjct) (programme bastp 2 séquences)

Score = 274 bits (138), Expect = 2e-70  
Identities = 213/239 (89%), Gaps = 1/239 (0%)  
Strand = Plus / Minus

Query: 467 ttttaatgctcttatactnnnnnnntggactatTTTTgttcagtcCGTgaaatgaaagta 526  
||||| ||||||||||||| ||||||||||||| ||||||||||| ||||||||| ||  
Sbjct: 2701 ttttactgctcttatactaaaaaaatggactatTTTTtattcagtcCGTaaaatgaaaata 2642

Query: 527 taggagtatTTTTatgtcaattcgttattcacaagatTTTaaagattcactggTtaaact 586  
||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||| ||||||||| |  
Sbjct: 2641 taggagcattTTTTatgtcaattcgttattcacaagatTTTaaagattcattggTtaaatt 2582

Query: 587 tcaccaagaaggacgttaacttaaatcattggcagaggtatTTggccttcaaaagattc 646  
||||||||||| ||| ||||||||||||| ||| ||||| ||||||||| |||||  
Sbjct: 2581 tcaccaagaaggccgttcaacttaaatcattaacagaataattTggaccttcaaaatattc 2522

Query: 647 tattgctctTTgggtcaagcaattagaaaatcgtctcgctatt-tTggaggaagaaaac 704  
||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||| ||||||||||||| ||  
Sbjct: 2521 tattgctctTTgggtcaagcaattagaaaagcgtctcgctattTgtggaggaagaaaac 2463

- ✓ Alignement des séquences nucléotiques de la région de pAB37 située en amont du premier cadre ouvert de lecture (query) et un portion du plasmide pSRQ11 de *P. acidilactici* PAC1.0 (sbjct) (programme bastp 2 séquences)

Query: 467 ttttaatgctcttatactnnnnnnntggactatTTTTgttcagtcCGTgaaatgaaagta 526  
||||| ||||||||||||| ||||||||||||| ||||||||||| ||||||||| ||  
Sbjct: 507 ttttactgctcttatactaaaaaaatggactatTTTTtattcagtcCGTaaaatgaaaata 448

Query: 527 taggagtatTTTTatgtcaattcgttattcacaagatTTTaaagattcactggTtaaact 586  
||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||| ||||||||| |  
Sbjct: 447 taggagcattTTTTatgtcaattcgttattcacaagatTTTaaagattcattggTtaaatt 388

Query: 587 tcaccaagaaggacgttaacttaaatcattggcagaggtatTTggccttcaaaagattc 646  
||||||||||| ||| ||||||||||||| ||| ||||| ||||||||| |||||  
Sbjct: 387 tcaccaagaaggccgttcaacttaaatcattaacagaataattTggaccttcaaaatattc 328

Query: 647 tattgctctTTgggtcaagcaattagaaaatcgtctcgctatt-tTggaggaagaaaac 704  
||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||| ||||||||||||| ||  
Sbjct: 327 tattgctctTTgggtcaagcaattagaaaagcgtctcgctattTgtggaggaagaaaac 269



- ✓ Alignement des séquences protéique de la protéine de 82 aa putative codée par pAB37 (query) et YmqJ de *Lc. lactis* IL1403. *faecium* 1352 (sbjct) (programme bastp 2 séquences)

Score = 120 bits (301), Expect = 5e-27  
Identities = 51/80 (63%), Positives = 74/80 (92%)

Query: 3 IIWTLIVGAIIGAVAGALTSRGAAMGWISNILAGLIGSWLGESLLGNWGPSLAGMALVPS 62  
+IW+LIVGA+IG +AGA+T++G++MGWI+NILAGL+GS++G++LLG WGPSLAGMAL+PS  
Sbjct: 1 MIWTLIVGALIGLIAGAITNKGSSMGWIANILAGLVGSFVGQALLGTWGPSLAGMALIPS 60

Query: 63 VIGAVILVIVSWITTRIKH 82  
++GAVI+V +VS+ +R+ H  
Sbjct: 61 IVGAVIVVAVVSFFLSRMNH 80







## Résumé

L'adaptation aux variations de l'environnement est un phénomène essentiel à la survie et au développement des bactéries. Cette thèse a pour objet de comprendre les mécanismes de réponse au stress développés par *Pediococcus pentosaceus* et *Tetragenococcus halophila* (deux bactéries lactiques employées en tant que ferments dans l'industrie agroalimentaire). La première partie de ce travail a consisté à caractériser la réponse au stress salin chez *T. halophila* (caractérisation de l'ORF codant une perméase à glycine bêtaïne ; régulation de deux transporteurs de glycine bêtaïne par l'osmolarité extérieure) et à initier cette étude chez *P. pentosaceus* (tolérance au sel, spectre de solutés compatibles, équipement en transporteurs d'osmoprotectants). La seconde partie de cette thèse a été consacrée à l'étude des capacités d'adaptation de *P. pentosaceus* à différents types de stress (impacts du stress sur la croissance, la survie et la viabilité, influence d'un pré-stress sur les capacités d'adaptation de la souche, implication potentielle de ses deux plasmides natifs dans la réponse au stress).

**mots-clefs :** *Tetragenococcus halophila*, *Pediococcus pentosaceus*, osmoadaptation, transport de glycine bêtaïne, réponse au stress, adaptation et plasmide.

## Abstract

Adaptation to environmental stress is an essential process for bacterial survival and growth. This thesis contributes to a better understanding of the mechanisms of stress response developed by *Pediococcus pentosaceus* and *Tetragenococcus halophila* (two lactic acid bacteria used as starters in the food industry). The first part of this work was dedicated to the characterization of the salt stress response in *T. halophila* (characterization of the ORF encoding a secondary glycine betaine transport system, regulation of two glycine betaine transporters by the external osmolarity) and to begin this study on *P. pentosaceus* (salt tolerance, spectrum of compatible solutes, osmoprotectant transport systems). The second part of this thesis was devoted to the study of the ability of *P. pentosaceus* to adapt to different kind of stresses (impact of stress upon growth, survival and viability, development of stress protection induced by a primary stress, possible contribution of its two resident plasmids to the stress response).

**keywords:** *Tetragenococcus halophila*, *Pediococcus pentosaceus*, osmoadaptation, glycine betaine transport, stress response, adaptation and plasmid.