

N° d'ordre 826

THESE

Présentée devant

L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE

en vue de l'obtention du

DOCTORAT

Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries
Filière : Microbiologie et Biocatalyse industrielle

par

Sandy RAYNAUD

Maître ès sciences, Université Paul Sabatier, Toulouse
DEA de génétique et physiologie microbienne, Université Paul Sabatier, Toulouse

**REGULATION METABOLIQUE ET
TRANSCRIPTIONNELLE DE L'AUTOACIDIFICATION
CHEZ *LACTOCOCCUS LACTIS***

Soutenue le 6 Mars 2006 devant la commission d'examen

MM. GUZZO J.	Professeur, ENSBANA, Dijon
LINDLEY N.D.	Directeur de Recherche CNRS, INSA, Toulouse
LOUBIERE P.	Directeur de Recherche INRA, INSA, Toulouse
MONNET V.	Directeur de Recherche INRA, INRA Jouy en Josas
PERRIN R.	Chef de Service, SOREDAB, La Boissière Ecole

Cette thèse a été préparée au Laboratoire de biotechnologie-bioprocédés, UMR INSA/CNRS 5504, UMR INSA/INRA 792, du Département de Génie Biochimique et Alimentaire de l'INSA dans le cadre de l'Ecole Doctorale de Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries de Toulouse.

NOM : RAYNAUD

Prénom : Sandy

Titre : Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*.

Thèse de Doctorat, Spécialité : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries

Année : 2006

Lieu : Toulouse

N° d'ordre : 826

pages : 309

RESUME :

De nombreuses souches de la bactérie lactique *Lactococcus lactis*, différentes par leur cinétique d'acidification, sont utilisées comme levain dans l'industrie fromagère.

L'étude macro- et micro-cinétique comparative de plusieurs souches et conditions de culture, appuyée par une analyse statistique des résultats, a permis de proposer des explications quant à l'hétérogénéité des comportements acidifiants inter-souches. La croissance détermine la cinétique d'acidification, et deux phénotypes nutritionnels peuvent être distingués dans le lait écrémé, liés au caractère protéolytique ou non des souches. Néanmoins, pour les deux catégories de souches, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est particulièrement importante dans le contrôle du flux glycolytique en phase de croissance, et la phospho-fructokinase (PFK) et la phospho-glycérate kinase (PGK) le deviennent en phase de post-acidification. En absence de limitation nutritionnelle et à pH libre, il semble qu'une concentration critique d'acide lactique soit responsable de l'arrêt de croissance. Les données enzymatiques et énergétiques récoltées vont dans le sens d'une inhibition du flux glycolytique par une faible valeur de pH interne en fin de post-acidification.

Pour la première fois, une analyse combinée du transcriptome et du métabolisme d'une souche laitière de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* biovar *diacetylactis*, a été réalisée dans des conditions similaires à celles rencontrées au cours d'un procédé fromager, c'est-à-dire en lait écrémé, à pH libre, avec un refroidissement contrôlé du milieu. Au cours de la phase de croissance, le contrôle du flux glycolytique est partagé entre plusieurs enzymes, mais ce sont la PFK et certaines enzymes du métabolisme des phospho-glycérates qui sont impliquées en post-acidification. Ces résultats sont renforcés par les données transcriptomiques, qui permettent également de mettre en évidence des réponses spécifiques aux deux stress, ainsi que l'activation inattendue de voies apparemment non liées aux stress.

MOTS CLES :

Lactococcus lactis, acidification, métabolisme central, lait écrémé, stress thermique, stress acide, transcriptome

JURY :

MM. GUZZO J.	Professeur, ENSBANA, Dijon
LINDLEY N.D	Directeur de Recherche CNRS, INSA, Toulouse
LOUBIERE P.	Directeur de Recherche INRA, INSA, Toulouse
MONNET V.	Directeur de Recherche INRA, INRA Jouy en Josas
PERRIN R.	Chef de Service, SOREDAB, La Boissière Ecole

Soutenue le 6 Mars 2006 à l'INSA de Toulouse.

Cette thèse a été préparée au Laboratoire de Biotechnologie-Bioprocédés, UMR INSA/CNRS 5504, UMR INSA/INRA 792, du Département de Génie Biochimique et Alimentaire de l'INSA de Toulouse dans le cadre de l'Ecole Doctorale de Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries de Toulouse.

Je tiens à remercier de nombreuses personnes sans qui cette thèse n'aurait pu voir le jour.

Tout d'abord merci à Nic LINDLEY pour m'avoir accueilli dans son équipe puis dans le Laboratoire de Biotechnologies-Bioprocédés. Merci également à Daniel AURIOL d'avoir accepté de m'accueillir au sein du CRITT-Bioindustries. Toute ma gratitude à la société SOREDAB qui a financé ce travail, et tout particulièrement à Rémi PERRIN qui la suivi avec intérêt depuis le début.

Je tiens également à remercier Véronique MONNET et Jean GUZZO pour leur participation à mon jury de thèse, ainsi que pour avoir accepté de juger mon travail.

Merci à Pascal LOUBIERE de m'avoir accueilli au sein de l'équipe du Génie du métabolisme des procaryotes et de m'avoir permis de mener ce travail à bien, même si nous n'avons pas toujours été sur la même longueur d'onde tous les deux. Un merci tout particulier aux « spécialistes des puces à ADN », Muriel et Emma dont les conseils ont toujours été très précieux. Merci à l'équipe des lactiques, Myriam, Sophie, les deux Mathieu, pour leur aide et leur présence pendant ces années. Merci à Marie, Mylène et Olivier pour avoir égayé ces journées de travail pas toujours fructueuses ! Ne vous découragez pas vous voyez on y arrive !

Merci enfin à toute ma famille et mes amis pour leur soutien. Un gros merci en particulier à ma maman qui a toujours été convaincue que j'y arriverai et m'a soutenu même quand le moral n'était pas au beau fixe ! Merci enfin à mon Doudou pour avoir été là, m'avoir supporté pendant la phase de rédaction pas toujours facile et avoir toujours cru en moi ! Enfin, une pensée toute particulière pour ma mémé qui, je pense, aurait été fière que j'y sois arrivée....

Sommaire

Sommaire	7
Introduction.....	13
Chapitre I : Etude bibliographique.....	19
1. Les bactéries lactiques	21
1.1. Description et utilisation	21
1.2. Classification phylogénétique	23
1.3. Voies fermentaires générales du métabolisme carboné.....	25
1.3.1. Voie homofermentaire	26
1.3.2. Voie hétérofermentaire.....	26
2. Métabolisme de <i>Lactococcus lactis</i>	27
2.1. Métabolisme carboné chez <i>L. lactis</i>	27
2.1.1. Transport des sucres	27
2.1.1.1. Système perméase	28
2.1.1.2. Système PTS	29
2.1.2. Catabolisme des sucres	31
2.1.2.1. Métabolisme du glucose.....	31
2.1.2.2. Métabolisme du lactose.....	31
2.1.2.3. Métabolisme du citrate.....	33
2.1.2.4. Métabolisme des sucres en aval du pyruvate	34
(i) Métabolisme homolactique	34
(ii) Métabolisme mixte	35
(iii) Production d'arômes	35
2.1.3. Régulation du métabolisme des sucres.....	37
2.1.3.1. Régulation biochimique	37
(i) Régulation des systèmes de transport des sucres.....	37
a/ Compétition entre les sucres.....	38
b/ Exclusion et expulsion de l'inducteur	38
(ii) Régulation du métabolisme homolactique	39
(iii) Régulation du shift homolactique/mixte	41
2.1.3.2. Régulation génétique.....	43
(i) La répression catabolique	43
(ii) Autres modes de régulation transcriptionnelle	46
2.2. Métabolisme azoté chez <i>Lactococcus lactis</i>	47
2.2.1. Protéolyse et croissance sur lait	47
2.2.2. Catabolisme et transport des peptides	49
2.2.3. Catabolisme et transport des acides aminés	51
3. Le lait et les procédés de fabrication fromagers.....	55
3.1. Le lait	55
3.2. Le procédé fromager	57
3.3. Les grandes familles de fromages	59
4. <i>Lactococcus lactis</i> et le stress	62
4.1. Le stress acide	63
4.1.1. Mécanismes de résistance	64
4.1.1.1. L'expulsion de protons.....	64
4.1.1.2. Production de composés basiques	66
4.1.1.3. Réactions de décarboxylations et transports électrogéniques.....	67
4.1.2. Réponse adaptative au stress acide.....	69
4.2. Le stress hypothermique	71
4.2.1. Réponse adaptative au froid.....	71
4.2.2. Régulation des CSPs	72
4.3. Autres stress physico-chimiques	73
4.3.1. Stress osmotique	73
4.3.2. Stress oxydatif.....	77
4.3.3. Stress hyper-thermique.....	79
Chapitre II : Matériels et méthodes.....	81
1. Les Souches	83
2. Fermentations.....	84
2.1. Milieux de culture	84
2.2. Techniques de culture	86

2.2.1. Conservation des souches.....	86
2.2.2. Précultures.....	86
2.2.3. Cultures discontinues en fermenteurs.....	87
2.2.4. Cultures en CINAC.....	88
3. Techniques analytiques exo-cellulaires.....	89
3.1. Mesure de la biomasse.....	89
3.1.1. Turbidimétrie.....	89
3.1.2. Gravimétrie.....	89
3.2. Dosage des produits de fermentation.....	90
3.3. Volume intracellulaire.....	91
4. Mesure des activités enzymatiques.....	92
4.1. Enzymes de la glycolyse et du métabolisme central.....	92
4.1.1. Préparation des extraits cellulaires.....	92
4.1.2. Dosage des activités enzymatiques.....	92
4.1.3. Dosage des protéines des extraits.....	96
4.1.4. Calcul des activités spécifiques.....	97
4.2. Activité ATPase.....	97
4.2.1. Préparation de l'extrait.....	97
4.2.2. Dosage de l'activité ATPase.....	98
5. Mesure de la force protomotrice.....	99
5.1. Mesure du volume de culot lors de la centrifugation sur huile.....	99
5.2. Mesure de ΔpH et de $\Delta\Psi$	100
5.2.1. Détermination de ΔpH	100
5.2.2. Détermination de $\Delta\Psi$	101
6. Quantification des transcrits.....	102
6.1. Prélèvement et extraction de l'ARN total.....	103
6.2. Synthèse et purification des cDNA radiomarqués.....	104
6.3. Hybridation.....	104
6.4. Détection.....	105
6.5. Exploitation des données.....	105
Chapitre III : Contexte et problématique du sujet.....	107
Chapitre IV : Contrôle métabolique de l'acidification : résultats.....	117
1. Caractérisation macro-cinétique des souches LD61 et LD71.....	119
1.1. Cinétiques en lait écrémé.....	120
1.2. Cinétiques en milieu M17-lactose.....	123
1.3. Effet de l'environnement gazeux sur la croissance des souches LD61 et LD71.....	125
1.4. Effet de suppléments nutritionnelles sur la croissance des souches LD61 et LD71 en lait.....	129
1.5. Culture de la souche LD61 en lait, à pH régulé.....	133
2. Etude cinétique comparative de nouvelles souches.....	135
2.1. Souches non retenues.....	137
2.2. Cultures en « milieux lactés ».....	139
2.3. Analyse physiologique de l'acidification en milieu M17-lactose.....	143
2.3.1. Paramètres de fermentation.....	143
2.3.2. Activités enzymatiques.....	149
2.3.2.1. Activités spécifiques maximales des enzymes de la glycolyse et de la lactate déshydrogénase.....	149
2.3.2.2. Effet du pH sur les activités des enzymes de la glycolyse et sur la LDH.....	151
2.3.2.4. Activités réelles <i>in vivo</i> et limitation du flux glycolytique.....	154
2.3.2.4. Paramètres énergétiques.....	156
3. Analyse du contrôle de l'acidification pour la souche LD61.....	159
3.1. Effet de la croissance sur l'acidification.....	159
3.2. Effet de la vitesse d'acidification sur le profil fermentaire et la croissance.....	162
3.2.1. Données cinétiques et énergétiques.....	163
3.2.2. Données enzymatiques.....	167
4. Conclusion.....	171
Chapitre V : Contrôle métabolique de l'acidification : analyse statistique des résultats et discussion.....	173
1. Métabolisme carboné.....	176
1.1. Contrôle métabolique.....	176
1.2. Énergétique cellulaire.....	179
1.3. Métabolisme du citrate.....	185
2. Nutrition azotée et croissance.....	187

3. Effet de l'oxygène sur la croissance de <i>L. lactis</i>	190
4. Régulation de l'acidification	192
4.1. Contrôle de la V_{\max} d'acidification.....	193
4.2. Contrôle de l'arrêt de croissance à pH libre	197
4.3. Vitesse de post-acidification	201
4.4. Arrêt de la post-acidification et pH à 24 heures	203
4.4.1. Arrêt de croissance lié à la concentration d'acide lactique	205
4.4.2. Arrêt de croissance provoqué par une limitation nutritionnelle	206
5. Conclusion	208
Chapitre VI : Analyse métabolique et transcriptionnelle de <i>L. lactis</i> LD61 en condition de stress cumulés.....	211
1. Cinétique de fermentation	214
2. Activités enzymatiques	218
2.1. Activités maximales	218
2.2. Effet de la température sur l'activité des enzymes	220
2.3. Activités corrigées et étapes limitantes du flux glycolytique	222
3. Analyse transcriptionnelle.....	224
3.1. Présentation des clusters	226
3.2. Analyse fonctionnelle.....	227
3.2.1. Fonctions inconnues.....	229
3.2.2. Biosynthèse des acides aminés.....	230
3.2.3. Biosynthèse des cofacteurs, groupes prosthétiques et transporteurs	230
3.2.4. Enveloppe cellulaire	231
3.2.5. Processus cellulaires.....	231
3.2.6. Métabolisme central intermédiaire.....	231
3.2.7. Métabolisme énergétique	232
3.2.8. Métabolisme des acides gras et des phospholipides.....	233
3.2.9. Métabolisme des purines, pyrimidines, nucléosides et nucléotides	233
3.2.10. Fonctions régulatrices	234
3.2.11. Réplication	235
3.2.12. Transcription	235
3.2.13. Traduction	235
3.2.14. Transport et protéines de liaison	236
3.2.15. Autres catégories.....	236
3.2.16. Fonctions plasmidiques	237
4. Discussion	238
4.1. Le phénotype de la culture	238
4.2. Le catabolisme	239
4.3. L'anabolisme.....	243
4.4. Les réponses spécifiques aux stress acide et thermique	245
4.4. Les réponses croisées aux stress.....	249
4.5. Les réponses non liées aux stress	251
5. Conclusion	253
Conclusion et perspectives.....	257
Références bibliographiques	273
Symboles et abréviations	303
Publications et communications.....	307

Introduction

L'intérêt des bactéries lactiques dans l'industrie agroalimentaire réside principalement dans leur capacité à transformer certains sucres en lactate et ainsi à acidifier le milieu environnant. Il s'agit d'une caractéristique utilisée dans de nombreux procédés de transformation dont la fabrication fromagère. Les débuts du fromage furent probablement le fruit du hasard, et bien que l'origine précise soit inconnue, des découvertes archéologiques datent sa fabrication depuis les débuts de l'élevage il y a environ 10 000 ans. L'utilisation des levains lactiques est empirique puisque la découverte du fromage serait le résultat de l'observation de la coagulation du lait laissé à température ambiante, phénomène qui en plus est accentué par la chaleur. Le caillé ainsi formé était ensuite vraisemblablement égoutté dans des faisselles (les premières ont environ 7 000 ans) puis séché. L'homme s'est rapidement rendu compte qu'il s'agissait d'un moyen agréable de conserver le lait, aliment précieux et périssable.

Au 19^e siècle, les découvertes de Louis Pasteur et les différentes avancées technologiques font rapidement progresser l'industrie fromagère qui va alors produire en grandes quantités des produits artisanaux qui étaient confinés dans leurs terroirs. A partir du 20^e siècle, les fromages fermiers traditionnels persistent en laissant le marché de masse aux fromages modernes de fabrication industrielle.

Plus d'un millier de variétés de fromages sont répertoriées à travers le monde, et la France à elle seule en compte pas moins de 350. Avec plus de 18 millions de tonnes produites en 2004 (source FAOSTAT database, <http://www.fao.org/>), la fabrication fromagère se révèle être un enjeu économique important. Ainsi, les industriels s'orientent de plus en plus vers une rationalisation de l'utilisation de ces levains dans un souci de rentabilité, mais aussi d'amélioration de la maîtrise des phases de fabrication afin d'apporter plus de régularité à la qualité des produits.

La fabrication d'un fromage résulte d'un ensemble de phénomènes physico-chimiques et biochimiques de transformation du lait par une flore microbienne et/ou par l'action de présure. Les levains lactiques sont capables de fermenter les sucres en lactate entraînant la coagulation du lait, mais également de produire de nombreux autres composés comme des polysaccharides, des arômes ou encore des agents antibactériens (bactériocines). Ainsi, les fonctions technologiques résultant de l'action de ces micro-organismes touchent aussi bien la texture que les aspects organoleptiques, nutritionnels et sanitaires du produit fini, ainsi que sa conservation.

L'une des étapes cruciales de ce procédé est la coagulation du lait au cours de laquelle l'acidification doit suivre une cinétique précise (vitesse, pH final) afin d'obtenir un caillé, et donc un fromage, qui auront des caractéristiques définies. La sélection des levains, utilisés comme « starters » dans les fabrications fromagères, repose sur la caractérisation et la compréhension de leur comportement dans l'environnement particulier de leur mise en œuvre. Par conséquent, la connaissance approfondie des souches impliquées dans de tels procédés industriels est indispensable à la bonne maîtrise de ces derniers et permettra également la sélection de souches adaptées.

Les bactéries appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis* sont particulièrement intéressantes puisqu'elles entrent dans la composition de la quasi-totalité des levains fromagers. La rationalisation du procédé passe nécessairement par une meilleure compréhension de la physiologie cellulaire et du métabolisme carboné central de ces microorganismes. Différents modèles métaboliques sont déjà disponibles mais en général ils ne correspondent qu'à des conditions de « laboratoire » (milieux synthétiques, régulation du pH, souches particulières, utilisation de mutants) souvent très éloignées de ce que rencontrent les bactéries au cours des procédés industriels. Nous avons essayé de nous rapprocher des conditions et des problématiques fromagères en collaborant avec un industriel (Sorédab, groupe Bongrain) qui nous a, entre autre, fourni un panel de souches isolées de fromages.

Dans un premier temps, les souches sélectionnées ont été cinétiquement caractérisées sur différents milieux (lait écrémé, M17...). Des analyses physiologiques et métaboliques ont été réalisées au cours des fermentations des souches retenues. Ainsi, divers mécanismes de régulation concernant les quatre principaux points de la cinétique d'acidification fermentaire (vitesse maximale d'acidification, arrêt de la croissance, vitesse de post-acidification et pH final) ont été mis en évidence.

De nombreux génomes bactériens sont actuellement séquencés et les données sont disponibles dans le domaine public. *Lactococcus lactis* ne fait pas exception puisque la séquence de la souche ssp. *lactis* IL1403 est publiée depuis 2001 (Bolotin *et coll.*, 2001). Depuis, quelques études transcriptionnelles ont été réalisées sur la base du génome complet ou en ciblant plus particulièrement une voie métabolique. Cependant, ces études s'intéressent généralement à décortiquer l'effet de stress uniques (acide, thermique, carence carbone...) dans des conditions sans rapport avec l'usage industriel. Si les résultats obtenus nous renseignent sur les voies spécifiques mises en place en réponse à ces stress physico-chimiques, rien ne permet de dire si ce sont les mêmes qui sont induites au cours de la formation du caillé, ni quelles sont alors les conséquences sur le métabolisme et l'acidification de *Lactococcus lactis*.

Dans un deuxième temps, nous avons donc réalisé une étude complète et tout à fait originale de l'une des souches « industrielles » dans des conditions aussi proches que possible de celles rencontrées au cours d'un procédé fromager. La combinaison de deux des stress majoritairement rencontrés par les levains lactiques (autoacidification et baisse de température) est donc étudiée durant une fermentation en lait écrémé au cours de laquelle une analyse dynamique globale est réalisée (cinétique, métabolique, transcriptomique). La régulation du métabolisme central ainsi que les voies, spécifiques ou non, mises en place en réponse à ces stress sont analysées.

Pour clore ce manuscrit, une conclusion générale reprendra les principaux résultats obtenus, puis un ensemble de perspectives scientifiques envisageables seront discutées.

Chapitre I : Etude bibliographique

1. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes à Gram positif, non sporulants, non mobiles, anaérobis mais aérotolérants et ne possédant aucune catalase. Toutes les bactéries lactiques possèdent un métabolisme fermentaire leur permettant, en utilisant des sucres fermentescibles, de produire principalement de l'acide lactique mais aussi d'autres acides organiques (acide acétique, acide formique...).

1.1. Description et utilisation

Les caractéristiques métaboliques des bactéries lactiques en font des acteurs indispensables au cours des fermentations alimentaires. Leur première utilisation humaine pour la production de produits laitiers fermentés (fromage, yaourt, beurre) a été mise en évidence dans des textes archaïques datant de plus de 5000 ans retrouvés en Iraq (Teuber, 1993). Les bactéries lactiques sont classiquement impliquées dans un grand nombre de fermentations alimentaires, seules ou avec d'autres micro-organismes (transformation du lait, boissons fermentées, salaison, fermentation des végétaux), et sont également étroitement associées à l'environnement humain (Tableau I.1). Le principal atout de ces bactéries réside donc dans leur capacité à acidifier les produits alimentaires. L'acide lactique, qui est le produit principal du métabolisme fermentaire, joue un rôle majeur dans la conservation des aliments puisqu'il inhibe fortement la croissance des bactéries pathogènes à bas pH (Stiles, 1996). Il a également un rôle direct dans l'industrie laitière puisqu'il permet la formation du caillé à bas pH. Les bactéries lactiques participent également à la texture (production d'exopolysaccharides) et à la saveur des produits laitiers. Les arômes sont multiples, parfois indésirables (amines biogènes) et peuvent provenir d'origines diverses, soit du catabolisme des hydrates de carbone présents dans le lait (lactose, citrate...), soit du métabolisme des acides aminés ou encore des matières grasses.

Tableau I.1 : Utilisations des bactéries lactiques dans l'alimentaire et exemples des espèces utilisées prédominantes (d'après McKay et Baldwin, 1990)

Applications	Espèces utilisées
Fermentations de végétaux	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>
Fermentations de viandes et poissons	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>
Boissons alcoolisées	<i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Café et cacao	Bactéries lactiques variées
Sauce de soja	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Pediococcus soyae</i>
Aliments fermentés indigènes	Bactéries lactiques variées
Ensilage	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Probiotiques	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i>
Pain au levain	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i>
Biscuits	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus leichmannii</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus brevis</i>
Produits laitiers fermentés	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i>

De nos jours, les bactéries lactiques font l'objet de recherches intensives qui sont améliorées par la disponibilité de la séquence complète du génome de nombreuses bactéries lactiques : *Lactococcus lactis* IL1403 (Bolotin *et coll.*, 2001), *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (Kleerebezem *et coll.*, 2003), *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (Pridmore *et coll.*, 2004), *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Altermann *et coll.*, 2005). La production sans cesse en augmentation de produits laitiers fermentés et surtout de fromage, 18 millions de tonnes en 2004 alors que seulement 15 millions de tonnes étaient produites en 1999 (source statistique FAO), conduit aujourd'hui à une rationalisation indispensable de l'utilisation des ferments lactiques dans l'industrie. Les technologies laitières constituent le secteur principal d'application des bactéries lactiques. La compréhension de la physiologie de ces micro-

organismes contribue ainsi à un meilleur contrôle des procédés de même qu'à l'amélioration et à la diversification des qualités organoleptiques et texturales des produits laitiers fermentés. Pour cela diverses stratégies ont été mises en place, il s'agit tout d'abord d'une meilleure sélection des souches et leur utilisation en mélanges complexes dans des levains de culture. Une optimisation métabolique des souches a également été envisagée afin d'augmenter la production d'arômes (Ferain *et coll.*, 1996, Hols *et coll.*, 1999, Hugenholtz *et coll.*, 2000), de polysaccharides, de vitamines ou encore de la protéolyse des protéines du lait.

Les bactéries lactiques sont également impliquées dans de nouveaux types de produits en tant que « probiotiques ». Il s'agit de micro-organismes vivants qui une fois ingérés, vont conférer un effet physiologique bénéfique à leur hôte animal grâce à leurs propriétés microbiennes (Fuller, 1992). Les genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus* abritent des espèces considérées comme probiotiques (Fuller, 1991 ; Gordin et Gorbach, 1992). D'autres bactéries, qui ne colonisent pas naturellement le tractus digestif des mammifères, mais sont utilisées comme starters dans l'industrie laitière sont également considérées comme des probiotiques, *Lb. bulgaricus* et *St. thermophilus*.

Leur classification dans les probiotiques ainsi que parmi les microorganismes GRAS (Generally Regarded As Safe) fait de ces bactéries des acteurs potentiellement important dans les domaines de la médecine et de la santé : amélioration de la digestion du lactose, stimulation du système immunitaire, vecteurs de molécules à effets thérapeutiques...

1.2. Classification phylogénétique

Orla-Jensen en 1919 définit les bactéries lactiques comme un groupe de bactéries à Gram positif, non mobiles, asporogènes et fermentant les hydrates de carbone et certains alcools en lactate. Cependant, plus récemment, l'apport de nouvelles approches de taxonomie bactérienne (physiologie, génétique), a permis d'affiner cette classification (Schleifer, 1987 ; Vandamme *et coll.*, 1996).

Phylogénétiquement, les bactéries lactiques appartiennent à la branche clostridienne des bactéries à Gram positif. Elles sont dépourvues d'activité catalase et ce sont des coques, coccobacilles ou bâtonnets qui possèdent moins de 55 % de bases GC dans leur génome.

Ainsi, ces caractéristiques les éloignent des bifidobactéries longtemps considérées comme appartenant à ce groupe.

Les bactéries lactiques impliquées dans l'industrie alimentaire appartiennent à différents genres : *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Vandamme *et coll.*, 1996). Le genre *Lactococcus*, qui nous intéresse plus particulièrement, était autrefois apparenté aux streptocoques. Il s'agit donc de bactéries en forme de coques, regroupées ou non en chaînettes de longueurs variables. Elles présentent un métabolisme homolactique, aucune activité β -hémolytique, et sont mésophiles puisque leur température optimale de croissance est proche de 30°C. Ce sont les études de Schleifer *et coll.* (1985) qui ont justifié la création de ce nouveau genre bactérien regroupant la quasi-totalité des streptocoques du groupe N de la classification de Lancefield. Le genre *Lactococcus* inclut différentes espèces, *garviae*, *lactis*, *piscium*, *plantarum* et *raffinolactis*. L'espèce *lactis* regroupe elle-même trois sous-espèces, *cremoris*, *hordniae* et *lactis* qui elle-même comprend le biovar *diacetylactis*, capable de surproduire le diacétyl.

Les différentes sous-espèces de *Lactococcus lactis* peuvent être différenciées entre autre par leur résistance aux stress. Ainsi, la sous-espèce *lactis* est plus robuste que la *cremoris* puisqu'elle est capable de croître à 40°C, ou en présence de 4 % de NaCl. De plus, la sous-espèce *lactis* est capable de produire de l'ammoniac à partir d'arginine grâce à la voie de l'arginine déiminase (ADI) qui est très rare chez *cremoris*. Les bactéries du genre *lactis* sont les bactéries lactiques les plus importantes d'un point de vue commercial. Les habitats les plus importants des lactocoques demeurent le lait, les laits fermentés ainsi que les fromages où ils constituent la flore dominante. Cependant, on peut également les isoler des plantes (Sandine *et coll.*, 1972) ainsi que de la peau de certains animaux, et il semble que la contamination qui a lieu au cours de la traite ait pour origine principale le fourrage.

1.3. Voies fermentaires générales du métabolisme carboné

Les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres (Fig. I.1). Il s'agit des voies homofermentaire (Embden-Meyerhoff-Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate). Ainsi, les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes principaux d'espèces homo- ou hétérofermentaires selon la nature et la concentration des produits terminaux issus de la fermentation du glucose.

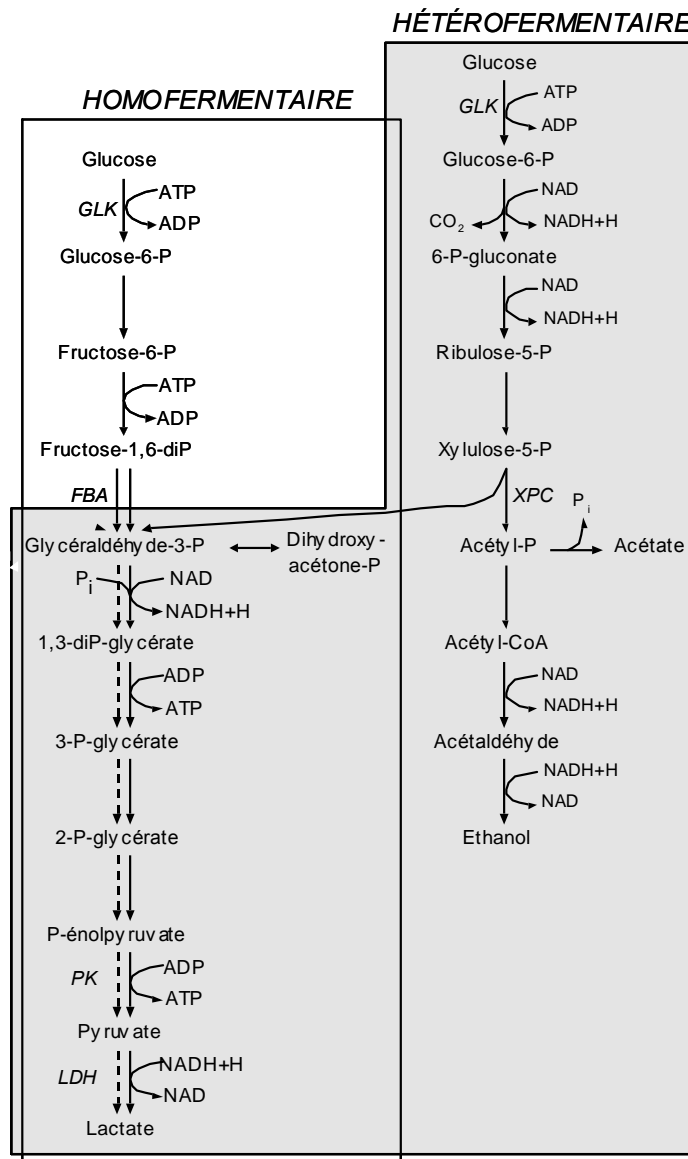


Figure I.1 : Voies homofermentaire et hétérofermentaire de la dégradation du glucose. Les principales enzymes sont indiquées en italique : *GLK* : glucokinase, *FBA* : fructose-1,6-bisphosphate aldolase, *XPC* : xylulose-5-phosphate phosphocétolase, *PK* : pyruvate kinase, *LDH* : lactate déshydrogénase.

1.3.1. Voie homofermentaire

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactocoques, pédiocoques, ainsi que certains lactobacilles. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée (Thompson et Gentry-Weeks, 1994). Des sucres autres que le glucose peuvent également être fermentés via cette voie : monosaccharides, disaccharides, hexitols. Ces micro-organismes présentent un métabolisme de type homolactique lorsque le lactate représente plus de 90 % des produits de fermentation. Dans certaines conditions de croissance (certains sucres, limitation carbone ...), le métabolisme de ces bactéries se diversifie vers un métabolisme mixte avec production en plus du lactate, de formiate, de CO₂, d'acétate et d'éthanol (Cocaign-Bousquet *et coll.*, 1996).

La fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA), est une enzyme clé présente chez toutes les espèces homofermentaires et indispensable au fonctionnement de la voie EMP. Cette enzyme catalyse la réaction menant à partir du fructose-1,6-bisphosphate (FBP) à deux molécules à 3 carbones, le dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) et le glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP).

1.3.2. Voie hétérofermentaire

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique (moins de 1,8 moles par mole de glucose), de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ sont dites hétérofermentaires (Thompson et Gentry-Weeks, 1994). Les groupes principaux de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les leuconostocs et certains lactobacilles. Ces microorganismes sont dépourvus d'une FBA, d'une triose-phosphate isomérase (TPI) ainsi que d'un système PTS fonctionnel. Dans ces conditions, le glucose est accumulé par l'intermédiaire d'un transport actif puis subit une phosphorylation intracellulaire par le biais d'une glucokinase (GLK) ATP-dépendante. Le glucose-6-phosphate emprunte ensuite la partie oxydative de la voie des pentoses-phosphate qui conduit à la formation de xylulose-5-phosphate. Le xylulose-5-phosphate est scindé en acétyl-phosphate et glycéraldéhyde-3-phosphate par la D-xylulose-5-phosphate phosphocétolase, enzyme spécifique à la voie hétérofermentaire. Enfin, l'acétyl-phosphate est converti en éthanol ou en acétate, et le GAP qui rejoint la glycolyse est métabolisé en acide lactique. Le métabolisme hétérofermentaire est

deux fois moins énergétique que le métabolisme homofermentaire puisqu'une mole de glucose conduit à la production d'une mole de lactate, d'éthanol, de CO₂ et d'un seul ATP.

2. Métabolisme de *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis est l'une des bactéries lactiques les plus étudiées. Son importance cruciale dans les procédés de fermentations alimentaires, ainsi que la disponibilité de ses séquences génomique et plasmidiques font de ce micro-organisme un modèle pour l'étude du métabolisme des bactéries lactiques ainsi que de leur comportement face à différents stress. Ce chapitre va aborder les deux types de métabolismes essentiels que sont le métabolisme carboné et le métabolisme azoté.

2.1. Métabolisme carboné chez *L. lactis*

L. lactis est une bactérie homofermentaire et mésophile. Son utilisation dans l'industrie alimentaire et plus particulièrement dans la fabrication du fromage la confronte à différentes sources de carbone. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux voies cataboliques impliquées dans l'utilisation du glucose, du lactose qui est la source de carbone principale du lait, et du citrate également présent en milieu laitier. Plusieurs phénomènes seront abordés, du transport de ces sucres aux voies de dégradation et à leurs mécanismes de régulation.

2.1.1. Transport des sucres

La membrane cytoplasmique des cellules est imperméable à de nombreux composés et peut donc entraver la pénétration des substrats utiles. Cette particularité est indispensable aux bactéries car une membrane exagérément perméable laisserait s'échapper des composants cellulaires précieux comme l'ATP, les nucléotides ou encore des intermédiaires métaboliques, de plus le maintien d'un potentiel membranaire deviendrait alors impossible. La membrane, structure hydrophobe, laisse donc pénétrer dans la cellule les composés apolaires par diffusion mais se révèle imperméable aux composés polaires hydratés comme les sucres.

Ainsi, l'entrée de ces derniers solutés nécessite la présence de systèmes de transport localisés au niveau de la membrane. Chez les bactéries, trois types de systèmes existent, primaire, secondaire, groupe de translocation (Poolman, 2002), mais deux sont particulièrement importants chez *L. lactis* : le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant (PTS), qui couple le transport et la phosphorylation du glucide (Postma *et coll.*, 1993), et le système perméase énergie-dépendant, qui fait pénétrer les sucres sous forme libre (Thompson, 1987, Konnings *et coll.*, 1994).

2.1.1.1. Système perméase

Ce système est basé sur la théorie chimiosmotique de Mitchell (1973). D'après ce concept, une enzyme membranaire (ATPase) couple l'hydrolyse de l'ATP à la sortie de protons générant ainsi un potentiel électrochimique de protons, appelé force protomotrice, à travers la membrane. Dans ce cas, le transport du sucre est couplé au mouvement de protons le long du gradient électrochimique, il s'agit donc d'un transport actif puisqu'il peut s'effectuer contre le gradient de concentration du sucre (Fig. I.2). Une fois à l'intérieur de la cellule, le substrat carboné est phosphorylé grâce à une kinase ATP-dépendante puis va être dégradé.

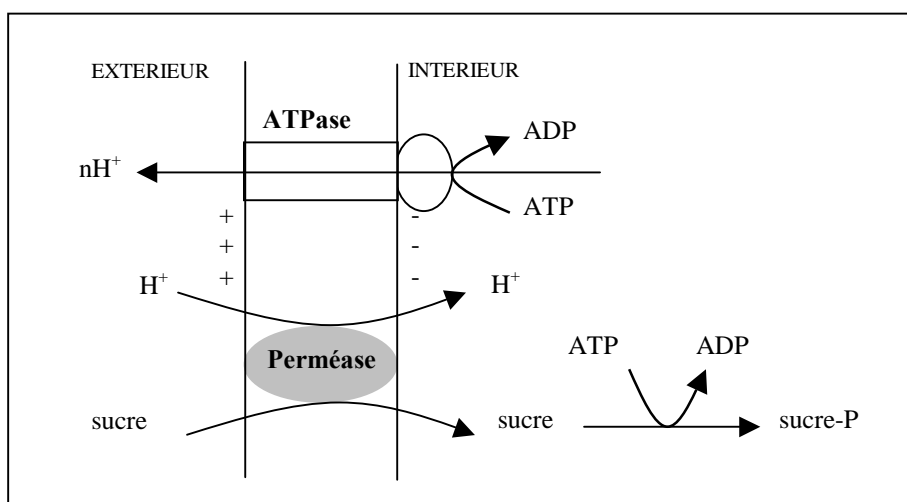


Figure I.2 : Système perméase.

2.1.1.2. Système PTS

Le système PTS (phosphotransférase PEP-dépendant) est impliqué dans le transport de divers hydrates de carbone chez les bactéries (Postma *et coll.*, 1993). Il s'agit d'un groupe de translocation qui catalyse de façon concomitante l'entrée du sucre dans la cellule ainsi que sa phosphorylation. Différentes protéines sont impliquées dans ce système, les deux protéines de couplage énergétique, l'enzyme I (EI) et HPr, sont communes à tous les systèmes, alors que les complexes « enzyme II » (EII^S) sont spécifiques du sucre et impliqués dans son transport (Meadow *et coll.*, 1990 ; Postma *et coll.*, 1993) (Fig. I.3). Chaque perméase EII est constituée de trois (IIA, B, C) ou quatre (IIA, B, C, D) domaines ou protéines selon le système (Reizer et Saier, 1997). Dans tous les cas, une suite de transferts du groupement phosphoryl du PEP vers le sucre s'effectue au sein du groupe de translocation. Le processus commence avec le transfert du groupement phosphoryl du PEP vers EI puis vers la protéine HPr. La protéine HPr phosphorylée sur son résidu His-15 catalyse la phosphorylation de EII. Les domaines EIIA et B, qui peuvent être cytoplasmiques ou liés à EIIC, transfèrent le groupement phosphoryl jusqu'au sucre.

Le système PTS semble énergétiquement plus favorable que les systèmes perméase, en effet, il couple entrée et phosphorylation du sucre avec la dépense d'une molécule de PEP, tandis que l'accumulation du sucre par un système non-PTS nécessite la dépense de plus d'un équivalent ATP car transport et phosphorylation ATP-dépendante sont physiquement séparés.

Le système PTS impliqué dans le transport du glucose chez *Lactococcus lactis* est en fait un PTS mannose (PTS^{man}) qui présente une forte affinité pour le glucose, le mannose, mais aussi le fructose et la glucosamine. Les gènes *ptnAB*, *ptnC* et *ptnD* codant pour ce système PTS ont été récemment identifiés sur le chromosome de la souche *L. lactis* IL1403 par Bolotin *et coll.* (2001). Le transport du glucose par les perméases est, lui, beaucoup moins étudié, et présente par ailleurs une affinité pour le glucose plus faible que celle du PTS (Cvitkovitch *et coll.*, 1995). Cependant, l'étude de mutants du PTS^{man} a révélé l'importance de ces transporteurs qui, dans de telles conditions, sont capables d'assurer la croissance sur glucose avec un flux d'entrée allant jusqu'à 80 % de ce qu'il aurait été avec un système PTS fonctionnel (Thompson *et coll.*, 1985 ; Garrigues, 1998).

Les *Lactococci* sont également capables de métaboliser le lactose, principal sucre du lait. Son entrée dans la cellule s'effectue, comme pour le glucose, via un système PTS spécifique ou une perméase (Crow et Thomas, 1984). Certaines souches utilisées comme starter dans l'industrie sont capables de fermenter rapidement ce sucre. Il a été suggéré, grâce à l'étude de ces souches, que le PTS-lactose est essentiel à une fermentation homolactique rapide de ce sucre du fait de la forte affinité du PTS^{lac} pour ce sucre ($K_m = 21 \mu\text{M}$) (Thompson, 1979) ainsi que de la faible dépense énergétique générée. Le système PTS^{lac} comprend deux composantes spécifiques du lactose, EII^{lac} localisée dans la membrane alors que EIII^{lac} est soluble (McKay *et coll.*, 1970). Lorsque le lactose est transporté par le système PTS^{lac} , il est phosphorylé en lactose-6-phosphate par la protéine EII^{lac} codée par les gènes *lacEF* (de Vos *et coll.*, 1990).

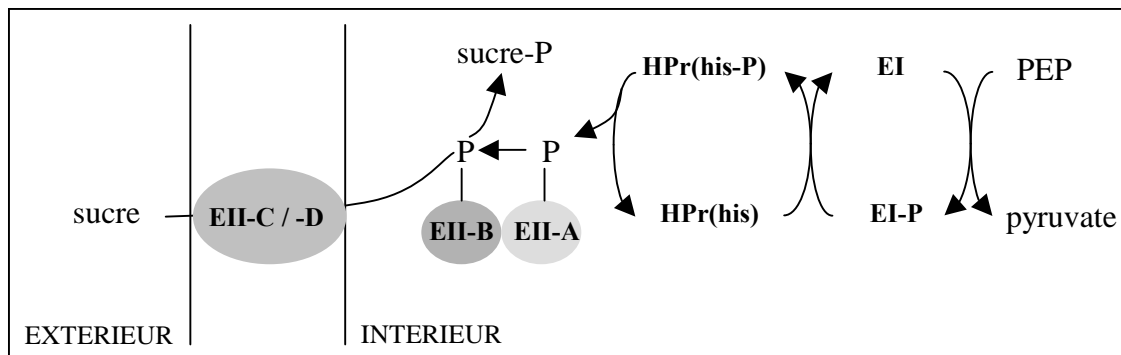


Figure I.3 : Système PTS (d'après Postma *et coll.*, 1993).

2.1.2. Catabolisme des sucres

2.1.2.1. Métabolisme du glucose

Une fois transporté à l'intérieur de la cellule, le glucose rejoint la glycolyse au niveau du glucose-6-phosphate (G6P), soit directement s'il entre grâce au PTS, soit après phosphorylation par la glucokinase (GLK) s'il a emprunté une perméase (Fig. I.4). Le sucre ainsi phosphorylé suit la glycolyse jusqu'au phosphoénolpyruvate (PEP) lui-même transformé en pyruvate par le biais de la pyruvate kinase (PK) ou du système PTS.

2.1.2.2. Métabolisme du lactose

Le lactose-6-phosphate intracellulaire issu du transport du lactose par le système PTS^{lac} est clivé en galactose-6-phosphate et glucose par la phospho- β -galactosidase (P β GAL, gène *lacG*). Le glucose, après phosphorylation par le PTS^{man} ou la GLK, emprunte la glycolyse tandis que le galactose-6-phosphate suit la voie du Tagatose qui elle-même rejoint la glycolyse au niveau des trioses-phosphate (de Vos *et coll.*, 1990 ; van Rooijen *et coll.*, 1991) (Fig. I.4).

Les souches de *L. lactis* qui fermentent lentement le lactose produisent généralement de nombreux produits finaux : acétate, formiate, éthanol et lactate (Farrow, 1980). Il a été montré que la souche NCDO2054, qui métabolise très lentement ce sucre le transporte via un système perméase (Crow et Thomas, 1984). Le lactose est ensuite clivé en glucose et en galactose par la β -galactosidase, le glucose emprunte la glycolyse, tandis que le galactose est dirigé vers la voie de Leloir qui rejoint la glycolyse au niveau du G6P (Bissette et Anderson, 1974 ; Thomas *et coll.*, 1980) (Fig. I.4).

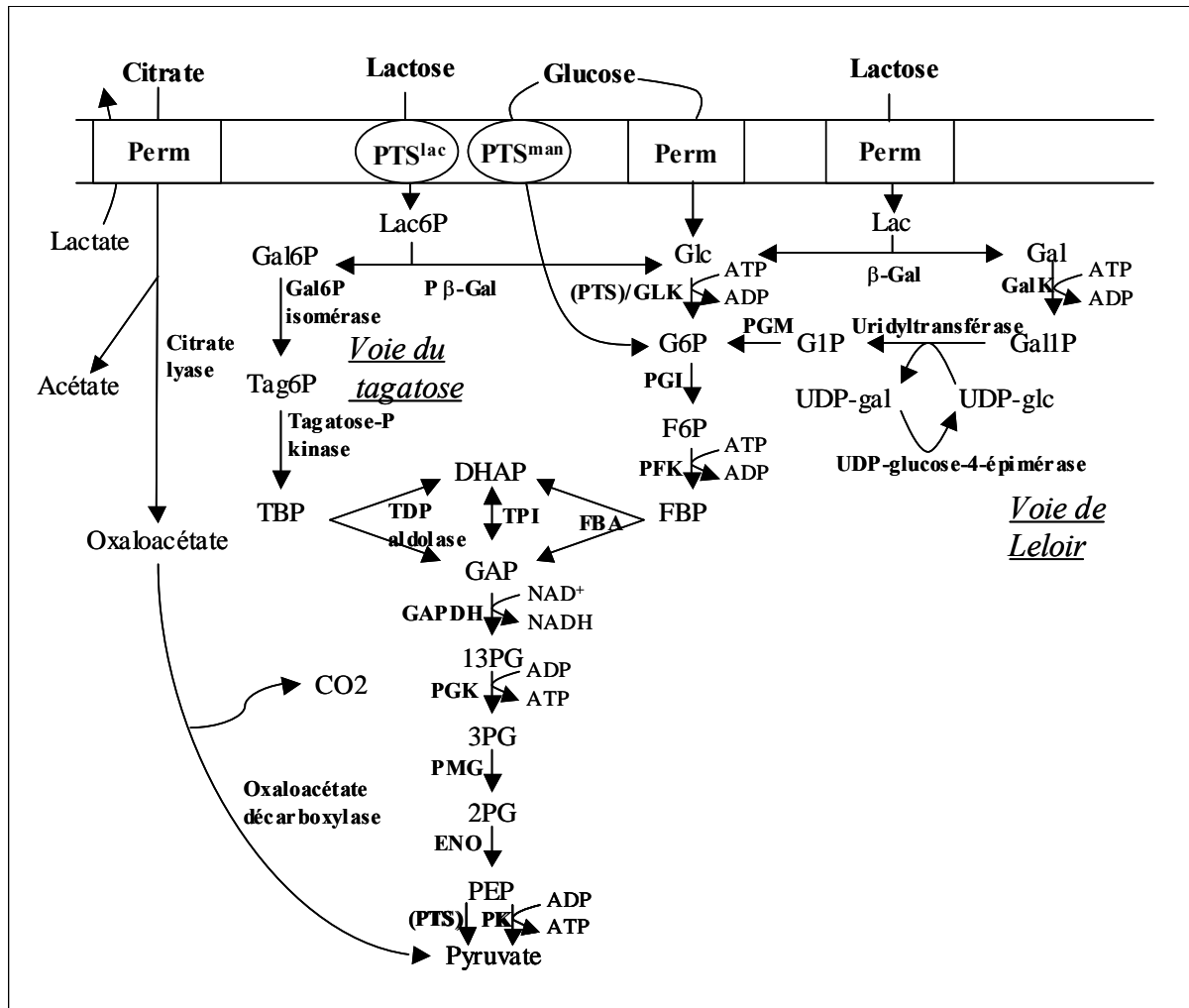


Figure I.4 : Métabolisme du glucose, du lactose et du citrate en amont du pyruvate.

Glc : glucose, G6P : glucose-6-phosphate, G1P : glucose-1-phosphate, F6P : fructose-6-phosphate, FBP : fructose-1,6-bisphosphate, DHAP, dihydroxyacétone-phosphate, GAP : glyceraldéhyde-3-phosphate, 1,3PG : 1,3-diphosphoglycérate, 3PG : 3-phosphoglycérate, 2PG : 2-phosphoglycérate, PEP : phosphoenolpyruvate, Lac : lactose, Lac6P : lactose-6-phosphate, Gal : galactose, Gal6P : galactose-6-phosphate, Gal1P : galactose-1-phosphate, Tag6P : tagatose-6-phosphate, TBP : tagatose-1,6-bisphosphate, GLK : glucokinase, PGI : glucose-6-phosphate isomérase, PFK : phosphofructokinase, FBA : fructose-1,6-bisphosphate aldolase, TPI : triose-phosphate isomérase, GAPDH : glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase, PGK : phosphoglycérate kinase, PMG : phosphoglycérate mutase, ENO : énolese, PK : pyruvate kinase, β-Gal : β galactosidase, GalK : galactokinase, PGM : phosphoglucomutase, P β-Gal : phospho β-galactosidase.

2.1.2.3. Métabolisme du citrate

De nombreux auteurs ont montré la dégradation totale ou partielle de l'acide citrique pendant la fermentation lactique de différents milieux par des espèces appartenant notamment au genre *Lactococcus*. Kempler et Mc Kay (1979) ont montré que la capacité de transport du citrate est liée à la présence d'un plasmide de 7,9 Kb chez toutes les souches analysées fermentant le citrate, qui appartiennent donc au biovar *diacetylactis*. Le citrate est transporté par le biais d'une perméase protonique (Konings *et coll.*, 1989) codée par le gène *citP* inclus dans l'opéron *citQRP* plasmidique (Lopez de Felipe *et coll.*, 1995). Le métabolisme du citrate est, chez *Lactococcus lactis* et *Leuconostoc*, une voie secondaire de production de force promotrice (FPM) puisque la forme anionique de l'acide est transportée dans la cellule par une perméase pouvant coupler cette entrée à la sortie du produit final essentiel du catabolisme qui est le lactate (Marty-Teysset *et coll.*, 1995). En absence de glucose ou de lactate, lorsque le citrate est la seule source de carbone, CitP peut fonctionner comme transporteur symport avec un proton. Dans ces conditions une PMF va également être générée, mais le système reste plus efficace lorsque c'est le lactate qui est échangé avec le citrate (Marty-Teysset *et coll.*, 1995 ; Magni *et coll.*, 1999).

Une fois dans la cellule, le citrate est scindé en acétate et oxaloacétate par la citrate lyase (gène *citE*). L'oxaloacétate va ensuite être décarboxylé en pyruvate par l'oxaloacétate synthase (gène *citF*) (Fig. I.4). Les deux enzymes impliquées dans cette voie métabolique sont codées par des gènes chromosomiques, et leur activité bien que constitutive chez les souches appartenant au biovar *diacetylactis*, augmente en condition de stress acide (Hugenholtz, 1993 ; Magni *et coll.*, 1999). Des études transcriptomiques récentes ont révélé l'induction de l'expression de ces gènes chromosomiques (*citE* et *citF*) en réponse à certains stress (stress acide et carence carbone), et ceci malgré que la souche IL1403 étudiée soit dépourvue du plasmide citrate et donc du transporteur CitP (Xie *et coll.*, 2004 ; Redon *et coll.*, 2005). L'existence d'un autre système de transport, spécifique ou non du citrate, paraît envisageable.

Les bactéries lactiques qui métabolisent le citrate jouent un rôle important dans de nombreux procédés laitiers car, dans ces bactéries, le co-métabolisme du citrate et du lactose entraîne la production de diacétyle, d'acétoïne et de CO₂ participant aux qualités aromatiques et texturales des produits.

2.1.2.4. Métabolisme des sucres en aval du pyruvate

(i) Métabolisme homolactique

Les lactocoques sont considérés comme des microorganismes homolactiques puisque, généralement, ils convertissent plus de 90 % du pyruvate produit en acide lactique. Le pyruvate est un intermédiaire métabolique clé chez les bactéries lactiques et d'ailleurs, sa production ainsi que sa conversion sont l'objet d'une régulation fine. La glycolyse génère de l'ATP qui est indispensable aux voies de biosynthèse, mais aussi du NADH. Chez les organismes «respirant», le recyclage de ce coenzyme est réalisé grâce à l'activité respiratoire. Les *lactococci* sont anaérobies et dépourvus de chaîne respiratoire, la réduction du NADH pourra donc être effectuée par la lactate déshydrogénase (LDH) qui transforme le pyruvate en acide lactique (Fig. I.5).

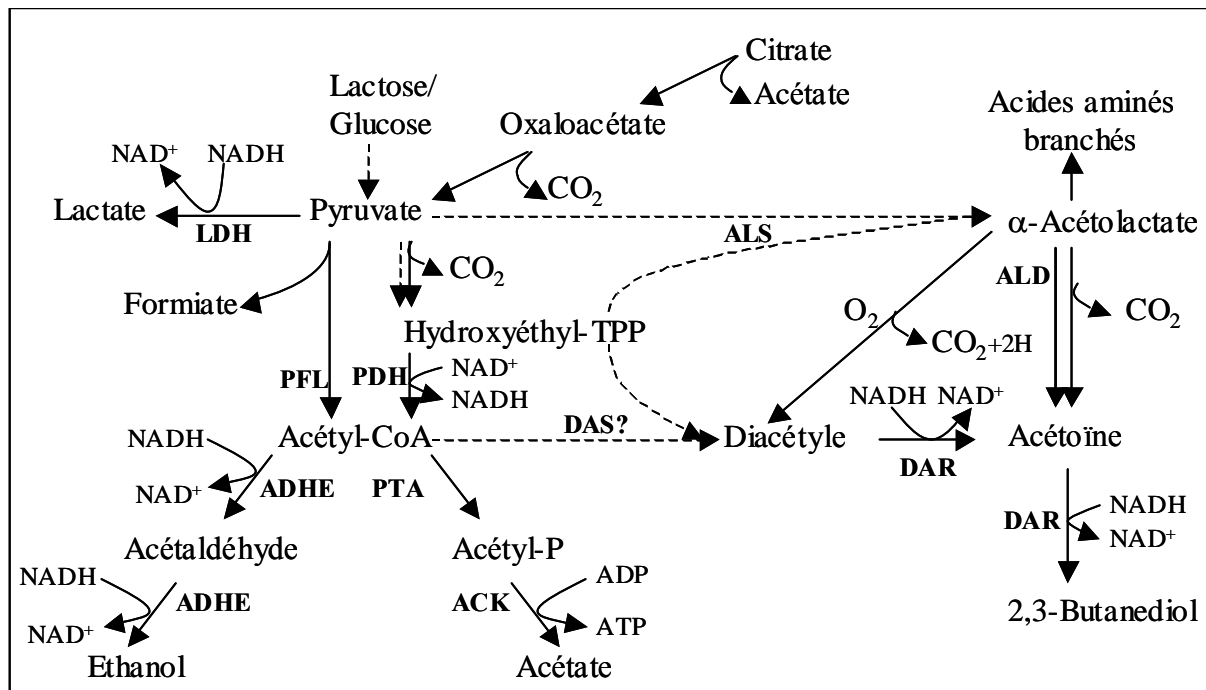


Figure I.5 : Métabolisme du pyruvate.

LDH : lactate déshydrogénase, PFL : pyruvate formiate lyase, PDH : pyruvate deshydrogénase, PTA : phosphotransacétylase, ACK : acétate kinase, ADHE : alcool deshydrogénase, ALS : α-acétolactate synthase, ALD : α-acétolactate décarboxylase, DAS : diacétyle synthase, DAR : diacétyle-acétoïne réductase.

(ii) Métabolisme mixte

Au cours du métabolisme mixte, les sucres qui empruntent la glycolyse continuent à générer du pyruvate mais le flux à travers la LDH est fortement diminué. Le pyruvate est alors métabolisé par la pyruvate formiate lyase (PFL) ou la pyruvate déshydrogénase (PDH) en acétyl-CoA avec formation respectivement, de formiate ou de CO₂ (Fig. I.5). En condition anaérobie, l'activité PFL est détectée, ce qui n'est pas le cas en condition d'aérobiose car cette enzyme est très sensible à l'oxygène (Takahashi *et coll.*, 1982 ; Abbe *et coll.*, 1982). Cette enzyme qui transforme le pyruvate en formiate et acétyl-CoA est également inhibée par le GAP et le DHAP (Thomas *et coll.*, 1980 ; Takahashi *et coll.*, 1982). La réaction de décarboxylation du pyruvate est réalisée par la PDH qui permet de générer, outre du CO₂ et de l'acétyl-CoA, un autre coenzyme réduit (Fig. I.5). Chez *Lactococcus lactis*, cette enzyme est faiblement exprimée et rapidement inactivée en anaérobiose (Snoep *et coll.*, 1993) et semble sensible au potentiel redox ainsi qu'au ratio NADH/NAD (Snoep *et coll.*, 1992).

La métabolisation de l'acétyl-CoA implique soit la phosphotransacétylase (PTA) et l'acétate kinase (ACK) avec formation d'acétate, soit l'alcool déshydrogénase (ADHE) avec production d'éthanol. Si la voie de l'acétate permet la synthèse d'une molécule supplémentaire d'ATP, celle de l'éthanol permet, elle, le recyclage de deux molécules de NADH. Ainsi, lorsque la PFL est employée, un équilibre réducteur peut être obtenu par la répartition équimolaire entre la production d'acétate et d'éthanol, permettant ainsi également un gain net en ATP de 50 % par rapport au métabolisme homofermentaire.

(iii) Production d'arômes

Certaines espèces de bactéries lactiques utilisées dans l'industrie laitière, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, sont dites aromatiques puisqu'elles sont capables, à partir du pyruvate, de synthétiser divers composés responsables des arômes des produits laitiers : diacétyl, acétoïne, 2,3-butanediol et α -acétolactate.

L' α -acétolactate est formé à partir de deux molécules de pyruvate par l' α -acétolactate synthase. Ce composé est instable et peut être décarboxylé soit chimiquement en présence d'oxygène en diacétyl, soit enzymatiquement par l' α -acétolactate décarboxylase en acétoïne.

Deux activités α -acétolactate synthase ont été identifiées chez *Lactococcus lactis*, l'enzyme catabolique codée par le gène *als*, présente une constante d'affinité pour le pyruvate de 50 mM (Snoep *et coll.*, 1992), supérieure à celle de l'enzyme anabolique codée par *ilvBN* ($K_m = 8,3$ mM) (Godon *et coll.*, 1992 ; 1993 ; Benson *et coll.*, 1996). L'acétoïne peut donc être produit à partir de l' α -acétolactate ou du diacétyle. La diacétyle synthase permet la formation de diacétyle à partir de l'acétyl-CoA puis la diacétyle-acétoïne réductase va catalyser la réduction successive du diacétyle en acétoïne et de l'acétoïne en 2,3-butanediol avec génération d'une mole de NAD^+ à chaque étape.

La diacétyle synthase est une enzyme très controversée, mise en évidence chez *Lactococcus lactis* par Kaneko *et coll.* (1990) dans des conditions particulières (fortes concentrations de cuivre, traitement thermique de l'extrait), Jordan *et coll.* (1996) n'ont eux détecté aucune activité chez *Leuconostoc lactis*, bactérie pourtant très proche de *Lactococcus*, soit à cause de son absence, soit à cause de son instabilité ou d'un dosage non optimal. Il semble que chez *Leuconostoc* et *Lactococcus*, la décarboxylation spontanée de l' α -acétolactate ne puisse expliquer seule la production de diacétyle, et l'existence d'une enzyme catalysant cette réaction est envisagée (Jordan *et coll.*, 1996 ; Aymes *et coll.*, 1999).

Les niveaux d'acétoïne et de diacétyle augmentent en aérobiose du fait de l'augmentation de l'activité de l' α -acétolactate synthase et de la NADH oxydase (Snoep *et coll.*, 1992 ; Bassit *et coll.*, 1993) ou de la diminution de celle de la pyruvate-formiate lyase lors du métabolisme du citrate par *L. lactis* biovar *diacetylactis* (Starrenburg *et Hugenholtz*, 1991).

2.1.3. Régulation du métabolisme des sucres

Pour leur croissance, les bactéries lactiques ont besoin d'un apport énergétique obtenu par la fermentation des sucres. Ce phénomène implique trois étapes, tout d'abord le transport du sucre à l'intérieur de la cellule, son catabolisme par une voie productrice d'ATP et enfin l'expulsion des produits finaux du catabolisme souvent acides. En conditions optimales de croissance, il existe un couplage énergétique entre anabolisme et catabolisme, de plus les trois étapes de ce processus doivent être régulées de façon coordonnée afin d'assurer une accumulation du sucre proportionnelle à son catabolisme. De plus, la cellule peut présenter des profils fermentaires différents en fonction des contraintes nutritionnelles. Cette capacité d'adaptation met en œuvre divers mécanismes de régulation qui peuvent être classés en deux groupes, tout d'abord les mécanismes rapides de type allostérique, puis les mécanismes plus lents impliquant des modulations de l'expression des gènes.

2.1.3.1. Régulation biochimique

Ce type de régulation est nécessaire à une réponse rapide du métabolisme à des modifications des conditions environnementales. Ces mécanismes de régulation fine permettent de moduler les activités des enzymes déjà présentes et de réguler le flux des produits au niveau des diverses voies métaboliques en réponse à des variations de concentration de substrats ou d'effecteurs allostériques.

(i) Régulation des systèmes de transport des sucres

La première étape de l'utilisation des sucres requiert leur transport dans la cellule. En présence d'un mélange de sucres dans le milieu, l'un rapidement métabolisable (glucose) et l'autre non, il a été montré chez de nombreuses bactéries un comportement de type diauxique (Epstein *et coll.*, 1966 ; Liberman et Bleiweis, 1984). En effet, la bactérie va d'abord métaboliser le sucre dit « rapide », puis le sucre dit « lent », ce qui suggère une utilisation préférentielle du substrat à consommation rapide par rapport à l'autre. Les mécanismes de régulation allostériques intervenant dans ces phénomènes sont de deux types, tout d'abord un phénomène de compétition au niveau des transporteurs, puis les mécanismes d'exclusion et d'expulsion de l'inducteur.

a/ Compétition entre les sucres

Le transport préférentiel d'un sucre par rapport à un autre peut être favorisé par une différence d'affinité pour une même protéine EII^S spécifique, ou par la compétition de différentes protéines EII^S pour le donneur commun de groupement phosphoryl HPr-P (Thompson *et coll.*, 1978 ; Thompson et Saier, 1981 ; Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

b/ Exclusion et expulsion de l'inducteur

Deux mécanismes de régulation du métabolisme carboné ont été mis en évidence chez les bactéries lactiques, et ils impliquent tous deux la protéine HPr-P. Il s'agit des mécanismes d'exclusion et d'expulsion de l'inducteur, qui n'ont d'ailleurs pas été détectés chez d'autres bactéries à Gram positif à bas pourcentage en GC (Saier *et coll.*, 1996 ; Viana *et coll.*, 2000).

Le mécanisme d'exclusion de l'inducteur a pour but d'empêcher l'entrée d'un sucre ou la formation d'inducteurs de gènes cataboliques par inhibition allostérique d'un transporteur de type PTS ou perméase (Saier, 1989 ; Saier *et coll.*, 1996). En plus du site de phosphorylation au niveau du résidu His-15, un second site a été identifié au niveau du résidu Ser-46 de la protéine HPr et sa fonction n'a été montrée que chez les bactéries Gram⁺. La phosphorylation à ce site est catalysée par une protéine kinase/phosphatase ATP-dépendante (HPr K/P) activée par le FBP et inhibée par le Pi (Deutscher et Saier, 1983 ; Saier *et coll.*, 1996). La forme phosphorylée HPr(Ser)-P, qui ne peut être utilisée pour la phosphorylation des sucres, est capable d'interagir avec certaines perméases PTS et non-PTS pour bloquer l'entrée d'inducteurs (Saier *et coll.*, 1996). C'est l'étude de différents mutants qui a révélé l'implication de HPr(Ser)-P dans cette inhibition allostérique (Viana *et coll.*, 2000 ; Dossonnet *et coll.*, 2000 ; Monedero *et coll.*, 2001). Ainsi, la formation de HPr(Ser)-P est dépendante de l'entrée d'un sucre métabolisable et du fonctionnement de la glycolyse (Reizer *et coll.*, 1983). Lorsqu'une bactérie est en état de carence en carbone, les bas niveaux de FBP et ATP ainsi que les niveaux élevés de Pi activent l'activité HPr-phosphatase permettant la phosphorylation sur le résidu His-15 (Mason *et coll.*, 1981 ; Thompson et Torchia, 1984). La métabolisation d'un sucre comme le glucose va entraîner une augmentation des concentrations intracellulaires de FBP et d'ATP, ainsi qu'une diminution de celles de Pi stimulant ainsi l'activité HPr-kinase. La phosphorylation de la protéine HPr au niveau du résidu Ser-46 va alors bloquer l'entrée de certains sucres au niveau des transporteurs, de même que leur phosphorylation puisqu'un seul des deux sites de la protéine HPr peut-être phosphorylé à la fois.

Le second mécanisme de régulation appelé expulsion de l'inducteur est un procédé en deux étapes qui entraîne, en présence d'un sucre rapidement métabolisable, la déphosphorylation du sucre-phosphate non préférentiel qui a été préalablement internalisé, puis son expulsion vers le milieu extérieur (Reizer *et coll.*, 1983 ; Reizer et Saier, 1983). Là encore, certaines observations suggèrent l'implication de la protéine HPr(Ser)-P dans ce mécanisme chez *L. lactis* (Ye *et coll.*, 1994) puisqu'elle semble activer une sucre-P phosphohydrolase intracellulaire (Wittekind *et coll.*, 1989 ; Ye et Saier, 1995). Cependant, des études réalisées *in vivo* chez *Lb. casei* (Dossonnet *et coll.*, 2000), *Lb. brevis* (Djordjevic *et coll.*, 2001) et *L. lactis* (Monedero *et coll.*, 2001) ne confirment pas le rôle direct de HPr(Ser)-P dont la présence n'est pas essentielle à la mise en place de ce système, mais suggèrent plutôt un rôle indirect dans cette régulation.

(ii) Régulation du métabolisme homolactique

De nombreuses études métaboliques ont permis de définir l'implication de certaines enzymes dans le contrôle du flux catabolique chez *Lactococcus lactis*. Le développement récent d'outils génétiques, comme les systèmes d'expression inductibles par la nisine (Kuipers *et coll.*, 1997), permet, via la modulation de l'expression de gènes codant entre autre pour des enzymes glycolytiques, de compléter et vérifier les résultats issus des analyses métaboliques. Ainsi, en fonction des souches, des conditions de culture et des techniques d'analyses utilisées, les conclusions obtenues sont souvent très différentes. Il semble tout de même que la GAPDH, ainsi que la PFK, la PK et la LDH, toutes trois codées au niveau de l'opéron *las* (Llanos *et coll.*, 1993) soient des enzymes particulièrement importantes dans le contrôle du flux glycolytique.

La GAPDH, dont l'activité est fortement dépendante du ratio NADH/NAD⁺ puisqu'une valeur élevée l'inhibe (Even *et coll.*, 1999), semble exercer une influence majeure sur le contrôle du métabolisme homolactique de différentes souches. En effet, les niveaux élevés de GAP et DHAP observés *in vivo* pour la souche NCDO 2118 prouvent l'implication de cette enzyme (Garrigues *et coll.*, 1997). De plus, Poolman *et coll.* (1987a) ainsi que Even *et coll.* (1999) ont montré, en modulant l'activité de cette enzyme *in vivo*, un fort coefficient de contrôle du flux (0,9 et 0,3 respectivement). Cependant, ces résultats sont controversés. Une étude réalisée par Solem *et coll.* (2003) donne un coefficient de contrôle nul pour cette

enzyme. En effet, des mutants de la souche MG 1363 présentant différents niveaux d'activités pour la GAPDH (14 à 210 % de l'activité de la souche de référence) ne permettent pas de modifier, ou très peu, le flux glycolytique. De même, Neves *et coll.* (2002) ont montré en l'absence de croissance, pour un mutant *ldh⁻* de la souche MG1363, que la GAPDH est capable d'assurer le flux glycolytique. Les deux premières études sont réalisées avec des cellules non prolifératives ou en présence d'inhibiteur, peut-être peu spécifique, ce qui peut avoir conduit à une sur-estimation du coefficient de contrôle. De plus, des conditions de cultures et des souches différentes dans chacune de ces études pourraient expliquer l'implication, ou non, de la GAPDH dans le contrôle du flux glycolytique.

Les hauts niveaux de PEP observés au cours de cultures réalisées avec la souche *L. lactis ssp. lactis* ATCC 7962 en chémostat ou en carence en carbone suggèrent l'implication de la PK dans la régulation du flux (Thompson et Thomas, 1977 ; Mason *et coll.*, 1981 ; Poolman *et coll.*, 1987e). Cette enzyme est activée par différents métabolites (FBP, G6P, F6P, Tag6P, Gal6P...) qui augmentent son affinité pour le PEP, alors que l'ATP et le Pi qui activent le système PTS inhibent la PK. Le FBP est également un activateur allostérique de la LDH, ce métabolite joue probablement un rôle important dans la régulation du métabolisme de *L. lactis* (Thompson, 1987). En effet, lors d'une fermentation homolactique, l'activation de la PK et de la LDH par un haut niveau de FBP dirigerait le flux vers la production de lactate. De même, la PFK semble impliquée dans le contrôle catabolique de la souche *L. lactis ssp. cremoris* MG 1363, puisqu'une diminution de son activité entraîne une baisse du flux glycolytique sur substrat glucose (Andersen *et coll.*, 2001). Les différentes études réalisées par la suite ont porté sur la modulation de l'expression des gènes de l'opéron *las*, afin de vérifier l'existence d'un contrôle par ces enzymes. Ainsi, la sur-expression du gène codant pour la PK (x15) n'a pas permis de diminuer significativement les concentrations intracellulaires en FBP, sauf en condition de carence carbone (Ramos *et coll.*, 2004). Les expériences d'ingénierie métabolique réalisées par Koebman *et coll.* (2002 ; 2005) sur la souche MG1363, leur ont permis de conclure que lorsque le flux glycolytique est important, ni la GAPDH, ni aucune des trois enzymes appartenant à l'opéron *las*, n'exerce de contrôle sur le flux. Il semble par contre que la PFK et la PK exercent un fort contrôle positif sur le flux lorsque leur activité est réduite.

Quand le flux glycolytique est faible, le contrôle se situe alors plutôt dans la partie supérieure des voies cataboliques, c'est-à-dire plus au niveau du transport qu'à celui des enzymes de la glycolyse. En effet, lorsque la souche IL 1403 est cultivée sur substrat glucose, la limitation semble s'effectuer au niveau du transport puisque les concentrations en intermédiaires métaboliques sont faibles et les concentrations des enzymes de la glycolyse élevées (Even *et coll.*, 2001).

Suite à toutes ces études, les auteurs s'orientent de plus en plus vers un modèle de contrôle distribué entre différentes étapes de la glycolyse, voire même en combinaison avec les voies consommatrices d'ATP (ATPase) et les systèmes de transport des sucres (Koebman *et coll.*, 2002 ; Neves *et coll.*, 2005).

(iii) Régulation du shift homolactique/mixte

Lorsque la croissance s'effectue en présence d'une source de carbone rapidement métabolisée, le flux glycolytique est élevé et le métabolisme homolactique. Par contre, lorsque le taux de croissance est faible, lors de cultures en chémostat en limitation de carbone ou lorsque le sucre présent est métabolisé lentement comme le galactose (Thomas *et coll.*, 1979 ; 1980), le maltose (Lohmeier-Vogel *et coll.*, 1986 ; Snoep *et coll.*, 1992) ou les pentoses (Kandler, 1983), un shift s'opère vers le métabolisme mixte. Un tel phénomène est dû à une diminution de l'activité de la LDH avec parallèlement une augmentation de celle de la PFL en anaérobiose ou de celle de la PDH en condition d'aérobiose, les activités de ces trois enzymes étant soumises à un contrôle par le ratio NADH/NAD^+ chez la souche NCDO 2118 (Garrigues *et coll.*, 1997).

Ainsi, lorsque le flux glycolytique est élevé, le ratio NADH/NAD^+ l'est également résultant en l'activation de la LDH et l'inhibition de la GAPDH dont l'activité est alors juste suffisante pour assurer le flux (Fig. I.6).

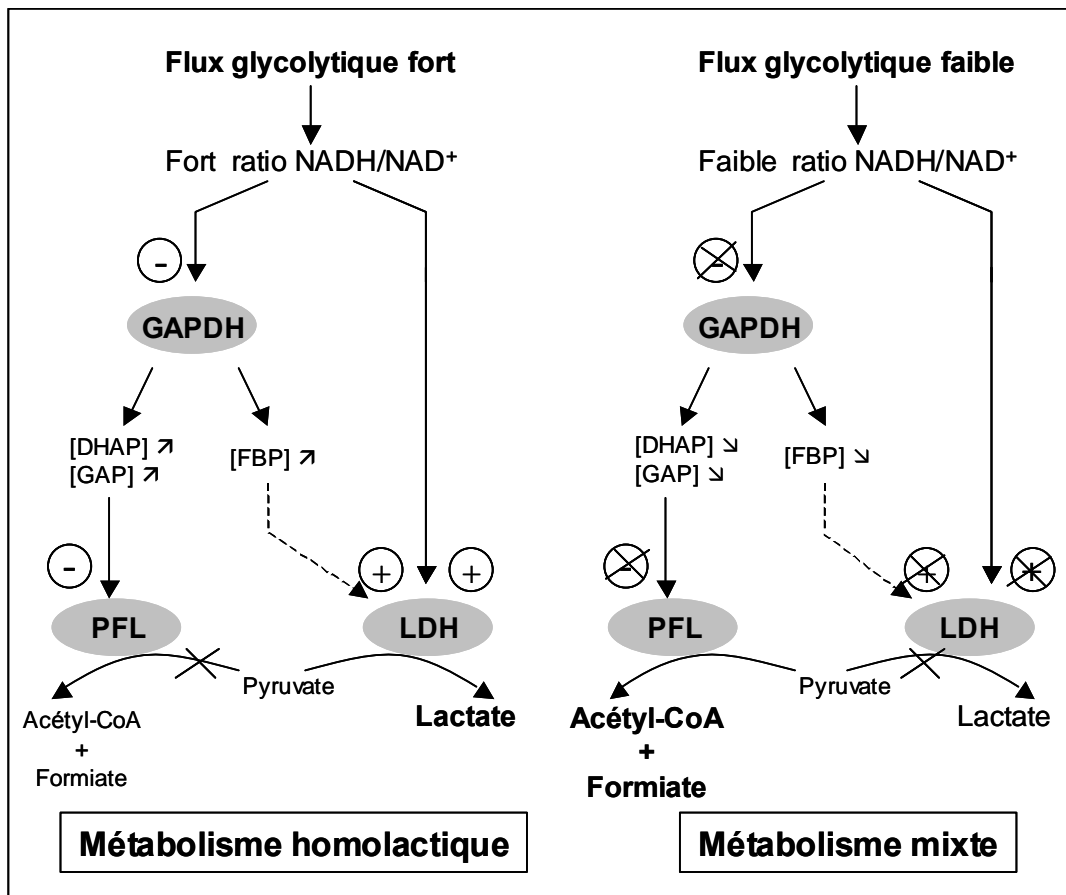


Figure I.6 : Rôle majeur de la valeur du ratio NADH/NAD⁺ dans le contrôle du shift du métabolisme homolactique vers un métabolisme mixte pour la souche *L. lactis* ssp. *lactis* NCDO 2118 (Garrigues *et coll.*, 1997 ; Even, 2001).

Ainsi, les concentrations intracellulaires des métabolites comme le DHAP, le GAP et le FBP augmentent. L'augmentation des pools de trioses-phosphate inhibent la PFL dont la concentration est en outre plus faible que dans le cas d'un métabolisme mixte (Garrigues *et coll.*, 1997 ; Takahashi *et coll.*, 1982), alors que le FBP active la LDH. Dans de telles conditions, le flux glycolytique emprunte cette dernière enzyme et le métabolisme est homolactique.

Lorsque le flux glycolytique est plus faible (sur galactose et lactose), le ratio NADH/NAD⁺ plus faible inhibe fortement la LDH, et l'activité de la GAPDH, alors plus importante, empêche l'augmentation des pools de trioses-phosphate et de FBP, et la PFL n'est plus inhibée (Fig. I.6). Le métabolisme est alors mixte.

Ce modèle a été proposé pour une souche de lactocoque mais ne peut être élargi à une souche comme la IL 1403 dont le contrôle du flux n'est pas assuré par la GAPDH et dont le mécanisme contrôlant ce shift reste à être élucidé. Une étude complémentaire du comportement métabolique de la souche *L. lactis* ssp. *lactis* NCDO 2118 en milieu minimum sur substrat galactose a révélé le rôle primordial de la balance entre anabolisme et catabolisme sur le contrôle du shift homolactique/mixte. En effet, dans ces conditions, la faible vitesse de consommation du sucre n'entraîne pas une forte diminution du flux catabolique puisque l'anabolisme est limité dans des proportions plus importantes que le catabolisme et le métabolisme mixte est réorienté vers la production de lactate (Garrigues *et coll.*, 2001).

2.1.3.2. Régulation génétique

La régulation génétique permet, contrairement au contrôle biochimique, une adaptation de la cellule en réponse à des changements environnementaux sur du long terme. L'expression des gènes et des opérons codant pour des enzymes cataboliques est induite par la présence d'un substrat approprié. Une telle induction peut être réalisée à un niveau transcriptionnel en activant ou réprimant l'expression des gènes, ou en jouant sur l'antiterminaison et l'élongation des transcrits.

Les 2,35 Mb du génome de la souche *L. lactis* ssp. *lactis* IL 1403 ont été séquencés et 2310 gènes codant pour des protéines mis en évidence (Bolotin *et coll.*, 2001). Environ 138 de ces protéines correspondent à des régulateurs potentiels (Guédon *et coll.*, 2002) et un grand nombre d'entre eux serait associé au contrôle du métabolisme carboné. L'un des phénomènes le plus étudié est la répression des opérons cataboliques, qui concerne des protéines impliquées dans le transport et le métabolisme des sucres les moins efficaces en présence d'un sucre rapidement métabolisable comme le glucose.

(i) La répression catabolique

Lorsque les bactéries sont soumises à un mélange de sources carbonées, elles vont métaboliser le substrat qui va entraîner le rendement maximal pour la croissance, établissant ainsi une utilisation hiérarchique des sucres présents. Ainsi, elles ont développé des mécanismes leur permettant de ressentir l'état nutritionnel du milieu et d'ajuster leur capacité catabolique par des réponses régulatrices ou CCR (carbon catabolite repression). Deux

réponses principales ont été identifiées chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif, dans les deux cas se sont les composants du système de transport du sucre, le PTS, qui vont permettre d'intégrer des signaux cis-régulateurs. Le sucre le plus efficace dans ce phénomène de répression est le glucose, ce qui a même amené Galinier *et coll.* (1998) à décrire un « effet glucose ».

Les bactéries à Gram positif et bas pourcentage en GC utilisent la protéine HPr du système PTS pour réaliser l'exclusion d'inducteur et contrôler l'action du régulateur transcriptionnel CcpA (catabolite control protein-A) dans le but d'utiliser la source de carbone qui confèrera le meilleur taux de croissance à la bactérie. Ce sont les protéines HPr, HPr K/P (HPr kinase/phosphatase) et CcpA qui sont impliquées dans le « sensing » de l'état physiologique cellulaire et dans la régulation du catabolisme. La protéine HPr reflète via son état de phosphorylation l'état nutritionnel de la cellule.

Lorsque des sucres sont métabolisés via le système PTS, certains intermédiaires glycolytiques, comme le FBP, voient leur concentration intracellulaire augmenter. Le FBP va stimuler l'enzyme HPr kinase entraînant la formation d'HPr-(Ser)P qui est indispensable à la mise en place de la régulation catabolique. Etant donné que HPr-(Ser)P n'est pas un substrat de l'enzyme E-I, le taux de consommation du sucre par le PTS va diminuer, la concentration en FBP également, entraînant une déphosphorylation de la protéine HPr. Ainsi, il a été montré que la forme HPr-(Ser)P domine lorsque les streptocoques ont une croissance rapide alors que la forme HPr-(His)P est elle majoritaire lorsque la croissance bactérienne est lente (Gunnewijk et Poolman, 2000).

HPr-(Ser)P agit comme co-répresseur ou co-activateur de la transcription avec CcpA (Deutscher *et coll.*, 1995 ; Jones *et coll.*, 1997). CcpA a été caractérisé chez *B. subtilis* comme un facteur de la répression par le glucose du gène *amyE* (amylase) en se liant à une séquence « cis-actrice » *cre* (catabolite responsive element). CcpA est une protéine très conservée identifiée chez plus de 20 bactéries à Gram positif et faible pourcentage en bases GC. Cette protéine régulatrice appartient à la famille LacI/GalR et contient tous les domaines caractéristiques de cette famille de protéines : un domaine hélice/tour/hélice impliqué dans la liaison à l'ADN, un site de liaison à l'effecteur ainsi qu'un domaine C-terminal de dimérisation (Henkin *et coll.*, 1991 ; Weickert et Adhya, 1992 ; Schumacher *et coll.*, 2004). CcpA se lie au niveau des sites *cre* localisés en amont, à l'intérieur ou en aval des promoteurs des gènes cataboliques (Fig I.7) entraînant ainsi soit l'activation, la répression ou l'avortement de la transcription (Ye *et coll.*, 1994 ; Henkin, 1996). Une étude RMN a révélé que deux monomères de la protéine HPr-(Ser)P se lient à un dimère de CcpA pour former un complexe

avec le site « *cre* » de l'ADN (Jones *et coll.*, 1997). Chez les bactéries lactiques, le gène *ccpA*, monocistronique, se trouve en opéron avec le gène *pepQ* (prolidase) mais leur transcription est divergente (*pepQ-ccpA*) (Mahr *et coll.*, 2000). L'expression de *ccpA* semble auto-régulée via un site *cre* situé dans sa région promotrice (Monedero *et coll.*, 1997 ; Mahr *et coll.*, 2000).

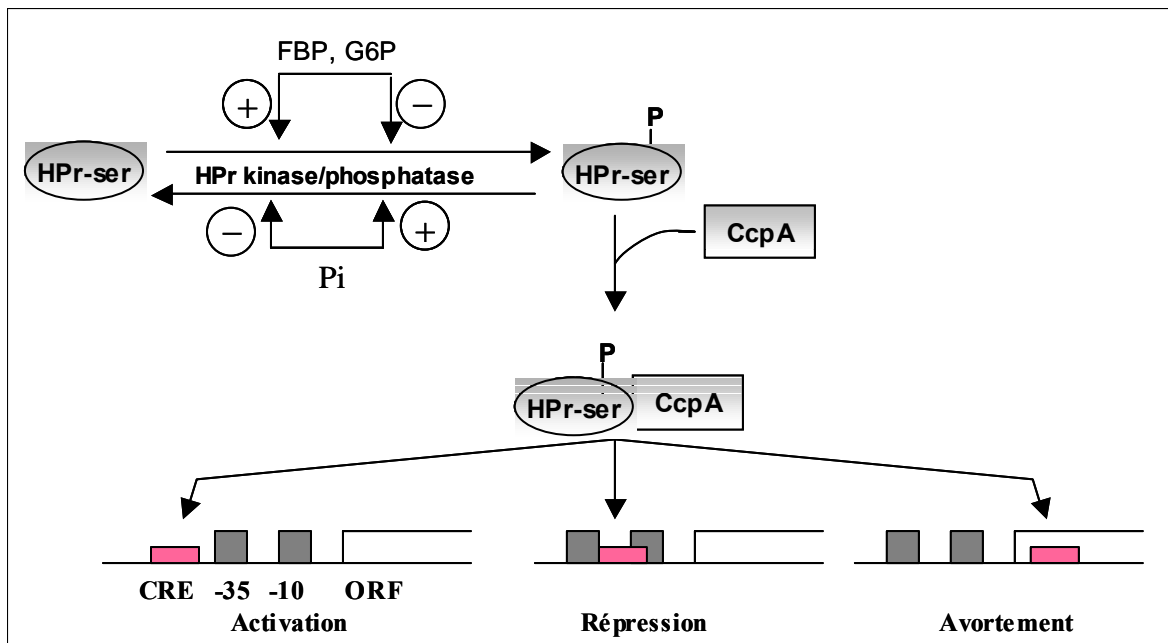


Figure I.7 : Régulation des gènes par CcpA (d'après Cocaign-Bousquet *et coll.*, 2002).

Chez *Lactococcus lactis* comme pour les autres bactéries, la « CCR » est sous le contrôle de CcpA/HPr-(Ser)P (Luesink *et coll.*, 1998). Des phénomènes d'activation sont présents, en présence de glucose on observe une activation de l'opéron *las* via un site *cre* en amont de la région -35 de l'opéron. Cependant, la délétion de *ptsH* n'entraîne qu'une perte de 30% sur l'activité des enzymes glycolytiques, d'autres facteurs sont donc probablement impliqués dans la régulation de cet opéron *las*. Chez *L. lactis*, la régulation catabolique carbonée inclut des phénomènes de répression et d'activation de gènes via CcpA. L'activation de l'opéron *las* par le glucose doit être un mécanisme visant à empêcher l'accumulation des produits finaux (Luesink *et coll.*, 1998), ce phénomène étant retrouvé chez *B. subtilis*.

(ii) Autres modes de régulation transcriptionnelle

Si CcpA est le régulateur principal impliqué dans la répression catabolique, d'autres régulateurs transcriptionnels jouent également un rôle important dans le contrôle de l'expression des gènes cataboliques. Tout comme CcpA, ils peuvent agir sur la transcription de façon différente en la réprimant, en l'activant ou en empêchant la terminaison de la transcription.

Différents répresseurs ont été mis en évidence chez *Lactococcus lactis*. Les enzymes du système PTS spécifique du lactose, ainsi que celles impliquées dans la voie du Tagatose-6-P, sont codées par 8 gènes plasmidiques organisés en opéron (*lacABCDFEGX*) dont l'expression est régulée par le produit du gène *lacR* (van Rooijen et de Voos, 1990 ; van Rooijen *et coll.*, 1991). LacR appartient à la famille de régulateurs bactériens « DeoR » qui comprennent un domaine N-terminal de liaison à l'ADN (motif hélice-tour-hélice) ainsi qu'un domaine C-terminal de liaison à l'inducteur. Le tagatose-6-P (Tag-6-P) est l'inducteur de l'opéron lactose, ainsi en l'absence de ce sucre la protéine LacR se lie à des séquences opératrices flanquant le promoteur de l'opéron *lac* et bloque ainsi sa transcription (van Rooijen *et coll.*, 1992 ; van Rooijen *et coll.*, 1993). Les gènes *sacABK* impliqués dans l'utilisation du sucrose sont eux régulés par le produit du gène *sacR* qui appartient à la famille de régulateurs LacI-GalR. Chez *L. lactis* ces gènes sont organisés en deux opérons *sacBK* et *sacAR* dont la transcription est divergente (Luesink *et coll.*, 1999). Les protéines XylR et MalR sont également deux activateurs transcriptionnels mis en évidence chez *Lactococcus lactis*. Le produit du gène *xylR* homologue aux régulateurs de la famille AraC-XylS est activateur de l'opéron xylose *xylRAB* (Erlandson *et coll.*, 2000). Les gènes impliqués dans le transport et le catabolisme du maltose sont localisés au sein de deux opérons chez *L. lactis* et tous deux exposés à la répression catabolique (Qian *et coll.*, 1997 ; Nilsson et Radstrom, 2001). Même si le produit du gène *malR* est homologue aux répresseurs de la famille LacI-GalR il est responsable chez *L. lactis* de l'activation du complexe perméase au maltose (Andersson et Radstrom, 2002).

La protéine BglR régule l'expression de l'opéron impliqué dans l'assimilation des β -glucosides chez *Lactococcus lactis* (Bardowski *et coll.*, 1994). Cette protéine présente de fortes homologies avec les membres de la famille BglG-SacY qui fonctionnent comme des anti-terminateurs de transcription. En absence de glucose, la protéine HPr phosphoryle un des domaines (PRD2) activant l'antitermineur, lorsque le glucose est métabolisé la protéine HPr est phosphorylée sur la sérine et ne peut activer l'antitermineur.

2.2. Métabolisme azoté chez *Lactococcus lactis*

Les besoins nutritionnels varient beaucoup d'un groupe bactérien à l'autre. Les bactéries lactiques sont hétérotrophes et nécessitent donc pour leur croissance l'apport de certaines substances organiques exogènes. Elles se caractérisent par des besoins nutritionnels particulièrement complexes car en plus d'un sucre fermentescible, elles nécessitent la présence de plusieurs acides aminés essentiels qu'elles ne peuvent synthétiser à partir d'une source azotée plus simple. Les *lactococci* ont généralement besoin d'un apport d'acide glutamique, d'histidine, d'isoleucine, de leucine, de méthionine et de valine pour se développer, et plus rarement d'arginine, de thréonine et de tryptophane (Monnet et Gripon, 1994, Cocaign-Bousquet *et coll.* 1995). Dans le lait, les concentrations de certains acides aminés essentiels comme l'isoleucine, la leucine et la méthionine sont très faibles (moins de $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) ce qui en fait des acides aminés potentiellement limitant pour la croissance (Mills et Thomas, 1981 ; Juillard *et coll.*, 1995).

Ce chapitre va aborder la protéolyse mise en place au cours de croissance sur lait, le transport et le catabolisme des peptides ainsi que celui des acides aminés. Les peptides ont un système de transport indépendant des acides aminés, et permettent une alimentation plus rapide et énergétiquement plus favorable du pool d'acides aminés intracellulaire.

2.2.1. Protéolyse et croissance sur lait

Dans le lait, la croissance des *lactococci* est fortement dépendante de l'hydrolyse des caséines qui constituent la principale source d'azote (Mills et Thomas, 1981 ; Juillard *et coll.*, 1995). Il existe plusieurs types de caséines, dont les principales sont les caséines α , β , γ et κ . Elles s'organisent en micelles, qui sont des particules sphériques formées par l'association des caséines (α_{S1} , α_{S2} , β , κ), de quelques fragments peptidiques (caséine γ) et de composants minéraux, principalement du calcium et du phosphate.

Lactococcus lactis produit une sérine-protéase (Cell Envelope Proteinase) localisée au niveau de la paroi cellulaire, pivot de la protéolyse des caséines (Fig. I.8) (Smid *et coll.*, 1991). Il s'agit d'une enzyme clé essentielle pour une croissance rapide des souches de lactocoques dans le lait puisqu'elle scinde les caséines en peptides. Bruinenberg *et coll.* (1992) ont observé que la synthèse des protéases est régulée par la composition du milieu puisque les niveaux les plus élevés sont obtenus en lait. Deux gènes, *prtP* et *prtM*, tous deux plasmidiques, sont requis pour la synthèse d'une protéase active (Kok, 1990). Le gène *prtP* code pour un précurseur de la protéase tandis que *prtM* code pour une lipoprotéine impliquée dans la maturation du précurseur de la protéase, qui est localisée au niveau de la membrane cellulaire des lactocoques par le biais d'une séquence d'ancrage C-terminale (de Vos *et coll.*, 1989). Deux types de protéases, -P_I et -P_{III} sont distinguables par leur spécificité d'hydrolyse, puisque les protéases de type-P_I clivent préférentiellement la caséine β , la caséine κ avec moins d'efficacité et presque pas la caséine α_{S1} , alors que la protéase de type-P_{III} clive les trois types de caséines avec la même efficacité (Visser *et coll.*, 1986 ; Reid *et coll.*, 1991a et b; Reid *et coll.*, 1994). Ainsi le type de protéase de paroi exprimé va fortement influencer la croissance de *L. lactis* (Exterkate et de Veer, 1987 ; Flambard *et coll.*, 1997 ; Helinck *et coll.*, 1997 ; Flambard *et coll.*, 1998). L'expression des gènes impliqués dans la synthèse de la CEP, *prtP* et *prtM*, a été étudiée par Marugg *et coll.* (1995) à l'aide de fusions transcriptionnelles avec le gène *gusA*. L'expression des deux gènes est contrôlée au niveau transcriptionnel par le contenu en peptides du milieu, et à un moindre niveau par le taux de croissance. Le plus faible niveau d'expression est obtenu dans des milieux riches en acides aminés libres et peptides, et l'ajout des di-peptides leucylproline et prolylleucine affecte négativement l'expression de *prtP* par le biais, semble-t-il, de leur accumulation intracellulaire. Plus récemment, des résultats similaires ont été obtenus par Guédon *et coll.* (2001a) pour les gènes *prtP1* et *prtP3* codant respectivement pour des protéases de type-P_I et -P_{III} de la souche *L. lactis* MG1363.

Chez *Lactococcus lactis* comme chez *Streptococcus thermophilus* la croissance en lait est diauxique, elle est scindée en deux phases exponentielles successives séparées par une phase au cours de laquelle la synthèse des protéases de paroi est réalisée (Juillard *et coll.*, 1995 ; Letort *et coll.*, 2002). Au cours de la première phase les bactéries consomment les acides aminés et peptides libres du milieu, tandis qu'au cours de la seconde elles utilisent les caséines comme source d'acides aminés. Chez les deux espèces bactériennes, c'est la capacité à utiliser les caséines pour la croissance qui va limiter le taux de croissance des bactéries. Cependant, chez *L. lactis* le taux de croissance est dépendant de la quantité de protéase synthétisée ainsi que de la vitesse d'hydrolyse des caséines par PrtP (Bruinenberg *et coll.*,

1992 ; Helinck *et coll.*, 1997), alors que chez *S. thermophilus* il s'agit probablement de la vitesse de transport des oligopeptides (Letort *et coll.*, 2002).

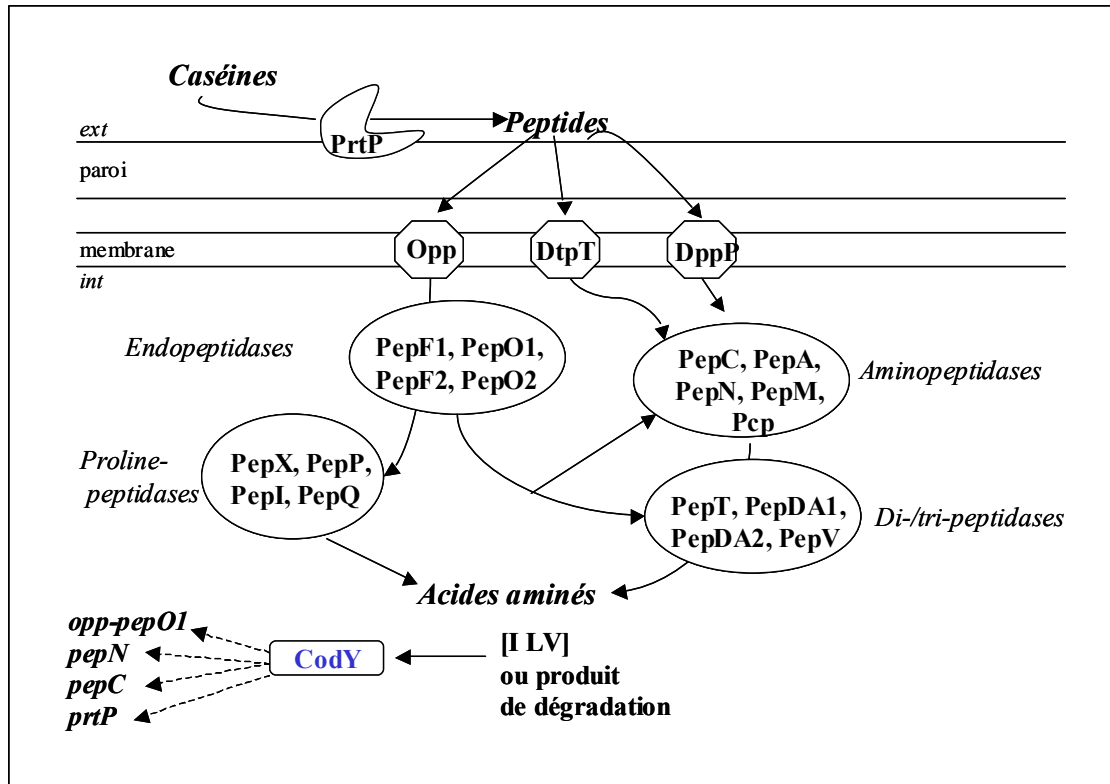


Figure I.8 : Représentation schématique du système protéolytique et régulation de l'expression des gènes du régulon protéolytique de *Lactococcus lactis* (d'après Guédon *et coll.*, 2001b; Doeven *et coll.* 2005).

2.2.2. Catabolisme et transport des peptides

L'utilisation de peptides, initialement présents dans le lait ou dérivés de l'hydrolyse des caséines, est indispensable à la croissance des lactocoques dans le lait. Elle est conditionnée en premier lieu par leur transport à travers la membrane via différents systèmes de transport, et également par leur hydrolyse en acides aminés libres dont certains sont indispensables à la croissance (Fig I.8).

Le système de transport des oligopeptides est particulièrement important pour la croissance en lait, car l'incapacité à transporter ces peptides entraîne une lente coagulation du lait, même en présence de la protéase Prt (Tynkkynen *et coll.*, 1993). Trois systèmes fonctionnels de transport des peptides ont été décrits pour la souche *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363. Le transport des di- et tri-peptides, indispensable à la croissance en présence de caséines, est réalisé par le système DtpT couplé à la PMF (Smid *et coll.*, 1989 a et b ; Kunji *et coll.*, 1993). Les oligopeptides de 4 à 35 résidus sont transportés par un système de type ABC, Opp, couplé à l'hydrolyse de l'ATP. Les gènes *oppDFBCA* sont organisés en opéron avec le gène *pepO* (Tynkkynen *et coll.*, 1993) et codent pour les cinq composants du transporteur. La protéine OppA est extracellulaire et lie l'oligopeptide à transporter, OppB et OppC sont des protéines intra-membranaires responsables de la translocation du peptide, alors qu'OppD et OppF, qui sont intracellulaires, sont impliquées dans l'hydrolyse de l'ATP fournissant ainsi l'énergie au transport. La spécificité du transport est régie par la protéine OppA qui lie spécifiquement et emprisonne les 6 premiers résidus du peptide à transporter alors que les autres interagissent avec la surface de la protéine (Detmers *et coll.*, 2000 ; Lanfermeijer *et coll.*, 2000). L'affinité de ce système est optimale pour les nonamères et les peptides contenant des résidus basiques et hydrophobes, alors que le transport des peptides acides de taille importante est impossible (Juillard *et coll.*, 1998). Le troisième système décrit, Dpp, possède une préférence pour les di- et tri-peptides hydrophobes contenant des acides aminés branchés (Foucaud *et coll.*, 1995). Il s'agit, comme Opp, d'un ABC transporteur ; *dppA* et *dppP* codent pour deux protéines de liaisons aux peptides mais seule DppA est fonctionnelle (Sanz *et coll.*, 2001), *dppB* et *dppC* codent pour les deux protéines membranaires et *dppD* et *F* pour les protéines de liaison à l'ATP.

Des gènes homologues à ceux impliqués dans le transport des peptides chez la souche MG1363 ont été mis en évidence suite au séquençage de la souche IL1403 (Bolotin *et coll.*, 2001). Le gène *dppP* est ici fonctionnel et permet le transport de peptides contenant jusqu'à neuf résidus (Lamarque *et coll.*, 2004), alors que le gène *oppA* n'est pas synthétisé et le système Opp non fonctionnel. Ainsi, le transport des oligopeptides semble dépendant du système Dpp plutôt que du système Opp chez *L. lactis* IL1403.

Une fois internalisés, les peptides sont hydrolysés par diverses peptidases intracellulaires différentes selon leur spécificité de clivage. Les aminopeptidases, PepN, C, A et Pcp génèrent des di-peptides et des acides aminés en clivant l'extrémité N-terminale des oligopeptides. Les endopeptidases PepO1, O2, F1 et F2 clivent les liaisons peptidiques

internes, d'autres peptidases comme PepV, T, DA1 et DA2 clivent les di- et tri-peptides, et certaines enfin hydrolysent des peptides contenant des résidus proline, la prolidase PepQ, la X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase PepX, l'aminopeptidase PepP, qui contrairement à PepX ne joue pas un rôle majeur dans la nutrition azotée (Matos *et coll.*, 1998), et la proline iminopeptidase PepI.

La régulation de l'expression des différents composants du système protéolytique n'est pas bien étudiée. Chez la souche MG1363, seule l'expression du gène *pepP* est modulée par la source de carbone, et la présence d'une boîte « *cre* » dans sa région promotrice suggère un contrôle de type répression catabolique par CcpA (Guédon *et coll.*, 2001a). Les gènes *pepC*, *pepN*, *pepX* ainsi que l'opéron *opp-pepO1* sont les plus exprimés en milieu chimiquement défini et leur expression réprimée (de 5 à 150 fois) par la présence d'une source de peptides (Guédon *et coll.*, 2001a). Le transport des peptides est régulé via un répresseur pléiotropique CodY sensible au pool interne des acides aminés branchés isoleucine, leucine et valine (Guédon *et coll.*, 2001b). Des expériences *in vitro* ont confirmé la fixation de CodY en amont des gènes cibles *pepN*, *pepC*, *opp-pepO1*, celui de la protéase membranaire *prtP* et probablement *pepX* et *pepDA2* (den Hengst *et coll.*, 2005).

2.2.3. Catabolisme et transport des acides aminés

Pour les lactocoques le transport des acides aminés est considérablement augmenté en présence de glucose ou de lactose et stoppé par les inhibiteurs de la glycolyse ou les enzymes hydrolysant l'ATP (Monnet et Gripon, 1994). Divers mécanismes de transport sont impliqués selon les acides aminés, soit couplé à la force protomotrice, soit à l'ATP ou à d'autres molécules possédant des liaisons phosphate riches en énergie, soit des systèmes antiports impliquant les gradients de concentration des acides transportés.

Les acides aminés à chaîne ramifiée, la leucine, l'isoleucine et la valine, sont tous trois essentiels à *Lactococcus lactis*. Leur transport est couplé à la force protomotrice car réalisé en symport avec un proton (Driessen *et coll.*, 1987a). La vitesse du transport est augmentée lorsque la PMF est élevée, la stoechiométrie générale est d'un acide aminé pour un proton mais elle peut être inférieure dans certaines conditions à cause principalement de la diffusion passive de ces acides aminés à travers la membrane due à l'hydrophobicité de leur chaîne

latérale. La vitesse maximale du système de transport est 10 fois plus importante en milieu chimiquement défini qu'en milieu lait, ce qui laisse penser que certains peptides pourraient être des répresseurs du système (Poolman et Konings, 1988). Le transport des acides aminés neutres, alanine, glycine, sérine et thréonine, est également lié à la FPM. La sérine et la thréonine possèdent un même système de transport, différent de celui commun à l'alanine et à la glycine (Driessen *et coll.*, 1987b). Le transport d'autres acides aminés tels que la cystéine, l'histidine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine et la tyrosine est également couplé à la force protomotrice mais peu d'informations sont disponibles (Driessen *et coll.*, 1989a ; Konings *et coll.*, 1989).

Outre les systèmes de transport PMF-dépendants, il existe des systèmes impliquant l'énergie des liaisons phosphate. Ces systèmes catalysent généralement des réactions unidirectionnelles et irréversibles. Chez les lactococques, le glutamate et la glutamine sont transportés par un même système. Le glutamate est préférentiellement transporté sous forme d'acide glutamique plutôt que d'anion, ce qui n'est pas le cas de la glutamine puisque son transport est indépendant du pH extérieur (Poolman *et coll.*, 1987c). L'aspartate est également transporté préférentiellement sous forme d'acide aspartique par un système indépendant à faible affinité. Tout comme les trois précédents acides aminés, l'asparagine s'accumule également suivant un mode de transport à haute affinité dépendant de l'énergie de liaisons phosphates, et distinct des deux précédents transporteurs.

De nombreuses souches de *lactococci* ont la capacité de transporter et de métaboliser l'arginine en ornithine, ammoniac et CO₂. Le système de transport assurant l'échange de l'arginine et de l'ornithine a été mis en évidence chez *L. lactis* par l'utilisation de vésicules membranaires (Driessen *et coll.*, 1987c). Cet antiport, qui catalyse un échange avec une stœchiométrie de 1/1, ne requiert pas de dépense d'énergie métabolique pour fonctionner puisqu'il utilise le gradient des deux acides aminés. Il semble que la lysine puisse également être utilisée pour l'accumulation d'arginine. La lysine est transportée à l'intérieur de la cellule par le symport H⁺/lysine dépendant de la PMF, puis métabolisée ou excrétée par un antiport en échange avec l'entrée d'arginine (Driessen *et coll.*, 1989a). Les systèmes antiports peuvent fonctionner selon deux mécanismes, séquentiel ou ping-pong. L'antiport arginine/ornithine fonctionne avec un mécanisme de type ping-pong (Driessen *et coll.*, 1989b) impliquant que le site de liaison du transporteur est exposé d'un côté puis de l'autre de la membrane et permet la fixation et le transport alternatif de chaque acide aminé.

L'arginine n'est pas un acide aminé essentiel car il peut être synthétisé *de novo* à partir du glutamate (Fig. I.9). Chez *L. lactis*, la dégradation complète de l'arginine s'effectue via la voie de l'arginine déiminase (ADI) qui comprend trois étapes catalysées par l'arginine déiminase (ArcA), l'ornithine carbamoyl-transférase (ArcB) et la carbamate kinase (ArcC) (Fig. I.9). Cette voie représente une source supplémentaire d'ATP, elle permet de combattre contre le stress acide grâce à la production d'ammoniac et fournit le carbamoyl-phosphate essentiel à la synthèse *de novo* des pyrimidines. Les gènes codant pour les enzymes impliquées dans le catabolisme de l'arginine sont localisés au sein d'un même cluster, *arcABD₁C₁C₂TD₂*, qui comprend outre les gènes codant pour des enzymes cataboliques, les gènes *arcD₁D₂* codant pour l'antiport (Poolman *et coll.*, 1987b), ainsi que *arcT* codant pour une aminotransférase. Chez de nombreux microorganismes, le catabolisme de l'arginine est régulé par les protéines ArgR ou AhrC. Le séquençage du génome de la souche *L. lactis* IL 1403 a permis l'identification de deux gènes orthologues à *argR* et *ahrC* (Bolotin *et coll.*, 2001). Chez *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG 1363, ces deux régulateurs sont fonctionnels, ils coopèrent pour réprimer la biosynthèse de l'arginine mais seul AhrC est impliqué dans l'activation de son catabolisme (Larsen *et coll.*, 2004). Ces deux régulateurs agissent sous forme d'homo-hexamères et se lient au niveau de sites opérateurs appelés boîtes ARG, situés dans les régions promotrices des gènes de synthèse et de dégradation de l'arginine. Un site *cre* a également été mis en évidence au niveau du promoteur du gène *arcA* impliquant probablement une régulation dépendante de la source de carbone par le biais de CcpA chez *L. lactis* (Crow et Thomas, 1982 ; Larsen *et coll.*, 2004).

La proline est un acide aminé essentiel pour certaines souches de lactocoques. Cependant ni pour ces souches ni pour celles qui sont autotrophes pour cet acide aminé, il n'a pu être détecté de système de transport spécifique de la proline (Smid et Konings, 1990). La proline est également un soluté impliqué dans la résistance contre le stress osmotique et des transporteurs spécifiques osmorégulés ont été mis en évidence chez *L. lactis* (Molenaar *et coll.*, 1993).

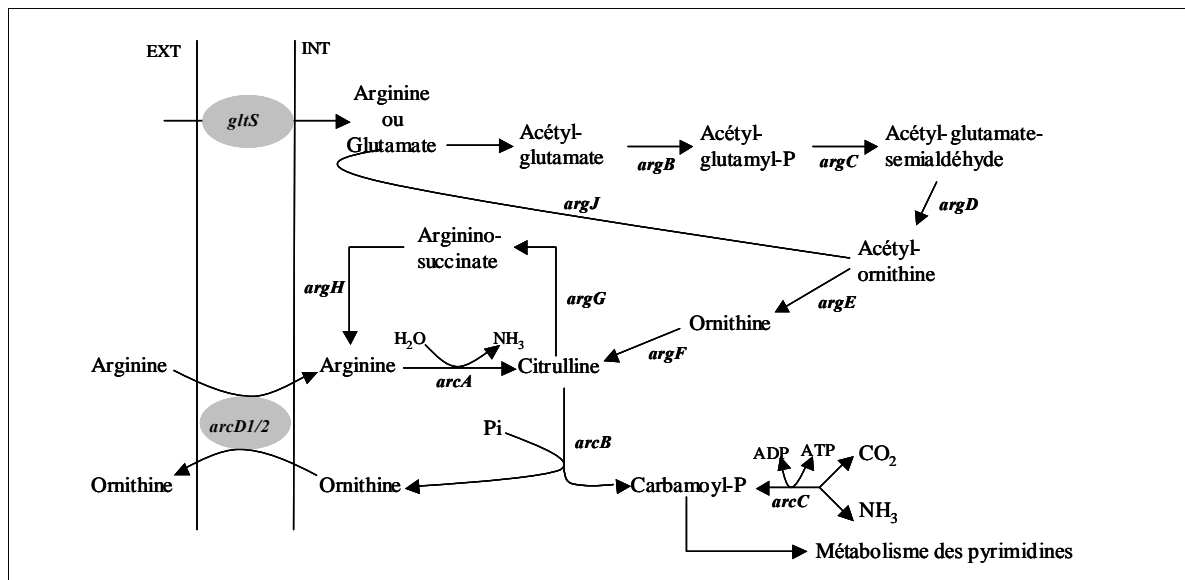


Figure I.9 : Représentation schématique du métabolisme de l'arginine chez *Lactococcus lactis* (d'après Larsen *et coll.*, 2004).

Légende : *argB* : N-acétylglutamate 5-phosphotransférase ; *argC* : N-acétylglutamate 5-semialdéhyde déshydrogénase ; *argD* : N-acétylornithine 5-aminotransférase ; *argJ* : ornithine acétyltransférase ; *argE* : acétylornithine acétyltransférase ; *argF* : ornithine carbamoyltransférase ; *argG* : argininosuccinate synthétase ; *argH* : argininosuccinase ; *arcA* : arginine déiminase ; *arcB* : ornithine carbamoyltransférase ; *arcC* : carbamate kinase ; *arcD1/2* : antiporteur arginine/ornithine ; *gltS* : transporteur du glutamate ou de l'arginine.

3. Le lait et les procédés de fabrication fromagers

La dénomination « fromage » est réservée aux produits, fermentés ou non, obtenus à partir des matières d'origine exclusivement laitière (lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse, babeurre) utilisées seules ou en mélange, et coagulées en tout ou partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse. En 2003, la production de fromages par les industries laitières françaises était de 1750000 tonnes, avec une consommation moyenne de 24 Kg par habitant, ce qui place la France au second rang européen. La richesse et la diversité fromagère française sont très importantes et dépendent du lait et des technologies mises en œuvre. La transformation du lait en fromage s'effectue généralement en quatre étapes principales que sont la coagulation, l'égouttage, le salage et l'affinage.

3.1. Le lait

Le lait est un aliment particulier puisqu'il constitue l'unique source d'alimentation chez les nouveau-nés de toutes les espèces de mammifères dont l'homme.

Il s'agit d'un mélange complexe et riche constitué à 90 % d'eau et comprenant des matières grasses (40 g.L^{-1}), du lactose (de 48 à 50 g.L^{-1}), des protéines (32 g.L^{-1}), des minéraux et des vitamines.

Les matières grasses dans le lait sont présentes sous forme d'une émulsion de globules gras. Les lipides du lait sont constitués en majorité de triglycérides (98 %), mais également de phospholipides, de stérols et de vitamines liposolubles. Les triglycérides liquides à température ambiante sont au centre du globule, ceux qui sont solides à cette température se retrouvent en périphérie. A la surface du globule, il y a une « membrane » formée sur sa face externe de protéines, d'eau et de minéraux, et sur sa face interne de phospholipides. La proportion de matières grasses contenues dans le lait de vache, ou taux butyreux, varie en fonction de la race et de la génétique de la vache, de l'alimentation et du stade de la lactation.

Le lactose est quasiment le seul glucide du lait de vache, sa teneur est très stable et présente de faibles variations au cours de la lactation. Le lactose est un sucre spécifique du lait, il s'agit d'un diholoside composé d'une molécule de glucose et d'une molécule de galactose. Le lactose est le seul sucre qui puisse être utilisé correctement par le jeune animal car son tube digestif possède une lactase, enzyme capable de dégrader le lactose, mais aucune saccharase, maltase ou amylase qui lui permettrait de dégrader d'autres sucres.

Le taux de matières azotées totales du lait est une caractéristique importante, car plus il est élevé, et plus le rendement de transformation fromagère sera bon. Les protéines du lait représentent 95 % des matières azotées totales, les 5 % restant étant constitués d'acides aminés libres, de petits peptides et d'azote non protéique, essentiellement de l'urée mais aussi de la créatinine et de l'acide urique. Les protéines du lait forment un ensemble assez complexe composé d'une faible proportion de protéines solubles (lactalbumine, lactoglobulines, sérum albumines et immunoglobulines) et de 80 % de caséines. Ces protéines se trouvent dans le lait sous forme d'un complexe des diverses caséines liées à du phosphate de calcium colloïdal. Ces protéines, qui contiennent des groupes acides et amines à caractère basique, sont sensibles au pH du milieu et coagulent en se séparant de la phase aqueuse à pH acide ($P_i = 4,6$). Il existe plusieurs types de caséines, les principales sont les caséines α , β , γ et κ . Elles s'organisent en micelles, ce sont des particules sphériques formées par l'association des caséines α_{S1} , α_{S2} , β et κ , de quelques fragments peptidiques (caséine γ) et de composants minéraux (calcium et phosphate). Au sein de la structure, la caséine κ stabilise les micelles en présence de calcium, et contrairement aux autres caséines, elle est très sensible à l'action de la chymosine, principale enzyme de la présure.

Les composants minoritaires du lait sont des minéraux, principalement du calcium, du phosphore, mais aussi du magnésium et du fer, ainsi que des vitamines liposolubles (A, D₃ et E) et hydrosolubles (principalement du groupe B) dont la teneur dépend fortement de l'alimentation. Il existe une variabilité importante de la composition chimique du lait en fonction de l'espèce, entre les individus, mais aussi en fonction des facteurs externes (alimentation, photopériode...) et du stade de lactation. C'est pour cela que préalablement à sa transformation, le lait de fromagerie est généralement standardisé afin de donner un bon fromage. Il existe deux types de standardisation, une standardisation physico-chimique afin d'obtenir une composition du lait donnée (matières azotées protéiques, matière grasse,

équilibre minéral, pH, lactose) et une standardisation biologique, généralement réalisée par traitement thermique, qui permet d'éradiquer la flore originelle du lait potentiellement indésirable et de favoriser la production de facteurs de croissance pour le développement de la flore « levain » qui sera ajoutée par la suite.

3.2. Le procédé fromager

Les bactéries lactiques jouent un rôle essentiel dans les différentes étapes de la transformation du lait en fromage. La production d'acide lactique abaisse le pH du lait et contribue avec les enzymes coagulantes à modifier les propriétés physico-chimiques du lait. Elles préparent les conditions de développement des flores d'affinage et participent également à cette phase grâce à leurs activités aromatiques et organoleptiques. Les bactéries lactiques sont donc pleinement impliquées dans l'obtention de produits finis présentant des caractéristiques texturales et organoleptiques particulières.

La première phase du procédé de fabrication fromager consiste en la coagulation du lait. Elle peut se faire selon trois voies : acide, enzymatique ou mixte. La coagulation par voie acide consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique par acidification bactérienne (ferments lactiques) en produisant de l'acide lactique à partir du lactose ou par acidification chimique. L'acidification entraîne une diminution des charges négatives des micelles, une diminution de leur hydratation, une solubilisation de leur composante minérale (calcium et phosphate) et donc une déstructuration de ces micelles avec une réorganisation de ces protéines en gel. La coagulation enzymatique présente la même finalité puisqu'elle consiste en la transformation du lait en gel par l'action d'enzymes protéolytiques qui vont préférentiellement hydrolyser les caséines κ , désorganisant ainsi les micelles et permettant ensuite leur réticulation. Selon la méthode utilisée, le gel présente des propriétés différentes, par exemple lorsqu'il est obtenu par coagulation acide il est très friable et peu élastique car le réseau de protéines est peu structuré, il résistera donc moins bien aux traitements mécaniques que le gel issu d'une coagulation enzymatique.

Le gel formé constitue un état instable, l'égouttage va permettre l'élimination du lactosérum emprisonné dans les mailles du gel. La maîtrise des facteurs d'égouttage permet d'agir sur les quantités d'eau et de solutés évacués du coagulum. Le tranchage consiste à découper le gel en portions égales plus ou moins grandes afin d'augmenter la surface d'exsudation du lactosérum. Le brassage évite la soudure du grain de caillé en maintenant libres les surfaces d'échanges. Le chauffage permet un égouttage plus important du grain de caillé en diminuant la viscosité du lactosérum et renforçant les liaisons hydrophobes à l'intérieur du grain de caillé. L'acidification développée par les ferments au cours de la fabrication entraîne une diminution de l'électronégativité des caséines conduisant à une baisse d'hydratation ainsi qu'à une déminéralisation de la micelle amplifiant l'expulsion du lactosérum.

Le caillé égoutté peut ensuite être pressé afin de donner la forme définitive au fromage, d'évacuer le sérum et l'air résiduels et de favoriser la soudure des grains de caillé. La phase de salage est importante puisque l'incorporation de chlorure de sodium dans le fromage va permettre d'assurer un complément d'égouttage, de contribuer à la formation de la croûte, de régler l'activité de l'eau qui module le développement microbien et les activités enzymatiques au cours de l'affinage, et enfin d'accroître le potentiel organoleptique du produit.

La dernière étape, l'affinage, correspond à une phase de digestion enzymatique des constituants du caillé. Les enzymes impliquées sont d'origines diverses, elles peuvent provenir directement du lait (plasmine, lipase ...), être ajoutées au lait (enzymes coagulantes, levains lactiques) ou produites par la flore d'affinage (bactéries, levures, moisissures). L'ensemble de ces enzymes va permettre l'hydrolyse de la matière grasse, la dégradation des protéines et la fermentation du lactose, conférant ainsi au fromage de nouvelles caractéristiques texturales et organoleptiques.

Le développement et les caractéristiques des bactéries lactiques utilisées comme levain ont un rôle primordial dans la fabrication fromagère, et une perturbation dans leur développement (croissance, acidification, synthèse d'enzymes ...) en altérant la coagulation, l'égouttage ou l'affinage aura des conséquences importantes sur la qualité du produit obtenu.

3.3. Les grandes familles de fromages

La diversité des procédés fromagers (types de lait, de coagulation, d'égouttage, cuisson, flore et type d'affinage...) permet d'obtenir des produits présentant des caractéristiques texturales et gustatives très différentes. Il existe 8 grandes familles de fromages. Les plus simples sont les fromages frais qui résultent d'une coagulation lactique. Le caillage, qu'il soit spontané ou travaillé, est assez long (12 à 24 heures) et pendant cette phase le lait est maintenu à une température comprise entre 15 et 20°C. Le caillé est donc à prédominance lactique et l'usage de la présure limité, le lactosérum est éliminé par un égouttage en faisselle ou par centrifugation mais le taux d'humidité du fromage frais reste très élevé.

Les fromages à pâte molle et à croûte lavée (Livarot, Maroilles, Munster...) sont le fruit d'une coagulation mixte, le caillage assez rapide est obtenu à partir de ferments lactiques et de présure. Afin de favoriser l'égouttage, le caillé est divisé et brassé, avant d'être moulé puis salé. Au cours de l'affinage en caves, les fromages sont brossés et lavés avec une solution d'eau salée enrichie de bactéries spécifiques afin d'éveiller les ferments du rouge, développant ainsi une croûte caractéristique de couleur jaune à rouge orangée. Les fromages à pâte molle et à croûte fleurie (Brie, Camembert, Chaource...) sont également le fruit d'une coagulation mixte, mais cette fois avec un rôle prédominant des ferments lactiques. Le caillé est ensuite moulé dans un moule perforé où il s'égoutte très lentement. Une fois démoulé, le fromage est salé et séché dans un hâloir. La surface des fromages est ensuiteensemencée en pulvérisant du *Penicillium camemberti*, un champignon qui se développe au cours de l'affinage et donne aux fromages leur croûte duvetée particulière.

Les fromages à pâte pressée cuite, dont les représentants les plus célèbres sont le gruyère, le comté, l'emmental et le beaufort, se caractérisent par le procédé de travail du caillé et la taille énorme des meules. Ils sont également appelés fromages de garde car dans leurs terroirs de montagne, ils constituaient autrefois un bon moyen de conserver de la nourriture pour les longs mois d'hiver. La fabrication peut durer jusqu'à 20 heures avant le départ à l'affinage. Le lait est coagulé en cuves géantes par une combinaison de ferments lactiques et de présure, puis il est tranché en petits dés dans sa cuve afin d'accélérer l'écoulement du lactosérum. Pendant le brassage qui dure au minimum 45 minutes (à 53°C – 54°C), les dés de caillé se contractent, se transformant en grains. Quand le brassage est terminé, les grains de caillé sont retirés de la cuve, moulés dans d'énormes moules et mis sous presse. Une fois démoulée, la meule de fromage est immergée dans un bain d'eau salée. L'affinage se passe ensuite en deux étapes : un séjour en cave fraîche suivi d'un séjour cave "chaude" (19°C ou plus). Pendant l'affinage, les meules sont retournées, brossées et parfois frottées au sel.

Dans la famille des fromages à pâte pressée non cuite se trouvent le saint-paulin, le cantal, le salers et le saint-nectaire. Le trait caractéristique de ces produits tient au fait que le caillé est assez fortement pressé dans les moules pour l'égouttage. Le caillé à dominante présure est émietté en petits morceaux après égouttage. Moulé dans des moules perforés, il est pressé pour en évacuer au maximum le lactosérum. Le temps de pressage varie selon le taux d'humidité que l'on veut donner à la pâte, celle du reblochon et du morbier est moins compacte que celle du cantal. Les fromages sont ensuite salés par immersion dans un bain de saumure et démoulés. Ils sont ensuite placés en cave humide pendant deux à trois mois. Pendant l'affinage, ils sont régulièrement retournés, frottés et parfois lavés. Les fromages de grande dimension comme le cantal et le laguiole sont moulés en plusieurs fois.

A l'exception du Roquefort, fabriqué avec du lait de brebis, la quasi-totalité des fromages à pâtes persillées est fabriquée à partir du lait de vache (bleu d'Auvergne, de Gex, des Causses, fourme d'Ambert). Le lait estensemencé de ferments lactiques et de présure. Le caillé obtenu est ensuite égoutté, émietté, salé puisensemencé avec les spores d'un champignon, le *Penicillium glaucum*, pour les bleus, ou le *Penicillium roqueforti* pour le Roquefort, puis il est ensuite tassé dans des moules. Après pressage, les fromages sont démoulés. Avant le départ en cave d'affinage, ils sont percés de part en part avec de longues aiguilles pour permettre à l'air de circuler dans la pâte et ainsi favoriser le développement des

moisissures pendant l'affinage. Celui-ci est long et minutieux, il se fait en cave à température et degré d'hygrométrie contrôlés.

La famille des fromages de chèvre est très vaste : picodon, valençay, sainte-maure, crottin de Chavignol, chabichou. Sa particularité n'est pas le type de fabrication mais la matière première qui est du lait de chèvre, pasteurisé ou non. Le lait est caillé par addition de ferments lactiques ou de présure. La quantité de présure utilisée et la durée de coagulation sont déterminantes dans la fabrication du fromage. Dans le cas du sainte-maure ou du crottin, on ajoute peu de présure et la coagulation est lente (24 heures). Par contre, pour fabriquer un fromage de chèvre de type pâte molle à croûte fleurie, l'emprésurage sera important et la coagulation ne durera qu'une heure. Le caillé obtenu est ensuite égoutté, moulé et salé. La durée de l'affinage dépend de la taille du fromage et de la consistance souhaitée. Lorsqu'il sort du moule, le fromage de chèvre est frais. Au bout de huit jours, il commence à développer des arômes et des saveurs typiques. Après deux semaines, son goût s'affirme nettement. Une fois sec, voire très sec - au bout de 3 à 4 semaines - sa pâte devient compacte et ferme.

La famille des fromages fondus est relativement récente puisque les premiers fromages fondus furent mis sur le marché en 1911 par une société suisse et que c'est en 1917 que fut créée la première fromagerie française pour ce type de fabrication, à Dôle dans le Jura. Les produits sont élaborés à partir d'une ou plusieurs variétés de fromages que l'on fait fondre. Pour obtenir un bouquet de saveurs, on associe souvent des fromages jeunes à des fromages affinés. Les éléments servant de matière première sont écroûtés, découpés, râpés, broyés avant d'être mélangés à d'autres produits laitiers, lait, crème, beurre... Des sels de fonte sont rajoutés car ils favorisent l'homogénéité et la stabilité du mélange et rendent le fromage onctueux. Ces ingrédients, définis par la réglementation, représentent au maximum 3 % du produit fini. Des épices ou des aromates sont également parfois ajoutées. La cuisson se fait par pasteurisation ou stérilisation. Les fromages fondus ont une teneur variable en matière grasse, pour les fromages allégés entre 20 et 30 %, pour les crèmes (de gruyère, de roquefort...) entre 50 et 60 % et pour les autres égale ou supérieure à 40 %.

4. *Lactococcus lactis* et le stress

Les bactéries lactiques, et en particulier *Lactococcus lactis*, jouent un rôle primordial dans les premières étapes de la transformation du lait, mais elles interviennent aussi, directement et indirectement, dans la phase d'affinage et dans la qualité sanitaire des produits. La croissance des bactéries en général, et de *Lactococcus lactis* en particulier, dépend des conditions nutritionnelles (sources de carbone et d'azote...) et physico-chimiques (pH, température, salinité...). Les conditions de culture en laboratoire sont souvent optimisées et contrôlées pour assurer une croissance rapide. A l'inverse, *Lactococcus lactis*, que ce soit dans son habitat naturel (plantes, sol) ou lors de sa mise en œuvre dans les processus industriels, doit faire face à de multiples stress nutritionnels ou physico-chimiques (thermique, oxydatif, acide, osmotique) parfois concomitants (Bunthof *et coll.*, 1999 ; Sanders *et coll.*, 1999 ; Stuart *et coll.*, 1999). En effet, *L. lactis* est soumis à de fortes variations de températures dans le sol ou lors de la fabrication de fromages tels que le cheddar, pour lequel la température monte jusqu'à 40°C. A l'inverse, la température est beaucoup plus faible pendant l'affinage (8-16°C) ou le stockage du fromage. De même, la production de lactate dans les levains provoque, quant à elle, une acidification croissante du milieu (lait). Dans ce cas, les bactéries sont elles-mêmes à l'origine du stress acide. La pression osmotique est également susceptible de varier significativement, notamment lors du pressage. Cette étape peut également conduire à une limitation carbonée par l'élimination du lactose dans le lactosérum (Stuart *et coll.*, 1999).

Les mécanismes de perception du stress, essentiels pour que la cellule puisse se protéger avant que les effets de ce stress ne soient irréversibles, sont encore peu connus chez *Lactococcus lactis*, mais semblent se faire chez les autres bactéries, soit au niveau membranaire, soit au niveau du cytoplasme (Rallu, 1999).

Les effets du stress peuvent être visualisés à plusieurs niveaux : modification du catabolisme, de l'anabolisme, de l'état énergétique, des constituants cellulaires... Face aux différents effets du stress, les bactéries disposent de plusieurs types de réaction qui se répartissent en trois catégories (Rallu, 1999). La fuite consiste, pour les bactéries capables de motilité, à rechercher des conditions plus favorables à la croissance, mais *Lactococcus lactis* qui est dépourvu de flagelle ne peut pas utiliser cette tactique. Le refus a pour but de diminuer l'intensité du stress, par exemple en utilisant une autre source de nutriment lorsqu'elle est

épuisée. Enfin, la résistance devient nécessaire lorsque le stress est persistant et/ou dommageable pour les constituants cellulaires. Elle peut être acquise soit par une modification irréversible du matériel génétique (mutation, remaniement) conduisant à une meilleure tolérance aux conditions environnementales, soit par l'induction de systèmes de protection et de lutte contre le stress ou de réparation contre les dommages causés.

4.1. Le stress acide

L'acidité est utilisée comme conservateur depuis des millénaires, en particulier dans le cas des aliments fermentés. Dans ces conditions, les sucres contenus dans le produit sont oxydés en acides organiques, en alcool ou encore en CO₂. Ces produits agissent comme des conservateurs, en particulier les acides faibles qui présentent un fort potentiel anti-microbien car leur forme non-dissociée est capable de traverser librement la membrane cellulaire. Le pH cytoplasmique étant généralement supérieur au pH extérieur, une fois dans la cellule, ces acides vont se dissocier, libérant ainsi un proton qui va provoquer une acidification du cytoplasme (Presser *et coll.*, 1997). Ces acides sont parfois ajoutés aux produits alimentaires, d'où l'intérêt des aliments fermentés par les bactéries lactiques comme *L. lactis* qui convertit directement plus de 90 % du sucre consommé en acide lactique. Les effets du stress acide sur la physiologie bactérienne sont encore mal définis. Il semble cependant que la baisse du pH intracellulaire soit responsable d'une diminution de l'activité de certaines enzymes sensibles aux bas pH, et en particulier les enzymes glycolytiques, ce qui a pour conséquence une baisse de la production d'ATP, mais également d'une altération structurale de la membrane cellulaire ainsi que des macromolécules comme l'ADN ou certaines protéines. En effet, l'acidification intracellulaire cause une dépurination et une dépyrimidination de l'ADN. Ce mécanisme implique la protonation d'une base suivie du clivage de la liaison glycosyl laissant ainsi des résidus abasiques (Lindahl et Nyberg, 1972). L'enveloppe cellulaire est la première cible des stress physico-chimiques. Il semble que ce soit également le cas pour le stress acide puisque chez *S. mutans*, l'adaptation à l'acidification du milieu implique un enrichissement de la membrane en acides gras mono-insaturés à longues chaînes (Quivey *et coll.*, 2000) ce qui doit entraîner la diminution de la perméabilité aux protons qui est observée pour les cellules adaptées (Ma *et coll.*, 1997). L'accumulation cytoplasmique de composés anioniques affecterait également la physiologie cellulaire, probablement en chélatant certains éléments indispensables au fonctionnement du micro-organisme (Presser *et coll.*, 1997).

4.1.1. Mécanismes de résistance

4.1.1.1. L'expulsion de protons

L'ATPase-F₀F₁ est une enzyme ubiquitaire dans le monde bactérien et son architecture moléculaire ainsi que son fonctionnement ont été établis (Rastogi et Girvin, 1999 ; Sambongi *et coll.*, 1999 ; Stock *et coll.*, 1999). Il s'agit d'une enzyme multimérique dont l'activité est réversible car elle est capable soit de synthétiser de l'ATP en utilisant le gradient de protons transmembranaire, soit d'expulser des protons intracellulaires grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Cette protéine membranaire est composée d'un complexe F₀, enchassé dans la membrane, composé des sous-unités a, b et c qui forment un canal permettant le transport des protons (Nannen et Hutkins, 1991b) (Fig. I.10). Le complexe F₁ est, lui, situé à l'intérieur de la cellule, il est constitué des sous-unités α , β , γ , δ et ϵ , il possède une activité ATPase seule lorsqu'il est dissocié de la membrane mais couple synthèse ou hydrolyse de l'ATP à la translocation de protons lorsqu'il est complexé à F₀ (Fig. I.10).

Chez les bactéries lactiques, l'activité d'hydrolyse de l'ATP couplée à l'expulsion de protons augmente à bas pH et est cruciale pour le maintien du gradient de pH (Futai *et coll.*, 1989 ; Nannen et Hutkins, 1991a et b). L'activité de l'ATPase est essentielle à la croissance de *Lactococcus lactis* (Koebmann *et coll.*, 2000), sauf lorsqu'une chaîne de transport d'électrons est active (Blank *et coll.*, 2001 ; Duwat *et coll.*, 2001), et des mutants affectés dans cette enzyme montrent un défaut de croissance à bas pH (Yokota *et coll.*, 1994).

Le locus *atp* (*atp EBFHAGDC*) contient tous les gènes codant pour les 5 sous-unités du complexe cytoplasmique F₁ ainsi que ceux codant pour les 3 sous-unités formant le canal F₀ (Fig. I.10) (Koebmann *et coll.*, 2000). Contrairement à la plupart des autres bactéries, les streptocoques présentent une organisation particulière des gènes « F₀ » avec l'ordre *atpEBF* au lieu de *atpBEF*, et de plus, chez *S. mutans*, *S. sanguis*, *Lb. acidophilus* et *L. lactis*, aucun des opérons *atp* ne possède d'homologue du gène *atpI*, de fonction encore inconnue, en amont des gènes structuraux, cependant ces particularités ne semblent en aucun cas affecter la synthèse et l'activité de l'ATPase.

La stimulation de l'activité ATPase à bas pH peut résulter de différents phénomènes, la stimulation de la transcription de l'opéron *atp*, comme c'est le cas chez *L. acidophilus* (Kullen et Klaenhammer, 1999), chez les streptocoques oraux (Belli et Marquis, 1991), ou chez *Oenococcus oeni* (Fortier *et coll.*, 2003), et/ou la stabilisation des sous-unités de l'enzyme comme cela a été observé chez *E. hirae* (Arikado *et coll.*, 1999). Le pH optimum de

l'ATPase chez *L. lactis* est proche de la neutralité, entre 6,5 et 7,5 (Nannen et Hutkins, 1991b ; O'Sullivan et Condon, 1999). L'activité ATPase n'est donc pas maximale à bas pHi, toutefois, la quantité d'ATPase augmente lorsque le pH diminue (Nannen et Hutkins, 1991b ; O'Sullivan et Condon, 1999). Nannen et Hutkins (1991b) ont cependant observé une baisse de cette activité pour des pH inférieurs à 5, en corrélation avec le non maintien du ΔpH et la baisse très prononcée du pHi (Nannen et Hutkins 1991a et b).

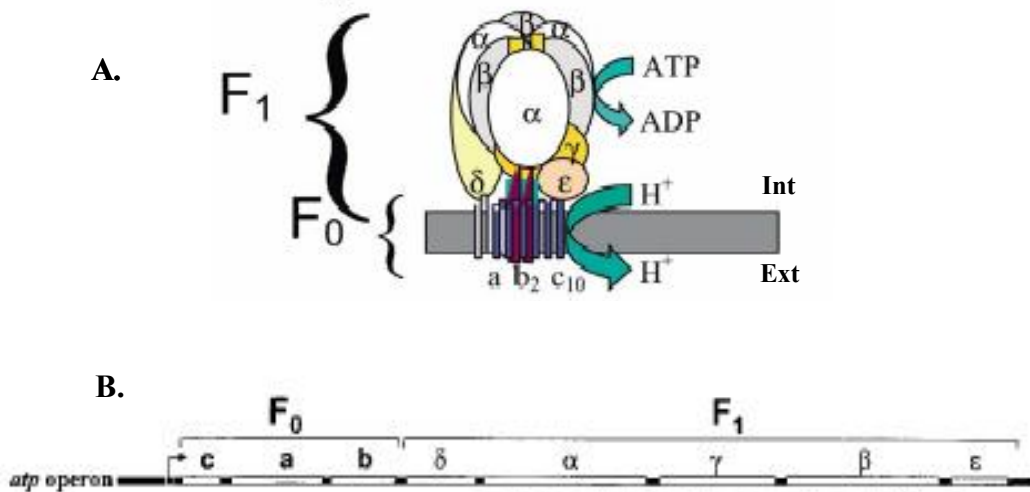


Figure I.10 : Représentation schématique de l'ATPase-F₀F₁ (A) et organisation génétique de l'opéron ATP de la souche *L. lactis* MG1363 (B, d'après Koebman *et coll.*, 2002).

En plus de l'ATPase-F₀F₁, d'autres ATPases couplées à un transport de cations, comme l'ATPase-K⁺, peuvent contribuer à l'homéostasie du pH grâce à un échange K⁺/H⁺ convertissant un potentiel transmembranaire en gradient de pH (Kashket, 1987). L'importance de la présence de potassium dans le milieu pour le maintien du pHi à bas pH a été montrée chez *S. mutans* (Bakker et Harold, 1980), mais également chez *L. lactis* (Kashket *et coll.*, 1977) et *E. hirae* (Kobayashi *et coll.*, 1982).

4.1.1.2. Production de composés basiques

Les bactéries ont développé d'autres systèmes de lutte contre l'acidification du cytoplasme. En effet, certaines vont produire des composés basiques et particulièrement de l'ammoniaque. Chez les bactéries à Gram positif, deux systèmes sont impliqués, la voie de l'arginine déiminase (ADI) ou la voie de l'uréase. L'uréase est une enzyme catalysant l'hydrolyse de l'urée en deux molécules d'ammoniaque et une molécule de CO₂. Si cette voie est très utilisée par les streptocoques, elle est absente des *lactococci*.

La désamination de l'arginine par la voie ADI est un mécanisme essentiel au maintien de l'homéostasie du pH chez *Lactococcus lactis* (Poolman *et coll.*, 1987b) (Fig. I.9). Trois enzymes, l'arginine déiminase, l'ornithine carbamoyl-transférase et la carbamate kinase sont impliquées dans cette voie qui permet la conversion de l'arginine en ornithine, ammoniaque, CO₂ et permet également la production d'ATP (cf. 2.2.3. Catabolisme et transport des acides aminés). L'ammoniaque ainsi produit va réagir avec des protons permettant l'alcalinisation du cytoplasme, et l'ATP généré pourra être utilisé par l'ATPase-F₀F₁ pour l'expulsion de protons. Les trois enzymes de la voie sont en général actives à bas pH (2-3) (Sanders *et coll.*, 1999). Il semblerait que la désamination de l'arginine soit une propriété phénotypique de la sous-espèce *lactis* et qu'elle soit très rarement observée chez *cremoris* (Sanders *et coll.*, 1999). Le transport de l'arginine s'effectue par un antiport arginine/ornithine et ne requiert donc pas d'énergie supplémentaire. L'échange arginine/ornithine est régulé par les gradients de concentration des deux métabolites (Poolman *et coll.*, 1987b). D'autre part, l'activité dans la voie ADI est affectée par le pool de nucléotides phosphate : une situation favorisant la consommation d'ATP favorise l'activité de la voie (Poolman *et coll.*, 1987b). Enfin, l'expression des gènes de la voie ADI ainsi que du transporteur arginine/ornithine est induite par l'arginine et réprimée par le glucose (Poolman *et coll.*, 1987b ; Christensen *et coll.*, 1999).

4.1.1.3. Réactions de décarboxylations et transports électrogéniques

Différents systèmes basés sur la décarboxylation d'un acide et un antiport électrogénique sont rencontrés chez les bactéries lactiques afin de contrecarrer la baisse du pH intracellulaire. Ils présentent tous un modèle commun, un composé acide (acide organique, acide aminé) est transporté, grâce à son gradient, à l'intérieur de la cellule où il subit une décarboxylation, un proton est consommé par cette réaction et le produit est exporté par un transporteur qui peut être électrogénique, c'est à dire qui va permettre de produire de l'ATP via la PMF générée.

Ce système fonctionne chez *L. lactis* ssp. *lactis* dans le cas du glutamate (Fig. I.11) (Sanders *et coll.*, 1999). La glutamate décarboxylase (*gadB*) est en opéron avec l'antiport glutamate/ γ -aminobutyrate (*gadC*) sous le contrôle de *gadR*, activateur transcriptionnel. L'expression de cet opéron augmente chez *L. lactis* ssp. *lactis* en présence de glutamate et à bas pH. Le pH optimum de la glutamate décarboxylase, évalué à 4,7, confirme son fonctionnement essentiellement à bas pH (Nomura *et coll.*, 1999). Cette activité glutamate décarboxylase ne semble pas présente chez la sous-espèce *cremoris* dans laquelle le gène *gadB* est présent mais l'expression est très faible (Nomura *et coll.*, 2000). De plus, une mutation de type «frameshift » dans le gène conduit à une protéine non fonctionnelle.

La présence de malate permet à certaines bactéries lactiques des genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Oenococcus* de désacidifier leur cytoplasme par le biais de la fermentation malolactique (Loubière *et coll.*, 1992 ; Konings *et coll.*, 1997 ; Tourdot-Marechal *et coll.*, 1999). Elle repose sur une enzyme, l'enzyme malolactique, qui décarboxyle directement le malate en lactate avec consommation d'un proton et production de CO₂, participant ainsi à la désacidification du cytoplasme (Konings *et coll.*, 1997). Chez *L. lactis*, le lactate est ensuite expulsé par un antiport lactate/malate (Poolman *et coll.*, 1991). Ce couplage de la réaction de décarboxylation du malate avec le système antiport malate/lactate génère une force protomotrice suffisante pour conduire à la formation d'ATP par l'ATPase (Fig. I.11) (Poolman *et coll.*, 1991). Les gènes codant pour l'enzyme malolactique (*mleA*) et la perméase (*mleP*) sont organisés en opéron chez *L. lactis* ou *O. oeni* (Denayrolles *et coll.*, 1994 ; Labarre *et coll.*, 1996a et b). Chez *Oenococcus oeni* le gène codant pour la protéine régulatrice *mleR* se trouve en amont de l'opéron *mle* alors que chez *Lactococcus lactis* le gènes codant pour l'activateur transcriptionnel est éloigné de *mleA* (Renault *et coll.*, 1989 ; Galland *et coll.*, 2003).

Les travaux de Magni *et coll.* (1999) sur *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* ont montré une diminution de l'effet inhibiteur du lactate sur la croissance par le co-métabolisme du glucose et du citrate. Le mécanisme impliqué est basé sur la capacité du transporteur CitP à fonctionner en antiport citrate/lactate (Fig. I.11) (Bandell *et coll.*, 1998 ; Magni *et coll.*, 1999). Le transport couplé du citrate et du lactate, associé à la décarboxylation de l'oxaloacétate, conduit à une alcalinisation du cytoplasme ainsi qu'à la génération d'une force protomotrice (Bandell *et coll.*, 1998 ; Magni *et coll.*, 1999). Cette voie du métabolisme du citrate serait induite à bas pH en fin de phase exponentielle de croissance, pour rendre les cellules plus résistantes aux effets inhibiteurs du lactate qui s'accumule dans ces conditions (Garcia-Quintans *et coll.*, 1998 ; Magni *et coll.*, 1999).

Chez *Lactococcus lactis*, l'excrétion de l'acide lactique a été étudiée à différentes valeurs de pH. Si à pH élevé l'excrétion est un processus électrogène, car plus d'un proton est expulsé avec le lactate, ce n'est pas le cas à bas pH car ce transport est alors électroneutre et ne peut contribuer à la formation d'une force protomotrice (Konings *et coll.*, 1997).

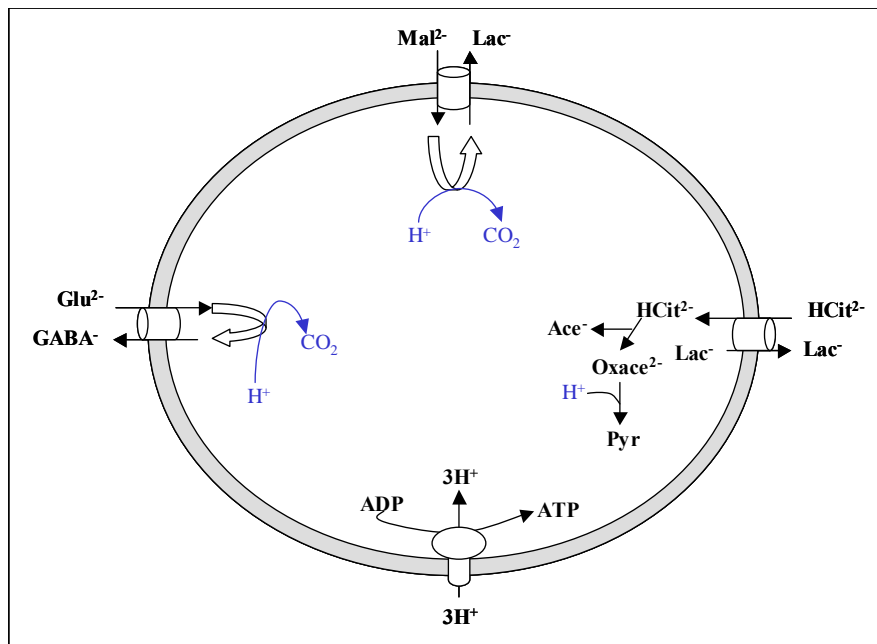


Figure I.11 : Représentation des différentes voies de décarboxylation des acides et systèmes de transports électrogéniques chez *Lactococcus lactis* (d'après Cotter et Hill, 2003).

Légende : Glu²⁻ : acide glutamique, GABA⁻ : acide gamma-amino butyrique, Mal²⁻ : acide malique, Lac⁻ : lactate, Hcit²⁻ : citrate, Ace⁻ : acétate, Oxace²⁻ : oxaloacétate, Pyr : pyruvate.

4.1.2 Réponse adaptative au stress acide

Lactococcus lactis mais également d'autres bactéries comme *S. typhimurium* (Foster et Hall, 1990) ou *E. coli* (Lin *et coll.*, 1995) présentent une réponse adaptative au stress acide que l'on appelle également ATR pour Acid Tolerance Response : l'exposition des bactéries à un stress d'intensité modérée leur confère une plus grande résistance lorsqu'elles sont ensuite confrontées à un stress normalement létal (Hartke *et coll.*, 1996 ; Rallu *et coll.*, 1996 ; O'Sullivan et Condon, 1997 ; Kim *et coll.*, 1999). La réponse adaptative a été mise en évidence chez *L. lactis* ssp. *cremoris* par Rallu *et coll.* (1996) et confirmée pour la souche NCDO 712 par O'Sullivan et Condon (1997). Ainsi, *L. lactis* ssp. *cremoris* MG 1363, prélevé en phase exponentielle de croissance et incubé au pH non létal de 4,5 pendant 15 min, présente un taux de survie de 100 % après 3 h d'incubation à pH 4, alors que ce taux était 10 000 fois plus faible sans préadaptation des cellules (Rallu *et coll.*, 1996). De même, *L. lactis* ssp. *lactis* IL 1403 voit son taux de survie augmenter lors d'un stress acide sévère (pH 3,9) après une incubation de 30 min à pH 5,5 (Hartke *et coll.*, 1996). Kim *et coll.* (1999) ont montré que cette réponse adaptative était moins marquée chez la sous-espèce *cremoris* que chez la sous-espèce *lactis*.

Les travaux de O'Sullivan et Condon (1997, 1999) sur la réponse adaptative de *L. lactis* ssp. *cremoris* NCDO 712 ont établi le rôle majeur du pH intracellulaire (pHi) dans l'acquisition de la résistance au stress acide. L'induction de cette réponse permet aux cellules de maintenir un Δ pH plus élevé que pour des cellules non adaptées et donc un pHi plus compatible avec les réactions biologiques. La survie de la bactérie en est alors améliorée. Le facteur déterminant dans l'acquisition de la résistance au stress acide semble être la valeur du pHi pendant la phase d'adaptation. Ce pHi optimum est de 5,9, qui correspond au pHi minimum pour lequel la croissance des cellules reste possible (O'Sullivan et Condon, 1999).

Toutefois, le taux de survie des cellules induites est plus élevé que pour des cellules non induites même si elles maintiennent un pHi identique lors du stress acide. Ceci suggère que le maintien d'un pHi plus favorable lors du stress intense, par la souche pré-adaptée, n'est pas le seul facteur impliqué dans l'augmentation de survie. La baisse du pHi pendant la préadaptation ou un autre facteur dépendant du pHi doit stimuler la synthèse protéique nécessaire à l'acquisition de la résistance au stress acide (O'Sullivan et Condon, 1997).

La réponse adaptative se caractérise en général par l'induction de certaines protéines. Hartke *et coll.* (1996) ont identifié 33 polypeptides induits dont 9 protéines de choc thermique (HSP), 4 communes avec le stress UV et 2 communes avec le stress oxydatif. A l'inverse, la plupart des autres protéines étaient présentes en moins grande quantité. Tandis que l'induction de ces protéines de choc acide apparaît comme indispensable à l'acquisition de la résistance au stress acide chez la sous-espèce *cremoris* (Rallu *et coll.*, 1996), elle n'est pas nécessaire pour la sous-espèce *lactis* (Hartke *et coll.*, 1996). Frees *et coll.* (2003) ont étudié l'effet de différentes valeurs de pH (5,5 ou 4,5) sur la synthèse protéique de la souche *L. lactis* MG1363. 23 protéines ont été identifiées et la majorité est induite dès pH 5,5. Plusieurs de ces protéines sont impliquées dans le stress oxydatif (AhpC, SodA), mais également dans le choc thermique (HSP14, HSP17, ClpE, ClpP). Certaines protéines, DnaK, GroES, GroEL et GrpE, qui sont des chaperonnes impliquées dans la réponse au choc thermique, ne sont induites qu'à pH 4,5 et semblent indiquer la présence de protéines mal repliées à pH acide.

L'induction de la réponse adaptative chez *L. lactis* ssp. *cremoris* NCDO 712 augmente le taux de survie de la bactérie lorsqu'elle est soumise à un stress acide sévère mais la protège également contre d'autres stress, thermique, oxydatif, osmotique (O'sullivan et Condon, 1997). La réciproque n'est pas vraie sauf pour le choc thermique qui confère la résistance au stress acide. D'autre part, l'entrée des bactéries en phase stationnaire confère également une grande résistance au stress acide mais également à d'autres stress physico-chimiques (Hartke *et coll.*, 1996 ; Kim *et coll.*, 1999).

Les travaux de Rallu *et coll.* (1996 ; 2000) sur des mutants d'insertion de *L. lactis* ssp. *cremoris* MG 1363, résistants au stress acide, ont permis d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la réponse au stress acide et ont montré également une implication de la réponse stringente dans la résistance au stress acide chez *L. lactis*. Certains mutants se sont révélés résistants à d'autres stress, soulignant là encore un certain recouvrement des réponses au stress. Certains gènes présentent des homologies avec *hpt*, *relA*, *guaA* et *deoB*, gènes impliqués dans le métabolisme des nucléotides et la voie de biosynthèse de (p)ppGpp (Duwat *et coll.*, 1999 ; Rallu *et coll.*, 2000).

4.2. Le stress hypothermique

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes mésophiles ou thermophiles. Au cours des procédés industriels, pendant l'affinage des fromages ou la réfrigération des produits fermentés, elles sont exposées à des températures inférieures à leur optimum. La baisse de température entraîne des modifications physiologiques importantes, tout d'abord une diminution de la fluidité membranaire, une stabilisation des structures secondaires des acides nucléiques, ainsi qu'une diminution de l'efficacité de la réplication, de la transcription et de la traduction et un ralentissement du métabolisme. En réponse à une brusque diminution de la température, les bactéries ont développé une réponse adaptative. Ainsi, la réponse au « choc froid » implique la synthèse de protéines dites CIPs (cold induced proteins) dans le but de maintenir la fluidité membranaire en augmentant la proportion d'acides gras plus courts et/ou insaturés, de conserver le surenroulement de l'ADN en réduisant le surenroulement négatif et de permettre la transcription et la traduction nécessaires à l'adaptation à basse température (Phadtare *et coll.*, 2000).

4.2.1. Réponse adaptative au froid

Les bactéries lactiques peuvent s'adapter rapidement à une baisse de température. Après une baisse de température de 20°C en phase exponentielle, *L. lactis* continue sa croissance mais avec une vitesse plus faible, tandis qu'une chute de température plus importante va elle entraîner l'arrêt de la croissance (Panoff *et coll.*, 1994 ; Kim et Dunn, 1997 ; Wouters *et coll.*, 1999a).

Les protéines les plus fortement induites suite à un choc hypothermique comprennent une famille de protéines de bas poids moléculaire (environ 7,5 kDa), les CSPs (Cold Shock Proteins). Il s'agit de protéines relativement bien conservées aussi bien chez les bactéries à Gram positif qu'à Gram négatif (Wouters *et coll.*, 2000c). Ces protéines sont exprimées différemment selon les conditions de culture, chez *E. coli* par exemple seules 4 des 9 CSPs sont induites par un « choc froid » (Yamanaka *et coll.*, 1998 ; Wang *et coll.*, 1999). Les protéines CSPs sont des « tonneaux β » possédant deux motifs de liaison aux acides nucléiques, ADN simple brin et ARN, capables de déstabiliser leurs structures secondaires (Graumann *et coll.*, 1997 ; Jiang *et coll.*, 1997 ; Hanna et Liu, 1998 ; Phadtare et Inouye, 1999). Ces protéines agissent donc probablement comme des chaperonnes de l'ARN en

facilitant la transcription et la traduction à basse température (Graumann *et coll.*, 1997 ; Jiang *et coll.*, 1997).

De nombreuses analyses protéomiques ont été réalisées qui ont révélé que l'adaptation au choc froid est également corrélée à la synthèse de CIPs (Cold Induced Proteins) ; 22 protéines induites ont été identifiées chez *L. lactis* (Panoff *et coll.*, 1994 ; Wouters *et coll.*, 1999a), 24 chez *S. thermophilus* (Wouters *et coll.*, 1999b) et 11 chez *E. faecalis* (Panoff *et coll.*, 1997). Chez *L. lactis*, elles sont impliquées dans différents processus cellulaires comme le métabolisme des sucres (Hpr, CcpA, β -PGM), la structuration des chromosomes (HslA, protéines HU-like), la transduction du signal (LlrC : régulateur d'un système de transduction du signal à deux composants homologue à YycF, gène essentiel de *B. subtilis*), et l'adaptation au stress osmotique (OsmC). Une protéine non identifiée de 45 kDa pourrait correspondre à l'ATP'ase ClpX impliquée dans la dégradation des protéines endommagées par le froid (Wouters *et coll.*, 1999b; Skinner et Trempy, 2001). La réponse adaptative au froid implique également la synthèse de protéines CSPs. Le nombre de gènes *csp* varie selon les sous-espèces et les souches, par exemple seulement 2 gènes codant pour des CSPs ont été identifiés pour la souche *L. lactis* ssp. *lactis* IL1403 (Bolotin *et coll.*, 2001) alors que 7 gènes sont présents dans le génome de la souche *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 (Wouters *et coll.*, 2000b).

4.2.2. Régulation des CSPs

L'induction des CSPs par le froid est complexe mais malgré tout probablement essentiellement contrôlée à un niveau post-transcriptionnel (Brandi *et coll.*, 1996 ; Goldenberg *et coll.*, 1996 ; Fang *et coll.*, 1997 ; Kaan *et coll.*, 1999). Chez *B. subtilis*, une seule CSP est requise pour la viabilité cellulaire puisque la délétion d'un ou plusieurs gènes codant pour ces protéines entraîne une compensation de la part des gènes restant puisque leurs niveaux d'expression augmentent (Graumann *et coll.*, 1997). Chez *E. coli*, les CSPs agissent comme anti-terminateurs de la transcription des gènes induits par le froid (Bae *et coll.*, 2000). Chez *B. subtilis* par contre, les CSPs co-localisent avec les ribosomes et sont certainement impliquées dans la traduction, puisqu'elles pourraient agir en tant que facteurs alternatifs d'initiation de la traduction (Mascarenhas *et coll.*, 2001 ; Weber *et coll.*, 2001a et b).

Des analyses transcriptomiques et protéomiques ont révélé que chez *L. lactis* ssp. *cremoris*, 5 des 7 CSPs (A, B, C, D et F) seulement sont induites par un choc froid avec une expression maximale à 10°C et minimale à 20 et 4°C. Wouters *et coll.* (2001) ont suggéré une régulation des membres de la famille CSP par certaines CSPs ainsi donc que la nécessité d'un niveau minimal de ces protéines dans la cellule. De même, la surproduction ou la délétion de CSPs modifie les niveaux de certaines CIPs impliquées dans l'adaptation au froid, OsmC, HslA, LlrC et 3 autres protéines non identifiées.

4.3. Autres stress physico-chimiques

4.3.1. Stress osmotique

Outre les stress acide et hypothermique, les lactococci sont soumis à d'autres stress physico-chimiques au cours des procédés fromagers. Ils sont soumis à de brusques variations de l'osmolarité environnante lors par exemple de l'égouttage/pressage ou du salage des produits. Lorsque les bactéries se trouvent dans un environnement hyper-osmotique, il y a diffusion d'eau de l'intérieur vers l'extérieur des cellules entraînant une diminution du volume cellulaire puis la plasmolyse. La perte d'eau va inhiber certains processus physiologiques comme le transport des nutriments, la réplication de l'ADN ou la biosynthèse des macromolécules. Ce phénomène n'est, bien sûr, pas observé lorsque la solution hyper-osmotique contient des molécules diffusibles comme le glycérol ou l'éthanol. Il n'y a pas de plasmolyse chez les bactéries à Gram positif car elles ont une pression de turgescence supérieure à celle des Gram négatif car leur membrane est collée au peptidoglycane. Cependant un stress osmotique entraînera quand même un arrêt de la croissance ainsi que l'inhibition d'autres fonctions biologiques. De la même façon, lors d'un choc hypo-osmotique, il va y avoir un afflux d'eau vers l'intérieur de la bactérie provoquant un gonflement, une augmentation de la pression de turgescence s'exerçant sur la membrane allant parfois jusqu'à l'éclatement cellulaire (Glaasker *et coll.*, 1998 ; Poolman et Glaasker, 1998).

En réponse à ces phénomènes physiques, la cellule ne se contente pas de voir son volume varier, elle va mettre en place un système actif permettant d'équilibrer les pressions osmotiques sans mouvements d'eau. Ce système est basé sur l'entrée ou la sortie de solutés qui peuvent être récupérés dans le milieu ou néosynthétisés, appelés solutés compatibles.

Les solutés impliqués dans ces phénomènes sont dits compatibles car leur accumulation dans le cytoplasme bactérien n'a aucun effet sur les processus cellulaires vitaux. Parmi eux, on trouve des ions (K^+), des acides aminés (proline, glutamate, glutamine), des polyols, des sucres (sucrose, tréhalose) ainsi que des composés ammonium quaternaire (glycine bêtaïne et carnitine).

Certains de ces composés sont dits osmoprotectants car en plus d'être compatibles avec la physiologie cellulaire, ils sont capables de lever les différentes inhibitions (croissance...) imposées par le stress osmotique. Les osmoprotectants les plus importants sont la proline et surtout la glycine bêtaïne qui en plus de modifier l'osmolarité cellulaire est capable de se lier aux protéines et de les stabiliser. Ces solutés peuvent être accumulés dans la cellule grâce à un transport actif ou dans certains cas grâce à une synthèse de novo induite par le stress (Glaasker *et coll.*, 1998 ; Poolman et Glaasker, 1998).

Chez les bactéries à Gram négatif, un stress hyper-osmotique va entraîner des mouvements de solutés compatibles. Les premiers transporteurs activés suite à un tel stress chez *E. coli* sont ceux responsables de l'entrée d'ions K^+ . Deux types de systèmes sont impliqués, un système à deux composants, Kdp dont KdpD est la protéine kinase-senseur membranaire probablement activée par une altération des interactions protéines-lipides (Poolman *et coll.*, 2002), et KdpE est la protéine régulatrice associée qui une fois phosphorylée va activer les gènes *kdpABC* du transporteur. Le second système, Trk, est également régulé au niveau transcriptionnel et son activité dépend de la pression de turgescence, de l'osmolarité interne et/ou de la concentration intracellulaire en K^+ .

Chez *Bacillus subtilis*, un tel choc induit également l'accumulation d'ions K^+ dans le cytoplasme puis une augmentation soit de la bêtaïne soit de la proline intracellulaire par transport ou synthèse *de novo*. Il existe trois systèmes de transport osmorégulés chez *B. subtilis*, OpuA qui est de la famille des transporteurs ABC (homologue à ProU d'*E. coli*), OpuC (ProP), et OpuD qui est un homologue de BetT, transporteur de haute affinité pour la choline indispensable à la néo-synthèse de glycine-bêtaïne chez *E. coli* (Kappes *et coll.*, 1996). Contrairement aux lactocoques, *B. subtilis* est capable comme *E. coli* de synthétiser de la glycine-bêtaïne (Boch *et coll.*, 1996) lorsque la choline (précurseur) se trouve dans le

milieu, par le biais d'enzymes analogues à celles trouvées chez *E. coli* qui sont ici codées par l'opéron *gbsAB* plasmidique.

Chez *Lactococcus lactis*, un choc hyper-osmotique entraîne également l'accumulation cytoplasmique de glycine bêtaïne qui paraît être le soluté le plus efficace pour ces bactéries. Ici, l'accumulation s'effectue grâce à un transport de glycine-bêtaïne exogène car les lactocoques, comme les lactobacilles (Glaasker *et coll.*, 1996 ; Glaasker *et coll.*, 1998), sont incapables de synthétiser ce composé. Obis *et coll.* (1999) ont caractérisé à l'aide de mutants les gènes impliqués dans ce transport. L'opéron *busA* comprend le gène *busAA* qui code pour la protéine BusAA (407 ac. Aminés) homologue à OpuAA de *B. subtilis* et ProV de *E. coli* qui sont des protéines de liaison à l'ATP. Le gène *busAB* code pour une protéine de 573 acides aminés qui comporte un domaine hydrophobe transmembranaire (N-term) et un domaine hydrophile C-terminal de liaison à la bêtaïne. BusAB présente des homologies avec OpuAC et ProV bien que les sous-domaines se trouvent inversés. L'opéron *busAB* semble sous contrôle osmotique, et outre la glycine-bêtaïne, ce transporteur peut également utiliser la proline mais avec une affinité moindre.

Van der Heide et Poolman (2000) nomment ce système de transport OpuABC. Pour eux, la régulation de l'entrée de la glycine-bêtaïne s'effectue au niveau de l'expression et de l'activité du transporteur chez *L. lactis*, alors que chez *Lb. Plantarum*, seule une régulation de son activité est impliquée. En effet, il a été mis en évidence chez *L. lactis* l'existence d'une protéine OpuR impliquée dans la régulation osmotique du gène *opuA* (Romeo *et coll.*, 2001). L'opéron *opuA* ou *busA* semble être induit par des changements de gradient osmotique transmembranaire ou de pression de turgescence qui seraient transmis au système via des distorsions de la bicouche lipidique induisant des modifications physiques du statut lipidique membranaire (plus d'acides gras insaturés et cycliques) ressenties via des interactions lipide/protéine (Guillot *et coll.*, 2000 ; van der Heide et Poolman, 2000).

La capacité d'accumulation de la bêtaïne va donc déterminer l'osmotolérance des lactocoques. Ainsi, la différence de tolérance au stress osmotique des bactéries de la sous-espèce *lactis* par rapport à celles de la sous-espèce *cremoris* (souches généralement moins résistantes) a pu être expliquée par une absence ou une faible activité du transporteur (Obis *et coll.*, 2001).

Ces systèmes permettent donc aux bactéries de contrecarrer les effets de l'hyperosmolarité du milieu, néanmoins, comme c'est le cas avec le stress acide, une meilleure réponse cellulaire (croissance, survie) est obtenue lorsque les bactéries ont été pré-adaptées par un stress non létal. L'analyse de la production de protéines en réponse à un choc hyperosmotique chez *L. lactis* a montré l'augmentation de la synthèse d'au moins douze protéines, dont celles impliquées dans le transport de la glycine-bétaïne (OpuAA et OpuABC) ainsi que DnaK, GroES et GroEL impliquées dans la réponse au choc thermique (Kilstrup *et coll.*, 1997). Comme c'est le cas pour les deux stress physico-chimiques précédents, il semble clairement que le stress hyper-osmotique induise des réponses croisées avec d'autres stress.

La réponse à l'hypo-osmolarité du milieu passe par l'efflux de solutés compatibles afin d'éviter le gonflement cellulaire. Cette réponse a essentiellement été étudiée chez les bactéries à Gram négatif, et deux systèmes d'efflux ont été identifiés à ce jour, les canaux mécanosensibles et les porines. Les canaux mécanosensibles ont été étudiés chez *E. coli* (Blount et Moe, 1999 ; Sukharev, 1999), trois canaux ont été mis en évidence en fonction de leur conductance : MscL (large conductance), MscS (small) et MscM (mini), il semble que MscL et S jouent un rôle important et redondant dans l'osmorégulation. Il semble que ces canaux soient activés soit par la tension exercée au niveau de la membrane soit par un état d'hydratation des protéines tel que la conformation ouverte du canal est favorisée (Poolman *et coll.*, 2002). Chez *Lactococcus lactis* les gènes *yncB* et *mscL* codent pour des protéines homologues à MscS et MscL. Seule l'activité de MscL est identifiée chez *L. lactis* qui utilise ce type de canal pour l'efflux de solutés compatibles et la protection cellulaire dans des conditions d'hypo-osmolarité (Folgering *et coll.*, 2005).

Les porines n'existent que chez les bactéries à Gram négatif car elles sont enchassées dans la membrane externe. L'expression des porines OmpF et C en réponse à l'osmolarité extracellulaire est régulée par un système à deux composants dont la protéine membranaire EnvZ est le senseur et OmpR l'activateur transcriptionnel (Csonka, 1989).

4.3.2. Stress oxydatif

Au cours des procédés industriels, *Lactococcus lactis* est amené à croître en présence d'oxygène. Le stress oxydatif ainsi rencontré peut être à l'origine de divers dommages cellulaires comme des interruptions de voies métaboliques, l'apparition de mutations spontanées ou encore l'arrêt de la croissance voire la mort cellulaire (Berlett et Stadtman, 1997 ; Fridovitch, 1998). Ce n'est pas l'oxygène lui-même qui est directement responsable de ces altérations, mais au cours des processus cellulaires l'impliquant, il va être réduit en eau (H_2O) de façon partielle et diverses espèces dites « réactives » vont également être formées : l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH^\bullet) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce sont ces composés, qui possèdent un très fort pouvoir oxydant, qui vont être responsables de la toxicité cellulaire liée à l'oxygène (Farr et Kogoma, 1991 ; Fridovich, 1998 ; Storz et Imlay, 1999). Dans certaines conditions, *Lactococcus lactis* peut tolérer voire même utiliser l'oxygène, il peut même présenter un métabolisme respiratoire lorsque de l'hème est rajouté au milieu de culture (Condon, 1987 ; Duwat *et coll.*, 2001). En absence de métabolisme respiratoire, la consommation d'oxygène va modifier l'état rédox de la cellule. Pour contrecarrer ce phénomène, la NADH oxydase est activée, et le métabolisme fermentaire devient mixte. Le flux est orienté vers la production d'acétate au détriment de l'éthanol, ce qui augmente le rendement énergétique et donc le rendement en biomasse. Ces modifications vont entraîner la formation et l'accumulation de H_2O_2 causant une diminution du taux de croissance et parfois la mort cellulaire.

Outre les effets sur le métabolisme énergétique, les différentes espèces réactives de l'oxygène vont pouvoir réagir avec différentes cibles cellulaires comme les protéines ou les acides nucléiques. En effet, H_2O_2 peut par exemple oxyder les résidus cystéine des protéines et ainsi inactiver certaines enzymes (Storz et Imlay, 1999), OH^\bullet peut quant à lui attaquer divers composés organiques, causer des cassures ou des modifications au niveau des bases de l'ADN (Czapski, 1984 ; Farr et Kogoma, 1991 ; Fridovich, 1998).

Les mécanismes de résistance au stress oxydatif sont variés chez *L. lactis*. Le plus commun implique l'action conjointe de deux enzymes, la NADH oxydase et la NADH peroxydase (Condon, 1987). La première utilise l'oxygène pour oxyder le NADH en NAD^+ , mais cette réaction produit du H_2O_2 qui pourra être transformé en eau par la seconde ($NADH + H^+ + O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O_2$; $NADH + H^+ + H_2O_2 \rightarrow NAD^+ + 2 H_2O$). Cependant, l'activité de cette dernière enzyme est très faible et l'absence d'activité catalase chez ces bactéries ne leur permet pas de se débarrasser efficacement du H_2O_2 très toxique. Une autre enzyme, la

SOD, est impliquée dans la neutralisation d'une espèce réactive de l'oxygène : le radical O_2^- ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$). Chez *L. lactis*, une seule de ces enzymes a été identifiée, le gène *sodA* code pour une superoxyde dismutase à manganèse dont l'expression est induite en condition d'aérobiose. La glutathione intracellulaire peut, comme la SOD, être impliquée dans l'élimination des radicaux O_2^- . van Niel *et coll.* (2002) ont mis en évidence chez une souche de lactocoque déficiente en NADH peroxydase et superoxyde dismutase (SOD) l'existence d'un système alternatif de neutralisation du peroxyde d'hydrogène par le pyruvate via une réaction non enzymatique, mais son importance est mal définie.

Il semble que la protéine RecA soit également impliquée dans la résistance vis à vis du stress oxydatif, en effet des mutants déficients pour le gène *recA* présentent une grande sensibilité à l'oxygène (diminution du taux de croissance et de la viabilité cellulaire) (Duwat *et coll.*, 1995). Il semble que RecA joue un rôle essentiel dans la réparation des dommages à l'ADN causés par les espèces réactives de l'oxygène. En effet, *recA* est co-transcrit avec le gène *fpg* qui code pour une formamidopyrimidine DNA glycosylase également impliquée dans la réparation de l'ADN (Duwat *et coll.*, 1995).

Tout comme les autres stress, un phénomène d'adaptation peut être mis en place en soumettant les lactocoques à des concentrations subléthales de peroxyde d'hydrogène (Condon, 1987). De même, l'adaptation à des stress comme l'irradiation UV, la carence ou de fortes températures peut induire l'expression de gènes qui vont également permettre la résistance au stress oxydatif (Duwat *et coll.*, 1995 ; Hartke *et coll.*, 1996 ; 1997). Le contrôle des mécanismes de résistance au stress oxydatif est encore peu connu. Chez *Bacillus subtilis*, de nombreuses fonctions impliquées dans les réponses aux stress sont régulées par des facteurs σ alternatifs. Seuls trois de ces facteurs (RpoD, ComX et SigX) sont présents chez *L. lactis* (Bolotin *et coll.*, 2001). ComX est spécifique des gènes de compétence, aucune fonction n'a été associée à SigX pour l'instant, mais RpoD qui est impliqué dans la résistance à la chaleur chez *Bacillus subtilis* (Huang *et coll.*, 1997) pourrait également être impliqué dans la résistance au stress oxydatif. Des systèmes de régulation à deux composants (O'Connell-Motherway *et coll.*, 1997 ; 2000) ainsi que les pools intracellulaires de guanosine phosphate et/ou de phosphate (Duwat *et coll.*, 1999 ; Duwat *et coll.*, 2000) pourraient également être impliqués dans la régulation de cette réponse.

4.3.3. Stress hyper-thermique

Au cours de la fabrication de certains fromages, les fortes températures rencontrées au cours de la « cuisson » peuvent être à l'origine d'altérations cellulaires majeures. Les protéines intracellulaires vont se dénaturer puis s'agréger, diverses macromolécules comme les ribosomes ou l'ARN vont être déstabilisées et la fluidité membranaire va augmenter posant des problèmes de perméabilité excessive et de transport (Earnshaw *et coll.*, 1995 ; Teixeira *et coll.*, 1997 ; Hansen *et coll.*, 2001).

La réponse au choc thermique ou heat shock (HS) a été très étudiée, notamment chez les bactéries lactiques. Ce type de stress provoque, chez *L. lactis*, l'induction de 17 protéines dont des protéines chaperonnes (DnaK, DnaJ, GrpE, GroES, GroEL) et des protéases (Clp, HtrA, FtsH) (Kilstrup *et coll.*, 1997). Les chaperonnes sont impliquées dans le repliement des protéines néo-synthétisées et la re-conformation des protéines dénaturées. La régulation de ces protéines, dont les gènes sont organisés en deux opérons, est assurée par la protéine HrcA qui reconnaît une séquence opératrice appelée CIRCE identifiée en amont de différents gènes chez *L. lactis* : *dnaJ* (van Asseldonk *et coll.*, 1993), *hrcA-grpE-dnaK* (Eaton *et coll.*, 1993).

Différents types de protéases sont induits par un stress hyper-thermique. HtrA, présent chez les *lactococci* (Poquet *et coll.*, 2000), est une sérine-protéase qui présente des fonctions de chaperonne ou de protéase selon la température, chaperonne à basse température et protéase quand celle-ci est normale ou élevée (Spiess *et coll.*, 1999). La protéine FtsH, qui est une métallo-protéase ATP-dépendante liée à la membrane, est essentielle chez *E. coli*. Le gène, également identifié chez *L. lactis* (Nilsson *et coll.*, 1994), est induit par une augmentation de la température, et RecA pourrait être impliqué dans sa régulation (Duwat *et coll.*, 1995). Le dernier type de protéase regroupe les protéases caséinolytiques, Clp. ClpP est une sérine-protéase multimérique qui dégrade les peptides inférieurs à 7 acides aminés. Lui sont associées des Clp-ATPases, 4 chez *L. lactis* (*clpB*, *clpC*, *clpE*, *clpX*), qui peuvent avoir une activité de chaperonne. ClpP peut s'associer à une Clp-ATPase pour former un complexe protéolytique dont la spécificité de substrat sera déterminée par l'ATPase. Après un choc thermique, ces protéines vont être responsables de la dégradation des protéines qui n'ont pût être repliées correctement. La transcription des gènes *clpB*, *C*, *E* et *P* est réprimée par la protéine régulatrice CtsR (Varmanen *et coll.*, 2000), mais TrmA semble également impliquée dans le contrôle de ces gènes.

Chapitre II : Matériels et méthodes

1. Les Souches

Les 6 souches utilisées au cours de cette étude sont d'origine fromagère et ont été fournies par la société Soredab. Quatre des souches sont des *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, dont trois (LD53, LD61 et LD71) appartiennent au biovar *diacetylactis*, tandis que la souche LL39 n'en fait pas partie. Les deux souches LC30 et LC40 sont quant à elles des *L. lactis* ssp. *cremoris*.

Ces souches se différencient par leur appartenance à différents ribogroupes ainsi que par leurs profils plasmidiques (Tableau II.1). Il faut noter que la souche principalement étudiée est la souche LD61.

Tableau II.1 : Liste et caractéristiques des souches utilisées au cours de cette étude.

Souche	sous-espèce	biovar	ribogroupe
LL39	<i>lactis</i>	-	58-S-1
LD53	<i>lactis</i>	<i>diacetylactis</i>	58-S-3
LD61	<i>lactis</i>	<i>diacetylactis</i>	58-S-6
LD71	<i>lactis</i>	<i>diacetylactis</i>	58-S-6
LC30	<i>cremoris</i>	-	157-S-2
LC40	<i>cremoris</i>	-	58-S-3

2. Fermentations

2.1. Milieux de culture

Le milieu M17 commercial (Difco), milieu complexe et riche, a été utilisé pour la plupart des précultures et cultures. Afin d'éviter tout problème de précipitation du sucre au cours de la stérilisation, le milieu M17 est reconstitué, stérilisé, puis une solution stérile de lactose 4X (200 g.L^{-1}) rajoutée avant la culture.

Deux milieux synthétiques chimiquement définis MS10 et MCD, présentés dans le tableau II.2, ont été utilisés (Cocaign-Bousquet *et coll.*, 1995), de même que deux milieux dérivés du MS10, le MS10r qui est supplémenté en riboflavine et le MS10rb qui contient, en plus de la riboflavine, des bases azotées en concentrations identiques à celles du MCD. Les cultures étant principalement réalisées à pH libre, la concentration en tampon phosphate correspond à celle habituellement employée lors des cultures en tubes, de façon à ralentir l'acidification du milieu et permettre une phase de croissance plus longue, en l'absence d'une régulation du pH. Afin de se rapprocher du milieu lait, l'ensemble des cultures est réalisée avec du lactose à 50 g.L^{-1} comme source de carbone.

Différents laits ont également été utilisés dans cette étude. Tout d'abord, il s'agit d'un lait écrémé en poudre Prolait à reconstituer et stérilisé par autoclavage (20' à 120°C). Ce lait stérilisé a été peu employé, car le chauffage provoque l'apparition de complexes de Maillard qui empêchent une croissance bactérienne optimale. Le second lait écrémé utilisé est le lait G (Standa industries). Ce lait est couramment utilisé dans l'industrie laitière pour la caractérisation de levains lactiques (culture et mesure de l'activité acidifiante). Il s'agit d'une poudre de lait stérilisée par ionisation, qui, prélevée aseptiquement (sous une hotte microbiologique) et diluée dans de l'eau distillée stérile, permet d'obtenir un lait stérile non thermisé dont la composition est garantie. D'autres laits plus complexes ou supplémentés ont été réalisés. Tout d'abord le milieu rétentat, lait concentré enrichi en caséines, est composé de poudre de rétentat de lait (852A Prolait) ainsi que de poudre de perméat (Armor protéine) à raison de 195 et 50 g.L^{-1} respectivement, et est thermisé (45' à 90°C). Des lait G supplémentés en acides aminés et/ou en vitamines en concentrations finales équivalentes à celles du MCD, de même qu'en Tryptone (10 g.L^{-1}) ou en extrait de levure (10 g.L^{-1}) ont également été utilisés.

Tableau II.2 : Composition des milieux de culture chimiquement définis, en g.L⁻¹.

Constituant	MCD	MS10
Lactose	50	50
Acétate de sodium	1	-
Citrate d'ammonium	0,6	-
Sulfate d'ammonium	-	0,6
KH ₂ PO ₄	9	9
K ₂ HPO ₄	7,5	7,5
L-Acides aminés		
Alanine	0,24	0,24
Arginine	0,12	0,12
Asparagine	0,34	0,34
Cystéine	0,17	0,17
Glutamine	0,51	0,51
Glycine	0,17	0,17
Histidine	0,11	0,11
Isoleucine	0,2	0,2
Leucine	0,47	0,47
Lysine-HCl	0,35	0,35
Méthionine	0,12	0,12
Phénylalanine	0,28	0,28
Proline	0,68	0,68
Sérine	0,34	0,34
Thréonine	0,23	0,23
Tryptophane	0,05	0,05
Tyrosine	0,29	0,29
Valine	0,33	0,33
Sels		
MgCl ₂ , 6 H ₂ O	0,2	0,2
FeSO ₄ , 4 H ₂ O	0,011	-
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,05	-
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	0,005	-
COCl ₂ , 6 H ₂ O	0,0025	-
Vitamines		
Ac. <i>P</i> -aminobenzoïque	0,01	-
Biotine	0,01	0,01
Cyano-cobalamine	0,001	-
Ac. Folique	0,001	-
Inosine	0,005	-
Ac. Nicotinique	0,001	0,001
Ac. Orotique	0,005	-
Pantothénate de calcium	0,001	0,001
Pyridoxamine	0,005	0,005
Pyridoxine	0,002	-
Riboflavine	0,001	-
Thiamine	0,001	-
Ac. D,L-6,8-thioctique	0,0025	-
Bases azotées		
Déoxy-thymidine	0,005	-
Adénine	0,01	-
Guanine	0,01	-
Uracile	0,01	-
Xanthine	0,01	-

2.2. Techniques de culture

L'ensemble des fermentations, en fioles de culture ou en fermenteurs, sont effectuées avec une agitation permanente du milieu, et majoritairement en conditions d'anaérobiose, après dégazage et maintien du milieu sous atmosphère d'azote. Des cultures en aérobiose (aération en continue), et micro-aérobiose (aération du milieu puis maintien en surpression d'azote) ont été plus rarement réalisées.

2.2.1. Conservation des souches

Des cellules en cultures sont récoltées après une croissance de 16 heures en milieu M17 lactose, à 30°C, mélangées volume à volume avec une solution cryoprotectrice, «M177», réparties dans des cryo-tubes Nunc et conservées à -80°C. La solution cryoprotectrice est composée de NaCl (18 g.L⁻¹), KCl (0,8 g.L⁻¹), CaCl₂ (0,8 g.L⁻¹), Na₂CO₃ (0,4 g.L⁻¹), glycérol (300 g.L⁻¹) et MOPS (6 g.L⁻¹), ajustée à pH 7 et stérilisée, 20 minutes à 120°C.

2.2.2. Précultures

Les précultures sont réalisées dans des flacons en verres sertis à l'aide de bouchons butyle, imperméables à l'oxygène. Le milieu M17 de chez Difco est reconstitué, dégazé à l'azote et stérilisé dans les flacons par autoclavage pendant 20 minutes à 121°C. Avant ensemencement, une solution concentrée stérile de lactose (200 g.L⁻¹) est rajoutée afin d'obtenir un milieu M17 à une concentration finale de 50 g.L⁻¹ de lactose.

Les fioles sont ensuiteensemencées à 1% de leur volume à partir de cryotubes de conservation préalablement décongelés, et mises à incuber sur table agitante dans une chambre à 30°C. Suivant le volume de culture final envisagé, des précultures successives dans des fioles de volume croissant sont réalisées tout en s'assurant que les cellules soient toujours inoculées en phase de croissance. Pour s'en assurer, les précultures sont suivies par mesure de l'absorbance à 580 nm.

En milieu riche, lorsque le volume de culture est inférieur ou égal à 2 L, le faible ensemencement initial (densité optique à 580 nm, $DO_{580} \approx 0,01$) ne nécessite pas une concentration préalable des cellules puisque le volume d'inoculum est faible. Pour une culture de 20 L ou en milieux chimiquement définis, afin d'éviter un phénomène de dilution ou un apport en nutriments, la préculture est centrifugée (6000 rpm, 10 min, 4°C) puis les cellules lavées et concentrées dans un tampon phosphate (KH_2PO_4 à 9 g.L⁻¹ et K_2HPO_4 à 7,5 g.L⁻¹) avant d'être inoculées.

2.2.3. Cultures discontinues en fermenteurs

Les cultures discontinues sont réalisées dans des fermenteurs de 2 ou 20 litres (SETRIC Génie Industriel, Toulouse, France). Différents paramètres comme l'agitation, le pH ou la température sont mesurés et régulés par un module de contrôle Sétric. L'agitation est toujours fixée à 250 rpm. La température est maintenue à 34°C par une résistance chauffante et un circuit de refroidissement pour les fermenteurs de 2 L, ou par une résistance chauffante et une double enveloppe avec circulation d'eau froide pour le fermenteur de 20 L. Lors de cultures nécessitant une baisse contrôlée de la température, de 34 à 12°C, un groupe froid est rajouté au niveau du fermenteur afin d'alimenter la double enveloppe en eau très froide. Lorsque les cultures sont réalisées à pH régulé, ce dernier est ajusté par ajout automatique de KOH 10 N.

Les fermenteurs de 2 L sont lavés et stérilisés une première fois avec de l'eau distillée (20 min, 121°C) puis ils sont équipés (sonde pH, tuyaux, filtres...) avant d'être stérilisés à nouveau avec de l'eau distillée ou le milieu de culture. Le fermenteur de 20 L est, quant à lui, stérilisé « in situ » à la vapeur (30 min, 120°C). Certains laits, ainsi que le milieu M17, sont stérilisés directement dans le fermenteur, dans ce cas le lactose stérile concentré est rajouté stérilement à l'aide d'une pompe. Les milieux chimiquement définis tels que le MCD, le MS10 et ses dérivés sont introduits stérilement dans les fermenteurs, via une cartouche de filtration Sartorius de porosité de 0,2 µm, après que l'eau ait été vidangée. Enfin, le lait G concentré et préparé aseptiquement est introduit de façon stérile dans le fermenteur à l'aide d'une pompe et d'un tuyau stérile. Pour ce lait le fermenteur est autoclavé avec un volume précis d'eau distillée qui permettra après mélange avec le lait concentré, l'obtention d'un lait G de concentration désirée.

Dans le cas des cultures anaérobies, le milieu stérile est dégazé à l'azote pendant 30 minutes puis maintenu sous pression d'azote (20 mbars). Pour les cultures en aérobiose, le milieu bénéficie d'une aération permanente par bullage d'air dans le fermenteur tandis que pour les conditions de micro-aérobiose, de l'air est envoyé dans le milieu pendant 30 minutes avant que le fermenteur ne soit placé en surpression d'azote.

Les prélèvements sont effectués régulièrement toutes les 30 minutes par le biais d'un tuyau situé en bas des fermenteurs qui est purgé avant chaque prélèvement.

2.2.4. Cultures en CINAC

Le CINAC (CINétique d'ACidification) est un système qui permet un suivi de l'acidification en continu, sur plusieurs cultures en parallèle. Les différentes sondes pH mises en œuvre sont reliées à un micro-ordinateur pour l'acquisition des données. Les mesures fournies par les sondes sont traitées par le logiciel « cinac » et vont permettre de caractériser les levains à l'aide de descripteurs calculés à partir de l'étude en temps réel des cinétiques d'acidification (vitesse maximale d'acidification, pH à 24 h, temps de latence ...).

Les cultures sont réalisées dans des bouteilles de 250 mL, les milieux sont préparés et stérilisés dans les flacons. Les sondes pH nettoyées et étalonnées sont insérées dans des bouchons butyles stériles permettant une fermeture hermétique des flacons et introduites dans les bouteilles contenant les milieux. Ceux-ci sont ensuite placées dans un bain-marie thermostaté réglé à 34°C, puis l'enregistrement du pH est initialisé. L'ensemencement est effectué à partir de précultures en milieu M17-lactose de façon à obtenir une DO_{580} initiale de 0,01 pour chaque culture. Chaque culture est réalisée en double, les pH initiaux, avant ensemencement, et à 24 h sont vérifiés sur une même électrode externe afin de s'assurer qu'il n'y a eu aucune dérive des électrodes Cinac au cours des 24 heures de mesure.

3. Techniques analytiques exo-cellulaires

3.1. Mesure de la biomasse

3.1.1. Turbidimétrie

La croissance est évaluée instantanément par mesure de l'absorbance de la culture à une longueur d'onde de 580 nm (DO_{580}) à l'aide d'un spectrophotomètre Hitachi U 1100. Afin de respecter la gamme de linéarité de l'appareil ($DO_{580} < 0,6$) les échantillons sont dilués dans de l'eau distillée si nécessaire. Le milieu M17 est très riche en peptides et protéines qui lui confèrent une absorbance propre ($DO_{580} \text{ M17} = 0,2$) dont il faut tenir compte pour le suivi de croissance dans ce milieu.

Le lait est, quant à lui, un milieu très opaque qui ne permet pas un suivi direct de la croissance par mesure directe de l'absorbance, même après dilution de l'échantillon. La méthode de clarification du lait mise au point par Mercade *et coll.* (2005) est donc employée. Un volume de culture « lait » est mélangé à deux volumes d'une solution de clarification (EDTA 15 mM, NaOH 0,15 mM). Le culot cellulaire est lavé 3 fois à l'aide d'une solution d'eau physiologique (NaCl 0,9 %) puis resuspendu dans un volume d'eau physiologique. L'absorbance à 580 nm de l'échantillon ainsi obtenu peut alors être mesurée directement ou après dilution, afin de rester dans la gamme de linéarité du spectrophotomètre. Ce protocole permet un suivi en direct de l'évolution de la biomasse au cours de cultures en lait, ce qui représente un avantage par rapport aux techniques classiques de numération sur boîtes plus longues, fastidieuses et imprécises.

3.1.2. Gravimétrie

La masse sèche de la biomasse contenue dans un échantillon de culture en milieu M17 de volume connu est déterminée après filtration au travers d'une membrane de porosité de 0,45 μm , lavage, séchage des filtres à l'étuve sous vide (24 h, 200 mbar, 60°C) et pesée à l'aide d'une balance de précision (Sartorius). La masse sèche est obtenue par la différence entre les masses du filtre après et avant filtration.

Des corrélations entre la DO_{580} et la concentration en biomasse (X , en $g.L^{-1}$) ont pu être établies pour les différentes souches utilisées.

$X = 0,3 \times DO_{580}$ pour les souches *L. lactis* ssp. *lactis* LL39, LD53, LD61 et LD71.

$X = 0,28 \times DO_{580}$ pour les souches *L. lactis* ssp. *cremoris* LC30 et LC40.

3.2. Dosage des produits de fermentation

Le surnageant des échantillons prélevés au cours des fermentations est analysé par chromatographie liquide à haute pression (HPLC). L'appareil utilisé est un chromatographe Hewlett-Packard série 1050, équipé d'un passeur d'échantillons automatique (Spectra physics SP 8875) dont le volume de la boucle d'injection est de 20 μL , d'une pré-colonne (Biorad microguard) et d'une colonne de type « H^+ » (Biorad HPX87H) qui effectue une double séparation par exclusion et échange d'ions. L'éluant employé, H_2SO_4 5 mM, circule à un débit de 0,5 $mL.min^{-1}$ et la température de la colonne est maintenue à 48°C à l'aide d'un coffret de régulation thermique (Croco-Cil). Une double détection est réalisée par le biais d'un spectrophotomètre UV à une longueur d'onde de 220 nm (pour le citrate, le lactate, le formiate et l'acétate) et d'un réfractomètre HP 1047A (pour le lactose, le glucose, le galactose et l'éthanol) tous deux branchés en série. L'acquisition et le traitement des données sont effectués à l'aide du logiciel Chemstation (Hewlett-Packard).

Lorsque les surnageants de culture sont chargés en protéines (milieux M17 et laits) les échantillons doivent subir au préalable une étape de défécation. Un volume de 800 μL de surnageant de culture est mélangé avec 100 μL d'Hydroxyde de Baryum à 0,3 M et 100 μL de Sulfate de Zinc à 0,3 M, vortexé puis centrifugé pendant 10 minutes à vitesse maximale. Le surnageant ainsi traité peut alors être dosé à l'HPLC.

Durant les fermentations, les surnageants de culture sont congelés après élimination des cellules par centrifugation (8000 rpm, 10 min). En ce qui concerne les cultures en lait, les échantillons entiers, cellules et milieu, sont congelés rapidement. Au moment de l'analyse les échantillons décongelés sont déféqués et centrifugés afin d'éliminer en même temps les cellules et les protéines du lait. Les quantités de lactose présentes dans les différents milieux (50 $g.L^{-1}$) étant très élevées et supérieures à la gamme de linéarité des détecteurs, les dosages sont réalisés sur les surnageants non dilués ainsi que dilués au demi.

3.3. Volume intracellulaire

La mesure du volume intracellulaire (Vic) est nécessaire pour la détermination des composantes de la force protomotrice ($\Delta\Psi$ et ΔpH). Un volume de culture correspondant à 150 mg de cellules au minimum est prélevé puis centrifugé (8000 rpm, 10 min, 4°C). Lors des cultures en lait, l'échantillon prélevé est clarifié afin de récupérer uniquement le culot cellulaire. Le culot peut être congelé tel quel à -20°C en vue d'un dosage ultérieur. La mesure du volume intracellulaire s'effectue par thermogravimétrie, en déterminant les proportions de matières sèches, d'eau interstitielle et d'eau intracellulaire dans ce culot (Uribelarrea *et coll.*, 1985).

La perte de masse du culot est suivie par séchage sur une balance infra-rouge (Sartorius) en fonction du temps. La cinétique d'évaporation de l'eau interstitielle, puis de l'eau intracellulaire est réalisée à 80°C, puis la masse sèche est déterminée après chauffage à 120°C. La cinétique d'évaporation présente un point de cassure après l'évaporation de la totalité de l'eau interstitielle, et lorsque l'eau intracellulaire commence à s'évaporer à son tour. Un traitement informatique des données obtenues permet de calculer la masse d'eau interstitielle, la masse d'eau intracellulaire et par conséquent le volume intracellulaire de la bactérie (en $\mu\text{L}.\text{mg}^{-1}$).

masse du volume interstitiel = masse du culot humide – masse du culot au point de cassure

masse du volume intracellulaire = masse du culot au point de cassure – masse sèche

Vic = masse du volume intracellulaire / masse sèche

Pour *Lactococcus lactis* ce Vic a été déterminé et correspond à 2,52 $\mu\text{L}.\text{mg}^{-1}$ de masse sèche.

4. Mesure des activités enzymatiques

4.1. Enzymes de la glycolyse et du métabolisme central

4.1.1. Préparation des extraits cellulaires

Les extraits cellulaires sont préparés selon le protocole décrit par Garrigues *et coll.* (1997), protocole qui a dû être adapté pour les cultures en lait (Mercade *et coll.*, 2005). Un volume de culture correspondant à 115 mg de cellules est prélevé puis centrifugé (6000 rpm, 10 min, 4°C). Lorsque les fermentations sont réalisées en lait, une étape de clarification de l'échantillon est nécessaire, ainsi le volume de culture est mélangé à deux volumes de solution de clarification (EDTA 15 mM, NaOH 0,15 M) avant l'étape de centrifugation. Dans tous les cas, le culot cellulaire est ensuite lavé volume à volume avec une solution de KCl à 0,2 %, à deux reprises pour les milieux synthétiques et le milieu M17, alors que trois lavages sont nécessaires pour les cultures en lait. Puis le culot cellulaire est resuspendu dans 5 mL de tampon de cassage : 150 mL de tampon Tris (400 mM)-Tricarballylate (15 mM) pH 7,2, 50 mL de glycérol, 20 mL de MgCl₂ (50 mM) et 750 µL de DTT (300 mM). Les extraits cellulaires sont conservés à -20°C dans ce tampon de cassage.

Le cassage des cellules est effectué à l'aide d'un sonicateur de haute densité Bioblock vibra-cell 72412 (600 W). La procédure comprend 5 cycles de cassage de 30 s, à 4°C, 20 % de puissance, avec 1 min de repos dans la glace entre chaque cycle. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation (15000 rpm, 10 min, 4°C). Le surnageant est conservé dans la glace pendant la totalité de l'analyse et une partie est congelée afin de réaliser un dosage de protéines.

4.1.2. Dosage des activités enzymatiques

Les activités enzymatiques sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre multicuve Hewlett Packard 8453 relié à un micro-ordinateur pour l'acquisition des données. Toutes les réactions sont couplées soit à l'oxydation du NADH, soit à la réduction du NAD⁺, qui sont suivies par mesure de l'absorbance à 340 nm ($\epsilon_{340} = 6,223 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Les données de DO sont traitées par le logiciel HP UV visible ChemStation Software. Les dosages des activités maximales sont effectués à pH 7,2, à 34°C, dans un volume final de 1 mL.

Lors de l'étude de l'effet du pH sur les enzymes, le tampon tris-HCl (400 mM) - acétate (100 mM) (dans une proportion de 1 volume/1 volume), au pH souhaité, est utilisé comme tampon pour l'ensemble des réactions. Celles-ci sont initialisées par l'extrait de façon à pouvoir au préalable ajuster le mélange réactionnel au pH souhaité. L'étude de l'effet de la température sur les activités enzymatiques ne nécessite aucune modification des protocoles de dosage.

Toutes les activités sont mesurées dans la zone de linéarité du dosage, il s'agit de la zone de proportionnalité entre la pente de DO mesurée (vitesse initiale) et la quantité d'extrait. Les protocoles de dosages utilisés proviennent de méthodes publiées qui ont, dans certains cas, été modifiées et optimisées.

Glucokinase (GLK) :

Le dosage est basé sur le protocole décrit par Thomas et Crow (1984). Le mélange réactionnel comprend du tampon Tris HCl (100 mM), MgCl₂ (5 mM), NADH (0,3 mM), ATP (2 mM), PEP (2 mM), pyruvate kinase (3 U.mL⁻¹), lactate déshydrogénase (10 U.mL⁻¹). La réaction est initialisée par le glucose (10 mM).

Lors de l'étude de l'effet pH sur la glucokinase, les concentrations de PEP et de lactate déshydrogénase sont multipliées par 2.

Glucose-6-phosphate isomérase (PGI) :

Le dosage est basé sur le protocole décrit par Gracy et Tylley (1975) et modifié comme suit par Even (2001) : le mélange réactionnel est constitué de tampon Tris HCl (100 mM), MgCl₂ (5 mM), NADH (0,3 mM), ATP (5 mM), phosphofructokinase (1 U.mL⁻¹), fructose-1,6-bisphosphate aldolase (1 U.mL⁻¹), glycérophosphate déshydrogénase (2 U.mL⁻¹), triose-phosphate isomérase (5 U.mL⁻¹) et c'est par le glucose-6-phosphate (10 mM) qu'est initialisée la réaction.

Lors de l'étude de l'effet du pH sur la glucose-6-phosphate isomérase, la concentration de glycérophosphate déshydrogénase est doublée.

Phosphofructokinase (PFK) :

La phosphofructokinase est dosée selon le protocole décrit par Le Bloas *et coll.* (1993) et modifié comme suit par Even (2001) : le mélange réactionnel est constitué de tampon triéthanolamine-HCl (100 mM, pH 7,2), MgCl₂ (5 mM), KCl (10 mM), NADH (0,3 mM), ATP (5 mM), fructose-1,6-bisphosphate aldolase (1 U.mL⁻¹), glycérophosphate déshydrogénase (2 U.mL⁻¹), triose-phosphate isomérase (5 U.mL⁻¹) et fructose-6-phosphate (20 mM) pour initialiser la réaction.

Lors de l'étude de l'effet du pH sur l'activité de cette enzyme, les concentrations de glycérophosphate déshydrogénase et de fructose-6-phosphate sont doublées.

Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) :

Le dosage est basé sur le protocole décrit par Le Bloas *et coll.* (1993). Le mélange réactionnel comprend du tampon triéthanolamine-HCl (100 mM, pH 7,2), KCl (200 mM), NADH (0,3 mM), glycérophosphate déshydrogénase (2 U.mL⁻¹), triose-phosphate isomérase (5 U.mL⁻¹). La réaction est initialisée par l'ajout de fructose-1,6-bisphosphate (30 mM).

Lors de l'étude de l'effet pH sur l'activité de la FBP aldolase, les concentrations de glycérophosphate déshydrogénase et fructose-1,6-bisphosphate sont multipliées par deux.

Triose-phosphate isomérase (TPI) :

Ce dosage a été mis au point par Dominguez *et coll.* (1998). Le milieu réactionnel est composé de tampon triéthanolamine-HCl (125 mM, pH 7,2), NADH (0,3 mM), glycérophosphate déshydrogénase (1 U.mL⁻¹) et le glycéraldéhyde-3-phosphate (6 mM) initialise la réaction.

Lors de l'étude de l'effet du pH sur l'activité de cette enzyme, la concentration de glycérophosphate déshydrogénase est doublée.

3-phosphoglycérate kinase (PGK) :

Ce dosage a été mis au point par Dominguez *et coll.* (1998). Le milieu réactionnel comprend du tampon triéthanolamine-HCl (125 mM, pH 7,2), NADH (0,3 mM), ATP (5 mM), glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (2 U.mL⁻¹), EDTA (1 mM), CaCl₂ (5 mM) et du 3-phosphoglycérate (10 mM) pour initialiser la réaction.

L'étude de l'effet du pH sur la 3-phosphoglycérate kinase a nécessité l'utilisation d'une solution de glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase deux fois plus concentrée que dans le protocole normal.

Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) :

La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est mesurée selon le protocole de Even *et coll.* (1999) sans l'étape de réactivation. Le milieu réactionnel est constitué de tampon triéthanolamine-HCl (125 mM, pH 7,2), NAD (5 mM), cystéine-HCl (5 mM), arsenate (40 mM) et le glycéraldéhyde-3-phosphate (6 mM, pH 7,2) initialise la réaction.

Lors de l'étude de l'effet du pH sur la GAPDH, les concentrations de NAD et de glycéraldéhyde-3-phosphate sont multipliées par deux.

Phosphoglycérate mutase (PMG) :

Cette activité est mesurée selon le protocole de Kulbe *et coll.* (1982). Le milieu réactionnel est constitué de tampon triéthanolamine-HCl (125 mM, pH 7,2), MgCl₂ (5 mM), KCl (10 mM), NADH (0,3 mM), ADP (3 mM), pyruvate kinase (3 U.mL⁻¹), lactate déshydrogénase (10 U.mL⁻¹), émolase (2 U.mL⁻¹). Le 3-phosphoglycérate (5 mM) est utilisé pour initialiser la réaction.

Lors de l'étude de l'effet du pH sur l'activité de la phosphoglycérate mutase, les concentrations de NADH et de lactate déshydrogénase sont divisées par deux, alors que la concentration d'émolase est doublée.

Enolase (ENO) :

Le dosage est basé sur le protocole de Siciliano et White (1987). Le milieu réactionnel est constitué de tampon Tris-HCl (100 mM, pH 7,2), MgCl₂ (5 mM), KCl (10 mM), NADH (0,3 mM), ADP (3 mM), pyruvate kinase (3 U.mL⁻¹), lactate déshydrogénase (10 U.mL⁻¹), et le 2-phosphoglycérate (5 mM) initialise la réaction.

Lors de l'étude de l'effet du pH sur l'émolase, les concentrations d'ADP, de pyruvate kinase et de 2-phosphoglycérate sont divisées par deux.

Pyruvate kinase (PK) :

Cette activité est mesurée selon le protocole de Thomas (1976) modifié par Garrigues (1998). Ainsi le mélange réactionnel est composé de tampon Tris-HCl (100 mM, pH 7,2), MnSO₄ (5 mM), KCl (10 mM), GDP (3 mM), NADH (0,3 mM), lactate déshydrogénase (10 U.mL⁻¹) et de PEP (6 mM, pH 7,2) qui initialise la réaction.

Lors de l'étude de l'effet du pH sur la pyruvate kinase, la concentration de lactate déshydrogénase est multipliée par deux.

Lactate déshydrogénase (LDH) :

Le protocole utilisé a été mis au point par Cocaign-Bousquet et Lindley (1995). Le mélange réactionnel comprend du tampon Tris-HCl (100 mM, pH 7,2), $MgCl_2$ (5 mM), NADH (0,45 mM), fructose-1,6-bisphosphate (3 mM). La réaction est initialisée par le pyruvate (20 mM).

Lors de l'étude de l'effet du pH sur la lactate déshydrogénase le protocole de dosage est inchangé.

NADH oxydase :

Cette activité est mesurée selon le protocole de Garrigues (1998). Le mélange réactionnel est composé de tampon Tris-HCl (100 mM, pH 7,2), $MnSO_4$ (5 mM) et NADH (0,3 mM). La réaction est ici initialisée par l'extrait.

4.1.3. Dosage des protéines des extraits

La méthode de Lowry *et coll.* (1951) est utilisée pour déterminer les concentrations en protéine totales des divers extraits enzymatiques. Cette méthode n'est linéaire que pour des concentrations en protéines comprises entre 0,01 et 0,1 $g.L^{-1}$. La gamme étalon est réalisée à chaque dosage à l'aide d'une solution de BSA (Bovine Serum Albumine) à 0,2 $g.L^{-1}$.

Un volume de 1 mL d'extrait à doser convenablement dilué, est incubé à l'obscurité pendant 10 minutes avec 3 mL de réactif C (décrit ci-dessous). Par la suite, 0,3 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma) dilué deux fois sont ajoutés. Le mélange réactionnel est alors rapidement homogénéisé puis incubé pendant 30 minutes à l'obscurité avant de lire l'absorbance à 750 nm.

Composition des réactifs utilisés pour le dosage des protéines :

- réactif A : solution de NaOH (0,1 M) avec 2 % (P/V) de Na_2CO_3 et 0,02 % (P/V) de tartrate de Na, K.
- réactif B : solution de $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ (0,5 %, (P/V)), contenant une goutte de H_2SO_4 concentré pour 100 mL de solution.
- réactif C : 50 mL de réactif A + 1 mL de réactif B.

4.1.4. Calcul des activités spécifiques

L'activité spécifique (AS) des enzymes relative à la biomasse ($\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) est calculée par la relation :

$$AS = \frac{a \times D1 \times 60.10^3}{\varepsilon \times l \times [\text{Prot}]} \times \text{PCT},$$

avec : a : pente d'activité (DO/min),

D1 : facteur de dilution de l'extrait dans l'essai enzymatique,

ε : coefficient d'absorption moléculaire du NADH ou de l'ONP,

l : trajet optique (1 cm),

[Prot] : concentration en protéine dans l'extrait (g.L^{-1}),

PCT : concentration des protéines cellulaires totales (g.g^{-1} de cellules), cette valeur est de 0,42 puisque la concentration de protéines dans la biomasse est estimée à 42 %.

4.2. Activité ATPase

4.2.1. Préparation de l'extrait

L'ATPase étant une protéine membranaire, un protocole d'extraction différent de celui décrit pour les enzymes cytoplasmiques est employé, méthode décrite par Drici-Cachon *et coll.* (1996). Un volume de culture correspondant à 20 mg de cellules est prélevé puis centrifugé (6000 rpm, 10 min, 4°C). Le culot est lavé volume à volume avec du tampon de lavage (MgCl_2 à 1mM), puis resuspendu dans 5 ml de ce même tampon. Les cellules peuvent être stockées à -20°C après cette étape. Pour les échantillons de culture en lait, une étape de clarification (EDTA 15 mM, NaOH 0,15 M) est rajoutée avant la première centrifugation, ainsi qu'un lavage supplémentaire dans le tampon MgCl_2 (1mM).

Au moment de l'extraction, l'échantillon décongelé est centrifugé (12000 rpm, 10 min, 4°C). Le culot est repris dans du tampon phosphate de potassium (73 mM, pH 6,5) contenant 0,05 % (V/V) de triton X-100, puis incubé pendant 24 heures à -20°C. L'extrait est ensuite décongelé puis centrifugé (12000 rpm, 10 min, 20°C), et le culot contenant les résidus lysés repris dans 5 ml de tampon de lavage (MgCl_2 à 1 mM).

4.2.2. Dosage de l'activité ATPase

Cette activité est évaluée par la mesure de la vitesse d'hydrolyse de l'ATP en ADP plus Pi à 37°C (Mercade, communication personnelle). Le dosage est réalisé en deux étapes. La mesure en continu de l'activité ATPase n'étant pas possible, elle est évaluée par arrêt de la réaction à différents temps, puis dosage du phosphate formé. Le protocole est le suivant :

Dans un tube à essai sont placés 100 µl d'extrait à doser, convenablement dilué, ainsi que 1,7 mL de solution à pH 7,8 contenant du Tris-HCl (24 mM), de l'EDTA (0,68 mM) et du MgCl₂ (6 mM) et 100 µL de solution contenant du NaCl (2 M) et du KCl (45 mM). L'ajout de 500 µL d'une solution d'ATP (20 mM) à 37°C, ajustée à pH 7,8 avec du Tris (1 M), déclenche la réaction. Celle-ci est ensuite arrêtée à différents temps par l'ajout de 1 mL de solution de HCl (0,2 N).

Le Pi formé est ensuite dosé selon le protocole de Benthin *et coll.* (1994), avec quelques modifications : 2 mL du mélange réactionnel sont incubés avec 2 mL de réactif molybdate pendant 15 à 30 minutes à température ambiante, puis la lecture de la densité optique est réalisée à 825 nm.

Le réactif molybdate, composé de 100 mL d'une solution contenant 1,25 g d'ammonium heptamolybdate et 10 mL d'acide perchlorique à 70 %, additionnée de 25 mL d'une solution d'acide ascorbique à 10 g.L⁻¹, est préparé extemporanément.

Une gamme étalon de phosphate subit le même traitement que l'extrait ATPase. La concentration finale dans la cuve, après l'ajout du réactif molybdate, doit être comprise entre 0,01 et 0,1 mM.

La concentration protéique de l'extrait est ensuite évaluée par la méthode de Lowry *et coll.* (1951) décrite précédemment (§ 4.1.3. Dosage des protéines des extraits), l'activité ATPase est alors exprimée en µmol Pi.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines :

$$\text{ATPase} = \frac{\text{Pi (fDO)} \times 68}{t \times [\text{Prot}]},$$

avec : Pi (fDO) : quantité de Pi correspondant à la DO de l'échantillon déterminée à l'aide de la gamme étalon de phosphate,

68 : facteur de dilution de l'extrait lors de la mesure de l'activité ATPase et du dosage du Pi,

t : temps en minutes au bout duquel est arrêtée la réaction ATPase avec le HCl,

[Prot] : concentration en protéine dans l'extrait (g.L⁻¹).

5. Mesure de la force protomotrice

La force protomotrice (FPM) est constituée de deux composantes, le gradient de proton, ΔpH , et le gradient électrique, $\Delta\Psi$. Les méthodes de détermination de ces paramètres impliquent une phase d'équilibre d'un ion radioactif entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, en fonction du ΔpH ou du $\Delta\Psi$ (Loubière *et coll.*, 1992). Dans une deuxième phase, les cellules sont séparées du milieu par centrifugation sur huile de silicone, pour compter la radioactivité du surnageant et du culot. Le calcul du ΔpH et du $\Delta\Psi$ suppose la détermination au préalable du volume du culot formé au cours de la centrifugation sur huile.

5.1. Mesure du volume de culot lors de la centrifugation sur huile

La suspension cellulaire est incubée avec de l'eau tritiée ($C_f = 5 \text{ mCi.mL}^{-1}$) pendant 10 minutes. La récupération des cellules est effectuée par centrifugation de 1,2 mL de la suspension cellulaire sur huile de silicone. Des huiles de densités différentes sont utilisées selon les milieux de culture ; pour les cultures en milieux synthétiques, une huile de densité $1,04 \text{ g.mL}^{-1}$ est utilisée, tandis que pour les cultures en M17 de l'huile de densité $1,05 \text{ g.mL}^{-1}$ est employée. Un volume de 100 μL de surnageant est transféré dans une fiole contenant 2 mL de liquide à scintillation, et la radioactivité est comptée dans un compteur à scintillation Beckman LS 1801. Le reste du surnageant et l'huile de silicone sont éliminés et les parois du tube convenablement séchées. Le culot est remis en suspension dans 500 μL de NaOH 0,5 M. La totalité de la suspension est ensuite transférée dans une nouvelle fiole contenant 5 mL de liquide à scintillation afin de compter la radioactivité du culot.

Le volume de culot (V_c), exprimé en μL , est donné par la relation :

$$V_c = V_{sn} \times \frac{{}^3\text{H}_c}{{}^3\text{H}_{sn}},$$

avec : V_{sn} : volume du surnageant dont on compte la radioactivité,

${}^3\text{H}_c$ et ${}^3\text{H}_{sn}$: radioactivités du culot et du surnageant respectivement (cpm).

5.2. Mesure de ΔpH et de $\Delta\Psi$

La mesure de ces deux paramètres consiste à déterminer les gradients d'ions, susceptibles de s'équilibrer de part et d'autre de la membrane. Pour ce faire, les ions radioactifs utilisés doivent être métaboliquement inertes, capables de diffuser à travers la membrane et rester libres en solution. Ils sont rajoutés en faible concentration afin de ne pas dissiper le gradient. La démarche expérimentale est similaire à celle précédemment décrite pour le calcul du volume de culot.

5.2.1. Détermination de ΔpH

Le ΔpH est mesuré par l'accumulation de ^{14}C -benzoate ($10\ \mu\text{M}$, $21,8\ \text{mCi.mmol}^{-1}$) après 10 minutes d'incubation avec l'extrait cellulaire. Le comptage de la radioactivité donne accès aux concentrations en ^{14}C -benzoate, exprimées en cpm.mL^{-1} , dans le surnageant (C_{sn}), dans le culot (C_{c}) et dans le milieu intracellulaire (C_{ic}) par les relations suivantes :

$$C_{\text{sn}} = 10 \times {}^{14}\text{C-benz}_{\text{SN}},$$

$$C_{\text{c}} = \frac{{}^{14}\text{C-Benz}_{\text{c}} \times 10^3}{V_{\text{c}}},$$

$$C_{\text{ic}} = \frac{(C_{\text{c}} \times V_{\text{c}}) - [C_{\text{sn}} \times (V_{\text{c}} - V_{\text{icT}})]}{V_{\text{icT}}},$$

avec : $^{14}\text{C-benz}_{\text{SN}}$ et $^{14}\text{C-benz}_{\text{c}}$, les radioactivités du surnageant et du culot (cpm),

V_{c} , le volume de culot (μL), calculé avec l'eau tritiée,

V_{icT} (μL), le volume intracellulaire total des cellules contenues dans le culot, calculé en faisant le produit de la quantité de biomasse dans le culot ($\text{DO} \times \text{corrélation DO/masse sèche} \times \text{volume de suspension centrifugé}$) et du volume intracellulaire V_{ic} ($\mu\text{L.mg}^{-1}$) mesuré par thermogravimétrie (§ 3.3. Volume intracellulaire).

Le calcul de ΔpH est donné par les relations suivantes, selon la valeur de pH du milieu de culture :

Si le pH du milieu de culture est supérieur au $\text{pK}_{\text{a,benzoate}} (4,19) + 1$:

$$\Delta\text{pH} = \log \frac{C_{\text{ic}}}{C_{\text{sn}}}.$$

En effet, La méthode utilisée mesure l'acide benzoïque total (A), c'est à dire ($A^- + AH$), alors que la formule de calcul de ΔpH tient compte de la forme dissociée A^- . Lorsque le pH est bien supérieur au pK_a , l'acide benzoïque est essentiellement sous forme dissociée et l'approximation $A^- \approx A$ peut être faite.

Par contre, lorsque le pH du milieu de culture est proche du $pK_{a_{benzoate}}$, la formule doit être corrigée pour tenir compte de la forme non dissociée :

$$\Delta pH = \log \left[\frac{C_{ic}}{C_{sn}} \times (10^{pK_a - pH} + 1) - 10^{pK_a - pH} \right]$$

5.2.2. Détermination de $\Delta \Psi$

La suspension cellulaire est incubée en présence de l'ion $^3H\text{-TPP}^+$ (tétraphénylphosphonium, $1\mu M$, 24 mCi.mmol^{-1}). La mesure de radioactivité dans le surnageant et dans le culot permet, là encore, d'accéder aux concentrations en $^3H\text{-TPP}^+$, exprimées en cpm.mL^{-1} , dans le surnageant (C_{sn}), dans le culot (C_c) et dans le milieu intracellulaire (C_{ic}).

Le gradient électrique $\Delta \Psi$ est obtenu par la relation :

$$\Delta \Psi = -Z \log \frac{C_{ic}}{C_{sn}}, \text{ avec } Z = 2,3 \frac{RT}{F} \text{ (environ } 59 \text{ mV)}.$$

Considérant ses deux composantes, ΔpH et $\Delta \Psi$, la force protomotrice peut finalement être calculée comme suit :

$$FPM = \Delta \Psi - Z \Delta pH.$$

6. Quantification des transcrits

L'évolution des transcrits n'a été mesurée qu'au cours d'une culture avec la souche de référence LD61, dans des conditions de fermentation s'approchant au maximum de celles rencontrées au cours d'un procédé fromager. Une culture en lait G, à pH libre, en anaérobiose, avec transfert de température (de 34 à 12°C en 10 h) a été réalisée. Afin d'avoir une vision de la dynamique d'évolution des transcrits au cours d'une telle culture, 4 prélèvements ont été réalisés durant les différentes phases de la croissance. Le premier, effectué durant la phase de croissance, sert de référence, le second est réalisé lors du ralentissement de la croissance au début de la baisse de température, les deux derniers lots d'échantillons sont prélevés au début et à la fin de la phase de post-acidification.

Les membranes utilisées pour ces expériences de transcriptome sont en nylon et chargées positivement. Sur ce support, ont été déposées par la plateforme génomique de Toulouse, des produits de PCR des gènes de *L. lactis* (500 à 800 nucléotides) réalisés par Eurogentec. Ces PCR correspondent à la totalité des gènes chromosomiques de la souche séquencée *L. lactis* IL1403 (2130 gènes sur 2310 ORFs séquencées). A ces gènes chromosomiques, ont été rajoutés 80 gènes plasmidiques codant pour des fonctions d'intérêts (production d'EPS, de nisine, métabolisme du citrate) et présents dans d'autres souches de lactocoques. Chaque gène est déposé en double exemplaire sur la membrane, et pour chaque spot, quatre dépôts ont été réalisés afin de se placer en condition d'excès de sondes.

6.1. Prélèvement et extraction de l'ARN total

La méthode d'extraction d'ARN total décrite par Even (2001) a été adaptée à une culture en milieu lait (Raynaud *et coll.*, 2005). Ainsi un volume de culture, correspondant à 6 mg de cellules, est traité avec la solution de clarification (EDTA 15 mM, NaOH 0,15 M), à raison d'un volume de culture pour deux volumes de solution de clarification, avant d'être centrifugé (8000 rpm, 5 min, 4°C). Le culot cellulaire est ensuite lavé dans 1 mL de tampon TE refroidi (Tris-HCl (10 mM, pH 8), EDTA 1 mM), après centrifugation (13000 rpm, 2 min, 4°C) le surnageant est éliminé par aspiration et le culot repris dans 500 µL de tampon TE puis rapidement congelé dans l'azote liquide. Les cellules ainsi traitées sont conservées à -80°C jusqu'au moment de l'extraction.

La méthode d'extraction utilisée est celle décrite par Even (2001), c'est à dire la méthode de Sambrook *et coll.* (1989) adaptée aux lactocoques par l'INRA de Jouy en Josas. Dans des tubes à vis (Polylabo), 500 µL de suspension cellulaire décongelés dans la glace sont mélangés avec 0,6 g de billes de verre (diamètre < 106 µm, Sigma), 50 µL de SDS à 10 %, 170 µL de Malcaloïd à 2 % (Rheox) ainsi que 500 µL de phénol acide (pH 4,7). Le cassage des cellules aux billes est réalisé à l'aide d'un « mini bead-beater » (Biospec products), utilisé à sa puissance maximale. Trois cycles d'une minute de cassage sont effectués avec, entre chaque cycle, une étape de refroidissement de deux minutes des échantillons dans la glace. Après élimination des débris cellulaires par centrifugation (13000 rpm, 25 min, 4°C), les ARN sont purifiés à l'aide du kit RNeasy Midi de Qiagen qui intègre une étape de digestion de l'ADN cellulaire directement sur la colonne (RNase-free DNase set, Qiagen).

Seule la moitié du volume de la phase aqueuse, contenant l'ensemble des acides nucléiques intracellulaires, est utilisée pour l'étape de purification afin de ne pas saturer les filtres des colonnes Qiagen. Après leur élution dans 200 µL d'eau stérile, les ARN sont précipités à l'éthanol absolu (3 volumes) en présence d'acétate de sodium (3 M, pH 4,8, 1/10 de volume) pendant 30 minutes à -80°C. Les ARN sont ensuite lavés dans 1 mL d'éthanol à 70 %, séchés puis resuspendus dans 23 µL d'eau stérile. Les ARN ainsi concentrés sont quantifiés par mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm et leur qualité contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (1 h de migration à 50 V) en conditions dénaturantes (formaldéhyde 3,3 %) et « RNase free ».

6.2. Synthèse et purification des cDNA radiomarqués

Une quantité constante d'ARN total (15 µg) est marquée par rétrotranscription à l'aide de dCTP³³ radioactif selon une méthode mise au point par Redon (communication personnelle). Aux 15 µg d'ARN total sont ajoutés 500 ng d'amorces aléatoires (Invitrogen Life Technologies) ainsi que 500 ng d'amorces spécifiques à toutes les ORF de *Lactococcus lactis* (Eurogentec). Après dénaturation (5 min, 70°C), le mélange est rapidement refroidi, avant l'ajout de 1,5 µL de dATP (10 mM), 1,5 µL de dGTP (10 mM), 1,5 µL de dTTP (10 mM), 10 µL de tampon 5X et 5 µL de DTT (0,1 mM) tous deux fournis avec l'enzyme (Superscript II, Invitrogen Life Technologies). Après hybridation des amorces (5 min, 25°C), 1,5 µL d'enzyme Superscript II (200 UmL⁻¹, Invitrogen Life Technologies) ainsi que 5 µL de dCTP³³ (10 µCi.mL⁻¹, Amersham Biosciences) sont ajoutés au mélange réactionnel et la rétrotranscription réalisée : 10 min à 25°C puis 1 h à 42°C. Afin de s'assurer d'une rétrotranscription complète, une seconde étape est réalisée après ajout de 1,2 µL de Superscript II et de 1,2 µL de dCTP froid (5mM). La réaction est ensuite stoppée par incubation de 15 min à 70°C, elle permet l'inactivation de l'enzyme et la séparation des brins d'ARNm et d'ADNc. Seuls les ADNc marqués doivent être hybridés sur les membranes, afin d'éviter une interférence du signal par les ARNm non marqués. Une étape de dégradation de ces ARN par la Rnase H est donc réalisée (2 U, 20 min à 37°C) avant la purification des ADNc marqués grâce à des colonnes Microspin G25 (Amersham Biosciences).

6.3. Hybridation

Les quatre échantillons à comparer sont traités en parallèle, tant au niveau de l'extraction, du marquage, qu'au niveau de l'hybridation. Les membranes sont tout d'abord pré-hybridées de 2 à 4 h à 68°C dans des tubes en verre contenant 5 mL de tampon d'hybridation (SSPE 5X (tampon phosphate 50 mM, NaCl 0,9 mM, EDTA 5 mM), SDS 2 %, tampon Denhart's 1X (Ficoll 400 0,02 % (p/v), polyvinylpyrrolidone 0,02 % (p/v, Sigma), BSA 0,02 % (p/v)) et 100 µg.mL⁻¹ d'ADN de sperme de saumon.

Le tampon de pré-hybridation est ensuite remplacé par 5 mL de tampon d'hybridation contenant les ADNc marqués, purifiés et préalablement dénaturés (10 min à 95°C puis passage à 4°C). Après hybridation (15 h à 68°C), les membranes sont lavées, trois fois pendant 5 minutes avec 50 mL de solution de lavage (SSPE 0,5X, SDS 0,2 %) à température ambiante, puis trois fois 20 minutes à 68°C avec 100 mL de solution de lavage.

6.4. Détection

Après séchage chaque membrane est emballée dans du papier Saran, puis les quatre sont disposées dans une même cassette contenant un écran radiosensible. Après une exposition de trois jours, la détection est réalisée à l'aide d'un fluoroimager Storm 860 (Molecular Dynamics) dont la sensibilité au niveau de la taille des pixels est réglée à 50 μm .

6.5. Exploitation des données

Trois répétitions sont réalisées avec des ARN issus d'extractions, marquages et hybridations indépendants. Les signaux d'hybridation sont quantifiés, évalués statistiquement et attribués aux gènes correspondants à l'aide du logiciel Bioplot (réalisé par S. Sokol, Plateforme Génomique, Toulouse). Le bruit de fond local (moyenne de l'intensité des pixels au voisinage du spot) est ôté de l'intensité de chaque spot. L'intensité de chaque spot est ensuite normalisée par rapport à la moyenne de l'intensité totale de la membrane donnant ainsi l'abondance de chaque messenger dans la population des ARN totaux. Pour chaque gène, la moyenne de l'intensité des trois répétitions est calculée pour chacune des quatre conditions. Une intensité minimale de détection correspondant à la moyenne des spots vides (sans dépôt de sonde) plus deux écart-types est calculée, les gènes dont les spots ont une intensité inférieure sont considérés comme non détectés (ND). Des ratios d'expression sont calculés en utilisant les intensités normalisées et moyennées, ils sont calculés pour chaque gène par rapport à l'intensité de la condition de référence obtenue en phase de croissance. Un test de Student's est réalisé à partir de ces ratios, ainsi une p-value inférieure à 0,05 est considérée comme significative. En effet, dans ces cas-là, il y a 95 % de chance pour que l'expression du gène considéré soit différente dans les deux conditions.

Toutes ces données sont ensuite regroupées pour une analyse dynamique et seuls les gènes présentant au moins une variation d'expression significative au cours de la culture sont conservés pour l'analyse fonctionnelle. Ainsi 702 gènes sont sélectionnés et l'évolution de leurs ratios d'expression soumis à un clustering à l'aide du logiciel Genespring (Silicon Genetics) afin de regrouper les gènes présentant des profils d'expression similaires. Par la suite une analyse fonctionnelle est également réalisée en utilisant les catégories fonctionnelles établies par Bolotin *et coll.* (2001) suite à l'annotation du génome de la souche *Lactococcus lactis* IL1403.

Chapitre III : Contexte et problématique du sujet

Lactococcus lactis est un micro-organisme d'intérêt, très important dans l'industrie agro-alimentaire, et également organisme modèle des bactéries lactiques. L'objectif de ce travail est d'acquérir à la fois une meilleure compréhension du comportement acidifiant des lactocoques, mais aussi de l'origine des différences de pouvoir acidifiant entre les souches.

L'une des étapes cruciales de la fabrication fromagère est la coagulation du lait, en effet, la cinétique d'acidification va déterminer les qualités du caillé, et donc influencer les caractéristiques du produit fini (texture, rhéologie...). Bien que d'autres critères entrent en jeu (production d'arômes, de polysaccharides, de bactériocines...), les levains lactiques sont essentiellement sélectionnés sur la base de leurs propriétés acidifiantes. Il est donc intéressant de pouvoir définir les paramètres métaboliques, physiologiques ou environnementaux, qui déterminent cette acidification. L'hétérogénéité de ces caractères pourra permettre de sélectionner des souches dont le comportement sera adapté à un procédé particulier.

Nous avons collaboré avec un industriel fromager (SOREDAB) et avons choisi de nous intéresser à quatre paramètres caractéristiques de la cinétique d'acidification. Ainsi le processus d'acidification du lait, ou d'autres milieux de culture, est donc décortiqué afin d'en comprendre les différentes phases et d'expliquer les différences de profils observées entre souches. Il s'agit d'établir quels sont les paramètres physiologiques qui contrôlent la vitesse maximale d'acidification (V_{\max}), la valeur de pH à l'arrêt de croissance, la vitesse de post-acidification ($V_{\text{post-acid}}$), ainsi que la valeur de pH à 24 h (fin de post-acidification). Afin de répondre à ces questions, une stratégie basée sur une étude métabolique comparative de différentes souches a été mise en place.

L'industriel fromager sélectionne les ferments sur la base de leurs cinétiques d'acidification en milieu rétentat. Il s'agit d'un lait concentré enrichi en caséines qui est utilisé comme modèle de la matrice fromagère. Le suivi et l'enregistrement des cinétiques d'acidification en temps réel est effectué par un système de type Cinac. Pour réaliser l'étude comparative, deux souches de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, LD61 et LD71, d'origine fromagère ont été fournies par la société SOREDAB. Leur caractérisation en milieu rétentat de lait a révélé des cinétiques d'acidification très différentes (Fig. III.1). Il s'agit de deux souches phylo-génétiquement très proches, appartenant au même ribogroupe, mais dont le contenu plasmidique est différent, 5 plasmides étant présents dans la souche LD61 et seulement deux dans la souche LD71.

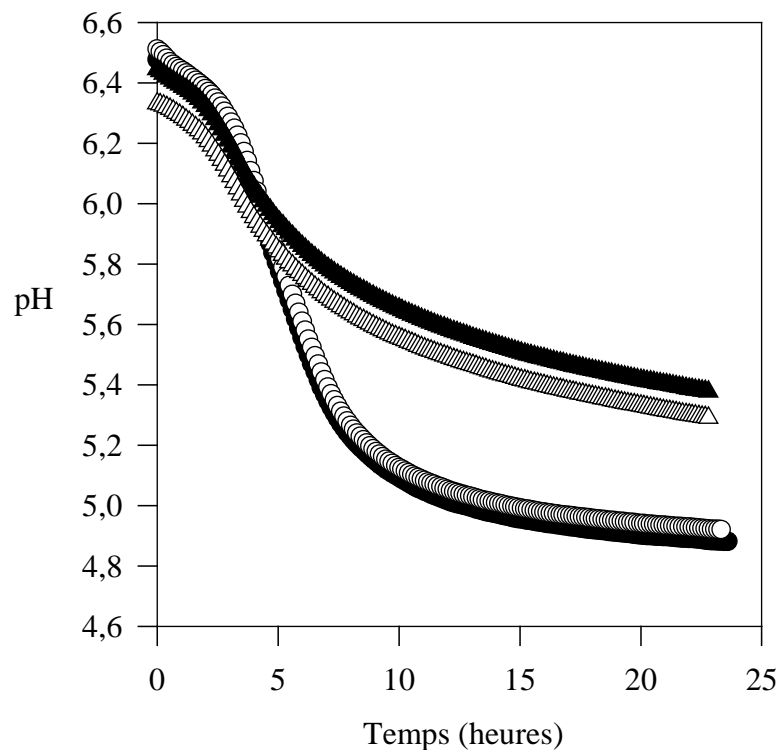


Figure III.1 : Cinétiques d'acidification des souches LD61 (●, ○) et LD71 (▲, △) sur milieu rétentat de lait.

La figure III.1 reprend les profils Cinac obtenus pour les deux souches en milieu rétentat. Chaque culture est réalisée en duplicat afin d'en valider la reproductibilité, tant au niveau de l'acidification que de la fiabilité des instruments de mesure (anomalie ou dérive des sondes pH). Les données obtenues avec cette méthode sont reproductibles car, malgré une différence de pH initial de 0,03 unités (pH_{init} de 6,48 et 6,51), les deux cinétiques obtenues avec la souche LD61 sont parfaitement superposables (Fig. III.1). Les pH à 24 heures de culture sont respectivement de 4,88 et 4,92 ce qui correspond à une baisse de pH identique de -1,6 upH. Les vitesses d'acidification maximales (V_{max}) sont elles aussi comparables avec des valeurs de -4,59 et $-4,28 \cdot 10^{-3}$ upH.min⁻¹. Les profils de la souche LD71 présentent, malgré un décalage plus important de pH initiaux de 0,11 upH (pH_{init} de 6,44 et 6,33), une allure identique avec une diminution respective de -1,06 et -1,04 upH sur 24 heures. Tout comme l'amplitude de l'acidification, les V_{max} sont également inférieures à celles obtenues avec la souche LD61 avec des valeurs de -2,62 et $-2,59 \cdot 10^{-3}$ upH.min⁻¹.

Les profils d'acidification des deux souches LD61 et LD71 sont donc très différents. La souche LD61 est plus acidifiante avec une V_{max} d'acidification environ 1,7 fois supérieure à celle de la souche LD71. Outre la vitesse, l'amplitude de la baisse de pH est également supérieure d'environ 52 %, avec une baisse de -1,6 upH pour la souche LD61 alors qu'elle n'est que de -1,05 upH en moyenne pour la souche LD71.

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées quant au contrôle des 4 paramètres caractéristiques de la cinétique d'acidification. En effet, la vitesse maximale d'acidification peut être liée soit aux capacités glycolytiques intrinsèques des souches (activité des transporteurs et des enzymes glycolytiques), soit à leurs capacités anaboliques associées à un rétro-contrôle du catabolisme, soit aux deux, soit encore au pouvoir tampon du milieu de culture.

En ce qui concerne l'arrêt de croissance, il peut être contrôlé par l'acidification du milieu de culture et l'effet inhibiteur du pH et/ou de l'acide lactique produit, soit directement sur l'anabolisme, soit indirectement par le biais d'une limitation énergétique provoquée par un catabolisme fortement inhibé. L'arrêt de croissance pourrait également être lié à d'autres éléments inhibiteurs de l'anabolisme, comme l'apparition d'une carence nutritionnelle au cours de la culture ou la synthèse de produits dérivés du métabolisme inhibant la croissance.

Le contrôle de la phase de post-acidification et de la valeur du pH à 24 heures peut être lié à plusieurs phénomènes. L'un d'eux a été mis en évidence par le travail de caractérisation de nouvelles souches de lactocoques intégrables à cette étude (données SOREDAB). En effet, l'étude comparative en Cinac de souches appartenant aux phénotypes «LD61 » ou «LD71 » en lait écrémé et lait écrémé supplémenté en tryptone a permis de remarquer que pour toutes les souches présentant un comportement de type «LD61 », la supplémentation du lait permet d'atteindre des vitesses maximales d'acidification supérieures, mais les pH finaux mesurés sont toujours supérieurs (tableau III.1). Ainsi, une vitesse d'acidification plus rapide pourrait être responsable de ce phénomène en ne permettant pas aux cellules de s'adapter aussi efficacement au stress acide qu'une vitesse d'acidification plus lente. Au cours de la culture, la baisse de pH externe doit être accompagnée d'une baisse du pH intracellulaire. Cette diminution de pH interne est liée à la valeur du gradient de pH ainsi qu'à son maintien au cours de la culture. On peut supposer que les souches présentent des capacités énergétiques différentes et ne sont pas capables de maintenir un pH interne favorable à la glycolyse et donc à la post-acidification dans les mêmes proportions. Par ailleurs, il est également possible que la sensibilité des éléments glycolytiques vis à vis de la baisse de pH intracellulaire soit différente selon les souches, et une plus grande résistance serait à l'origine d'une vitesse de post-acidification supérieure et d'un pH à 24 heures plus bas chez les souches concernées.

Souche	sous-espèce	$V_{\max \text{ lait } \acute{e}c}$	$V_{\max \text{ lait } \acute{e}c \text{ trp}}$	écart de $\text{pH}_{24\text{h}}$
LD36	<i>lactis</i>	-0,0065	-0,0068	-0,14
LD52	<i>lactis</i>	-0,0073	-0,0104	-0,14
LD53	<i>lactis</i>	-0,0077	-0,0104	-0,13
LL30	<i>lactis</i>	-0,0075	-0,0086	-0,11
LL29	<i>lactis</i>	-0,0077	-0,0084	-0,11
LD61	<i>lactis</i>	-0,0049	-0,0072	-0,06
LD41	<i>lactis</i>	-0,0033	-0,0057	0,15
LL39	<i>lactis</i>	-0,004	-0,0055	0,22
LD51	<i>lactis</i>	-0,0038	-0,0057	0,24
LD71	<i>lactis</i>	-0,0036	-0,007	0,27
LD35	<i>lactis</i>	-0,0038	-0,0076	0,28
LD48	<i>lactis</i>	-0,0037	-0,0055	0,29
LL55	<i>lactis</i>	-0,0035	-0,0078	0,3
LC26	<i>cremoris</i>	-0,0072	-0,0086	-0,15
LC49	<i>cremoris</i>	-0,0053	-0,0062	-0,12
LC94	<i>cremoris</i>	-0,007	-0,0089	-0,1
LC90	<i>cremoris</i>	-0,0066	-0,0079	-0,07
LC46	<i>cremoris</i>	-0,0064	-0,0085	-0,07
LC58	<i>cremoris</i>	-0,006	-0,007	-0,05
LC40	<i>cremoris</i>	-0,0059	-0,0072	-0,03
LC34	<i>cremoris</i>	-0,0031	-0,0065	0,09
LC30	<i>cremoris</i>	-0,0041	-0,0091	0,18
LC32	<i>cremoris</i>	-0,0038	-0,0076	0,2
LC38	<i>cremoris</i>	-0,0042	-0,0085	0,23
LC53	<i>cremoris</i>	-0,0032	-0,0081	0,26
LC33	<i>cremoris</i>	-0,0041	-0,0081	0,28
LC50	<i>cremoris</i>	-0,0035	-0,0087	0,3
LC44	<i>cremoris</i>	-0,003	-0,0079	0,34

Tableau III.1: Récapitulatif de données Cinac traduisant le comportement acidifiant de différentes souches de lactocoques d'origine fromagère.

Légende : $V_{\max \text{ lait } \acute{e}c}$: vitesse maximale d'acidification au cours d'une culture en lait écrémé ; $V_{\max \text{ lait } \acute{e}c \text{ trp}}$: vitesse maximale d'acidification au cours d'une culture en lait écrémé supplémenté en tryptone ; écart de $\text{pH}_{24\text{h}}$: différence des valeurs de pH entre la culture lait et la culture en lait supplémenté ($\text{pH}_{24\text{h}} \text{ lait } \acute{e}c - \text{pH}_{24\text{h}} \text{ lait } \acute{e}c \text{ trp}$)

L'étude bibliographique a permis de faire le point sur le niveau de connaissances actuelles du métabolisme et de la physiologie des lactocoques. S'il s'agit de données fondamentales indispensables à la compréhension du comportement de ces organismes, elles sont généralement éloignées des problématiques liées à l'utilisation industrielle de ces bactéries : deux souches de laboratoire principalement étudiées (IL1403 et MG1363), conditions de cultures limitées (milieux synthétiques, glucose comme source de carbone, température d'incubation de 30°C), stress étudiés sous forme de chocs de forte amplitude. Il existe très peu d'études, et notamment aucune réelle étude physiologique, réalisées dans le milieu d'intérêt qui est le lait, et de même, rares sont celles qui s'intéressent à la réponse à des stress progressifs dont l'autoacidification (Even *et coll.*, 2001), plus proches de ceux rencontrés au cours des procédés de transformation alimentaire. Il est important de tenir compte des conditions de culture industrielles et de s'en rapprocher au maximum afin de réaliser l'étude la plus représentative du comportement réel des lactocoques au cours de ces procédés.

Dans ce but, des conditions d'études particulières ont été définies. Tout d'abord, il paraît indispensable d'utiliser des souches industrielles, probablement plus robustes et certainement mieux adaptées aux conditions de cultures que les souches de laboratoire. Ce sont des milieux complexes comme le lait écrémé ou le M17-lactose qui ont souvent été préférés aux milieux synthétiques. Un certain nombre d'analyses sont réalisables en lait écrémé (Mercade, 2002), mais certains composants de ce milieu pouvant interférer avec plusieurs analyses, l'emploi du milieu M17 est envisagé afin de disposer d'une analyse physiologique exhaustive. Le milieu rétentat, qui est plus riche en caséine que le lait, ne peut être employé car aucun suivi direct de la croissance n'est possible et que toutes les techniques d'analyse macro- et micro-cinétiques ne peuvent être utilisées. Pour rester proche des conditions fromagères, les cultures sont réalisées à 34°C et l'inoculation avec la pré-culture bactérienne est telle que la quantité de biomasse initiale est faible (environ $3 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Bien que les cultures en Cinac ou lors de la fabrication de fromages, soient plutôt en condition micro-aérobies, les cultures sont réalisées en anaérobiose ou aérobiose stricte afin de standardiser l'environnement gazeux. En effet, la micro-aérobiose est un état difficile à reproduire puisque la quantité exacte d'oxygène dans le milieu est inconnue. De plus, au cours du procédé fromager ou des cultures Cinac, aucune agitation du milieu n'est réalisée, donc l'ensemble des cellules n'est pas soumis au même environnement gazeux. Il nous est impossible de réaliser des fermentations non agitées car dans ce cas la culture n'étant pas

homogène, les mesures directes de pH et de biomasse seraient faussées, de même que les prélèvements. Un manque de reproductibilité des paramètres de culture est classiquement observé chez certaines souches de lactocoques et de lactobacilles. Il est donc nécessaire de réaliser une analyse de type statistique basée sur l'étude de cultures reproduites plusieurs fois afin de valider les observations.

Notre étude va comporter deux types d'analyses comparatives complémentaires, la comparaison de souches de comportements acidifiants différents, et pour une même souche, l'étude comparative du comportement dans différentes conditions de culture (*cf.* Chapitre IV). En effet, dans un premier temps, l'analyse macrocinétique dans différentes conditions de culture des deux premières souches sélectionnées, LD61 et LD71, est abordée. Les nouvelles souches présentant les phénotypes « LD61 » ou « LD71 » sont ensuite intégrées à cette étude. Une étude plus approfondie de la souche de « référence » LD61 est ensuite réalisée dans des conditions de croissance et d'acidification particulières. Toutes les cultures présentées bénéficient d'un suivi macro-cinétique complet (pH, biomasse, substrats et produits de fermentation), et pour certaines d'entre elles, des données micro-cinétiques sont également acquises (activités spécifiques maximales et activités *in vivo* de certaines enzymes du métabolisme central, énergétique cellulaire). Pour traiter l'ensemble de ces données, une analyse statistique est utilisée et une étude de corrélations est également mise en œuvre. Enfin, pour la dernière culture réalisée avec la souche de référence dans des conditions mimant un procédé fromager, une analyse transcriptomique complète a même été réalisée en plus de l'étude cinétique classique (*cf.* Chapitre VI).

Chapitre IV : Contrôle métabolique de l'acidification : résultats

Afin de rendre ce manuscrit le plus clair possible, ce chapitre présente les résultats (sans discussion) obtenus pour toutes les fermentations réalisées : données macro-cinétiques et micro-cinétiques lorsqu'elles sont disponibles, et dans le but de faciliter la lecture et la compréhension de ces données, elles seront analysées statistiquement et discutées dans le chapitre suivant. La culture réalisée avec la souche de référence dans des conditions se rapprochant d'un procédé fromager, et analysée au niveau du transcriptome, fera quant à elle l'objet du dernier chapitre.

1. Caractérisation macro-cinétique des souches LD61 et LD71

Deux souches ayant des caractéristiques d'acidification très différentes sur milieu rétentat nous ont été fournies. Cependant, en Cinac, ni la croissance, ni le métabolisme carboné n'ont pu être abordés, et une étude macro-cinétique plus complète de ces deux souches est indispensable. Des cultures ont donc été réalisées dans les deux milieux susceptibles de servir de modèles, un lait écrémé thermisé, préféré au milieu rétentat trop complexe, et le milieu M17-lactose qui permet l'ensemble des mesures des paramètres cinétiques, enzymatiques et surtout énergétiques, dont certains ne sont pour l'instant pas mesurables dans le lait. Le milieu M17 est potentiellement plus intéressant que le lait dans l'optique de l'étude comparative, puisque le panel de mesures qu'il permet est plus important, cependant il est indispensable de vérifier que le comportement bactérien y est bien similaire à celui observé en milieu laitier.

1.1. Cinétiques en lait écrémé

Le lait écrémé utilisé est une poudre de lait commerciale qui est stérilisée thermiquement après reconstitution. Les fermentations des souches *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, LD61 et LD71, sont réalisées à pH libre et 34°C afin d'être dans des conditions comparables aux Cinacs. Seul l'environnement gazeux diffère puisque contrairement aux cultures en flacons du Cinac, il est contrôlé en fermenteur ce qui permet de réaliser des cultures en anaérobiose.

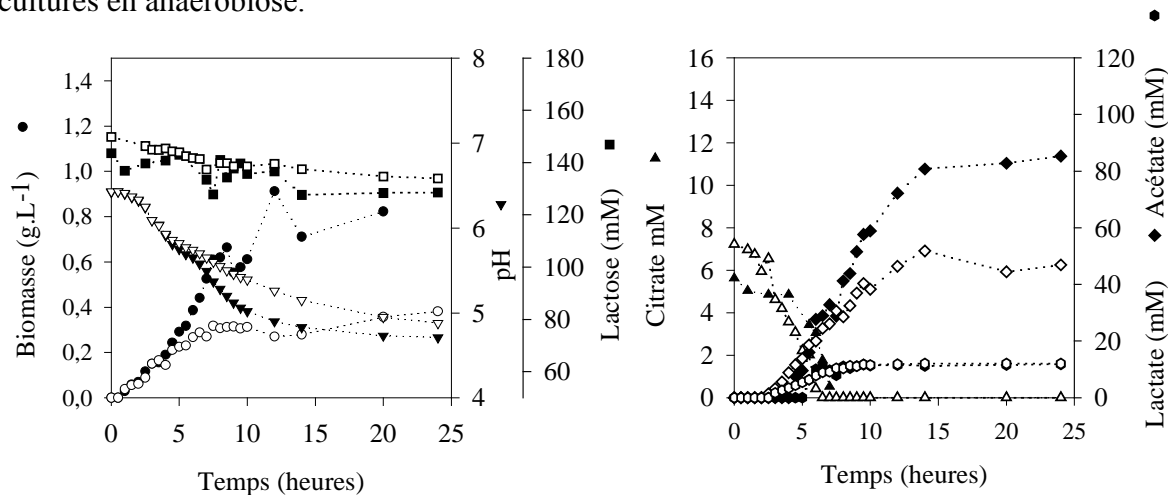


Figure IV.1 : Evolution de la biomasse (●), du pH (▼), des substrats (lactose ■, citrate ▲) et produits de fermentation (lactate ◆, acétate ●) au cours de cultures des souches LD61 (en noir) et LD71 (en blanc) en milieu lait écrémé, en anaérobiose et à 34°C.

L'évolution de la concentration en biomasse de la souche LD61 en lait écrémé est divisée en deux phases. La phase de croissance dure 12 heures au cours desquelles la production de biomasse atteint, après un lissage de la courbe, 0,71 g.L⁻¹ (Fig IV.1). La modification texturale du lait due à l'acidification est probablement responsable d'une diminution de l'efficacité de la clarification et de l'hétérogénéité des valeurs de biomasse mesurées en fin de culture. La cinétique d'apparition des produits de fermentation suit celle de la croissance, avec 71,6 mM de lactate et environ 11,4 mM d'acétate produits à 12 h. L'acidification du lait a lieu au cours de cette phase avec une baisse de pH de 1,52 unités. Les 5,7 mM de citrate présents dans le lait en début de culture sont rapidement consommés parallèlement au lactose et épuisés dès 6 heures. La phase de croissance précède une phase de post-acidification au cours de laquelle 14,7 mM de lactate supplémentaires sont produits, entraînant une baisse de 0,19 unités pH. Au cours de cette phase, la croissance est fortement ralentie voire arrêtée alors que la glycolyse et l'acidification sont maintenues, avec cependant des vitesses bien inférieures à celles de la phase de croissance.

Les concentrations initiales en lactose sont très élevées et comprises entre 140 et 150 mM (50 g.L^{-1}), cependant la consommation qui n'excède généralement pas, à pH libre, 10 à 20 % du lactose initial, est très faible ce qui entraîne une imprécision au niveau du dosage de ce substrat. Par conséquent, les capacités cataboliques bactériennes seront plus sûrement évaluées d'après le lactate produit, dont le dosage est plus précis.

Durant les 8 heures de la phase de croissance de la souche LD71, seuls $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de biomasse ont été produits. Cette croissance est associée à la consommation de lactose, de citrate et à la production de 28,8 mM de lactate et de 10,3 mM d'acétate. La production d'acides organiques entraîne une diminution de pH de 0,88 upH. A l'image de la souche LD61, la totalité des 7,2 mM de citrate initiaux sont totalement consommés en 7 heures de culture. Après 8 h de culture, une phase « pseudo-stationnaire » est associée à un phénomène de post-acidification au cours duquel 1,7 mM d'acétate et 28,8 mM de lactate sont produits, provoquant une acidification supplémentaire de 0,72 upH.

Les très faibles valeurs de concentration initiale en biomasse ($DO_{\text{init}} \approx 0,01$) entraînent des erreurs considérables sur l'estimation des vitesses spécifiques en début de culture. De façon à atténuer ces erreurs, après comparaison de différents modes de calcul, les divers paramètres analysés sont calculés sur une plage de $DO_{580\text{nm}}$ comprise entre 0,1 et 1 (notés $X_{0,1/1}$), correspondant à des concentrations en biomasse de 0,03 et $0,3 \text{ g.L}^{-1}$, et représentent donc des valeurs « maximales moyennées ». Le lait écrémé permet une croissance plus importante de la souche LD61, avec un taux de croissance calculé entre les $DO_{580\text{nm}}$ 0,1 et 1 ($\mu_{0,1/1}$) de $0,56 \text{ h}^{-1}$, que de la souche LD71 ($\mu_{0,1/1}$ de $0,38 \text{ h}^{-1}$). La quantité de biomasse produite est également 2 fois plus élevée pour la souche LD61 que pour la LD71 dans ces conditions ($0,71$ et $0,3 \text{ g.L}^{-1}$). L'écart entre les deux souches se retrouve également au niveau de l'amplitude de l'acidification, mais pas au niveau des vitesses maximales qui sont comparables, avec une V_{max} de $-3,83.10^{-3} \text{ upH.min}^{-1}$ pour la souche LD61 et de $-4.10^{-3} \text{ upH.min}^{-1}$ pour la LD71.

Bien que les cinétiques de croissance et d'acidification soient différentes, il est intéressant de remarquer que pour ces deux souches, l'évolution du citrate suit un profil identique puisqu'il est rapidement épuisé du milieu de culture. Pour chacune de ces souches, le produit majoritaire est le lactate et le métabolisme peut être considéré comme homolactique puisque ce dernier représente respectivement 92 et 91,3 % des produits issus du lactose. Ainsi, les faibles quantités d'acétate formées ne témoignent pas d'un métabolisme mixte, car ni formiate ni éthanol ne sont détectés. La voie de dégradation du citrate produit une molécule de lactate, une molécule d'acétate et une molécule de CO₂ par molécule de citrate consommée (en négligeant la part éventuelle vers les molécules à caractère aromatique dérivées de l'acétolactate, qui ne semblent pas produites dans ces conditions). Ainsi pour la souche LD61, sur les 11,4 mM d'acétate produits, 5,6 mM proviennent directement du métabolisme du citrate alors que les 5,8 mM restant sont liés à la consommation du lactose (peu probable car aucune production de formiate n'est observée), ou à la dégradation d'une autre molécule présente dans le lait. De même, la souche LD71 consomme les 7,2 mM de citrate contenus dans le lait, ce qui lui permet de produire 7,2 mM d'acétate, et comme pour la souche LD61, les 4,8 mM d'acétate restant peuvent provenir du métabolisme du lactose ou d'un substrat inconnu.

Le lait écrémé semble un bon milieu modèle puisque les deux souches y reproduisent globalement les comportements acidifiants observés en milieu rétentat. Cependant, une différence majeure existe en début de croissance ; si l'acidification est identique pour les deux souches jusqu'à 5 heures de culture en milieu lait écrémé, elle est différente très tôt en milieu rétentat (V_{max}). L'avantage du lait écrémé réside dans notre capacité à y suivre la croissance, étroitement liée avec l'acidification, ainsi que le métabolisme. Cependant, des mesures comme celles des gradients énergétiques sont impossibles car il existe une interférence entre les caséines du lait et les ions radio-marqués utilisés pour ces mesures. L'emploi d'un autre milieu comme le M17 est donc envisagé.

1.2. Cinétiques en milieu M17-lactose

Des cultures comparables à celles réalisées en lait écrémé ont été effectuées en milieu M17-lactose. Il s'agit d'un milieu complexe riche en protéines et en peptides. Afin que les résultats puissent être comparés à ceux obtenus dans le lait écrémé, le lactose à une concentration de 50 g.L^{-1} est utilisé comme source de carbone, et comme précédemment les cultures sont réalisées dans un environnement gazeux anaérobie et à 34°C .

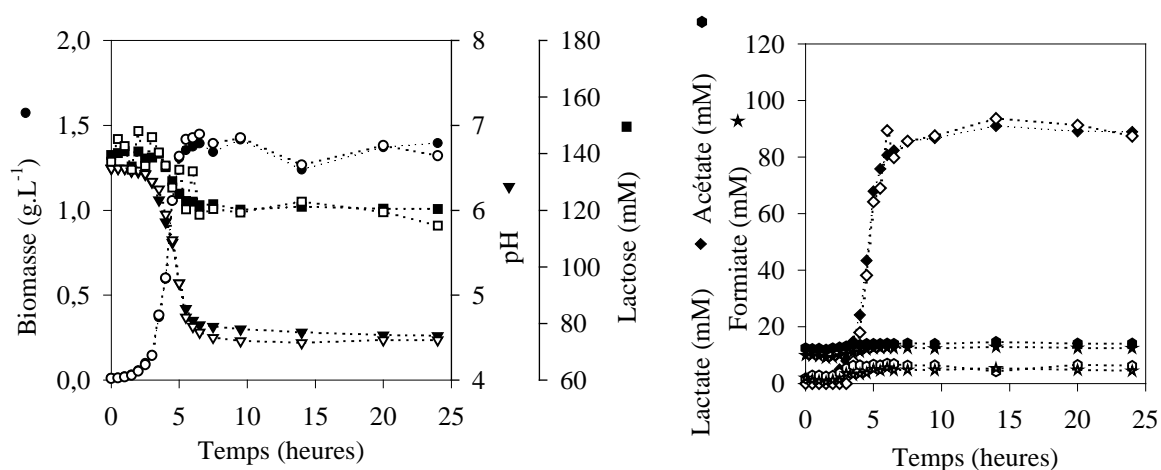


Figure IV.2 : Evolution de la biomasse (●), du pH (▼), des substrats (lactose ■, citrate ▲) et produits de fermentation (lactate ◆, acétate ●, formiate ★) au cours de cultures des souches LD61 (en noir) et LD71 (en blanc) en milieu M17-lactose, en anaérobiose et à 34°C .

La croissance de la souche LD61 en milieu M17-lactose est environ deux fois plus rapide ($\mu_{0,1/1} = 1,24 \text{ h}^{-1}$ en M17 contre $0,56 \text{ h}^{-1}$ en lait écrémé) et plus courte qu'en lait écrémé, puisqu'elle s'arrête ici à 5,5 heures, mais la quantité de biomasse produite est plus importante, avec $1,35 \text{ g.L}^{-1}$ contre $0,71 \text{ g.L}^{-1}$ en lait (Fig. IV.2). La phase d'acidification, concomitante à la croissance, est également plus rapide qu'en lait écrémé avec une V_{\max} de $-1,3 \cdot 10^{-2} \text{ upH} \cdot \text{min}^{-1}$. La vitesse maximale d'acidification est une valeur qui dépend à la fois des vitesses de la croissance et du catabolisme. Le calcul de la vitesse spécifique d'acidification moyennée sur le début de la croissance ($V_{\text{sp}é0,1/1}$) permet de s'affranchir de l'effet de la croissance. En milieu M17, la valeur obtenue, $-2,17 \cdot 10^{-2} \text{ upH} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, est proche de celle calculée au cours de la culture en lait ($-1,77 \cdot 10^{-2} \text{ upH} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Ainsi, l'augmentation de la V_{\max} en M17 par rapport

au lait dépend principalement de la croissance puisque la vitesse du catabolisme n'est quasiment pas augmentée en milieu M17. Au cours de la phase de croissance, le pH diminue de 6,49 à 4,84, valeur comparable à celle obtenue en lait (4,9). Pendant cette période, 75,8 mM de lactate sont produits à partir d'environ 20 mM de lactose. Cette valeur est proche de celle observée en lait (71,6 mM) ce qui implique un rendement en biomasse supérieur en M17 par rapport au lait écrémé (17,8 et 9,9 g.mol⁻¹ de lactate respectivement). L'erreur sur l'estimation de la quantité de lactose consommée étant plus importante que celle réalisée sur l'estimation de la production de lactate, le rendement en biomasse est donc calculé par rapport à la valeur la plus sûre et donné en gramme de biomasse synthétisée par mole de lactate produite. L'arrêt de croissance est suivi d'une phase de « post-acidification » au cours de laquelle le catabolisme est ralenti mais maintenu, et la baisse de 0,32 upH qui est observée est liée à la production de 13,2 mM de lactate supplémentaire. Au cours de cette phase, peu de différences sont observées entre les deux milieux, cependant la valeur de pH à 24 heures en M17 (4,52) est légèrement plus basse qu'en lait (4,71).

A la différence des cinétiques observées en milieu rétentat ou lait écrémé, la croissance des deux souches est quasiment identique en milieu M17-lactose. Après une rapide phase de croissance de 5,5 h ($\mu_{0,1/1} = 1,35 \text{ h}^{-1}$) au cours de laquelle 1,42 g.L⁻¹ de biomasse sont produits, une phase de post-acidification est observée pour la souche LD71 (Fig. IV.2). Le pH dont la valeur était de 6,49 en début de culture n'est plus que de 4,74 à l'arrêt de croissance. Cette acidification est directement liée à la production de lactate (69 mM). Pendant la phase stationnaire, la synthèse de 24 mM de lactate supplémentaire est responsable d'une baisse de 0,27 upH. Comme pour la souche LD61, la croissance de la souche LD71 observée en milieu M17 est plus rapide qu'en lait ($\mu_{0,1/1} = 0,38 \text{ h}^{-1}$), la V_{\max} est également plus rapide ($-15,2 \cdot 10^{-3}$ en M17 contre $-4 \cdot 10^{-3}$ upH.min⁻¹ en lait) mais comme précédemment, les vitesses spécifiques d'acidification sont comparables (Tableau IV.1). Par contre, avec cette souche, les pH mesurés à l'arrêt de croissance et à 24 heures sont beaucoup plus bas en M17 (4,74 et 4,47) qu'en lait (5,6 et 4,88), ce qui correspond également à des productions de lactate plus importantes (Tableau IV.1).

Le métabolisme des deux souches demeure homolactique même dans ce milieu M17-lactose, en effet le lactate représente encore 95,7 et 92,6 % des produits de fermentation, respectivement pour les souches LD61 et LD71, et de plus aucune production significative par ces souches d'acétate, de formiate ou d'éthanol n'a pu être détectée.

Il est très intéressant de remarquer que, contrairement à ce que les cultures en milieux lactés auraient pu laisser supposer, les deux souches montrent des profils de croissance et d'acidification identiques en milieu M17-lactose. Ce milieu, bien que très riche, n'est pas un bon modèle d'étude pour reproduire les phénomènes observés dans le lait. Cependant, son utilisation a tout de même permis l'identification de deux types de comportements originaux : celui de la souche LD61 qui, malgré une croissance et une acidification plus rapides en milieu M17, présente au final des concentrations en lactate et des pH comparables pour les deux milieux M17 et lait écrémé, et celui de la souche LD71 dont la croissance et l'acidification sont également favorisées par le milieu M17, qui permet par ailleurs une amplitude d'acidification et une production de lactate plus importantes que le lait.

Les cultures en Cinac et en fermenteur n'ont pas été réalisées dans les mêmes conditions d'oxygénation. Afin de vérifier que l'oxygène ne modifie la croissance d'aucune des deux souches, des cultures en présence d'oxygène ont été envisagées dans les deux milieux complexes lait écrémé et M17-lactose.

1.3. Effet de l'environnement gazeux sur la croissance des souches LD61 et LD71

Des fermentations en aérobiose et à 34°C ont été réalisées avec les souches LD61 et LD71 dans les deux milieux M17-lactose et lait écrémé thermisé. Les bactéries lactiques homofermentaires en général, et celles appartenant au genre *Lactococcus* en particulier, sont anaérobies aérotolérantes. Bien qu'elles soient dépourvues de l'un des systèmes importants de détoxification des radicaux libres oxygénés (catalase) et d'une chaîne respiratoire, la présence d'oxygène n'est pas létale et va entraîner des remaniements du métabolisme, qu'il s'agisse du catabolisme avec un shift vers une voie fermentaire mixte plus réductrice, ou même de la mise en place d'une respiration si l'hème ou un précurseur est rajouté dans le milieu de culture (Duwat *et coll.*, 2001). Les principaux paramètres descripteurs de la croissance et de l'acidification qui sont présentés dans le tableau IV.1 permettent de comparer les cultures des souches LD61 et LD71 en milieu lait écrémé et M17 et dans les deux environnements gazeux testés.

L'aération a un effet modéré sur le taux de croissance de la souche LD61, avec une baisse d'environ $0,2 \text{ h}^{-1}$ de $\mu_{0,1/1}$, reproductible pour les deux milieux (Tableau IV.1). Les vitesses maximales d'acidification présentent des valeurs globalement comparables en anaérobiose et en aérobie. Les vitesses spécifiques d'acidification, qui comme le taux de croissance sont des valeurs moyennées sur la période de temps comprise entre les $\text{DO}_{580\text{nm}}$ 0,1 et 1, présentent un comportement comparable au $\mu_{0,1/1}$ avec des valeurs plus faibles en aérobie ($-1,49$ et $-1,1 \cdot 10^{-2} \text{ upH} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) qu'en anaérobiose ($-2,17$ et $-1,77 \cdot 10^{-2} \text{ upH} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ en lait et M17 respectivement). Ainsi, l'oxygène semble ralentir la croissance ainsi que le catabolisme. La V_{max} d'acidification est généralement obtenue en début de culture, alors que l'effet de l'oxygène sur la croissance et le catabolisme ne s'observe que sur les vitesses moyennées. On peut supposer que, les V_{max} étant identiques, le début de la croissance n'est pas affecté par l'aérobie et que cet effet se fait ressentir plus tardivement, avant cependant que la $\text{DO}_{580\text{nm}}$ 1 ne soit atteinte. La présence d'oxygène n'a aucun effet sur la durée de la croissance de la souche LD61 ni sur le pH atteint à ce moment là. Quel que soit le milieu considéré, les quantités de biomasse obtenues en anaérobiose sont inférieures à celles mesurées en aérobie, probablement à cause d'une phase de croissance plus longue en présence d'oxygène. Les concentrations en lactate produit sont également différentes, cette fois c'est en absence d'oxygène que la valeur la plus élevée est obtenue en lait écrémé, alors qu'en milieu M17 l'inverse est observé avec 91 mM de lactate produit en aérobie contre 75,8 mM en anaérobiose. Les valeurs des concentrations de la forme non dissociée, c'est à dire de l'acide lactique (AcLact), souvent considérée comme la forme inhibitrice (Kell *et coll.*, 1981), ont été calculées. En lait écrémé, des valeurs identiques sont obtenues pour les deux conditions d'aération, alors qu'en milieu M17 des valeurs proches, probablement non significativement différentes, sont estimées (8,4 et 7,2 mM). Les pH mesurés à 24 heures sont similaires pour un même milieu. La post-acidification est globalement limitée et plus lente en présence d'oxygène. Comme à l'arrêt de croissance, en lait écrémé, c'est en anaérobiose que la plus grande quantité de lactate totale est produite, alors qu'en milieu M17, c'est en aérobie.

La souche LD71 présente le même comportement que la LD61 vis à vis de l'oxygène (Tableau IV.1). Le taux de croissance ainsi que la vitesse spécifique de post-acidification présentent des valeurs supérieures en anaérobiose dans les deux milieux, alors que les V_{\max} sont, elles par contre, identiques dans les deux environnements gazeux. L'arrêt de croissance s'effectue un peu plus tardivement en aérobiose mais pour des pH et des quantités de biomasse comparables. Comme on l'a observé pour la souche LD61, l'effet de l'oxygène sur la production de lactate (et de la forme non dissociée) diffère selon les milieux. En effet, la synthèse de lactate est favorisée par l'anaérobiose en lait écrémé alors qu'elle l'est par l'aérobiose lors de cultures en M17. Après 24 heures de culture, les valeurs de pH mesurées sont identiques pour les deux cultures en lait écrémé de la souche LD71, alors qu'en milieu M17 la valeur obtenue en absence d'oxygène est plus basse qu'en aérobiose. En milieu M17, des quantités totales de lactate identiques sont obtenues. Dans ce milieu, la post-acidification, que ce soit en terme de production de lactate ou de vitesse de production, est moins importante en aérobiose. Dans le lait, les valeurs de lactate total obtenues sont également identiques mais il est intéressant de noter que dans ce cas la présence d'oxygène a semble-t-il permis une plus grande production de lactate en post-acidification, bien que les vitesses initiales de post-acidification calculées soient inférieures à celles obtenues en anaérobiose.

Tableau IV.1 : Comparaison des principales données descriptrices en phase de croissance, à l'arrêt et à 24 h, des souches LD61 et LD71 au cours de cultures en fermenteur à 34°C, en milieu lait écrémé ou M17, en condition d'anaérobiose ou d'aérobiose.

		LD61				LD71			
		Lait écrémé		M17		Lait écrémé		M17	
		anaérobiose	aérobiose	anaérobiose	aérobiose	anaérobiose	aérobiose	anaérobiose	aérobiose
croissance	pH _{init}	6,42	6,37	6,49	6,67	6,43	6,37	6,49	6,67
	$\mu_{0,1/1}$	0,56	0,36	1,24	1,02	0,38	0,2	1,35	1,07
	V _{max} (10 ⁻³)	-3,83	-4,17	-13	-13,7	-4	-3,3	-15,2	-14,2
	V _{spé0,1/1} (10 ⁻²)	-2,17	-1,49	-1,77	-1,1	-1,6	-1,04	-1,58	-1,18
arrêt	temps	12	12,5	5,5	6	7,5	9	5,5	6,5
	biomasse	0,71	0,87	1,35	1,61	0,3	0,3	1,42	1,52
	pH	4,9	4,81	4,84	4,85	5,6	5,52	4,74	4,74
	lactate	71,6	59,6	75,8	91	28,8	17,2	69	80
	AcLact	6	6	7,2	8,4	0,51	0,37	8,04	9,32
24 h	pH	4,71	4,71	4,52	4,58	4,88	4,88	4,47	4,57
	lactate _{p-A}	14,7	10,4	13,2	5	28,8	45,5	24	10,4
	lactate _T	86,3	70	89	96	57,6	62,7	93	90,4
	v _{Lac1h}	3,4	1,3	3,6	1,7	16,4	15,4	14,8	5,3
	V _{spé1h} (10 ⁻³)	-0,8	-0,09	-2,3	-1,64	-5,4	-1,04	-2,1	-0,58

Légende : pH_{init} : pH initial, $\mu_{0,1/1}$: μ moyen entre les DO 0,1 et 1 (h⁻¹), V_{max} : vitesse maximale d'acidification (x.10⁻³ upH.min⁻¹), V_{spé0,1/1} : vitesse spécifique d'acidification moyennée au cours de la période entre les DO 0,1 et 1 (x.10⁻³ upH.g⁻¹.min⁻¹), temps (heures), biomasse (g.L⁻¹), lactate (mM), AcLact : acide lactique, forme non dissociée du lactate (mM), lactate_{p-A} : lactate produit au cours de la phase de post-acidification (mM), lactate_T : lactate total (mM), v_{Lac1h} : vitesse spécifique moyenne de production de lactate au cours de la première heure de post-acidification (mmol.g.h⁻¹), V_{spé1h} : vitesse spécifique moyenne d'acidification au cours de la première heure de post-acidification (upH.g.min⁻¹).

La présence d'oxygène a peu d'effet sur la croissance et l'acidification des deux souches LD61 et LD71, et cet effet semble parfois dépendre du milieu considéré. L'aérobiose entraîne un ralentissement de la croissance et de l'acidification, mais ce phénomène a lieu semble-t-il après quelques heures de culture. Pendant la phase de croissance en milieu lait, en aérobiose, la production de biomasse semble favorisée au détriment de celle du lactate. En milieu M17, la présence d'oxygène est responsable à la fois d'une augmentation de la quantité de biomasse et de lactate. En général, pour chaque milieu, les pH à 24 heures sont similaires avec ou sans oxygène, de même que les concentrations en lactate total qui sont globalement peu différentes, surtout pour la souche LD71. Par contre, la présence d'oxygène semble responsable d'un ralentissement de la phase de post-acidification, dès la première heure.

Les cultures réalisées en lait écrémé et en milieu M17-lactose ont permis de définir deux types de comportement propres à chaque souche. Nous avons mis en évidence pour la souche LD71 une inhibition de la croissance liée à la culture en lait écrémé. Pour expliquer ce phénomène, plusieurs hypothèses ont été envisagées, dont une limitation de type nutritionnel. La source de carbone ne peut être mise en cause puisque que ce soit en lait écrémé ou en M17, le lactose n'est jamais épuisé dans le milieu. Les lactocoques sont connus comme étant des micro-organismes nutritionnellement exigeants (Cocaign-Bousquet *et coll.*, 1995), en particulier en terme d'acides aminés et de vitamines. Nous avons donc décidé d'étudier l'effet de suppléments (acides aminés, peptides, vitamines...) sur l'activité acidifiante des deux souches de *L. lactis* en lait.

1.4. Effet de suppléments nutritionnelles sur la croissance des souches LD61 et LD71 en lait

L'emploi du Cinac est préféré pour cette étude puisqu'il permet de réaliser de nombreuses cultures en parallèle, permettant ainsi de comparer l'effet de différents milieux sur l'acidification des souches LD61 et LD71. De plus l'environnement micro-aérobie de ce type de culture ne peut être considéré comme un problème vis à vis de l'interprétation des résultats puisque, comme nous l'avons vu, la présence d'oxygène (en quantités importantes) a peu d'effet sur la croissance et l'acidification des deux souches. Certains milieux comme le rétentat, le lait écrémé thermisé ou le M17 ont servi de « références ». Un nouveau lait, le lait G, a également été testé, son intérêt réside dans le fait que, contrairement au premier lait écrémé, il ne subit aucun traitement thermique. En effet, il s'agit d'un lait à reconstituer en poudre stérile (par ionisation) et sa reconstitution avec de l'eau autoclavée (en atmosphère stérile) lui évite de subir un traitement thermique. Les différentes suppléments réalisées dans ce lait sont de deux types, vitaminiques et azotées. Les concentrations en vitamines et acides aminés utilisées sont celles définies pour le milieu MCD afin d'éviter les limitations en molécule essentielle à la croissance de *Lactococcus lactis*. Des enrichissements complexes en peptone et extrait de levure (Yeast Extract) ont également été réalisés.

Le logiciel utilisé pour le système Cinac permet, outre un suivi et un enregistrement en direct des valeurs de pH au cours du temps, un calcul de divers paramètres dits « descripteurs » de l'acidification qui permettent de comparer les différentes cultures. Il s'agit entre autre de l'amplitude de l'acidification (pH final - pH initial), du temps de latence ou encore des vitesses d'acidification. Toutes les cultures sont réalisées au minimum en duplicat, mais pour une facilité de présentation, une seule cinétique représentative de chaque condition est présentée Figure IV.3.

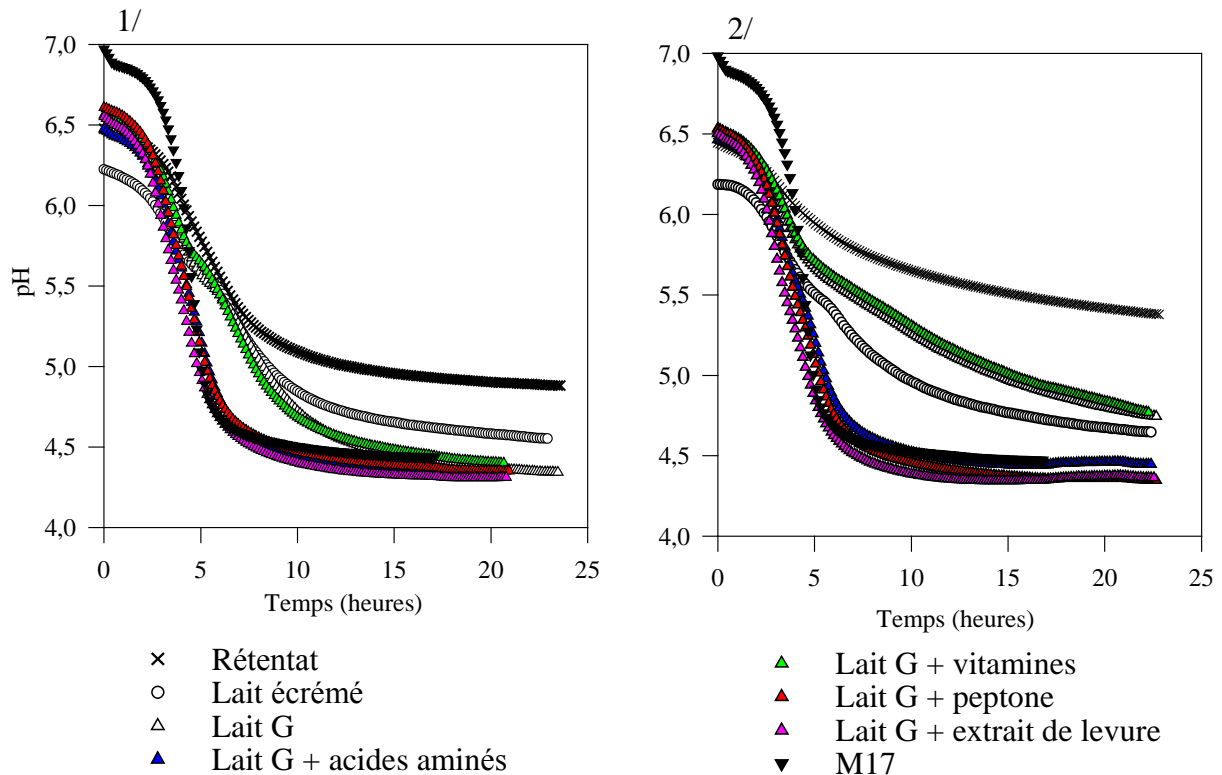


Figure IV.3 : Evolution du pH en fonction du temps au cours de cultures Cinac des souches LD61 (1) et LD71 (2) dans divers milieux à 34°C.

Les courbes d'acidification obtenues avec la souche LD61 présentent des profils différents selon les milieux de culture (Fig. IV.3). Le pH initial du M17 est proche de la neutralité (6,94), celui des laits G (supplémentés ou non) est voisin de 6,5, le milieu rétentat présente une valeur proche avec 6,44, et c'est le lait écrémé thermisé qui possède la valeur la plus basse (6,2). Malgré les quelques écarts de pH initiaux, les profils d'acidification de la souche LD61 ainsi que les pH finaux sont très proches pour les divers laits G ainsi que le M17. Les acidifications en rétentat et lait écrémé thermisé sont les plus lentes et les moins importantes (pH finaux moins bas).

La souche LD71 présente un comportement légèrement différent de la souche précédente. Si, comme pour cette dernière, les milieux M17 et lait G supplémentés en acides aminés, peptone et extrait de levure, permettent une acidification importante et similaire, ce n'est pas le cas des autres milieux et en particulier du lait G, qu'il soit ou non enrichi en vitamines, dont le profil est plus proche de celui observé pour le lait écrémé thermisé. Le milieu rétentat semble le moins propice à l'acidification avec un pH final très élevé comparativement aux autres (5,33 en moyenne).

Tableau IV.2 : Récapitulatif des principaux paramètres descripteurs cinac obtenus pour des cultures des souches LD61 et LD71 dans différents milieux à 34°C. Les cultures étant réalisées au moins en duplicat, la moyenne et l'écart-type des valeurs sont présentés pour chaque condition, les valeurs d'écart-type ne sont pas précisées lorsqu'elles sont inférieures à 10^{-2} .

Souche	Milieu	Rétentat	Lait écrémé	Lait G	Lait G + AA	Lait G + vit	Lait G + pep	Lait G + YE	M17
	Descripteur								
LD61	Amp. acidif. (upH)	-1,59	-1,67	-2,13 ±0,03	-2,1 ±0,05	-2,14 ±0,03	-2,24 ±0,03	-2,22 ±0,03	-2,51
	V_{\max} ($\times 10^{-3}$ upH.min ⁻¹)	-4,45 ±0,21	-3,95 ±0,07	-5,75 ±0,19	-7,35 ±0,07	-6 ±0,14	-8,65 ±0,07	-9,05 ±0,21	-21
LD71	Amp. acidif. (upH)	-1,05 ±0,02	-1,54 ±0,01	-1,77 ±0,02	-2,01	-1,77 ±0,01	-2,18	-2,14	-2,53
	V_{\max} ($\times 10^{-3}$ upH.min ⁻¹)	-2,6	-4	-4,95 ±0,17	-7,25 ±0,07	-5,05 ±0,07	-8,45 ±0,07	-9,75 ±0,21	-21,05 ±0,07

Légende : Amp. acidif. (upH) : amplitude de l'acidification calculée sur 24 heures de culture ; V_{\max} ($\times 10^{-3}$ upH.min⁻¹) : vitesse maximale d'acidification ; Lait G + AA : Lait G supplémenté en acides aminés ; Lait G + vit : Lait G supplémenté en vitamines ; Lait G + pep : Lait G supplémenté en peptone ; Lait G + YE : Lait G supplémenté en extrait de levure ; M17 : milieu M17-lactose.

Le tableau IV.2 reprend les valeurs pour chaque condition de culture de deux descripteurs importants que sont l'amplitude et la vitesse maximale d'acidification. Des répétitions ayant été réalisées pour chaque condition (de 2 à 4), les valeurs présentées correspondent aux moyennes et aux écart-types calculés. Les écart-types ne sont précisés que lorsqu'ils sont supérieurs à une valeur de 10^{-2} , les autres étant considérés comme négligeables. Les expérimentations paraissent reproductibles, puisque toutes conditions confondues, les erreurs maximales sont de 2,5 % et 4,7 % respectivement pour l'amplitude d'acidification et la V_{\max} . L'imprécision sur la mesure des pH (initiaux ou finaux) est également faible car l'écart maximal est de 0,08 upH pour des cultures dupliquées, ce qui correspond à seulement 1,7 % d'erreur sur ces mesures.

Il existe une différence d'acidification pour les deux souches entre les deux milieux lait (lait écrémé thermisé et lait G). Le lait G permet une meilleure acidification en terme d'amplitude et de vitesse maximale (tableau IV.2). Il semble que la thermisation subie par le lait écrémé soit néfaste à l'acidification et c'est pour cela que le lait G sera préféré pour les cultures ultérieures.

Les résultats obtenus en Cinac corroborent tout à fait ceux issus des différentes fermentations. En effet, les deux souches *diacetylactis* LD61 et LD71 acidifient différemment les milieux laits simples et rétentat, alors que leurs profils (Fig IV.3) et descripteurs d'acidification sont comparables dans le milieu M17-lactose. Pour les deux souches, l'ajout de vitamines au lait G n'a aucun effet sur l'acidification, ce qui n'est pas le cas des nutriments azotés. Lorsque le lait G est supplémenté en acides aminés, peptone ou extrait de levure, chaque souche présente un type de comportement différent. Dans le cas de la souche LD61, cette supplémentation permet d'accroître la vitesse d'acidification, mais elle n'a par contre aucun effet sur son amplitude ($2,17 \pm 0,06$ upH de moyenne). Le comportement de la souche LD71 est totalement différent puisque ces trois types de supplémentation permettent à la fois une augmentation de la vitesse maximale et de l'amplitude d'acidification avec un effet plus marqué de l'extrait de levure en ce qui concerne la V_{\max} (Fig IV.3).

Les hypothèses initiales envisagées afin d'expliquer l'inhibition de la croissance de la souche LD71 dans le lait étaient l'apparition d'une limitation nutritionnelle au cours de la culture, ou la formation d'un produit inhibiteur. Les expériences de supplémentation réalisées en Cinac ont permis d'orienter le choix vers un problème nutritionnel puisque les supplémentations ont permis, excepté celle en vitamines, d'augmenter l'amplitude de l'acidification. Il paraît alors logique de relier la faible croissance en lait à l'épuisement d'un ou plusieurs nutriments, probablement azotés (acides aminés, peptides...). Bien que pour la souche LD61 aucune limitation de ce type ne soit observée (pas d'augmentation de l'amplitude d'acidification suite aux supplémentations), il est tout de même intéressant de savoir à quelles limitations la croissance de cette souche est sujette dans le lait. Dans ce but, une culture dans le lait a été réalisée à pH régulé afin de dissocier l'effet de la baisse du pH de celui d'autres limitations sur la croissance.

1.5. Culture de la souche LD61 en lait, à pH régulé

Une fermentation à pH régulé à 6,4 a donc été réalisée en milieu lait G avec la souche *L. lactis* LD61. Le pH est régulé via l'ajout automatique d'une solution de KOH concentrée dans le fermenteur.

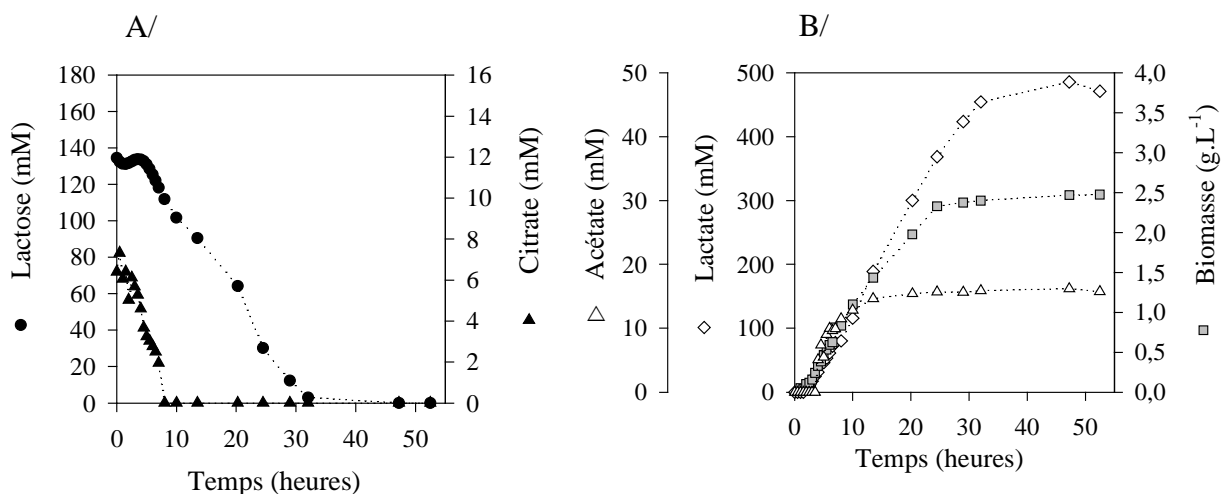
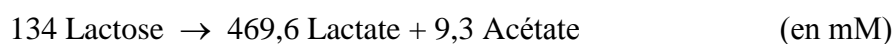


Figure IV.4 : Cinétiques de consommation des substrats (A), de croissance et de formation des produits (B) au cours d'une fermentation de la souche LD61 dans du lait G, à 34°C, en anaérobiose et à pH régulé à 6,4.

A pH régulé, tout le lactose (134 mM) est consommé en 32 heures de culture (Fig. IV.4). Le citrate est, comme à pH libre, rapidement métabolisé puisqu'il est épuisé dès 8 heures de culture. En parallèle, on observe une croissance importante, qui ralentit fortement à 24,5 h de culture, et la quantité de biomasse qui est alors de 2,33 g.L⁻¹ évolue peu par la suite (2,47 g.L⁻¹ à 52,5 h). Le taux de croissance $\mu_{0,1/1}$ calculé (0,74 h⁻¹) est supérieur à celui obtenu en lait écrémé thermisé (0,56 h⁻¹), mais reste inférieur à celui du M17 (1,24 h⁻¹). La quantité de lactate produite au cours de cette culture atteint 476 mM. Le lactate n'est pas l'unique produit de fermentation, de l'acétate est également produit mais en faibles quantités puisque la concentration maximale, obtenue vers 10 heures de culture, n'atteint que 15,7 mM. La stœchiométrie globale de la fermentation peut être scindée en deux réactions, la première issue de la consommation du citrate et la seconde de celle du lactose :



La consommation du citrate est théoriquement à l'origine d'une production équimolaire de lactate, d'acétate et de CO₂ tandis que celle du lactose produit essentiellement du lactate (98 % des produits) et de faibles quantités d'acétate. Le rendement en lactate obtenu est de 3,5 moles de lactate par mole de lactose consommé ce qui est proche du rendement théorique (4 mol.mol⁻¹).

A pH régulé, aucune limitation nutritionnelle spécifique n'est observée pour la souche LD61, puisque la croissance ne s'arrête que lorsque la source de carbone, le lactose, est épuisée. A pH libre, on peut donc supposer que l'arrêt de croissance est lié à la baisse de pH et/ou à la production de lactate associée.

Bien que différentes en lait écrémé, les cinétiques de croissance et d'acidification sont comparables pour les deux souches en milieu M17. Une étude micro-cinétique comparative de ces souches paraît donc peu pertinente dans ce milieu. Il a donc été décidé de réaliser une nouvelle sélection de souches d'origine fromagère avec cette fois des critères un peu différents des précédents.

2. Etude cinétique comparative de nouvelles souches

Les deux souches initialement sélectionnées possèdent des comportements différents selon les milieux. Leurs profils identiques en M17 sont problématiques vis à vis de la stratégie choisie et des hypothèses de départ (capacités glycolytiques et/ou sensibilité au stress acide différentes). Deux types de comportements ont été définis, le type « LD61 » pour lequel la supplémentation du lait ne modifie pas l'amplitude d'acidification, et le type « LD71 » qui présente une limitation nutritionnelle dans ce milieu puisque la supplémentation permet d'augmenter cette amplitude. La société SOREDAB a réalisé d'autres sélections dans le but d'intégrer de nouvelles souches à cette étude. La sélection s'est cette fois effectuée après l'analyse de cultures Cinac en lait écrémé et lait écrémé supplémenté en tryptone. Ainsi, deux souches de type « LD61 » et deux souches de type « LD71 » ont été retenues car elles présentent des valeurs de V_{\max} et/ou de $\text{pH}_{24\text{h}}$ différentes de celles de la souche de référence. Les 4 nouvelles souches, LC30, LC40, LD53 et LL39, appartiennent à des sous-espèces de *Lactococcus lactis* différentes, les deux souches LC30 et LC40 à la sous-espèce *cremoris*, la souche LD53, comme les deux souches de référence, à la sous-espèce *lactis* biovar *diacetylactis* et la dernière, la LL39, à la sous-espèce *lactis*.

Tableau IV.3 : Valeurs des principaux descripteurs Cinac (V_{\max} , vitesse maximale d'acidification et $\text{pH}_{24\text{h}}$, pH à 24 h) pour les six souches de *Lactococcus lactis* sélectionnées par la société Sorédab.

Souches	Lait		Lait + Tryptone		Ecart de pH
	V_{\max}	$\text{pH}_{24\text{h}}$	V_{\max}	$\text{pH}_{24\text{h}}$	
LD61	-5.10^{-3}	4,52	$-7,2. 10^{-3}$	4,59	+ 0,07
LC40	$-5,9. 10^{-3}$	4,64	$-7,1. 10^{-3}$	4,66	+ 0,02
LD53	$-7,7. 10^{-3}$	4,34	$-1,04. 10^{-2}$	4,47	+ 0,13
LD71	$-3,6. 10^{-3}$	4,86	$-7. 10^{-3}$	4,6	- 0,26
LC30	$-4. 10^{-3}$	4,78	$-9,1. 10^{-3}$	4,6	- 0,18
LL39	$-3,9. 10^{-3}$	4,93	$-5,5. 10^{-3}$	4,72	- 0,21

Légende : V_{\max} : vitesse maximale d'acidification (en $\text{upH}\cdot\text{min}^{-1}$) ; $\text{pH}_{24\text{h}}$: pH mesuré après 24 h de culture (upH) ; Ecart de pH : écart de pH entre la culture en lait + tryptone et celle en lait (upH).

Le tableau IV.3 présente les valeurs de deux des paramètres descripteurs mesurés en Cinac que sont la V_{\max} d'acidification et le $\text{pH}_{24\text{h}}$. Parmi les souches de type « LD61 », la LC40 présente des vitesses d'acidification comparables à celles de la souche de référence avec cependant des $\text{pH}_{24\text{h}}$ plus élevés, tandis que l'acidification de la souche LD53 est plus rapide et les pH à 24 heures inférieurs à ceux de la souche LD61. Les 3 souches de type « LD71 » ont également des comportements acidifiant différents. La souche LC30 est plus rapide que la LD71, surtout en lait supplémenté mais leurs $\text{pH}_{24\text{h}}$ restent comparables. La souche LL39 présente une acidification comparable aux deux autres souches en lait écrémé, alors qu'en lait supplémenté, elle est plus lente avec un pH final plus élevé.

Il est intéressant de remarquer que les trois souches de type « LD71 » ont des paramètres d'acidification équivalents en lait écrémé, probablement du fait d'une croissance très limitée. La supplémentation du lait permet dans ce cas une acidification plus importante, autant en terme de vitesse que d'amplitude, puisque le $\text{pH}_{24\text{h}}$ en présence de tryptone est toujours inférieur à celui mesuré pour le lait seul, de 0,18 à 0,26 upH selon les souches (Tableau IV.3). Les souches de type « LD61 » acidifient plus rapidement lorsque le lait est supplémenté tout en conservant un $\text{pH}_{24\text{h}}$ comparable ou légèrement supérieur. En effet, l'écart de pH le plus important entre les deux milieux n'est que de 0,13 upH et 0,02 upH seulement pour le plus faible. Cependant, cet écart est positif pour les trois souches considérées et on peut donc se demander si le fait d'avoir une acidification plus rapide en lait supplémenté permet d'obtenir un $\text{pH}_{24\text{h}}$ plus élevé. Ces écarts sont néanmoins faibles et il semble nécessaire de s'interroger sur leur significativité puisque ces cultures n'ont été réalisées qu'une fois, de même les valeurs de pH initiaux, qui auraient permis de comparer les amplitudes d'acidification pour ces 6 souches, n'étant pas disponibles il est difficile de conclure quant à la pertinence de cette observation.

L'utilisation du milieu M17-lactose a permis de lever les limitations nutritionnelles de la souche LD71 et elle permet également de réaliser une étude macro- et micro-cinétique complète. Les 6 souches disponibles vont donc être cultivées sur trois types de milieux : lait G, lait G supplémenté et M17-lactose, afin d'analyser leurs croissances, leurs cinétiques d'acidification, leurs capacités cataboliques, dans le but d'apporter des réponses sur le contrôle de l'acidification et de la post-acidification chez des souches de lactocoques d'origine fromagère.

2.1. Souches non retenues

Parmi les nouvelles souches sélectionnées, deux n'ont pas été retenues pour la suite de l'étude. En effet, les cultures des souches LC40 et LD53, réalisées en milieu M17-lactose à 34°C et en anaérobiose (Fig. IV.5) ont révélé des caractéristiques incompatibles ou présentant peu d'intérêt dans l'étude comparative.

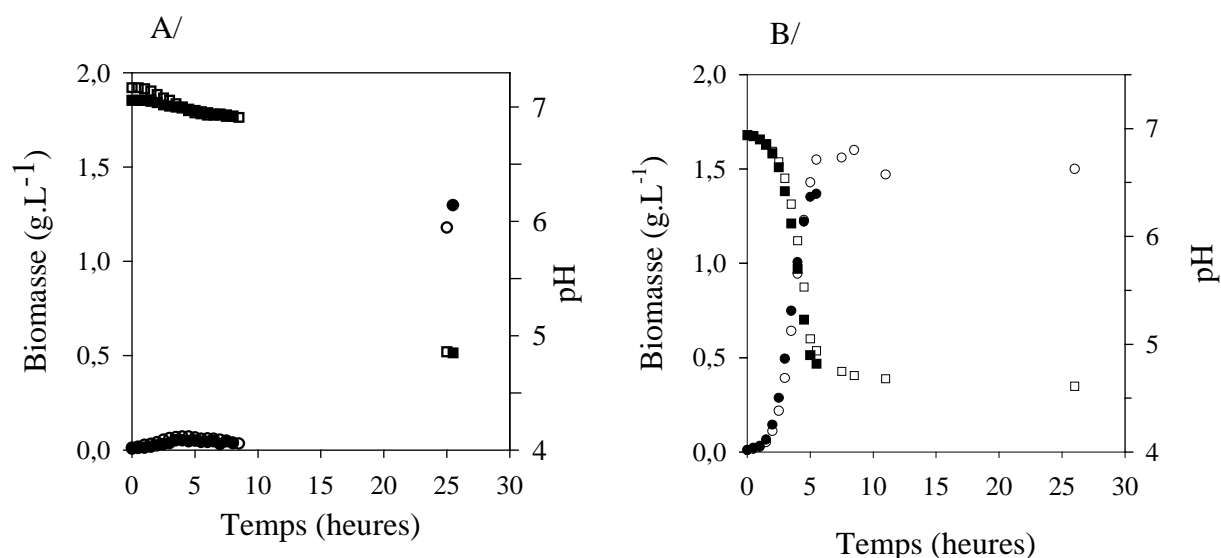


Figure IV.5 : Evolution de la biomasse (○) et du pH (□) en fonction du temps pour des cultures en M17, à 34°C et anaérobiose des souches LC40 (A) et LD53 (B).

Deux lots de culture indépendants ont été réalisés pour chaque souche. Entre 0 et 8 h, croissance et acidification sont pratiquement inexistantes pour la souche LC40 (Fig. IV.5.A). Cependant, après 25 h de culture, la quantité de biomasse observée (1,23 g.L⁻¹ en moyenne) montre qu'il y a bien eu croissance. De plus, parallèlement à cet accroissement de biomasse, le milieu a subi une acidification, avec un pH de 7,1 en début de culture qui n'est plus que de 4,85 à 25 h. Ces profils de croissance atypiques peuvent être dus soit à une longue phase de latence (8 heures au minimum), soit à la croissance d'un micro-organisme contaminant dans le fermenteur. Deux cultures indépendantes ont été menées et les résultats obtenus montrent la reproductibilité du phénomène (Fig. IV.5.A). Afin d'écarter une éventuelle contamination du milieu, des observations au microscope ont été réalisées et elles n'ont pas révélé la présence de contaminant. Le retard de croissance observé avec la souche LC40 semble dû à une longue phase de latence. Cependant, lors des précultures en fioles anaérobies en milieu M17-lactose, une croissance normale est observée (pas de phase de latence), de même que lors des cultures

Cinac en lait au cours desquelles aucun retard d'acidification n'a été remarqué. Les conditions de culture en fermenteur semblent donc préjudiciables à la bonne croissance de cette souche. La seule différence flagrante entre ces types de cultures, hormis l'agitation, est l'état d'oxydation du milieu. En effet, dans les fioles de préculture et les flacons Cinac le milieu est moins « anaérobique » que dans les fermenteurs et cette présence plus importante d'oxygène dans les fioles pourrait être favorable à la croissance. Des cultures en micro-aérobiose et en aérobiose ont donc été réalisées avec la souche LC40 afin de confirmer cette hypothèse. Dans les deux cas, le démarrage de la croissance a été quasi immédiat avec une quantité maximale de biomasse de 1,16 et 1,22 g.L⁻¹ respectivement, obtenue à 11 h pour les cultures en condition de micro-aérobiose et aérobiose. La présence d'oxygène, même en faible quantité, semble indispensable afin de limiter la phase de latence. L'étude comparative des différentes souches devant être réalisée dans les mêmes conditions de cultures, en particulier d'anaérobiose, afin d'éviter de visualiser des écarts de comportement liés aux conditions environnementales, la souche LC40 qui présente des exigences très particulières en terme d'environnement gazeux n'a pas été retenue pour la suite de l'étude.

La souche LD53, de même phénotype protéasique que la souche LD61, a été sélectionnée sur la base d'une acidification plus rapide et de pH_{24h} inférieurs à ceux de la souche de référence en milieu lait écrémé seul et supplémenté (Tableau IV.3). Un tel profil n'est absolument pas reproduit lors de la culture en milieu M17-lactose. La phase de croissance est légèrement plus rapide que celle de la souche LD61 (1,36 contre 1,24 h⁻¹ pour la LD61), et la croissance de la souche LD53 s'arrête après 7,5 h de culture alors que 1,56 g.L⁻¹ de biomasse ont été produits. Le pH atteint à ce moment là est de 4,75 upH, ce qui correspond à la présence de 84 mM de lactate total et 9,58 mM de la forme non dissociée. Bien que le pH atteint à l'arrêt de croissance soit plus bas que celui de la souche LD61 (4,84 upH), les vitesses maximales d'acidification sont peu différentes ($-1,52 \cdot 10^{-2}$ upH.min⁻¹ pour la souche LD53 contre $-1,3 \cdot 10^{-2}$ pour la LD61), contrairement à ce qui est observé en Cinac. De même, la valeur de pH_{24h} ne correspond pas du tout à celles mesurées en lait puisqu'elle est ici de 4,61 upH, ce qui est bien supérieur aux valeurs Cinac (4,34 et 4,47 upH) et à la valeur obtenue avec la souche LD61 en M17 (4,52). L'acidification de la souche LD53 semble favorisée au cours des cultures Cinac, soit par le milieu lait, soit par la présence d'oxygène, mais en M17 son étude ne semble pas nécessaire puisque ses profils de croissance et d'acidification sont trop proches de ceux des deux souches de référence LD61 et LD71.

Lors des cultures Cinac en milieu lait écrémé seul un paramètre macro-cinétique (pH) a pu être analysé et il était donc nécessaire de réaliser de nouvelles cultures dans ce type de milieu afin de déterminer d'autres paramètres cinétiques pour ces souches (croissance, catabolisme) et de conclure quant au contrôle de l'acidification et aux différences de comportements dans de tels milieux.

2.2. Cultures en « milieux lactés »

Des fermentations ont été réalisées dans les conditions classiques de température (34°C) et d'anaérobiose, en milieu lait G et lait G supplémenté en tryptone pour les quatre souches dont nous disposons. Les données cinétiques obtenues au cours de la phase de croissance sont comparées dans le Tableau IV.4. Il est intéressant de remarquer que dans les deux types de lait aucune consommation de citrate n'est notée pour les souches LL39 et LC30, même à bas pH, alors que les deux souches *diacetylactis* (LD61 et LD71), elles, le consomment rapidement.

Tableau IV.4 : Valeurs des principaux paramètres cinétiques caractérisant la phase de croissance (taux de croissance, vitesse spécifique de production de lactate et vitesses d'acidification) pour les souches LD61, LD71, LL39 et LC30 au cours de cultures en milieux lait G seul ou supplémenté en tryptone, à pH libre, 34°C et en condition d'anaérobiose.

	LD61		LD71		LL39		LC30	
	<i>lait G</i>	<i>lait G + tryptone</i>	<i>lait G</i>	<i>lait G + tryptone</i>	<i>lait G</i>	<i>lait G + tryptone</i>	<i>lait G</i>	<i>lait G + tryptone</i>
$\mu_{0,1/1}$ (h ⁻¹)	0,73	0,87	0,5	0,87	0,22	0,68	0,1	0,75
$V_{\text{moy}0,1/1}$ (x10 ⁻³ upH.min ⁻¹)	-3,9	-4,8	-2,9	-5,1	-1,8	-3,6	-1,1	-5
$V_{\text{spé}0,1/1}$ (x10 ⁻² upH.g ⁻¹ .min ⁻¹)	-0,76	-3,3	-3,4	-3,1	-1,5	-4	-0,87	-5,5
V_{max} (x10 ⁻³ upH.min ⁻¹)	-4	-7,7	-4,3	-8,3	-4,3	-7	-2,8	-7

Légende : $\mu_{0,1/1}$: taux de croissance calculé sur la période de culture entre les DO₅₈₀ 0,1 et 1 ; $V_{\text{moy}0,1/1}$ et $V_{\text{spé}0,1/1}$: vitesse moyenne et spécifique d'acidification calculée sur la période de culture entre les DO₅₈₀ 0,1 et 1 ; V_{max} : vitesse maximale d'acidification.

Pour l'ensemble des souches, il apparaît que la supplémentation du lait G en tryptone provoque une augmentation du taux de croissance. Si elle est faible pour la souche LD61 (facteur 1,2), elle est beaucoup plus élevée (facteur 7,5 environ) pour la souche LC30 (Tableau IV.4). Une telle augmentation est également observée au niveau des vitesses maximales d'acidification, bien que dans de moindres proportions (facteurs de 1,6 pour la souche LL39, 1,9 pour les souches LD61 et 71 et jusqu'à environ 2,5 pour la LC30). Les vitesses moyennes d'acidification ($V_{\text{moy},0,1/1}$) présentent le même type de comportement que les taux de croissance, puisque la supplémentation du lait G entraîne une augmentation de ces vitesses dans des proportions comparables à celles de la croissance. Afin de dissocier les effets de la croissance et du catabolisme sur l'acidification, la $V_{\text{spé},0,1/1}$ a également été calculée pour chaque culture. Vis à vis de ce paramètre deux comportements sont à distinguer. Tout d'abord celui de la souche LD71 pour laquelle la supplémentation du lait n'a aucun effet sur la vitesse spécifique d'acidification et donc sur le flux glycolytique. Pour cette souche, l'augmentation de la vitesse maximale d'acidification provoquée par la supplémentation du lait G en tryptone est uniquement liée à une augmentation du taux de croissance. Les souches LL39 et LC30 présentent le même phénotype que la souche LD71, mais contrairement à cette dernière, la présence de tryptone dans le lait est, cette fois-ci, responsable à la fois de l'augmentation du taux de croissance et de la vitesse spécifique d'acidification, donc du flux glycolytique, les deux se répercutant sur la vitesse maximale d'acidification. Il s'agit d'un comportement proche de celui de la souche de référence LD61. La souche LL39 présente des caractéristiques originales puisque, malgré des taux de croissance inférieurs à ceux de la souche LD61 en lait G, supplémente ou non, les vitesses maximales d'acidification présentent des valeurs proches même en lait G. Une étude plus approfondie de ces deux souches paraît intéressante afin de comparer le comportement macro-cinétique global de deux souches qui, bien que présentant des « phénotypes » différents, montrent apparemment des capacités glycolytiques proches.

Des cultures des souches LD61 et LL39 en lait G et lait G supplémente ont donc été suivies jusqu'à 24 h et les différentes données cinétiques obtenues au cours de ces fermentations sont présentées dans le tableau IV.5.

La croissance de la souche LL39 (0,22 et 0,68 h⁻¹) est plus lente que celle de la souche LD61 (0,73 et 0,87 h⁻¹), et ceci dans les deux milieux. La vitesse spécifique d'acidification, qui correspond au flux glycolytique moyenné sur la période de culture entre DO_{580nm} 0,1 et 1, est par contre supérieur pour la souche LL39, particulièrement en lait G. Il en résulte des vitesses maximales d'acidification, résultant de la combinaison du flux glycolytique et de la croissance, similaires pour les deux souches.

Tableau IV.5 : Valeurs des principaux paramètres cinétiques caractérisant la croissance et la post-acidification de la souche LD61 et de la souche LL39, lors de cultures en milieu lait G seul ou supplémenté en tryptone, à pH libre, 34°C et anaérobiose.

		LD61		LL39	
		<i>lait G</i>	<i>lait G + tryptone</i>	<i>lait G</i>	<i>lait G + tryptone</i>
Phase de croissance	$\mu_{0,1/1}$ (h ⁻¹)	0,73	0,87	0,22	0,68
	$V_{sp\acute{e}0,1/1}$ (x10 ⁻² upH.g ⁻¹ .min ⁻¹)	-0,76	-3,3	-1,5	-4
	V_{max} (x10 ⁻³ upH.min ⁻¹)	-4	-7,7	-4,3	-7
Arrêt de croissance	Temps (h)	8	8	10	6,5
	Biomasse (g.L ⁻¹)	0,68	0,68	0,28	0,84
	pH (upH)	5,05	4,73	5,42	5,15
	[lactate] (mM)	86,7	101,7	48	68,5
	[AcLact] (mM)	5,3	12,1	1,3	3,3
	Y_X (g.mol ⁻¹ lactate)	7,5	6,7	5,9	12,2
Valeurs à 24 h	pH _{24h} (upH)	4,53	4,54	4,87	4,58
	Baisse pH _{24h} (upH)	-2,03	-2,06	-1,67	-2,02
	Baisse pH _{post-acid} (upH)	-0,52	-0,19	-0,61	-0,57

Légende : $\mu_{0,1/1}$: taux de croissance calculé sur la période de culture entre les DO₅₈₀ 0,1 et 1 ; $V_{sp\acute{e}0,1/1}$: vitesse spécifique d'acidification calculée sur la période de culture entre les DO₅₈₀ 0,1 et 1 ; V_{max} : vitesse maximale d'acidification; [AcLact] : concentration de l'acide lactique, forme non dissociée ; Y_X : rendement en biomasse calculé par mole de lactate produite ; pH_{24h} : pH mesuré après 24 h de culture ; Baisse pH_{24h} : diminution de pH observée en 24 h ; Baisse pH_{post-acid} : diminution de pH observée au cours de la phase de post-acidification.

Contrairement à la souche LL39 pour laquelle la croissance est plus longue en absence de tryptone (10 heures au lieu de 6,5), la supplémentation du lait G ne permet pas à la souche LD61 de raccourcir la durée de la phase de croissance (8 heures dans les deux cas). La souche LD61 présente des quantités de biomasse identiques dans les deux milieux (0,68 g.L⁻¹). Par contre, la souche *lactis* LL39 produit moins de biomasse en absence de tryptone (0,28 g.L⁻¹), et, lorsque celle-ci est présente (0,84 g.L⁻¹), cette valeur est même supérieure à celle de la souche *diacetylactis* LD61. Par conséquent, si les valeurs de rendement en biomasse sont comparables dans les deux milieux pour la souche LD61, ce n'est pas le cas pour l'autre souche qui présente un rendement deux fois plus élevé lorsque le lait est supplémenté (12,2 contre 5,9 g.mol⁻¹ de lactate). La supplémentation permet d'obtenir des valeurs de pH plus basses à l'arrêt de croissance d'environ 0,3 upH pour les deux souches. Enfin, les concentrations en lactate et en acide lactique sont toujours inférieures pour la souche LL39 par rapport à celles de la souche de référence.

Après 24 heures de fermentation, des valeurs comparables de pH sont mesurées pour trois des cultures, celles de la souche LD61 et celle de la souche LL39 en lait supplémenté, alors que celle de la souche LL39 en lait G présente une valeur plus élevée (4,87 upH). C'est par contre pour la culture de la souche LD61 en lait G supplémenté que la post-acidification possède la plus faible amplitude avec -0,19 upH contre -0,56 ± 0,03 upH en moyenne pour les trois autres cultures. Ces données confirment le fait que la souche LL39 est du type « LD71 » puisque la supplémentation du lait G en tryptone a permis l'augmentation à la fois de la vitesse maximale et de l'amplitude de l'acidification.

Trois des quatre souches utilisées dans cette étude sont de type « LD71 » et présentent une limitation de type nutritionnel dans le lait ; de plus, ce type de milieu ne permet pas d'avoir accès à toutes les données nécessaires à une bonne interprétation des phénomènes liés au contrôle de l'acidification et de la post-acidification. Pour cela, une étude a été réalisée avec ces mêmes souches mais cette fois en milieu M17-lactose.

2.3. Analyse physiologique de l'acidification en milieu M17-lactose

2.3.1. Paramètres de fermentation

Les quatre souches sélectionnées ont été cultivées en milieu M17-lactose, dans les mêmes conditions que les cultures en lait G (anaérobiose, 34°C, pH libre). Pour être sûr de ne pas être en conditions de limitation en substrat carboné, le lactose est fourni dans le milieu à une concentration de 50 g.L⁻¹ qui équivaut à celle rencontrée dans le lait. Pour les différentes souches, les cultures ont été réalisées au minimum en duplicat, mais afin de faciliter la présentation graphique, un seul profil de fermentation est présenté car ils varient peu entre les répétitions (Fig IV.6). Les valeurs fournies dans le tableau comparatif (Tableau IV.6) sont des valeurs moyennées pour chaque souche et l'écart-type correspondant est fourni pour chaque mesure. L'absence de valeur pour l'écart-type signifie qu'une seule valeur était disponible et qu'il n'a pu être calculé.

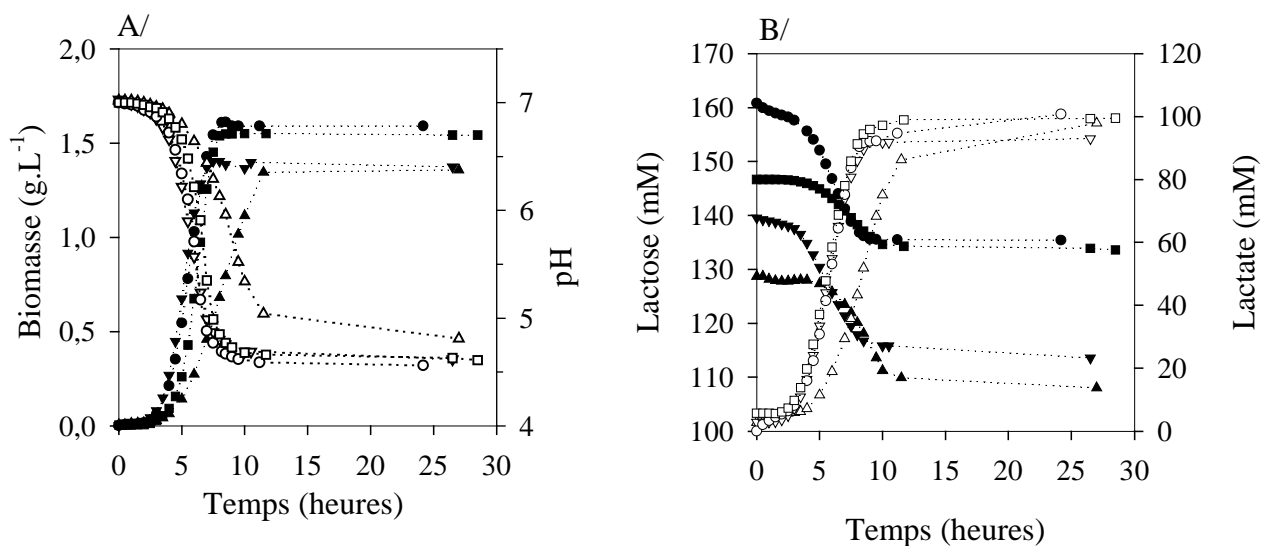


Figure IV.6 : Evolution de la biomasse (en noir), du pH (en blanc) (Fig IV.6.A), du lactose (en noir) et du lactate (en blanc) (Fig IV.6.B), au cours de cultures des souches LD61 (○), LD71 (□), LC30 (△) et LL39 (▽) en milieu M17-lactose, à 34°C et en anaérobiose.

Les figures IV.6.A et B représentent l'évolution de la biomasse, du pH et des concentrations en lactose et lactate au cours des quatre fermentations. Pour chaque culture, la phase de croissance, plus ou moins rapide, précède une phase de post-acidification dont les caractéristiques sont différentes selon les souches. Seule la souche LC30 présente un profil original dans ce milieu complexe, avec une croissance et une acidification plus faibles que celles des autres souches (Fig. IV.6). Les taux de croissance des souches LD61, LD71 et LL39 (1,16 ; 1,18 et 0,91 h⁻¹ respectivement) ainsi que leurs vitesses maximales d'acidification (-1,53 ; -1,55 et -1,1.10⁻² upH.min⁻¹) sont plus élevés que ceux de la souche LC30 dont les valeurs ne sont que de 0,76 h⁻¹ et -6,89.10⁻³ upH.min⁻¹. Les profils des souches LD61 et 71 sont toujours identiques sur milieu M17-lactose. Elles représentent les souches les plus efficaces en terme de croissance, avec des valeurs de taux de croissance et de quantité maximale de biomasse produite les plus élevées dans ce milieu, ainsi qu'en terme d'acidification avec de fortes valeurs de V_{max} et de bas pH_{24h}. La souche LL39 montre quant à elle des profils très proches de ceux des deux souches *diacetylactis*.

Les concentrations en lactose sont grossièrement comprises entre 130 et 160 mM pour les quatre cultures, et cet écart est explicable par le protocole de réalisation du milieu M17. En effet, afin d'éviter lors de la stérilisation de ce milieu la formation de complexes de Maillard qui diminueraient la quantité de sucre disponible, le milieu M17 est thermisé seul dans les fermenteurs. Une solution de lactose concentrée est donc réalisée et stérilisée séparément. Un volume de solution concentrée à rajouter est calculé afin d'obtenir une concentration dans le fermenteur de 150 mM, cependant, ces volumes sont importants et le transfert de la solution s'effectue à partir d'un flacon stérile, grâce à une pompe. Une certaine imprécision subsiste au cours de ces transferts et explique les écarts de concentration initiale en lactose parfois obtenus. Cependant, au cours de nos cultures à pH libre, la consommation de lactose excède rarement 25 mM. Même avec une concentration initiale de 130 mM le sucre ne sera jamais limitant et on peut considérer que ces écarts de concentration n'ont pas d'effet sur la croissance de nos souches.

Les profils de culture ne tenant compte que d'une fermentation, il paraît indispensable de prendre en compte l'ensemble des répétitions afin de pouvoir réellement comparer croissance et acidification pour les quatre souches, et de mettre en évidence les paramètres régulant l'acidification chez ces lactocoques.

Les données fermentaires sont regroupées en fonction des phases de culture (Tableau IV.6). Les valeurs concernant la phase de croissance (taux de croissance, vitesse spécifique de production de lactate et d'acidification) sont calculées sur la période correspondant à des valeurs de DO_{580} comprises entre 0,1 et 1 afin de bénéficier d'une concentration en biomasse suffisante et donc d'une meilleure précision des valeurs, tandis que la V_{max} d'acidification est la valeur maximale mesurée au cours de la culture. Les valeurs à l'arrêt de croissance correspondent à des données ponctuelles mesurées au moment où le taux de croissance devient nul. Dans nos conditions de culture, le dosage du lactate étant plus précis que celui du lactose, le rendement en biomasse est donc calculé comme la quantité de biomasse produite par mole de lactate synthétisé et non par mole de lactose consommé, cependant le lactate provenant principalement du lactose sur un tel milieu il est permis d'estimer la valeur correspondante par mole de lactose en divisant la valeur fournie par 4. Les données à 24 h peuvent correspondre soit à des valeurs ponctuelles, comme le pH_{24h} , soit à des valeurs caractérisant la post-acidification ou la globalité de la culture (baisse pH_{24h}).

Tableau IV.6 : Valeurs des principaux paramètres caractérisant croissance et acidification pour les souches LD61, LD71, LL39 et LC30 en milieu M17-lactose.

		LD61	LD71	LL39	LC30
Phase de croissance	$\mu_{0,1/1}$ (h ⁻¹)	1,16 ± 0,06	1,18 ± 0,11	1 ± 0,13	0,72 ± 0,07
	$V_{sp\acute{e}0,1/1}$ (x10 ⁻² upH.g ⁻¹ .min ⁻¹)	-1,77 ± 0,13	-1,68 ± 0,2	-1,18 ± 0,77	-1,34 ± 0,11
	V_{max} (x10 ⁻² upH.min ⁻¹)	-1,51 ± 0,14	-1,49 ± 0,04	-1,08 ± 0,35	-0,59 ± 0,18
Arrêt de croissance	Temps (h)	6,63 ± 1,03	6,63 ± 0,85	7	9,75 ± 0,29
	Biomasse (g.L ⁻¹)	1,51 ± 0,11	1,49 ± 0,07	1,38 ± 0,02	0,96 ± 0,2
	pH (upH)	4,8 ± 0,05	4,86 ± 0,1	5,04 ± 0,06	5,48 ± 0,08
	pH _{int} (upH)	5,31 ± 0,04	5,43 ± 0,15	5,63 ± 0,07	5,85 ± 0,23
	[lactate] (mM)	81,9 ± 3,5	76,6 ± 17,9	73,8	67,6 ± 2,1
	[AcLact] (mM)	8,44 ± 1,2	7,1 ± 1,6	5,09	1,7 ± 0,21
	Y _X (g.mol ⁻¹ lactate)	18,4 ± 1,2	20,1 ± 4,5	18,45	15,3 ± 2,1
Valeurs à 24 h	pH _{24h} (upH)	4,52 ± 0,04	4,58 ± 0,1	4,62	4,91 ± 0,13
	pH _{int24h} (upH)	4,79 ± 0,06	4,91 ± 0,1	4,97	5,21 ± 0,18
	Baisse pH _{24h} (upH)	-2,28 ± 0,27	-2,26 ± 0,21	-2,41	-2,09 ± 0,17
	Baisse pH _{post-acid} (upH)	-0,27 ± 0,05	-0,27 ± 0,11	-0,37	-0,55 ± 0,22
	$V_{sp\acute{e}1hpost-acid}$ (x10 ⁻³ upH.g ⁻¹ .min ⁻¹)	-1,53 ± 0,67	-1,78 ± 0,83	-2,28	-3,17 ± 0,32

Légende : $\mu_{0,1/1}$: taux de croissance calculé sur la période de culture entre les DO₅₈₀ 0,1 et 1 ; $V_{sp\acute{e}0,1/1}$: vitesse spécifique d'acidification calculée sur la période de culture entre les DO₅₈₀ 0,1 et 1 ; V_{max} : vitesse maximale d'acidification; pH_{int} : pH intracellulaire à l'arrêt de croissance; [lactate] : concentration en lactate (mM) ; [AcLact] : concentration en acide lactique ; Y_X : rendement en biomasse calculé par mole de lactate produite ; pH_{24h} : pH mesuré après 24 h de culture ; pH_{int24h} : pH intracellulaire mesuré après 24 h de culture; Baisse pH_{24h} : diminution de pH observée en 24 h ; Baisse pH_{post-acid} : diminution de pH observée au cours de la phase de post-acidification ; $V_{sp\acute{e}1hpost-acid}$: vitesse spécifique d'acidification calculée au cours de la première heure de post-acidification.

La phase de croissance est différente pour les souches LL39 et LC30, alors que celle des souches de référence est comparable. En effet, les souches LD61 et LD71 présentent des valeurs de taux de croissance (calculé sur la période comprise entre les DO_{580nm} 0,1 et 1) et de vitesse maximale d'acidification comparables (Tableau IV.6). Les valeurs moyennes obtenues ($\mu_{0,1/1}$ et $V_{sp\ 0,1/1}$) pour la souche LL39 sont inférieures à celles obtenues pour les deux souches de référence, mais elles ne peuvent être considérées comme significativement différentes à cause de l'importance des écart-types observés. Ce n'est pas le cas de la souche LC30 pour laquelle les valeurs de $\mu_{0,1/1}$ et de V_{max} sont significativement inférieures à celles des trois autres souches.

La phase de croissance est plus longue pour la souche LC30 ($9,75 \pm 0,29$ h) que pour les trois autres souches chez lesquelles elle est inférieure à 7 h. Les souches LD61 et 71 qui possèdent les taux de croissances les plus élevés sont également celles qui produisent les plus grandes quantités de biomasse (environ $1,5 \text{ g.L}^{-1}$), tandis que c'est la souche LC30 qui présente les plus faibles valeurs ($0,96 \pm 0,2 \text{ g.L}^{-1}$) alors que celles de la souche LL39 sont intermédiaires. Les valeurs de pH mesurées à l'arrêt de croissance suivent le même profil que les quantités de biomasse, en effet, plus la croissance a été rapide et la quantité de biomasse produite importante, plus le pH obtenu à l'arrêt de croissance est bas, ce qui est logiquement associé à de fortes concentrations en lactate. Le pH au moment de l'arrêt de croissance varie donc de 4,8 et 4,86 en moyenne pour les souches de référence (tableau IV.6) à 5,04 pour la LL39 et jusqu'à 5,48 pour la souche LC30. Les pH intracellulaires mesurés au moment de l'arrêt de croissance varient également selon les souches avec les valeurs les plus basses pour les souches de référence ($5,31 \pm 0,04$ et $5,43 \pm 0,15$ de moyenne) puis pour la LL39 ($5,63 \pm 0,07$), et enfin pour la LC30 ($5,85 \pm 0,23$). Si les concentrations en lactate sont globalement corrélées aux valeurs de pH, ce n'est pas le cas des concentrations de la forme non dissociée qui sont comprises entre 8,44 et 5,09 mM pour les trois souches les plus rapides mais très faible ($1,7 \pm 0,2 \text{ mM}$) pour la souche LC30. Les rendements en biomasse ne sont pas significativement différents pour les quatre souches avec des valeurs moyennes comprises entre $15,3 \pm 2,1$ et $20,1 \pm 4,5 \text{ g.mol}^{-1}$ lactate.

Tout comme à l'arrêt de croissance, les pH les plus bas observés à 24 h le sont pour les souches LD61 et LD71 avec des valeurs respectives de $4,52 \pm 0,04$ et $4,58 \pm 0,1$ upH, tandis que la souche LC30 présente à nouveau le pH le plus élevé ($4,91 \pm 0,13$). Après 24 heures de culture, les écarts observés entre les valeurs de pH intracellulaires des souches LD61, LD71 et LL39 sont diminués, avec des valeurs très proches comprises entre $4,79 \pm 0,06$ et $4,97$ upH. La souche LC30 présente là encore les valeurs les plus élevées ($5,21 \pm 0,18$), cependant l'importance de l'écart-type est telle pour cette donnée qu'il est difficile de trancher quant à la significativité de cette différence. Si la diminution de pH observée au cours des 24 h de culture est la plus importante pour les souches LD61, LD71 et LL39, ce n'est pas le cas de l'amplitude de la post-acidification qui semble plus importante pour la souche LC30 ($-0,55 \pm 0,22$ upH), cependant en tenant compte de l'écart-type très élevé pour cette valeur, les quatre souches semblent peu différentes. La valeur de vitesse spécifique de post-acidification la plus élevée est observée pour la souche LC30 ($-3,17 \pm 0,32 \cdot 10^{-3}$ upH.g⁻¹.min⁻¹), les trois autres ayant des valeurs non significativement différentes comprises entre $-1,53 \pm 0,67 \cdot 10^{-3}$ et $-2,28 \cdot 10^{-3}$ upH.g⁻¹.min⁻¹.

D'après les données obtenues, on remarque que plus le taux de croissance de la souche considérée est élevé, plus la phase de croissance est de courte durée et les pH mesurés à l'arrêt de croissance et à 24 h sont bas. Cependant, la post-acidification semble d'amplitude plus importante lorsque la croissance est ralentie (souche LC30). C'est la souche LC30 qui a le comportement en milieu M17 le plus original avec une croissance peu rapide et plus longue que les autres qui résulte en une amplitude d'acidification également moins importante. A 24 heures de culture, la souche LC30 se différencie encore des autres par une valeur de pH intracellulaire plus élevée ; en effet, pour les deux souches *diacetylactis* et la souche *lactis*, les pH intracellulaires présentent une valeur moyenne globale de 4,87 avec un écart-type faible, de 0,1 seulement. Ainsi, cette souche est la seule présentant un comportement très différent de la souche de référence LD61, et c'est la raison pour laquelle l'étude enzymatique et énergétique est focalisée sur ces deux souches.

2.3.2. Activités enzymatiques

2.3.2.1. Activités spécifiques maximales des enzymes de la glycolyse et de la lactate déshydrogénase

Les activités spécifiques des enzymes de la glycolyse ainsi que celles de la lactate déshydrogénase ont été mesurées au cours de cultures des souches LD61 et LC30 en milieu M17-lactose à pH libre, à 34°C et en condition d'anaérobiose. Trois prélèvements ont été effectués au cours des fermentations : en phase de croissance, à l'arrêt de croissance et le dernier en fin de culture. Le comportement des enzymes glycolytiques sur la globalité de la culture, que ce soit lors de l'acidification (phase de croissance) ou lors de la post-acidification, est ainsi caractérisé. L'évolution des profils d'activités de ces enzymes va permettre de connaître leur implication dans le ralentissement de l'acidification et son arrêt.

Tableau IV.7 : Valeurs des activités spécifiques maximales des enzymes de la glycolyse et de la lactate déshydrogénase ($\text{mmol.g de biomasse}^{-1}.\text{h}^{-1}$) au cours de cultures des souches LD61 et LC30 en milieu M17-lactose, en anaérobiose, à pH libre et 34°C.

Souches Temps Enzymes	Phase de croissance		Arrêt de croissance		Fin de culture	
	LD61	LC30	LD61	LC30	LD61	LC30
	5 h	6,5 h	7,5 h	10 h	24,2 h	27 h
<i>GLK</i>	3,2 ± 2,9	18 ± 3	1,1 ± 0,7	15 ± 2	2 ± 0,3	13 ± 2
<i>PGI</i>	97 ± 4	137 ± 2	135 ± 26	153 ± 2	122 ± 22	130 ± 7
<i>PFK</i>	20 ± 4	39 ± 7	20 ± 11	27 ± 0,5	7,7 ± 0,4	29 ± 2
<i>FBA</i>	143 ± 18	133 ± 2	133 ± 101	135 ± 12	172 ± 121	162 ± 10
<i>TPI</i>	4188 ± 562	1788 ± 32	2231 ± 946	2351 ± 35	2486 ± 627	1783 ± 477
<i>GAPDH</i>	1,7 ± 3	45 ± 5	3,2 ± 3	58 ± 7	84 ± 64	16 ± 5
<i>PGK</i>	183 ± 87	162 ± 11	192 ± 92	166 ± 2	37 ± 21	113 ± 5
<i>PMG</i>	431 ± 171	259 ± 10	351 ± 162	320 ± 78	307 ± 157	360 ± 29
<i>ENO</i>	265 ± 56	non dosé	303 ± 100	non dosé	310 ± 15	non dosé
<i>PK</i>	24 ± 11	16 ± 1,4	51 ± 12	17 ± 0,3	40 ± 23	18 ± 1
<i>LDH</i>	156 ± 34	250 ± 3	343 ± 53	142 ± 15	206 ± 90	293 ± 50

Légende: GLK : glucokinase, PGI : phosphoglucose isomérase, PFK : phosphofructokinase, FBA : fructose-1,6-bisphosphate aldolase, TPI : triose-phosphate isomérase, GAPDH : glycéraldéhyde-3 phosphate déshydrogénase, PGK : 3-phosphoglycérate kinase, PMG : phosphoglycérate mutase, ENO : phosphopyruvate hydratase, PK : pyruvate kinase, LDH : lactate déshydrogénase.

Quatre des enzymes de la souche LD61 présentent des activités inférieures aux autres, il s'agit de la glucokinase (GLK), de la phosphofructokinase (PFK), de la glyceraldéhyde-3 phosphate déshydrogénase (GAPDH) et de la pyruvate kinase (PK), la triose-phosphate isomérase (TPI), quant à elle, présentant les valeurs les plus élevées (Tableau IV.7). Les enzymes peuvent être classées en trois groupes selon leur évolution au cours de la croissance. Le premier groupe est composé de la majorité des enzymes, dont les activités spécifiques sont relativement constantes tout au long de la culture : GLK, phosphoglucose isomérase (PGI), fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA), TPI, phosphoglycérate mutase (PMG), phosphopyruvate hydratase (ENO), PK et lactate déshydrogénase (LDH). Dans le second groupe d'enzymes, se trouvent la PFK et la PGK dont les activités, constantes jusqu'en début de post-acidification, chutent en fin de culture. Enfin, la GAPDH est la seule enzyme à présenter un profil très particulier avec une très forte augmentation de son activité spécifique en fin de culture.

Pour la souche LC30, les mêmes enzymes ont les activités spécifiques les plus basses (GLK, PFK, GAPDH et PK), et c'est également toujours la TPI qui présente les valeurs les plus élevées (Tableau IV.7). Il existe peu de différences entre les profils d'évolution et les valeurs d'activités des enzymes de la souche LC30 et de la LD61. Trois types de profils sont également retrouvés avec une majorité d'enzymes dont l'activité est constante au cours de la fermentation. Dans cette catégorie, sont retrouvées la GLK, la PGI, la FBA, la TPI, la PMG, la PK et également la PFK, contrairement à la souche LD61. Dans la seconde catégorie d'enzymes, se retrouvent la GAPDH et la PGK dont les activités demeurent constantes au cours de la croissance et chutent en fin de culture. Le profil de la LDH est particulièrement original puisque après une forte chute à l'arrêt de croissance, l'activité spécifique augmente au cours de la phase de post-acidification pour atteindre un niveau comparable à celui de la phase de croissance. L'activité de l'énolase n'a, quant à elle, pas pu être déterminée car le substrat employé pour le dosage (l'acide 2-phosphoglycérique ou 2PG) est devenu commercialement indisponible.

Quelques différences sont observées sur l'évolution des activités enzymatiques au cours des deux cultures, particulièrement l'évolution de l'activité de la GAPDH en phase de post-acidification, cependant il n'est question que des activités maximales et il faut garder à l'esprit que la baisse du pH intracellulaire au cours de la culture va entraîner une diminution des activités enzymatiques dans des proportions qui seront peut-être, elles aussi, différentes en fonction de l'enzyme et de la souche considérée.

2.3.2.2. Effet du pH sur les activités des enzymes de la glycolyse et sur la LDH

Comme l'indique le tableau IV.6, l'acidification du milieu se reporte à l'intérieur de la cellule. Bien que la cellule bactérienne soit capable de maintenir un gradient de pH transmembranaire au cours de la croissance, celui-ci observe tout de même une diminution en fin de culture. Ainsi, à l'intérieur de la cellule, le pH va varier d'une valeur supérieure à 7 en début de culture (pH initial du M17-lactose proche de 7) à des valeurs allant de 4,79 pour la LD61 à 5,21 en moyenne pour la souche LC30. Une telle diminution du pH intracellulaire va influencer l'activité des enzymes bactériennes, et il est donc indispensable de connaître l'effet du pH sur les enzymes pour avoir accès à leur activité réelle *in vivo* et non plus à une activité spécifique maximale.

Il semble particulièrement intéressant de comparer les profils d'activités obtenus pour les deux souches (LD61 et LC30) de comportement acidifiant très différent. L'originalité ou non de leur comportement est mise en évidence par le biais d'une comparaison avec les profils obtenus dans l'équipe pour la souche *cremoris* de référence MG1363 (communication personnelle).

Les profils d'évolution de l'activité des enzymes glycolytiques en fonction du pH sont présentés Figure IV.7. L'activité appelée « résiduelle » est calculée en pourcentage de l'activité de référence qui est celle obtenue à pH 7. Une gamme de pH allant de 7,5 à 4,5 permet de couvrir la totalité des pH intracellulaires envisageables pour les trois souches. La majorité des enzymes présentent des profils identiques pour la souche appartenant au biovar *diacetylactis* (LD61) et les deux souches de la sous-espèce *cremoris* (LC30 et MG1363). Seules deux enzymes montrent des profils légèrement différents entre les souches *cremoris* et la souche *lactis*, il s'agit de la PGI et de la PGK dont l'activité est plus affectée par la baisse de pH dans la souche LD61. En ce qui concerne la TPI, bien que les pourcentages d'activité résiduelle à bas pH (<5) soient comparables, ce n'est pas le cas des valeurs obtenues aux pH intermédiaires et des allures globales des courbes qui semblent « souche spécifique ». Parmi toutes ces enzymes, il est intéressant de regarder celles dont l'activité résiduelle est très faible (inférieure à 10 %) à des pH inférieurs à 5,5. Parmi ces enzymes qui peuvent être qualifiées de très sensibles au pH, nous retrouvons la PGI, la GAPDH, la PGK et l'ENO pour la souche LD61, et la FBA, la GAPDH et l'ENO pour les souches *cremoris*. Il existe une catégorie d'enzymes qui sont, elles par contre, très peu sensibles à la baisse de pH ; en effet la TPI, la PMG, la PK et surtout la LDH, quasi insensibles au pH dans la gamme testée, présentent des activités supérieures à 10 % de l'activité de référence même à pH 5. Les enzymes restantes

ont des profils intermédiaires, avec de faibles activités (inférieures à 10 %) à partir de pH 5, il s'agit de la GLK, la PGI et la PGK des souches *cremoris*, de la FBA pour la LD61 et de la PFK pour l'ensemble des souches.

Il n'existe donc pas de différence flagrante entre les enzymes des souches LD61, LC30 et même MG1363, y compris à bas pH. La diminution de l'activité *in vivo* des enzymes très sensibles à la baisse de pH pourrait être à l'origine de la diminution du flux glycolytique et du passage de la phase de croissance à la phase de post-acidification, puis de l'arrêt de la post-acidification puisque leurs activités résiduelles deviennent très faibles lorsque le pH est compris entre 4,5 et 5, ce qui correspond aux valeurs observées en fin de post-acidification. Cependant, il s'agit d'observations effectuées à partir des profils enzymatiques et la réconciliation des activités spécifiques et de l'effet du pH va permettre d'avoir accès aux activités réelles *in vivo* et de déterminer les étapes limitantes de la glycolyse, par comparaison de l'activité *in vivo* avec le flux glycolytique.

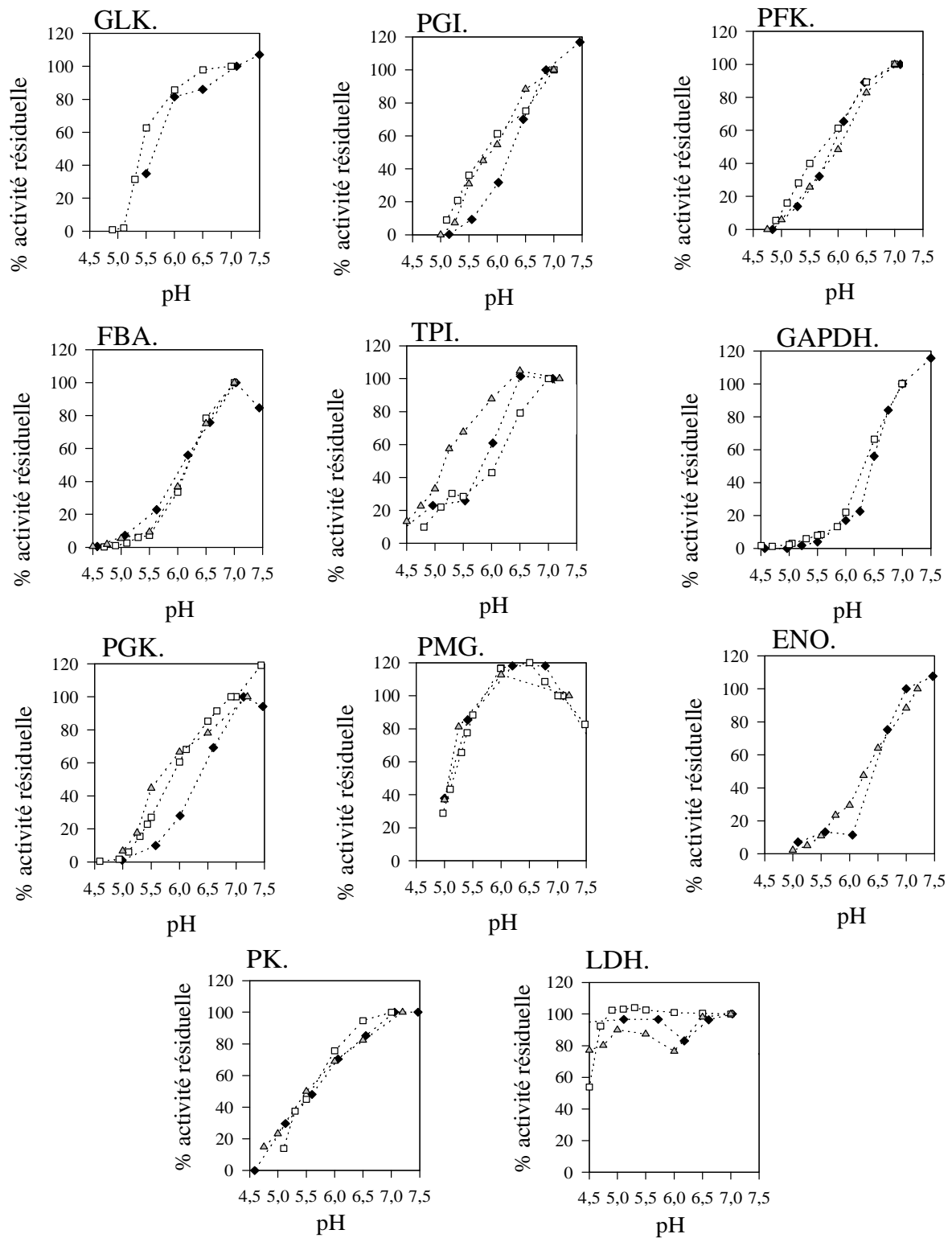


Figure IV.7: Effet du pH sur l'activité des enzymes de la glycolyse et de la lactate déshydrogénase des souches LD61 (◆), LC30 (□), et MG1363 (▲). Les données sont fournies en pourcentage d'activité résiduelle par rapport à l'activité de référence mesurée à pH7.

2.3.2.4. Activités réelles *in vivo* et limitation du flux glycolytique

Les facteurs de correction des activités enzymatiques obtenus grâce à la mesure de l'effet du pH sur les enzymes et de la valeur du pH interne ont été appliqués aux activités spécifiques maximales afin d'obtenir pour chaque souche et prélèvement la valeur moyenne de l'activité réelle *in vivo*. Cette activité, comparée au flux glycolytique assuré aux divers temps de culture (tableau IV.8) permet de mettre en évidence les enzymes qui ne sont pas en excès par rapport au flux, et qui donc sont censées participer significativement au contrôle du flux.

Au cours de la phase de croissance de la souche LD61 en milieu M17-lactose, le contrôle du flux glycolytique semble partagé au moins entre la GLK, la GAPDH et la PK, pour lesquelles les valeurs d'activités sur flux sont inférieures à 1. D'autres enzymes présentent également de faibles valeurs d'activités/flux (PFK, PGK, ENO, LDH), mais celles-ci demeurant supérieures à 1, il est difficile de dire leur implication réelle dans le contrôle du flux carboné. A l'arrêt de croissance, les enzymes limitant le flux semblent être la GLK, la GAPDH et la PGK, ainsi que probablement la PFK. Au cours de la culture, les valeurs d'activités/flux ont globalement tendance à augmenter, et la PFK et la PGK sont les seules exceptions puisqu'elles présentent des valeurs proches de 1 en fin de culture. La GAPDH qui était limitante jusqu'à l'arrêt de croissance possède une activité 2,1 fois supérieure au flux en fin de post-acidification.

Les valeurs obtenues avec la souche LC30 sont globalement supérieures à celles de la souche LD61, à cause principalement des différences de pH interne et de flux glycolytiques au cours des cultures. En phase de croissance, seule la PK de la souche LC30 présente une valeur proche de 1, la GAPDH, bien qu'ayant une valeur faible, demeure supérieure à 2. A l'arrêt de croissance, c'est la GAPDH qui devient limitante, tandis que la valeur d'activité/flux de la PK est encore faible (2,3). En fin de culture, contrairement à ce qui est observé pour la souche LD61, aucune enzyme ne présente une activité corrigée proche du flux, hormis la GAPDH, qui avec un facteur de 2,4, présente la valeur la plus faible.

Tableau IV.8 : Comparaison entre le flux glycolytique ($\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) et les activités spécifiques *in vivo* des enzymes glycolytiques et de la lactate déshydrogénase, c'est-à-dire corrigées par l'effet du pH intracellulaire, exprimée en rapport d'activité corrigée sur flux (sans unités), au cours des cultures des souches LD61 et LC30 en milieu M17-lactose, à pH libre, 34°C et anaérobie.

Souche	Phase de croissance		Arrêt de croissance		Fin de culture	
	LD61	LC30	LD61	LC30	LD61	LC30
Temps	5 h	6,5 h	7,5 h	10 h	24,2 h	27 h
pH _{int}	6,8	7,2	5,3	5,6	4,8	5,3
Flux glycolytique	8,3	3,9	2,8	1,5	<0,1	<0,1
<i>GLK</i>	≤1	4,6	≤1	7,6	7,4	43
<i>PGI</i>	10	33	2,4	48	12	273
<i>PFK</i>	2,3	9,7	1,2	8,7	≤1	80
<i>FBA</i>	14	33	6,7	14	52	97
<i>TPI</i>	260	220	80	274	2486	2674
<i>GAPDH</i>	≤1	2,7	≤1	1,1	2,1	2,4
<i>PGK</i>	3,8	10	≤1	12	≤1	42
<i>PMG</i>	16	17	25	54	184	594
<i>ENO</i>	4,6	non dosé	2,4	non dosé	9,3	non dosé
<i>PK</i>	≤1	1,4	2,4	2,3	16	22
<i>LDH</i>	4,6	16	30	24	495	763

Légende: *GLK* : glucokinase, *PGI* : phosphoglucose isomérase, *PFK* : phosphofructokinase, *FBA* : fructose-1,6-bisphosphate aldolase, *TPI* : triose-phosphate isomérase, *GAPDH* : glycéraldéhyde-3 phosphate déshydrogénase, *PGK* : 3-phosphoglycérate kinase, *PMG* : phosphoglycérate mutase, *ENO* : phosphopyruvate hydratase, *PK* : pyruvate kinase, *LDH* : lactate déshydrogénase.

2.3.2.4. Paramètres énergétiques

L'acidification du milieu de culture va avoir un impact non seulement sur la croissance et le catabolisme mais aussi sur l'état énergétique des cellules. Ainsi l'évolution de divers paramètres comme la vitesse spécifique de production d'ATP (q_{ATP}), le rendement en biomasse relatif à l'ATP (Y_{ATP}), le gradient de pH (ΔpH), le gradient électrique ($\Delta \Psi$), la force proton-motrice résultant de la présence des deux gradients (PMF) ou l'activité de l'ATPase membranaire vont permettre d'évaluer l'évolution de l'état énergétique des bactéries. Le tableau IV.7 présente l'évolution de ces paramètres au cours des cultures des deux souches de lactocoques LD61 et LC30 en milieu complexe M17-lactose à pH libre.

Tableau IV.7 : Evolution des paramètres énergétiques au cours des fermentations des souches de *L. lactis* LD61 et LC30 cultivées sur milieu M17-lactose, à pH libre : q_{ATP} , vitesse spécifique de production d'ATP ($\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) ; Y_{ATP} , rendement ATP apparent ($\text{g biomasse.mol}^{-1} \text{ATP}$) ; ΔpH , gradient de protons ; $\Delta \Psi$, gradient électrique (mV) ; FPM, force protomotrice (mV) et l'activité de l'ATPase membranaire ($U = \mu\text{mol Pi. min}^{-1}.\text{(mg protéines)}^{-1}$).

Souche	Phase de croissance				Arrêt de croissance		Phase de post-acidification	
	LD61	LC30	LD61	LC30	LD61	LC30	LD61	LC30
Temps	2,5 h	3 h	5 h	6 h	7,5 h	10 h	24,2 h	27 h
pH	6,91	6,87	6,34	6,4	4,77	5,35	4,56	5
ΔpH	—	—	0,47	0,83	0,52	0,3	0,27	0,34
pH_{int}	—	—	6,81	7,23	5,29	5,65	4,83	5,34
$\Delta \Psi$	—	—	-104	-92	-95	-69	-55	-71
FPM	—	—	-132	-141	-126	-87	-71	-91
q_{ATP}	75,9	31,5	35,1	19,8	9,3	9,9	<0,01	<0,01
Y_{ATP}	17,8	23	22,8	15,1	—	—	—	—
ATPase	—	—	$0,35 \pm 0,17$	$0,52 \pm 0,2$	$0,57 \pm 0,18$	$0,38 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,15$	$0,43 \pm 0,1$

L'évolution des gradients de pH est différente pour les deux souches. La souche LD61 présente un gradient qui se maintient jusqu'à l'arrêt de croissance (0,47 et 0,52 upH) et chute à 24 heures de culture. La valeur maximale du gradient de pH est obtenue en phase de croissance pour la souche LC30 ; il s'agit d'une valeur élevée (0,83 upH) qui chute dès l'arrêt de croissance et se stabilise aux alentours de 0,3 upH. Les valeurs de pH et de pH_{int} obtenues pour la souche *L. lactis* LD61 à 24 h sont beaucoup plus faibles que celles de la souche *cremoris* LC30, avec des valeurs finales de 4,56 et 4,83 upH seulement. Les gradients électriques et la force protomotrice résultant de la présence des deux gradients ont des évolutions comparables, et les valeurs maximales en phase de croissance diminuent tout au long de la culture. Les valeurs de ces deux gradients sont supérieures, ou similaires pour la FPM en phase de croissance, pour la souche LD61 jusqu'à l'arrêt de croissance, alors qu'à 24 heures de culture, ce sont celles de la souche LC30 qui sont plus élevées. Ainsi, la baisse de gradient de pH observée pour les deux souches ne s'accompagne pas d'une augmentation de gradient électrique. Les deux gradients ainsi que la force protomotrice résultante diminuent, et aucune inter-conversion entre gradient de pH et gradient électrique n'est observée.

L'ATPase membranaire est une enzyme indispensable à la survie cellulaire, notamment en condition d'acidification car elle permet l'expulsion des protons du cytoplasme. Son activité maximale a été déterminée au cours des deux fermentations ; elle évolue très peu au cours des cultures et aucune augmentation en condition acide n'a été mise en évidence pour aucune des deux souches.

La vitesse spécifique de production d'ATP (q_{ATP}), qui est directement reliée au flux glycolytique, équivaut à la vitesse spécifique de production de lactate ($v_{Lactate}$) puisque le métabolisme est de type homolactique pour les deux souches considérées. L'évolution de q_{ATP} est comparable pour les deux souches avec une diminution tout au long de la phase de croissance pour atteindre une valeur quasi nulle en fin de culture. Même si le comportement est identique, les valeurs, elles, ne le sont pas, en tous cas en phase de croissance puisque les q_{ATP} de la souche LD61 correspondent au double de ceux de la souche LC30 durant cette période. Cet écart s'estompe au cours du temps et à l'arrêt de croissance les deux souches montrent des valeurs comparables de l'ordre de $10 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Le rendement apparent en ATP (Y_{ATP}) est calculé d'après le rapport des vitesses spécifiques de croissance et de production d'ATP et rend compte de la quantité de biomasse produite par mole d'ATP disponible. Un découplage entre anabolisme et catabolisme s'opère pour les deux souches à l'arrêt de croissance puisqu'à ce moment là les valeurs de Y_{ATP} apparent chutent d'environ 20 g.mol^{-1} en moyenne à une valeur nulle. Ce découplage se poursuit après l'arrêt de croissance lorsque le catabolisme continue alors que la croissance est arrêtée.

3. Analyse du contrôle de l'acidification pour la souche LD61

Les deux hypothèses de départ censées expliquer les écarts de cinétiques d'acidification entre souches impliquent des capacités glycolytiques différentes ou une sensibilité particulières des cellules au pH. L'étude comparative a permis de montrer que même pour deux souches très différentes cinétiquement, comme la LC30 et la LD61, aucune différence significative au niveau des activités spécifiques maximales des enzymes glycolytiques ou de leur sensibilité au pH n'existe. Cependant, leurs cinétiques d'acidification et de croissance sont bien différentes. En utilisant cette fois uniquement la souche de référence LD61, nous avons testé l'implication de la croissance dans le contrôle de l'acidification.

De plus, les premières cinétiques en Cinac ont permis de remarquer un lien apparent entre la vitesse maximale d'acidification et la valeur de pH à 24 heures. Afin de vérifier la validité de cette hypothèse, une culture de la souche de référence a été réalisée avec contrôle de l'acidification en milieu M17.

3.1. Effet de la croissance sur l'acidification

Pour démontrer l'existence d'un lien éventuel entre croissance et acidification, il est nécessaire de disposer d'une palette de taux de croissance plus étendue que celle observée lors des cultures de la souche LD61 en lait G et M17-lactose, et l'utilisation de milieux synthétiques chimiquement définis s'est avérée indispensable. Des fermentations de la souche *L. Lactis* biovar *diacetylactis* LD61 ont été réalisées en milieu MCD, MS10rb (milieu MS10 supplémenté en riboflavine et bases) et MS10r (milieu MS10 supplémenté en riboflavine). Les lactocoques sont des bactéries nutritionnellement très exigeantes (Jensen et Hammer, 1993), et différents milieux synthétiques ont été mis au point pour leur culture (Cocaign-Bousquet *et coll.*, 1995). Le milieu MCD est assez complet puisqu'en plus du sucre, il contient des sels, la plupart des acides aminés, des vitamines et des bases azotées nécessaires à la croissance des lactocoques. Le milieu MS10 est une version simplifiée du milieu MCD puisqu'il contient moins de sels, seulement 4 vitamines et aucune base azotée (*cf.* Chap. II). Ce dernier milieu a été mis au point pour la souche NCDO 2118 d'origine végétale, et son utilisation pour la culture de la souche LD61 s'est avérée impossible puisque, contrairement

au milieu MCD, aucune croissance n'a été observée avec le milieu MS10. Une supplémentation du MS10 en riboflavine (MS10r), vitamine indispensable à la croissance de certaines souches (Cocaign-Bousquet *et coll.*, 1995), a permis de restaurer la croissance, et un ajout supplémentaire de bases azotées (MS10rb) a permis à son tour d'obtenir une meilleure croissance. Afin de se placer, comme toujours, en excès de substrat carboné et dans des conditions proches de celles du lait, le lactose à une concentration de 50 g.L⁻¹ est employé comme source de carbone.

Le tableau IV.10 reprend les valeurs des principaux paramètres caractérisant la croissance et la post-acidification de la souche *L. lactis* LD61 dans les trois milieux synthétiques, à pH libre, en condition d'anaérobiose et à 34°C.

Les taux de croissance obtenus avec les trois milieux synthétiques sont différents (Tableau IV.10) ; le milieu MCD est le plus favorable ($\mu_{0,1/1}$ de 1,14 h⁻¹), les deux milieux MS10 ont des taux de croissance plus faibles ($\mu_{0,1/1}$ de 0,88 et 0,68 h⁻¹). Les vitesses spécifiques d'acidification calculées sur la période entre DO₅₈₀ 0,1 et 1 présentent le même comportement que les taux de croissance avec la valeur la plus faible calculée pour le milieu le moins riche (MS10r). Les vitesses maximales présentent quant à elles un profil particulier. La valeur de V_{max} la plus élevée est obtenue en milieu MCD qui est le milieu le plus riche et dans lequel le taux de croissance est le plus important. Contrairement à toute attente, pour les deux milieux « MS10 », la vitesse la plus importante est observée en MS10r.

A l'arrêt de croissance, les concentrations en biomasse sont corrélées avec le $\mu_{0,1/1}$, et la valeur maximale de 1,03 g.L⁻¹ est obtenue pour la culture en milieu MCD. Le rendement en biomasse est également corrélé avec le taux de croissance puisque la valeur la plus élevée (16,9 g de biomasse.mol⁻¹ de lactate) est observée pour le milieu le plus riche (Tableau IV.10). Entre les trois milieux, le pH externe diffère de 0,2 upH environ (4,81 en MCD, 4,67 et 4,63 en MS10rb et r), ce qui est également le cas des pH intracellulaires. Tout comme le pH, les concentrations en lactate total sont différentes, avec des valeurs allant de 60,9 mM en MCD à 51,2 et 52,5 mM pour les milieux MS10 enrichis. La concentration en acide lactique est le paramètre dont la valeur varie le moins entre les deux types de milieux (6,1, 6,9 et 7,6 mM pour les trois cultures).

Après 24 heures de culture, les pH externes et internes mesurés sont peu différents dans les trois conditions (Tableau IV.10). La post-acidification est plus importante en milieu MCD (intensité et vitesse initiale) que dans les deux milieux « MS10 » pour lesquels les valeurs de baisse de pH et de vitesse spécifique sur la première heure sont comparables (Tableau IV.10).

Tableau IV.10 : Valeur des principaux paramètres cinétiques (vitesses maximales et spécifiques, concentration en biomasse et produits, rendements, pH) et énergétiques (pH intracellulaire) caractérisant la croissance et la post-acidification au cours de fermentations de la souche LD61 dans différents milieux synthétiques (MCD, MS10rb et MS10r) à pH libre, 34°C et en anaérobiose.

		MCD	MS10rb	MS10r
Phase de croissance	$\mu_{0,1/1}$ (h ⁻¹)	1,14	0,88	0,68
	$V_{sp\acute{e}0,1/1}$ (x10 ⁻² upH.g ⁻¹ .min ⁻¹)	-1,79	-1	-0,62
	V_{max} (x10 ⁻² upH.min ⁻¹)	-1,8	-1,1	-1,5
Arrêt de croissance	Temps (h)	6,5	5,5	6,5
	Biomasse (g.L ⁻¹)	1,03	0,79	0,68
	pH (upH)	4,81	4,67	4,63
	pH _{int} (upH)	5,5	5,36	5,35
	[lactate] (mM)	60,9	51,2	52,5
	[AcLact] (mM)	6,1	6,9	7,6
	Y _X (g.mol ⁻¹ lactate)	16,9	15,4	13
Valeurs à 24 h	pH _{24h} (upH)	4,37	4,5	4,38
	pH _{int24h} (upH)	4,72	4,86	4,78
	Baisse pH _{24h} (upH)	-2,4	-2,31	-2,34
	Baisse pH _{post-acid} (upH)	-0,44	-0,17	-0,25
	$V_{sp\acute{e}1hpost-acid}$ (x10 ⁻³ upH.g ⁻¹ .min ⁻¹)	-2,7	-1,6	-1,6

Légende : $\mu_{0,1/1}$: taux de croissance calculé sur la période de culture entre les DO₅₈₀ 0,1 et 1 ; $V_{sp\acute{e}0,1/1}$: vitesse spécifique d'acidification calculée sur la période de culture entre les DO₅₈₀ 0,1 et 1 ; V_{max} : vitesse maximale d'acidification; pH_{int} : pH intracellulaire à l'arrêt de croissance; [AcLact] : concentration en acide lactique, forme non dissociée ; Y_X : rendement en biomasse calculé par mole de lactate produite ; pH_{24h} : pH mesuré après 24 h de culture ; pH_{int24h} : pH intracellulaire mesuré après 24 h de culture; Baisse pH_{24h} : diminution de pH observée en 24 h ; Baisse pH_{post-acid} : diminution de pH observée au cours de la phase de post-acidification ; $V_{sp\acute{e}1hpost-acid}$: vitesse spécifique d'acidification calculée au cours de la première heure de post-acidification.

L'utilisation de ces trois milieux synthétiques a permis d'observer le comportement cinétique de la souche de référence dans trois conditions de croissance différentes ($\mu_{0,1/1}$).

Dans ces conditions de culture, une corrélation entre taux de croissance ($\mu_{0,1/1}$), vitesse spécifique d'acidification ($V_{sp\acute{e}0,1/1}$), quantités de biomasse totale et rendement en biomasse (Y_X) est observée. Cette modulation de la croissance semble avoir, par contre, peu ou pas d'effet sur la quantité de lactate non dissocié à l'arrêt de croissance et les valeurs de pH et pH_{int} à 24 heures de culture. Afin de vérifier ces observations, nous avons décidé de moduler cette fois la vitesse d'acidification et d'observer les effets sur la croissance et la glycolyse.

3.2. Effet de la vitesse d'acidification sur le profil fermentaire et la croissance

Dans les résultats précédents, il a été remarqué un lien entre vitesse de croissance, d'acidification et de post-acidification, de plus, la souche qui présente l'acidification la plus lente en milieu M17 (LC30) est celle pour qui le pH_{24h} est le plus élevé. Afin de vérifier le lien réel entre ces paramètres, deux cultures de la souche LD61 avec une acidification ralentie ont été réalisées en milieu M17-lactose dans les mêmes conditions d'anaérobiose et de température (34°C) qu'à pH libre. L'acidification du milieu est ralentie au cours de la croissance par l'ajout dans le fermenteur d'une solution de KOH concentrée, et ceci afin de reproduire une cinétique d'acidification proche de celle observée en milieu lait. La comparaison des données cinétiques, énergétiques et enzymatiques avec celles obtenues à pH libre va permettre de déterminer l'effet de la vitesse d'acidification sur l'anabolisme et le catabolisme.

3.2.1. Données cinétiques et énergétiques

Les profils d'acidification en fonction du temps de différentes cultures de la souche LD61 sont présentées Figure IV.9. Trois types de cultures sont comparées, deux en milieu M17-lactose avec ou sans contrôle de l'acidification, et une en lait G à pH libre. Dans le cas de la culture avec contrôle de la baisse de pH, l'acidification est laissée libre jusqu'à 5 heures de culture puis ralentie par l'ajout de base concentrée.

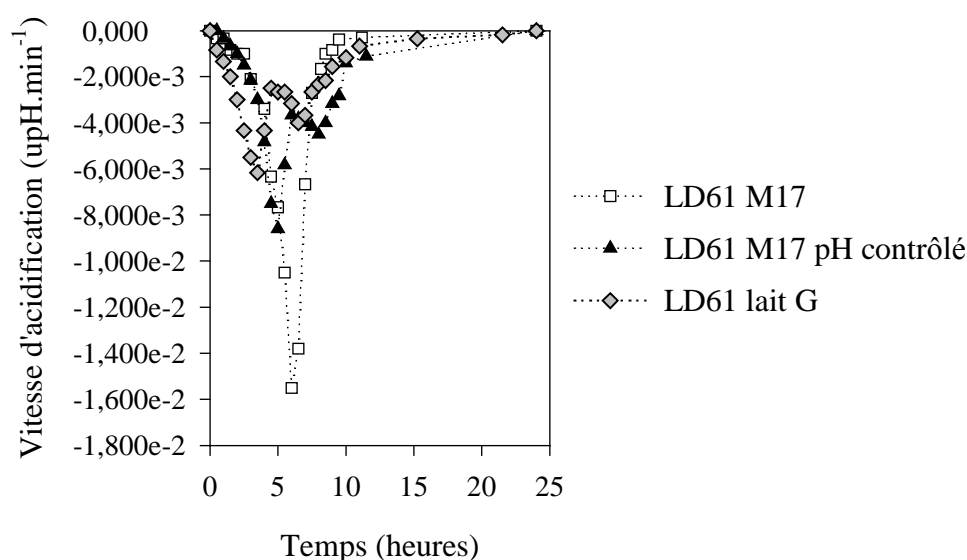


Figure IV.9 : Evolution de la vitesse d'acidification en fonction du temps au cours de trois cultures de la souche *L. lactis* LD61 à 34°C, en condition d'anaérobiose : en milieu M17-lactose à pH libre, en milieu M17-lactose avec contrôle de l'acidification et en lait G à pH libre.

En milieu M17-lactose, la vitesse d'acidification augmente rapidement dès le début de la culture. La valeur maximale de $-1,55 \cdot 10^{-2}$ upH.min⁻¹ est atteinte après 6 heures de culture, puis la vitesse diminue jusqu'à s'annuler à 24 heures (Fig. IV.9). Lorsque la baisse de pH est contrôlée, l'acidification est identique à celle de la culture à pH libre jusqu'à 5 heures. La valeur maximale mesurée est alors de $-8,6 \cdot 10^{-3}$ upH.min⁻¹ et donc inférieure à celle obtenue à pH libre. La vitesse d'acidification diminue ensuite à cause de l'ajout de KOH et atteint une phase de plateau entre 6,5 et 8,5 heures au niveau de laquelle la valeur moyenne est de $-4,1 \cdot 10^{-3}$ upH.min⁻¹. Après ce plateau, la vitesse baisse lentement pour s'annuler à 24 heures de culture. Le profil d'acidification observé en lait G est comparable à celui obtenu en M17 avec

acidification contrôlée, hormis un décalage dans le temps. Pour cette culture, la vitesse d'acidification maximale est obtenue à 3,5 h et sa valeur est plus faible que les deux précédentes ($-6,2 \cdot 10^{-3}$ upH.min⁻¹). La vitesse ralentit ensuite puis atteint une phase de plateau, entre 5 et 7,5 heures, au cours de laquelle une vitesse moyenne de $-3,1 \cdot 10^{-3}$ upH.min⁻¹ est observée. Après ce plateau, la vitesse d'acidification diminue jusqu'à une valeur nulle en fin de culture. Ainsi, comme le montrent ces trois profils, le contrôle de l'acidification a bien permis de reproduire en milieu M17 un profil d'acidification comparable à celui observé en lait G.

La croissance, l'acidification ainsi que l'évolution des concentrations des substrats et produits de fermentations ont été suivies au cours de deux cultures avec acidification contrôlée. Dans le tableau IV.11, sont présentées les valeurs moyennes des paramètres permettant de caractériser croissance et acidification pour ces deux cultures avec contrôle de la baisse de pH, ainsi que les valeurs moyennes obtenues à pH libre.

Hormis les vitesses maximales d'acidification qui sont différentes (tableau IV.11), les autres paramètres mesurés en phase de croissance ($\mu_{0,1/1}$ et $V_{spé0,1/1}$) sont similaires dans les deux conditions de culture. Ceci est tout à fait normal puisque ces valeurs sont calculées à partir des données de fermentation obtenues avant 5 heures de culture alors que le pH n'est pas encore contrôlé, et que les vitesses maximales sont, par contre, obtenues à 5 h lorsque l'acidification est contrôlée, et à 6 h à pH libre.

L'arrêt de croissance est plus tardif lorsque l'acidification est contrôlée et la quantité de biomasse produite beaucoup plus importante qu'à pH libre ($2,43 \pm 0,16$ contre $1,51 \pm 0,11$ g.L⁻¹). Les pH extra- et intra-cellulaires, de même que la concentration en lactate total, sont plus élevés lorsque l'acidification est ralentie. Le rendement en biomasse est, par contre, supérieur à pH libre (Tableau IV.11). La concentration en acide lactique est le seul paramètre similaire à l'arrêt de croissance dans les deux conditions ($7,75 \pm 0,32$ et $8,44 \pm 1,2$ mM).

A l'image de l'arrêt de croissance, les pH extra- et intra-cellulaires gardent des valeurs supérieures à 24 heures de culture lorsque la baisse de pH est contrôlée. Au cours de la phase de post-acidification, si la baisse de pH est plus élevée lorsque l'acidification est ralentie ($-0,38 \pm 0,01$ contre $-0,27 \pm 0,05$ upH), ce n'est pas le cas de la vitesse spécifique en début de post-acidification ($V_{spé1hpost-acid}$) dont la valeur est comparable quel que soit le type d'acidification.

Tableau IV.11 : Valeurs des principaux paramètres caractérisant croissance et acidification pour des cultures de la souche *L. lactis* LD61 en milieu M17-lactose avec (ac. contrôlée) ou sans (pH libre) contrôle de l'acidification.

	ac. contrôlée	pH libre	
Phase de croissance	$\mu_{0,1/1}$ (h^{-1})	$1,22 \pm 0,08$	$1,16 \pm 0,06$
	$V_{sp\acute{e}0,1/1}$ ($\times 10^{-2}$ upH.g $^{-1}$.min $^{-1}$)	$-1,52 \pm 0,03$	$-1,77 \pm 0,13$
	V_{max} ($\times 10^{-2}$ upH.min $^{-1}$)	$-0,88 \pm 0,02$	$-1,51 \pm 0,14$
Arrêt de croissance	Temps (h)	9	$6,63 \pm 1,03$
	Biomasse (g.L $^{-1}$)	$2,43 \pm 0,16$	$1,51 \pm 0,11$
	pH (upH)	$5,16 \pm 0,01$	$4,8 \pm 0,05$
	pH $_{int}$ (upH)	$5,61 \pm 0,11$	$5,31 \pm 0,04$
	[lactate] (mM)	$161 \pm 9,3$	$81,9 \pm 3,5$
	[AcLact] (mM)	$7,75 \pm 0,32$	$8,44 \pm 1,2$
	Y_X (g.mol $^{-1}$ lactate)	$15,2 \pm 0,1$	$18,4 \pm 1,2$
Valeurs à 24 h	pH $_{24h}$ (upH)	$4,77 \pm 0,01$	$4,52 \pm 0,04$
	pH $_{int24h}$ (upH)	4,96	$4,79 \pm 0,06$
	Baisse pH $_{24h}$ (upH)	$-2,26 \pm 0,06$	$-2,28 \pm 0,27$
	Baisse pH $_{post-acid}$ (upH)	$-0,38 \pm 0,01$	$-0,27 \pm 0,05$
	$V_{sp\acute{e}1hpost-acid}$ ($\times 10^{-3}$ upH.g $^{-1}$.min $^{-1}$)	$-1,1 \pm 0,03$	$-1,53 \pm 0,67$

Légende : $\mu_{0,1/1}$: taux de croissance calculé sur la période de culture entre les DO $_{580}$ 0,1 et 1 ; $V_{sp\acute{e}0,1/1}$: vitesse spécifique d'acidification calculée sur la période de culture entre les DO $_{580}$ 0,1 et 1 ; V_{max} : vitesse maximale d'acidification; pH $_{int}$: pH intracellulaire à l'arrêt de croissance; [AcLact] : concentration en acide lactique ; Y_X : rendement en biomasse calculé par mole de lactate produite ; pH $_{24h}$: pH mesuré après 24 h de culture ; pH $_{int24h}$: pH intracellulaire mesuré après 24 h de culture; Baisse pH $_{24h}$: diminution de pH observée en 24 h ; Baisse pH $_{post-acid}$: diminution de pH observée au cours de la phase de post-acidification ; $V_{sp\acute{e}1hpost-acid}$: vitesse spécifique d'acidification calculée au cours de la première heure de post-acidification.

De même que pour les paramètres cinétiques, une étude comparative des données énergétiques a également été réalisée pour ces deux types de cultures en milieu M17-lactose. Les valeurs des différents paramètres énergétiques obtenues au cours de la culture avec baisse de pH contrôlée sont présentées dans le tableau IV.10 et comparées à celles obtenues pour la culture à pH libre (cf. 2.3.2.4).

Tableau IV.12 : Evolution des paramètres énergétiques au cours de fermentations de la souche *L. lactis* LD61 en M17-lactose, avec contrôle de l'acidification (ac. contrôlée) ou à pH libre : q_{ATP} , vitesse spécifique de production d'ATP ($\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) ; Y_{ATP} , rendement ATP apparent ($\text{g de biomasse.mol}^{-1}$ ATP) ; ΔpH , gradient de protons ; $\Delta\Psi$, gradient électrique (mV) ; FPM, force protomotrice (mV) ; et l'activité de l'ATPase membranaire ($U = \mu\text{mol Pi. min}^{-1}.\text{(mg protéines)}^{-1}$).

Condition de culture	Phase de croissance				Arrêt de croissance		Phase de post-acidification	
	ac. contrôlée	pH libre	ac. contrôlée	pH libre	ac. contrôlée	pH libre	ac. contrôlée	pH libre
Temps	3 h	2,5 h	5 h	5 h	9 h	7,5 h	27,5 h	24,2 h
pH	6,86	6,91	6,23	6,34	5,16	4,77	4,78	4,56
ΔpH	—	—	0,63	0,47	0,38	0,52	0,2	0,27
pH_{int}	—	—	6,83	6,81	5,54	5,29	4,98	4,83
$\Delta\Psi$	—	—	-96	-104	-101	-95	-55	-55
FPM	—	—	-133	-132	-124	-126	-67	-71
q_{ATP}	50	75,9	37,4	35,1	7,8	9,3	<0,01	<0,01
Y_{ATP}	24,2	17,8	17,1	22,8	—	—	—	—
ATPase	—	—	$0,63 \pm 0,07$	$0,35 \pm 0,17$	$0,68 \pm 0,37$	$0,57 \pm 0,18$	$0,81 \pm 0,15$	$0,34 \pm 0,15$

A 5 heures de culture, avant le rajout de base, les pH externes et internes ont des valeurs proches (6,23 et 6,83 à pH contrôlé et 6,34 et 6,81 à pH libre), alors que par la suite, les valeurs de pH mesurées à pH libre se révèlent toujours être les plus basses. L'évolution du gradient de pH présente un profil différent selon le type d'acidification. A pH libre, le gradient est maintenu jusqu'à l'arrêt de croissance (environ 0,5 upH) puis il chute fortement par la suite. Lorsque l'acidification est contrôlée, le gradient de pH diminue graduellement

tout au long de la culture. Malgré cette différence, le comportement énergétique bactérien est comparable dans les deux conditions de culture puisque gradient électrique, force protomotrice, vitesse spécifique de production d'ATP et rendement en ATP ont des valeurs et des profils d'évolution similaires au cours des deux fermentations, à partir de 5 heures de culture.

Compte tenu des écarts-types mesurés, l'activité de l'ATPase membranaire ne semble pas varier significativement au cours de l'avancement des deux types de culture. L'activité de l'ATPase est globalement plus élevée en condition d'acidification contrôlée. En fin de culture notamment, l'activité observée à pH libre est beaucoup plus faible que lorsque la baisse de pH est contrôlée. Cependant, ce phénomène n'est pas associé à une valeur de gradient de pH plus élevée en condition d'acidification contrôlée qu'à pH libre. La dé-corrélation entre production de lactate et baisse de pH en condition d'acidification contrôlée, qui se traduit par une plus forte accumulation de lactate pour une valeur de pH donnée, est probablement responsable de cette observation.

3.2.2. Données enzymatiques

Des prélèvements ont été effectués en phase de croissance et de post-acidification au cours d'une des cultures avec baisse de pH contrôlé, afin de doser les activités maximales des enzymes glycolytiques. Le tableau IV.13 présente les valeurs d'activités spécifiques maximales obtenues, et les valeurs mesurées à pH libre sont également reportées afin de faciliter l'analyse comparative.

Les valeurs d'activités spécifiques maximales mesurées sont similaires pour les deux conditions de culture, de même que les profils d'évolution au cours de la croissance (Tableau IV.11). Quatre des enzymes présentent des activités inférieures aux autres, il s'agit de la GLK, de la PFK, de la GAPDH et de la PK. C'est la TPI qui présente les activités spécifiques les plus élevées. Les enzymes peuvent être classées en trois groupes selon leur évolution au cours de la croissance. Le premier groupe est composé de la majorité des enzymes (GLK, PGI, FBA, TPI, PMG, ENO, PK et LDH) dont les activités spécifiques sont constantes tout au long de la culture. Dans le second groupe se trouvent la PFK et la PGK dont les activités, constantes jusqu'en début de post-acidification, chutent en fin de culture. Quant à la GAPDH, elle présente un profil tout à fait particulier avec une très forte augmentation de son activité spécifique en fin de post-acidification.

Tableau IV.13 : Valeurs des activités spécifiques maximales des enzymes de la glycolyse et de la lactate déshydrogénase (mmol.g de biomasse⁻¹.h⁻¹) au cours de cultures de la souche *L. lactis* LD61 en milieu M17-lactose, en anaérobiose, à 34°C, avec un contrôle de l'acidification (ac. contrôlée) ou à pH libre.

Enzymes	Phase de croissance		Arrêt de croissance		Fin de culture	
	ac. contrôlée	pH libre	ac. contrôlée	pH libre	ac. contrôlée	pH libre
	5 h	5 h	9 h	7,5 h	27,5 h	24,2 h
<i>GLK</i>	0,7 ± 0,1	3,2 ± 2,9	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,7	1,4 ± 0,2	2 ± 0,3
<i>PGI</i>	66 ± 18	97 ± 4	108 ± 3	135 ± 26	121 ± 20	122 ± 22
<i>PFK</i>	23 ± 3	20 ± 4	35 ± 2	20 ± 11	7,3 ± 0,1	7,7 ± 0,4
<i>FBA</i>	116 ± 7	143 ± 18	203 ± 39	133 ± 101	197 ± 15	172 ± 121
<i>TPI</i>	2596 ± 365	4188 ± 562	3820 ± 73	2231 ± 946	1545 ± 31	2486 ± 627
<i>GAPDH</i>	0,3 ± 0,1	1,7 ± 3	1,6 ± 0,03	3,2 ± 3	34 ± 1	84 ± 64
<i>PGK</i>	169 ± 49	183 ± 87	146 ± 8	192 ± 92	35 ± 3	37 ± 21
<i>PMG</i>	186 ± 5	431 ± 171	191 ± 7	351 ± 162	106 ± 17	307 ± 157
<i>ENO</i>	217 ± 19	265 ± 56	213 ± 25	303 ± 100	152 ± 31	310 ± 15
<i>PK</i>	11 ± 3	24 ± 11	19 ± 4	51 ± 12	23 ± 2	40 ± 23
<i>LDH</i>	212 ± 39	156 ± 34	409 ± 51	343 ± 53	321 ± 75	206 ± 90

Légende: GLK : glucokinase, PGI : phosphoglucose isomérase, PFK : phosphofructokinase, FBA : fructose-1,6-bisphosphate aldolase, TPI : triose-phosphate isomérase, GAPDH : glycéraldéhyde-3 phosphate déshydrogénase, PGK : 3-phosphoglycérate kinase, PMG : phosphoglycérate mutase, ENO : phosphopyruvate hydratase, PK : pyruvate kinase, LDH : lactate déshydrogénase, ND: non dosé.

Afin de déterminer les enzymes qui peuvent être impliquées dans le contrôle du flux glycolytique, les valeurs d'activités spécifiques sont comparées au flux empruntant la glycolyse. De plus, le pH intracellulaire variant au cours de la culture, les valeurs d'activités sur flux sont également corrigées en tenant compte de l'effet du pH intracellulaire (tableau IV.14).

En phase de croissance, dans les deux conditions, le contrôle du flux glycolytique semble partagé entre trois enzymes que sont la GLK, la GAPDH et la PK. A l'arrêt de croissance, les enzymes limitantes semblent être la GLK et la GAPDH, ainsi que la PGK et probablement la PFK pour la culture à pH libre. En fin de post-acidification, deux enzymes s'avèrent importantes pour l'arrêt du flux catabolique, il s'agit de la GAPDH et de la PGK lorsque l'acidification du milieu est ralentie, et de la PFK et la PGK à pH libre.

Tableau IV.14 : Comparaison entre le flux glycolytique ($\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) et les activités spécifiques des enzymes glycolytiques et de la lactate déshydrogénase corrigées par l'effet du pH intracellulaire, exprimé en rapport d'activité corrigée/flux (sans unité), au cours de cultures de la souche LD61 en milieu M17-lactose, 34°C, en anaérobiose, avec un contrôle (ac. contrôlée) ou non (pH libre) de l'acidification.

	Phase de croissance		Arrêt de croissance		Fin de culture	
	ac. contrôlée	pH libre	ac. contrôlée	pH libre	ac. contrôlée	pH libre
pH_{int}	5 h	5 h	9 h	7,5 h	27,5 h	24,2 h
	6,8	6,8	5,5	5,3	5	4,8
Flux glycolytique	8,8	8,3	1,5	2,8	<0,1	<0,1
<i>GLK</i>	≤1	≤1	≤1	≤1	5,8	7,4
<i>PGI</i>	7,5	10	5	2,4	12	12
<i>PFK</i>	2,5	2,3	5,4	1,2	3,7	≤1
<i>FBA</i>	12	14	23	6,7	99	52
<i>TPI</i>	152	260	331	80	1004	2486
<i>GAPDH</i>	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	2,1
<i>PGK</i>	4,3	3,8	2	≤1	≤1	≤1
<i>PMG</i>	6,1	16	31	25	100	184
<i>ENO</i>	5,9	4,6	3,9	2,4	8	9,3
<i>PK</i>	≤1	≤1	1,9	2,4	17	16
<i>LDH</i>	6	4,6	67	30	779	495

Légende: GLK : glucokinase, PGI : phosphoglucose isomérase, PFK : phosphofructokinase, FBA : fructose-1,6-bisphosphate aldolase, TPI : triose-phosphate isomérase, GAPDH : glycéraldéhyde-3 phosphate déshydrogénase, PGK : 3-phosphoglycérate kinase, PMG : phosphoglycérate mutase, ENO : phosphopyruvate hydratase, PK : pyruvate kinase, LDH : lactate déshydrogénase, ND: non dosé.

Lorsque la baisse de pH est ralentie par un ajout de base, le pH externe final est supérieur à celui mesuré à pH libre. Cette différence de pH externe est compensée par le gradient de pH, plus faible lorsque plus de lactate a été accumulé, c'est-à-dire en condition de baisse de pH contrôlée. Dans ces conditions, les diminutions des rapports activités/flux de certaines enzymes glycolytiques (PFK à pH libre et PGK à acidification contrôlée) et les pH internes (proche de 4,9) similaires semblent expliquer l'arrêt du catabolisme.

La différence de $\text{pH}_{24\text{h}}$ observée sur les Cinacs en lait écrémé et lait écrémé supplémenté en tryptone, donc apparemment corrélée à la vitesse d'acidification, n'est pas retrouvée ici. Les deux cultures réalisées en M17 avec des vitesses d'acidification différentes ne permettent pas d'expliquer ce phénomène. Ces fermentations diffèrent néanmoins des comparaisons habituelles entre lait et lait supplémenté dans lesquelles le taux de croissance est différent entre les deux conditions, contrairement aux deux cultures réalisées dans le même milieu M17. Il se peut donc que la différence de pH à 24 h observée entre lait et lait supplémenté soit la conséquence d'une différence d'état des cellules à l'entrée en phase stationnaire provoquée par une différence de croissance liée au milieu. De plus, le contrôle de l'acidification implique l'ajout de base au cours de la culture et donc une modification du pouvoir tampon du milieu qui peut également influencer la valeur du pH mesuré à 24 h.

4. Conclusion

L'ensemble de ces cultures a permis d'obtenir un grand nombre de données qui vont permettre de répondre aux quatre interrogations posées. Cependant, une analyse statistique est indispensable au traitement de l'ensemble de ces données afin de déterminer les paramètres significativement impliqués dans le contrôle de l'acidification et de la post-acidification.

Cette étude cinétique a permis de distinguer deux types de souches de lactocoques selon leur comportement en lait et lait supplémenté. En effet, bien que la supplémentation du lait augmente la valeur de la vitesse maximale d'acidification des souches de type « LD61 », elle ne modifie jamais l'amplitude de l'acidification. Les souches de type « LD71 », au contraire, sont affectées à la fois dans leur vitesse et leur amplitude d'acidification. Des tests de supplémentations ont permis d'identifier pour la souche LD71 une limitation de type nutritionnel (acides aminés, peptides...) dans le lait. Dans un milieu complexe comme le M17-lactose, peu d'écarts sont observés entre les 4 souches testées. C'est la souche LC30 qui présente les cinétiques (croissance et acidification) les plus éloignées de la souche de référence LD61. Une analyse enzymatique et énergétique plus poussée de ces deux souches en M17 n'a pas permis de mettre en évidence de différences flagrantes qui pourraient expliquer ces écarts, puisque même la sensibilité des enzymes de la glycolyse vis à vis de la baisse de pH est comparable pour ces souches.

Les cultures de la souche de référence LD61 dans différentes conditions de croissance (milieux synthétiques ou complexes) et d'acidification (M17 à pH libre ou acidification contrôlée) ont permis d'acquérir un grand nombre de données cinétiques. Afin de traiter avec pertinence l'ensemble de ces données, une analyse de type statistique est réalisée (Chap. V), qui va permettre de définir les éléments de contrôle de l'acidification et de la post-acidification, et de valider, ou non, les hypothèses définies au début de l'étude.

**Chapitre V : Contrôle métabolique de
l'acidification : analyse statistique des résultats
et discussion**

L'objectif de ce travail de thèse est d'acquies à la fois une meilleure compréhension du comportement acidifiant des lactocoques, mais aussi de l'origine des différences de pouvoir acidifiant entre les souches. Pour cela, différentes souches de *L. lactis* d'origine fromagère (SOREDAB) sélectionnées sur la base de cinétiques d'acidification différentes en milieu lait écrémé (vitesses maximales, $\text{pH}_{24\text{h}}$) ont été étudiées. Ces données cinétiques ont été obtenues par SOREDAB via un système Cinac permettant un suivi en continu du pH, et ceci sur plusieurs cultures en parallèles. Parmi 6 souches ainsi présélectionnées, seulement 4 ont été retenues pour l'étude, il s'agit de la souche LL39 appartenant à la sous-espèce *lactis*, des souches LD61 et LD71 appartenant au biovar *diacetylactis* et de la souche LC30 de la sous-espèce *cremoris*. En effet, les deux autres souches n'ont pas été étudiées plus avant car l'une d'elles, la souche LC40, présentait d'importantes difficultés de croissance en anaérobiose et que l'autre, la souche LD53, ne s'est finalement pas avérée différente de la souche de référence (LD61).

Une double étude comparative a été réalisée entre les souches et pour des conditions de culture différentes (milieux, aération, régulation du pH), dans le but de déterminer les éléments de contrôle de l'acidification. Ainsi, un grand nombre de données (cinétiques, enzymatiques, énergétiques) a été récolté et cet ensemble a également fourni des informations sur le métabolisme carboné et sa régulation, ainsi que sur l'effet de la nutrition azotée ou de l'oxygène sur la croissance de *Lactococcus lactis*.

1. Métabolisme carboné

Le métabolisme carboné est un vaste domaine et seuls certains éléments seront discutés dans ce chapitre. Tout d'abord, il sera question de la glycolyse, puisque l'estimation des activités enzymatiques présentes *in vivo* permet d'établir un modèle de contrôle du flux glycolytique au cours de cultures en dynamique d'auto-acidification en milieu complexe. L'énergétique cellulaire et son rôle éventuel dans l'inhibition de la croissance, puis le métabolisme du citrate seront ensuite discutés.

1.1. Contrôle métabolique

Il s'agit d'un aspect important du métabolisme car les étapes enzymatiques impliquées dans le contrôle du flux glycolytique se révèlent être des cibles de choix en vue de l'amélioration et/ou de la sélection de souches. De nombreuses études réalisées en milieux synthétiques, à pH libre ou régulé, ont permis de connaître les étapes contrôlant la glycolyse chez diverses souches de *Lactococcus lactis* (MG 1363, IL 1403, NCDO 2118). Pour les deux souches de notre étude présentant les cinétiques les plus différentes en milieu M17-lactose, LD61 et LC30, les activités des enzymes de la glycolyse et de la lactate déshydrogénase ont été mesurées à divers temps de culture. L'activité spécifique mesurée *in vitro* est représentative de la concentration maximale d'enzyme potentiellement active dans la cellule. Ces activités, après correction par l'effet du pH interne (activités *in vivo*), sont comparées à la valeur du flux glycolytique qu'elles assurent afin de déterminer les étapes limitantes.

Malgré quelques différences inter-souches, certaines enzymes jouent un rôle important dans les deux types bactériens. C'est le cas en particulier de la GAPDH, dont l'activité est quasiment ajustée au flux pour les deux souches (LD61 et LC30), durant toute la phase de croissance. La GAPDH exerce, pour les souches LD61 et LC30, une influence majeure sur le contrôle du métabolisme homolactique au cours de la phase de croissance comme cela a déjà été établi pour différentes souches (Poolman *et coll.*, 1987a; Garrigues *et coll.*, 1997 ; Even *et coll.*, 1999 ; Mercade *et coll.*, 2000). Il s'agit d'une enzyme particulièrement sensible à la baisse du pH interne, puisqu'elle fait partie des rares enzymes présentant moins de 10 % d'activité résiduelle lorsque la valeur de pH est inférieure à 5,5. Outre le pH, le ratio NADH/NAD⁺ a également un fort effet inhibiteur vis à vis de cette enzyme (Garrigues *et coll.*, 1997 ; Even *et coll.*, 1999). Aucun dosage de métabolites intracellulaires n'a été réalisé

au cours de ces cultures, mais bien que cet effet inhibiteur n'ait pu être pris en compte, l'implication de la GAPDH dans le contrôle du flux a tout de même été mise en évidence. Au cours de cette phase, outre la GAPDH, d'autres enzymes semblent impliquées dans le contrôle du flux glycolytique, il s'agit de la PK pour les deux souches et de la GLK pour la souche LD61. L'activité de cette dernière enzyme est particulièrement faible tout au long de la phase de croissance, suggérant qu'une grosse partie du flux d'entrée du lactose soit assurée par le système de transport PTS chez la souche LD61. Les régulations observées ici en phase de croissance sont à la fois légèrement différentes et proches de celles observées par Even (2001) en condition de stress acide. En phase exponentielle de croissance, il a en effet été montré que pour deux souches IL 1403 et MG 1363 en milieux synthétiques sur substrat glucose, l'activité GLK ne peut assurer le flux, et que la PFK et la PK sont en faible excès par rapport à ce dernier.

A l'arrêt de croissance, trois enzymes ont une activité corrigée proche du flux chez la LD61, il s'agit de la GLK, de la PGK et toujours de la GAPDH, alors que, dans le cas de la LC30, seule la GAPDH semble limitante. A 24 heures de culture, aucune enzyme n'est identifiée comme limitante pour la souche LC30, même si la GAPDH semble la plus à même de contrôler le flux. La PFK et la PGK présentent des activités spécifiques corrigées censées assurer le contrôle du flux glycolytique de la souche LD61 en fin de post-acidification.

Que l'acidification de la souche LD61 soit contrôlée ou non en milieu M17, les mêmes enzymes sont impliquées dans le contrôle du flux glycolytique. Lorsque les bactéries sont en condition d'auto-acidification et subissent donc un stress dynamique et rapide, les enzymes ont besoin d'un ajustement rapide par rapport au flux, et dans ces conditions, les régulations allostériques, dites rapides, semblent préférées à celles agissant à plus long terme sur l'expression (transcription et traduction) et/ou la stabilité, des enzymes ou de leurs messagers, puisque les activités spécifiques maximales mesurées varient peu au cours des cultures. Seule la GAPDH, l'enzyme probablement majeure dans le contrôle du flux glycolytique, non seulement dans toutes les souches de *Lactococcus lactis* testées, mais aussi chez d'autres bactéries à Gram positif, dont *Clostridium acetobutylicum* (Girbal et Soucaille, 1994) et *Corynebacterium glutamicum* (Dominguez et Lindley, com. personnelle), présente des variations importantes de concentration en fonction de l'avancement de la culture. De plus, cette évolution s'avère totalement variable en fonction des souches, puisque la concentration de GAPDH diminue pour la souche LC30, alors qu'elle augmente fortement dans le cas de la

souche LD61 (facteur proche de 50). Elle augmente également pour la souche MG1363 (facteur 5), mais reste constante à un niveau élevé dans un mutant *relA*⁻ de la souche MG1363, affecté dans l'activité (p)ppGpp synthase (Mercade, com. personnelle). Ces différentes observations démontrent le haut degré de régulation transcriptionnelle et/ou traductionnelle de cette enzyme, en plus des régulations allostériques. Il en résulte malgré tout une participation importante de cette enzyme au contrôle du flux glycolytique, quelles que soient les souches ou les conditions de culture, même si d'autres enzymes, notamment la GLK, la PFK et la PK participent également à ce contrôle.

La baisse de pH induit une inhibition variable et parfois très importante sur les enzymes de la glycolyse, mais elle n'a par contre aucun effet sur la LDH. Une des hypothèses émises pour expliquer les différences de comportement acidifiant entre plusieurs lactocoques incrimine une hétérogénéité inter-souches de la sensibilité d'une ou de plusieurs enzymes de la glycolyse vis à vis du pH. Afin d'éclaircir ce phénomène, une étude comparative de l'effet du pH vis à vis de ces enzymes portant sur trois souches de *Lactococcus lactis* (LD61, LC30 et MG1363) a été réalisée. Les profils obtenus sont curieusement comparables pour les trois, en effet, la souche LC30 étant moins acidifiante que la LD61, une sensibilité plus importante d'une ou plusieurs de ses enzymes était attendue. Si les différentes enzymes ont un comportement très hétérogène, il semble cependant très conservé au sein de l'espèce puisque aucune différence importante n'est mise en évidence entre les individus des sous-espèces *lactis* et *cremoris*. La sensibilité à la baisse de pH joue un rôle majeur dans la diminution des activités enzymatiques et donc dans le contrôle du flux à pH libre, mais elle ne permet à priori pas d'expliquer la différence de cinétiques d'acidification observées entre les souches LD61 et LC30. Cependant, on peut se demander si ces profils sont réellement représentatifs de l'ensemble des souches de *L. lactis* et s'il en existe pour lesquelles ces sensibilités sont différentes.

1.2. Energétique cellulaire

Au cours de cette étude, plusieurs souches ont bénéficié d'une analyse de type énergétique. Pour toutes, l'acidification du milieu de culture entraîne une diminution du pH intracellulaire, jusqu'à des valeurs cependant moins basses que celles du milieu du fait de l'existence d'un gradient de pH transmembranaire. Il semble que l'évolution du gradient de pH au cours des cultures dépende des souches et des conditions de culture. En effet, la croissance de la souche LD61 a été étudiée dans différents milieux et conditions d'acidification. Il s'avère qu'en milieux synthétiques (MCD, MS10r et MS10rb) ainsi qu'en milieu M17, à pH libre, que le gradient de pH est maintenu pendant toute la phase de croissance puis chute au cours de la phase de post-acidification. Si les profils d'évolution de ces gradients sont comparables, il n'en est pas de même des valeurs, puisque celles-ci sont plus élevées pour les milieux synthétiques en phase de croissance, avec des valeurs moyennes de gradients de pH au cours de la phase de croissance de 0,59, 0,81 et 0,73 upH respectivement pour les milieux MCD, MS10r et MS10rb, qu'en milieu M17 (0,49 upH de moyenne). Par contre, en milieu M17-lactose, lorsque l'acidification est contrôlée, le gradient de pH de la souche LD61, qui est de 0,63 upH au cours de la phase de croissance, n'est pas maintenu puisque des valeurs de 0,38 et 0,2 upH sont mesurées respectivement à l'arrêt de croissance et à 24 heures de culture. Il apparaît donc qu'une même souche régule différemment l'évolution du gradient de pH en fonction des conditions de cultures. L'importance du gradient dépend semble-t-il, à pH libre, de la richesse du milieu et de son pouvoir tampon. En effet, pour les trois milieux synthétiques l'acidification est plus rapide qu'en milieu M17, ce qui implique de mettre en place des gradients plus élevés, afin de maintenir des valeurs de pH interne compatibles avec la croissance et la glycolyse. L'évolution du gradient de pH est par contre différente lorsque l'acidification du milieu M17 est ralentie. Dans cette condition, l'acidification du milieu et du cytoplasme semble être suffisamment lente pour que le gradient n'ait pas à être maintenu à des niveaux très élevés. En effet, malgré ces différences de comportement, il s'avère que les pH intracellulaires évoluent, eux, avec un même profil et des valeurs comparables.

Des cultures des quatre souches, LD61, LD71, LL39 et LC30 ont également été réalisées en milieu M17-lactose à pH libre. Pour les trois premières souches, l'évolution des gradients ainsi que leurs valeurs sont identiques, avec 0,51, 0,57 et 0,59 upH respectivement à l'arrêt de croissance, et 0,27, 0,33 et 0,35 upH à 24 heures de cultures. Les gradients de la souche LC30 présentent quant à eux un profil vraiment original avec une valeur élevée de 0,83 upH au cours de la phase de croissance, qui chute puis se stabilise autour de 0,3 upH dès l'arrêt de la croissance et pendant toute la phase de post-acidification.

L'évolution des gradients de pH observée ici, est cependant très différente de celle obtenue pour une souche de *L. lactis* ssp. *cremoris*, la MG1363, à pH libre, en milieu MCD-glucose (Even *et coll.*, 2002). En effet, dans ces conditions, les valeurs obtenues sont très élevées (1,16 upH en début de post-acidification) et se maintiennent aux alentours de 1 upH jusqu'en fin de post-acidification. L'évolution du pH interne des deux souches *cremoris* LC30 et MG1363 est néanmoins comparable, malgré ces écarts de gradients, avec des valeurs de 7,2 ; 5,7 ; 5,3 et 5,1 pour la souche MG1363 en phase exponentielle, décélération, début et fin de post-acidification respectivement (Even *et coll.*, 2002) et de 7,23 ; 5,65 et 5,34 upH pour la souche LC30 respectivement en phase de croissance, à l'arrêt de croissance et en phase de post-acidification. L'acidification du MCD est plus rapide que celle du M17-lactose à cause du faible pouvoir tampon du milieu chimiquement défini dépourvu de peptides ou de protéines. Il semble donc que pour l'ensemble des souches, la valeur de pH intracellulaire soit un paramètre essentiel à maintenir contrairement au gradient de pH.

Les gradients électriques ont des évolutions comparables pour toutes les souches en milieu M17-lactose. Les valeurs maximales observées en phase de croissance diminuent tout au long des cultures et aucune différence significative n'est relevée entre les souches. En milieux synthétiques et en M17 avec contrôle de l'acidification, le gradient électrique est assez stable pendant toute la phase de croissance et diminue en fin de post-acidification. La force protomotrice, qui résulte de la présence des deux gradients électriques et pH, présente par contre des profils comparables au cours de toutes les cultures avec des maxima de valeurs obtenus en phase de croissance. Les gradients électriques sont supérieurs pour la souche LC30 en milieu M17 à ceux de la souche MG1363, mais les forces protomotrices équivalentes, de -138 à -95 mV pour la MG1363 (Even *et coll.*, 2002) et de -141 à -87 mV pour la souche LC30, puisqu'elles sont calculées à partir des gradients de pH et électriques.

L'ATPase membranaire, qui est une enzyme indispensable à la survie cellulaire en condition d'acidification, présente une activité constante tout au long de la culture pour les deux souches LD61 et LC30. Les valeurs obtenues pour la souche LC30 correspondent à celles de la souche MG1363 uniquement jusqu'en début de post-acidification, puisque celles-ci chutent fortement par la suite (Even *et coll.*, 2002). L'évolution de l'activité ATPase est souvent considérée comme étant en adéquation avec celle du gradient de pH puisque les deux phénomènes sont liés. En effet, l'expulsion des protons par le biais de cette enzyme permet de générer ou de maintenir le gradient de pH. Etant donné la chute des gradients de pH au début de la phase de post-acidification pour la souche LC30, ou à la fin de cette phase pour la souche LD61, il aurait été logique d'observer parallèlement à ces phénomènes une diminution de l'activité ATPase, ce qui n'est pas le cas. Une des explication réside dans le fait que l'activité ATPase mesurée est une activité maximale, et que l'effet de la baisse du pH sur cette enzyme n'a pas été pris en compte. Or, comme cela a été montré chez de nombreuses bactéries, l'activité catalytique de cette enzyme membranaire est probablement régulée par son substrat (l'ATP), mais aussi par des effecteurs ou par l'environnement physico-chimique intracellulaire et notamment par la baisse de pH (Bender et Marquis, 1987 ; Nannen et Hutkins, 1991b ; Hutkins et Nannen, 1993 ; O'Sullivan et Condon, 1999 ; Mercade, 2002). Ainsi, même si l'activité maximale de l'ATPase est constante, l'activité *in vivo* diminue probablement au cours de la culture. La différence de comportement observée entre les souches LD61 et LC30, vis à vis de l'évolution du pH interne, n'est donc pas reliable à des différences d'activités maximales de l'ATPase membranaire.

Outre le pH intracellulaire, l'acidification du milieu de culture provoque la chute du taux de croissance, ainsi que celle de la vitesse spécifique de production d'ATP (q_{ATP}). L'ensemble des souches étudiées présente des métabolismes de type homolactique. Ainsi, la vitesse spécifique de production d'ATP (q_{ATP}) est égale à la vitesse spécifique de production de lactate ($v_{Lactate}$). Pirt (1965) a concrétisé la relation existant entre les vitesses spécifiques de production d'ATP et de croissance par l'équation :

$$q_{ATP} = \mu/Y_{ATPm} + m_{ATP},$$

où Y_{ATPm} représente le rendement maximal en ATP (en g de biomasse.mol⁻¹) qui correspond à la quantité de biomasse effectivement synthétisée à partir de l'énergie produite, et m_{ATP} (en mmol.g⁻¹.h⁻¹) correspond au coefficient de maintenance de la cellule, englobant tous les phénomènes qui ne sont pas directement liés à la croissance comme le maintien de

l'homéostasie cellulaire, le turnover des macromolécules ou encore les cycles futiles (Russel et Cook, 1995). La représentation de q_{ATP} en fonction de μ permet de déterminer graphiquement la valeur du coefficient de maintenance (m_{ATP}) qui correspond à l'ordonnée à l'origine de chaque droite, ainsi que le rendement maximal en ATP puisque $1/Y_{\text{ATPm}}$ est la pente de cette droite (Fig. V.1). Cependant, cette droite n'est un paramètre interprétable que si le coefficient de maintenance est constant quel que soit le taux de croissance, ce qui est rarement le cas (Tempest, 1978). De plus, il n'existe de relation linéaire que dans certains cas, lorsqu'une culture est énergétiquement limitée (Tsai et Lee, 1990), ou lorsque l'anabolisme étant limité, il induit un ajustement du flux catabolique (Novak *et coll.*, 1997).

L'évolution de la vitesse spécifique de production d'ATP en fonction du taux de croissance est donc analysée pour différentes cultures, afin de déterminer, dans diverses conditions, l'implication, ou non, d'une limitation énergétique dans l'arrêt de la croissance (Fig. V.1). Pour cela, nous nous sommes intéressés à un panel de différentes cultures, celles de la souche LD61 dans divers milieux (M17-lactose à pH libre ou avec ralentissement de l'acidification, lait G à pH régulé à 6,4), de la souche LC30 en milieu M17-lactose à pH libre et enfin de la souche LL39 en lait G également à pH libre.

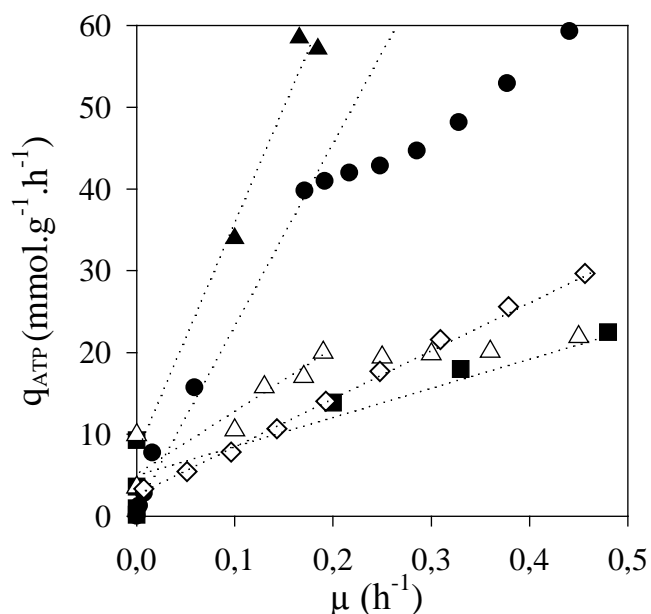


Figure V.1 : Représentation de l'évolution de la vitesse spécifique de production d'ATP (q_{ATP} en $\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) en fonction du taux de croissance (μ en h^{-1}) au cours de cultures de la souche LD61 en milieu M17-lactose à pH libre (■), avec contrôle de l'acidification (◇), ou en lait G à pH régulé (●), de la souche LC30 en M17-lactose à pH libre (△), et de la souche LL39 en lait G à pH libre (▲). L'ensemble de ces cultures est réalisé à 34°C et en condition d'anaérobiose.

Les cultures de la souche LD61 en milieu M17 à pH libre ou avec ralentissement de l'acidification, et de la souche LL39 en lait G à pH libre présentent des évolutions linéaires de q_{ATP} en fonction de μ (Fig. V.1). Pour la culture de la souche LC30 en M17 à pH libre, malgré la diminution du taux de croissance, la vitesse de production d'ATP varie peu jusqu'à ce que la vitesse spécifique de croissance ait atteint une valeur inférieure à $0,2 \text{ h}^{-1}$, puis les deux vitesses spécifiques évoluent ensuite proportionnellement. Enfin, pour la souche LD61 en lait G à pH régulé, la relation entre q_{ATP} et μ n'est une droite que pour les valeurs de μ inférieures à $0,17 \text{ h}^{-1}$. Les valeurs de q_{ATP} sont globalement supérieures pour les cultures en lait G par rapport à celles réalisées en milieu M17-lactose, indiquant un rendement en biomasse par rapport à l'ATP plus faible en lait G qu'en M17 (Tableau V.1). En effet, les valeurs de Y_{ATP} ponctuel, calculées pour les trois cultures de la souche LD61 selon la formule $Y_{ATP} \text{ ponctuel} = \mu/q_{ATP}$ (Tableau V.1), diminuent lorsque le taux de croissance diminue, et ce quelle que soit la condition de culture. Pour une même souche, ici la LD61, des cultures

différentes présentent des valeurs de q_{ATP} et donc des flux cataboliques différents, même pour des taux de croissance identiques. Lors des cultures en M17, à pH libre et avec contrôle de l'acidification, les deux vitesses spécifiques évoluent dans des proportions différentes provoquant un découplage entre anabolisme et catabolisme qui se poursuit jusqu'en phase de post-acidification moment où la croissance est arrêtée alors que l'acidification perdure (Fig. V.1).

Les valeurs des coefficients de maintenance estimés pour la souche LD61 en M17 sont de 3 et 4 $\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. La valeur de m_{ATP} est encore plus élevée pour la souche LC30 en M17 à pH libre ($6,5 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$), et pour la souche LL39 en lait G à pH libre avec $8,5 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Ces valeurs de m_{ATP} sont caractéristiques d'un état non limité énergétiquement, contrairement à ce qui a pu être observé pour *Lb. bulgaricus* à pH libre (Mercade *et coll.*, 2004). Une culture est considérée comme étant énergétiquement limitée lorsque c'est l'approvisionnement énergétique lui-même qui est insuffisant pour assurer la croissance, comme c'est par exemple le cas en condition de carence en carbone, ou lorsque la glycolyse est inhibée par la baisse de pH. Inversement, lorsque la baisse de pH se traduit en premier lieu par une inhibition de l'anabolisme, ou par une dépense énergétique exacerbée par l'effet toxique des acides organiques, un découplage s'opère entre le catabolisme producteur d'énergie et l'anabolisme. Un tel découplage se traduit alors par de fortes valeurs de m_{ATP} . Les données obtenues sur les différentes souches de *L. lactis* à pH libre indiquent donc que le ralentissement de croissance associé à la baisse de pH est plutôt la conséquence d'une inhibition de l'anabolisme sous l'effet de l'accumulation de l'acide lactique, ou d'une limitation nutritionnelle précoce lorsque les souches sont de phénotype Prt^- (*cf.* 4.2 Nutrition azotée et croissance). Lorsque la souche LD61 est cultivée à pH régulé, les valeurs de q_{ATP} sont très élevées jusqu'à ce que le taux de croissance atteigne environ $0,17 \text{ h}^{-1}$. Pour des taux de croissance plus faibles, une nouvelle corrélation entre q_{ATP} et μ s'établit, qui conduit à une estimation de m_{ATP} de $0,02 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, caractéristique d'une limitation énergétique imposée par un état de carence progressive en substrat carboné.

Tableau V.1 : Valeur des paramètres énergétiques q_{ATP} (en $\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$), μ (en h^{-1}) et Y_{ATP} ponctuel (en g.mol^{-1}) pour trois cultures de la souche LD61 en lait G à pH régulé, en M17-lactose à pH libre ou avec ralentissement de l'acidification.

	M17 à pH libre			M17 avec acidification ralentie				lait G à pH 6,4				
μ	0,48	0,33	0,2	0,45	0,31	0,25	0,15	0,52	0,44	0,33	0,22	0,06
q_{ATP}	22,5	18	13,9	29,2	21,7	17,8	11,2	67,5	59,4	48,5	42,3	16,2
Y_{ATP}	21,3	18,3	14,4	15,4	14,3	14	13,4	7,7	7,4	6,8	5,2	3,7

1.3. Métabolisme du citrate

Au cours des cultures en lait écrémé, une co-métabolisation du lactose et du citrate est observée en phase de croissance pour les deux souches *diacetylactis* LD61 et LD71, alors qu'elle n'est pas observée pour les deux autres, LC30 et LL39. Pour ces deux souches, le citrate n'est même pas consommé à bas pH, en fin de culture, alors que c'est une caractéristique fréquente des souches de *Lactococcus lactis* n'appartenant pas au biovar *diacetylactis*, d'induire le catabolisme du citrate à bas pH. Les quantités de citrate présentes dans le lait varient de 5,7 à 7,2 mM et sont bien inférieures aux quantités de lactose (environ 140 mM). L'utilisation du citrate comme source de carbone est une caractéristique existant chez de nombreuses bactéries lactiques, et en particulier très étudiée chez *Leuconostoc* sp. et *Lactococcus* sp. Chez les lactocoques, le transporteur CitP responsable de l'entrée du citrate dans la cellule est codé par un plasmide qui caractérise l'appartenance au biovar *diacetylactis*. Ce transporteur est indispensable à la consommation du citrate puisque des bactéries ne possédant pas le plasmide sont incapables de le métaboliser. Le gène *citP* correspondant au transporteur appartient à l'opéron *citQRP* qui comprend également un gène codant pour une protéine régulatrice CitR et un peptide leader CitQ (Lopez de Felipe *et coll.*, 1995). La protéine CitP n'est pas un simple transporteur secondaire puisqu'elle permet un échange hétérologue précurseur/produit, en l'occurrence citrate/lactate. Ainsi, le métabolisme du citrate va permettre la génération d'une pmf (force proton-motrice) résultant de la formation d'un gradient de pH et d'un potentiel trans-membranaire (Lolkema *et coll.*, 1996 ; Konings *et coll.*, 1997). Le lactate est issu de la métabolisation à la fois du citrate et du

lactose, cependant, la voie métabolique de consommation du citrate ne produit ni NADH, ni ATP, et donc la croissance avec du citrate comme unique source de carbone est impossible (Drinan *et coll.*, 1976). Des expérimentations réalisées par Garcia-Quintans *et coll.* (1998) ont montré l'importance du pH sur le métabolisme du citrate puisque la transcription de l'opéron *citQRP* est fortement induite (facteur 14 environ) à pH 4,5. Le rôle de ce métabolisme dans la lutte à bas pH contre l'accumulation intracellulaire de lactate est également largement démontré (Magni *et coll.*, 1999). En effet, lorsque le citrate produit essentiellement du diacétyle et/ou de l'acétoïne à la place du lactate, on peut considérer que le catabolisme du citrate permet d'évacuer le lactate intracellulaire provenant de la glycolyse. Cependant, il semble que dans nos conditions de culture, le pH initial du lait, inférieur à 6,5, permette un catabolisme basal du citrate dès le début de la croissance et de la consommation de lactose, proche de ce qu'ont déjà observé Starrenburgh et Hugenholtz (1991) avec la souche Ru4. Après son internalisation, le citrate est dégradé en acétate, CO₂ et pyruvate grâce à des enzymes codées chromosomiquement (opéron *citCDEFG*) (Hugenholtz, 1993). Les souches appartenant au biovar *diacetylactis*, en plus du transport, ont la capacité de transformer le pyruvate via une voie annexe permettant la formation de composés carbonés en C4 responsables de certaines qualités texturales et organoleptiques. Les deux plus importants, le diacétyle et sa forme réduite l'acétoïne, sont responsables du goût particulier du beurre et s'accumulent au cours de fermentations en présence de *L. lactis* biovar *diacetylactis*. Le diacétyle est donc un composé gustatif majeur dans divers produits laitiers fermentés, cependant les bactéries lactiques le produisent en de très faibles quantités (généralement moins de 5 mg par litre). Cette production, qui semble favorisée à bas pH (inférieur à 5,5) en conditions aérobies (Starrenburg et Hugenholtz, 1991), constitue un enjeu majeur puisque de nombreuses études réalisées dans le but de l'améliorer ont montré qu'une activité lactate déshydrogénase faible ou nulle entraîne une baisse de la production de lactate et une augmentation de celle de diacétyle et d'acétoïne (McKay and Baldwin, 1974; Kuila et Ranganadan, 1977; Platteuw *et coll.*, 1995; Gasson *et coll.*, 1996). Les dosages des substrats et produits de fermentation par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) réalisés au cours des cultures en lait thermisé et aérobie n'ont pas permis de mettre en évidence une production de diacétyle, composé très instable, ni d'acétoïne probablement produits en trop faibles quantités. Dans nos conditions de culture, avec les deux souches *diacetylactis* utilisées, la consommation du citrate est à l'origine d'une production d'acétate, de lactate et de CO₂ (non dosé) dont les concentrations sont estimées stœchiométriquement par rapport à celles du citrate métabolisé.

2. Nutrition azotée et croissance

L'étude comparative doit permettre, grâce à l'analyse métabolique de souches de *Lactococcus lactis* de comportement acidifiant différent, de mettre en évidence les types de régulation métabolique qui sous-tendent le mécanisme d'acidification ainsi que son contrôle dans un milieu complexe comme le lait. Les différences d'acidification observées en milieu rétentat le sont également en lait écrémé thermisé pour les deux souches initialement testées, LD61 et LD71. En effet, sur ce dernier milieu, taux de croissance et quantités de biomasse sont doubles pour la souche LD61 par rapport à la souche LD71 (0,58 h⁻¹ et 0,61 g.L⁻¹ respectivement pour la LD61 contre 0,33 h⁻¹ et 0,3 g.L⁻¹ pour la LD71). L'amplitude de l'acidification, est également, comme la croissance, plus importante avec la souche LD61 (-1,71 upH) qu'avec la LD71 (-1,55 upH). Contrairement au milieu lait, l'étude en M17-lactose a révélé des cinétiques identiques pour les deux souches tant au niveau de l'acidification qu'à celui de la croissance, et il semble donc que le milieu laitier soit seul responsable des différences observées entre ces deux souches. Les souches de lactocoques présentent généralement des exigences nutritionnelles complexes tant au niveau des acides aminés que des vitamines (Cocaign-Bousquet *et coll.*, 1995). Des expérimentations en Cinac ont été réalisées dans le but de déterminer si l'écart de croissance observé entre les deux souches résultait d'une carence en l'un de ces substrats. Les tests de supplémentation du lait en vitamines, acides aminés, extrait de levure ou peptone ont permis de mettre en évidence deux comportements différents. Tout d'abord un comportement de type « LD61 » pour lequel l'ajout de substrats azotés (acides aminés, peptone ou extrait de levure) permet une augmentation de la vitesse d'acidification (de -5,75 à -9,05.10⁻³ upH.min⁻¹), mais n'a aucun rôle sur son amplitude (de -2,1 à -2,24 upH). Enfin un comportement différent, de type « LD71 », où la supplémentation du lait G en substrat azotés va permettre à la fois l'augmentation de la V_{max} d'acidification (de -4,95 à -9,75.10⁻³ upH.min⁻¹) et de son amplitude (de -1,77 à -2,18 upH). Il est intéressant de noter que pour les deux souches, l'ajout de vitamines, à l'opposé des substrats azotés, n'a aucun effet sur l'acidification.

Bien qu'il soit écrémé, le lait demeure un milieu très riche, puisque outre des sources de carbone (lactose et citrate), des vitamines et des minéraux, il renferme une fraction protidique complexe. Les caséines sont des composés très importants puisqu'elles représentent environ 78,5 % des protéines totales du lait de vache (de Peters et Ferguson, 1992) et qu'elles vont jouer un rôle essentiel dans la coagulation du lait et la nutrition des

micro-organismes. Le lait de vache renferme très peu d'azote non protidique (environ 5 %), il est en particulier très pauvre en acides aminés libres, dont la concentration globale est proche de 4,4 mg/100 g de lait, et bien qu'il renferme également des oligopeptides (environ 3,2 mg/100 g de lait) et d'autres constituants azotés dont le principal est l'urée (14,2 mg/100 g de lait), les caséines demeurent la source d'azote principale (de Peters and Ferguson, 1992). Les acides aminés libres et petits peptides sont en concentrations insuffisantes dans le lait pour permettre une croissance prolongée, en l'absence d'une dégradation des caséines (St Gelais *et coll.*, 1992). Cependant, des acides aminés et peptides supplémentaires peuvent être obtenus par la protéolyse des protéines du lait, mais ce phénomène n'est pas instantané, ce qui explique que les *lactococci* ont généralement une croissance plus rapide et souvent plus importante dans des milieux riches, synthétiques ou non, qu'en lait, comme cela a été observé pour les quatre souches de cette étude.

Le système protéolytique est, chez *L. lactis*, composé d'une sérine-protéase pariétale codée par le gène plasmidique *prtP* et qui nécessite le produit du gène *prtM* pour sa maturation (Vos *et coll.*, 1989 a et b; Kok, 1990). A cette protéase, s'ajoutent des transporteurs de spécificité différente permettant l'internalisation des peptides issus du clivage des caséines par PrtP, ainsi que des peptidases intra-cellulaires dégradant ces peptides en acides aminés métabolisables. Ainsi, l'activité protéolytique des lactocoques génère suffisamment de petits peptides pour permettre une croissance non limitée. On peut donc différencier les souches de type « Prt⁺ » qui possèdent le plasmide protéase et ont une activité protéolytique, de celles qui ne l'ont pas (Prt⁻) et dont la croissance va rapidement s'arrêter après épuisement des acides aminés et peptides libres du lait.

La croissance de la souche LD71 s'arrête rapidement en lait écrémé et l'acidification résultante est peu importante. Cependant, lorsque le lait est supplémenté en acides aminés libres ou en peptone, l'amplitude d'acidification augmente fortement. L'ajout de substrats azotés facilement métabolisables en absence de protéase membranaire a donc permis de lever la limitation nutritionnelle qui pesait sur la souche LD71 en lait écrémé, souche qui est probablement de phénotype Prt⁻. A l'inverse, l'amplitude d'acidification de la souche LD61 en lait n'est modifiée par aucune des suppléments ce qui implique une absence de limitation nutritionnelle dans ce milieu et probablement donc un phénotype Prt⁺. Ces deux souches, bien que phylo-génétiquement proches, présentent des profils plasmidiques différents qui pourraient expliquer ces comportements. La souche LD61, qui comporte 5

plasmides, possède vraisemblablement le plasmide codant pour la protéase membranaire, qui est par contre absent de la souche LD71 qui ne possède que 2 plasmides lui permettant l'utilisation du citrate et du lactose. On peut supposer que pour les quatre souches ajoutées à l'étude (LC30, LC40, LD53 et LL39), l'appartenance au type «LD61» ou «LD71» correspond également au phénotype protéasique associé, respectivement Prt^+ et Prt^- , mais une analyse de leur contenu plasmidique serait nécessaire afin d'en établir la certitude.

Une différence de niveau d'acidification a pu être observée entre lait écrémé thermisé et lait G pour les souches LD61 et LD71. En effet, si l'amplitude d'acidification est de -2,13 et -1,77 upH respectivement pour les souches LD61 et LD71 en lait G, cette valeur est inférieure en lait écrémé (-1,67 et -1,54 upH respectivement). Ce phénomène est très probablement lié au mode de stérilisation de ces deux laits, car si le lait G ne subit aucun traitement thermique, ce n'est pas le cas du lait écrémé qui, lui, est stérilisé à l'autoclave. La chaleur va catalyser la formation de complexes de Maillard entre le groupement carbonyle réducteur du lactose et la fonction amine d'acides aminés libres et de protéines comme les caséines (Liggins and Furth, 1997) produisant des substances aromatiques et colorées. Einarsson *et coll.* (1988) ont démontré l'effet inhibiteur de certains produits de réaction de Maillard sur le transport de la sérine ou du glucose chez *Salmonella* ainsi que sur la solubilité du fer dans le milieu de culture. Outre des effets inhibiteurs directs, la formation de tels composés va également diminuer la disponibilité du lactose et des caséines pour la synthèse d'énergie et la croissance, ce qui explique une acidification non optimale dans le lait thermisé. L'utilisation du lait G, préféré au cours de l'étude, lève les inhibitions liées au mode de stérilisation du milieu et permet de se focaliser uniquement sur les caractères propres aux souches étudiées.

3. Effet de l'oxygène sur la croissance de *L. lactis*

Lors des cultures en Cinac, l'environnement gazeux de la culture n'étant pas contrôlé, la croissance s'effectue en présence d'oxygène. Afin de pouvoir comparer ces cinétiques avec celles réalisées en anaérobiose en fermenteur, il a été nécessaire de vérifier l'effet de la présence d'oxygène sur la croissance et l'acidification des deux souches. *Lactococcus lactis* est une bactérie lactique homofermentaire anaérobie facultative, mais au cours des différents procédés de fabrication alimentaire, de nombreuses étapes (mélange...) entraînent un contact des bactéries avec l'oxygène. L'effet délétère de l'oxygène est essentiellement lié à l'accumulation de composés oxygénés toxiques comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et cet effet est accentué lorsque la croissance est limitée (milieu pauvre, lait...), mais il peut être évité par l'ajout de catalase (absente chez *Lactococcus*), d'extrait de levure ou d'agents réducteurs au milieu de culture (Gilliland et Speck, 1969 ; Selby Smith *et coll.*, 1975). Cependant, les bactéries lactiques bénéficient d'autres systèmes de détoxification, elles peuvent en effet utiliser l'oxygène moléculaire ou le peroxyde d'hydrogène afin de régénérer le NAD^+ grâce à des enzymes comme la NADH oxydase ou la NADH peroxydase (Condon, 1987).

Ainsi, la présence d'oxygène va influencer le catabolisme en altérant le ratio $NADH/NAD^+$ qui joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme des sucres (Garrigues *et coll.*, 1997 ; Garrigues *et coll.*, 2001 ; Neves *et coll.*, 2002), mais également sur les enzymes tant au niveau de leur expression que de leur activité spécifique (Jensen *et coll.*, 2001). Lorsque l'atmosphère est aérobie, un mélange de lactate et d'acétate est produit et le flux est également redirigé vers la production d'acétoïne et de diacétyle (Condon, 1987 ; Smart et Thomas, 1987 ; Cogan *et coll.*, 1989 ; Lopez de Felipe *et coll.*, 1997). La présence d'oxygène va activer la pyruvate déshydrogénase, mais également des NADH oxydases qui vont permettre la ré-oxydation du NADH en NAD. La moindre disponibilité du NADH pour les déshydrogénases (LDH, ADH), favorise la production d'acétate par rapport à celle du lactate ou de l'éthanol. L'augmentation de la production d'acétate est à l'origine d'une plus grande synthèse d'ATP. La présence d'oxygène est donc souvent responsable d'une augmentation du taux de croissance, en tous cas, lorsque les produits oxygénés inhibiteurs ne sont pas encore présents en quantité importante. Pour les deux types de milieux que nous avons employé, lait écrémé et M17-lactose, les taux de croissance des souches LD61 et LD71 sont plus faibles en aérobie, d'environ $0,2 h^{-1}$ et ce quelle que soit la souche, comme cela a été observé avec la souche MG1363 (Nordvisk *et coll.*, 2003) pour laquelle le taux de croissance en batch

diminue avec l'aération. Dans ces conditions, plus de 90 % du glucose reste converti en lactate, et les produits secondaires deviennent majoritairement l'acétate, le CO₂ et l'acétoïne. En aérobiose, et notamment en lait écrémé, la production d'acétate est augmentée, ce qui est en adéquation avec l'activation par l'oxygène d'enzyme comme le complexe pyruvate déshydrogénase (Cogan *et coll.*, 1989 ; Jensen *et coll.*, 2001), alors que les autres produits comme l'acétoïne sont probablement produits en de trop faibles quantités pour être détectés dans nos conditions, mais une majorité du lactose (plus de 90 %) reste toujours convertie en lactate. Ainsi, la production d'ATP supplémentaire liée à la synthèse d'acétate ne semble pas suffisante dans nos conditions pour assurer une augmentation du taux de croissance. Ce phénomène pourrait être lié à une inhibition par des produits dérivés de l'oxygène.

Cependant, les phases de croissance sont plus longues, de même que les rendements en biomasse et les quantités de lactate présentes à l'arrêt de croissance supérieures en présence d'oxygène, ce qui ne semble pas corroborer une inhibition par des dérivés oxygénés. Le lait étant un milieu très complexe, on peut se demander s'il contient des substances qui permettraient aux lactocoques de lutter contre les substances toxiques de l'oxygène, comme par exemple la présence d'asparagine, ou si, comme cela a également été montré pour la souche *L. lactis* ATCC 19435, c'est le pyruvate qui, en réagissant avec le peroxyde d'hydrogène, détoxifie la cellule (van Niel *et coll.*, 2002). Cette réaction produit par ailleurs de l'acétate mais qui n'est pas couplé à la synthèse d'ATP. La synthèse d'acétate et la consommation de pyruvate par cette réaction non productrice d'énergie, tout en conservant un métabolisme homolactique, expliquerait peut-être la baisse du taux de croissance observée en aérobiose.

La « post-acidification » est à l'inverse moins importante en aérobiose, et ainsi, pH et quantité de lactate finaux sont équivalents pour un milieu donné en présence ou non d'oxygène. Les différences observées en terme de vitesse de post-acidification peuvent provenir de pH différents à l'arrêt de croissance, les pH les plus élevés semblant favoriser une vitesse de post-acidification supérieure (*cf.* 4.3. Contrôle de la vitesse de post-acidification).

4. Régulation de l'acidification

Le processus d'acidification du lait, ou d'autres milieux de culture, est décortiqué afin d'en comprendre les différentes phases. Il s'agit d'établir quels sont les paramètres physiologiques qui contrôlent la vitesse maximale d'acidification (V_{\max}), la valeur de pH à l'arrêt de croissance, la vitesse de post-acidification ($V_{\text{post-acid}}$), ainsi que la valeur de pH à 24 heures (fin de post-acidification), pour les différentes souches testées. De plus, outre les cultures en lait ou lait supplémenté, d'autres réalisées en milieu complexe M17 (nombreuses répétitions) ou en milieux synthétiques ont été effectuées afin d'analyser la pertinence et la reproductibilité des résultats. Plusieurs paramètres sont mesurés au cours des cultures en fermenteur : le pH, notamment le pH à 24 h de culture ; la V_{\max} d'acidification, le μ , et la concentration en biomasse ; les vitesses spécifiques de consommation de lactose (q_{lactose}) et de production de lactate (v_{lactate}) ; et la vitesse d'acidification spécifique $V_{\text{spé}}$ (une autre manière d'appréhender le véritable flux d'acidification par unité de biomasse, plus précise que q_{lactose} ou v_{lactate}). Afin d'établir la pertinence des relations entre certains paramètres, différentes corrélations ont été testées et analysées statistiquement selon le test de Student (Doly *et coll.*, 1994), dont les valeurs du coefficient de corrélation (r) et de la p-value sont indiquées dans les légendes des graphes.

Les souches de *Lactococcus lactis* fournies par la société SOREDAB peuvent être classées sur un plan nutritionnel en deux catégories. La première correspond aux souches de type « LD61 », qui sont probablement de phénotype Prt^+ puisqu'elles n'ont pas de problème nutritionnel en lait, et qui en lait écrémé thermisé supplémenté en tryptone, atteignent un pH à 24 h de culture légèrement plus élevé qu'en lait. Les souches de type « LD71 » constituent le second groupe dont la croissance en lait écrémé est limitée (phénotype Prt^-), et qui, lorsque le lait écrémé thermisé est supplémenté en tryptone, atteignent un pH à 24 h de culture plus bas d'environ 0,2 upH. Parmi les quatre souches analysées dans cette étude, la souche LD61 appartient à la première catégorie, tandis que les souches LD71, LL39 et LC30 appartiennent à la seconde.

4.1. Contrôle de la V_{\max} d'acidification

La vitesse maximale d'acidification (V_{\max}), est, avec le pH atteint à 24 h ($\text{pH}_{24\text{h}}$), l'un des paramètres essentiels dans la comparaison et la sélection de souches sur la base de leurs capacités acidifiantes. La V_{\max} d'acidification résulte à la fois de la croissance (μ), des capacités glycolytiques intrinsèques de chaque souche, ainsi que du pouvoir tampon du milieu de culture. L'effet des deux premiers facteurs est analysé pour les quatre souches de *Lactococcus lactis* (LD61, LD71, LL39 et LC30), et ceci dans divers milieux de culture permettant d'obtenir un panel de cinétiques d'acidification différentes.

Les très faibles valeurs de concentration initiale en biomasse ($\text{DO}_{580\text{nm}}$ d'environ 0,01) entraînent des erreurs considérables sur l'estimation des vitesses spécifiques en début de culture. De façon à atténuer ces erreurs, après comparaison de différents modes de calcul, les divers paramètres analysés sont calculés sur une plage entre DO 0,1 et DO 1 (notés $X_{0,1/1}$), et représentent donc des valeurs « maximales moyennées ».

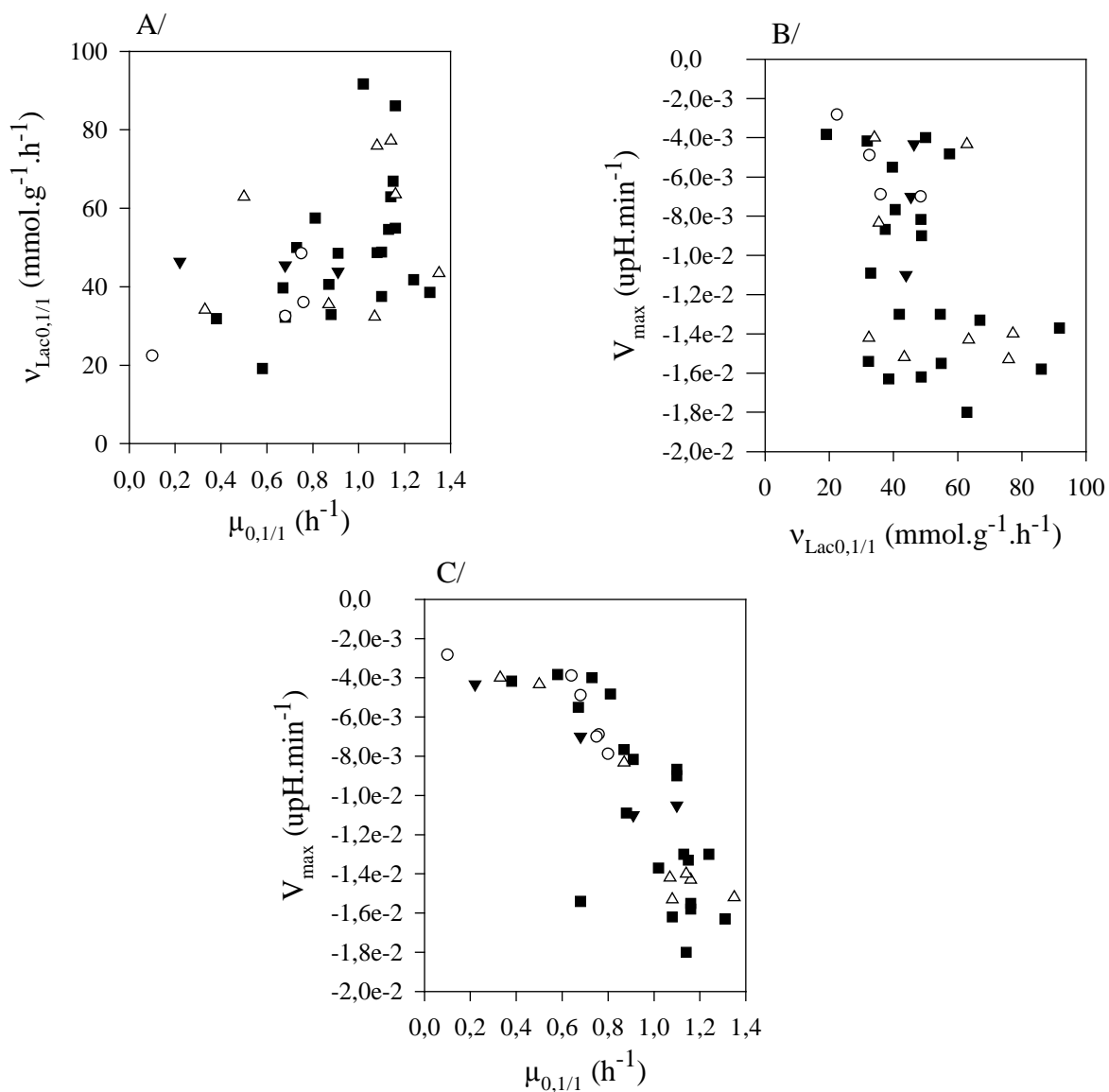


Figure V.2 : Evolution de la vitesse spécifique de production de lactate ($v_{Lac0,1/1}$) en fonction du taux de croissance ($\mu_{0,1/1}$) (A), de la V_{max} d'acidification en fonction du $v_{Lac0,1/1}$ (B), et de la V_{max} d'acidification en fonction de $\mu_{0,1/1}$ (C), pour les quatre souches étudiées (LD61, ■ ; LD71, △ ; LL39, ▼ ; LC30, ○).

Coefficients de corrélation (r) et p value (p) correspondant à chaque graphe : r_A : 0,45, p_A : 10^{-3} / r_B : -0,47, p_B : 10^{-3} / r_C : -0,82, p_C : 3.10^{-15} .

L'hypothèse initiale la plus plausible pour expliquer les différences d'acidification entre les souches était de considérer que la V_{\max} était directement liée au flux glycolytique (v_{Lac}), lui-même contrôlé par les capacités anaboliques (μ), en vertu des liens établis entre anabolisme et catabolisme par Novak *et coll.* (1997). Cependant, pour l'ensemble des souches et des milieux testés, une faible corrélation est observée entre $\mu_{0,1/1}$ et les vitesses spécifiques caractéristiques de la glycolyse (q_{lactose} , v_{Lac} (Fig. V.2A), et la vitesse spécifique d'acidification $V_{\text{spé}}$). Contrairement à certaines données bibliographiques (Novak *et coll.*, 1997) qui montrent une excellente corrélation entre flux glycolytique et taux de croissance de *L. lactis* sur différents milieux, la compilation de nos données indique un certain découplage entre flux catabolique et anabolique. Il faut cependant noter que, compte tenu de la très faible concentration de biomasse initiale, les vitesses spécifiques caractéristiques de la glycolyse sont entachées d'une erreur importante, puisque les valeurs moyennes de $v_{\text{Lac}0,1/1}$ pour toutes les cultures sont de $47,7 \pm 17 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, et de $60 \pm 19 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour la souche LD61 en M17 (moyenne de 10 répétitions).

Une faible corrélation est également observée entre la vitesse maximale d'acidification et la vitesse spécifique de production de lactate (Fig. V.2B). Effectivement, un même flux glycolytique peut conduire à des valeurs de V_{\max} extrêmement variables.

Par contre, une forte corrélation existe entre la vitesse maximale d'acidification et le $\mu_{0,1/1}$ (Fig. V.2C). La V_{\max} dépend essentiellement de la croissance et elle ne semble donc pas être un critère adéquat pour la mise en évidence de comportements glycolytiques particuliers aux différentes souches. Les quatre souches étudiées présentent des différences de taux de croissance, entre elles sur un même milieu, et pour une souche donnée sur différents milieux (Fig. V.3). En effet, la capacité de croissance est régie par une somme de phénomènes complexes, relatifs en particulier aux transporteurs membranaires, aux voies anaboliques et à l'énergétique cellulaire, qui caractérisent chaque souche. On peut également noter que pour les trois souches présentant des limitations nutritionnelles en lait, la supplémentation du lait augmente nettement le taux de croissance (calculé sur la tranche entre DO 0,1 et 1), contrairement à la souche LD61 (Fig. V.3).

Les quatre souches testées dans différents milieux ne se différencient donc pas significativement par leur capacité glycolytique, mais plutôt par leur taux de croissance, qui détermine la vitesse maximale d'acidification. Par conséquent, le contrôle de la V_{\max} d'acidification devra être recherché directement par le biais de la caractérisation du taux de croissance des souches testées.

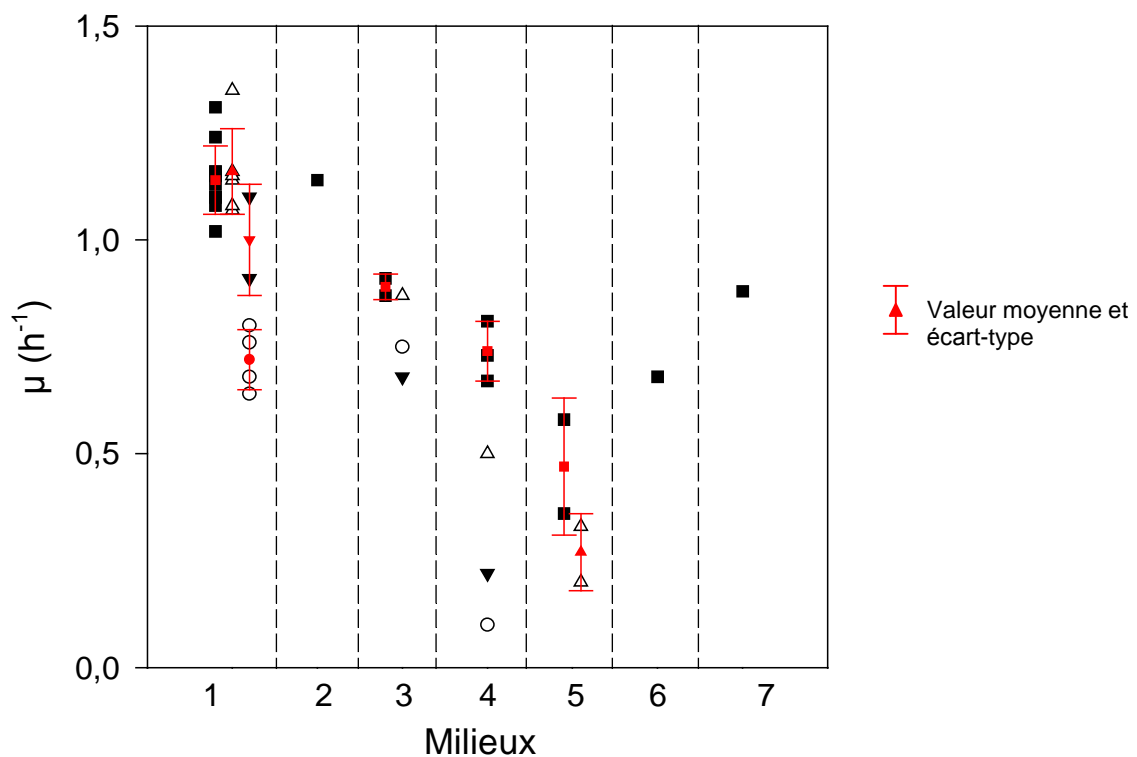


Figure V.3: Evolution du taux de croissance ($\mu_{0,1/1}$) pour les quatre souches étudiées (LD61, ■ ; LD71, ▲ ; LL39, ▼ ; LC30, ○) en fonction du milieu de culture.

Légende : milieu : 1 : M17 ; 2 : MCD ; 3 : lait G supplémenté ; 4 : lait G ; 5 : lait écrémé thermisé ; 6 : MS10r ; 7 : MS10rb.

4.2. Contrôle de l'arrêt de croissance à pH libre

Il s'agit de comprendre quel est le facteur responsable de l'inhibition de la croissance et quel phénomène détermine la valeur de pH à l'arrêt de croissance chez *L. lactis*. Chez les lactocoques en condition d'auto-acidification, le ralentissement puis l'arrêt de la croissance sont liés à la baisse de pH et à la production d'acide lactique. Par conséquent, les valeurs de pH, pH_{int} , concentration en lactate total ([lactate]), ainsi que de la forme non dissociée, l'acide lactique [AcLact], calculée selon la relation acido-basique classique en tenant compte du pK_A du lactate (Kashket, 1987), obtenues à l'arrêt de croissance pour différentes cultures des souches LD61, LD71, LL39 et LC30, ont été comparées afin de déterminer le facteur réellement impliqué (Tableau V.2).

Au cours de cultures à pH libre de la souche de référence LD61 dans différents milieux, les valeurs de pH (de 4,63 à 5,11), de pH_{int} (de 5,25 à 5,5) et de [lactate] (de 51,2 à 98,2 mM) mesurées à l'arrêt de croissance varient fortement. Concernant les valeurs de [AcLact], celles obtenues pour l'ensemble des cultures en milieux M17, MCD et MS10, sont centrées autour d'une valeur moyenne de $7,2 \pm 0,6$ mM. La comparaison de deux cultures (M17 avec acidification contrôlée et MS10r) présentant des cinétiques de croissance et d'acidification extrêmes et les valeurs les plus éloignées pour les autres paramètres, montre des valeurs de [AcLact] à l'arrêt de croissance identiques dans les deux cas ($7,7 \pm 0,3$ et $7,6$ mM). Lorsque la souche LD61 est cultivée en lait, les valeurs de [AcLact] sont moins précises et plus étalées, puisqu'elles varient de $3,9 \pm 1,9$ mM en lait G à $11 \pm 1,5$ mM en lait G supplémenté, mais elles sont néanmoins centrées autour d'une valeur moyenne d'environ 7 mM. Considérant le phénotype de la souche LD61, non limitée nutritionnellement en lait, on peut donc proposer que parmi les facteurs intervenant dans l'arrêt de croissance, la concentration d'acide lactique, forme non dissocié est le facteur prépondérant.

Tableau V.2 : Comparaison des paramètres mesurés à l'arrêt de croissance : temps, concentration de biomasse, pH du milieu (pH), pH intracellulaire (pHint), concentration en lactate total [lactate] et en acide lactique [AcLact], pour les quatre souches de lactocoques LD61, LD71, LL39 et LC30 dans différents milieux de culture.

Souche	Milieu	Temps (h)	Biomasse (g.L ⁻¹)	pH	pHint	[lactate] mM	[AcLact] mM
LD61	M17	6,6 ± 0,8	1,5 ± 0,1	4,86 ± 0,1	5,25 ± 0,16	84,2 ± 6,6	7,7 ± 1,5
	M17 acidification contrôlée	9	2,4 ± 0,1	5,15 ± 0,007	5,61 ± 0,11	160,6 ± 9,3	7,7 ± 0,3
	MCD	6,5	1	4,81	5,5	60,9	6,1
	Lait G supplémenté	7,2 ± 1	0,9 ± 0,3	4,76 ± 0,04		98,4 ± 4,5	11 ± 1,5
	Lait G	7,5 ± 0,7	0,7 ± 0,03	5,11 ± 0,1		71 ± 22,2	3,9 ± 1,9
	Lait G pH 6,4	32	0,4			475,9	1,4
	MS10rb	5,5	0,8	4,67	5,36	51,2	6,9
	MS10r	6,5	0,7	4,63	5,35	52,5	7,6
	Lait écrémé	10,5 ± 2,8	0,7 ± 0,2	5 ± 0,3		51,6 ± 11,3	4 ± 2,9
LD71	M17	6,7 ± 0,7	1,5 ± 0,1	4,82 ± 0,1	5,38 ± 0,16	84,5 ± 11,2	8,7 ± 1,9
	Lait G supplémenté	3,5	0,4	5,81		14,6	0,2
	Lait G	5,5	0,2	5,7		21,6	0,3
	Lait écrémé	8,2 ± 1,1	0,3	5,56 ± 0,06		23 ± 8,2	0,4 ± 0,1
LL39	M17	7	1,4 ± 0,02	5,03 ± 0,06	5,63 ± 0,07	73,8	5,1
	Lait G supplémenté	6,5	0,8	5,15		68,5	3,3
	Lait G	10	0,3	5,42		48	1,3
LC30	M17	9,7 ± 0,3	1 ± 0,2	5,48 ± 0,08	5,85 ± 0,23	67,6 ± 2,1	1,7 ± 0,2
	M17 pH 7	10	0,9 ± 0,01			70,9 ± 6,3	0,05
	Lait G supplémenté	3,5	0,2	5,99		8,3	0,06
	Lait G	10	0,2	5,43		30,9	0,8

Lorsque le pH de la culture est régulé, l'arrêt de croissance est provoqué par l'épuisement du milieu en lactose, et la faible valeur de [AcLact] mesurée dans cette condition (1,4 mM) confirme que ce paramètre n'intervient pas dans l'arrêt de croissance.

La souche LD71 présente des valeurs de [AcLact] en M17 similaires à celles de la souche LD61 (8,7 ± 1,9 comparé à 7,7 ± 1,5 mM pour LD61) (Tableau V.13). En effet, ces deux valeurs ne sont pas significativement différentes puisque l'écart-type sur cette mesure est d'environ 19 % pour la LD61 et de 22 % pour la LD71, alors que la différence entre les deux moyennes n'est que de 12 %. Les valeurs de concentration en lactate obtenues à l'arrêt de croissance sont identiques entre ces deux souches (84,5 ± 11,2 pour la LD71 et 84,2 ± 6,6 mM pour LD61). Des valeurs de [AcLact] très inférieures sont par contre obtenues dans les différents laits (entre 0,2 et 0,4 mM), témoignant d'une limitation de la croissance d'ordre nutritionnel. Etant donné les similitudes entre les souches LD71 et LD61 en milieu M17 et

l'absence, pour la souche LD71, de cultures en milieux synthétiques et/ou avec contrôle de l'acidification qui pourraient appuyer notre conclusion, il semble logique de conclure que l'inhibition de la croissance est liée, pour la souche LD71, à la présence d'une concentration en acide lactique limite, et ceci lorsque le milieu n'est pas nutritionnellement limitant.

La souche LL39 présente des valeurs, que ce soit de [lactate] ou de [AcLact], inférieures à celles des souches *diacetylactis* en milieu M17. Cependant, compte tenu des écarts-types observés pour ces souches, on ne peut conclure quant à la significativité de cette différence, d'autant plus qu'une seule valeur est disponible pour la souche LL39. Dans les différents laits, les valeurs de [AcLact] sont, là encore, inférieures à celles obtenues en M17 (1,3 et 3,3 mM contre 5,1 mM en M17). Il faut néanmoins noter que les valeurs de [AcLact] qui se situent dans la gamme de 3 à 5 mM sont sujettes à incertitude quant à leur interprétation. La décision doit alors prendre en compte le phénotype connu des souches (limitées nutritionnellement en lait ou non). C'est ainsi qu'une valeur de 3,9 mM pour LD61 est considérée dans la gamme de valeurs inhibitrices, alors que la valeur de 3,3 mM observée pour la souche LL39 en lait G supplémenté est probablement classée dans le phénotype limité nutritionnellement. Pour cette souche, il est également probable que la concentration en acide lactique soit responsable de l'arrêt de la croissance en milieu M17.

Les concentrations de [AcLact] obtenues pour la souche LC30 sont toutes très faibles, que ce soit en milieu lait ou en milieu M17 (Tableau V.2). Trois hypothèses sont envisageables pour expliquer ce comportement, soit une sensibilité plus importante de cette souche vis à vis de [AcLact], soit la production de molécules inhibitrices autres que l'acide lactique, soit une limitation de type nutritionnel, même dans un milieu riche comme le M17. Des cultures de cette souche ont été réalisées en M17 à pH régulé afin de valider ces hypothèses. Les croissances à pH libre et régulé sont similaires (Tableau V.2), et l'arrêt de croissance a lieu dans le second cas alors que le milieu n'est pas épuisé en sucre (80 mM de lactose résiduel). La valeur de [AcLact] obtenue est significativement plus faible qu'à pH libre (0,05 contre $1,7 \pm 0,2$ mM) indiquant que l'arrêt de croissance pour cette souche est indépendant de [AcLact] ou du pH, et lié à un facteur inhibiteur (molécule inhibitrice, ou plus probablement carence nutritionnelle).

La concentration d'acide lactique semble donc responsable de l'arrêt de la croissance, hors cas de limitation nutritionnelle. Nous observons une grande homogénéité entre les souches sur la valeur de cette concentration inhibitrice. Inversement, de faibles concentrations de [AcLact] à l'arrêt de croissance pour des cultures à pH libre sont indicatrices de limitation de croissance par carence nutritionnelle. Par conséquent, une mesure en fin de croissance du

4.3. Vitesse de post-acidification

L'importance de la phase de post-acidification peut être analysée soit par sa vitesse initiale, de production de lactate ou de baisse de pH (vitesse calculée sur la première heure après l'arrêt de croissance, appelée V_{1h}), soit par sa vitesse moyenne sur l'ensemble de la post-acidification (entre l'arrêt de croissance et 24 h de culture). Les vitesses calculées indiquent le fonctionnement global de la population, dépendant de la quantité de biomasse et de son activité glycolytique. Par ailleurs, de même que pour la vitesse spécifique de production de lactate, des vitesses spécifiques d'acidification ($V_{spé}$), qui indiquent l'état de fonctionnement réel de la biomasse, sont calculées.

Les vitesses spécifiques de post-acidification (et de production de lactate) calculées sur 1 h sont d'autant plus élevées (en valeur absolue) que le pH à l'arrêt de croissance est élevé et que la quantité de biomasse produite est faible (Fig. V.5 A et B). Dans ce cas, la valeur de pH atteinte à l'arrêt de croissance constitue le facteur déterminant vis à vis de l'activité catabolique de la biomasse. La vitesse moyenne calculée sur l'ensemble de la période de post-acidification évolue également dans le même sens que les vitesses spécifiques (Fig. V.5 C et D). En effet, plus le pH à l'arrêt de croissance est élevé, plus la vitesse de post-acidification moyenne est importante, malgré une quantité de biomasse atteinte faible. Le déficit en biomasse est compensé par des vitesses spécifiques de post-acidification initiales supérieures qui, du fait de valeurs de pH à l'arrêt de croissance plus élevées, sont maintenues plus longtemps que lorsque la biomasse est plus importante mais que le pH à l'arrêt de croissance est plus bas (notons cependant que cette analyse néglige la valeur de viabilité de la population dans cette phase, certainement également liée au pH atteint à l'arrêt de croissance).

Le pH atteint à l'arrêt de croissance, déterminé par le phénotype nutritionnel de la souche, détermine la vitesse de post-acidification : un pH élevé est peu inhibiteur vis à vis des enzymes du métabolisme central, et l'activité glycolytique est donc maintenue. Dans ce cas, malgré une quantité de biomasse relativement faible, la vitesse moyenne de post-acidification est élevée.

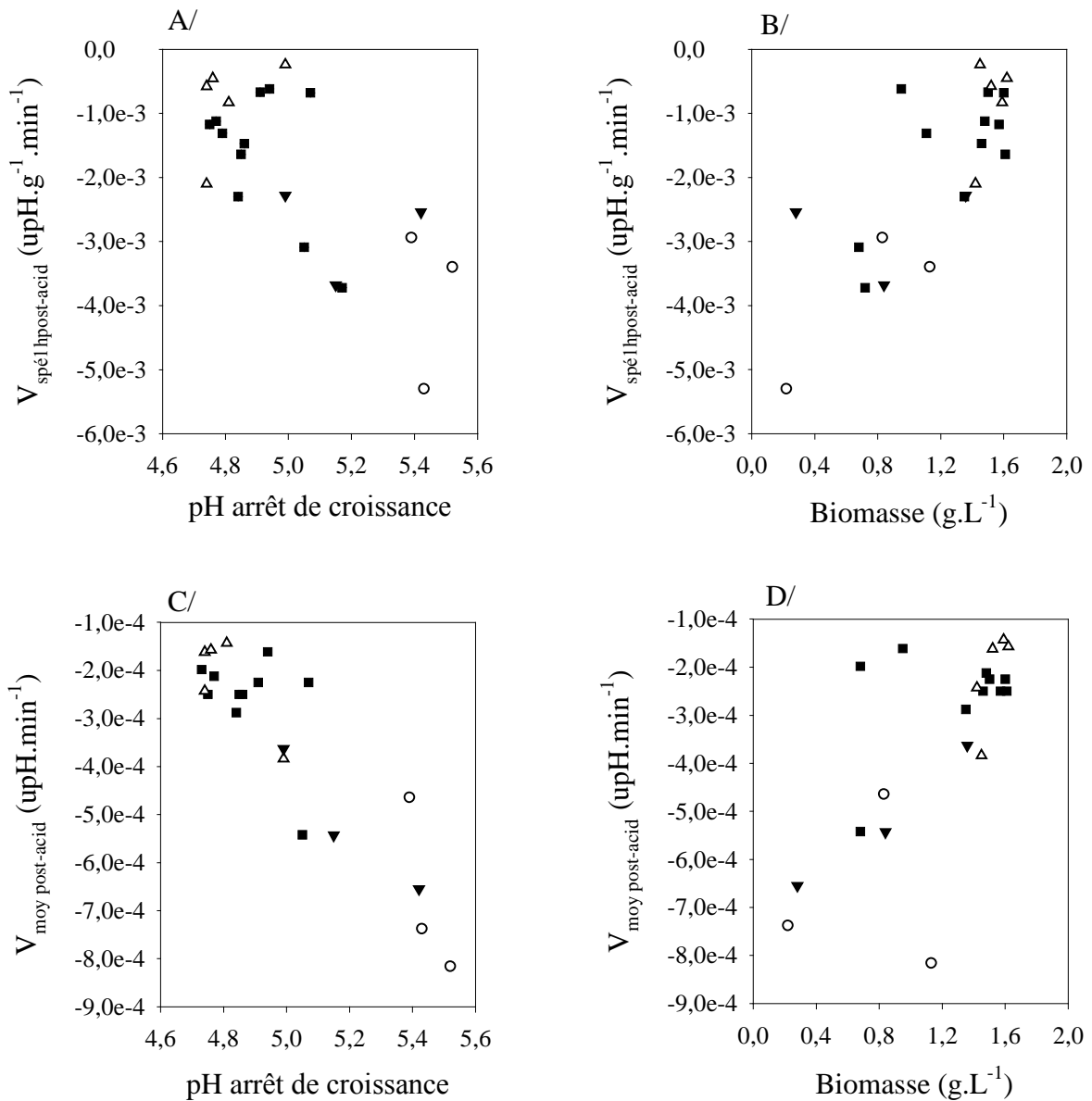


Figure V.5 : Evolution de la $V_{spé1h\ post-acid}$ ($upH.g^{-1}$ de cellules. min^{-1}) en fonction du pH à l'arrêt de croissance (A) et de la concentration en biomasse ($g.L^{-1}$) atteinte en fin de croissance (B), ainsi que de la $V_{moy\ post-acid}$ ($upH.min^{-1}$) en fonction du pH à l'arrêt de croissance (C) et de la concentration en biomasse ($g.L^{-1}$) en fin de croissance (D), pour les quatre souches étudiées (LD61, ■ ; LD71, △ ; LL39, ▼ ; LC30, ○).

Coefficients de corrélation (r) et p value (p) correspondant à chaque graphe : r_A : -0,73, p_A : 6.10^{-7} / r_B : 0,69, p_B : 5.10^{-6} / r_C : -0,9, p_C : 10^{-14} / r_D : 0,69, p_D : 10^{-5} .

4.4. Arrêt de la post-acidification et pH à 24 heures

L'arrêt de la post-acidification est un phénomène crucial puisqu'il détermine le pH final du produit. Il est donc particulièrement important de comprendre ce qui détermine ce phénomène. Les observations initiales en Cinac (données SOREDAB) montrent que les souches de type LD61, sans limitation nutritionnelle en lait, présentent une vitesse maximale d'acidification augmentée lorsque le lait écrémé est supplémenté en tryptone, alors que le pH atteint à 24 h reste plus élevé. L'hypothèse formulée pour expliquer cette relation apparente entre V_{\max} et le pH mesuré à 24 heures ($\text{pH}_{24\text{h}}$) postule qu'une vitesse d'acidification lente pourrait permettre une meilleure adaptation de la bactérie au stress acide, et conduirait ainsi à un pH final plus bas.

L'ensemble des données Cinac obtenues pour la souche LD61 dans différents milieux lait est compilé dans le Tableau V.3. Le phénomène décrit est observé initialement sur lait écrémé thermisé (prolait)/lait écrémé prolait + tryptone (données SOREDAB), et nos cultures ultérieures en lait thermisé confirment les valeurs des paramètres V_{\max} et $\text{pH}_{24\text{h}}$ obtenues dans ce milieu (Tableau V.3). Par contre, il n'existe plus de relation apparente entre V_{\max} et $\text{pH}_{24\text{h}}$ lorsque les cultures sont réalisées en lait G et lait G supplémenté. D'une part, ce lait non thermisé permet d'obtenir une acidification plus rapide que le lait prolait, mais aussi un pH final plus bas. D'autre part, les différentes suppléments réalisées augmentent bien la vitesse maximale d'acidification par rapport au lait G, mais les valeurs de pH à 24 h restent identiques.

Tableau V.3 : Vitesse maximale d'acidification (V_{\max} , $\text{upH}\cdot\text{min}^{-1}$) et $\text{pH}_{24\text{h}}$, obtenus en Cinac pour des cultures de la souche LD61 dans différents milieux « lait ». Données Cinac SOREDAB.

	Lait écrémé thermisé (prolait)	Lait prolait + tryptone	Lait G	Lait G + tryptone	Lait G + extrait de levure	Lait G + acides aminés	Lait G+ acides aminés + vitamines
V_{\max} ($\times 10^{-3}$)	-4,17/ -4/ -4,9	<u>-7,2</u>	-5,58/ -5,6/ -5,97/ -5,84	-8,86/ -8,74	-9,16/ -8,94	-7,96/ -8,14	-7,97/ -8,04
$\text{pH}_{24\text{h}}$	4,53/ 4,54/ <u>4,53</u>	<u>4,59</u>	4,39/ 4,39/ 4,36/ 4,37	4,37/ 4,37	4,36/ 4,32	4,3/ 4,41	4,39/ 4,4

Afin d'éprouver la reproductibilité de ce phénomène dans d'autres milieux, des cultures en M17 avec une acidification contrôlée ont été réalisées et les résultats comparés aux cultures à pH libre. La V_{\max} d'acidification ainsi imposée (-9 et $-8,6 \cdot 10^{-3}$ upH.min⁻¹) est bien inférieure à celle observée habituellement sur M17 ($-1,51 \pm 0,14 \cdot 10^{-2}$ upH.min⁻¹), mais les pH obtenus à 24 h sont supérieurs ($4,77 \pm 0,01$) à ceux des cultures à pH libre ($4,61 \pm 0,12$), invalidant l'hypothèse initiale. Le phénomène observé en lait thermisé/lait thermisé + tryptone n'est donc pas reproduit dans nos conditions, ni en lait G, ni en M17 à différentes V_{\max} d'acidification. Deux hypothèses peuvent être formulées à ce stade : (i) en lait écrémé prolait supplémenté ou non, les variations de pH à 24 h ne sont pas significativement différentes. Une analyse de reproductibilité des résultats avec la souche LD61 permettrait de répondre sur ce point ; (ii) ce phénomène est réel dans le lait thermisé, mais pas dans le lait G, et serait donc dépendant du milieu. Il serait alors intéressant de réaliser un inventaire en Cinac des différents types de milieux ou de laits, pour analyser la répartition de ce phénomène selon la composition du milieu de culture.

Pour analyser plus profondément une éventuelle relation entre la vitesse d'acidification et le pH à 24 h, le pH_{24h} a été confronté, soit à la concentration en biomasse atteinte en fin de croissance, qui traduit l'importance de la croissance, soit à la V_{\max} d'acidification mesurée pendant la phase de croissance (Fig. V.6). Les valeurs de pH_{24h} ont également été confrontées aux valeurs de pH et de [lactate] à l'arrêt de croissance, ainsi qu'aux vitesses de post-acidification, mais dans tous les cas aucune corrélation n'a pu être mise en évidence. Ces données de pH_{24h} peuvent être regroupées selon deux types de comportements : lorsque l'arrêt de croissance est lié à la concentration d'acide lactique non dissocié (LD61, et LD71 et LL39 en M17), le pH à 24 h est bas ; lorsque l'arrêt de croissance est lié à une limitation nutritionnelle (LD71 et LL39 en lait, LC30), le pH_{24h} est élevé, bien que les vitesses de post-acidification soient importantes (Fig. V.5). Ces deux catégories de valeurs sont significativement différentes l'une de l'autre (p-value = 0,03, confiance de 97 %). Ces deux catégories de données doivent être distinguées pour une analyse des paramètres qui déterminent le comportement.

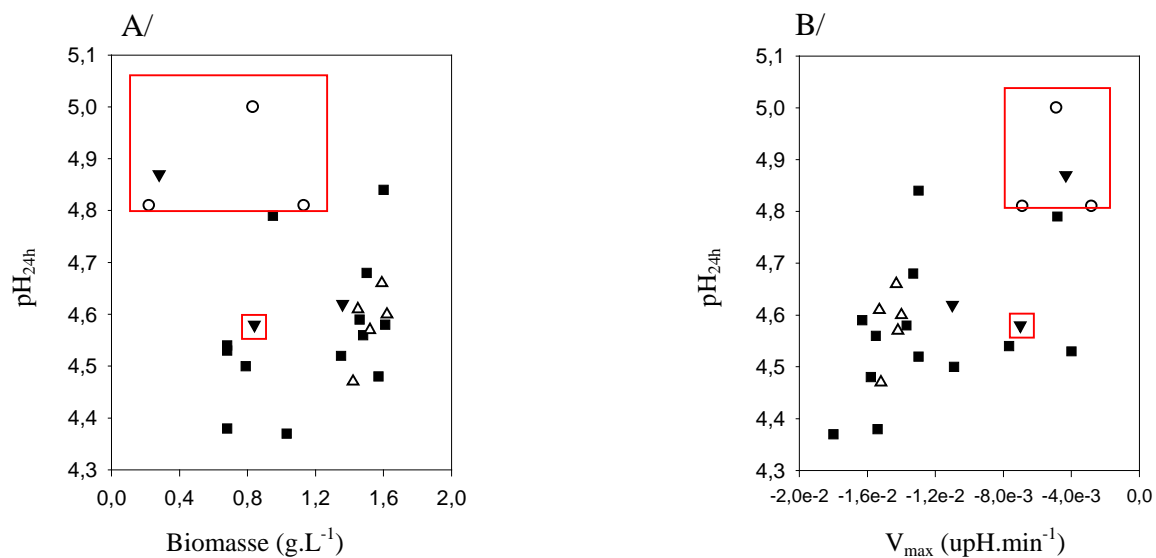


Figure V.6 : Evolution des pH à 24h de culture (pH_{24h}) en fonction de la concentration en biomasse (A) et de la vitesse maximale d'acidification (V_{max}, B) pour les quatre souches de *Lactococcus lactis* étudiées (LD61, ■ ; LD71, △ ; LL39, ▼ ; LC30, ○).

□ : cultures pour lesquelles l'arrêt de croissance est provoqué par des limitations de type nutritionnel.

4.4.1. Arrêt de croissance lié à la concentration d'acide lactique

En plus des valeurs de pH externe à 24 h, certaines cultures en M17 et en milieux synthétiques ont fait l'objet de mesures de gradient de pH et donc de pH interne à 24 h de culture.

Pour la souche LD61, les valeurs de pH externe atteintes à 24 h en M17 varient significativement (p-value = 0,02) de celles observées en milieux synthétiques, de même que les gradients de pH (p-value = 5.10^{-3}), tandis que les valeurs de pH interne correspondantes sont similaires (p-value = 0,80) (Tableau V.4). Des valeurs limites de pH différentes sont donc atteintes suivant le milieu, alors qu'une valeur de pH interne constante est atteinte à 24 h de culture, qui semble responsable de l'arrêt de la post-acidification.

La comparaison en M17 des souches LD61 et LD71 ne montre pas de différence significative pour le pH externe (p-value = 0,66) et le gradient de pH (p-value = 0,39), ni pour les valeurs de pH interne, malgré une incertitude plus importante (p-value = 0,09).

Le pH limite atteint par la souche LL39 est identique à celui des autres souches, tandis que le pH_{int} , même si une seule valeur est disponible, semble du même ordre de grandeur (Tableau V.4). Par conséquent, on peut proposer qu'une valeur limite de pH interne ($4,84 \pm 0,08$) est responsable de l'arrêt de la post-acidification pour ces trois souches, même si cette valeur ne peut probablement pas être considérée comme universelle, et peut certainement varier suivant le potentiel enzymatique des souches.

Une autre observation vient renforcer cette hypothèse ; en effet, la mesure de l'effet du pH sur les enzymes glycolytiques pour les trois souches LD61, LD71 et LL39, n'a pas permis de mettre en évidence de différences significatives d'inhibition de ces enzymes par la baisse de pH, ce qui confirme l'existence d'une valeur de pH interne limite inhibant totalement le flux glycolytique. Pour raisons méthodologiques, il manque malheureusement les données de pH interne en lait qui pourraient étayer cette conclusion.

4.4.2. Arrêt de croissance provoqué par une limitation nutritionnelle

La deuxième catégorie de comportement comprend les cultures pour lesquelles l'arrêt de croissance est provoqué par une limitation nutritionnelle. Dans ces cas-là, le pH externe atteint à 24 h est significativement plus élevé que pour l'autre catégorie de cultures (Fig V.6). Deux hypothèses peuvent expliquer ces valeurs, soit un gradient de pH très faible conduisant, malgré un pH externe plus élevé, à la valeur de pH interne limite, soit une post-acidification inachevée. Pour cette catégorie de comportement, les valeurs de gradient de pH ne sont malheureusement disponibles que pour la souche LC30 en M17, puisque ce paramètre ne peut pas être mesuré en lait. Dans ce cas, la valeur de ΔpH est d'environ 0,3 upH, un pH externe de 4,9 étant associé à un pH interne à 24 h de 5,21, valeur de pH interne à 24 h bien supérieure à la valeur considérée comme limite pour les autres souches (Tableau V.4). La valeur de ΔpH mesurée pour cette souche est du même ordre de grandeur que celle observée pour les trois autres souches, et donc les souches appartenant aux deux catégories de comportement précédemment établies ne diffèrent pas vis à vis de ce paramètre. Enfin, la souche LC30 ne présente aucune différence significative de sensibilité des enzymes glycolytiques au pH, qui aurait pu expliquer un pH interne limite plus élevé, et dans ce cas-là, l'hypothèse d'une post-acidification inachevée semble plus plausible. Récemment, de nouvelles cultures ont été réalisées afin de vérifier cette hypothèse. Malgré un manque de reproductibilité au niveau des profils fermentaires, souvent observé chez les bactéries lactiques, la valeur de pH minimal atteinte pour la souche LC30 en milieu M17 à pH libre est

de $4,67 \pm 0,12$ upH, ce qui est significativement inférieur aux valeurs obtenues pour cette souche à 24 heures de culture, et comparable aux valeurs minimales de pH obtenues pour les souches LD61, LD71 et LL39. Il semble donc que l'hypothèse soit correcte, et qu'à 24 heures de culture, la phase de post-acidification ne soit pas terminée pour la souche LC30.

Tableau V.4 : Valeurs de pH externe, Δ pH et pH interne mesurées en fin de cultures (24 h) pour les quatre souches LD61, LD71, LL39 et LC30, au cours de cultures en M17, ou pour la souche LD61 en milieux synthétiques (MCD, MS10rb et MS10r).

Milieu	Souche	pH	Δ pH	pH _{int}
M17	LD61	$4,59 \pm 0,13$	$0,26 \pm 0,02$	$4,8 \pm 0,04$
	LD71	$4,58 \pm 0,07$	$0,29 \pm 0,05$	$4,91 \pm 0,07$
	LL39	4,62	0,35	4,97
	LC30	$4,9 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,05$	$5,21 \pm 0,18$
MCD		4,37	0,35	4,72
MS10rb	LD61	4,5	0,36	4,86
MS10r		4,38	0,4	4,78

En conclusion, l'éventuelle relation entre V_{\max} et pH à 24 heures issue des résultats en Cinac n'est observée qu'en lait thermisé (et serait donc à valider statistiquement, et à comparer à différents laits) ; des cultures de la souche LD61 en M17 à différentes V_{\max} d'acidification indiquent clairement l'absence de corrélation entre cette vitesse maximale et la valeur du pH à 24 h; le pH atteint à 24 h de culture est conditionné par la catégorie des souches : celles sujettes à inhibition par l'acide lactique (c'est-à-dire celles sans problème de croissance) atteignent un pH_{24h} plus bas que celles qui présentent une limitation nutritionnelle ; pour les souches atteignant un bas pH_{24h}, le pH interne n'est pas significativement différent, et une valeur limite moyenne de 4,84 peut être proposée ; les quatre souches testées ne présentent aucune différence significative d'inhibition des enzymes glycolytiques par le pH ; les souches limitées nutritionnellement, pour lesquelles le pH_{24h} est encore élevé, ont un pH interne également plus élevé que pour l'autre catégorie de souches (et un Δ pH similaire). On peut donc proposer que dans ce cas, les valeurs de pH externe et interne sont élevées car la post-acidification n'est probablement pas arrivée à son terme, et on peut supposer que le véritable pH interne final sera du même ordre de grandeur que celui de l'autre catégorie de souches.

5. Conclusion

L'analyse physiologique globale, réalisée pour les quatre souches de *L. lactis* d'origine fromagère fournies par SOREDAB, a permis de répondre aux interrogations posées au début de l'étude, mais également de déterminer les régulations métaboliques mises en place au cours de cultures en milieu complexe. L'étude comparative de deux souches cinétiquement différentes, LD61 et LC30, en milieu M17, a permis de mettre en évidence le rôle de la GAPDH et de la PK dans le contrôle du flux glycolytique en phase de croissance. Il est également apparu que pour la souche LD61, au cours de la phase de post-acidification, la PFK, ainsi que la PGK impliquée dans le métabolisme des trioses, sont responsables de l'arrêt du flux glycolytique.

L'étude de ces souches en lait écrémé, supplémenté ou non en sources d'azote facilement métabolisables (acides aminés libres, peptone...), a permis de souligner l'importance de la nutrition azotée dans la croissance et l'acidification des souches de *L. lactis*, et a également permis de distinguer deux phénotypes au sein des quatre souches. En effet, la souche LD61 possède vraisemblablement le plasmide codant pour la protéase de paroi PrtM, alors que celui-ci est absent de la souche LD71 et probablement également des souches LC30 et LL39 qui présentent le même phénotype.

L'étude de l'énergétique cellulaire a permis de déterminer que l'inhibition de la croissance au cours de la culture de la souche LD61 en lait G à pH régulé est provoquée par une limitation énergétique liée à la carence en substrat carboné. Par contre, pour toutes les autres cultures, que ce soit à pH libre ou avec ralentissement de l'acidification, un découplage entre anabolisme et catabolisme est observé. La croissance s'arrête indépendamment du catabolisme alors que la glycolyse et donc la production d'énergie sont maintenues.

La présence d'oxygène, qui est l'un des stress rencontrés au cours des cultures en Cinac, n'a qu'un effet limité sur la croissance et la qualité des produits synthétisés. La métabolisation du citrate présent dans le lait n'est réalisée que pour les deux souches appartenant au biovar *diacetylactis*, LD61 et LD71. D'après leurs profils plasmidiques, ces deux souches possèdent le plasmide codant pour les enzymes impliquées dans ce métabolisme. La consommation du citrate est très rapide et s'effectue parallèlement à celle du lactose, dès le début de la culture, et ne semble donc pas liée à une réponse au stress acide pour ces deux souches.

Cette étude comparative a permis de mettre en évidence le lien étroit entre la croissance et l'acidification chez *Lactococcus lactis* (Fig.V.7). Il s'avère en effet qu'en phase de croissance, les capacités glycolytiques, comparables pour les 4 souches testées, ne sont pas responsables des différences observées au niveau des vitesses maximales d'acidification. Cette hétérogénéité de comportement est donc directement liée à la croissance, elle-même différente selon les souches et leur patrimoine génétique, en particulier plasmidique, mais également selon les milieux et la disponibilité en nutriments azotés complexes, vitamines, bases... Ainsi, lorsque l'arrêt de croissance a lieu à des pH élevés, et plus précisément à de faibles [AcLact], il est possible d'affirmer qu'il est provoqué par une ou des limitations nutritionnelles.

Dans tous les cas, pour les 4 souches, l'arrêt de croissance est suivi d'une phase de post-acidification. La baisse de pH durant cette phase particulière est plus rapide lorsque l'arrêt de croissance, « précoce », est provoqué par une limitation anabolique et indépendant du pH. En effet, dans ces conditions, les pH externe et interne ont des valeurs plus élevés, permettant aux enzymes glycolytiques, elles-mêmes très sensibles au pH, de maintenir une activité également plus importante. L'arrêt de la post-acidification est lié à la baisse du pH interne, qui lorsqu'il atteint une valeur limite de 4,84, valeur comparable pour 3 des souches utilisées (LD61, LD71, LL39), inhibe totalement l'activité des enzymes glycolytiques. Ainsi, les pH externes mesurés pour ces 3 souches à 24h ne sont pas considérés comme significativement différents. La souche LC30 montre quant à elle des pH 24h (externe et interne) significativement supérieurs qui sont le fait d'une post-acidification semble-t-il inachevée à ce moment là. Il est intéressant de noter que pour toutes ces souches, tant au niveau du flux glycolytique maximal qu'à celui des enzymes et de leur sensibilité au pH, aucune différence significative ne semble exister.

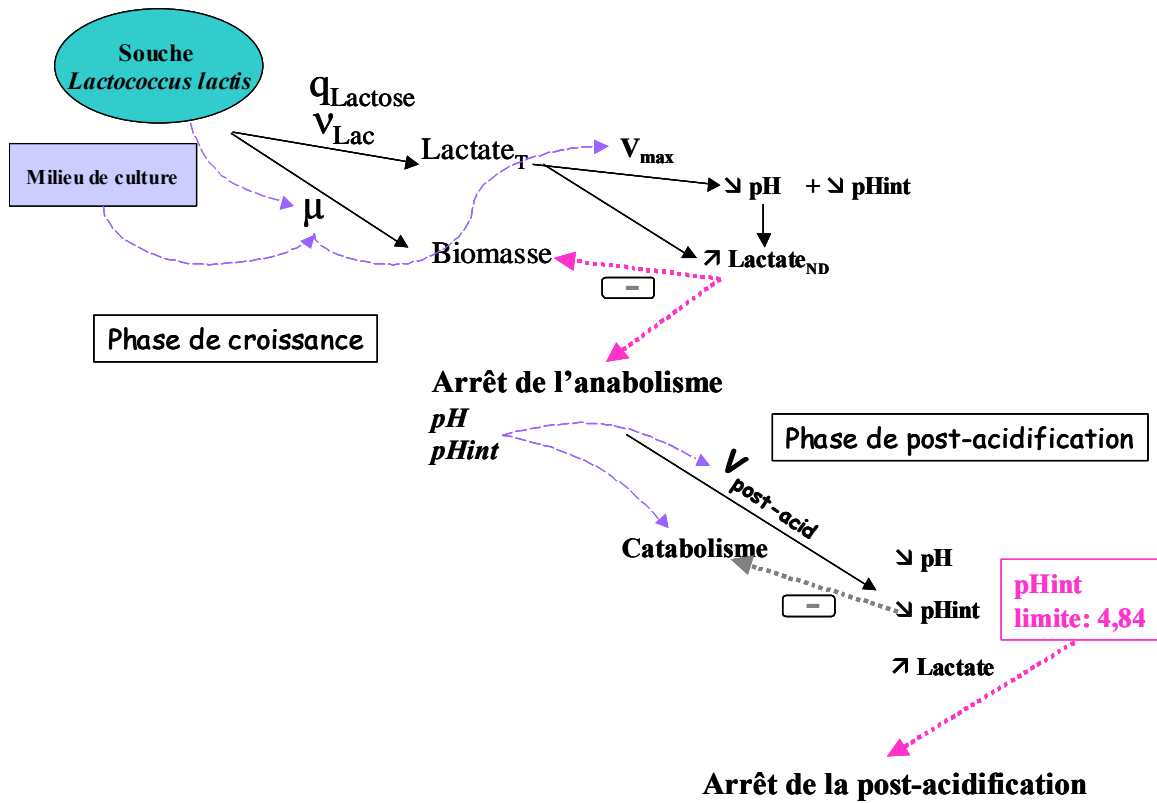


Figure V.7 : Régulation de l'acidification chez *Lactococcus lactis* dans des conditions de culture nutritionnellement non limitantes.

Chapitre VI : Analyse métabolique et transcriptionnelle de *L. lactis* LD61 en condition de stress cumulés

Les bactéries lactiques sont employées dans de nombreux procédés de transformation agro-alimentaires et plus particulièrement dans la fabrication fromagère, au cours desquels elles vont subir différents stress. Les lactocoques produisent de l'acide lactique à partir du lactose présent dans le lait. Bien qu'ayant un effet inhibiteur sur leur propre croissance, cette production d'acide a un double intérêt puisqu'elle va permettre à la fois la coagulation du lait mais également l'inhibition de la croissance de bactéries indésirables, comme les pathogènes par exemple. Outre le stress acide, *Lactococcus lactis* va subir d'autres stress environnementaux ; le stress froid est particulièrement important puisque certains procédés comportent des étapes de refroidissement (affinage des fromages) et que la conservation des produits est généralement réalisée à basse température. L'adaptation des lactocoques vis à vis du milieu de culture et des différents stress, va être responsable des caractéristiques texturales et organoleptiques du produit fini. L'étude de la souche industrielle de *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* LD61 a été réalisée dans des conditions comparables à celles d'un procédé fromager (fromage pâte molle), c'est à dire à pH libre avec une cinétique de refroidissement (de 34 à 12°C en 10 h à partir de pH 5,2), reprenant ainsi les deux stress majeurs. Il s'agit d'une étude originale car aucune étude complète de ce type n'a encore été réalisée dans un milieu complexe et d'intérêt comme le lait. Elle va permettre d'avoir accès aux régulations métaboliques, aux effets des différents stress et aux mécanismes de défense mis en place dans ces conditions particulières.

1. Cinétique de fermentation

La culture de la souche LD61 est réalisée dans des conditions mimant un procédé fromager : lait G, pH libre, anaérobiose et transfert de température. Au cours de la fermentation, des suivis macro- et micro-cinétiques sont réalisés. La figure VI.1 reprend l'évolution de la biomasse, des substrats et produits de fermentation, de la température et du pH externe en fonction du temps.

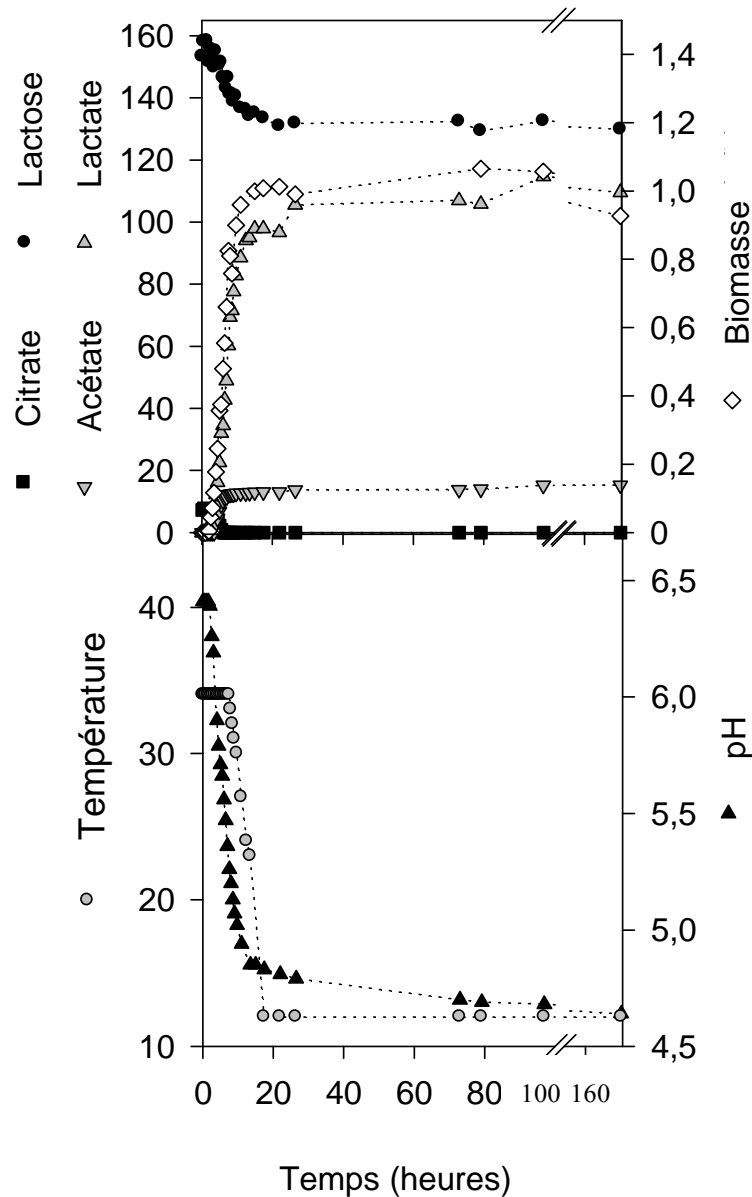


Figure VI.1: Evolution des concentrations des substrats et produits de fermentation (en mM), de la biomasse (en g.L⁻¹) et du pH externe au cours d'une culture de la souche *L. lactis* LD61 sur lait G à pH libre et avec transferts de température, pendant 180 heures de culture.

La fermentation a été suivie pendant 580 heures (24 jours) pour atteindre la valeur de pH la plus basse observée dans ces conditions de culture, et caractériser la totalité de la phase de post-acidification. Sur la figure VI.1 sont reportées les données obtenues pendant les 180 premières heures de culture puisque aucune évolution n'est observée par la suite.

La cinétique de croissance peut être divisée en deux phases, la phase de croissance et la phase stationnaire au cours de laquelle une post-acidification est observée. Au cours de la phase de croissance, de 0 à 11 h de culture, la température maintenue à une valeur de 34°C jusqu'à 8 h, diminue lentement par la suite et atteint 27°C à 11 h. Aucune phase exponentielle n'est observée puisque le taux de croissance diminue dès le début de la culture, avec une valeur maximale de 0,95 h⁻¹ à 3 h (Fig. VI.2). La biomasse initiale étant très faible (environ 0,003 g.L⁻¹), aucune valeur de vitesse spécifique n'est calculée avant 3 h de culture du fait de l'incertitude sur cette mesure. L'accroissement de la biomasse est associé à la consommation simultanée de lactose et de citrate. Les 7,8 mM de citrate présents dans le milieu sont épuisés en six heures de culture. Le lait est acidifié au cours de cette phase, le pH diminuant de 6,41 (valeur en début de culture) à 4,94 à 11 h, et ceci du fait de la production concomitante de lactate et d'acétate.

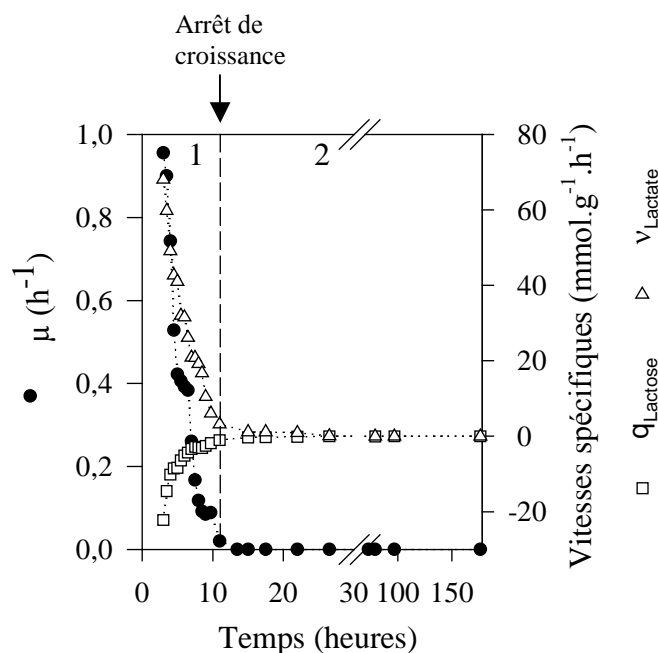


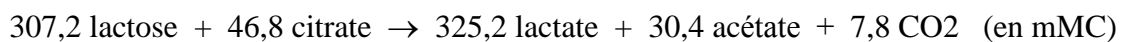
Figure VI.2: Evolution du taux de croissance (μ) et des vitesses spécifiques de consommation du lactose (q_{Lactose}) et de production du lactate (v_{Lactate}) pendant les 180 premières heures d'une culture de la souche *L. lactis* LD61 sur lait G à pH libre et avec transferts de température.

Légende : 1 : phase de croissance, 2 : phase de post-acidification.

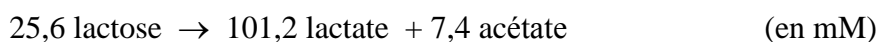
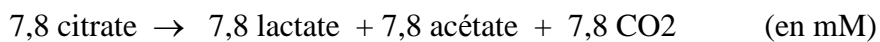
L'arrêt de croissance, à 11 h de culture, intervient alors que la température est de 27°C, que le pH du milieu est de 4,94, et pour une concentration maximale de biomasse de 1,02 g.L⁻¹. La totalité du citrate ainsi que 18,5 mM de lactose ont été consommés, permettant la production de 88,5 mM de lactate et 12,7 mM d'acétate. Le rendement en biomasse calculé à l'arrêt de croissance est de 55,1 g.mol⁻¹ de lactose.

La baisse de température se poursuit également après l'arrêt de la croissance puisque ce n'est qu'à 17,5 h de culture que la température finale de 12°C est atteinte. Au cours de la phase stationnaire, bien que la croissance soit arrêtée, l'acidification du milieu continue et se traduit par une diminution de 0,3 unités pH entre 11 h et 17,5 h de culture. Cette post-acidification est liée à la consommation de 7,1 mM de lactose et à la production de 19,9 mM de lactate et de 2,5 mM d'acétate.

La stoechiométrie globale observée durant cette culture est la suivante :



Elle peut être décomposée en consommation théorique de citrate à l'origine de lactate, acétate et CO₂ en concentration équimolaire, et consommation de lactose, selon les 2 équations ci-dessous :



Le rendement global en lactate par rapport au lactose consommé est de 3,95, valeur tout à fait cohérente avec la stoechiométrie d'un métabolisme homolactique sur substrat lactose (rendement théorique de 4). Le bilan carboné catabolique global est de 102,6 %. Ce calcul néglige d'une part la consommation d'autres substrats que les sources de carbone (lactose et citrate), comme les peptides ou acides aminés, d'autre part la biomasse formée et éventuellement des sous-produits du métabolisme, mais on peut considérer qu'il est globalement équilibré, et donc que les substrats et produits de fermentation importants ont été pris en compte, ou en d'autres termes qu'il n'y a pas de co-produits quantitativement importants qui ne soient pas pris en compte.

Les vitesses spécifiques de consommation de lactose (q_{Lactose}) et de production du lactate (v_{Lactate}) ont été calculées tout au long de la culture, et leur évolution en fonction du temps est présentée figure VI.2. Tout comme le taux de croissance, ces vitesses diminuent pendant toute la fermentation. Alors qu'elles sont maximales à 3 h de culture (20 mmol.g.h^{-1} pour le q_{Lactose} et 68 mmol.g.h^{-1} pour le v_{Lactate}), les valeurs obtenues à l'arrêt de croissance ne sont plus que de 1 et $3,2 \text{ mmol.g.h}^{-1}$ respectivement, et elles deviennent nulles à 176,5 h de culture. Une vitesse spécifique d'acidification a également été calculée au cours de la fermentation, d'après l'évolution du pH en cours de culture, et son évolution est similaire à celle des autres vitesses (Fig. VI.3). En effet, une vitesse maximale de $-3,5 \text{ upH.g.h}^{-1}$ est obtenue à 3 h de culture puis elle diminue fortement puisqu'elle est environ 100 fois moins importante à l'arrêt de croissance ($-0,04 \text{ upH.g.h}^{-1}$). Même si l'acidification se poursuit en phase stationnaire, les vitesses d'acidification y sont très faibles et tendent à s'annuler vers 176,5 h.

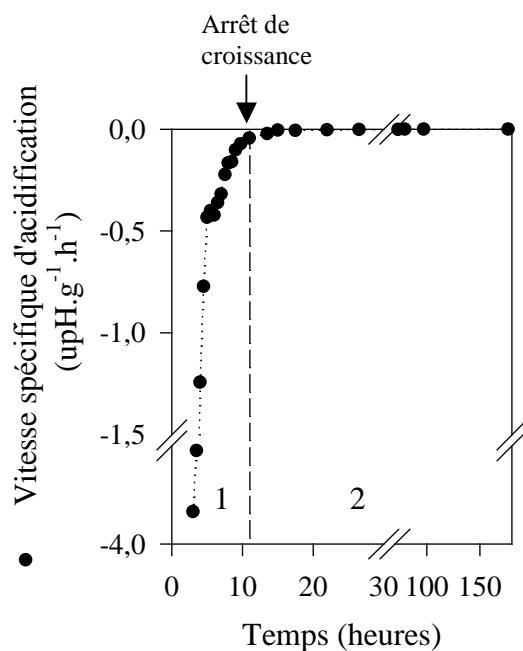


Figure VI.3: Evolution de la vitesse spécifique d'acidification pendant les 180 premières heures d'une culture de la souche *L. lactis* LD61 sur lait G à pH libre et avec transferts de température.

Légende : 1 : phase de croissance, 2 : phase de post-acidification.

2. Activités enzymatiques

2.1. Activités maximales

Les activités des enzymes de la glycolyse et de la lactate déshydrogénase ont été mesurées tout le long de la culture. Trois échantillons ont été prélevés en phase de croissance (3,5, 5,5 et 7,5 heures), un au moment de l'arrêt de croissance à 11 h de culture, et enfin trois autres au cours de la phase de post-acidification (26,5, 97 et 176,5 heures). Les profils observés pour les différentes enzymes (Tableau VI.1) permettent de les classer en trois grands groupes. Le premier groupe est constitué de deux enzymes, glucokinase (GLK) et lactate déshydrogénase (LDH), dont l'activité est constante pendant la phase de croissance puis diminue dès l'arrêt de croissance pour la glucokinase, ou pendant la phase de post-acidification pour la LDH. Les cinq enzymes composant le second groupe, glucose-6-phosphate isomérase (PGI), phosphofructokinase (PFK), triose-phosphate isomérase (TPI), phosphoglycérate kinase (PGK) et pyruvate kinase (PK), présentent une activité spécifique à peu près constante tout au long de la culture avec une chute à 176,5 h. Les enzymes du troisième groupe ont quant à elles une activité qui augmente soit en phase de croissance pour la glycéraldéhyde-3 phosphate déshydrogénase (GAPDH), soit en début de post-acidification pour la fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA), la phosphoglycérate mutase (PMG), l'énolase (ENO) et l'ATPase, puis qui diminue par la suite.

Cependant les activités spécifiques mesurées correspondent aux activités maximales *in vitro* pour chaque enzyme au niveau des divers prélèvements. Ainsi est-il nécessaire d'effectuer une correction pour chaque enzyme par l'effet du pH intracellulaire et de la température auxquels sont soumises les cellules aux différents moments de la culture. Grâce à cette correction il est alors possible d'évaluer les activités spécifiques réelles *in vivo*, et en comparant ces activités au flux glycolytique ponctuel, de déterminer les enzymes limitant potentiellement ce dernier. Cependant, pour effectuer cette correction, il est indispensable d'avoir quantifié l'effet du pH (*cf.* § IV) et de la température sur chaque enzyme.

Tableau VI.1 : Activités spécifiques maximales des enzymes de la glycolyse et de la lactate déshydrogénase (mmol.g de biomasse. h^{-1}), ainsi que de l'ATPase membranaire ($\text{U} : \mu\text{mol Pi.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines) au cours de la culture de la souche LD61 sur lait G, en anaérobiose, à pH libre avec transfert de température.

Phase Temps (h)	Croissance			Arrêt	Post-acidification		
	3,5	5,5	7,5	11	26,5	97	176,5
GLK	3,7 ± 0,1	5,7 ± 0,5	4,1 ± 0,03	0,4 ± 0,06	0,4 ± 0,09	0,2 ± 0,02	2,3 ± 0,01
PGI	67,1 ± 1,7	101,2 ± 17	76,5 ± 12,3	50,6 ± 21	80,5 ± 4,7	76,2 ± 7	37,3 ± 10,3
PFK	21,7 ± 1	26,9 ± 5,9	26,2 ± 0,5	21,3 ± 5,2	23,2 ± 3,2	17,6 ± 2,3	9,8 ± 2,1
FBA	57,1 ± 1,9	93,1 ± 13,8	80,8 ± 14,8	79,2 ± 26,8	149,6 ± 22,4	117,9 ± 12,3	68,8 ± 5,1
TPI	1469,3 ± 273	1186 ± 183,2	1359,2 ± 107,4	1456,1 ± 531,8	1652,8 ± 282,6	1712 ± 368	779,9 ± 136,5
GAPDH	37,4 ± 13,4	52,1 ± 15,1	79,5 ± 2,5	30,5 ± 18,8	40,2 ± 16,5	10,2 ± 2,5	26,9 ± 2,1
PGK	48,2 ± 10,2	38,8 ± 6,9	32,5 ± 21	61,7 ± 7,8	49,3 ± 14,4	65,2 ± 2,2	33,1 ± 2,6
PMG	136,9 ± 5,4	181,8 ± 41,4	132,9 ± 8,2	104,3 ± 39,6	205,5 ± 47,4	137,5 ± 10,8	88,2 ± 7,1
ENO	73,3 ± 26,8	97,4 ± 13	102,7 ± 11,1	149,8 ± 77,4	240,2 ± 95,3	125,5 ± 8,4	63,7 ± 7,8
PK	42 ± 0,1	55,6 ± 19,5	67,4 ± 24,2	31,1 ± 21,9	52,6 ± 19,7	33,8 ± 8,5	12,9 ± 1,4
LDH	91,9 ± 9,7	93 ± 27,3	87,9 ± 5,4	79,6 ± 5,6	45,1 ± 14,2	62,3 ± 2,8	25,4 ± 8
ATPase	0,5	0,48	0,42	0,8	non dosé	1,83	0,5

Abréviations : GLK : glucokinase, PGI : phosphoglucose isomérase, PFK : phosphofruktokinase, FBA : fructose-1,6-bisphosphate aldolase, TPI : triose-phosphate isomérase, GAPDH : glyceraldéhyde-3 phosphate déshydrogénase, PGK : 3-phosphoglycérate kinase, PMG : phosphoglycérate mutase, ENO : phosphopyruvate hydratase, PK : pyruvate kinase, LDH : lactate déshydrogénase.

2.2. Effet de la température sur l'activité des enzymes

Comme l'effet du pH, l'effet de la température a été évalué sur les différentes enzymes de la glycolyse ainsi que sur la lactate déshydrogénase. Trois températures ont été retenues car elles couvrent l'amplitude de la baisse de température réalisée au cours de la culture en lait G à pH libre, soit 34, 20 et 12°C. Pour chaque dosage enzymatique, la non sensibilité des enzymes de couplage et des cofacteurs à la basse température (12°C) a été vérifiée. Ainsi, seul le dosage de la PGK a été modifié en doublant la quantité de GAPDH utilisée pour la réaction. Il s'avère que les dix enzymes glycolytiques et la LDH répondent à la baisse de température selon essentiellement trois profils (Fig. VI.4).

Certaines enzymes comme la PGI, la PFK, la FBA, la PMG et l'ENO sont plus sensibles à la baisse de température entre 34 et 20°C qu'entre 20 et 12°C (Fig. VI.4). En moyenne selon les enzymes, entre 80 et 55 % de l'activité maximale sont perdus à 20°C (de 5,7 à 3,9 % de perte d'activité par degré centigrade), alors qu'entre 20 et 12°C on assiste soit à une stabilisation (PFK, PMG), soit à une baisse d'activité mais beaucoup plus lente qu'entre 34 et 20°C, d'environ 1,25 à 2,5 % par unité de température.

Contrairement à ce profil, des enzymes comme la GLK, la TPI, la GAPDH, la PGK et la PK présentent, elles, une plus grande sensibilité à la baisse de température entre 20 et 12°C. Ces 5 enzymes ont des profils de sensibilité au refroidissement comparables (Fig. VI.4) avec une perte d'activité de seulement 1,4 à 2,5 % par degré Celsius entre 34 et 20°C, alors qu'elle est d'environ 3,7 à 7,5 % lors du passage de 20 à 12°C. A basse température, les activités résiduelles représentent encore de 33 à 44 % des activités maximales pour la GLK, la TPI, la GAPDH et la PK, alors que cette valeur n'est plus que de 4 % pour la PGK qui semble donc l'enzyme la plus touchée par le refroidissement.

La LDH est l'enzyme la plus résistante à la baisse de température. Elle présente un profil d'activité en fonction de la température plutôt linéaire (Fig. VI.4), avec un pourcentage d'activité résiduelle de 63 % environ à 12°C.

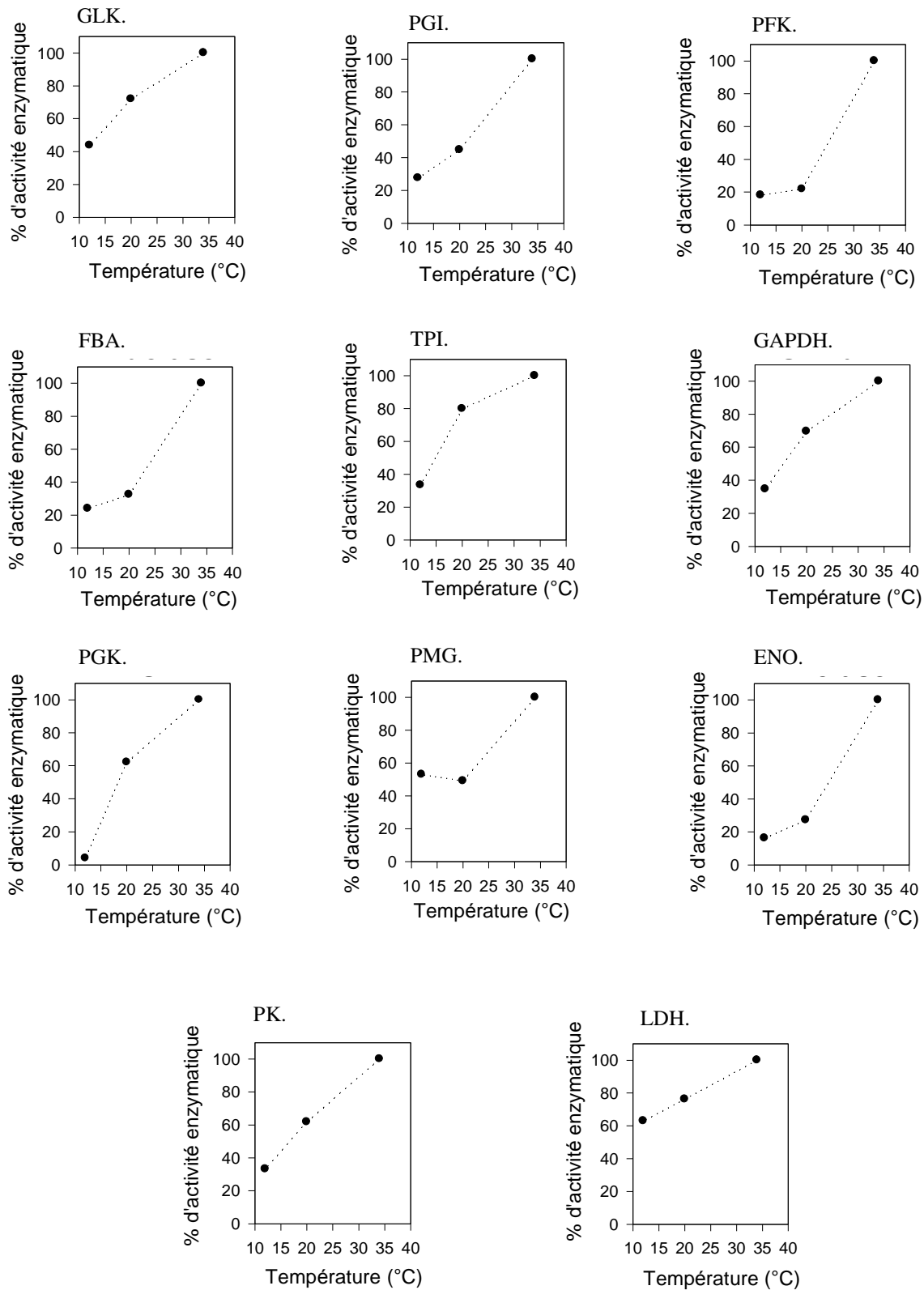


Figure VI.4 : Effet de la température, en pourcentage d'activité résiduelle, sur les enzymes de la glycolyse et la lactate déshydrogénase.

2.3. Activités corrigées et étapes limitantes du flux glycolytique

Les activités spécifiques corrigées par l'effet du pH intracellulaire et de la température sont comparées au flux pris en charge par chaque enzyme (Tableau VI.2), calculé à partir de la vitesse spécifique de consommation du lactose (q_{Lactose}). A 176,5 h, le flux étant nul (q_{Lactose} et v_{Lactate}), les rapports activité/flux n'ont pas pu être calculés. Pour des raisons méthodologiques, les données de pH interne (pH_{int}) ne sont pas disponibles pour les cultures en lait, et deux valeurs de pH_{int} « extrêmes » ont donc été extrapolées, soit à partir de cultures en MCD à pH libre, soit à partir d'une culture en milieu M17 avec une acidification contrôlée et ralentie. L'avantage de la première culture est qu'elle a été réalisée à pH libre, dans les mêmes conditions que cette culture en lait. Cependant, il s'agit d'un milieu synthétique moins tamponné que le lait, pour lequel le pH externe diminue très vite alors que le ΔpH garde une valeur élevée jusqu'en fin de culture. En M17 par contre, la vitesse d'acidification est plus lente, comparable à celle observée en lait, et dans ces conditions le ΔpH diminue rapidement. Cependant les conditions de culture sont particulières puisque le pouvoir tampon du milieu est constamment modifié par l'ajout de base afin de contrôler la baisse du pH. Il est difficile de dire de quel comportement la culture en lait sera la plus proche, et c'est la raison pour laquelle les deux valeurs d'activités corrigées obtenues avec les deux pH_{int} sont présentées pour chaque temps.

Les deux valeurs de pH_{int} calculées à partir des cultures en M17 et MCD diminuent au cours de la culture, cependant le « pH_{int} M17 » s'avère toujours le plus bas. Bien que les pH_{int} soient proches à 3,5 h (6,61 et 6,7), un écart plus important, de 0,4 upH en moyenne, est observé en phase de post-acidification. Pour chaque enzyme les deux valeurs de rapports activité/flux calculées pour chaque temps de culture avec les deux estimations de pH_{int} présentent la même évolution au cours du temps. Le « pH_{int} M17 » étant le plus bas, les valeurs d'activités enzymatiques et les valeurs d'activités/flux calculées sont logiquement inférieures à celles calculées avec le « pH_{int} MCD ».

Tableau VI.2 : Rapports des activités maximales des enzymes de la glycolyse et de la lactate déshydrogénase, corrigées par l'effet du pH et de la température, divisées par les flux qu'elles assurent *in vivo* (sans unité) au cours d'une culture de la souche LD61 sur lait G, en anaérobiose, à pH libre avec transfert de température. Pour chaque enzyme, les deux valeurs correspondent aux deux valeurs de pH_{int} considérées.

Phase	Croissance			Arrêt	Post-acidification	
	3,5	5,5	7,5	11	26,5	97
Temps (h)						
Température (°C)	34	34	34	27	12	12
pH_{int} extrapolés	M17 acidification contrôlée / MCD					
	6,61 / 6,7	6,17 / 6,33	5,67 / 5,9	5,22 / 5,57	5 / 5,41	4,9 / 5,3
$q_{Lactose}$ (mmol.g ⁻¹ .h ⁻¹)	14,5	6,4	2,8	1,02	0,02	0,01
GLK	0,3 / 0,3	0,7 / 0,8	1 / 1,1	0,2 / 0,2	4,8 / 5,7	4,6 / 5,4
PGI	4,9 / 5,3	9,5 / 12	6,8 / 14	1,1 / 6,4	11 / 124	21 / 117
PFK	1,7 / 1,7	2,9 / 3,6	3 / 5,5	1,6 / 4	10 / 42	3,2 / 46
FBA	3,7 / 4,1	8 / 9,9	7,2 / 13	5,6 / 10	261 / 741	113 / 368
TPI	61,4 / 61,4	69 / 87	107 / 148	169 / 253	2727 / 4636	4520 / 8051
GAPDH	0,4 / 0,5	0,5 / 1,1	0,2 / 0,5	0,1 / 0,1	3,4 / 3,4	0,9 / 1,7
PGK	0,7 / 0,8	0,6 / 0,8	0,4 / 0,8	0,5 / 1,2	0,2 / 1,7	0,7 / 3,3
PMG	3,4 / 3,4	8,3 / 8,4	11 / 13	12 / 17	449 / 1105	275 / 1203
ENO	1,1 / 1,2	1,6 / 2,2	1,5 / 2,8	1 / 2,5	9,6 / 43	5 / 30
PK	1 / 1,1	2,1 / 2,3	4,1 / 5,5	2,7 / 3,8	64,6 / 119	48 / 130
LDH	1,8 / 1,9	3,4 / 3,5	7,1 / 7,2	15 / 15	302 / 313	815 / 854

Abréviations : $q_{Lactose}$: vitesse spécifique de consommation du lactose, pH_{int} : pH intracellulaire extrapolé des données obtenues en M17 avec contrôle de l'acidification ou en MCD, GLK : glucokinase, PGI : phosphoglucose isomérase, PFK : phosphofruktokinase, FBA : fructose-1,6-bisphosphate aldolase, TPI : triose-phosphate isomérase, GAPDH : glycéraldéhyde-3 phosphate déshydrogénase, PGK : 3-phosphoglycérate kinase, PMG : phosphoglycérate mutase, ENO : phosphopyruvate hydratase, PK : pyruvate kinase, LDH : lactate déshydrogénase.

En début de phase de croissance, à 3,5 h, seule la TPI est en très large excès par rapport au flux (rapport de 61,4). Toutes les autres enzymes présentent des valeurs de rapport activités/flux plus faibles, comprises entre 0,3 et 5,3, les valeurs les plus faibles étant observées pour la GLK, la GAPDH, la PGK, l'ENO et la PK. En général, les rapports activités enzymatiques corrigées/flux augmentent fortement au cours de l'avancement de la fermentation. Deux enzymes ont un comportement particulier, en effet la GAPDH et la PGK présentent des activités toujours proches du flux et leurs rapports activités/flux évoluent peu au cours de la culture (de 0,1 à 3,4 pour la GAPDH et de 0,2 à 3,3 pour la PGK). La majorité des enzymes présente des rapports très élevés en post-acidification, excepté la GLK, la PFK et l'ENO dont les rapports activités/flux sont intermédiaires entre ces fortes valeurs (de 21 à 8051 à 97 h) et celles des enzymes GAPDH et PGK (ratios de 0,7 à 3,3 à 97 h).

3. Analyse transcriptionnelle

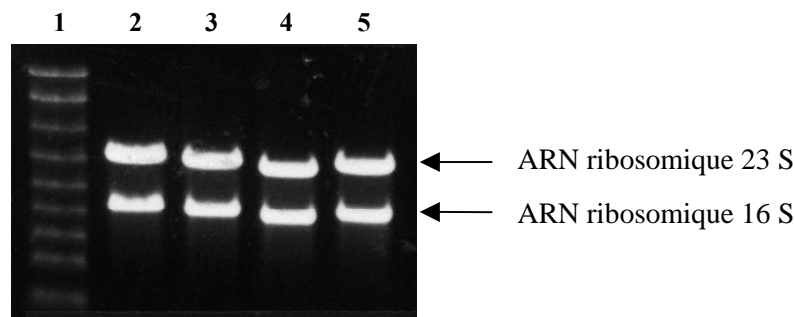
Quatre prélèvements sont retenus pour l'étude transcriptionnelle, deux en phase de croissance et deux en phase stationnaire. Le premier prélèvement effectué en début de phase de croissance, à 6 h de culture (0,45 g.L⁻¹ de biomasse, pH 5,56, 34°C) sert de référence, le second prélèvement est réalisé en fin de phase de croissance, à 8,5 h de culture (0,81 g.L⁻¹ de biomasse, pH 5,13), alors que la température est de 32°C. Les deux autres prélèvements sont effectués soit en début de phase stationnaire, à 15 h (1 g.L⁻¹ de biomasse ; pH 4,85 ; 17°C), soit en fin de phase stationnaire à 176 h de culture (0,93 g.L⁻¹ de biomasse ; pH 4,64 ; 12°C).

La quantité d'ARN total dans les cellules diminue d'un facteur 2 dès 8,5 h de culture par rapport à 6 h, puis se stabilise ensuite (Tableau VI.3). La qualité et la non dégradation de l'ARN total ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose avant l'étape de rétro-transcription. La photographie VI.1 montre le résultat obtenu pour les quatre échantillons. La présence de deux bandes nettement visibles correspondant aux ARN ribosomiques 16S et 23S et l'absence d'un « smear », indique que les ARN ne sont pas dégradés, même après 176 h de culture. Pour l'hybridation, une quantité d'ARN totale constante est marquée, l'intensité totale des membranes est donc le reflet de la quantité de transcrits présents dans l'échantillon. Une diminution graduelle de l'intensité totale moyenne des membranes est observée au cours de la culture (Tableau VI.3) avec une perte par rapport à 6 h de culture allant de 38 % à 8,5 h de culture jusqu'à 62 % à 176 h. Les variations de concentrations de messagers dans la cellule cumulent la diminution des quantités d'ARNs totaux, et au sein de cette population, de la proportion des messagers (dilution par la croissance, ralentissement de la transcription et/ou de la stabilité des messagers). Ainsi les concentrations en ARNm diminuent très fortement avec une perte maximale de 81 % atteinte à partir de 15 h de culture.

Tableau VI.3 : Concentration en ARN total, proportion de messagers dans cette population et nombre de gènes détectés en transcriptome au cours de la culture de la souche LD61 en lait G, à pH libre avec transfert de température.

	Phase de croissance		4 h de post-acidification	165 h de post-acidification
	6 h	8,5 h	15 h	176 h
Concentration en ARN totaux (g.(100 g masse sèche) ⁻¹)	8 ± 1,3	4,3 ± 0,03	3,4 ± 0,8	4,2 ± 0,1
Proportion relative des ARNm dans les ARN totaux*	100	62 ± 12	44 ± 6	38 ± 2
Nombre de gènes détectés	1864	1508	926	487

(*): calculé à partir des intensités globales des membranes avec le point à 6 h en phase de croissance comme référence.

**Photographie VI.1** : Profil de migration sur gel d'agarose 1 %, des quatre échantillons d'ARNs.

Légende : 1 : marqueur de taille ; 2 : échantillon 6 h ; 3 : échantillon 8,5 h, 4 : échantillon 15 h, 5 : échantillon 176 h.

3.1. Présentation des clusters

Les données d'intensité pour chaque gène sont normalisées par rapport à l'intensité totale de la membrane, ce qui donne accès à l'abondance des messagers. Ces abondances sont comparées pour chaque gène aux valeurs obtenues à 6 h de croissance et exprimées en ratios d'expression. Ces ratios sont ensuite soumis à un traitement statistique (test de student) pour déterminer les variations d'expression significatives. 702 gènes présentant au moins une variation d'expression significative au cours de la fermentation sont ainsi sélectionnés. Ils sont regroupés au sein de 6 clusters différents selon leurs profils d'évolution et leurs niveaux d'expression à l'aide du logiciel « genespring » (Tableau VI.4).

Les clusters 1 et 2 comprennent respectivement 75 et 17 gènes qui sont tous sur-exprimés. Leur abondance augmente en fin de phase de croissance (8,5 h) et se poursuit en phase stationnaire jusqu'à des valeurs de ratios moyens supérieures à 2. Dans le cas du cluster 1, l'augmentation est graduelle jusqu'à 176 h et déjà importante à 8,5 h de culture, alors que pour le cluster 2 une augmentation apparaît surtout entre 8,5 et 15 h, après quoi une stabilisation de l'expression est observée.

Les clusters 3, 4 et 5 regroupent respectivement 46, 19 et 163 gènes tous induits transitoirement à 8,5 h de culture. Le cluster 3 se caractérise, après une induction à 8,5 h, par une diminution d'abondance des messagers en phase stationnaire qui se stabilise à 15 h, avec des niveaux d'expression qui restent cependant supérieurs à ceux de la phase de croissance (ratios moyens de 1,4). L'induction des gènes des clusters 4 et 5 est, quant à elle, suivie d'une diminution progressive de leur expression jusqu'à des niveaux inférieurs à ceux de la phase de croissance (de l'ordre de 0,6), et ceci plus précocement pour les gènes du cluster 5 (dès 15 h).

La majorité des 702 gènes sélectionnés pour le clustering, soit 382 gènes, est sous-exprimée et constitue le cluster 6. La sous-expression de l'ensemble de ces gènes se visualise dès 8,5 h, se poursuit jusqu'à 15 h mais semble se stabiliser au-delà.

Tableau VI.4 : Evolution des ratios d'expression des différents clusters au cours de la culture.

Temps	Ratios moyens*					
	cluster 1	cluster 2	cluster 3	cluster 4	cluster 5	cluster 6
8,5 h	1,83 ±0,64	1,24 ±0,29	2,18 ±0,87	1,81 ±0,61	1,43 ±0,46	0,6 ±0,2
15 h	2,02 ±0,61	2,14 ±0,58	1,39 ±0,39	1,33 ±0,39	0,62 ±0,16	0,44 ±0,17
176 h	2,32 ±0,98	2,14 ±0,4	1,4 ±0,45	0,63 ±0,09	0,52 ±0,18	0,46 ±0,24

(*) : moyenne des ratios aux différents temps pour tous les gènes de chaque cluster.

3.2. Analyse fonctionnelle

Les gènes sélectionnés sont classés en fonction des catégories fonctionnelles établies par Bolotin *et coll.* (2001) suite au séquençage et à l'annotation du génome complet de la souche *L. lactis* IL1403. Plusieurs catégories fonctionnelles différentes sont représentées au sein de chaque cluster (Tableau VI.5) rendant très difficile une analyse fonctionnelle pour chacun. C'est donc l'évolution de l'expression des gènes et leur répartition dans les différents clusters qui est analysée au sein de chaque catégorie fonctionnelle.

Tableau VI.5 : Répartition des gènes de chaque catégorie fonctionnelle, ayant au moins une variation d'expression significative, dans les 6 clusters d'expression. Sous le nom de chaque catégorie est précisé le nombre de gènes classés dans les différents clusters ainsi que, entre parenthèses, le nombre total de gènes de la catégorie.

Catégories fonctionnelles	Expression					
	Sur-exprimés			Sur-exprimés transitoirement		Sous-exprimés
	cluster 1	cluster 2	cluster 3	cluster 4	cluster 5	cluster 6
<u>Fonctions inconnues</u> 246 gènes (815)	28	6	17	7	54	134
<u>Biosynthèse des Acides aminés</u> 19 gènes (72)	4 <i>hisA, hisB, hisD, metE</i>	1 <i>hisI</i>	1 <i>argG</i>	-	-	13 <i>aroC, asnH, cysE, dapA, dapB, glnA, gltA, gltD, serA, serB, serC, thrA, thrB</i>
<u>Biosynthèse des cofacteurs, groupes prosthétiques et transporteurs</u> 16 gènes (42)	-	-	-	1 <i>menE</i>	6 <i>folD, gpo, menD, trxA, trxB2, yvdG</i>	9 <i>coaA, dfpB, dfrA, hemH, hemN, nadE, panE, preA, thiD2</i>
<u>Enveloppe cellulaire</u> 38 gènes (80)	1 <i>tagX</i>	1 <i>tagD2</i>	2 <i>murC, mycA</i>	-	6 <i>acmA, bmpA, murB, ponA, rgpA, ywaF</i>	28 <i>acmB, acmD, clsA, dacB, dal, dgkA, dltC, glmU, icaC, lgt, mreC, murA1, murA2, plpB, plpC, plpD, pspB, racD, rgpB, rgpE, usp45, ycbB, ysfC, ycbD, ycbF, ycbH, ycbI, ycbJ</i>

<p><u>Processus cellulaires</u></p> <p>18 gènes (47)</p>	1 <i>comGC</i>	-	1 <i>mesJ</i>	-	5 <i>ahpC, fisX, fisZ, gidA, groES</i>	11 <i>ezrA, ftsA, ftsH, ftsQ, fisW1, gidC, hly, lspA, secA, sipL, sodA</i>
<p><u>Métabolisme central intermédiaire</u></p> <p>7 gènes (27)</p>	-	-	2 <i>chiA, yucG</i>	-	1 <i>metK</i>	4 <i>amyL, glgD, glmS, xynD</i>
<p><u>Métabolisme énergétique</u></p> <p>65 gènes (176)</p>	12 <i>butA, butB, galM, gapA, lacZ, noxA, noxC, pdhB, qor, xylM, yjiB, yugB</i>	2 <i>enoB, pflA</i>	8 <i>adhE, arcC2, citB, citE, enoA, galK, glk, thgA</i>	4 <i>citF, dhaK, galT, pdhD</i>	13 <i>arcA, arcB, arcC1, citC, cydA, dhaM, fbaA, galE, ldh, pmg, pyk, ycgD, yphC</i>	26 <i>aldB, atpD, atpF, atpH, bcaT, gpdA, icd, mleS, nijS, noxB, pgiA, pgk, pta, sdaB, tkt, ycgG, yiaB, yjhF, yncA, ypaI, ypbD, yppH, ytfE, yugC, yviC, zwf</i>
<p><u>Métabolisme des acides gras et phospholipides</u></p> <p>5 gènes (25)</p>	1 <i>lpL</i>	-	-	2 <i>acpA, fabZ2</i>	2 <i>fabD, thiL</i>	-
<p><u>Purines, pyrimidines, nucléosides et nucléotides</u></p> <p>21 gènes (60)</p>	-	-	1 <i>guaC</i>	-	14 <i>cpsM, deoB, prsA, purA, purC, purD, purE, purF, purL, rmlB, rmlC, thyA, xpt, ycjM</i>	6 <i>carB, duka, dut, guaA, pyrH, udp</i>
<p><u>Fonctions régulatrices</u></p> <p>38 gènes (135)</p>	5 <i>phoU, rmeC, yfjG, yjfE, yugA</i>	1 <i>ybdA</i>	1 <i>rliC</i>	-	6 <i>citR, kinE, llrC, llrE, rmaA, rmal</i>	25 <i>bglR, ccpA, codY, eraL, kinB, kinD, llrA, llrD, llrF, nadR, rbsR, rcfB, relA, rliB, rlrD, rmaC, rmaJ, rmeB, thdF, typA, yebF, yeeG, ynaB, yqeL, ysfD</i>
<p><u>Réplication</u></p> <p>17 gènes (62)</p>	2 <i>hslB, recJ</i>	-	-	2 <i>gyrA, ssbB</i>	3 <i>recN, uvrA, xseA</i>	10 <i>dnaC, exoA, hsdM, mutM, mutX, mutY, recD, ruvB, snf, tag</i>
<p><u>Transcription</u></p> <p>6 gènes (31)</p>	-	1 <i>sunL</i>	-	-	4 <i>rimM, rpoA, rpoE, trmD</i>	1 <i>rheB</i>

<p>Traduction</p> <p>61 gènes (133)</p>	<p>3</p> <p><i>rpmH, serS, thrS</i></p>	-	<p>1</p> <p><i>rplR</i></p>	<p>1</p> <p><i>rpsM</i></p>	<p>23</p> <p><i>argS, fusA, infA, pepDB, pepT, ppiB, rplF, rplM, rplN, rplT, rplU, rplV, rpmF, rpmJ, rpsA, rpsC, rpsF, rpsH, rpsI, rpsQ, tgt, tuf, yueE</i></p>	<p>33</p> <p><i>frr, gatB, htrA, ileS, infC, lepA, lysS, pepC, pepDA, pepN, pepO, pepXP, pmpA, pmsR, pmsX, rplA, rplC, rplJ, rplK, rplO, rplS, rplX, rpmE, rpsJ, rpsL, rpsO, rpsP, rpsT, trpS, truA, ycjC, ycjD, yugD</i></p>
<p>Transport et protéines de liaison</p> <p>69 gènes (216)</p>	<p>5</p> <p><i>copA, copB, fruA, lmrP, yqeI</i></p>	<p>2</p> <p><i>pstE, ydcE</i></p>	<p>7</p> <p><i>arcD1, feoB, phnA, phnB, pstA, pstC, ycgB</i></p>	<p>2</p> <p><i>blt, pstB</i></p>	<p>14</p> <p><i>choQ, pbuX, phnC, phnE, potA, potB, potD, ptnAB, ptsH xynT, ycfI, yhcA, yqgE, ypiB</i></p>	<p>39</p> <p><i>busAA, cadA, ctrA, mscl, msmK, nah, oppA, oppB, oppC, oppD, oppF, optD, optS, pmrA, ptsK, rgpC, ydaG, ydaA, ydcB, ydgB, ydgC, ydiA, yjdE yjdJ, yjgC, yjgD, yjgE, yjlI, yngG, yoaB, ypjG, yqgG, yrjE, ysdA, ysiA, yvdF, yxbD, yxdG, zitQ</i></p>
<p>Autres catégories</p> <p>43 gènes (225)</p>	<p>12</p> <p><i>clpB, osmC, pi110, pi115, pi129, pi247, pi301, pi318, pi319, pi329, ps215, tra905</i></p>	<p>3</p> <p><i>cstA, pi224, pi317</i></p>	<p>5</p> <p><i>clpE, grpE, pi211, pi228, tra983L</i></p>	-	<p>5</p> <p><i>dpsA, pi102, pi103, pi349, ps201</i></p>	<p>18</p> <p><i>clpC, clpP, crtK, ctsR, pi125, pi201, ps202, ps301, ps302, ps303, ps315, ps316, tpx, tra904A, tra981C, tra1077B, yajE, ybdL</i></p>
<p>Fonctions plasmidiques</p> <p>33 gènes (64)</p>	<p>1</p> <p><i>nisB</i></p>	-	-	-	<p>7</p> <p><i>citQ, prtM, repB4, 4 tnase</i></p>	<p>25</p> <p><i>citR, citrate transporter, epsA, epsB, epsD, epsX, lacA, lacB, lacC, lacD, lacE, lacF, lacG, lacR, lacX, mobA, putative mobilization protein, prtP, repB, 2 tnase, 3 hypothetical protein, IS-like element</i></p>
TOTAL	75	17	46	19	163	382

3.2.1. Fonctions inconnues

Parmi les 702 gènes soumis au clustering, 246 codent pour des protéines hypothétiques et sont répertoriés dans la catégorie « Fonctions inconnues » qui est la plus importante en nombre de gènes (815). Ces gènes sont uniformément répartis entre les clusters puisqu'ils représentent de 33,1 à 37,3 % des gènes de chaque cluster. Cette proportion de gènes hypothétiques correspond à la fréquence des gènes inconnus dans le génome de *Lactococcus lactis*.

3.2.2. Biosynthèse des acides aminés

La majorité des 19 gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés sont sous-exprimés. Ces 13 gènes (cluster 6) sont répartis dans 4 familles d'acides aminés : i) 5 gènes dans la famille de l'aspartate : *asnH*, *dapA*, *dapB*, *thrA* et *thrB* ; ii) 4 gènes dans la famille de la sérine : *serA*, *serB*, *serC* et *cysE* ; iii) 3 gènes dans la famille du glutamate, *gltD*, *gltA*, *glnA* ; iv) 1 gène dans la famille des acides aminés aromatiques : *aroC*.

Seulement 6 gènes de cette catégorie sont induits transitoirement ou non. 4 gènes de la famille de l'histidine ; *hisA*, *hisB*, *hisD*, *hisI*, et le gène *metE* de la famille de l'aspartate sont présents dans les clusters 1 et 2, alors que le gène *argG* de la famille du glutamate est induit transitoirement (cluster 3).

3.2.3. Biosynthèse des cofacteurs, groupes prosthétiques et transporteurs

Parmi les 16 gènes impliqués dans la biosynthèse des cofacteurs, groupes prosthétiques et transporteurs, 9 gènes sont sous-exprimés (cluster 6). 7 gènes sont sur-exprimés transitoirement (clusters 4 et 5) : 3 gènes du métabolisme de la thioredoxine, glutaredoxine et glutathione (*gpo* (glutathione peroxidase), *trxA* (thioredoxin) et *trxB2* (thioredoxin reductase)), les gènes *menD* et *menE* impliqués dans la synthèse des ménaquinones et ubiquinones, le gène *folD*, qui joue un rôle dans la biosynthèse de l'acide folique et le gène *yvdG* impliqué dans la synthèse des nucléotides pyridines (NAD).

3.2.4. Enveloppe cellulaire

Une grande majorité des gènes de la catégorie enveloppe cellulaire, 28 gènes sur les 38 classés, sont sous-exprimés (cluster 6). Parmi les 10 gènes sur-exprimés, 8 présentent une induction transitoire (clusters 3 et 5). Il s'agit de *murB* (UDP-N-acetyl-enolpyruvoyl-glucosamine reductase), *murC* (UDP-N-acetylmuramate-alanine ligase), *acmA* (N-acetylmuramidase) et *ponA* (penicillin binding protein 1A) impliqués dans la synthèse de la muréine et du peptidoglycane, de 3 gènes des voies de synthèse de polysaccharides, de lipopolysaccharides et d'antigènes de surface, *mycA* (myosin-cross-reactive antigen), *rgpA* (rhamnosyl-transferase) et *ywaF*, et enfin du gène *bmpA* (basic membrane protein A) de la sous-catégorie des lipoprotéines et porines membranaires. Seulement deux gènes sont retrouvés dans les clusters 1 et 2 et induits tout le long de la culture, il s'agit de *tagD2* (glycerol-3-phosphate cytidyl-transferase) et *tagX* (teichoic acid biosynthesis protein) de la sous-catégorie « polysaccharides, lipopolysaccharides et antigènes de surface ».

3.2.5. Processus cellulaires

La plupart des gènes de la catégorie « processus cellulaires » sont sous-exprimés (11 gènes sur 18). 6 gènes sont induits transitoirement (clusters 3 et 5), *ftsX* (cell division protein FtsX), *ftsZ* (cell division protein FtsZ), *gidA* et *mesJ* directement impliqués dans la division cellulaire, alors que *groES* (10 KD chaperonin) code pour une protéine chaperone induite en réponse à un stress thermique (Tilly *et coll.*, 1983 ; Kim et Batt, 1993). Le gène *ahpC* (alkyl hydroperoxide reductase), également présent dans le cluster 5 et impliqué dans la détoxification, ne présente pas d'induction significative (ratio max de 1,01). Enfin, l'un des gènes de compétence, *comGC*, est induit tout le long de la culture (cluster 1).

3.2.6. Métabolisme central intermédiaire

Sur les 7 gènes du métabolisme central intermédiaire, 4 gènes appartiennent au cluster 6 alors que 3 gènes présentent une induction qui est toujours transitoire (clusters 3 et 5). Le gène *metK* (S-adenosylmethionine synthetase) fait partie de la sous-catégorie du métabolisme général, alors que les gènes *chiA* et *yucG* permettent la dégradation des polysaccharides et en particulier de la chitine.

3.2.7. Métabolisme énergétique

La majorité des 65 gènes du métabolisme énergétique, soit 39 gènes, sont sur-exprimés, au moins transitoirement, alors que seulement 26 gènes sont sous-exprimés (cluster 6). 11 gènes induits transitoirement (clusters 3, 4, 5) ou non (clusters 1 et 2), codent pour des enzymes impliquées dans le métabolisme aérobie, *noxC* (NADH oxydase), *noxA* (NADH déhydrogénase) et 3 oxido-reductases, *yugB*, *yphC* et *ycgD*, ainsi que dans des voies métaboliques actives en présence d'oxygène chez *Lactococcus lactis*, et répertoriés dans les sous-catégories : *i*) « fermentation », *butA* et *butB* ; *ii*) « transport d'électrons » ; *qor* (quinone oxido-reductase) et *cydA* (cytochrome D ubiquinol oxydase subunit I) ; *iii*) « pyruvate déhydrogénase », *pdhB* et *pdhD*.

Plusieurs gènes de la voie de Leloir sont induits. Deux gènes, *lacZ* et *galM*, ont une forte sur-expression en phase stationnaire (cluster 1) et 3 gènes sont induits transitoirement (clusters 3, 4, 5) : *galT*, *galE* et le gène *galK*. Outre les gènes de la voie de Leloir, 2 autres gènes de la sous-catégorie « sucres » sont induits, soit très fortement (cluster 1) pour le gène *xyIM* codant pour une aldose 1-épimérase impliquée dans la conversion du xylose, pourtant absent du milieu de culture, soit transitoirement (cluster 3) pour le gène *thgA* codant pour une thiogalactoside acétyltransférase.

Quatre gènes, *citB*, *citC*, *citE* et *citF*, impliqués dans le cycle du TCA, sont induits de façon transitoire (clusters 3, 4, 5).

Les gènes de la voie de l'arginine déiminase, *arcC2*, *arcC1*, *arcA*, *arcB* sont présents dans les clusters 3 et 5 avec une induction transitoire de forte amplitude (ratios compris entre 2 et 3,4). Une forte augmentation d'expression est également observée pour le gène *yjiB* (cluster 1) codant pour une « amino acid aminohydrolase » de spécificité inconnue.

Les 11 gènes codant pour des enzymes glycolytiques sont globalement sur-exprimés puisque seulement 3 de ces gènes appartiennent au cluster 6 : *pgiA*, *pgk* et *yjhF* (phosphoglycérate mutase). Parmi les gènes sur-exprimés, 6 sont présents dans les clusters 3 et 5 correspondant à une induction transitoire : *enoA*, *glk*, *pmg*, *fbaA*, *pyk* et *ldh*. Les 2 gènes, *gapA* et *enoB* voient leur expression augmenter très fortement au cours de la culture (clusters 1 et 2) pour atteindre des ratios d'expression maximums de 7,7 et 3,3 respectivement.

Deux gènes, *dhaK* et *dhaM* impliqués dans le métabolisme anaérobie et codant pour des dihydroxyacétone kinases, sont sur-exprimés transitoirement (clusters 4 et 5). 2 gènes de la sous-catégorie « fermentation » sont également induits, soit transitoirement pour *adhE* (alcool-acétaldehyde dehydrogenase) (cluster 3), soit tout au long de la culture pour *pflA* (pyruvate-formate lyase activating enzyme) (cluster 2).

Parmi les 26 gènes sous-exprimés (cluster 6) se trouvent notamment 3 gènes codant pour des sous-unités de l'ATP synthase (ou ATPase), enzyme essentielle au maintien de l'homéostasie du pH intracellulaire : 2 gènes, *atpD* (ATP synthase alpha subunit) et *atpH* (ATP synthase delta subunit), codant pour des sous-unités de l'unité catalytique cytoplasmique F1, et *atpF* (ATP synthase subunit b) de l'unité F0 formant le pore membranaire. Les 4 autres gènes codant pour des sous-unités de l'ATPase ne varient pas au cours de l'expérimentation.

3.2.8. Métabolisme des acides gras et des phospholipides

5 gènes du métabolisme des acides gras présentent des variations d'expression significatives et sont tous sur-exprimés, définitivement ou non : 4 gènes, *acpA* (acyl carrier protein), *fabZ2* (3R-hydroxymyristoyl-acyl carrier protein dehydratase), *fabD* (malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase) et *thiL* (acetyl coenzyme A acetyltransferase), sont dans les clusters 4 et 5, et *lplL* (lipoate-protein ligase) dans le cluster 1.

3.2.9. Métabolisme des purines, pyrimidines, nucléosides et nucléotides

La majorité des gènes de la catégorie du métabolisme des purines, pyrimidines, nucléosides et nucléotides (soit 15 gènes sur 21) sont sur-exprimés transitoirement. En particulier, le métabolisme des purines est fortement sur-exprimé (10 gènes sur 12). Tous les gènes induits le sont transitoirement (clusters 3 et 5), qu'ils fassent partie de la voie de sauvetage, *deoB*, *prsA* et *xpt*, ou de la voie de biosynthèse des purines, *guaC*, *purA*, *purC*, *purD*, *purE*, *purF* et *purL*. Tous ces gènes codent pour des enzymes impliquées en amont du XMP (xanthine-monophosphate) permettant de synthétiser du XMP à partir de ribose-1P.

Seulement 2 gènes, *guaA* et *dukA*, sont sous-exprimés (cluster 6) mais codent pour des fonctions impliquées dans la synthèse ou l'interconversion de dérivés de la guanine, en aval du XMP.

4 gènes du métabolisme des sucres-nucléotides sont sur-exprimés de façon transitoire (cluster 5), faiblement dans le cas de *rmlB*, *rmlC* et *cpsM*, et beaucoup plus fortement pour le gène *ycjM*, qui code pour une phosphatase répertoriée dans l'interconversion des nucléotides et nucléosides et qui présente des homologies à une sucre-nucléotidase d'*E. coli* (ratio maximum de 3,1).

Enfin, le métabolisme des pyrimidines (voie de biosynthèse, sauvetage et interconversion) est fortement réprimé. 4 gènes sur les 5 présents sont sous-exprimés (cluster 6) : *udp*, *dut*, *pyrH* et *carB*. Bien que le gène *thyA* (thymidilate synthase) soit présent dans le cluster 5, son expression n'augmente pas significativement à 8,5 h et diminue fortement en phase stationnaire (1,1/0,6/ND).

3.2.10. Fonctions régulatrices

Parmi les 38 gènes codant pour des régulateurs, 25 gènes, soit une large majorité, sont dans le cluster 6 et donc sous-exprimés. 6 gènes codant pour des régulateurs généraux sont induits dès le ralentissement de croissance (clusters 1 et 2) : *phoU* (phosphate transport system regulator), et 5 régulateurs de fonction inconnue, *rmeC*, *ybdA*, *yffG*, *yjfE* et *yugA*. Enfin, 7 gènes sont induits transitoirement (clusters 3 et 5) : *kinE*, *llrE* et *llrC* partiellement caractérisés et faisant partie de systèmes à deux composants (O'Connell-Motherway *et coll.*, 2000), *citR* (citrate lyase regulator), et 3 régulateurs de spécificité inconnue, *rliC* régulateur de la famille LacI (liaison à l'ADN par un motif hélice-tour-hélice, régulateurs putatifs de gènes du métabolisme des sucres), et *rmaA* et *rmaI* de la famille MarR (liaison à l'ADN par un motif hélice-tour-hélice, régulateurs du métabolisme des métaux).

3.2.11. Réplication

Dix gènes sur les 17 impliqués dans le processus de réplication sont sous-exprimés (cluster 6). Parmi ceux-ci, un seul gène réellement impliqué dans la réplication, *dnaC* (replicative DNA helicase), varie au cours de la culture (cluster 6). Inversement, tous les gènes induits codent pour des protéines impliquées dans la dégradation, la réparation et la protection de l'ADN. 3 gènes de la sous-catégorie « dégradation de l'ADN » sont induits, transitoirement pour *uvrA* et *xseA* (cluster 5) ou non pour *recJ* (cluster 1). 2 gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, *gyrA* et *recN*, sont sur-exprimés transitoirement (cluster 4 et 5). Les 2 derniers gènes codent pour des protéines de liaison à l'ADN, *hslB* est sur-exprimé dès 8,5 h de culture (cluster 1) tandis que *ssbB* l'est transitoirement (cluster 4).

3.2.12. Transcription

Sur les 6 gènes de la catégorie fonctionnelle « transcription », 5 sont sur-exprimés. 4 le sont transitoirement (cluster 5), *rpoA*, *rpoE*, *trmD*, *rimM* alors que le gène *sunL*, codant pour une rRNA méthylase, est induit pendant toute la culture (cluster 2). Inversement, seul le gène *rheB* (RNA hélicase ATP-dépendante) est constamment sous-exprimé (cluster 6).

3.2.13. Traduction

Parmi les 61 gènes impliqués dans la traduction, 33 gènes sont sous-exprimés. Seuls 3 gènes présentent une induction pendant toute la fermentation (cluster 1) : *serS* et *thrS* codent pour des tRNA synthetase, alors que *rpmH* code pour la sous-unité L34 de la protéine ribosomale 50S. Les 25 gènes restant sont induits transitoirement et présents essentiellement dans le cluster 5 : i) *argS* code pour une tRNA synthetase ; ii) *pepDB*, *pepT* et *yueE* sont impliqués dans la dégradation des protéines, peptides et glycopeptides ; iii) *fusA*, *infA* et *tuf* codent pour des facteurs de traduction ; iv) *ppiB* est impliqué dans la modification des protéines ; v) 9 gènes codent pour des protéines ribosomales 50S : *rplF*, *rplM*, *rplN*, *rplR*, *rplT*, *rplU*, *rplV*, *rpmF* et *rpmJ* ; vi) 7 gènes codent pour des protéines ribosomales 30S : *rpsA*, *rpsC*, *rpsF*, *rpsH*, *rpsI*, *rpsM*, *rpsQ* ; vii) enfin, le gène *tgt* est impliqué dans la synthèse et la modification des protéines ribosomales.

3.2.14. Transport et protéines de liaison

Sur les 69 gènes codant pour des transporteurs et des protéines de liaison, 39 gènes sont présents dans le cluster 6. Seulement 7 gènes sur les 30 autres sont sur-exprimés pendant toute la fermentation et répertoriés dans les clusters 1 et 2 : *pstE* (phosphate ABC transporter substrate binding protein), *copA* et *copB* (copper/potassium transporting ATPase A et B), *fruA* (fructose-specific PTS system enzyme IIBC component), *lmrP*, *yqeI* et *ydcE*. Les 23 gènes restant sont induits transitoirement (clusters 3, 4, 5) et regroupent : i) 5 gènes impliqués dans le transport d'acides aminés et de peptides (*arcDI* codant un antiport arginine/ornithine, *choQ* une sous-unité d'ABC transporteur pour la choline, et *potA*, *potB*, *potD* les trois sous-unités d'un ABC transporteur spermidine/putrescine) ; ii) 7 gènes codant pour des ABC transporteurs de phosphonate et phosphate (*phnA*, *phnB*, *phnC*, *phnE*, *pstA*, *pstB* et *pstC*) ; iii) et des gènes impliqués dans le transport général (*ycfI*, *ycgB* et *yhcA*), le transport de cations (*feoB* (ferrous ion transport protein B)), de carbohydrates (*xynT* (xyloside transporter) et *yqgE*), de nucléosides (*pbuX* (xanthine permease)), les systèmes PTS (*ptnAB* (mannose-specific PTS system component IIAB), *ptsH* (phosphocarrier protein Hpr)) ou de résistance aux drogues (*blt* et *ypiB*).

3.2.15. Autres catégories

Parmi les gènes d'« autres catégories », une forte proportion, soit 25 gènes sur les 43, est sur-exprimée. Les prophages sont globalement induits (11 gènes dans les clusters 1 et 2, 6 gènes dans les clusters transitoires 3 et 5, et seulement 3 gènes dans le cluster 6). A l'exception du prophage ps3 dont les 5 gènes sont sous-exprimés et du prophage ps1 absent de l'analyse, les prophages pi1, pi2, pi3 et ps2 sont induits. 2 gènes codant pour des transposases ou des fonctions assimilées sont sur-exprimés (*tra905* dans le cluster 1 et *tra983L* dans le cluster 3) sur les 6 présents dans l'analyse.

Parmi les 12 gènes sur-exprimés restant, 6 sont répertoriés dans la sous-catégorie « adaptations et conditions atypiques » et sont impliqués dans les réponses aux stress. Les gènes *osmC* (osmotically inducible protein), *clpB* (ClpB protein) et *cstA* (carbon starvation protein) sont fortement induits (clusters 1 et 2) avec des ratios maximums de 1,7 à 3,1 en phase stationnaire tandis que *grpE* (stress response protein GrpE), *clpE* (ATP-dependent protease ATP-binding subunit) et *dpsA* (non-heme iron-binding ferritin) sont induits transitoirement (clusters 3 et 5).

3.2.16. Fonctions plasmidiques

Une très grande proportion de gènes plasmidiques, soit 25 gènes sur 33, sont sous-exprimés. Parmi eux on trouve : *i*) 3 gènes du plasmide « citrate » dont le transporteur de citrate et le gène codant pour le régulateur putatif CitR ; *ii*) 11 gènes du plasmide permettant la synthèse d'EPS dont *epsA*, *epsB*, *epsD* et *epsX* et deux protéines de mobilisation ; *iii*) 2 gènes *repB* et *prtP* du plasmide « protéases membranaires » ; *iv*) les 9 gènes du plasmide permettant l'utilisation du lactose dont le gène du régulateur LacR, tous les gènes de la voie du tagatose (*lacA*, *lacB*, *lacC*, *lacD*, *lacE*, *lacF*, *lacG*) et *lacX*. L'intensité de tous les gènes plasmidiques permettant l'utilisation du saccharose est inférieure au seuil de détection de notre analyse.

Seulement 8 gènes codant pour des fonctions plasmidiques sont sur-exprimés. Le gène *nisB* impliqué dans la production de nisine est induit pendant toute la culture avec un ratio maximal de 2,1 (cluster 1). 7 gènes sont sur-exprimés transitoirement (cluster 5) : *i*) *citQ* (putative translational regulator) du plasmide permettant l'utilisation du citrate présente le plus fort ratio (2,2) ; *ii*) 3 gènes portés par le plasmide de synthèse d'EPS codant pour deux transposases et une protéine de réplication (*repB4*) ; *iii*) le précurseur d'une protéase (*prtM*) et une transposase du plasmide « protéases membranaires » ; *iv*) et enfin un gène du plasmide lactose codant pour une transposase.

4. Discussion

4.1. Le phénotype de la culture

Une culture de *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* LD61 a été réalisée dans des conditions proches de celles employées dans certains procédés fromagers qui superposent deux stress physico-chimiques. Le stress acide est directement dépendant de la croissance bactérienne et de la production d'acide organique (acide lactique majoritairement) associée. Le stress thermique, lui, est imposé puisqu'une cinétique de refroidissement précise est appliquée au cours de la culture (de 34 à 12°C en 10 h lorsque la culture est à pH 5,2). Ces deux stress sont susceptibles d'affecter à la fois la croissance et le métabolisme des lactocoques.

Au cours de cette culture le métabolisme rencontré est de type homolactique et aucune phase exponentielle de croissance n'est observée. Les bactéries consomment le citrate présent dans le lait parallèlement avec le lactose, jusqu'à son épuisement à six heures de culture. Le taux de croissance (μ), élevé à 3 h ($0,95 \text{ h}^{-1}$), diminue tout au long de la phase de croissance pour atteindre une valeur nulle à partir de 11 h. A l'image du μ , le flux glycolytique (q_{Lactose}) voit sa valeur baisser pendant toute la culture. La présence d'un flux, bien que très faible, après 11 h, témoigne de l'existence d'une phase de post-acidification. La vitesse spécifique de post-acidification diminue pendant toute cette phase avec une valeur déjà très faible à l'arrêt de croissance, de $-0,04 \text{ upH.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, qui décroît jusqu'à s'annuler à 176 h de culture (figure VI.3).

La mesure des quantités d'ARN et de l'évolution des transcrits tout au long de la culture a permis de mettre en évidence une série de phénomènes importants. Une forte diminution de la concentration d'ARN totaux dans les cellules (50 % en moyenne) est observée dès 8,5 h de culture, qui n'est pas due à la dégradation des ARNs dont la qualité a été vérifiée sur gel. A cette baisse se rajoute celle de la proportion des « messagers » au sein de la population d'ARN totaux, qui atteint une valeur moyenne de 59 % en phase de post-acidification. De plus, une forte baisse d'expression des gènes est observée au cours de la culture; en effet dès 8,5 h, plus de la moitié (54,4 %) des gènes qui varient significativement sont sous-exprimés, et cette valeur atteint 80,3 % à 176 h de culture.

4.2. Le catabolisme

Les deux évènements phénotypiques majeurs observés durant cette culture sont les diminutions concomitantes du taux de croissance et de la vitesse spécifique de consommation du lactose (q_{Lactose}), le ralentissement du flux catabolique se poursuivant jusqu'en fin de post-acidification. Ce ralentissement du flux catabolique est contrôlé par certaines enzymes glycolytiques (GLK, PFK, GAPDH, PGK, ENO), pourtant les quantités d'enzymes *in vivo* (activités spécifiques maximales) évoluent relativement peu au cours de la culture (facteur 4,4 en moyenne d'augmentation ou de diminution). En général, les concentrations des enzymes glycolytiques diminuent en phase stationnaire, plus ou moins tardivement, en accord avec la sous-expression des transcrits correspondants (PGI, PGK, LDH, PK, FBA et PMG). Bien que les gènes codant pour la PK et la LDH soient répertoriés dans des clusters induits transitoirement, l'augmentation de ratio à 8,5 h est très faible (1,1 et 1,05), et en tous cas trop faible pour induire une augmentation de quantités d'enzymes. Les transcrits de *pyk* et *ldh* présentent la même évolution, ce qui est cohérent avec le fait que ces deux gènes font partie, avec *pfk* (gène non disponible sur les puces ADN), du même opéron « *las* » (Llanos *et coll.*, 1992 ; 1993). Les messagers de *pyk* et *ldh* sont sous-exprimés en phase stationnaire, en accord avec la sous-expression du gène *ccpA* qui code pour un activateur de cet opéron (Luesink *et coll.*, 1998). Généralement, les enzymes glycolytiques observent un profil constant ou une diminution avant la phase stationnaire sauf quatre enzymes qui sont la FBA, la GAPDH, la PMG et l'ENO. Les concentrations des enzymes PMG et FBA augmentent en effet toutes deux en début de post-acidification, alors que les transcrits des gènes correspondant sont induits transitoirement (ratios de 1,8 et 1,3) à 8,5 h de culture. Il semble qu'il y ait un décalage pour ces deux enzymes entre expression des gènes et traduction. La concentration en ENO augmente en début de phase stationnaire en accord avec les très fortes sur-expressions des gènes dupliqués *enoA* (2,2/1,4/1,7) et *enoB* (1,6/3,3/2,8). Il semblerait donc que *enoB* ait un rôle dans la glycolyse bien que ce soit *enoA* qui soit généralement considéré comme le gène fonctionnel (Jamet *et coll.*, 2001). L'activité spécifique de la GAPDH augmente en fin de croissance en accord avec la très forte sur-expression du gène *gapA* (2,3/4,6/7,7). Bien que *gapB* (ND) soit considéré comme le gène essentiel (Jamet *et coll.*, 2001), il semble que *gapA* joue un rôle *in vivo* dans nos conditions de stress. Enfin, la GLK présente un comportement particulier puisque le gène *glk* est induit transitoirement, avec un ratio élevé (ratio de 2), alors qu'aucune variation significative de concentration de l'enzyme n'a été mesurée.

Ces enzymes glycolytiques sont toutes inhibées fortement par le pH interne et la température qui évoluent au cours de la culture. La comparaison des activités corrigées par ces facteurs avec le flux permet d'identifier les enzymes qui contrôlent le flux glycolytique. Nous ne pouvons pour des raisons techniques accéder aux concentrations en intermédiaires glycolytiques qui nous auraient permis d'identifier avec certitude les étapes limitantes de la glycolyse en milieu lait. Néanmoins, il semble qu'en début de phase de croissance un contrôle partagé soit mis en place puisque la grande majorité des enzymes ont des activités ajustées au flux. A 3,5 h de culture, seule la TPI présente un large excès d'activité corrigée par rapport au flux. Après l'arrêt de croissance, alors que le q_{Lactose} et le pH ne cessent de diminuer, la plupart des enzymes sont en excès. Néanmoins la PFK, la GAPDH, la PGK et l'ENO sont les enzymes qui présentent le moins d'excès par rapport au flux catabolique et apparaissent de ce fait comme des cibles potentielles dans la régulation du flux catabolique (Fig. VI.5). Pour chacune de ces enzymes, une déviation du flux carboné d'origine transcriptionnelle se met en place juste en amont de l'enzyme, vraisemblablement pour provoquer une réorientation du flux vers des voies périphériques afin d'absorber l'excès de carbone. L'induction de ces voies périphériques est probablement due à l'augmentation des concentrations en substrats en amont des enzymes limitantes. Ainsi, les gènes *dhaK* et *dhaM* permettant de dévier un excès éventuel de DHAP vers la production d'acides gras (Fig VI.5) sont induits transitoirement, ce qui semble confirmer le contrôle au niveau des C3 par la GAPDH, la PGK et l'ENO.

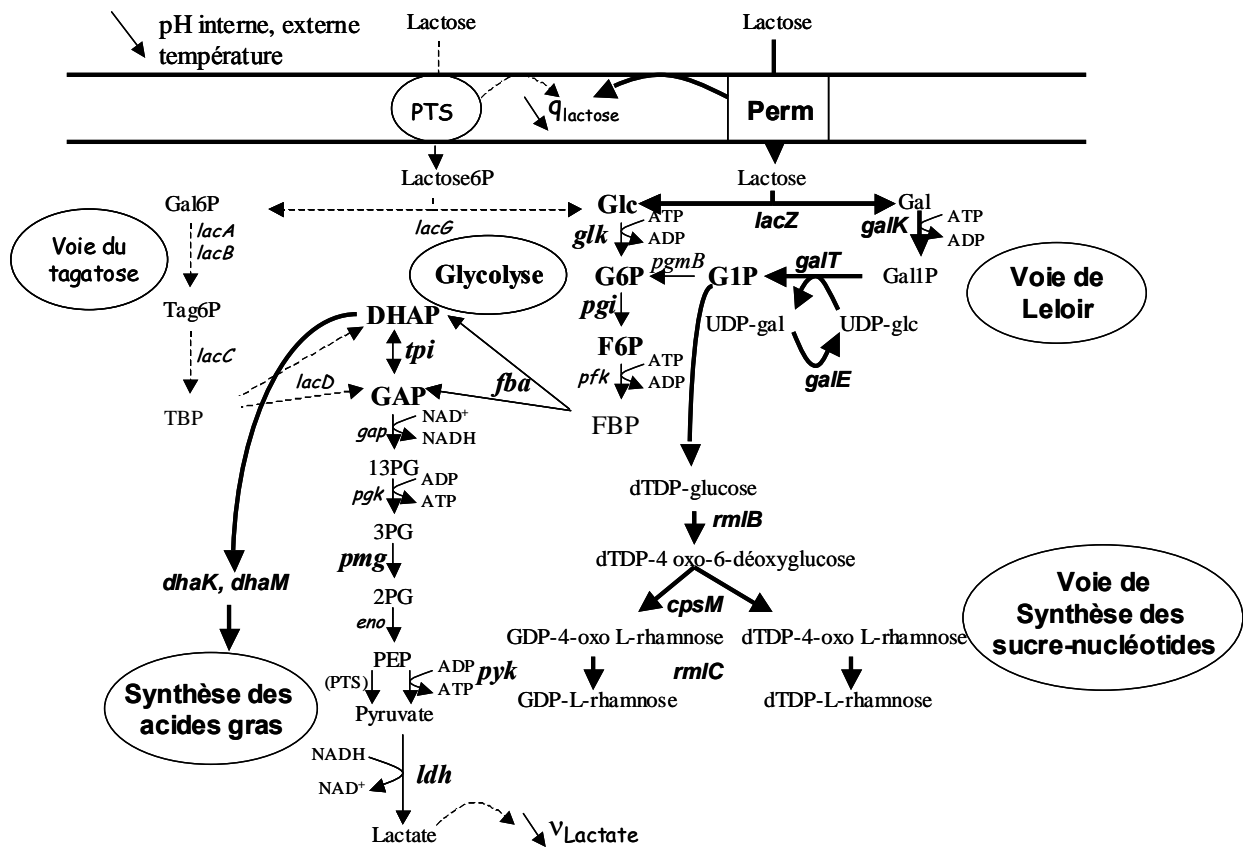


Figure VI.5 : Régulation du métabolisme carboné et voies de dérivation mises en place en réponse à la baisse de pH et de température.

Légende : Glc : glucose, G6P : glucose-6-phosphate, G1P : glucose-1-phosphate, F6P : fructose-6-phosphate, FBP : fructose-1,6-bisphosphate, DHAP, dihydroxyacétone-phosphate, GAP : glycéraldéhyde-3-phosphate, 1,3PG : 1,3-diphosphoglycérate, 3PG : 3-phosphoglycérate, 2PG : 2-phosphoglycérate, PEP : phosphoenolpyruvate, Gal : galactose, Gal6P : galactose-6-phosphate, Gal1P : galactose-1-phosphate, Tag6P : tagatose-6-phosphate, TBP : tagatose-1,6-bisphosphate, *glk* : glucokinase, *pgi* : glucose-6-phosphate isomérase, *pfk* : phosphofructokinase, *fba* : fructose-1,6-bisphosphate aldolase, *tpi* : triose-phosphate isomérase, *gap* : glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase, *pgk* : phosphoglycérate kinase, *pmg* : phosphoglycérate mutase, *eno* : énoïase, *pyk* : pyruvate kinase, *ldh* : lactate deshydrogénase, *lacZ* : β -galactosidase, *galk* : galactokinase, *galE* : UDP-glucose-4-épimérase, *galT* : uridylyltransférase, *pgmB* : phosphoglucomutase, *lacG* : P- β -galactosidase, *lacA*, *lacB* : galactose-6-P isomérase, *lacC* : tagatose-P kinase, *lacD* : TDP aldolase, **gènes** et **voies induits** au cours de la culture (\rightarrow), *gènes* et *voies réprimés* (\dashrightarrow)

De même, les gènes de la voie de Leloir, *galE* (1,2/0,6/0,4), *galK* (2,6/2/ND), *galM* (1,7/1,9/1,5), *galT* (2,4/2,5/0,7) et *lacZ* (2,9/2,4/ND) sont induits de façon importante jusqu'en début de phase stationnaire, alors que les gènes plasmidiques (enzyme III du PTS lactose et voie du Tagatose) permettant la métabolisation rapide du lactose sont fortement sous-exprimés. Ce changement transcriptionnel semble indiquer que le système préférentiel d'entrée du lactose, initialement le PTS, évolue vers la perméase, et que l'utilisation du lactose est déviée de la voie du tagatose vers la voie de Leloir. Une telle réorientation est vraisemblablement liée à la limitation au niveau du PTS (non mesuré) et de la voie du Tagatose. Il serait cependant intéressant de doser l'activité du PTS au cours de cette culture, ainsi que les effets du pH et de la température sur ce transporteur, afin de valider l'hypothèse proposée. Cette déviation semble confirmée par l'induction transitoire de trois des quatre gènes (*cpsM*, *rmlB*, *rmlC*) impliqués dans la synthèse des sucre-nucléotides qui dérivent du GIP produit par la voie de Leloir (Fig. VI.5). Cette déviation supplémentaire au niveau du GIP pourrait être liée à la limitation exercée au niveau de la PFK.

La confrontation des données cinétiques, enzymatiques (avec leur caractérisation cinétique *in vitro*) et transcriptomiques, permet donc de proposer que le flux glycolytique est graduellement mais fortement réduit par la baisse de pH et de température de la culture, le contrôle de ce flux en milieu acide étant certainement partagé entre 4 enzymes glycolytiques et le PTS lactose. Cette diminution du flux catabolique de production d'énergie, associé à l'augmentation du coût énergétique de la croissance à bas pH (discuté dans un autre chapitre), doit être responsable du ralentissement de croissance.

4.3. L'anabolisme

Toutes les fonctions directement liées à la croissance présentent une évolution comparable à celle du taux de croissance. La synthèse de la paroi, la réplication, et la nutrition azotée sont des fonctions qui semblent répondre précocement à la baisse du taux de croissance puisqu'elles sont réprimées dès 8,5 h. La synthèse de la paroi est en effet une fonction globalement sous-exprimée puisque 27 gènes sur 37 présentent des ratios d'expression inférieurs à 1 tout au long de la culture. Il en est de même pour la réplication, car parmi les 8 gènes essentiels à cette fonction (gènes « *dna* »), 7 ont des intensités inférieures au seuil de détection et le gène *dnaC* est sous-exprimé. Les transporteurs d'oligopeptides et les protéases (surtout *prtP*) sont indispensables à l'hydrolyse des caséines et donc à la croissance dans le lait. 70 % des gènes codant pour des transporteurs d'oligopeptides (*oppA,B,C,D,F*, *optD* et *optS*) et 8 gènes codant pour des protéases (7 gènes chromosomiques et le gène plasmidique *prtP*) sont sous-exprimés. Les 4 gènes induits de cette fonction (facteur maximal de 1,4), le sont transitoirement à 15 h mais sont fortement sous-exprimés ensuite puisqu'ils ne sont plus détectés en fin de culture. De même, les gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés sont en général réprimés (acides aminés aromatiques, famille de l'aspartate, du glutamate et de la sérine). Les quelques gènes qui sont induits codent pour des enzymes des voies de biosynthèse de l'histidine qui fait partie des acides aminés les moins présents dans le lait (Lindmark-Mansson *et coll.*, 2003) et qui peuvent prévaloir d'une limitation nutritionnelle. Deux gènes des familles de l'aspartate (*metE*) et du glutamate (*argG*) sont fortement induits mais ils codent pour des fonctions particulières ayant un lien direct avec les stress imposés (*cf.* 4.4. Les réponses spécifiques aux stress acide et thermique). La nutrition azotée est donc globalement sévèrement réprimée au cours de la fermentation, certainement en conséquence directe du ralentissement de la croissance.

De même, la division cellulaire, la transcription et la traduction sont des fonctions qui sont globalement sous-exprimées mais plus tardivement que les autres fonctions physiologiques (sous-expression dès 15 h) et parfois même après une courte phase d'induction. Les gènes impliqués dans la division cellulaire sont en général réprimés en phase stationnaire soit dès 8,5 h (gènes *ftsA*, *H*, *Q*, *WI* et *ezrA* (régulateur de la division cellulaire)), soit après une brève induction à 8,5 h (*ftsX*, *ftsZ*, *gidA* et *mesJ*). Deux des cinq gènes codant pour des sous-unités de l'ARN polymérase, *rpoA* et *rpoE*, sont fortement réprimés en phase stationnaire (ratio de 0,3 et ND) après une induction transitoire à 8,5 h. Cette diminution d'expression peut être corrélée avec la diminution de 80 % par rapport à la phase de croissance de la concentration moyenne en ARNm qui témoigne d'un ralentissement de la transcription. La traduction fait également partie des fonctions globalement réprimées en phase stationnaire. En effet, 33 gènes sur les 61 appartenant à cette catégorie fonctionnelle sont sous-exprimés, et 23 présentent après une induction transitoire de faible amplitude (ratios compris entre 1,05 et 1,5 à 8,5 h), une forte diminution d'expression (ratios entre 0,5 et ND). Seulement 3 gènes liés à la traduction sont sur-exprimés tout au long de la culture, dont le gène *rpmH* codant pour la protéine L34 de la sous-unité ribosomale 50S (ratio maximal de 1,9 qui se maintient à un niveau élevé de 1,4 à 176 h de culture). Cette protéine ribosomale joue probablement un rôle important au niveau de la traduction en phase de post-acidification. En carence carbone, c'est une autre protéine ribosomale, la protéine L33 (gène *rpmGC*) qui présente un profil d'induction similaire (Redon *et coll.*, 2005). Ainsi, il ne semble pas que ce soit un phénomène isolé et ces protéines ribosomales sont sûrement induites spécifiquement en fonction des conditions de culture. La traduction est fortement ralentie en phase stationnaire mais elle est encore probablement active en début de phase puisque la quantité d'enzymes *in vivo* augmente pour plusieurs enzymes glycolytiques (fructose-1,6-bisphosphate aldolase, phosphoglycérate mutase, énoïase) ainsi que pour l'ATPase.

4.4. Les réponses spécifiques aux stress acide et thermique

Au cours de la fermentation, un certain nombre de réponses physiologiques directement liées aux stress acide et thermique ont été mises en évidence. Les gènes *arcA* (arginine déiminase), *arcB* (ornithine carbamoyl-transferase), *arcC1* et *arcC2* (carbamate kinase) ainsi que *arcDI* (antiport arginine/ornithine) sont très fortement induits à 8,5 h de culture (clusters 3 et 5) avec des ratios compris entre 1,9 et 3,4. Ces gènes codent pour les enzymes de la voie ADI réalisant la désamination de l'arginine (Poolman *et coll.*, 1987b) et pour le transporteur associé (Fig. VI.6). Ces réactions permettent une production de NH₃ qui alcalinise le cytoplasme. Cette voie est induite pour lutter directement contre l'acidification du cytoplasme. Le système à deux composants KinA/LlrA bien que n'étant pas induit dans nos conditions, est connu comme activateur transcriptionnel des gènes de la voie ADI (O'Connell-Motherway *et coll.*, 2000). Par contre, le système KinC/LlrC qui est entre autre impliqué dans la réponse globale aux stress (O'Connell-Motherway *et coll.*, 2000) est induit transitoirement et pourrait être responsable de l'activation de la transcription des gènes de la voie ADI. Face à cette déviation de l'arginine vers la voie ADI, un certain nombre de voies périphériques se mettent en place tout autour de l'arginine et de l'ornithine. Des gènes réversibles impliqués dans la biosynthèse/catabolisme de l'arginine (*argG*), et la synthèse/déchargement du tRNA-Arg (*argS*) sont en effet induits, ainsi que les gènes *metK*, *potA*, *potB*, *potD*, impliqués dans la synthèse et le transport des amines biogènes spermidine et putrescine issues de l'ornithine et de la S-adénosyl méthionine (Fig. VI.6). L'induction des gènes impliqués dans la synthèse et le transport des amines biogènes est particulièrement intéressante vis à vis des produits alimentaires. Les gènes codant pour l'ornithine décarboxylase et la spermidine synthase, les deux dernières enzymes de la voie de biosynthèse, n'ont cependant pas encore été identifiées chez *Lactococcus lactis* et cette souche n'est pas connue pour produire des amines biogènes. L'arginine semble ainsi un point clé dans ces conditions de stress acide et thermique puisqu'elle est au centre d'un grand nombre de voies métaboliques induites.

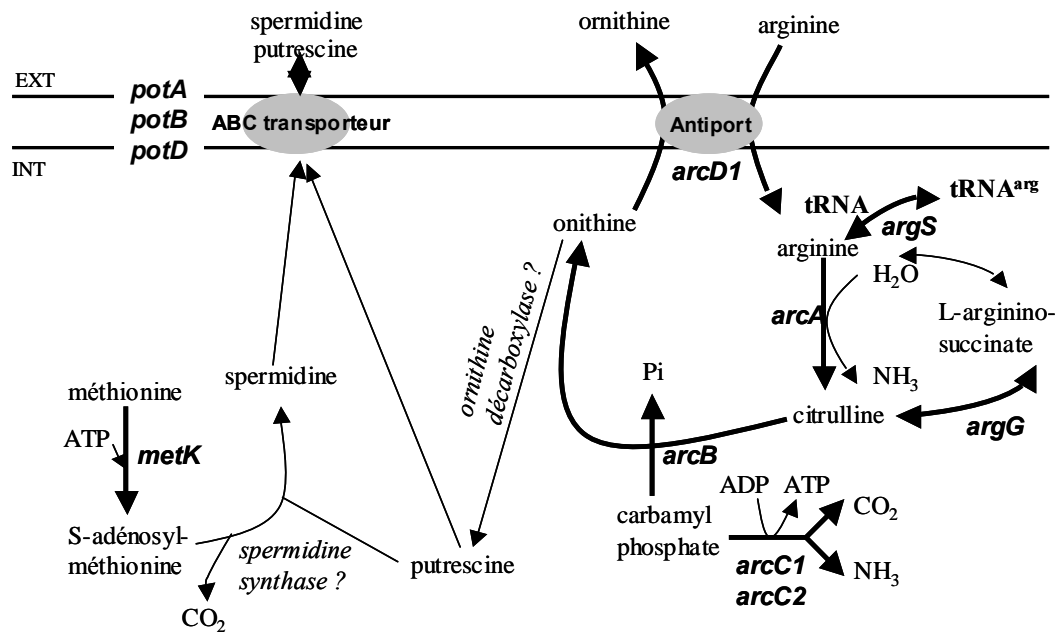


Figure VI.6 : Voies et gènes induits autour de l’arginine.

Légende : *arcA* : arginine déiminase, *arcB* : ornithine transcarboxylase, *arcC1*, *arcC2* : carbamate kinase, *arcD1* : antiport arginine/ornithine, *argG* : argininosuccinate synthétase, *argS* : arginyl-tRNA synthétase, *metK* : S- adénosylméthionine synthétase, *potA*, *potB*, *potC* : ABC transporteur spermidine/putrescine. **Gènes induits** au cours de la culture (➔), ? : gènes non identifiés chez *L. lactis*.

Pour lutter contre l’acidification, la cellule met en place deux autres systèmes consommateurs de protons : le système ATPase et la voie de consommation du citrate. L’activité catalytique de l’ATPase membranaire augmente en phase de post-acidification avec une valeur maximale à 97 h suivie d’une chute en fin de culture. Elle permet de lutter contre l’acidification du cytoplasme en expulsant des protons et en consommant de l’ATP. Chez les bactéries lactiques l’activité d’hydrolyse de l’ATP couplée à l’expulsion de protons augmente à bas pH et est cruciale pour le maintien du gradient pH (Futai *et coll.*, 1989 ; Nannen *et coll.*, 1991b). Le pH optimum de l’ATPase chez *L. lactis* est proche de la neutralité, entre 6,5 et 7,5, toutefois, la quantité d’ATPase augmente lorsque le pH diminue (Nannen et Hutkins, 1991b ; O’Sullivan et Condon, 1999). Cependant une baisse de cette activité est observée pour des pH inférieurs à 5, en corrélation avec le non-maintien du ΔpH et la baisse très prononcée du pH intracellulaire (Nannen et Hutkins, 1991a et b). Contrairement à l’activité qui augmente, les transcrits codant pour les différentes sous-unités de cette enzyme sont soit sous-exprimés (*atpD*, *atpF* et *atpH*), soit constants à 8,5 h puis non détectés par la suite (*atpA*, *atpB*, *atpE* et *atpG*) et n’apparaissent donc pas dans les clusters. Il semblerait donc que

l'augmentation de l'activité ATPase résulte d'une régulation à un niveau traductionnel ou post-traductionnel.

Les gènes de la voie de consommation du citrate (Fig. VI.7), *citC* (acetate-SH-citrate lyase ligase), *citE* (citrate lyase beta chain) et *citF* (citrate lyase alpha chain), de même que le gène *citB* (aconitate hydratase, qui interconvertit citrate et isocitrate), sont sur-exprimés transitoirement à 8,5 h de culture avec des ratios compris entre 1,3 et 1,6. L'induction de cette voie a lieu alors que les 7,8 mM de citrate contenus dans le lait sont épuisés. Elle a déjà été observée chez *L. lactis* dans des conditions de stress acide (Garcia-Quintans *et coll.*, 1998 ; Magni *et coll.*, 1999). En condition de stress acide, la consommation du citrate est favorisée puisque sa décarboxylation permet une augmentation de pH interne (consommation d'un proton) et la génération d'une pmf (Fig. VI.7). L'oxaloacétate décarboxylase permettant la décarboxylation de l'oxaloacétate en pyruvate n'a été identifiée que très récemment chez une souche de *L. lactis* biovar *diacetylactis* (Sender *et coll.*, 2004), elle est codée par le gène *citM* (absent de notre puce) qui appartient à l'opéron « *cit* » et qui comme lui est induit en conditions de stress acide (Martin *et coll.*, 2004). Les souches appartenant au biovar *diacetylactis* possèdent une citrate perméase plasmidique permettant l'utilisation de cette source de carbone (Sesma *et coll.*, 1990 ; Smith *et coll.*, 1992). Ce gène, probablement induit par le citrate, est sous-exprimé dès 8,5 h de culture dans nos conditions, mais la consommation rapide de citrate en début de culture témoigne de la présence d'une perméase fonctionnelle. Par conséquent, alors que chez *L. lactis*, pour lesquels ces gènes sont chromosomiques, la consommation de citrate est un mécanisme de réponse au stress acide, chez *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, les gènes plasmidiques permettent une consommation rapide et précoce du citrate. Même chez le biovar *diacetylactis*, les gènes chromosomiques sont induits en stress acide alors que le citrate est déjà épuisé du milieu de culture.

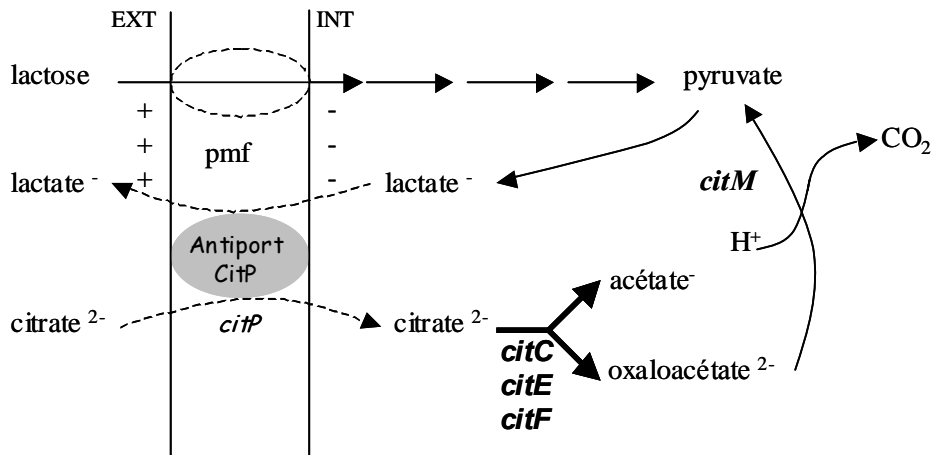


Figure VI.7 : Cycle du TCA et lutte contre l'acidification du cytoplasme.

Légende : *citC*, *citE*, *citF* : citrate lyase, *citM* : oxaloacétate décarboxylase, *citP* : antiport citrate/lactate. **Gènes induits** au cours de la culture (—▶), **gènes réprimés** (---▶).

L'induction de la réponse spécifique au choc froid n'est que partielle. En effet, seuls trois gènes codant pour des CIPs (Cold Induced Proteins) impliquées dans divers processus cellulaires (Wouters *et coll.*, 2000 b et c) sont induits, soit transitoirement avec une faible amplitude, *llrC*, *ptsH* (protéine HPr), soit jusqu'en post-acidification pour *osmC* (osmotically induced protein) avec des ratios allant jusqu'à 3 à 176 h. Bien que la protéine HslA ait été identifiée comme une CIP dans une autre souche (Wouters *et coll.*, 2000 b et c), la transcription du gène *hslA* est constitutive dans les conditions étudiées. Néanmoins, l'induction de *hslB* (ratio de 1,7 à 176 h) qui code comme *hslA* pour une HU-like DNA binding protein semble montrer que c'est la protéine HslB et non HslA qui est une CIP dans cette souche. Aucune induction des gènes codant pour les CSPs, Cold Shock Proteins de bas poids moléculaire (< 7 kDa) assez conservées chez les bactéries et induites spécifiquement en condition de choc froid, n'est observée. En effet, dans nos conditions de culture les deux gènes présents sur le génome, *cspD* et *cspE* ont une expression constante. La réponse au choc froid observée au cours de la fermentation n'est donc que partielle, vraisemblablement du fait du refroidissement progressif de la culture et de la superposition d'un stress acide qui lui est antérieur.

Les stress acide et froid ont des effets antagonistes sur la fluidité membranaire. Si la baisse de pH augmente la fluidité et la perméabilité membranaire, le refroidissement a au contraire plutôt tendance à la diminuer. L'induction, transitoire ou non, de 4 des 5 gènes impliqués dans la synthèse des acides gras semble mettre en évidence une modification de la composition membranaire en acides gras. Les produits des gènes *fabD* et *acpA* sont communs à la synthèse de tous les acides gras. Par contre l'induction de *fabZ2* qui code pour une désaturase et de *thiL* dont le produit, une acétyl coenzyme A acétyl-transferase, est impliqué dans la dégradation des acides gras à courtes chaînes, va vraisemblablement favoriser la synthèse d'acides gras insaturés à longue chaîne. La synthèse d'acides gras poly-insaturés à longue chaîne va permettre d'augmenter la fluidité membranaire, ce qui s'apparente aux réponses observées en conditions de stress froid. Il semble donc que le froid soit le stress majeur vis à vis de la membrane et que l'effet de la baisse de pH soit secondaire.

4.4. Les réponses croisées aux stress

En plus de ces réponses spécifiques liées au froid et à l'acidification, des réponses croisées envers d'autres stress sont également induites. Il a été montré que le régulon HS (Heat-Shock) est induit en condition d'induction de tolérance acide (ATR), lors du passage rapide des lactocoques d'un milieu à pH neutre dans un milieu dont le pH est sub-léthal (pH 4,5 ou 5,5) (Hartke *et coll.*, 1996 ; Rallu *et coll.*, 1996). Quatre gènes du régulon HS sont induits ici. Les gènes *groES* et *grpE* codant pour des chaperones présentent une induction transitoire à 8,5 h (ratios de 1,6 et 1,4), et les deux gènes, *clpB* et *clpE* codant pour des sous-unités de liaison à l'ATP des protéases Clp sont fortement induits au cours de la culture (ratios maximaux de 3,1 et 2,2). Cependant, les autres gènes du régulon sont soit sous-exprimés (*clpP*, *clpC*), soit non détectés (*dnaK*, *clpX*), soit absent de la puce ADN (*groEL*). Deux régulateurs négatifs sont connus pour contrôler l'expression de ces gènes. Le gène *hrcA*, dont l'expression est constitutive, réprime l'expression des chaperones, alors que le gène *ctsR* (sous-exprimé ici) régule l'expression des gènes *clp*. L'auto-acidification du milieu plus lente et plus modérée (pH final de 4,64) que l'acidification induisant l'ATR explique probablement la réponse partielle observée ici. Des gènes impliqués dans les réponses à d'autres stress sont également induits : *cstA* qui est normalement induit en carence carbone et le gène *ytgH* (2/0,9/1,2) qui code pour une protéine générale de stress, homologue au gène *gls24* d'*Enterococcus faecalis* (Giard *et coll.*, 2002). Bien que la culture soit réalisée en

anaérobiose, de nombreux gènes codant pour des oxidoreductases (*ycgD*, *yphC*, *yugB*), NADH-oxidase (*noxC*), NADH-dehydrogenase (*noxA*), pour des gènes impliqués dans des voies métaboliques actives en présence d'oxygène (*butA*, *butB*, *gor*, *cydA*, *pdhB* et *pdhD*) et pour des cofacteurs importants en conditions d'aérobiose (*gpo*, *trxA*, *trxB2*) présentent des inductions transitoires. Cependant, le gène *sodA* (superoxyde dismutase), indispensable à la survie des cellules en présence d'oxygène, n'est pas induit. De même, l'activité NADH oxidase est absente dans les extraits cellulaires. Cette réponse transcriptionnelle s'apparente plutôt à une réponse croisée vis à vis du stress oxydatif et non à un stress oxydatif accidentel. Enfin, le bas pH induit des modifications au niveau des acides nucléiques comme des dépurinations de l'ADN par exemple (Haring *et coll.*, 1994). Certains gènes comme *uvrA*, *recJ*, *xseA*, *gyrA*, *recN* ou *ssbB*, impliqués dans la dégradation et la réparation de l'ADN sont induits à 8,5 h de culture, certainement pour lutter contre un probable effet mutagène des stress.

Sur les dix gènes codant pour des transporteurs de phosphate à haute affinité ou de phosphonate, 8 présentent une forte induction (*pstA,B,C,E*, *phnA,B,C,E*) avec des ratios allant de 1,6 à 3,1 et qui est maintenue pour la plupart jusqu'en début de phase stationnaire. Ces gènes *pst* codant pour des transporteurs de phosphate à haute affinité appartiennent au régulon Pho chez *Bacillus subtilis* (Qi *et coll.*, 1997) et sont induits en carence phosphate (Hulett *et coll.*, 1994 ; Hulett, 1996). Chez *Bacillus* le système à deux composants PhoP-PhoR régule positivement l'expression des gènes *pst* (Qi *et coll.*, 1997), alors que le gène *phoU* qui régule négativement le régulon Pho chez *E. coli* (Nakata *et coll.*, 1984) est absent. Dans la souche *L. lactis* IL1403, seul le gène *phoU* a été pour l'instant identifié, et bien que ce gène soit induit dans nos conditions de culture, on ne peut écarter comme chez *Bacillus* la présence d'un régulateur positif. Le système à deux composants KinE/IlrE, également induit dans nos conditions, pourrait être un bon candidat puisqu'il est connu comme régulateur positif de l'activité phosphatase alcaline (O'Connell-Motherway *et coll.*, 2000). Quoi qu'il en soit, on observe une induction des gènes de transport de phosphate dans nos conditions de culture. Le lait est un milieu plutôt riche en phosphates mais la baisse de pH a un effet inhibiteur sur le transport du phosphate (Poolman *et coll.*, 1987d). Au cours de la culture, la baisse du pH entraîne probablement une diminution de l'import de phosphate mimant ainsi un état de carence que la cellule tente de contrer en induisant des transporteurs à plus haute affinité et plus efficaces. L'induction de la limitation en phosphate est peut-être destinée à augmenter la tolérance au stress acide puisqu'un lien entre la résistance aux bas pH et la mutation de transporteurs de phosphate a été découvert par Rallu *et coll.* (2000).

4.5. Les réponses non liées aux stress

Enfin, un certain nombre de réponses physiologiques qui ne semblent pas liées directement au métabolisme ou au stress sont induites au cours de la culture. On observe globalement une forte induction du métabolisme des purines. En effet, des gènes impliqués dans la biosynthèse des purines, *guaC*, *purA*, *purC*, *purD*, *purE*, *purF* et *purL* sont très fortement induits à 8,5 h avec des ratios compris entre 1,4 et 5,8. D'autres gènes, impliqués dans les voies de sauvetage, *xpt*, *deoB* et *prsA*, le sont également mais avec une moindre amplitude (ratios de 1,1 à 1,6). Le gène *pbuX* codant pour une xanthine perméase, la xanthine étant un précurseur des purines, et les gènes *trxA* (thioredoxin) et *trxB2* (thioredoxin reductase) impliqués dans les conversions de nucléotides sont également induits transitoirement. Parallèlement à cette induction, le métabolisme des pyrimidines est globalement réprimé puisque les gènes *udp*, *pyrH*, *dut*, *carB* sont sous-exprimés, et que *thyA*, dont le ratio d'expression à 8,5 h n'est que de 1,1, est vraisemblablement constitutif. Il existe probablement une régulation concertée entre purines et pyrimidines puisque l'induction d'une des voies est liée à la répression de l'autre. La forte induction de la synthèse des purines peut être liée soit aux stress, soit à un déficit du milieu en purines. En effet, le lait est un aliment pauvre en purines, et il est probable que les gènes de synthèse et de sauvetage soient induits en réponse à une carence. Un dosage des purines et pyrimidines dans des échantillons de culture nous permettrait d'éclaircir ce phénomène. On peut remarquer par ailleurs que seulement deux gènes (*guaA* et *dukA*) consécutifs dans le métabolisme des purines et la synthèse du GMP n'évoluent pas comme les autres gènes de la voie, leur sous-expression étant peut-être liée à une augmentation de résistance vis à vis du stress acide puisqu'un lien entre la résistance au stress acide et la délétion du gène *guaA* a déjà été mise en évidence par Rallu *et coll.* (2000).

Bien qu'aucune lyse systématique ne soit observée, de multiples fonctions phagiques sont induites (ratios maximaux de 1,2 à 3) au cours de la culture, comme observé précédemment lors d'une carence en carbone (Redon *et coll.*, 2005). La réponse phagique semble être très dépendante des conditions de culture. En effet, si l'on retrouve l'induction de 4 prophages ($\pi 1$, $\pi 2$, $\pi 3$ et $\pi 2$) dans les deux cultures en carence en carbone et en stress acide/hypothermique, le prophage $\pi 3$, réprimé ici, semble être induit spécifiquement en réponse à la carence carbone. Par contre, le prophage $\pi 1$ n'est induit au cours d'aucune de ces cultures. La signification physiologique et la cause d'une telle induction en condition de stress sont encore inconnues. Chez *Bacillus subtilis* et *E. coli* les réponses SOS sont remarquablement similaires (Love et Yasbin, 1984 ; 1986 ; Lovett et Roberts, 1985 ; Lovett *et coll.*, 1988) et consistent en l'induction de fonctions diverses comme la réparation de l'ADN, la mutagenèse, la filamentation, la réactivation de Weigle et l'induction de prophages (Love et Yasbin, 1984). Cette réponse est modulée par l'interaction des protéines RecA et LexA (Love et Yasbin, 1986) en réponse à un endommagement de l'ADN bactérien ou à l'inhibition de la réplication (Love et Yasbin, 1986 ; Lovett *et coll.*, 1988). L'existence d'une telle réponse SOS n'est que supposée chez *Lactococcus lactis* à cause de la mise en évidence de phénomènes assimilables à des réponses SOS (Lautier *et coll.*, 1988) et la découverte récente d'un gène « *lexA-like* », *dinR* (Wojciekowski *et coll.*, 1991 ; Raymond-Denis et Guillen, 1992). Bien qu'aucune induction des gènes *recA* et *dinR* ne soit observée, l'induction multiple des prophages tout au long de la culture est probablement reliée à une réponse « SOS-like » en relation avec les dommages à l'ADN provoqués par les stress environnementaux (*cf.* 4.5. Les réponses croisées aux stress).

5. Conclusion

L'étude de la souche industrielle LD61 dans des conditions proches d'un procédé fromager industriel a permis de mettre en évidence l'induction de voies métaboliques et de phénomènes physiologiques spécifiques de ces conditions de croissance et de stress. Alors qu'en phase de croissance, le contrôle du flux catabolique semble réparti entre la plupart des enzymes glycolytiques, une régulation glycolytique originale se met en place en phase de post-acidification. Quatre enzymes de la glycolyse (PFK, GAPDH, PGK et ENO), essentiellement impliquées dans le métabolisme des C3, et le système de transport PTS lactose, semblent assurer le contrôle du flux pendant toute cette phase. Dès 8,5 h de culture, à cause de la baisse de pH et/ou de température, une transition s'opère de la voie rapide (PTS lactose - voie du Tagatose) vers la voie lente (perméase - voie de Leloir) d'utilisation du lactose participant ainsi à la diminution de la vitesse spécifique d'utilisation du sucre. L'étude du transcriptome s'est avéré être un outil essentiel pour la confirmation des régulations observées à un niveau enzymatique. En effet, elle a permis de mettre en évidence l'induction de voies périphériques de la glycolyse permettant d'absorber l'excès de carbone engendré par le contrôle du flux, comme par exemple *dhak* et *dhaM* pour absorber l'excès de DHAP, ou la voie de synthèse des sucres nucléotides pour l'excès de G1P.

La diminution du taux de croissance dès le début de la culture s'accompagne d'une sous-expression plus ou moins tardive des fonctions cellulaires associées. Si la réplication, la synthèse de la paroi et la nutrition azotée répondent précocement en fin de phase de croissance (8,5 h, avant l'arrêt de croissance), d'autres fonctions comme la division cellulaire, la transcription et la traduction semblent maintenues au moins jusqu'à l'arrêt de croissance (sous-expression à 15 h).

Le stress acide permet l'induction des gènes de la voie ADI (Arginine déiminase), et de ceux de la voie de consommation du citrate (bien que le citrate ait été consommé dès le début de la culture), ainsi que l'augmentation de l'activité de l'ATPase membranaire, qui permettent de lutter contre l'acidification du cytoplasme, en revanche, il ne permet pas d'induire la totalité du régulon « Heat Shock » probablement car ce stress est trop modéré. Le stress froid semble secondaire pour la cellule par rapport au stress acide car la réponse spécifique induite est très partielle (quelques CIPs mais aucune CSP). Par contre, l'effet du refroidissement est semble-t-il prépondérant au niveau de la membrane puisque la réponse

observée correspond à une fluidisation de cette dernière. L'autoacidification et la baisse de température induisent un certain nombre de réponses croisées envers d'autres stress comme le choc thermique (HS), le stress oxydatif, et les carences en carbone et phosphates.

Il semble que l'arginine ait une grande importance dans ces conditions de stress puisque de nombreuses voies périphériques sont induites autour de cet acide aminé, en particulier la voie de synthèse et de transport des amines biogènes (putrescine et spermidine), produits qu'il convient d'éviter dans les productions agroalimentaires. Cependant, l'arginine fait partie des acides aminés minoritaires du lait (Lindmark-Manson *et coll.*, 2003), et il serait donc intéressant de vérifier qu'aucune carence en arginine n'est observée au cours de la culture. En ce qui concerne les fonctions d'intérêt industriel, il semble que la cellule induise des voies de synthèse de certains composés aromatiques comme le diacétyl, l'acétoïne ou le 2,3-butanediol, comme c'est le cas en aérobiose. Il n'a pas été observé d'activation des voies de biosynthèse des EPS bien que la voie de Leloir et certains gènes du métabolisme des sucres nucléotides soient induits. La production de la nisine (seul *nisB* est induit) n'est pas non plus induite dans nos conditions de culture.

L'analyse transcriptomique a, de plus, permis de mettre en évidence des phénomènes particuliers qui ne peuvent pour l'instant pas être reliés aux stress imposés, mais qui le seront peut-être dans l'avenir avec l'avancée des connaissances. Au cours de la culture, un état de carence en purines semble s'installer puisque de nombreux gènes des voies de synthèse et de sauvetage sont sur-exprimés. En parallèle, une inhibition de la synthèse des pyrimidines s'opère participant ainsi à un phénomène de régulation concertée. Il serait intéressant de doser l'évolution des concentrations en purines et pyrimidines au cours de la culture afin de déterminer si cet état de carence est réel et s'il peut influencer sur la croissance bactérienne, ou si cette réponse est un effet secondaire des stress rencontrés. D'autre part, l'induction de nombreux prophages est observée ici comme dans d'autres conditions de stress telles que la carence carbone. Cependant, il est important de noter que la nature de certains prophages induits diffère selon les conditions de stress, en particulier ps3. Cette induction de prophages n'entraîne pas la mise en place de cycles lytiques, et on peut alors se demander si c'est l'état de stress (acide et thermique, carence), via une réponse de type « SOS » ou simplement le ralentissement de la croissance qui est responsable de ce phénomène. Afin de relier ce phénomène à une réponse au(x) stress de type « SOS » il serait intéressant de regarder l'induction de ces gènes en condition de choc acide ou de choc thermique. En effet, dans les

deux cas le régulateur *recA* est impliqué comme dans la réponse « SOS », si les gènes de prophages sont induits dans ces conditions, leur expression dans des souches délétées du gène *recA* ou *dinR* pourra confirmer un lien avec les réponses aux stress.

L'étude transcriptomique réalisée ici est totalement complémentaire de l'étude métabolique. Il s'agit d'une méthode très exhaustive qui, bien qu'elle soit coûteuse en temps d'analyse, permet à la fois de confirmer les observations qui sont faites à des niveaux macroscopiques (cinétiques, enzymatiques...) et de mettre en évidence une série de voies métaboliques et de phénomènes qui seraient passés inaperçus après la seule analyse métabolique. Cette méthode est donc tout à fait complémentaire de l'analyse métabolique, idéale pour la visualisation des cinétiques d'adaptation, et qui ouvre la voie à des utilisations plus ciblées. C'est la première fois qu'une telle analyse transcriptomique en dynamique est réalisée en milieu complexe. Cependant, le nombre de prélèvements analysés par cette technique est limité, et leur espacement dans le temps est certainement un frein à l'observation d'inductions transitoires de courte durée ou à la quantification plus précise du niveau d'induction réel.

La vitesse d'acidification étant un point clé dans le contrôle des procédés fromagers, l'analyse transcriptomique peut être envisagée pour comparer deux souches ayant des vitesses maximales d'acidification différentes, soit en comparant leur caractéristique transcriptomique en phase de croissance et d'acidification rapide, soit en analysant différenciellement leur dynamique d'évolution face aux stress. Cette approche doit permettre de mettre en évidence, d'une part la nature des enzymes qui contrôlent le flux catabolique en début de culture, et le niveau (transcriptionnel, traductionnel ou allostérique) de ce contrôle, d'autre part, les particularités de réponse des souches face aux stress. L'identification de ces points de contrôle aboutira à terme à une compréhension mais aussi à une optimisation de la sélection/modification ciblée des souches en fonction des impératifs industriels.

Conclusion et perspectives

Lactococcus lactis est largement utilisée dans la fabrication des aliments fermentés (produits laitiers, charcuterie...). Ce micro-organisme présente, de multiples intérêts pour l'industrie agro-alimentaire et en particulier dans la fabrication des fromages puisqu'il est directement impliqué dans le procédé de transformation. En présence d'un substrat carboné adapté, comme le lactose, *Lactococcus lactis* va produire, à l'image des autres bactéries lactiques, des acides organiques. Le lactate représente le produit principal, mais, selon les conditions de culture, la qualité des produits peut se diversifier (acétate, formiate, éthanol). Lorsque le métabolisme est homofermentaire, le lactate représente plus de 90 % des produits de fermentation, et est responsable de l'acidification du lait et de la formation du caillé. Outre son implication directe dans la constitution de la matrice fromagère et dans les caractéristiques rhéologiques et texturales du produit fini, l'acidification du lait présente également, via son action inhibitrice vis à vis de la croissance bactérienne, un double intérêt sanitaire (inhibition de pathogènes) et organoleptique (inhibition de bactéries nuisibles aux qualités du produit). D'autres fonctions d'intérêt technologique sont également associées aux lactocoques, il s'agit de la production d'exopolysaccharides, de bactériocines, ainsi que de la protéolyse, qui participent également à la formation des qualités texturales et organoleptiques du produit fromager.

Les *lactococci* sont très largement étudiés et considérés comme micro-organismes modèles des bactéries lactiques. Les études réalisées portent principalement sur la régulation du métabolisme carboné, les fonctions d'intérêt technologique, ou les réponses aux stress, et ceci dans des conditions souvent très éloignées de celles rencontrées au cours des procédés de fabrication agroalimentaire (souches, milieux, dynamique et intensité du stress). Il est permis de se demander si les phénomènes et les comportements mis en évidence dans ces conditions « de laboratoire » sont extrapolables au monde industriel. Afin d'être sûr que les résultats de l'étude seront pertinents et exploitables au niveau des technologies fromagères, ce travail a été réalisé en collaboration avec un industriel fromager (SOREDAB). Nous avons ainsi défini des axes d'études pertinents vis à vis de la mise en œuvre des *lactococci*, ainsi que les conditions (souches, milieux, température, environnement gazeux) les plus proches possibles de celles rencontrées au cours des procédés. Deux axes de travail ont ainsi été définis, le premier concerne les éléments de régulation des différentes étapes de la cinétique d'acidification, alors que le second concerne lui sur la caractérisation et la mise en place des réponses métaboliques et transcriptionnelles de *L. lactis* au cours d'un procédé fromager.

La cinétique d'acidification est l'un des critères principaux de sélection des souches employées en tant que levain. En effet, c'est elle qui détermine la structure du caillé, et elle est en partie responsable (avec la production d'exopolysaccharides) des propriétés rhéologiques et texturales de la matrice fromagère. La compréhension globale du phénomène d'acidification va permettre une meilleure maîtrise des procédés existants, ainsi que la sélection rationnelle de souches adaptées à de nouveaux procédés. Au cours de cette thèse nous avons pu définir les paramètres de contrôle de l'acidification prise dans sa globalité : vitesse maximale, arrêt de l'anabolisme, post-acidification et pH à 24 heures. La stratégie employée pour élucider ces phénomènes repose sur une analyse macro- (croissance, acidification, évolution des substrats et produits de fermentation) et parfois micro-cinétique (mesure des activités enzymatiques, énergétique, flux glycolytique) dynamique et comparative dans diverses conditions de culture (lait, M17 ou milieux synthétiques, présence ou non d'oxygène, pH libre ou régulé), de plusieurs souches d'origine fromagère présentant des cinétiques d'acidification différentes dans un milieu modèle (rétentat) ou en lait écrémé. Quatre souches, LD61, LD71, LL39 et LC30, sélectionnées avec l'aide de la société SOREDAB ont été employées au cours de cette étude. Deux de ces souches, la souche de référence LD61 ainsi que la souche LC30, ont bénéficiées d'une étude plus approfondie, cinétique, enzymatique et énergétique, en milieu M17-lactose à pH libre.

Au cours de la plupart des procédés fromagers, le laitensemencé subit, en plus de l'auto-acidification, une cinétique de refroidissement qui diffère selon les produits. Nous avons choisi comme second axe de travail, d'étudier la souche de référence, LD61, dans des conditions se rapprochant le plus possible de celles rencontrées dans l'industrie. Une analyse physiologique et transcriptomique globale de la souche LD61 a donc été réalisée au cours d'une fermentation en lait G, en dynamique d'auto-acidification et de refroidissement. Ainsi pour la première fois, la régulation du métabolisme central chez *L. lactis* est appréhendée d'un point de vue métabolique et moléculaire dans les conditions de mise en œuvre technologique. La disponibilité de la séquence complète du génome de la souche *L. lactis* IL1403, ainsi que celle de nombreux plasmides, a permis de réaliser une analyse transcriptomique complète portant sur la totalité des ORFs identifiées. Ce travail permet donc en recoupant les données physiologiques (cinétiques de croissance, acidification, évolution des substrats et produits de fermentation, activités des enzymes du métabolisme central), avec les données issues de l'analyse de l'évolution des transcrits, de déterminer la dynamique de mise en place des réponses aux stress (acide et hypothermique) et leurs répercussions sur la croissance et le catabolisme.

Analyse phénotypique

La caractérisation cinétique des quatre souches dans divers milieux, complexes ou synthétiques, et en particulier en lait écrémé supplémenté ou non en sources d'azote facilement métabolisables, a permis de mettre en évidence deux phénotypes nutritionnels dans le milieu lait. Ainsi, il faut différencier les souches Prt⁺ (LD61), qui possèdent le plasmide codant pour la protéase de paroi, caractérisées par une amplitude d'acidification identique que le lait soit supplémenté ou non en substrats azotés facilement et rapidement métabolisables, des souches Prt⁻ (LD71, LC30 et LL39), dépourvues de ce plasmide, et dont l'amplitude d'acidification augmente cette fois lorsque le lait est supplémenté. Une croissance diauxique est retrouvée pour la souche LD61 en lait, comme précédemment observé par Letort *et coll.* (1995). Elle se caractérise par une phase de croissance rapide sur les quelques acides aminés et peptides du lait, suivie d'une phase de transition au cours de laquelle la protéase de paroi est synthétisée, ce qui permet ensuite à la souche de croître en dégradant les caséines. Cette seconde phase est par contre plus lente puisqu'elle implique deux étapes intermédiaires que sont la protéolyse des caséines puis le transport des peptides générés.

Seules deux souches, LD61 et LD71, appartenant au biovar *diacetylactis* et possédant donc le plasmide codant pour le transporteur du citrate, sont capables de consommer le citrate présent dans le lait. La dégradation de ce substrat, qui est présent en faibles quantités dans le lait (< 10mM), ne modifie en rien le métabolisme carboné de ces bactéries qui demeure homolactique dans le lait.

Les différences de phénotype nutritionnel sont responsables, pour les quatre souches, des écarts de cinétiques d'acidification observées en milieu lait. Afin de s'affranchir de ces limitations, et d'avoir accès uniquement aux régulations « cataboliques » de l'acidification, le milieu M17-lactose a été employé. Il s'agit d'un milieu riche, qui contient entre autre de la peptone et de l'extrait de levure, sources de peptides et d'acides aminés, et afin de se rapprocher des conditions du lait, le lactose est utilisé comme source de carbone. De plus, ce milieu est particulièrement intéressant car sa richesse lui procure un pouvoir tampon proche de celui du lait, tout en permettant des mesures comme celles des paramètres énergétiques impossibles en milieu lacté.

En milieu M17, trois des quatre souches possèdent des cinétiques de croissance et d'acidification comparables, et seule la souche LC30 croît et acidifie plus lentement et de façon moins importante que les autres. Dans tous les cas, les cinétiques sont bi-phasiques avec une première phase durant laquelle croissance et acidification sont concomitantes, puis une phase dite de post-acidification caractérisée par un catabolisme, et une acidification, ralentis alors que la croissance cellulaire est arrêtée.

Lactococcus lactis est une bactérie anaérobie mais aérotoleante. Pour les deux souches LD61 et LD71 (appartenant au biovar *diacetylactis*) des cultures en aérobiose ont été réalisées afin d'estimer l'effet de la présence d'oxygène sur la croissance et l'acidification, en lait écrémé et en milieu M17-lactose. Dans nos conditions de culture, la présence d'oxygène a un effet limité sur la croissance puisqu'elle entraîne une diminution du taux de croissance, un allongement de la phase de croissance et une augmentation du rendement en biomasse. En aérobiose, et notamment dans le lait écrémé, la production d'acétate est augmentée, probablement du fait de l'activation de la pyruvate déshydrogénase par l'oxygène. Malgré cette production le métabolisme observé demeure homolactique pour toutes les cultures, et la synthèse de produits comme le diacétyle ou l'acétoïne n'a pu être détectée même dans le lait alors qu'il y a co-métabolisation du citrate et du lactose par ces deux souches. Les faibles quantités de citrate présentes dans le lait, ainsi que l'instabilité et les faibles proportions de ces deux produits expliquent probablement l'absence de détection. L'augmentation des

quantités d'acétate, et donc d'ATP, synthétisées ne semble pas suffisante pour permettre une croissance plus rapide des deux souches *diacetylactis*.

Régulation de l'acidification

Afin d'expliquer les différences d'acidification observées entre les souches de lactococques, un lien étroit entre anabolisme et catabolisme chez *L. lactis* a été envisagé. En effet, la vitesse d'acidification serait directement liée au flux glycolytique lui-même contrôlé par les capacités anaboliques. L'analyse statistique réalisée sur l'ensemble de nos données de fermentation a permis d'établir une absence totale de corrélation, d'une part entre capacités cataboliques (v_{Lac} , vitesse spécifique d'acidification) et anaboliques (μ), et d'autre part entre le catabolisme et la vitesse maximale d'acidification (V_{max}). Il existe dans nos conditions aucune corrélation entre anabolisme et catabolisme. La vitesse maximale d'acidification semble dépend donc essentiellement de la croissance, et par conséquent des capacités anaboliques de chaque souche (spécificité de transporteurs, auxotrophies...) ainsi que du milieu de culture.

Au cours de la phase de croissance en milieu M17-lactose, le contrôle du flux glycolytique semble partagé entre plusieurs enzymes pour les souches LD61 et LC30. La GAPDH et la PK sont communes aux deux souches et présentent des activités ajustées au flux, la GLK, par contre ne semble limitante que pour la souche LD61. Ces résultats suggèrent que pour cette dernière souche, une grosse partie du flux d'entrée du lactose est assurée par le système PTS, alors que pour la souche LC30, il l'est vraisemblablement par une perméase. Ces trois enzymes sont connues pour être des points de contrôle du flux dans des souches et des conditions particulières. Cependant, la PFK et la PK, toutes deux codées au niveau du même opéron (*las*), sont souvent impliquées en même temps dans le contrôle du flux, ce qui n'est le cas pour aucune de nos souches. Il n'a encore, à ma connaissance, jamais été mis en évidence de contrôle partagé entre la GAPDH et la PK. Ce type de contrôle ne semble pas anecdotique puisque les deux souches étudiées sont concernées.

Arrêt de l'anabolisme

Selon les souches et les conditions de culture plusieurs causes sont responsables de l'arrêt de l'anabolisme. Tout d'abord, l'une des causes principales de l'arrêt de croissance est la limitation nutritionnelle. Elle est en effet incriminée pour toutes les souches de phénotype Prt⁻ en lait écrémé, et probablement également pour la souche LC30 même en milieu M17-lactose.

Différentes données caractérisant l'état énergétique des cellules, rendement en ATP, coefficient de maintenance, ont été déterminées. L'analyse de ces paramètres pour différentes cultures a permis de mettre en évidence l'implication d'un déficit énergétique dans l'arrêt du catabolisme à pH régulé en lait G. En effet, lorsque le pH est maintenu à une valeur de 6,4, la totalité du lactose présent dans le milieu est consommé et un état de carence en carbone s'installe.

Au cours de la croissance, et plus tard de la post-acidification, la production de lactate provoque une diminution du pH externe et du pH interne. Avec cette acidification, les concentrations de la forme non dissociée, l'acide lactique, augmentent. Il s'agit d'une forme considérée comme potentiellement inhibitrice puisqu'elle diffuse librement à travers la membrane cellulaire. Une fois à l'intérieur de la cellule l'acide lactique va se dissocier puisque le pH intracellulaire est plus basique que celui du milieu, et participera ainsi à l'acidification du cytoplasme. La comparaison de cultures de la souche LD61, radicalement différentes en terme de milieux (MS10r et M17) et d'acidification, a permis de conclure quant au rôle prépondérant de la concentration en acide lactique dans l'inhibition de la croissance. Ce phénomène se reproduit également pour deux autres souches (LD71, LL39), et une concentration moyenne inhibitrice de 6,9 mM d'acide lactique a même pu être établie pour les trois souches. A pH libre, le ralentissement de la croissance de la souche LD61, provoqué par des concentrations inhibitrices d'acide lactique, est associé à une diminution de la vitesse de production d'ATP. Cependant, ce dernier terme évolue dans une moindre proportion que le taux de croissance, ce qui a pour conséquence d'entraîner un découplage entre les deux fonctions, anabolisme et catabolisme, qui se poursuit jusqu'en phase de post-acidification. Dans cette condition, l'inhibition de la croissance ne peut être attribué à une limitation de l'approvisionnement en énergie.

Au cours de la croissance, et plus tard de la post-acidification, la production de lactate provoque une diminution du pH du milieu de culture. La répercussion de ce phénomène au niveau du pH intracellulaire est ralentie par l'activation d'une enzyme, l'ATPase membranaire, qui en expulsant des protons intracellulaires, va permettre la création d'un gradient de pH transmembranaire. Lorsque l'acidification est rapide et la croissance arrêtée par la concentration en acide lactique (LD61), le gradient de pH est faible (0,5 upH) et maintenu jusqu'à l'arrêt de croissance. Par contre pour la souche *cremoris*, en condition de limitation nutritionnelle (LC30), un gradient plus élevé est observé durant la phase de croissance (0,83 upH) mais il n'est pas maintenu.

Trois enzymes, la GLK, la PGK et la GAPDH, sont impliquées dans le contrôle du flux glycolytique de la souche LD61 à l'arrêt de croissance, alors que pour la souche LC30, seule la GAPDH semble en cause.

Post-acidification et pH à 24 heures

A pH libre, la phase de croissance est toujours suivie d'une phase de post-acidification, quel que soit le milieu ou la souche considérée. Bien que les capacités cataboliques soient comparables pour les quatre souches en phase de croissance, ce n'est plus le cas ici.

La baisse du pH externe provoquée par la production de lactate est responsable, malgré la présence d'un gradient de pH transmembranaire, de la diminution du pH intracellulaire. L'étude de la sensibilité au pH des enzymes glycolytiques a permis d'établir l'effet inhibiteur et parfois drastique de ce facteur. En plus des deux souches LD61 et LC30, les profils de sensibilité au pH des enzymes de la souche MG1363 ont également été intégrés à l'étude. Parmi les trois souches étudiées aucune n'a présenté de profils d'inhibition significativement différents des autres. Les différences de post-acidification existant entre les souches LD61 et LC30 sont donc liées aux profils d'évolution des pH intracellulaires à partir de l'arrêt de croissance. L'analyse statistique de différents paramètres a en effet permis de mettre en évidence un lien entre pH à l'arrêt de croissance et vitesse de post-acidification. En effet, plus le pH à l'arrêt de croissance est élevé et plus la vitesse de post-acidification est importante.

Lors des sélections des souches en Cinac, en lait écrémé thermisé, il a été observé que pour les souches de phénotype Prt^+ , la supplémentation du lait entraînait à chaque fois une augmentation de la V_{max} d'acidification mais également l'obtention d'un pH à 24 heures de culture légèrement supérieur à celui du lait seul. Une V_{max} d'acidification plus lente permettrait peut-être une meilleure adaptation des souches, et donc un pH à 24 heures plus bas. Ce phénomène n'a pu être mis en évidence qu'au cours des cultures en lait écrémé thermisé et semble propre à ce milieu.

Il a été montré que lorsque l'arrêt de croissance est dû à l'inhibition par la concentration en acide lactique (souches LD61, LD71, LL39 en M17), la post-acidification est terminée à 24 heures de culture. Le pH interne atteint à ce moment là une valeur limite (de 4,84 upH de moyenne), responsable de la chute d'activités de certaines enzymes glycolytiques (PFK et PGK) provoquant un arrêt du flux glycolytique. Dans ce cas, les valeurs de pH externe et de pH interne ne sont pas significativement différentes entre les souches. Par contre, lorsque l'arrêt de croissance est lié à une limitation de type nutritionnelle, comme c'est le cas de la souche LC30 en M17, les pH (externe ou interne) mesurés à 24 heures de culture sont significativement supérieurs à ceux des trois autres souches. Cependant, il semble que dans ce cas la post-acidification ne soit pas achevée à 24 heures, puisque des valeurs minimales, proches de celles observées pour les trois souches précédentes, sont obtenues après 24 heures. Cette hypothèse est également corroborée par le fait qu'aucune baisse de concentration, ni aucune différence de sensibilité des enzymes glycolytiques au pH n'a été montrée, et qu'à 24 heures de culture aucune enzyme ne limite le flux. Pour toutes les souches testées la valeur minimale de pH atteinte est comparable, et seul va différer le moment auquel cette valeur sera atteinte. En effet, il va dépendre des caractéristiques phénotypiques de la souche et du déroulement de la cinétique d'acidification.

Dynamique de stress... un pas vers le procédé fromager

L'analyse transcriptomique combinée à une caractérisation phénotypique et métabolique de la souche *L. lactis* biovar *diacetylactis* d'origine fromagère, LD61, est un outil très puissant pour obtenir une vue d'ensemble du comportement cellulaire. Le cumul à l'auto-acidification du refroidissement du milieu, n'a aucun effet significatif sur la croissance de la souche LD61. En effet, la cinétique de refroidissement est lente et la température est encore de 27°C lorsque l'anabolisme s'arrête à cause de l'inhibition par l'acide lactique non dissocié. Par contre, la phase de post-acidification est ralentie par la baisse de température et prolongée jusqu'à environ 180 heures de culture.

Au cours de cette étude, l'absence de données concernant les concentrations en métabolites intracellulaires a été compensée par les données transcriptomiques qui ont mis en évidence l'activation de voies périphériques en amont des points de contrôle caractérisés par l'analyse enzymatique. Contrairement à ce qui est observé pour cette souche en milieu M17, dans le lait G le contrôle du flux est partagé en phase de croissance entre de nombreuses enzymes. Si la PGK, la GAPDH, et la PK jouent encore un rôle important ici, la PGK et l'ENO sont également impliquées dans ce contrôle. Comme en milieu M17, la GAPDH conserve une activité ajustée au flux durant toute la culture, mais dans le lait, la PGK présente également un tel comportement. En fin de post-acidification, trois enzymes voient leurs activités fortement diminuer (GLK, PFK et ENO) et sont probablement responsable de l'arrêt du catabolisme. L'évolution des transcrits des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme central a permis de confirmer le point de contrôle au niveau des trioses (GAPDH, PGK et ENO), mis en évidence par l'étude des activités enzymatiques *in vivo*. En effet, une déviation du flux semble se mettre en place, à un niveau transcriptionnel, en amont de chacune des enzymes (déviation du DHAP vers la synthèse des acides gras). De même, une ré-orientation du transport du lactose semble se mettre en place avec une déviation du flux vers la voie de Leloir et donc l'utilisation préférentielle du système perméase à la place du PTS pour l'entrée du sucre.

Outre un apport réel dans l'analyse métabolique, l'étude de l'évolution des transcrits permet également de caractériser les voies induites en réponse aux stress acide et thermique. De nombreuses voies précédemment identifiées comme impliquées dans la réponse au stress acide et au stress hypo-thermique, ainsi que des réponses croisées vis à vis d'autres stress (hyper-thermique, oxydatif), sont également mises en évidence. Le métabolisme de l'arginine semble essentiel dans la lutte contre ces stress cumulés puisque de nombreux gènes impliqués dans des voies liées au métabolisme de cet acide aminé sont induits. Cependant, l'induction de la réponse spécifique au choc froid n'est que partielle, et le stress acide lié à l'auto-acidification semble également un stress modéré. Les stress intenses généralement étudiés (« chocs ») ne correspondent donc pas à la réalité physiologique des stress rencontrés au cours des procédés.

Cette analyse transcriptomique exhaustive permet également de souligner la mise en place de réponses originales, car elles ne sont apparemment pas directement liées aux deux stress, que sont la réponse à la carence phosphate, l'induction des voies de biosynthèse des purines ou celle de gènes de prophages.

Cette approche globale, dans un environnement de culture contrôlé, ouvre la voie vers une meilleure compréhension des bactéries lactiques dans leurs contextes d'intérêt, c'est à dire dans les conditions des procédés industriels. L'analyse dynamique des transcrits est complémentaire des analyses phénotypiques et métaboliques, et certainement une méthodologie d'avenir pour l'étude des microorganismes d'intérêt agro-alimentaire puisqu'elle permettra d'appréhender les fondements génomiques des propriétés technologiques et des variations phénotypiques.

Perspectives

Le travail réalisé au cours de cette thèse a permis d'établir un modèle de régulation de l'acidification, ainsi que les réponses induites par la dynamique de stress rencontrée au cours d'un procédé fromager. Néanmoins, certains travaux mériteraient d'être approfondis ou plus développés. Tout d'abord, la stratégie employée au cours de cette étude repose sur une comparaison de souches et de conditions de cultures différentes. La répétition de certaines cultures s'est avérée indispensable à l'établissement des conclusions, puisque seule une étude statistique a permis de conclure quant à la validité des observations. Cependant, certaines cultures n'ont été réalisées qu'une seule fois et il serait intéressant de les reproduire afin de valider les comportements, et vérifier la reproductibilité de certaines valeurs comme la concentration d'acide lactique inhibitrice de la croissance et le pH interne à 24 heures par exemple.

D'autre part, les souches sélectionnées sur la base de comportements acidifiants différents en lait, s'avèrent comparables en terme de contrôle glycolytique. Il serait intéressant de réaliser de nouvelles sélections de souches d'origine fromagère, peut-être même en milieu M17-lactose, afin de vérifier si toutes les souches de lactocoques présentent un schéma de régulation métabolique comparable, et si non de déterminer à quel niveau se situe l'hétérogénéité de comportement. Une caractérisation cinétique et énergétique de ces nouvelles souches, ainsi que de leurs enzymes glycolytiques, et en particulier de l'effet inhibiteur du pH sur ces dernières, permettra d'appréhender la diversité des schémas de régulation métabolique chez *Lactococcus*.

La souche LC30 s'est révélée significativement différente des trois autres souches étudiées que ce soit en milieu lacté ou en M17-lactose. Les différents résultats obtenus à pH libre et à pH régulé semblent indiquer qu'en condition d'auto-acidification l'arrêt de l'anabolisme est provoqué par une limitation nutritionnelle ou par une substance inhibitrice autre que l'acide lactique, et qu'à 24 heures de culture la post-acidification n'est pas terminée. Il serait intéressant de prolonger une culture de la souche LC30 à pH libre jusqu'à atteindre la valeur de pH la plus basse et de définir la valeur de pH intracellulaire responsable de l'arrêt du catabolisme, de même que les enzymes impliquées dans l'arrêt du flux glycolytique. Le milieu M17 est un milieu très riche en divers peptides ainsi qu'en acides aminés libres, une limitation nutritionnelle dans ce type de milieu semble peu probable. Il pourrait être

intéressant de réaliser un milieu M17 supplémenté en acides aminés libres et/ou vitamines afin de valider l'état de carence nutritionnelle pour cette souche.

L'étude de l'évolution des activités des enzymes de la glycolyse au cours de plusieurs fermentations a permis d'établir pour deux des souches (la souche *L. lactis* ssp. *cremoris* LC30, et la souche *L. lactis* biovar *diacetylactis* LD61), en milieu complexe M17-lactose, les points de contrôle du flux glycolytique à pH libre. Certaines enzymes, dont deux sont impliquées dans le métabolisme des trioses, GAPDH et PGK, ainsi que la PFK et la PK, semblent contrôler le flux à divers moments de la culture. Les concentrations des métabolites intracellulaires n'ont pu être mesurées ni en milieu M17-lactose, ni dans le lait écrémé, or elles permettent de valider les points de contrôle du flux mis en évidence par l'étude des activités enzymatiques. Ne disposant pas de ces valeurs en lait, nous avons par ailleurs montré qu'une analyse transcriptomique permet de pallier à l'absence de données sur l'évolution des métabolites intracellulaires, en mettant en évidence l'induction de voies de délestage du flux en amont des points de contrôle. Afin de vérifier que ces enzymes sont bien limitantes vis à vis du flux et le contrôlent, il serait intéressant de moduler leurs activités et de regarder l'effet de telles modifications sur le flux glycolytique, et/ou de réaliser une étude transcriptomique en parallèle à l'analyse métabolique pour ces deux souches en milieu M17-lactose.

Les résultats fournis par l'analyse combinée du métabolisme et du transcriptome, dans des conditions de dynamiques de stress acide et thermique rencontrées au cours de procédés fromagers, sont particulièrement intéressants. A plus long terme, il serait envisageable de réaliser, dans ces mêmes conditions, l'étude combinée complète d'une nouvelle souche de *L. lactis* d'origine fromagère qui présenterait des caractéristiques métaboliques différentes de la souche de référence LD61. Il paraît également intéressant de dissocier l'effet des différents stress, en réalisant une étude transcriptomique à pH libre à 34°C, et à pH régulé avec un refroidissement du milieu, afin de déterminer les réponses spécifiques à chaque stress. L'analyse de l'effet d'autres stress, également rencontrés au cours des procédés (osmotique, oxydatif), pourrait également être envisagée afin de déterminer là encore l'induction de réponses spécifiques et de mettre en évidence, par comparaison, les réponses générales aux stress induites indifféremment dans l'ensemble des conditions.

Le métabolisme de l'arginine semble particulièrement important dans les réponses aux stress acide et hypo-thermique, on peut se demander quel serait l'effet d'une supplémentation du milieu en arginine sur la croissance et sur l'acidification de la souche *L. lactis* LD61. Cette étude pourrait être réalisée en milieu M17-lactose afin de pouvoir relier le métabolisme de l'arginine à un effet éventuel sur l'énergétique cellulaire, par exemple par l'augmentation du découplage anabolisme/catabolisme, un meilleur maintien des gradients de pH, et pourquoi pas l'obtention d'un pH externe final plus important.

Références bibliographiques

A

Abbe K., Takahashi S., Yamada T. (1982) Involvement of oxygen-sensitive pyruvate formate-lyase in mixed-acid fermentation by *Streptococcus mutans* under strictly anaerobic conditions. *J. Bacteriol.* 152: 175-182.

Altermann E., Russell W.M., Azcarate-Peril M.A., Barrangou R., Buck B.L., McAuliffe O., Souther N., Dobson A., Duong T., Callanan M., Lick S., Hamrick A., Cano R., Klaenhammer T.R. (2005) Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 3906-3912.

Andersen H.W., Solem C., Hammer K., Jensen P. R. (2001) Twofold reduction of phosphofructokinase activity in *Lactococcus lactis* results in strong decreases in growth rate and glycolytic flux. *J. Bacteriol.* 183: 3458-3467.

Andersson U., Radstrom P. (2002) Physiological function of the maltose operon regulator, MalR, in *Lactococcus lactis*. *BMC Microbiol.* 2: 28-34.

Arikado E., Ishihara H., Ehara T., Shibata C., Saito H., Kakegawa T., Igarashi K., Kobayashi H. (1999) Enzyme level of enterococcal F1F0-ATPase is regulated by pH at the step of assembly. *Eur. J. Biochem.* 259: 262-268.

van Asseldonk M., Simons A., Visser H., de Vos W.M., Simons G. (1993) Cloning, nucleotide sequence, and regulatory analysis of the *Lactococcus lactis* dnaJ gene. *J. Bacteriol.* 175: 1637-1644.

Aymes F., Monnet C., Corrieu G. (1999) Effect of alpha-acetolactate decarboxylase inactivation on alpha-acetolactate and diacetyl production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis*. *J. Biosc. Bioeng.* 87 : 87-92.

B

Bandell M., Lhotte M.E., Marty-Teyssset C., Veyrat A., Prevost H., Dartois V., Divies C., Konings W.N., Lolkema J.S. (1998) Mechanism of the citrate transporters in carbohydrate and citrate cometabolism in *Lactococcus* and *Leuconostoc* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1594-1600.

Bardowski J., Ehrlich S.D., Chopin A. (1994) BglR protein, which belongs to the BglG/SacY family of transcriptional anti-terminators, is involved in β -glucosidase utilization in *L. lactis*. *J. Bacteriol.* 176: 5681-5685.

Bassit N., Boquien C.Y., Picque D., Corrieu G. (1993) Effect of initial oxygen concentration on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1893-1897.

Bakker E.P., Harold F.M. (1980) Energy coupling to potassium transport in *Streptococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* 255: 433-440.

Belli W.A., Marquis R.E. (1991) Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1134-1138.

- Bender G.R., Marquis R.E.** (1987) Membrane ATPases and acid tolerance of *Actinomyces viscosus* and *Lactococcus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2124-2128.
- Benson K.H., Godon J.-J., Renault P., Griffin H.G., Gasson M.J.** (1996) Effect of *ilvBN*-encoded α -acetolactate synthase expression on diacetyl production in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 107-111.
- Benthin J., Nielsen J., Villadsen J.** (1994) Galactose expulsion during lactose metabolism in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FD1 due to dephosphorylation of intracellular galactose-phosphate. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1254-1259.
- Berlett B.S., Stadtman E.R.** (1997) Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272: 20313-20316.
- Bissette D.L., Anderson R.L.** (1974) Lactose and D-galactose metabolism in group N streptococci : presence of enzymes for both the D-galactose 1-phosphate and D-tagatose 6-phosphate pathways. *J. Bacteriol.* 117: 318-320.
- Blank L.M., Koebmann B.J., Michelsen O., Nielsen L.K., Jensen P.R.** (2001) Hemin reconstitutes proton extrusion in an H(+)-ATPase-negative mutant of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 183: 6707-6709.
- le Bloas P., Guilbert N., Loubière P., Lindley N.D.** (1993) Growth inhibition and pyruvate overflow during glucose metabolism of *Eubacterium limosum* are related to a limited capacity to reassimilate CO₂ by the acetyl-CoA pathway. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1861-1869.
- Blount P., Moe P.C.** (1999) Bacterial mechanosensitive channels: integrating physiology, structure and function. *Trends in Microbiol.* 7: 420-424.
- Boch J., Kempf B., Schmid R., Bremer E.** (1996) Synthesis of the osmoprotectant Glycine betaine in *Bacillus subtilis* : characterisation of the *gbsAB* genes. *J. Bacteriol.* 178: 5121-5129.
- Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarne K., Weissenbach J., Ehrlich S. D., Sorokin A.** (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* 11: 731-753.
- Brandi A., Pietroni P., Gualerzi C.O., Pon C.L.** (1996) Post-transcriptional regulation of CspA expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 19: 231-240.
- Bruinenberg P.G., Vos P., de Vos W.** (1992) Proteinase overproduction in *Lactococcus lactis* strains : regulation and effect on growth and acidification in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 78-84.
- Bunthof C.J., Van Den Braak S., Breeuwer P., Rombouts F.M., Abee T.** (1999) Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Appl. Env. Microbiol.* 65: 3681-3689.

C

Christensen J.E., Dudley E.G., Pederson J.H., Steele J.L. (1999) Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuw.* 76: 217-246

Cocaign-Bousquet M., Garrigues C., Novak L., Lindley N.D., Loubière P. (1995) Rational developpement of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*. *Appl. Bacteriol.* 79: 108-116.

Cocaign-Bousquet M., Lindley N.D. (1995) Pyruvate overflow and carbon flux within the central metabolic pathway of *Corynebacterium glutamicum* during growth on lactate. *Enz. Microbiol. Technol.* 17: 260-267.

Cocaign-Bousquet M., Garrigues C., Loubière P., Lindley N.D. (1996) Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuw.* 70: 253-267.

Cocaign-Bousquet M., Even S., Lindley N.D., Loubière P. (2002) Anaerobic sugar catabolism in *Lactococcus lactis* : genetic regulation and enzyme control over pathway flux. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 24-32.

Cogan J.F., Walsh D., Condon S. (1989) Impact of aeration on the metabolic end products formed from glucose and galactose by *Streptococcus lactis*. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 77-84.

Condon S. (1987) Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* 46: 269-280.

Cotter P.D., Hill C. (2003) Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 429-453.

Crow V.L., Thomas T.D. (1982) Arginine metabolism in lactic streptococci. *J. Bacteriol.* 150 : 1024-1032.

Crow V.L., Thomas T.D. (1984) Properties of a *Streptococcus lactis* strain that ferments lactose slowly. *J. Bacteriol.* 157: 28-34.

Csonka L.N. (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* 53 : 121-147.

Cvitkovitch D.G., Boyd D.A., Thevenot T., Hamilton I.R. (1995) Glucose transport by a mutant of *Streptococcus mutans* unable to accumulate sugars via the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* 177: 2251-2258.

Czapski G. (1984) Reaction of OH. *Methods Enzymol.* 105: 209-215.

D

Denayrolles M., Aigle M., Lonvaud-Funel A. (1994). Cloning and sequence analysis of the

gene encoding *Lactococcus lactis* malolactic enzyme : relationships with malic enzymes. *FEMS Microbiol. Lett.* 116: 79–86.

Detmers F.J., Lanfermeijer F.C., Abele R., Jack R.W., Tampe R., Konings W.N., Poolman B. (2000) Combinatorial peptide libraries reveal the ligand-binding mechanism of the oligopeptide receptor OppA of *Lactococcus lactis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97: 12487-12492.

Deutscher J., Saier M.H. Jr. (1983) ATP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of a seryl residue in HPr, a phosphate carrier protein of the phosphotransferase system in *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 80: 6790-6794.

Deutscher J., Küster E., Bergstedt U., Charrier V., Hillen W. (1995) Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 15: 1049-1053.

Djordjevic G.M., Tchieu J.H., Saier M.H. Jr. (2001) Genes involved in control of galactose uptake in *Lactobacillus brevis* and reconstitution of the regulatory system in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183: 3224-3236.

Doeven M.K., Kok J., Poolman B. (2005) Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Mol. Microbiol.* 57: 640-649.

Doly M., Vennat J.C., Cardot J.M., Cardot P. (1994) Eléments de statistique et de probabilités. *Interéditions, Paris.*

Dominguez H., Rollin C., Guyonvarch A., Guerin-Kern J.-L., Coccagn-Bousquet M., Lindley N.D. (1998) Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose. *Eur. J. Biochem.* 254: 96-102.

Dossonnet V., Monedero V., Zagorec M., Galinier A., Perez-Martinez G., Deutscher J. (2000) Phosphorylation of HPr by the bifunctional HPr kinase/P-ser-HPr phosphatase from *Lactobacillus casei* controls catabolite repression and inducer exclusion but not inducer expulsion. *J. Bacteriol.* 182: 2582-2590.

Drici-Cachon Z., Guzzo J., Cavin J.-F., Diviès C. (1996) Acid tolerance in *Leuconostoc oenos*. Isolation and characterisation of an acid-resistant mutant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 785-789.

Driessen A.J.M., de Jong S., Konings W.N. (1987a) Transport of branched-chain amino acids in membrane vesicles of *Streptococcus cremoris*. *J. Bacteriol.* 169: 5193-5200.

Driessen A.J.M., Hellingwerf K.J., Konings W.N. (1987b). Mechanism of energy coupling to entry and exit of neutral and branched chain amino acids in membrane vesicles of *Streptococcus cremoris*. *J. Biol. Chem.* 262: 12438-12443.

Driessen A.J., Poolman B., Kiewiet R., Konings W.N. (1987c) Arginine transport in *Streptococcus lactis* is catalyzed by a cationic exchanger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 6093-6097.

Driessen A.J., van Leeuwen C., Konings W.N. (1989a) Transport of basic amino acids by membrane vesicles of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 171: 1453-1458.

Driessen A.J., Molenaar D., Konings W.N. (1989b) Kinetic mechanism and specificity of the arginine-ornithine antiporter of *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 264: 10361-10370.

Drinan D.F., Robin S., Cogan T.M. (1976) Citric acid metabolism in hetero- and homofermentative lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 481-6.

Duwat P., de Oliveira R., Ehrlich S.D., Boiteux S. (1995) Repair of oxidative DNA damage in gram-positive bacteria: the *Lactococcus lactis* Fpg protein. *Microbiology.* 141: 411-417.

Duwat P., Ehrlich S.D., Gruss A. (1999) Effects of metabolic flux on stress response pathways in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 31: 845-858.

Duwat P., Sourice S., Cesselin B., Lamberet G., Vido K., Gaudu P., Le Loir Y., Violet F., Loubiere P., Gruss A. (2001) Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J. Bacteriol.* 183: 4509-4516.

E

Earnshaw R.G., Appleyard J., Hurst R.M. (1995) Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *Int. J. Food Microbiol.* 28: 197-219.

Eaton T., Shearman C., Gasson M. (1993) Cloning and sequence analysis of the dnaK gene region of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 3253-3264.

Einarsson H., Eklund T., Nes I.F. (1988) Inhibitory mechanisms of Maillard reaction products. *Microbios.* 53:27-36.

Epstein W., Naono S., Gros F. (1966) Synthesis of enzymes of the lactose operon during diauxic growth of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24: 588-592.

Erlandson K.A., Park J.H., Wissam, El Khal, Kao H.H., Basaran P., Brydges S., Batt C.A. (2000) Dissolution of xylose metabolism in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3974-3980.

Even S., Garrigues C., Loubière P., Lindley N.D., Cocaign-Bousquet M. (1999) Pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis* is dependent upon glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity. *Metabolic Eng.* 1: 198-205.

Even S. (2001) Régulation des voies centrales chez *Lactococcus lactis* : intégration des profils métaboliques et transcriptionnels. *Thèse doctorale* (N° d'ordre : 615), INSA, Toulouse, France.

Even S., Lindley N.D., Cocaign-Bousquet M. (2001) Molecular physiology of sugar catabolism in *Lactococcus lactis* IL1403. *J. Bacteriol.* 183: 3817-3824.

Even S., Lindley N.D., Loubiere P., Cocaign-Bousquet M. (2002) Dynamic response of catabolic pathways to autoacidification in *Lactococcus lactis* : transcript profiling and stability in relation to metabolic and energetic constraints. *Mol. Microbiol.* 45: 1143-1152.

Exterkate F.A., de Veer G.J.C.M. (1987) Optimal growth of *Streptococcus cremoris* HP in milk is related to β - and κ -casein degradation. *Appl. Environ. Biotechnol.* 25: 471-475.

F

Fang L., Jiang W., Bae W., Inouye M. (1997) Promoter-independent cold-shock induction of *cspA* and its derepression at 37 degrees C by mRNA stabilization. *Mol. Microbiol.* 23: 355-364.

Farr S.B., Kogoma T. (1991) Oxidative stress responses in *E. coli* and *S. typhimurium*. *Microbiol. Rev.* 55: 561-585.

Farrow J.A. (1980) Lactose hydrolysing enzymes in *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* and also in some other species of streptococci. *J. Appl. Bacteriol.* 49: 493-503.

Ferain T., Schanck A.N., Delcour J. (1996) ¹³C nuclear magnetic resonance analysis of glucose and citrate end products in a *ldhL-ldhD* double-knockout strain of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 178: 7311-7315.

Flambard B., Richard J., Juillard V. (1997) Interaction between proteolytic strains of *Lactococcus lactis* influenced by different types of proteinase during growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2131-2135.

Flambard B., Helinck S., Richard J., Juillard V. (1998) The contribution of caseins to the amino acid supply for *Lactococcus lactis* depends on the type of cell envelope proteinase. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1991-1996.

Folgering J.H., Moe P.C., Schuurman-Wolters G.K., Blount P., Poolman B. (2005) *Lactococcus lactis* uses MscL as its principal mechanosensitive channel. *J. Biol. Chem.* 280: 8784-8792.

Fortier L.C., Tourdot-Marechal R., Divies C., Lee B.H., Guzzo J. (2003) Induction of *Oenococcus oeni* H⁺-ATPase activity and mRNA transcription under acidic conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 222: 165-169.

Foster J.W., Hall H.K. (1990) Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 172: 771-778.

Foucaud C., Kunji E.R., Hagting A., Richard J., Konings W.N., Desmazeaud M., Poolman B. (1995) Specificity of peptide transport systems in *Lactococcus lactis*: evidence for a third system which transports hydrophobic di- and tripeptides. *J. Bacteriol.* 177: 4652-4657.

Frees D., Vogensen F.K., Ingmer H. (2003) Identification of proteins induced at low pH in *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.* 87: 293-300.

Fridovich I. (1998) Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* 201: 1203-1209.

Fuller R. (1991) Probiotics in human medicine. *Gut.* 32: 439-442.

Fuller R. (1992) History and development of probiotics. Probiotics, the scientific basis, p1-8. (Editeur: Fuller R) Chapman et Hall, London.

Futai M., Noumi T., Maeda M. (1989) ATP synthase (H⁺-ATPase): results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 111-136.

G

Galinier A., Kravanja M., Engelmann R., Hengstenberg W., Kilhoffer M.C., Deutscher J., Haiech J. (1998) New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 1823-1828.

Galland D., Tourdot-Marechal R., Abraham M., Chu K.S., Guzzo J. (2003) Absence of malolactic activity is a characteristic of H⁺-ATPase-deficient mutants of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *App. Environ. Microbiol.* 69: 1973-1979.

Garcia-Quintans N., Magni C., de Mendoza D., Lopez P. (1998) The citrate transport system of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* is induced by acid stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 850-857.

Garrigues C., Loubiere P., Lindley N.D., Coccain-Bousquet M. (1997) Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ rapport. *J. Bacteriol.* 179: 5282-5287.

Garrigues C. (1998) Régulation du métabolisme central de *Lactococcus lactis*. *Thèse doctorale* (N° ordre : 496), INSA, Toulouse, France.

Garrigues C., Mercade M., Coccain-Bousquet M., Lindley N.D., Loubière P. (2001) Regulation of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis* depends upon the imbalance between catabolism and anabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 74 : 108-115.

Gasson M.J., Benson K., Griffin H. (1996) Metabolic engineering of the *Lactococcus lactis* diacetyl pathway. *Lait* 76: 33-40.

Giard J-C., Verneuil N., Auffray Y., Hartke A. (2002) Characterisation of genes homologous to the general stress-inducible gene *gls24* in *Enterococcus faecalis* and *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Let.* 206: 235-239.

Gilliland S.E., Speck M.L. (1969) Biological response of lactic Streptococci and Lactobacilli to catalase. *Appl. Microbiol.* 17: 797-800.

Girbal L., Soucaille P. (1994) Regulation of *Clostridium acetobutylicum* metabolism as revealed by mixed-substrate steady-state continuous cultures : role of NADH/NAD⁺ ratio and ATP pool. *J. Bacteriol.* 176: 6433-6438.

- Goldenberg D., Azar I., Oppenheim A.B.** (1996) Differential mRNA stability of the *cspA* gene in the cold-shock response of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 19: 241-248.
- Glaasker E., Konings W.N., Poolman B.** (1996) Glycine betain fluxes in *Lactobacillus plantarum* during osmostasis and hyper- and hypo-osmotic shock. *J. Biol. Chem.* 271: 10060-10065.
- Glaasker E., Tjan F.S., Ter Steeg P.F., Konings W.N., Poolman B.** (1998), Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress. *J. Bacteriol.* 180: 4718-4723.
- Godon J.J., Chopin M.-C., Ehrlich S.D.** (1992) Branched-chain amino acids biosynthesis genes in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J. Bacteriol.* 174: 6580-6589.
- Godon J.J., Delorme C., Bardowski J., Chopin M.C., Ehrlich S.D., Renault P.** (1993) Gene inactivation in *Lactococcus lactis*: branched-chain amino acid biosynthesis. *J. Bacteriol.* 175: 4383-4390.
- Gordin B.R., Gorbach S.L.** (1992) Probiotics for humans. Probiotics, the scientific basis, p 355-376. (Editeur: Fuller R) Chapman et Hall, Londres.
- Gracy R.W., Tylley B.E.** (1975) Phosphoglucose isomerase of Human erythrocytes and cardiac tissue. *Meth. Enz.* 41: 392-400.
- Graumann P., Wendrich T.M., Weber M.H., Schroder K., Marahiel M.A.** (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: 741-756.
- Guédon E., Renault P., Ehrlich S.D., Delorme C.** (2001a) Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply. *J. Bacteriol.* 183 : 3614-3622.
- Guédon E., Serror P., Ehrlich S.D., Renault P., Delorme C.** (2001b) Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 40 : 1227-1239.
- Guédon E., Jamet E., Renault P.** (2002) Gene regulation in *Lactococcus lactis*: the gap between predicted and characterized regulators. *A. Van Leeuwenhoek.* 82 : 93-112.
- Guillot A., Obis D., Mistou M.Y.** (2000) Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress. *Int. J. Food Microbiol.* 55: 47-51.
- Gunnewijk M.G., Poolman B.** (2000) Phosphorylation state of HPr determines the level of expression and the extent of phosphorylation of the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* 275: 34073-34079.

H

Hanna M.M., Liu K. (1998) Nascent RNA in transcription complexes interacts with CspE, a small protein in *E. coli* implicated in chromatin condensation. *J. Mol. Biol.* 282: 227-239.

Hansen M.C., Nielsen A.K., Molin S., Hammer K., Kilstrup M., Palmer Jr R.J., Udsen C., White D.C. (2001) Changes in rRNA levels during stress invalidate results from mRNA blotting: fluorescence in situ rRNA hybridization permits renormalization for estimation of cellular mRNA levels. *J. Bacteriol.* 183: 4747-4751.

Haring M., Rudiger H., Demple B., Boiteux S., Epe B. (1994) Recognition of oxidized abasic sites by repair endonucleases. *Nucleic Acids Res.* 22: 2010-2015.

Hartke A., Bouche S., Giard J.C., Benachour A., Boutibonnes P., Auffray Y. (1996) The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Cur. Microbiol.* 33: 194-199.

Hartke A., Frere J., Boutibonnes P., Auffray Y. (1997) Differential induction of the chaperonin GroEL and the co-chaperonin GroES by heat, acid and UV-irradiation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Cur. Microbiol.* 34 : 23-26.

van der Heide T., Poolman B. (2000), Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *PNAS.* 97: 7102-7106.

Helinck S., Richard J., Juillard V. (1997) The effects of adding lactococcal proteinase on the growth rate of *Lactococcus lactis* depend on th type of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2124-2130.

den Hengst C.D., Curley P., Larsen R., Buist G., Nauta A., van Sinderen D., Kuipers O.P., Kok J. (2005) Probing direct interactions between CodY and the *oppD* promoter of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 187: 512-521.

Henkin T.M., Grundy F.J., Nicholson W.L., Chambliss G.H. (1991) Catabolite repression of alpha-amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* *lacl* and *galR* repressors. *Mol. Microbiol.* 5: 575-584.

Henkin T.M. (1996) The role of the CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 135: 9-15.

Hols P., Kleerebezem M., Schanck A.N., Ferain T., Hugenholtz J., Delcour J., de Vos W.M. (1999) Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering. *Nat. Biotechnol.* 17: 588-592.

Huang X., Decatur A., Sorokin A., Helmann J.D. (1997) The *Bacillus subtilis* sigma(X) protein is an extracytoplasmic function sigma factor contributing to survival at high temperature. *J. Bacteriol.* 179: 2915-2921.

Hugenholtz J. (1993) Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12 : 165-178.

Hugenholtz J., Kleerebezem M., Starrenburg M., Delcour J., de Vos W., Hols P. (2000) *Lactococcus lactis* as a cell factory for high-level diacetyl production. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 4112-4114.

Hulett F.M., Lee J., Shee L., Sun G., Chesnut R., Sharkova E., Duggan M.F., Kapp N. (1994) Sequential action of two-component genetic switches regulated the PHO regulon in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176 : 1348-1358.

Hulett F.M. (1996) The signal-transduction pathway for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 19 : 933-939.

Hutkins R.W., Nannen N.L. (1993) pH homeostasis in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 76 : 2354-2365.

J

Jamet E., Ehrlich S.D., Duperray F., Renault P. (2001) Study of the duplicated glycolytic genes in *Lactococcus lactis* IL1403. *Le Lait* 81. 1: 115-129.

Jensen P.R., Hammer K. (1993) Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4363-4366.

Jensen N.B., Melchiorsen C.R., Jokumsen K.V., Villadsen J. (2001) Metabolic behavior of *Lactococcus lactis* MG1363 in microaerobic continuous cultivation at a low dilution rate. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2677-2682.

Jiang W., Hou Y., Inouye M. (1997) CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J. Biol. Chem.* 272: 196-202.

Jones B.E., Dossonnet V., Kuster E., Hillen W., Deutscher J., Klevit R.E. (1997) Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr. *J. Biol. Chem.* 272 : 26530-26535.

Jordan K. N., O'Donoghue M., Condon S., Cogan T. M. (1996) Formation of diacetyl by cell-free extracts of *Leuconostoc lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 143 : 291-297.

Juillard V., le Bars D., Kunji E.R.S., Konings W.N., Gripon J.C., Richard J. (1995) Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 : 3024-3030.

Juillard V., Guillot A., Le Bars D., Gripon J.C. (1998) Specificity of milk peptide utilization by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 :1230-1236.

K

Kaan T., Jurgen B., Schweder T. (1999) Regulation of the expression of the cold shock proteins CspB and CspC in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 262: 351-354.

- Kandler O.** (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuw.* 49 : 209-224.
- Kaneko, T., Takahashi, M. Suzuki, H.** (1990) Acetoin fermentation by citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 grown aerobically in the presence of hemin or Cu²⁺. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 2644-2649.
- 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.
- Kashket E.R., Barker S.L.** (1977) Effects of potassium ions on the electrical and pH gradients across the membrane of *Streptococcus lactis* cells. *J. Bacteriol.* 130: 1017-1023.
- Kashket E.R.** (1987) Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Rev.* 46 : 233-244.
- Kell D.B., Peck M.W., Rodger G., Morris J.G.** (1981) On the permeability to weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99 : 81-88.
- Kempler G.M., McKay L.L.** (1979) Characterization of plasmid deoxyribonucleic acid in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*: evidence for plasmid-linked citrate utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 37 : 316-323.
- Kilstrup M., Jacobsen S., Hammer K., Vogensen F.K.** (1997) Induction of heat-shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 : 1826-1837.
- Kim S.G., Batt C.A.** (1993) Cloning and sequencing of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* *groESL* operon. *Gene.* 127 : 121-126.
- Kim W.S., Dunn N.W.** (1997) Identification of a cold shock gene in lactic acid bacteria and the effect of cold shock on cryotolerance. *Cur. Microbiol.* 35 : 59-63.
- Kim W.S., Ren J., Dunn N.W.** (1999) Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptative response to stresses. *FEMS Microbiol. Lett.* 171 : 57-65.
- Kleerebezem M., Boekhorst J., van Kranenburg R., Molenaar D., Kuipers O.P., Leer R., Turchini R., Peters S.A., Sandbrink H.M., Fiers M.W.E.J., Stiekema W., Klein Lankhorst R.M., Bron P.A., Hoffer S.M., Nierop Groot M.N., Kerkhoven R., de Vries M., Ursing B., de Vos W.M., Siezen R.J.** (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 :1990-1995.
- Kobayashi H., Murakami N., Unemoto T.** (1982) Regulation of the cytoplasmic pH in *Streptococcus faecalis*. *J. Biol. chem.* 257 : 13246-13252.

Koebmann B.J., Nilsson D., Kuipers O.P., Jensen P.R. (2000) The membrane-bound H⁺-ATPase complex is essential for growth of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 182 : 4738-4743.

Koebmann B.J., Andersen H.W., Solem C., Jensen P.R. (2002) Experimental determination of control of glycolysis in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuw.* 82 : 237-248.

Koebmann B., Solem C., Jensen P.R. (2005) Control analysis as a tool to understand the formation of the *las* operon in *Lactococcus lactis*. *FEBS J.* 272 : 2292-2303.

Kok J. (1990) Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 15-42.

Konings W.N., Poolman B., Driessen A.J. (1989) Bioenergetics and solute transport in lactococci. *Crit. Rev. Microbiol.* 16 : 419-476.

Konings W.N., Poolman B., Driessen A.J.M., Smid E.J., Molenaar D. (1994) Mécanismes du transport des nutriments dans les bactéries lactiques. Dans : Bactéries lactiques, Vol. I, p 209-238 (Editeurs : De Roissart H., Luquet F.M.) Lorica, Uriage, France.

Konings W.N., Lolkema J.S., Bolhuis H., Van Veen H.W., Poolman B., Driessen A.J.M. (1997) The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuw.*, 71 : 117-128.

Kuila R.K., Ranganathan B. (1977) Ultraviolet light-induced mutants of *Streptococcus lactis* subspecies *diacetylactis* with enhanced acid- or flavorproducing abilities. *J. Dairy Sci.* 61: 379-383.

Kuipers O.P., de Ruyter P.G., Kleerebezem M., de Vos W.M. (1997) Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol.* 15 : 135-140.

Kulbe K.D., Foellmer H., Fuchs J. (1982) Simultaneous purification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase, and phosphoglycerate mutase from pig liver and muscle. *Meth. Enz.* 90 : 498-499.

Kullen M.J., Klaenhammer T.R. (1999) Identification of the pH-inducible, proton-translocating F1F0-ATPase (*atpBEFHAGDC*) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: gene structure, cloning and characterization. *Mol. Microbiol.* 33: 1152-1161.

Kunji E.R.S., Smid E.J., Plapp R., Poolman B., Konings W.N. (1993) Di-tripeptides and oligopeptides are taken up via distinct transport mechanisms in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 175 : 2052-2059.

L

Labarre C., Guzzo J., Cavin J. F., Divies C. (1996a). Cloning and characterization of the genes encoding the malolactic enzyme and the malate permease of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 1274-1282.

- Labarre C., Divies C., Guzzo J.** (1996b). Genetic organization of the *mle* locus and identification of a *mleR*-like gene from *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 4493–4498.
- Lamarque M. Charbonnel P., Aubel D., Piard J.C., Atlan D., Juillard V.** (2004) A multifunction ABC transporter (Opt) contributes to diversity of peptide uptake specificity within the genus *Lactococcus*. *J. Bacteriol.* 186 : 6492-6500.
- Lanfermeijer F.C., Detmers F.J., Konings W.N., Poolman B.** (2000) On the binding mechanism of the peptide receptor of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *EMBO J.* 19 : 3649-3656.
- Larsen R., Buist G., Kuipers O.P., Kok J.** (2004) ArgR and AhrC are both required for regulation of arginine metabolism in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 186 : 1147-1157.
- Lautier M., Gillot B., Auffray Y., Castillo-Sanchez X., Boutibonnes P.** (1988) Mutagenesis in *Streptococcus lactis* exposed to UV irradiation and alkylating agents. *Mutagenesis.* 3: 245-247.
- Letort C., Nardi M., Garault P., Monnet V., Juillard V.** (2002) Casein utilisation by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Appl. Env. Microbiol.* 68 : 3162-3165.
- Liberman E.S., Bleiweis A.S.** (1984) Role of the phosphoenolpyruvate-dependent glucose phosphotransferase system of *Streptococcus mutans* GS5 in the regulation of lactose uptake. *Infect. Immun.* 43 : 536-542.
- Liggins J., Furth A.J.** (1997) Role of protein-bound carbonyl groups in the formation of advanced glycation endproducts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1361: 123-130.
- Lin J., Lee I.S., Frey J., Slonczewski J.L., Foster J.W.** (1995) Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177 : 4097-4104.
- Lindahl T., Nyberg B.** (1972) Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry.* 11 : 3610-3618.
- Lindmark-Mansson H., Fondèn R., Pettersson H.-E.** (2003) Composition of Swedish dairy milk. *Int. Dairy J.* 13: 409-425.
- Llanos R.M., Hillier A.J., Davidson B.E.** (1992) Cloning, nucleotide sequence, expression, and chromosomal location of *ldh*, the gene encoding L-(+)-lactate dehydrogenase, from *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 174: 6956-6964.
- Llanos R.M., Harris C.J., Hillier A.J., Davidson B.E.** (1993) Identification of a novel operon in *Lactococcus lactis* encoding three enzymes for lactic acid synthesis: phosphofructokinase, pyruvate kinase, and lactate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 175: 2541-51.

- Lohmeier-Vogel E.M., Hahn-Hagerdahl B., Vogel H. J.** (1986) Phosphorus-31 NMR studies of maltose and glucose metabolism in *Streptococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 43-51.
- Lolkema J.S., Poolman B., Konings W.N.** (1996) Secondary transporters and metabolic energy generation in bacteria, p. 229–260. In W. N. Konings, H. R. Kaback, and J. S. Lolkema (ed.), Handbook of biological physics. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- Lopez de Felipe F., Magni C., de Mendoza D., Lopez P.** (1995) Citrate utilization gene cluster of the *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* : organization and regulation of expression. *Mol. Gen. Genet.* 246 : 590-599.
- Lopez de Felipe F., Starrenburg M.J.C., Hugenholtz J.** (1997) The role of NADH-oxidation in acetoin and diacetyl production from glucose in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363. *FEMS Microbiol. Lett.* 156: 15-19.
- Loubiere P., Salou P., Leroy M.J., Lindley N.D., Pareilleux A.** (1992) Electrogenic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* grown on glucose-malate mixtures. *J. Bacteriol.* 174 : 5302-5308.
- Love P.E., Yasbin R.E.** (1984) Genetic characterization of the inducible SOS-like system of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 160: 910-920.
- Love P.E., Yasbin R.E.** (1986) Induction of the *Bacillus subtilis* SOS-like response by *Escherichia coli* RecA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 83: 5204-5208.
- Lovett C.M. Jr, Roberts J.W.** (1985) Purification of a RecA protein analogue from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 260: 3305-3313.
- Lovett C.M. Jr, Love P.E., Yasbin R.E., Roberts J.W.** (1988) SOS-like induction in *Bacillus subtilis*: induction of the RecA protein analog and a damage-inducible operon by DNA damage in Rec⁺ and DNA repair-deficient strains. *J. Bacteriol.* 170: 1467-1474.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randa P.P.** (1951) Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- Luesink E.J., van Herpen R.E.M.A., Grossiord B.P., Kuipers O.P., de Vos W.M.** (1998) Transcriptional activation of the glycolytic *las* operon and catabolite repression of the *gal* operon in *Lactococcus lactis* are mediated by the catabolite control protein CcpA. *Mol. Microbiol.* 30 : 789-798.
- Luesink E.J., Marugg J.D., Kuipers O.P., de Vos W.M.** (1999) Characterization of the divergent *sacBK* and *sacAR* operons, involved in sucrose utilization by *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 181 : 1924-1926.

M

- Ma Y., Curran T.M., Marquis R.E.** (1997) Rapid procedure for acid adaptation of oral lactic-acid bacteria and further characterization of the response. *Can. J. Microbiol.* 43 : 143-148.
- Magni C., de Mendoza D., Konings W.N., Lolkema J.S.** (1999) Mechanism of citrate metabolism in *Lactococcus lactis* : resistance against lactate toxicity at low pH. *J. Bacteriol.* 181 : 1451-1457.
- Mahr K., Hillen W., Titgemeyer F.** (2000) Carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus*: analysis of the *ccpA* region. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 277-283.
- Martin M.G., Sender P.D., Peiru S., de Mendoza D., Magni C.** (2004) Acid-inducible transcription of the operon encoding the citrate lyase complex of *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CRL264. *J. Bacteriol.* 186: 5649-5660.
- Marty-Teyssset C., Lolkema J.S., Schmitt P., Divies C., Konings W.N.** (1995) Membrane potential-generating transport of citrate and malate catalyzed by CitP of *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Biol. Chem.* 270 : 25370-25376.
- Marugg J.D., Meijer W., van Kranenburg R., Laverman P., Bruinenberg P.G., de Vos W.M.** (1995) Medium-dependant regulation of proteinase gene expression in *Lactococcus lactis* : control of transcription initiation by specific dipeptides. *J. Bacteriol.* 177 : 2982-2989.
- Mascarenhas J., Weber M.H., Graumann P.L.** (2001) Specific polar localization of ribosomes in *Bacillus subtilis* depends on active transcription. *EMBO Rep.* 2: 685-689.
- Mason P.W., Carbone D.P., Cushman R.A., Waggoner A.S.** (1981) The importance of inorganic phosphate in regulation of energy metabolism of *Streptococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 256 : 1861-1866.
- Matos J., Nardi M., Kumura H., Monnet V.** (1998) Genetic characterization of *pepP*, which encodes an aminopeptidase P whose deficiency does not affect *Lactococcus lactis* growth in milk, unlike deficiency of the X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 4591-4595.
- McKay L.L., Miller A., Sandine W.E., Elliker P.R.** (1970) Mechanisms of lactose utilization by lactic acid streptococci: enzymatic and genetic analysis. *J. Bacteriol.* 102 : 804-809.
- McKay L.L., Baldwin K.A.** (1974) Altered metabolism in a *Streptococcus lactis* C2 mutant deficient in lactic dehydrogenase. *J. Dairy Sci.* 57: 181-6.
- McKay L.L., Baldwin K.A.** (1990) Applications for biotechnology : present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87 : 3-14.
- Meadow N.D., Fox D.K., Roseman S.** (1990) The bacterial phosphoenolpyruvate: glucose phosphotransferase system. *Annu. Rev. Biochem.* 59 : 497-542.

Mercade M., Lindley N.D., Loubière P. (2000) Metabolism of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG 1363 in acid stress conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 55 : 161-165.

Mercade M. (2002) Analyse métabolique et énergétique de *Lactobacillus bulgaricus* sous contrainte d'extrémophilie industrielle. *Thèse doctorale* (N° d'ordre : 647), INSA, Toulouse, France.

Mercade M., Duperray F., Loubière P. (2004) Energetic analysis of cultures of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: identification of the type of control between catabolism and anabolism. *Le Lait.* 84 : 39-47.

Mercade M., Raynaud S., Cocaign-Bousquet M., Loubière P. (2005) Physiological analysis of Lactic Acid Bacteria in skimmed milk : methods improvement and development. Soumis à *Journal of Dairy Research*.

Mills O.E., Thomas T.D. (1981) Nitrogen sources for growth of lactic streptococci in milk. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 16 : 43-55.

Mitchell P. (1973) Chemiosmotic coupling in energy transduction : a logical development of biochemical knowledge. *J. Bioenerg.* 4 : 63-91.

Molenaar D., Hagting A., Alkema H., Driessen A.J., Konings W.N. (1993) Characteristics and osmoregulatory roles of uptake systems for proline and glycine betaine in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 175 : 5438-5444.

Monedero V., Gosalbes M.J., Perez-Martinez G. (1997) Catabolite repression in *Lactobacillus casei* ATCC 393 is mediated by CcpA. *J. Bacteriol.* 179 : 6657-6664.

Monedero V., Kuipers O.P., Jamet E., Deutscher J. (2001) Regulatory functions of serine-46-phosphorylated HPr in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 183 : 3391-3398.

Monnet V., Gripon J.C. (1994) Métabolisme azoté des bactéries lactiques. Dans : Bactéries lactiques, Vol. I, p331-347 (Editeurs : de Roissart H., Luquet F.M.), Loriga, Uriage, France.

N

Nakata A., Amemura M., Shinagawa H. (1984) Regulation of the phosphate regulon in *Escherichia coli* K12 : regulation of the negative regulatory gene *phoU* and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 159 : 979-985.

Nannen N.L., Hutkins R.W. (1991a) Intracellular pH effects in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 74 : 741-746.

Nannen N.L., Hutkins R.W. (1991b) Proton-translocating adenosine triphosphatase activity in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 74 : 747-751.

Neves A.R., Ventura R., Mansour N., Shearman C., Gasson M.J., Maycock C., Ramos A., Santos H. (2002) Is the glycolytic flux in *Lactococcus lactis* primarily controlled by the redox charge? Kinetics of NAD(+) and NADH pools determined in vivo by ¹³C NMR. *J. Biol. Chem.* 277 : 28088-28098.

Neves A.R., Pool W.A., Kok J., Kuipers O.P., Santos H. (2005) Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* - the input from in vivo NMR. *FEMS Microbiol. Rev.* 29 : 531-54.

van Niel E.W., Hofvendhal K., Hahn-Hagerdal B. (2002) Formation and conversion of oxygen metabolites by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 under different growth conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4350-4356.

Nilsson D., Lauridsen A.A., Tomoyasu T., Ogura T. (1994) A *Lactococcus lactis* gene encodes a membrane protein with putative ATPase activity that is homologous to the essential *Escherichia coli* ftsH gene product. *Microbiology.* 140: 2601-2610.

Nilsson U., Radstrom P. (2001) Genetic localization and regulation of the maltose phosphorylase gene, *malP*, in *Lactococcus lactis*. *Microbiology.* 147: 1565-1573.

Nomura M., Nakajima I., Fujita Y., Kobayashi M., Kimoto H., Suzuki I., Aso H. (1999) *Lactococcus lactis* contains only one glutamate decarboxylase gene. *Microbiol.* 145 : 1375-1380.

Nomura M., Kobayashi M., Ohmomo S., Okamoto T. (2000) Inactivation of the glutamate decarboxylase gene in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Env. Microbiol.* 66: 2235-2237.

Nordkvist M., Jensen N.B., Villadsen J. (2003) Glucose metabolism in *Lactococcus lactis* MG1363 under different aeration conditions: requirement of acetate to sustain growth under microaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3462-3468.

Novak L., Cocaign-Bousquet M., Lindley N.D., Loubière P. (1997) Metabolism and energetics of *Lactococcus lactis* during growth in complex or synthetic media. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2665-2670.

O

Obis D., Guillot A., Gripon J.C., Renault P., Bolotin A., Mistou M.Y. (1999) Genetic and biochemical characterisation 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 osmolality of *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* and *cremoris* is related to the activity of a betaine transport system. *FEMS Microbiol. Lett.* 202: 39-44.

O'Connell-Motherway M., Fitzgerald G.F., van Sinderen D. (1997) Cloning and sequence analysis of putative histidine protein kinases isolated from *Lactococcus lactis* MG1363. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2454-2459.

O'Connell-Motherway M., van Sinderen D., Morel-Deville F., Fitzgerald G.F., Ehrlich S.D., Morel P. (2000) Six putative two-component regulatory systems isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Microbiology.* 146: 935-947.

Orla-Jensen S. (1919) The lactic acid bacteria. Fred Host and Son, Copenhagen.

O'Sullivan E., Condon S. (1997) Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 : 4210-4215.

O'Sullivan E., Condon S. (1999) Relationship between acid tolerance, cytoplasmic pH, and ATP and H⁺-ATPase levels in chemostat cultures of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 : 2287-2293.

P

Panoff J.-M., Legrand S., Thammavongs B., Boutibones P. (1994) The cold shock response in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr. Microbiol.* 29 : 213-216.

Panoff J.-M., Corroler D., Thammavongs B., Boutibones P. (1997) Differentiation between cold shock proteins and cold acclimation proteins in a mesophilic gram-positive bacterium, *Enterococcus faecalis* JH2-2. *J. Bacteriol.* 179 : 4451-4454.

De Peters E.J., Ferguson J.D. (1992) Nonprotein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. *J. Dairy Sci.* 75: 3192-209.

Phadtare S., Yamanata K., Inouye M. (2000) The cold-shock response. Dans *Bacterial stress response*, (ed) Storz G., Hengge-Aronis R., p 33-45, ASM Press, Washington.

Pirt S.J. (1965) The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proc. Roy. Soc. London.* 163 : 225-231.

Platteuw C., Hugenholtz J., Starrenburg M., van Alen-Boerrigter I., de Vos W.M. (1995) Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: influence of the overproduction of alpha-acetolactate synthase in strains deficient in lactate dehydrogenase as a function of culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3967-3971.

Poolman B., Bosman B., Kiers J., Konings W.N. (1987a) Control of glycolysis by glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase in *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 169 : 5887-5890.

Poolman B., Driessen A.J.M., Konings W.N. (1987b) Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 169 : 5597-5604.

Poolman B., Driessen A.J.M., Konings W.N. (1987c) Regulation of solute transport in streptococci by external and internal pH values. *Microbiol. Rev.* 51 : 498-508.

Poolman B., Nijssen R.M., Konings W.N. (1987d) Dependence of *Streptococcus lactis* phosphate transport on internal phosphate concentration and internal pH. *J. Bacteriol.* 169 : 5373-5378.

Poolman B., Smid E.J., Veldkamp H., Konings W.N. (1987e) Bioenergetic consequences of lactose starvation for continuously cultured *Streptococcus cremoris*. *J. Bacteriol.* 169: 1460-1468.

Poolman B., Konings W.N. (1988) Relation of growth of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* to amino acid transport. *J. Bacteriol.* 170 : 700-707.

Poolman B., Molenaar D., Smid E.J., Ubbink T., Abee T., Renault P., Konings W.N. (1991) Malolactic fermentation : electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport metabolic energy. *J. Bacteriol.* 173 : 6030-6037.

Poolman B., Glaasker E. (1998), Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* 29: 397-407.

Poolman B. (2002) Transporters and their roles in LAB cell physiology. *Antonie van Leeuw.* 82 : 147-164.

Poolman B., Blount P., Folgering J.H., Friesen R.H., Moe P.C., van der Heide T. (2002) How do membrane proteins sense water stress? *Mol. Microbiol.* 44: 889-902.

Poquet I., Saint V., Seznec E., Simoes N., Bolotin A., Gruss A. (2000) HtrA is the unique housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing. *Mol. Microbiol.* 35: 1042-1051.

Postma P.W., Lengeler J.W., Jacobson G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 543-594.

Presser K.A., Ratkowsky D.A., Ross T. (1997) Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2355-2360.

Pridmore R.D., Berger B., Desiere F., Vilanova D., Barretto C., Pittet A.C., Zwahlen M.C., Rouvet M., Altermann E., Barrangou R., Mollet B., Mercenier A., Klaenhammer T., Arigoni F., Schell M.A. (2004) The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 2512-2517.

Q

Qi Y., Kobayashi Y., Hulett F.M. (1997) The *pst* operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate-regulated promoter and is involved in phosphate transport but not regulation of the *pho* regulon. *J. Bacteriol.* 179: 2534-2539.

Qian N., Stanley G.A., Bunte A., Radstrom P. (1997) Product formation and phosphoglucomutase activities in *Lactococcus lactis*: cloning and characterization of a novel phosphoglucomutase gene. *Microbiology.* 143 : 855-865.

Quivey R.G. Jr, Faustoferri R., Monahan K., Marquis R. (2000) Shifts in membrane fatty acid profiles associated with acid adaptation of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 189 : 89-92.

R

Rallu F., Gruss A., Maguin E. (1996) *Lactococcus lactis* and stress. *Antonie van Leeuw.* 70 : 243-251.

- Rallu F.** (1999) Etude de la résistance au stress acide de *Lactococcus lactis*. *Thèse doctorale*, Université Paris 6, Paris, France.
- Rallu F., Gruss A., Ehrlich S.D., Maguin E.** (2000) Acid and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis* : identification of intracellular stress signals. *Mol. Microbiol.* 35 : 517-528.
- Ramos A., Neves A.R., Ventura R., Maycock C., Lopez P., Santos H.** (2004) Effect of pyruvate kinase overproduction on glucose metabolism of *Lactococcus lactis*. *Microbiology.* 150 : 1103-1111.
- Rastogi V.K., Girvin M.E.** (1999) Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature.* 402 : 263-268.
- Raymond-Denise A., Guillen N.** (1992) Expression of the *Bacillus subtilis* *dinR* and *recA* genes after DNA damage and during competence. *J. Bacteriol.* 174: 3171-3176.
- Raynaud S., Perrin R., Coccagn-Bousquet M., Loubière P.** Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. *Appl. Env. Microbiol.* 71: 8016-8023.
- Redon E., Loubière P., Coccagn-Bousquet M.** (2005) Transcriptome analysis of the progressive adaptation of *Lactococcus lactis* to carbon starvation. *J. Bacteriol.* 187 : 3589-3592.
- Reid J.R., Ng K.H., Moore C.H., Coolbear T., Pritchard G.G.** (1991a) Comparison of bovine β -casein hydrolysis by P_I- and P_{III}-type proteinases from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36 : 344-351.
- Reid J.R., Moore C.H., Midwinter G.G., Pritchard G.G.** (1991b) Action of a cell wall proteinase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 on bovine α_{S1} -casein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35 : 222-227.
- Reid J.R., Coolbear T., Pillidge C.J., Pritchard G.G.** (1994) Specificity of hydrolysis of bovine κ -casein by cell-envelope-associated proteinases from *Lactococcus lactis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 801-806.
- Reizer J., Novotny M.J., Panos C., Saier M.H. Jr.** (1983) Mechanism of inducer expulsion in *Streptococcus pyogenes*: a two-step process activated by ATP. *J. Bacteriol.* 156 : 354-361.
- Reizer J., Saier M.H. Jr.** (1983) Involvement of lactose enzyme II of the phosphotransferase system in rapid expulsion of free galactosides from *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.* 156 : 236-242.
- Reizer J., Saier M.H. Jr.** (1997) Modular multidomain phosphoryl transfer proteins of bacteria. *Cur. Opin. Struct. Biol.* 7 : 407-415.

Renault P., Gaillardin C., Heslot H. (1989). Product of the *Lactococcus lactis* gene required for malolactic fermentation is homologous to a family of positive regulators. *J. Bacteriol.* 171 : 3108–3114.

Romeo Y., Bouvier J., Gutierrez C. (2001) La réponse au stress osmotique des bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum*. *Le Lait.* 81 : 49-55.

van Rooijen R.J., de Vos W.M. (1990) Molecular cloning, transcriptional analysis, and nucleotide sequence of *lacR*, a gene encoding the repressor of the lactose phosphotransferase system of *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 265 : 18499-18503.

van Rooijen R.J., van Schalkwijk S., de Vos W.M. (1991) Molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of the tagatose 6-phosphate pathway gene cluster of the lactose operon of *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 266 : 7176-7181.

van Rooijen R.J., Gasson M.J., de Vos W.M. (1992) Characterization of the *Lactococcus lactis* lactose operon promoter: contribution of flanking sequences and LacR repressor to promoter activity. *J. Bacteriol.* 174 : 2273-2280.

van Rooijen R.J., Dechering K.J., Niek C., Wilmink J., de Vos W.M. (1993) Lysines 72, 80 and 213 and aspartic acid 210 of the *Lactococcus lactis* LacR repressor are involved in the response to the inducer tagatose-6-phosphate leading to induction of lac operon expression. *Protein. Eng.* 6 : 201-206.

Russell J.B., Cook G.M. (1995) Energetics of bacterial growth : balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol. Rev.* 59 : 48-52.

S

Saier M.H. Jr. (1989) Protein phosphorylation and allosteric control of inducer exclusion and catabolite repression by the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Microbiol. Rev.* 53: 109-120.

Saier M.H. Jr., Chauvaux S., Cook G.M., Deutscher J., Paulsen I.T., Reizer J., Ye J.-J. (1996) Catabolite repression and inducer control in gram-positive bacteria. *Microbiol.* 142 : 217-230.

Sambongi Y., Iko Y., Tanabe M., Omote H., Iwamoto-Kihara A., Ueda I., Yanagida T., Wada Y., Futai M. (1999) Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F₀F₁): direct observation. *Science.* 286 : 1722-1724.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Sanders J.W., Venema G., Kok J. (1999) Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Reviews.* 23 : 483-501.

Sandine WE, Radich PC, Elliker PR. (1972) Ecology of the lactic streptococci. *J. Milk Food Technol.* 35 : 176-184.

- Sanz Y., Lanfermeijer F.C., Renault P., Bolotin A., Konings W.N., Poolman B.** (2001) Genetic and functional characterization of *dpp* genes encoding a dipeptide transport system in *Lactococcus lactis*. *Arch. Microbiol.* 175 : 334-343.
- Schleifer KH, Kraus J, Dvorak C, Kilpper-Balz R, Collins MD, Fischer W.** (1985) Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Appl. Microbiol.* 6 :183-195.
- Schleifer KH.** (1987) Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 46 : 201-203.
- Schumacher M.A., Allen G.S., Diel M., Seidel G., Hillen W., Brennan R.G.** (2004) Structural basis for allosteric control of the transcription regulator CcpA by the phosphoprotein HPr-Ser46-P. *Cell.* 118 : 731-741.
- Selby Smith J., Hillier A. J., Lees G. J.** (1975) The nature of the stimulation of the growth of *Streptococcus lactis* by yeast extract. *J. Dairy Res.* 42: 123–138.
- Sender P.D., Martin M.G., Peiru S., Magni C.** (2004) Characterization of an oxaloacetate decarboxylase that belongs to the malic enzyme family. *FEBS Lett.* 570: 217-222.
- Sesma F., Gardiol D., de Ruiz Holgado A.P., de Mendoza D.** (1990) Cloning of the citrate permease gene of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* and expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2099-2103.
- Siciliano M.J., White B.F.** (1987) Isozyme identification of chromosomes in interspecific somatic hybrid cells. *Meth. Enz.* 151 : 169-194.
- Skinner M.M., Trempy J.E.** (2001) Expression of ClpX, an ATPase subunit of the Clp protease, is heat and cold shock inducible in *Lactococcus lactis*. *J. Dairy Sci.* 84: 1783-1785.
- Smart J., Thomas T. D.** (1987) Effect of oxygen on lactose metabolism in lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 533–541.
- Smid E.J., Driessen A.J.M., Konings W.N.** (1989a) Mechanism and energetics of dipeptide transport in membrane vesicles of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 171: 292-298.
- Smid E.J., Plapp R., Konings W.N.** (1989b) Peptide uptake is essential for growth of *Lactococcus lactis* on the milk protein casein. *J. Bacteriol.* 171: 6135-6140.
- Smid E.J., Konings W.N.** (1990) Relationship between utilization of proline and proline-containing peptides and growth of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 172: 5286-5292.
- Smid E. J., Poolman B., Konings W. N.** (1991). Casein utilization by lactococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2447-2452.
- Smith M.R., Hugenholtz J., Mikoczi P., de Ree E., Bunch A.W., de Bont J.A.M.** (1992) The stability of the lactose and citrate plasmids in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. *FEMS Microbiol. Letters.* 96: 7-12.

Snoep J.L., Teixeira de Mattos M.J., Starrenburg M.J., Hugenholtz J. (1992) Isolation, characterization, and physiological role of the pyruvate dehydrogenase complex and alpha-acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis*. *J. Bacteriol.* 174: 4838-4841.

Snoep J.L., de Graef M.R., Westphal A.H., de Kok A., Teixeira de Mattos M.J., Neijssel O.M. (1993) Differences in sensitivity to NADH of purified pyruvate dehydrogenase complexes of *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Azotobacter vinelandii* and *Escherichia coli* : implications for their activity in vivo. *FEMS Microbiol. Lett.* 114: 279-283.

Solem C., Koebmann B.J., Jensen P.R. (2003) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase has no control over glycolytic flux in *Lactococcus lactis* MG1363. *J. Bacteriol.* 185: 1564-1571.

Spiess C., Beil A., Ehrmann M. (1999) A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell.* 97: 339-347.

St-Gelais D., Roy D., Hache S. (1992) Growth and activities of *Lactococcus lactis* in milk enriched with low mineral retentate powders. *J. Dairy Sci.* 75: 2344-2352.

Starrenburg M.J.C., Hugenholtz J. (1991) Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3535-3540.

Stiles M.E. (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuw.* 70: 331-340.

Stock D., Leslie A.G., Walker J.E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science.* 286: 1700-1705.

Storz G., Imlay J.A. (1999) Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 188-194.

Stouthamer A.H., Bettenhausen C.W. (1976) Energetic aspect of anaerobic growth of *Aerobacter aerogenes* in complex medium. *Arch. Microbiol.* 111: 21-23.

Stuart M.R., Chou L.S., Weimer B.C. (1999) Influence of carbohydrate starvation and arginine on culturability and amino acid utilization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Env. microbiol.* 65: 665-673.

Sukharev S. (1999) Mechanosensitive channels in bacteria as membrane tension reporters. *The FASEB J.*, 13: S55-S61.

T

Takahashi S., Abbe K., Yamada T. (1982) Purification of pyruvate formate lyase from *Streptococcus mutans* and its regulatory properties. *J. Bacteriol.* 149: 1034-1040.

Teixera P., Castro H., Mohacsi-Farkas C., Kirby R. (1997) Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. *J. Appl. Microbiol.* 83: 219-226.

Tempest D.W. (1978) The biochemical significance of microbial growth yields : a reassessment. *Trends Biochem. Sci.* 3: 180-184.

Teuber M. (1993) Biological Fundamentals. Biotechnology vol.1, p325. (Editeurs: Rhem HJ, Reed G), VCH, Weinheim.

Thomas T.D. (1976) Regulation of lactose fermentation in group N *Streptococci*. *Appl Env. Microbiol.* 32: 474-478.

Thomas T.D., Ellwood D.C., Longyear V.M. (1979) Change from homo- to heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. *J. Bacteriol.* 138: 109-17.

Thomas, T. D., Turner K. W., Crow V. L. (1980) Galactose fermentation by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* : pathways, products, and regulation. *J. Bacteriol.* 144: 672-682.

Thomas T.D., Crow V.L. (1984) Selection of galactose-fermenting *Streptococcus thermophilus* in lactose-limited chemostat cultures. *Appl. Env. Microbiol.* 48: 186-191.

Thompson J., Thomas T.D. (1977) Phosphoenolpyruvate and 2-phosphoglycerate: endogenous energy source(s) for sugar accumulation by starved cells of *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 130: 583-95.

Thompson J., Turner K.W., Thomas T.D. (1978) Catabolite inhibition and sequential metabolism of sugars by *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 133: 1163-1174.

Thompson J. (1979) Lactose metabolism in *Streptococcus lactis*: phosphorylation of galactose and glucose moieties in vivo. *J. Bacteriol.* 140: 774-885.

Thompson J., Saier Jr.M.H. (1981) Regulation of methyl- β -D-thiogalactopyranoside-6-phosphate accumulation in *Streptococcus lactis* by exclusion and expulsion mechanisms. *J. Bacteriol.* 146: 885-894.

Thompson J., Torchia D.A. (1984) Use of ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy and ^{14}C fluorography in studies of glycolysis and regulation of pyruvate kinase in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 158: 791-800.

Thompson J., Chassy B.M., Egan W. (1985) Lactose metabolism in *Streptococcus lactis* : studies with a mutant lacking glucokinase and mannose-phosphotransferase activities. *J. Bacteriol.* 162: 217-223.

Thompson J. (1987) Sugar transport in the lactic acid bacteria. Dans : Sugar transport and metabolism in gram-positive bacteria, p 15-38 (Editeurs : Reizer J., Peterkofsky A.), Ellis Horwood Ltd., Chichester, Royaume-Uni.

Thompson J., Gentry-Weeks C.R. (1994) Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. Dans : Bactéries lactiques, Vol. I, p 239-290 (Editeurs : De Roissart H., Luquet F.M.) Loriga, Uriage, France.

Tilly K., VanBogelen R.A., Georgopoulos C., Neidhardt F.C. (1983) Identification of the heat-inducible protein C15.4 as the groES gene product in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 154: 1505-1507.

Tourdot-Marechal R., Fortier L.C., Guzzo J., Lee B., Divies C. (1999) Acid sensitivity of neomycin-resistant mutants of *Oenococcus oeni* : a relationship between reduction of ATPase activity and lack of malolactic activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 178: 319-326.

Tsai S.P., Lee Y.H. (1990) A model for energy-sufficient culture growth. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 138-145.

Tynkkynen S., Buist G., Kunji E., Kok J., Poolman B., Venema G., Haandrikman A. (1993) Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 175: 7523-7532.

U

Uribelarrea J.L., Pacaud S., Goma G. (1985) New method for measuring the cell water content by thermogravimetry. *Biotechnol. Lett.* 7: 75-80.

V

Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., Swings J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60: 407-438.

Varmanen P., Ingmer H., Vogensen F.K. (2000) *ctsR* of *Lactococcus lactis* encodes a negative regulator of *clp* gene expression. *Microbiol.* 146: 1447-1455.

Viana R., Monedero V., Dossonnet V., Vadeboncoeur C. Perez-Martinez G., Deutscher J. (2000) Enzyme I and HPr from *Lactobacillus casei*: their role in sugar transport, carbon catabolite repression and inducer exclusion. *Mol. Microbiol.* 36: 570-584.

Visser F., Exterkate F.A., Slangen C.J., de Veer G.J.C.M. (1986) Comparative study of action of cell wall proteinases from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine α_{S1} -, β -, and κ -casein. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 1162-1166.

Vos P., Simons G., Siezen R.J., de Vos W.M. (1989a) Primary structure and organization of the gene for a prokaryotic, cell envelope-located serine proteinase. *J. Biol. Chem.* 264: 13579-13585.

Vos P., van Asseldonk M., van Jeveren F., Siezen R., Simons G., de Vos W.M. (1989b) A maturation protein is essential for production of active forms of *Lactococcus lactis* SK11 serine proteinase located in or secreted from the cell envelope. *J. Bacteriol.* 171: 2795-802.

de Vos W.M., Vos P., de Haard H., Boerrigter I. (1989) Cloning and expression of the *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 gene encoding an extracellular serine proteinase. *Gene.* 85 : 169-176.

de Vos W.M., Boerrigter I., van Rooijen R.J., Reiche B., Hengstenberg W. (1990) Characterization of the lactose-specific enzymes of the phosphotransferase system in *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 265: 22554-22560.

W

Wang N., Yamakada K., Inouye M. (1999) CspI, the ninth member of the CspA family of *Escherichia coli*, is induced upon cold shock. *J. Bacteriol.* 181: 1603-1609.

Weber M.H., Beckering C.L., Marahiel M.A. (2001a) Complementation of cold shock proteins by translation initiation factor IF1 in vivo. *J. Bacteriol.* 183: 7381-7386.

Weber M.H., Volkov A.V., Fricke I., Marahiel M.A., Graumann P.L. (2001b) Localization of cold shock proteins to cytosolic spaces surrounding nucleoids in *Bacillus subtilis* depends on active transcription. *J. Bacteriol.* 183: 6435-6443.

Weickert M.J., Adhya S. (1992) A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *J. Biol. Chem.* 267 : 15869-15874.

Wittekind M., Reizer J., Deutscher J., Saier M.H. Jr., Klevit R.E. (1989) Common structural changes accompany the functional inactivation of HPR by seryl phosphorylation or by serine to aspartate substitution. *Biochemistry.* 28: 9908-9912.

Wojciechowski M.F., Peterson K.R., Love P.E. (1991) Regulation of the SOS response in *Bacillus subtilis*: evidence for a LexA repressor homolog. *J. Bacteriol.* 173: 6489-6498.

Wouters J.A., Jeynov B., Rombouts F.M., de Vos W.M., Kuipers O.P., Abee T. (1999a) Analysis of the role of 7 kDa cold-shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 in cryoprotection. *Microbiology.* 145: 3185-3194.

Wouters J.A., Rombouts F.M., de Vos W.M., Kuipers O.P., Abee T. (1999b) Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4436-4442.

Wouters J.A., Kamphuis H.H., Hugenholtz J., Kuipers O.P., de Vos W.M., Abee T. (2000a) Changes in glycolytic activity of *Lactococcus lactis* induced by low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3686-3691.

Wouters J.A., Mailhes M., Rombouts F.M., de Vos W.M., Kuipers O.P., Abee T. (2000b) Physiological and regulatory effects of controlled overproduction of five cold shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3756-3763.

Wouters J.A., Rombouts F.M., Kuipers O.P., de Vos W.M., Abee T. (2000c) The role of cold-shock proteins in low-temperature adaptation of food-related bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 23: 165-173.

Wouters J.A., Frenkiel H., de Vos W.M., Kuipers O.P., Abee T. (2001) Cold shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 are involved in cryoprotection and in the production of cold-induced proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5171-8.

X

Xie Y., Chou L.S., Cutler A., Weimer B. (2004) DNA Macroarray profiling of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 gene expression during environmental stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6738-6747.

Y

Yamanaka K., Fang L., Inouye M. (1998) The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Mol. Microbiol.* 27: 247-255.

Ye J.J., Reizer J., Cui X., Saier M.H Jr. (1994) Inhibition of the phosphoenolpyruvate-lactose phosphotransferase system and activation of a cytoplasmic sugar-phosphate phosphatase in *Lactococcus lactis* by ATP-dependent metabolite-activated phosphorylation of serine 46 in the phosphocarrier protein HPr. *J. Biol. Chem.* 269: 11837-11844.

Ye J.J., Saier M.H. Jr. (1995) Cooperative binding of lactose and HPr(SerP) to lactose/H⁺ permease of *Lactobacillus brevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 417-421.

Yokota A., Terasawa Y., Takaoka N., Shimizu H., Tomita F. (1994) Pyruvic acid production by an F1-ATPase-defective mutant of *Escherichia coli* W1485lip2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58: 2164-21567.

Symboles et abréviations

Dans le cas des enzymes, l'abréviation en majuscule correspond à l'activité enzymatique et celle en minuscule et italique, au gène correspondant.

AA	acides aminés
ADH, <i>adhE</i>	alcool deshydrogénase
ADI	arginine déiminase
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ATP	adénosine triphosphate
ATR	« acid tolerance response »
CcpA, <i>ccpA</i>	catabolite control protein
CoA	coenzyme A
cre	« catabolite-responsive element »
ΔpH	gradient de protons
$\Delta\Psi$	gradient électrique
DHAP	dihydroxyacétone phosphate
DO	densité optique
DTT	1,4-dithiothréitol
ENO, <i>eno</i>	énolase
F6P	fructose-6-phosphate
FBA, <i>fbaA</i>	fructose-1,6-bisphosphate aldolase
FBP	fructose-1,6-bisphosphate
FPM	force protomotrice
G1P	glucose-1-phosphate
G6P	glucose-6-phosphate
Gal	galactose
Gal1P	galactose-1-phosphate
Gal6P	galactose-6-phosphate
GalK	galactokinase
GAP	glycéraldéhyde-3-phosphate
GAPDH, <i>gap</i>	glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase
GDP	guanosine diphosphate
Glc	glucose
GLK, <i>glk</i>	glucokinase
GTP	guanosine triphosphate
HSP	« heat shock protein »
K _i	constante d'inhibition d'une enzyme
K _m	constante d'affinité d'une enzyme michaelienne
Lac	lactate (en indice)
LDH, <i>ldh</i>	lactate deshydrogénase
μ	taux de croissance
m _{ATP}	coefficient de maintenance énergétique
NAD(P) ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) oxydé

NAD(P)H	nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit
v_P	vitesse spécifique de formation d'un produit P
PA	phosphatase alcaline
PDH	pyruvate deshydrogénase
PEP	phosphoénolpyruvate
Perm	perméase
PFK, <i>pfk</i>	phosphofructokinase
PFL, <i>pfl</i>	pyruvate formiate lyase
1,3PG	1,3-diphosphoglycérate
2PG	2-phosphoglycérate
3PG	3-phosphoglycérate
PGL, <i>pglA</i>	glucose-6-phosphate isomérase
PGK, <i>pgk</i>	phosphoglycérate kinase
pH _{ext}	pH externe
pH _{int}	pH intracellulaire
Pi	phosphate inorganique
PK, <i>pyk</i>	pyruvate kinase
PMG, <i>pmg</i>	phosphoglycérate mutase
PTA, <i>pta</i>	phosphotransacétylase
PTS	système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant
q_s	vitesse spécifique de consommation du substrat
R_{ATP}	rendement ATP en mol d'ATP par mol de lactose
RelA, <i>relA</i>	(p)ppGpp synthase
R_{X_S}	rendement biomasse en g biomasse par mole de substrat ou de produit
Tag	tagatose
Tag6P	tagatose-6-phosphate
TBP	tagatose-1,6-bisphosphate
TPI, <i>tpi</i>	triose-phosphate isomérase
Tris	tri-(hydroxyméthyl) aminométhane
U_{act}	unité d'activité enzymatique en $\text{mmol} \cdot (\text{g biomasse})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
X	biomasse
Y_{ATP}	rendement ATP apparent ($=\mu/v_{ATP}$) en g de biomasse par mole d'ATP

Publications et communications

Publications dans revues soumises à comité de lecture

Raynaud S., Perrin R., Cocaign-Bousquet M., Loubière P. Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (12) : 8016-8023.

Mercade M., Raynaud S., Cocaign-Bousquet M., Loubière P. Physiological analysis of Lactic Acid Bacteria in skimmed milk : methods improvement and development. Soumis à *Journal of Dairy Research*.

Communications sous forme de posters

M. Cocaign-Bousquet, E. Redon, S. Raynaud, P. Loubière. Progressive adaptation of *Lactococcus lactis* to stress. Congrès LAB8 (FEMS), 28 Août-1 Septembre 2005, The Netherland.

Raynaud S., Perrin R., Loubière P. Analyse cinétique comparative de deux souches industrielles de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* dans des conditions proches du procédé. Poster. *Club des Bactéries Lactiques*, 19-21 Mai 2003, Aurillac.

