

Sommaire

Liste des figures.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Introduction	01
1. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	03
1.1. Généralités	03
1.1.1. Historique	03
1.1.2. Caractéristiques générales des bactéries lactiques	03
1.1.3. Classification et taxonomie	04
1.1.4. Utilisation industrielle des bactéries lactiques	05
1.1.5. Des bactéries commensales de l'homme	06
1.1.6. Les lactobacilles	06
1.1.6.1. Diversité génétique	07
1.1.6.2. Diversité des habitats	08
1.1.6.3. Utilisation en industrie laitière	08
1.1.6.4. Effets des lactobacilles sur la santé	09
1.2. Généralités sur le stress	10
1.3. Modalité d'application du stress.....	11
1.3.1. Stress prolongé	11
1.3.2. Stress de type choc	11
1.4. Effet du stress sur les bactéries.....	13
1.4.1. Effet sur la croissance / survie / morphologie.....	13
1.4.2. Effets sur la virulence des bactéries pathogènes	13
1.4.3. Adaptation au stress.....	14
1.5. Stress osmotique	16
1.5.1. Définitions	16
1.5.1.1. Osmose et stress osmotique	16
1.5.1.2. Les mouvements d'eau et la pression de turgescence	16
1.5.1.3. L'effet du stress osmotique sur la cellule bactérienne	17
1.5.1.3.1. Environnement hypo-osmotique.....	17
1.5.1.3.2. Environnement hyper-osmotique.....	17

1.5.2. Mécanismes d'osmorégulation	18
1.5.2.1. Choc hyper-osmotique	18
1.5.2.1.1. La stratégie des bactéries halophiles : « salt in cytoplasm ».....	18
1.5.2.1.2. L'accumulation intracellulaire de solutés osmotiquement actifs.....	19
1.5.2.2. Choc hypo-osmotique	20
1.5.2.2.1. Efflux d'eau	20
1.5.2.2.2. Efflux de solutés compatibles	21
1.5.3. Les solutés compatibles.....	21
1.5.3.1. Généralités	21
1.5.3.2. Modalité d'accumulation des solutés compatibles	24
1.5.3.2.1. La synthèse d'osmoprotectants	24
1.5.3.2.2. Le transport d'osmoprotectants	24
1.5.3.3. L'accumulation d'osmoprotectants chez les BL	25
1.5.3.3.1. Chez <i>Lc. lactis</i>	25
1.5.3.3.2. Chez <i>Lb. plantarum</i>	26
1.6. Stress acide.....	30
1.6. 1. Effets de l'acide lactique sur les bactéries	30
1.6. 2. Mécanismes de résistance au stress acide des BL.....	31
1.7. Stress thermique.....	33
1.7.1. Stress hyperthermique	33
1.7.2. Stress hypothermique	34
1.8. Stress oxydatif.....	36
1.9. Réponse croisée et état de multirésistance.....	38
1.9. 1. Les régulateurs globaux de la réponse au stress	38
1.9. 2. La réponse générale au stress	39
1.9. 3. Etat de multi-résistance et protéines générales de stress	40
1.9.4. Les BL et la régulation des réponses aux stress.....	42
1.10. Caractères technologiques	43
2. MATERIEL ET METHODES.....	44
2.1. Matériel biologique	44
2.2. Conditions de culture	44
2.3. Milieux de culture	44

2.3. 1. Milieu MRS	44
2.3.2. Lait écrémé	44
2.4. Vérification de la pureté des souches	45
2. 5. Conservation des souches	45
2.6. Estimation des conditions inhibitrices de croissance	46
2. 6. 1. Estimation de la concentration minimale inhibitrice de NaCl.....	46
2. 6. 2. Estimation de la température minimale inhibitrice de croissance.....	46
2. 6. 3. Estimation du pH minimal inhibiteur de croissance.....	46
2. 7. Protocoles d'application des stress	46
2. 7. 1. Préparation des cellules en phase exponentielle	47
2. 7. 2. Application d'un stress modéré	47
2. 7. 2. 1. Détermination de la létalité de différentes contraintes	47
2. 7. 2. 2. Procédure d'adaptation- challenge	48
2. 8. Croissance des souches en conditions de stress et en présence d'osmoprotecteurs.....	49
2. 8. 1. Détermination de la concentration optimale de la proline et de la glycine-bétaïne ...	49
2. 8. 2. Croissance en conditions stressantes et de la concentration optimale d'osmoprotecteurs.....	49
2. 9. Analyse des protéines par SDS-PAGE.....	50
2. 9. 1. Cultures des bactéries.....	50
2. 9. 2. Récolte et lyse des bactéries	50
2. 9. 3. Dosage des protéines.....	50
2. 9. 4. Electrophorèse des protéines.....	51
2. 9. 4. 1. Préparation des gels de migration	51
2. 9. 4. 2. Dépôt des échantillons	52
2. 9. 4. 3. Migration	52
2. 9. 4. 4. Révélation	52
2.10. Mesure de l'acidité et la production d'acide lactique.....	52
2. 10. 1. Préparation des cultures	52
2. 10. 2. Mesure de l'acidité	53
2. 10. 3. Mesure de la production d'acide lactique	53
3. RESULTATS ET DISCUSSION.....	54

3.1. Vérification de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique	54
3.2. Estimation des conditions inhibitrices de croissance.....	55
3. 2.1. Estimation de la concentration minimale inhibitrice de NaCl.....	55
3. 2. 2. Estimation de la température inhibitrice de croissance.....	56
3. 2. 3. Estimation du pH minimal inhibiteur de croissance.....	57
3.3. Effet des différent stress sur les paramètres de croissance	57
3.3.1. Essai non adapté.....	57
3.3.2. Essai adapté	63
3. 4. Effet des différent stress sur la croissance et la viabilité des cellules.....	67
3.4.1. Essai non adapté	67
3. 4. 2. Essai adapté	69
3. 5. Effet des différents stress sur le taux de mortalité des cellules.....	76
3.5.1. Essai non adapté	76
3.5.2. Essai adapté	80
3.6. Facteurs de tolérance	86
3.7. Croissance des souches en conditions de stress et en présence d'osmoprotecteurs	89
3. 7. 1. Détermination de la concentration optimale de l'osmoprotecteur.....	89
3. 7. 2. Croissance en conditions stressantes et de la concentration optimale d'osmoprotecteurs	91
3. 8. Analyse des protéines par SDS-PAGE.....	99
3. 9. Mesure de l'acidité et la production d'acide lactique	103
 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	 107
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	109
ANNEXE	134

Listes des figures

Figure 1 : Distances phylogénétiques entre les genres principaux constituant les BL basées sur les séquences des ARNr 16S (Schleifer et Ludwig, 1995).....	05
Figure 2 : Arbre phylogénétique des groupes principaux du genre <i>Lactobacillus</i> basé sur les ARNr 16S (Penaud, 2006).....	07
Figure 3 : Modèle de l'hétérogénéité intra-population (Booth, 2002).....	12
Figure 4 : Représentation des flux d'eau durant la croissance dans des conditions d'équilibre osmotique, de choc hyper-osmotique et de choc hypo-osmotique (O'Byrne et Booth, 2002).....	17
Figure 5 : Effet de l'osmolarité sur la structure d'une protéine d'une Halobactérie (Sleator et Hill 2002).....	19
Figure 6 : Représentation de la stabilisation de la structure d'une protéine d'une Halobactérie à forte osmolarité (Sleator et Hill 2002).....	23
Figure 7 : Origine des solutés compatibles accumulés par les bactéries présentes dans les aliments (O'Byrne et Booth, 2002).....	25
Figure 8 : Organisation du système de transport OpuA de la glycine-bétaïne chez <i>L.lactis</i> (Hiron, 2007).....	26
Figure 9 : Modèle de transport de la glycine-bétaïne chez les lactobacilles (Hiron, 2007)..	27
Figure 10 : Représentation schématique des flux de glycine bétaïne en fonction de l'osmolarité extérieure chez <i>Lb. plantarum</i> (Glaaskera et al., 1998).....	28
Figure 11 : Représentation schématique des systèmes de transport de solutés compatibles chez quelques bactéries à Gram positif (Baliarda, 2003).....	29
Figure 12 : Modèle de la création de la force protomotrice par la décarboxylation d'acides aminés et de son utilisation pour la synthèse d'ATP (Penaud, 2006).....	32
Figure 13 : Aspect de la souche BH14 sur MRS-gélosé.....	54

<u>Figure 14</u> : Aspect des souches étudiées sous microscope optique (GX1000).....	55
<u>Figure 15</u> : Effet des divers stress sur les paramètres de croissance de la souche CHTD27 (essai non adapté).....	58
<u>Figure 16</u> : Effet des divers stress sur les paramètres de croissance de la souche BH14 (essai non adapté)	60
<u>Figure 17</u> : Effet des divers stress sur les paramètres de croissance de la souche CHM18 (essai non adapté)	62
<u>Figure 18</u> : Effet des divers stress sur les paramètres de croissance de la souche CHTD27 (essai adapté)	64
<u>Figure 19</u> : Effet des divers stress sur les paramètres de croissance de la souche BH14 (essai adapté)	65
<u>Figure 20</u> : Effet des divers stress sur les paramètres de croissance de la souche CHM18 (essai adapté)	66
<u>Figure 21</u> : Effet des divers stress sur la croissance et la viabilité de la souche CHTD27 (essai non adapté)	68
<u>Figure 22</u> : Effet des divers stress sur la croissance et la viabilité de la souche BH14 (essai non adapté)	70
<u>Figure 23</u> : Effet des divers stress sur la croissance et la viabilité de la souche CHM18 (essai non adapté)	71
<u>Figure 24</u> : Effet des divers stress sur la croissance et la viabilité de la souche CHTD27 (essai adapté).	73
<u>Figure 25</u> : Effet de divers stress sur la croissance et la viabilité de la souche BH14 (essai adapté).	74
<u>Figure 26</u> : Effet des divers stress sur la croissance et la viabilité de la souche CHM18 (essai adapté)	75

Figure 27: Effet des divers stress sur le taux de mortalité de la souche CHTD27 (Essai non adapté)	77
7Figure 28: Effet des divers stress sur le taux de mortalité de la souche BH14 (Essai non adapté)	79
Figure 29: Effet des divers stress sur le taux de mortalité de la souche CHM18 (Essai non adapté)	81
Figure 30: Effet des divers stress sur le taux de mortalité de la souche CHTD27 (Essai adapté)	83
Figure 31: Effet des divers stress sur le taux de mortalité de la souche BH14 (Essai adapté)	84
Figure 32: Effet des divers stress sur le taux de mortalité de la souche CHM18 (Essai adapté)	85
Figure 33: Effet de la GB sur la croissance des cellules pendant le stress osmotique.....	92
Figure 34: Effet de la proline et la GB sur la croissance des cellules CHM18 pendant le stress osmotique	93
Figure 35: Effet de la proline sur la croissance des cellules pendant le stress thermique....	94
Figure 36: Effet de la GB sur la croissance des cellules pendant le stress thermique.....	95
Figure 37: Effet de la proline sur la croissance des cellules pendant le stress acide	97
Figure 38: Effet de la GB sur la croissance des cellules pendant le stress acide.....	98
Figure 39 : Analyse des protéines totales synthétisées lors du stress osmotique de la souche BH14 par électrophorèse SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide 11%.....	101
Figure 40: Evolution du pH au cours du temps de la souche BH14.....	104
Figure 41: Evolution de la production d'acide lactique au cours du temps de la souche BH14.....	105

Liste des tableaux

Tableau 1 : Habitats des lactobacilles (Penaud, 2006).....	08
Tableau 2 : Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques (Penaud, 2006).....	09
Tableau 3 : Phénomène de protections homologue et hétérologue chez les bactéries lactiques.....	15
Tableau 4 : Structure des principaux solutés compatibles (Baliarda, 2003).....	22
Tableau 5 : Gènes impliqués dans la résistance au stress oxydant présents dans le génome de <i>Lb.bulgaricus ATCC11842</i> (Penaud, 2006).....	37
Tableau 6 : Caractérisation de l'induction de protéines en réponse au stress chez <i>Lc. lactis</i>	41
Tableau 7 : Origine des souches utilisées.....	44
Tableau 8 : Gamme étalon pour le dosage des protéines.....	50
Tableau 9 : Les CMI de NaCl correspondantes à chaque souche.....	55
Tableau 10 : Les TMI de croissance correspondant à chaque souche.....	56
Tableau 11 : Les pHMI de croissance correspondant à chaque souche.....	57
Tableau 12 : Facteurs de tolérance de la souche CHTD27.....	86
Tableau 13 : Facteurs de tolérance de la souche BH14.....	87
Tableau 14 : Facteurs de tolérance de la souche CHM18.....	87
Tableau 15 : Concentrations optimales de la proline et la glycine-bétaine du stress osmotique.....	89
Tableau 16 : Concentrations optimales de la proline et la glycine-bétaine du stress thermique.....	89
Tableau 17 : Concentrations optimales de la proline et la glycine-bétaine du stress acide...	89
Tableau 18 : Quantité de protéines produites par les cellules de la BH14 exposées aux stress osmotique et acide après 50 cycles de lyse thermique.....	100

Liste des abréviations

ADN	: acide désoxyribonucléique
ARN	: acide ribonucléique
atm	: atmosphère
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: adénosine tri-phosphate
ATR	: Acid Tolerance Response
a_w	: activité de l'eau
B	: <i>Bacillus</i>
BL	: bactérie lactique
BusA	: betaine uptake system A
C	: <i>Corynebacterium</i>
°C	: degré Celsius
CIRCE	: Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression
cm	: centimètre
CMI	: concentration minimal inhibitrice
Csp	: Cold Shock Protein
°D	: degré Dornic
DO	: densité optique
E	: <i>Escherichia</i>
EDTA	: éthylène diamine tétra acétate
Ent.	: <i>Enterococcus</i>
Fur	: Ferric uptake Regulator
g	: gravité
GB	: glycine-bétaine
g/l	: gramme par litre
GSP	: protéines générales de stress
H	: heure
H⁺	: ion hydroxyde
HCl	: chlorure d'hydrogène
HK	: Histidine Kinase
Hsp	: Heat Shock Protein
K⁺	: ion potassium
kDa	: kilo Dalton (unité de masse des protéines)
kg	: kilogramme
KCl	: chlorure de potassium
L.	: <i>Listeria</i>
Lb.	: <i>Lactobacillus</i>
Lc.	: <i>Lactococcus</i>
Leu.	: <i>Leuconostoc</i>

M	: molaire
mA	: milli-ampère
mg/ml	: milligramme par millilitre
min	: minute
ml	: millilitre
mm	: millimètre
mM	: millimolaire
MRS	: de Man, Rogosa et Sharpe
m/v	: masse par volume
µg	: microgramme
µg/µl	: microgramme par microlitre
µl	: microlitre
NaCl	: chlorure de sodium
NADH	: nicotinamide adénine dinucléotide
ND	: non déterminé
NH₃	: ammoniac
nm	: nanomètre
NSLAB	: Non- Starter Lactic Acid Bacteria
<i>O.</i>	: <i>Oenococcus</i>
O₂⁻	: ion superoxyde
OH	: radical hydroxyle
OpuA	: osmoprotectant uptake system A
P	: protéine
<i>P.</i>	: <i>Pediococcus</i>
pH	: potentiel d'hydrogène
pHMI	: pH minimum inhibiteur
pH_{int}	: potentiel d'hydrogène interne
p/v	: poids à volume
QacT	: Quaternary ammonium compound Transporter
qsp	: quantité suffisante pour
rpm	: round per minute : tours par minute
RR	: protéine régulatrice de réponse
RT-PCR	: reverse transcription–polymerase chain reaction
<i>Sc.</i>	: <i>Staphylococcus</i>
SDS	: dodécyl sulfate de sodium
SDS-PAGE	: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis : électrophorèse
<i>ssp.</i>	: <i>sous espèce</i>
<i>St.</i>	: <i>Streptococcus</i>
<i>T.</i>	: <i>Tetragenococcus</i>
T°	: température
TMI	: température minimale inhibitrice
UFC	: unité formant colonie
UV	: ultra-violet

V : Vitesse de croissance
VNC : Viables mais Non Cultivables
v/v : volume à volume
 σ^B : facteurs sigma B

INTRODUCTION

Le secteur des industries agroalimentaires utilise un certain nombre d'auxiliaires technologiques, parmi lesquels les bactéries lactiques, pour élaborer des aliments fermentés. Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène qui rassemble des bactéries capables de produire de l'acide lactique par un métabolisme fermentaire (**Rigaux, 2008**). L'acidification et les procédés enzymatiques accompagnant leur développement influencent les qualités organoleptiques et la préservation de nombreux aliments. Les différentes applications des bactéries lactiques en agroalimentaires reposent sur l'utilisation de six genres-clefs : *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus* et *Streptococcus* (**Baliarda, 2003**).

Les bactéries lactiques sont également retrouvées dans d'autres secteurs d'application. Ainsi certains membres de cette famille (les Lactobacilles notamment) sont utilisés comme probiotiques, c'est-à-dire comme une préparation microbienne vivante ayant une action bénéfique sur l'hôte après ingestion (augmentation de la prise de poids des animaux d'élevage, réductions des infections...) (**Bourlioux, 2007**).

Dans leurs habitats naturels, les microorganismes sont fréquemment exposés à des variations des propriétés physicochimiques du milieu environnant : la température, l'osmolarité ou encore l'acidité de ce milieu. Les pratiques de l'industrie laitière provoquent des variations de ces paramètres et les bactéries utilisées, qui y sont constamment confrontées, ont développé des réponses adaptés à ces variations (**Özer et al., 2009**). Ces réponses font l'objet d'études académiques depuis plus de vingt ans pour améliorer les fabrications industrielles. Outre de son intérêt fondamental, l'étude des mécanismes de protection contre les stress chez les bactéries est aussi nécessaire pour une utilisation optimale de celles-ci dans les procédés industriels (**Essaid et al., 2009**).

L'espèce *Lactococcus lactis* a longtemps été présentée et utilisée comme bactérie lactique modèle dans l'étude de la réponse au stress, et à la contrainte osmotique en particulier. Aujourd'hui, les tendances observées en matière de régulation doivent être comparées chez d'autres bactéries lactiques, notamment les lactobacilles (**Kumalaningshi et al., 2011**).

L'équipe du Laboratoire de Biologie de Micro-organismes et de Biotechnologie (LBMB) de l'université d'Oran Es-Sénia a constitué une collection de souches de bactéries lactiques isolées à partir de différents échantillons de lait et de la saumure d'olive de différentes régions (**Karam, 1995 ; Zadi-Karam, 1998 ; Zadi-Karam et Karam, 2006**). Parmi les espèces

isolées à partir du lait de chamelle de Timimoun, il existe des lactocoques identifiés comme étant des *Lactococcus lactis cremoris* résistant à des concentrations de 6.5% de NaCl (Selkh, 1995 ; Saad, 1997 ; Zadi Karam, 1998 ; Zadi-Karam et Karam, 2006). Saad (1997), Zadi Karam (1998) et Boublenza (2003) ont étudié la croissance des lactocoques en présence des concentrations croissantes de NaCl. Baghdad Belhadj-Semar (2009) a étudié la résistance au sel et l'osmoprotection chez des souches de *Lactobacillus*.

Ce travail de mémoire consiste à poursuivre les recherches initiées au laboratoire sur la réponse spécifique au stress osmotique chez des lactobacilles et une initiation à l'étude des stress acide et thermique chez ces mêmes souches. Notre travail a pour objectif d'étudier le comportement de souches de lactobacilles (CHTD27, BH14 et CHM18) isolées de laits de chammelles face à des contraintes osmotique, acide et thermique en vue de leur utilisation pour des recherches fondamentales ainsi que pour d'éventuelles applications technologiques.

Par des approches physiologiques, biochimiques et technologiques nous avons cherché à :

- Evaluer l'impact de différents types de contraintes sur les paramètres de croissance ;
- Evaluer l'impact de différents types de contraintes sur la viabilité des cellules ;
- Adapter les cellules aux différentes contraintes afin de pouvoir comparer les résultats obtenus ;
- Etudier l'impact de l'osmoprotection sur des cellules stressées ;
- Faire une analyse du contenu protéique des souches par une électrophorèse SDS-PAGE ;
- Initier une étude sur les caractères technologiques des souches stressées ;

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

1. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. GENERALITES :

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des millénaires dans l'alimentation humaine. Après un bref rappel historique sur l'utilisation des produits fermentés et notamment des produits laitiers au cours de l'histoire humaine, nous verrons quelles sont leurs caractéristiques principales et comment elles sont utilisées industriellement de nos jours.

1.1.1. Historique :

L'utilisation de la fermentation par l'Homme remonte à des temps très anciens. Les premières preuves de l'existence des produits laitiers fermentés remontent à 8000 ans avant JC (**Fox, 1993**). Il faudra attendre Pasteur et ses travaux sur la fermentation en 1857 pour établir un lien entre la fermentation lactique et les bactéries (**Alice et Sanchez-Rivas, 1997**). La première culture bactérienne pure sera d'ailleurs une culture de *Lactococcus lactis* obtenue et décrite par Joseph Lister en 1873 (**Azcarate-Peril et al., 2004**).

Depuis 1960, la production industrielle de yaourt connaît un développement international considérable et le yaourt est devenu aujourd'hui un produit de consommation courante en Occident. En 2003, la consommation de yaourts et de laits fermentés s'est élevée en France à 1,3 millions de tonnes, soit 21,9 kg par an et par habitant (**Baliarda, 2003**).

1.1.2. Caractéristiques générales des bactéries lactiques :

La première définition de bactéries lactiques (BL), basée sur la capacité des bactéries de fermenter et de coaguler le lait, englobait les bactéries coliformes et lactiques. En 1901, Beijerinck observe que les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif, ce qui séparera définitivement les bactéries lactiques (à Gram positif) des bactéries coliformes (**Stiles et Holzappel, 1997**).

A quelques exceptions près, elles partagent les caractéristiques suivantes : ce sont des cellules procaryotes, hétérotrophes, et chimioorganotrophes, non pathogènes, à Gram positif, généralement immobiles, non sporulées, anaérobies mais aérotoles, ne possédant pas la catalase ni la nitrate réductase ni la cytochrome oxydase, ne liquéfiant pas la gélatine, et ne produisant pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux (**De Roissart et Luquet, 1994**), elles sont

généralement immobiles, asporulés, anaérobies mais aérotolérants (Novel, 1993). Pour se développer, elles ont besoin de sources de carbone organique (glucides fermentescibles) et de nombreuses BL ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés ou les peptides, les vitamines et les acides gras (Prescott *et al.*, 1999).

Les BL peuvent avoir un métabolisme homofermentaire (l'acide lactique est quasiment le seul produit), hétérofermentaire facultatif (elles produisent de l'acide lactique ou de l'acide lactique et de l'acide acétique) ou hétérofermentaire strict (elles produisent, en plus de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO₂ ; Vandamme *et al.*, 1996). Elles sont classées en plusieurs genres : *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weisella* (Pot, 2008). Le genre *Lactobacillus* nous intéresse particulièrement.

1.1.3. Classification et taxonomie :

Les BL appartiennent toutes au groupe des bactéries à Gram positif, mais si la plupart d'entre elles appartiennent au groupe des bactéries à Gram positif à bas %G+C (phylum des Firmicutes), le genre *Bifidobacterium* appartient au groupe des bactéries à Gram positif à haut %G+C (phylum des Actinomycètes ; Figure 1) (Holzapfel *et al.*, 2001).

Parmi les bactéries lactiques, on peut distinguer quatre groupes phylogénétiques principaux. Les genres *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* et *Aerococcus* forment un premier groupe (Stiles et Holzapfel, 1997). Les genres *Streptococcus* et *Lactococcus* n'ont été séparés qu'en 1985 avec l'apparition du genre *Lactococcus* (Schleifer *et al.*, 1985) et sont phylogénétiquement proches. Dans le genre *Streptococcus*, la seule espèce utilisée comme ferment dans l'industrie alimentaire est *St. thermophilus*, notamment pour la production de yaourt avec *Lb. bulgaricus*.

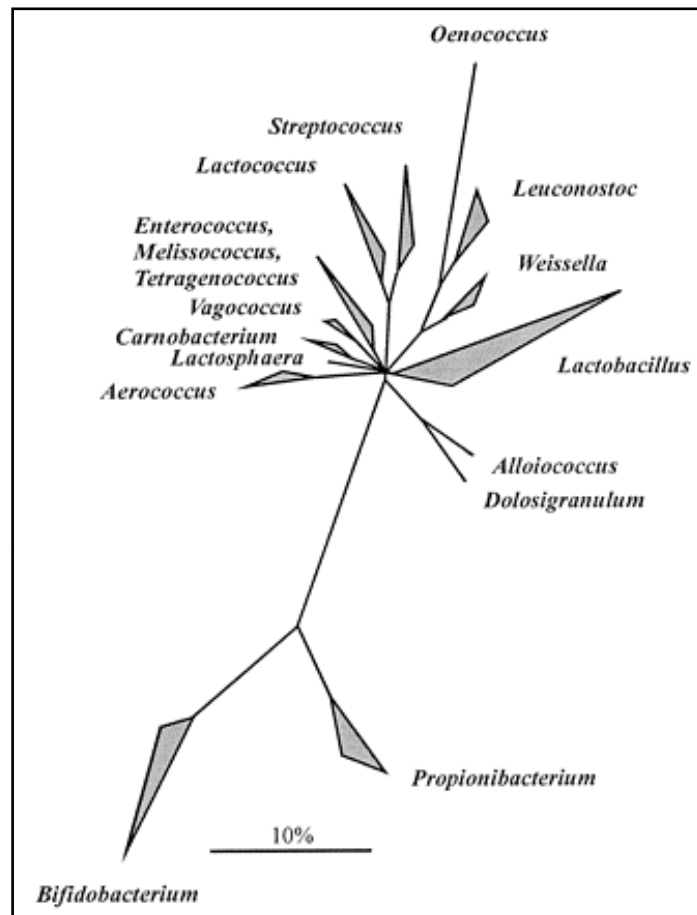


Figure 1 : Distances phylogénétiques entre les genres principaux constituant les BL basées sur les séquences des ARNr 16S (Schleifer et Ludwig, 1995)

1.1.4. Utilisation industrielle des bactéries lactiques :

Les BL sont très utilisées dans l'industrie agroalimentaire. Tout d'abord, les BL vont permettre de changer la saveur de l'aliment et sa texture (Sánchez *et al.*, 2009). D'autre part, les BL produisent des peptides et des molécules comme l'acétoïne, l'acétaldéhyde, le diacétyle ou l'éthanol qui sont importants pour la flaveur des aliments. Un autre rôle des BL est d'inhiber le développement de la flore bactérienne indésirable qu'elle soit pathogène ou d'altération (Klaenhammer, 1988; Rammelsberg *et al.*, 1990). Les BL sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides et de mannitol) (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002 ; Wisselink *et al.*, 2002). Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines

(**Rodriguez et al., 2003**) et pourraient être impliquées dans la production de protéines thérapeutiques ou comme vecteurs de vaccins (**Langella et al., 2001**).

1.1.5. Des bactéries commensales de l'homme :

Si les BL sont importantes pour l'alimentation humaine, elles le sont aussi pour sa santé. En effet, des BL ont colonisé un grand nombre de niches écologiques notamment le tractus digestif où le nombre de bactéries ($\sim 10^{15}$) est supérieur au nombre total de cellules humaines constituant l'organisme (**Backhed et al., 2005**). On estime que seulement 20 à 40% des bactéries du colon sont cultivables et ont été caractérisées (**Servin, 2004**).

La flore intestinale permet de fermenter des aliments non digérables par l'homme (**Cummings et Macfarlane, 1997**). La microflore intestinale joue aussi un rôle dans la synthèse de vitamines (**Hill, 1997**) et dans l'absorption de certains ions comme le calcium, le magnésium et le fer (**Miyazawa et al., 1996**). Les bactéries du tube digestif protègeraient l'hôte des infections bactériennes à deux niveaux : elles stimuleraient le système immunitaire de l'hôte et le protègeraient des pathogènes par « l'effet barrière » (**Gurner et Malagelada, 2003 ; Servin, 2004**).

1.1. 6. Les lactobacilles :

Les lactobacilles représentent un genre important des BL tant au niveau industriel qu'au niveau de la flore commensale infantile. Ils ont des aspects variés, allant du bacille long et fin au coccobacille en passant par la forme bâtonnet court, ou légèrement flexueux. Ils sont fréquemment associés en chaînettes, et habituellement immobiles, généralement aérobies facultatifs, ou microaérophiles, et ont des besoins nutritionnels complexes (**Prescott et al., 1995**). Les lactobacilles se montrent généralement plus résistants au stress acide que les lactocoques (**Siegumfeldt et al., 2000**). Le métabolisme des sucres, chez ces bactéries, est hétéro ou homofermentaire, et certaines souches sont thermophiles, d'autres mésophiles (**Geneviève, 2000**). Cependant, ce genre est très hétérogène, aussi bien sur le plan génétique que sur le plan de la distribution des habitats (**Pietrrese et al., 2005**).

1.1.6.1. Diversité génétique :

Le genre *Lactobacillus* a été proposé par Beijerinck en 1901, il est composé de plus de 60 espèces décrites et est génétiquement assez divers. Le pourcentage en G+C varie entre 32 et 54 %. Une première classification des lactobacilles a été établie selon le profil fermentaire (De Roissart et Luquet, 1994).

Les lactobacilles sont divisés en groupes phylogénétiques portant le nom de l'espèce type, considérée comme la plus représentative du groupe considéré : *Lb. acidophilus*, *Lb. salivarius*, *Lb. reuteri*, *Lb. buchneri*, *Lb. plantarum*... (Figure 2). Le premier génome de lactobacille à être publié a été celui de *Lb. plantarum* en 2003 (Kleerebezem et al., 2003). Plus récemment, le génome de *Lb. sakei*, un autre lactobacille hétérofermentaire facultatif, phylogénétiquement éloigné de *Lb. plantarum*, a été séquencé (Chaillou et al., 2005).

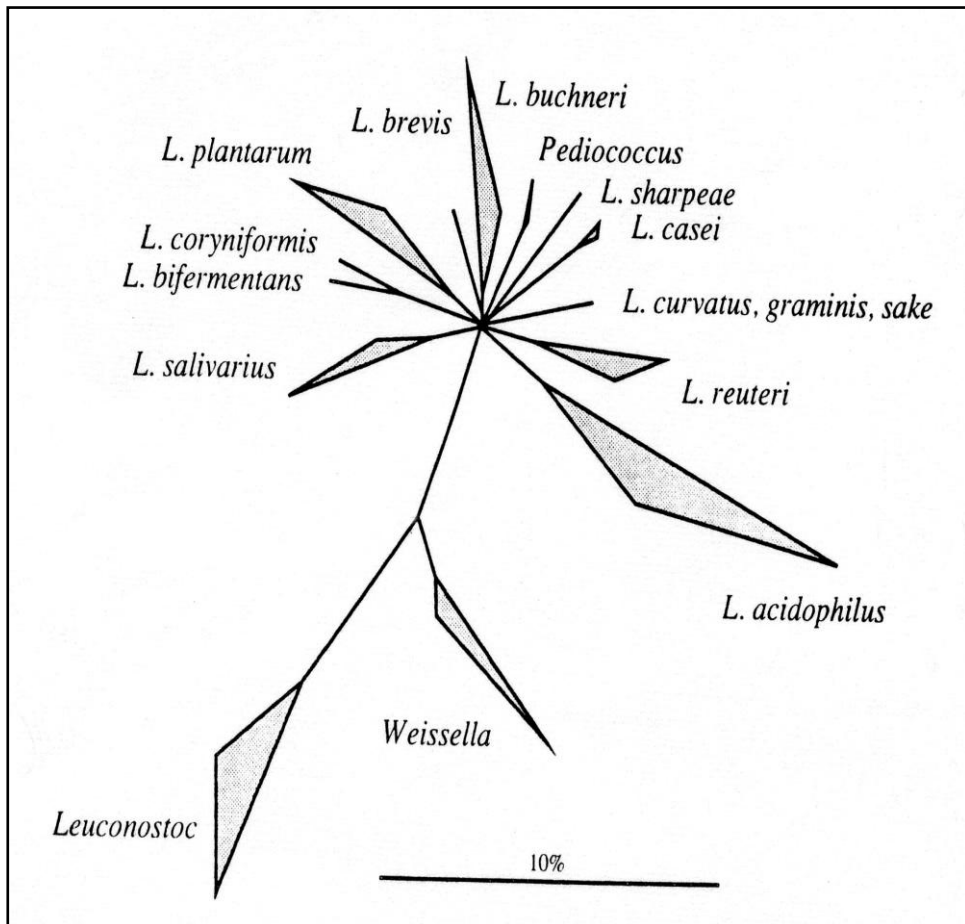


Figure 2 : Arbre phylogénétique des groupes principaux du genre *Lactobacillus* basé sur les ARNr 16S (Penaud, 2006)

1.1.6.2.Diversité des habitats :

Les lactobacilles ont colonisé un nombre important de niches écologiques (**Tableau 1**) et représentent le groupe de BL le plus ubiquitaire dans l'environnement (**De Roissart et Luquet, 1994**). Certains lactobacilles peuvent être isolés de plusieurs niches écologiques, d'autres sont limitées à des niches écologiques plus restreintes (**De Angelis et al., 2001**) . La grande diversité d'habitats explique que les lactobacilles sont très utilisés pour la production de nombreux produits fermentés traditionnels (**Stiles et Holzapfel, 1997 ; De Roissart et Luquet, 1994**)(**Tableau 2**).

Tableau1 : Habitats des lactobacilles (Penaud, 2006)

Environnement	Exemples
Plantes et produits végétaux	<i>Lb. plantarum, Lb.brevis, Lb. buchneri, Lb. fructosus</i>
Sols, eau, eaux usées et compost	<i>Lb. sharpeae, Lb. agilis, Lb. pentosus, Lb. rhamnosus</i>
Lait	<i>Lb. delbrueckii, Lb. casei, Lb. helveticus, Lb. hilgardii, Lb. kefir</i>
Viande	<i>Lb. sakei, Lb. curvatus, Lb. halotolerans, Lb. reuteri</i>
Légumes	<i>Lb. plantarum, Lb. brevis, Lb. fermentum, Lb. cellobiosus</i>
Levain (pain)	<i>Lb. delbrueckii, Lb. buchneri, Lb. acidophilus, Lb. casei, Lb. plantarum</i>
Malt	<i>Lb. delbrueckii, Lb. casei, Lb. brevis</i>
Ensilage	<i>Lb. paracasei, Lb. plantarum, Lb. brevis, Lb. fermentum</i>
Cavité orale	<i>Lb. plantarum, Lb. salivarius, Lb. oris, Lb. gasseri, Lb. crispatus</i>
Tractus digestif	<i>Lb. reuteri, Lb. gasseri, Lb. plantarum, Lb. ruminis, Lb. acidophilus</i>
Vagin	<i>Lb. crispatus, Lb. jensenii, Lb. gasseri, Lb. vaginalis, Lb. acidophilus</i>

1.1.6.3. Utilisation en industrie laitière :

En fromagerie, les lactobacilles sont généralement utilisés pour la préparation de pâtes dures ou semi-dures typiques des fromages suisses et italiens (**Alice et Sánchez-Rivas, 1997**). Jusqu'aux années 80, quelques espèces de *Lactobacillus* étaient considérées comme des contaminants (Non- Starter Lactic Acid Bacteria ou NSLAB ; **Boyd et al., 2000**). Dans les années 1990, plusieurs auteurs ont démontré que ces espèces participaient à l'affinage des fromages par leur activité protéolytique, et la formation d'arômes qui en résulte (**Lane et al., 1996 ; Lynch et al., 1996**). Cependant, l'arrivée des techniques de traitement du lait de

fromagerie, telle que la pasteurisation à basse température couplée à la microfiltration, a contribué à une diminution significative dans le lait de ces NSLAB. Cette constatation a incité les producteurs de ferments fromagers à développer et commercialiser de nouvelles cultures, dites auxiliaires, contenant des souches de *Lactobacillus* capables d'accentuer et d'accélérer l'affinage des fromages (El Soda *et al.*, 2003).

Tableau 2 : Principaux produits issus de la fermentation des bactéries lactiques (Penaud, 2006)

Genres	Substrat	Exemple de produits
<i>Bifidobacterium</i>	lait	laits fermentés
<i>Lactobacillus</i>	lait	yaourts, laits fermentés, kéfirs, fromages
	viande	saucissons secs, jambons secs
	végétaux	choucroute, olives, "yaourts" au lait de soja
	céréales	pain au levain, bières
<i>Lactococcus</i>	lait	fromages, kéfirs
<i>Leuconostoc</i>	végétaux	choucroute, olives, vin
<i>Pediococcus</i>	végétaux	choucroute
	viande	saucisses semi-séchées
<i>Oenococcus</i>	végétaux	vin
<i>Streptococcus</i>	lait	lait yaourts, laits fermentés, fromages

1.1.6.4. Effets des lactobacilles sur la santé :

Depuis Metchnikoff et ses théories sur l'effet bénéfique des ferments lactiques, l'effet probiotique de certains lactobacilles a été et est encore largement étudié (Isolauri *et al.*, 2004). Un des effets majeurs des lactobacilles sur la santé humaine décrits dans la littérature est leur rôle antagoniste vis à vis des bactéries pathogènes (Servin, 2004). Les effets des lactobacilles sur les bactéries pathogènes reposent sur différentes propriétés telles que la capacité à adhérer aux cellules et d'inhiber ainsi l'adhésion des pathogènes, l'inhibition de la croissance des pathogènes, la capacité d'entrer en compétition avec les pathogènes pour les ressources nutritives et la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte (Reid et Burton, 2002). Aujourd'hui, le débat reste encore ouvert sur l'innocuité des probiotiques, qui pourraient être des opportunistes notamment chez les patients immuno-déprimés (Cannon *et al.*, 2005).

1.2. GENERALITES SUR LE STRESS :

Selon **Booth (2002)**, le stress correspond à "toute modification dans le génome, le protéome ou dans l'environnement, qui provoque une croissance réduite ou affecte la capacité à survivre. De telles modifications conduisent la cellule à tenter de restaurer un profil métabolique qui serait favorable à la survie, ou bien à une croissance plus rapide".

La résistance d'un microorganisme face à un stress donné dépend de son état physiologique. Les cellules qui ont cessé de croître, qui se développent lentement ou qui sont entrées en phase stationnaire, acquièrent un niveau général de protection au stress supérieur à celui des cellules en pleine croissance (**Martin et al., 1995**). La résistance au stress d'une population bactérienne dépend également de la composition du milieu de culture (**Annous et al., 1999 ; Guillot et al., 2000 ; Carvalho et al., 2003**)

Les cellules Viables mais Non Cultivables (VNC) sont des cellules métaboliquement actives, mais qui ne sont plus capables de se développer sur milieu gélosé (**Kogure, 1979; Xu et al., 2003**). L'entrée en état VNC est indépendante de la division cellulaire ou de l'augmentation de la biomasse (**Ravel et al., 1994; Colwell et Grimes, 2000**).

Actuellement deux hypothèses tentent d'expliquer le phénomène VNC: (1) les cellules VNC seraient des cellules morbides incapables de former des colonies sur milieu gélosé à cause de détériorations cellulaires diversers, (2) les cellules entreraient en état VNC selon une stratégie de réponse adaptative programmée, visant à améliorer leur survie (**Morbach et Kramer, 2002**).

Selon cet auteur, cet état correspondrait à une forme de "stérilité" développée par des bactéries intactes (intégrité membranaire et conservation d'une activité métabolique). L'état VNC a été observé dans diverses situations de stress : carence nutritive, basses températures, pressions élevées, variations du pH ou de la salinité extérieure (**Delmas et al., 2001**). Il s'avère que l'évaluation de l'effet d'une contrainte sur les flores présentes dans un aliment par des techniques de numérations directes sur milieu gélosé ne prend pas en compte la proportion de la population à l'état VNC et tend à minimiser le nombre de cellules totales. L'utilisation de procédures d'enrichissement avant numération peut révéler en partie cette population VNC (**Asakura et al., 2002**).

1.3. MODALITE D'APPLICATION DU STRESS:

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

1.3.1. Stress prolongé:

Cette modalité d'application du stress consiste à inoculer dans un milieu modérément hostile, c'est-à-dire permettant une croissance. Il s'agit ici de suivre l'adaptation progressive (ou acclimatation) de la bactérie face à un stress prolongé (**Kempf et Bremer, 1998**). L'évaluation de l'impact du stress prolongé sur la croissance est classiquement réalisée par turbidimétrie en mesurant les effets des variations des paramètres de croissance. Il peut s'agir de l'augmentation du temps de latence ou de la diminution du taux de croissance et de l'absorbance finale (**Baliarda, 2003**).

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

1.3.2. Stress de type choc:

Le stress peut également prendre la forme d'une contrainte intense et de courte durée (**chocs**) (**Piuri et al., 2003**). La réponse de la bactérie sera évaluée en terme de survie après que la contrainte ait été supprimée, et ceci principalement par numération sur milieu gélosé. Plusieurs facteurs influencent le taux de survie d'une population bactérienne après un stress de type choc : l'état physiologique des cellules, le genre, l'espèce et parfois même la souche considérée (**Kim et al., 1999**).

Lorsque la résistance est évaluée sur des cellules en phase exponentielle de croissance, des différences apparaissent entre les cellules d'une même population (**Booth, 2002; Kim et al., 2002**). Selon **Kim (2002)**, les cellules d'une même culture bactérienne ne sont pas toutes exactement dans le même état physiologique. Chacune possède un contenu protéique donné et présente, par conséquent, un niveau de résistance au stress létal différent (**Poolman et al., 2004**). Ainsi, les cellules d'une même population de *Lc. lactis* ayant survécu à un stress intense (99,99% mortalité) sont toutes capables de croître ultérieurement en absence de stress, tandis que seule une proportion peut survivre à un stress intense ultérieur (**Kim et al., 2002**). Les cellules survivant au premier stress ne possédaient donc pas toutes le même équipement de réponse au stress.

Différentes hypothèses permettent d'expliquer pourquoi des cellules en phase exponentielle de croissance issues d'une même population ne possèdent pas toutes le même contenu protéique : (i) il existe des variations génétiques au sein de cette population, (ii) des altérations transitoires de la transcription et de la traduction apparaissent, (iii) l'activité des protéines chaperonnes et des systèmes protéolytiques varie (**Booth, 2002**) (**Figure 3**).

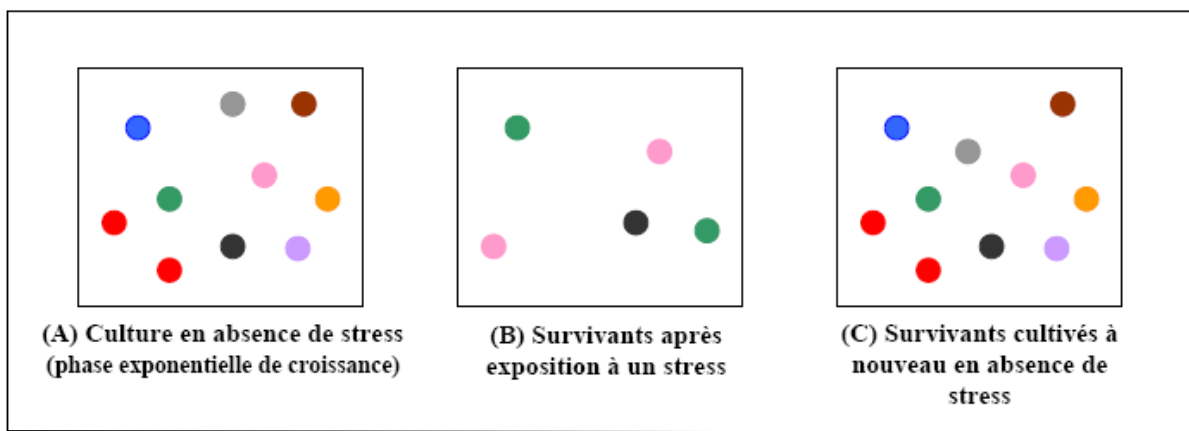


Figure3 : Modèle de l'hétérogénéité intra-population (Booth, 2002).

Ce modèle d'hétérogénéité intra-population est présenté comme une stratégie permettant à une bactérie de survivre au stress. Il garantit ainsi qu'au moins une partie de la population survivra face un stress donné. Dans ce modèle, la population ayant survécu au stress possède les mêmes potentiels génétiques que la population originelle. Lorsqu'elle sera cultivée en absence de stress, elle générera à nouveau l'apparition d'un mélange de cellules présentant des profils protéiques similaires à ceux de la population initiale (**Korber et al., 2000**).

1.4. EFFET DU STRESS SUR LES BACTERIES:

1.4.1. Effet sur la croissance / survie / morphologie:

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

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

Le stress peut également provoquer un événement d'agrégation cellulaire, comme c'est le cas chez *Lb. alimentarius* en présence d'un stress hyper-osmotique (**Lemay et al., 2000**).

1.4.2. Effets sur la virulence des bactéries pathogènes :

Certaines contraintes ont un effet direct sur la production de toxines. Ainsi, la production des entérotoxines A et B par *S. aureus* est réduite dans un environnement dont l' a_w est faible (Qi et Miller, 2000). Chez *L. monocytogenes*, la présence de sels (NaCl ou KCl) entraîne une production accrue de catalase, superoxyde dismutase et de listeriolysin O (**Amegaza et al., 1995**).

Les acteurs principaux de la réponse au stress salin (osmoprotectants, systèmes de transport et de synthèse d'osmoprotectants, régulateurs transcriptionnels) semblent représenter d'importants facteurs de virulence chez plusieurs bactéries pathogènes (**Kazmierczak et al., 2003 ; Sleator et Hill, 2002**).

Ainsi, la carnitine semble être le principal osmoprotectant utilisé par *L. monocytogenes* pour vivre durant l'infection (Sleator *et al.*, 2001). L'inactivation de certains transporteurs d'osmoprotectants réduit la virulence des bactéries comme *E. coli* (Culham *et al.*, 1998), *Listeria monocytogenes* (Sleator *et al.*, 2001) ou *Salmonella* (Lindgren *et al.*, 1996). Chez *L. monocytogenes*, une exposition au stress acide augmente la virulence de la bactérie (Bolton et Franck, 1999 ; Gaillot *et al.*, 2001).

1.4.3. Adaptation au stress:

Les cellules en phase exponentielle de croissance sont capables de développer des mécanismes d'adaptation au stress. Lorsque ces cellules sont placées en contact avec un agent de stress modéré, elles deviennent plus résistantes à ce stress (protection homologue) et parfois à d'autres types de stress (protection hétérologue ou croisée ; Streit, 2008). L'importance du phénomène peut être évaluée en calculant le « **taux de survivants** », puis le « **facteur de tolérance** » (Lou et Yousef, 1997).

Pour une espèce donnée, toutes les combinaisons de stress ne sont pas susceptibles d'activer les mécanismes de protection croisée. La plupart des connaissances sur l'adaptation au stress au sein de la famille des BL concernent *Lc. lactis* (Tableau3), cependant certains stress (biliaire, acide, chaud ou salin) ont fait l'objet de travaux sur plusieurs BL. Lorsqu'ils sont employés en tant que stress adaptatifs, ils induisent des phénomènes de protection homologue et/ou hétérologue (Baliarda, 2003).

Ainsi, une adaptation acide protège d'un stress ultérieur acide, chaud, éthanolique, osmotique (salin ou dessiccation) ou oxydatif. Une adaptation saline protège d'un stress biliaire, chaud, ou d'un stress de dessiccation. Il est à noter que les données consignées dans le **tableau 3** concernent une souche particulière de chaque espèce bactérienne ; elles ne peuvent donc pas être extrapolées à l'espèce (Laplace *et al.*, 1999 ; Richmond *et al.*, 1999). En effet, Kim *et al.* (1999) ont montré que chaque espèce et même chaque sous espèce de *Lc.lactis* possède ses propres capacités d'adaptation.

Tableau 3: Phénomène de protections homologue et hétérologue chez les bactéries lactiques.

(1) : Hartke et al., 1994 ; (2) : Hartke et al., 1995 ; (3) : Flahaut et al., 1996 , (4) : O’Sullivan et Condon, 1997 ; (5) : Svensater et al., 2000 ;
 (6) : Lorca et et Font de Valdez, 1999 ; (7) : Kim et al., 2001 ; (8) : Prasad et al., 2003.

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

1. 5. STRESS OSMOTIQUE :

1.5.1. Définitions :

1. 5.1.1. Osmose et stress osmotique :

Le phénomène d'osmose correspond à la diffusion spontanée, sous la seule influence de l'agitation moléculaire, d'un composé chimique à travers une membrane semi-perméable. Il se produit lorsqu'une substance est présente à des concentrations différentes de part et d'autre de la membrane (**Romeo et al., 2001**). Cette différence engendre un excès de pression, appelé **pression osmotique**. La diffusion se fait alors de manière à ce que les deux concentrations tendent à s'égaliser. Le corps dissout dans l'eau franchit la membrane vers la solution la moins concentrée sous l'effet de la pression osmotique. Ce transfert spontané ne nécessite aucune dépense d'énergie et joue un rôle essentiel dans l'activité des cellules (**Lorca et al., 1998**).

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

1. 5.1.2. Les mouvements d'eau et la pression de turgescence :

Les mouvements d'eau causés par le phénomène d'osmose ont pour conséquence de modifier le volume cellulaire et, par là même, la pression exercée sur la membrane cytoplasmique de la bactérie, appelée **pression de turgescence** (**Dromigny, 2008**). Le maintien de la pression de turgescence est essentiel à la viabilité cellulaire puisqu'elle est considérée comme la force mécanique nécessaire à l'élongation de la cellule durant la croissance (**Koch, 1982**). La pression de turgescence des bactéries à Gram positif est estimée à des valeurs comprises entre 20 et 50 atm (**Whatmore et Reed, 1990 ; Doyle et Marquis, 1994**) alors que celle des bactéries à Gram négatif varie entre 0,8 et 5,0 atm (**Koch et Pinette, 1987; Overmann et al., 1991; Walsby et al., 1995**). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que plus la paroi est épaisse, plus la force nécessaire à son étirement doit être importante (**Bayels et Wilkinson, 2000**).

1. 5.1.3. L'effet du stress osmotique sur la cellule bactérienne :

1. 5.1.3.1. Environnement hypo-osmotique

Une diminution rapide de l'osmolarité du milieu extérieur (**choc hypo-osmotique**) provoque un afflux d'eau dans la cellule et par conséquent, une augmentation du volume cellulaire et de la pression de turgescence (**Figure 4 b**) en comparaison avec l'état de l'équilibre osmotique (**Figure 4 a**). Etant donné que la rigidité de la paroi bactérienne permet à la cellule de supporter des pressions élevées [jusqu'à 100 atm chez les bactéries à Gram à négatif (**Carpita, 1985**)], un choc hypo-osmotique ne provoque, en général, qu'une faible **augmentation** du volume cellulaire (**Elmnasser et al., 2006**).

1. 5.1.3.2. Environnement hyper-osmotique

Une augmentation brusque de l'osmolarité du milieu extérieur (**choc hyper-osmotique**) entraîne un rapide flux d'eau vers l'extérieur de la cellule ; le volume du cytoplasme diminue (**Figure 4 c ; Koch, 1984**). Dans le cas d'un choc hyper-osmotique sévère, la brusque diminution de l'activité de l'eau du cytoplasme inhibe certaines fonctions cellulaires comme l'adsorption de nutriments, la réplication de l'ADN ou la biosynthèse de macromolécules (**Csonka, 1989**). En cas de choc hyper-osmotique modéré, la plasmolyse n'est qu'une étape transitoire. En effet, la cellule est capable de s'adapter à ces faibles variations de l'osmolarité du milieu (**Lim et al., 2001**).

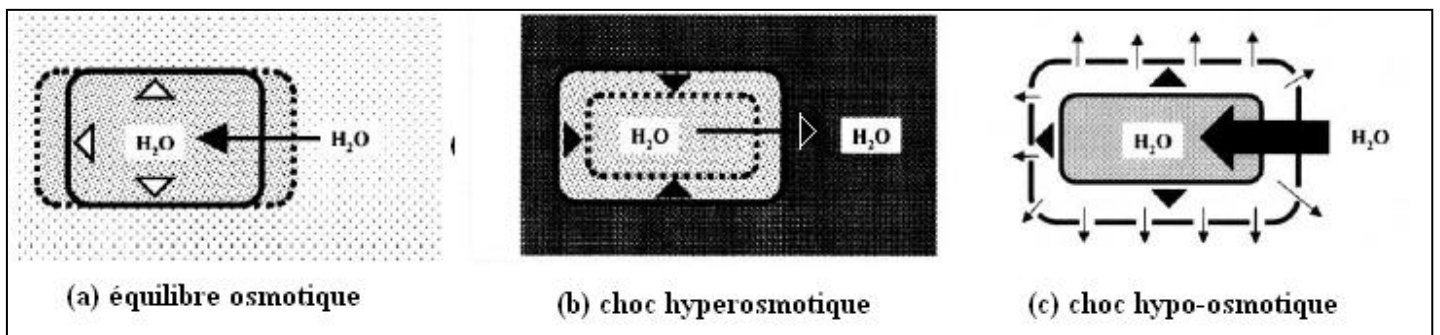


Figure 4 : Représentation des flux d'eau durant la croissance dans des conditions (a) d'équilibre osmotique, (b) de choc hyper-osmotique, (c) de choc hypo-osmotique (O'Byrne et Booth, 2002).

1. 5.2.Mécanismes d'osmorégulation :

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

1. 5.2.1.Choc hyper-osmotique :

Chez les microorganismes, deux types de stratégie d'osmorégulation ont été décrits pour affronter un choc hyper-osmotique: l'accumulation de sel dans le cytoplasme et l'accumulation de solutés compatibles.

1. 5.2.1.1.La stratégie des bactéries halophiles : «salt in cytoplasm»

La stratégie «salt in cytoplasm» est un mécanisme spécifique aux Halobactéries (**Martin et al., 1995 ; Galinski, 1995**) grâce auquel l'équilibre osmotique est obtenu en maintenant dans le cytoplasme une concentration en sel identique à celle du milieu extérieur. Chez certaines espèces du genre *Halobacterium*, la concentration en KCl dans le cytoplasme peut atteindre 7 M (**Lanyi, 1974**).

Cependant, l'accumulation de fortes concentrations en ions dans le cytoplasme est susceptible de perturber la physiologie cellulaire en provoquant l'agrégation des macromolécules et en réduisant la disponibilité de l'eau (**Lucas et al., 2003**). Aussi, les Halobactéries ont développé des mécanismes d'adaptation (**Figure 5**) qui leur permettent de disposer d'une machinerie cellulaire capable de supporter de fortes concentrations intracellulaires en ions (**Sleator et Hill, 2002**).

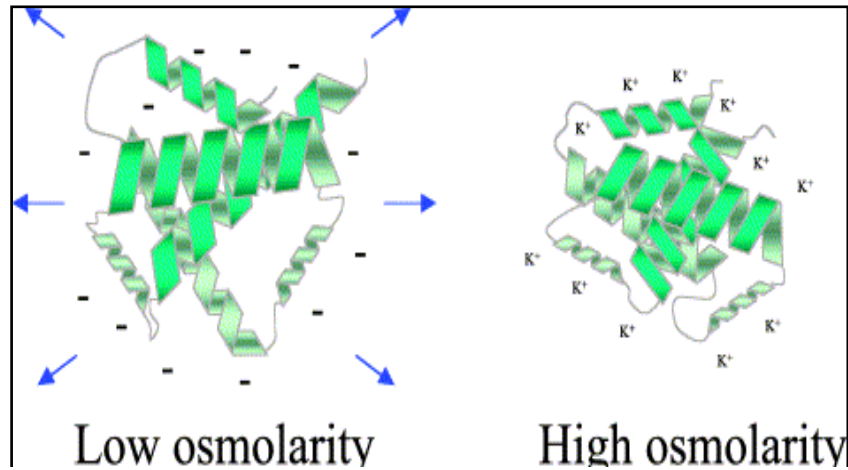


Figure 5 : Effet de l'osmolarité sur la structure d'une protéine d'une Halobactérie (Sleator et Hill 2002).

1.5.2.1.2. L'accumulation intracellulaire de solutés osmotiquement actifs :

Les bactéries modérément halophiles ont développé des mécanismes d'osmoadaptation leur permettant de survivre dans des habitats dont l'osmolarité peut fluctuer. En situation de stress osmotique, la cellule restaure une pression de turgescence positive en accumulant du potassium dans le cytoplasme (réponse primaire) et/ou des solutés dits « compatibles ». Cette accumulation peut se réaliser par synthèse endogène ou bien par transport à partir du milieu extérieur (Baliarda, 2003).

- La réponse primaire :

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

- La réponse secondaire :

Le terme de « solutés compatibles » a été introduit par **Brown et Simpson** en **1972** pour décrire des solutés accumulés qui ne présentaient pas d'activité inhibitrice, même à forte concentration, vis-à-vis des fonctions enzymatiques. Ce mécanisme de réponse au stress hyper-osmotique est donc plus répandu dans le monde du vivant que la stratégie « salt in cytoplasme » (**Bremer et Krämer, 2000**).

- Les osmoprotectants non accumulés :

Gouffi et Blanco (2000) ont montré, chez *Sinorhizobium meliloti*, que certaines molécules (ectoïne et disaccharides) ont un effet osmoprotecteur sans pour autant être accumulées dans le cytoplasme. **Prasad et al. (2003)** ont démontré qu'en situation de stress hyper-osmotique la quantité d'oligosaccharides (mono-, di-, tri-, tétra-saccharides) augmente dans le cytoplasme de *Lb. plantarum* (**Farwick et al., 1995**).

1. 5.2.2. Choc hypo-osmotique :

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

1.5.2.2.1. Efflux d'eau :

Les mouvements d'eau à travers les membranes biologiques sont facilités par la présence de canaux aqueux appelés **aquaporines**. Dans un environnement hypo-osmotique, ces canaux permettent de « lever » le stress aqueux sans dissiper le potentiel transmembranaire (**Engel et al., 2000 ; Streit, 2008**).

1.5.2.2.2. Efflux de solutés compatibles :

Aux canaux aqueux s'ajoutent des systèmes d'efflux de solutés compatibles dont l'activité a été observée chez *E. coli* (**Schleyer et al., 1993**), *Lb. plantarum* (**Glaasker et al., 1996.b**), *C. glutamicum* (**Ruffert et al., 1997**), *B. subtilis* (**Wong et al., 1995**) et *L. monocytogenes* (**Verheul et al., 1997**) en réponse à une diminution de l'osmolarité extérieure. Les bactéries possèdent deux types de système d'efflux de solutés compatibles: des **canaux de type mécanosensibles** (système efflux rapide) et des **transporteurs membranaires** (système d'efflux lent ; **Bouvier et al., 2000**). Des cinétiques d'efflux de glycine bêtaïne (GB) en conditions hypo-osmotiques montrent que la GB est rejetée dans le milieu extérieur par (i) des canaux chez *C. glutamicum* (**Ruffert et al., 1997**) (ii) des canaux et des transporteurs membranaires chez *Lb. plantarum* (**Glaasker et al., 1998**).

1. 5.3. Les solutés compatibles :

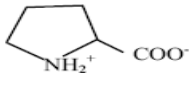
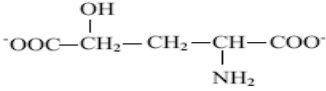
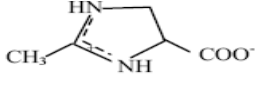
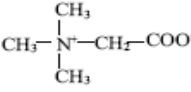
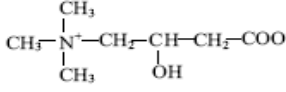
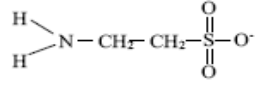
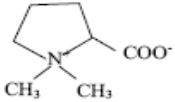
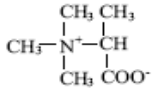
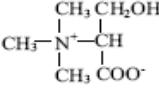
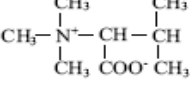
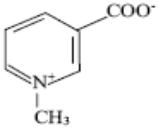
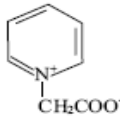
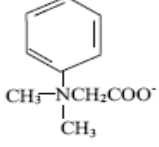
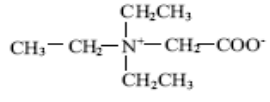
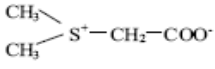
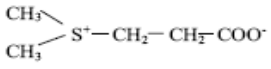
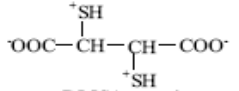
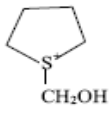
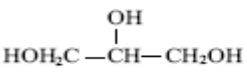
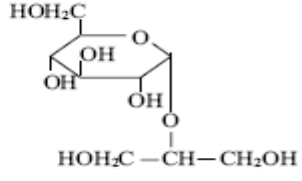
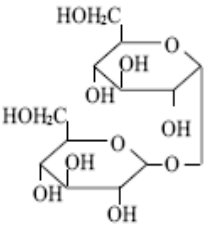
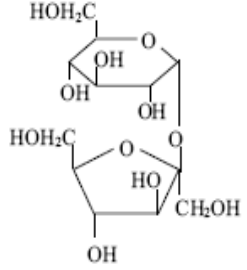
1. 5.3.1. Généralités :

Les solutés compatibles sont de molécules organiques très hydrosolubles qui (i) possèdent une charge nette nulle au pH physiologique, (ii) n'interagissent pas avec les protéines, (iii) n'interfèrent pas, même à forte concentration (>1M), avec les fonctions cellulaires vitales (**Sleator et Hill, 2002**). Ces composés agiraient comme des chaperonnes chimiques en aidant les protéines cytoplasmiques à conserver leur état de compaction (**Streit, 2008 ; Bourot et al., 2000**).

Selon **Bremer et Krämer (2000)**, la gamme de solutés compatibles (ou osmoprotectants) identifiés est composée (**Tableau 4**) : (i) d'acides aminés (glutamate) et de dérivés d'acides aminés (ectoïne), (ii) de petits peptides (N-acetylglutamine amide), (iii) d'ammonium quaternaires appelés bêtaïnes (GB), et de dérivés d'ammonium quaternaires (proline bêtaïne), (iv) de sucres (tréhalose).

La nature des solutés compatibles accumulés par une bactérie dépend (i) du niveau de présence de ces composés (ou de leur précurseurs) dans le milieu extérieur, (ii) de l'existence de systèmes de transport (ou de synthèse) d'osmoprotectants adéquats, (iii) de l'intensité du stress osmotique auquel elle doit faire face (**Galinski, 1995 ; Beumer et al., 1994**).

Tableau 4 : Structure des principaux solutés compatibles (Baliarda, 2003).

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

La GB est le soluté compatible préférentiellement utilisé chez les Procaryotes, les Plantes et les Animaux (**Robert *et al.*, 2000**). Elle est principalement accumulée par transport à partir du milieu extérieur ; quelques bactéries sont cependant capables de la synthétiser (**Sleator et Hill, 2002**). Un autre osmoprotectant largement utilisé par les bactéries est la proline (**Kempf et Bremer, 1998**). Chez les bactéries à Gram négatif en général, l'accumulation de proline en condition de stress osmotique résulte de la seule activité de transport (**Csonka, 1981**). L'origine de l'effet protecteur des solutés compatibles repose sur le fait qu'ils sont exclus de l'interface protéine-eau (**Figure 6**) (**Sleator et Hill, 2002**).

L'accumulation de solutés compatibles en réponse à un choc hyper-osmotique (i) stabilise la structure des protéines en améliorant l'état d'hydratation et de compaction, (ii) participe au maintien de la pression de turgescence en augmentant le volume cellulaire (**Canovas *et al.*, 2000**). Il est important de noter que la stabilisation de la structure des protéines grâce à l'action des solutés compatibles a pour effet d'augmenter la tolérance vis-à-vis du sel mais aussi vis-à-vis d'autres facteurs de stress comme la chaleur, la congélation et la dessiccation (**Lipper et Galinski, 1992; Welsh, 2000**).

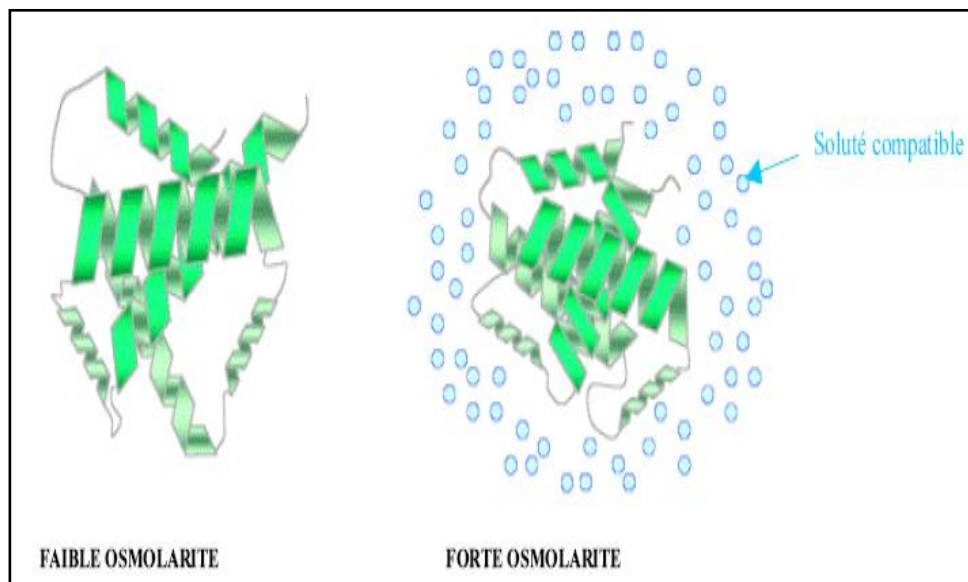


Figure 6: Représentation de la stabilisation de la structure d'une protéine d'une Halobactérie à forte osmolarité (Sleator et Hill, 2002).

1. 5.3.2. Modalité d'accumulation des solutés compatibles :

Les bactéries à Gram négatif accumulent des solutés compatibles uniquement lorsqu'elles sont soumises à un choc hyper-osmotique. Cependant, les bactéries à Gram positif tendent à accumuler ces molécules lorsqu'elles sont cultivées en laboratoire en conditions osmotiquement non stressantes (Whatmore et Reed, 1990; Glaasker *et al.*, 1998). Ceci semble être le reflet de la différence de pression de turgescence qui existe entre ces deux types bactériens (Kempf et Bremer, 1998). La capacité d'osmoadaptation d'une bactérie dépend d'une part de la disponibilité en solutés compatibles dans le milieu environnant et de son aptitude à les **accumuler** dans le cytoplasme soit par **synthèse** soit par **transport** d'autre part (Oren, 1999 ; Bernard *et al.*, 1993).

1.5.3.2.1. La synthèse d'osmoprotectants :

Rares sont les bactéries capables de synthétiser la GB. Cette caractéristique est confinée aux Eubactéries phototrophes et plus particulièrement à celles montrant une forte tolérance au sel comme *Ectothiorhodospira halocloris* (Galinski et Truper, 1982). La plupart des autres Eubactéries synthétisent la GB à partir de précurseurs comme la choline ou la carnitine (Imhoff, 1986).

1.5.3.2.2. Le transport d'osmoprotectants :

En situation de contrainte osmotique, l'accumulation de solutés compatibles à partir d'une source exogène a pour conséquence de diminuer fortement la synthèse endogène (Dinnbier *et al.*, 1988; Whatmore *et al.*, 1990 ; Sleator et Hill, 2002). Les transporteurs d'osmoprotectants ont donc généralement une forte affinité pour leurs substrats pour permettre un haut niveau d'accumulation. D'autre part, les bactéries possèdent souvent plusieurs systèmes de transport de solutés compatibles ayant parfois chacun plusieurs substrats potentiels (Redon, 2005). Ceci permet l'accumulation d'un large spectre d'osmoprotectants à partir de l'environnement. Ces systèmes se répartissent en deux grandes familles structurales: les **transporteurs ABC** et les **transporteurs actifs secondaires** (Baliarda, 2003).

L'aliment constitue une source variée de molécules utilisables dans le cadre d'une réponse primaire et/ou secondaire à une contrainte osmotique. (**Figure 7**). La plupart du temps, des quantités non négligeables de solutés sont retrouvés dans la composition des aliments. Il s'agit de sucres (comme le tréhalose), de peptides, d'acides aminés (dont la proline) ainsi que d'amines quaternaires (GB, carnitine,) (**McLaggan et Epstein, 1991**).

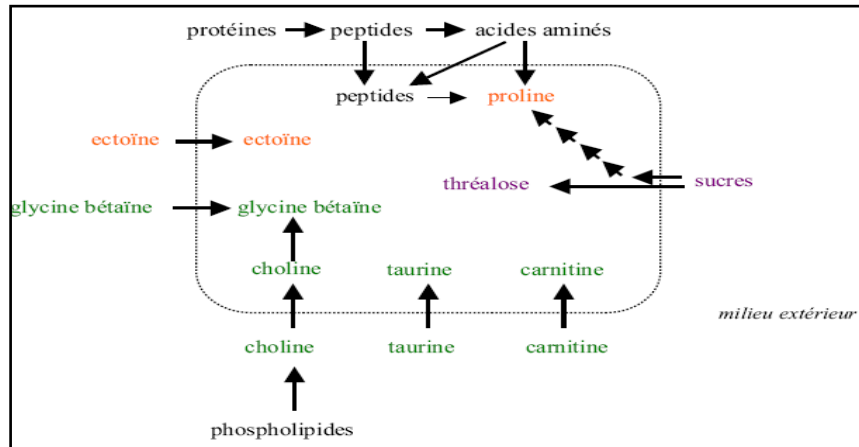


Figure 7: Origine des solutés compatibles accumulés par les bactéries présentes dans les aliments (O'Byrne et Booth, 2002).

1. 5.3.3. L'accumulation d'osmoprotectants chez les BL:

Les bactéries lactiques ne sont pas capables de synthétiser des osmoprotectants en situation de contrainte osmotique (**Roméo et al., 2001**), hormis la conversion choline/GB décrite chez *T. halophila* (**Robert et al., 2000**). Dans cette famille, l'essentiel des connaissances sur la nature des osmoprotectants et des modalités de transport ont été acquises chez les modèles *Lc. lactis* et *Lb. plantarum* (**Mc Donald et al., 1999**).

1.5.3.3.1. Chez *Lc. lactis*:

L'accumulation de GB et dans une moindre mesure de proline est capable de protéger *Lc. lactis* des effets délétères du stress osmotique (**Molenaar et al., 1993**). Récemment, un système unique de transport à haute affinité pour la GB a été isolé et caractérisé chez deux

souches de *Lc. lactis* : BusA (pour betaine uptake system A) (Obis *et al.*, 1999) aussi appelé OpuA (pour osmoprotectant uptake system A) (Bouvier *et al.*, 2000). Il présente la particularité d'être composé de deux protéines uniquement : une ATPase (BusAA, produit du gène *busAA*) et une protéine membranaire possédant une extension hydrophile liant le substrat (BusAB, produit du gène *busAB*) (Obis *et al.*, 1999 ; Bouvier *et al.*, 2000).

L'expression de l'opéron *busA* est régulée par l'osmolarité du milieu au niveau de transcriptionnel et post transcriptionnel (Figure 8) (Obis *et al.*, 1999; Bouvier *et al.*, 2000; Van Der Heide et Poolman, 2000).

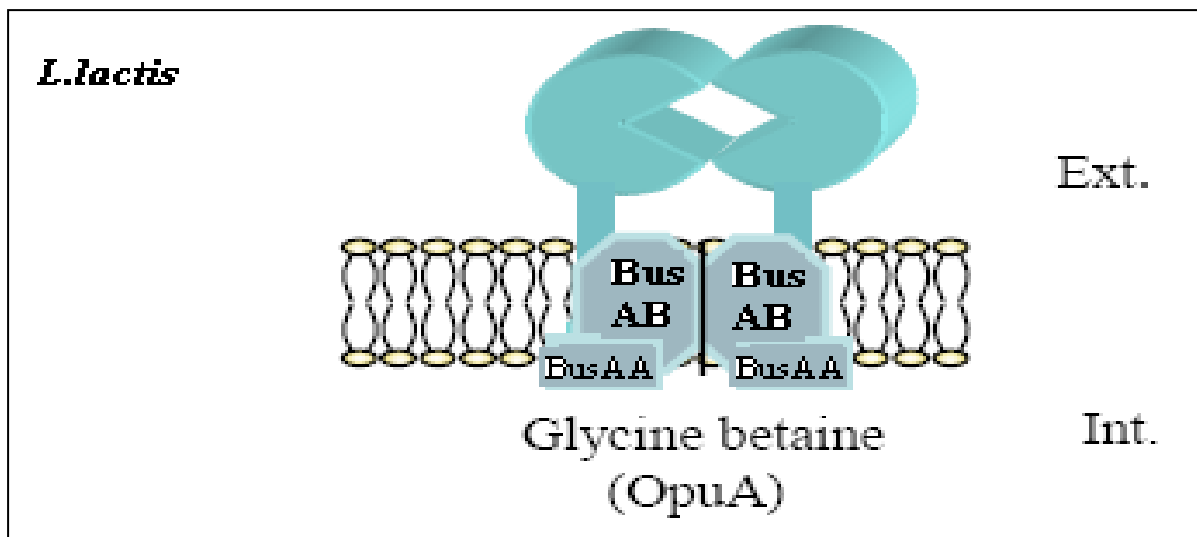


Figure 8 : Organisation du système de transport OpuA de la glycine-bétaine chez *L.lactis* (Hiron, 2007).

1.5.3.3.2. Chez *Lb. plantarum* :

Le contenu cytoplasmique de *Lb. plantarum* ATCC 14917 montre que le pool intracellulaire de K^+ , proline, glutamate, alanine et de GB augmente lorsque du KCl est ajouté au milieu de culture (1,51 osmole/kg ; Glaasker *et al.*, 1996 a). Lorsque le milieu extérieur est riche en GB, cette dernière est accumulée à forte concentration dans le cytoplasme tandis que la concentration intracellulaire des autres composés compatibles décroît (Glaasker *et al.*, 1996 b).

En conditions hypo-osmotiques, la proline, la glycine et l'alanine accumulées dans le cytoplasme sont rejetées dans le milieu extérieur (Glaasker *et al.*, 1998). *Lb. plantarum* ATCC 14917 possède donc des systèmes de transport (efflux et d'afflux) spécifiques de certains solutés compatibles qui sont régulés par l'osmolarité du milieu extérieur (Sleator et Hill, 2002).

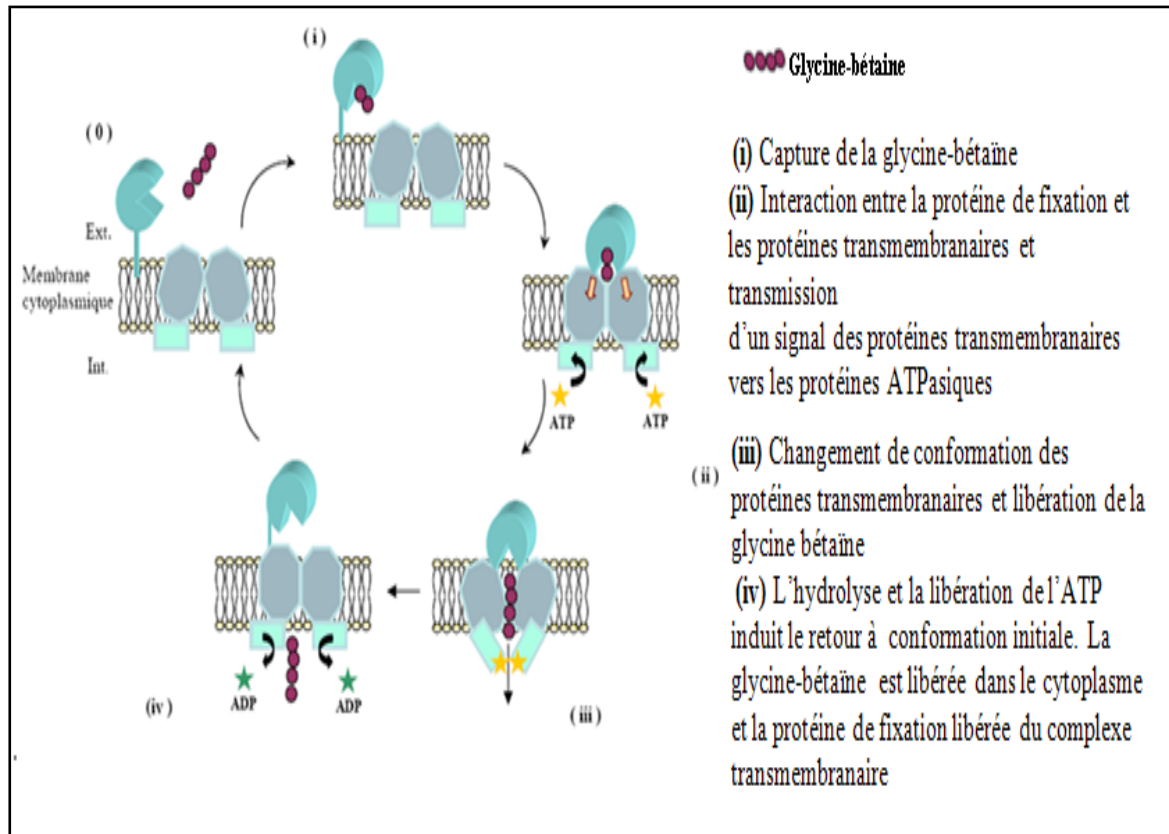


Figure 9: Modèle de transport de la glycine-bétaïne chez les lactobacilles (Hiron, 2007)

L'étude des flux de GB suggère que la bactérie dispose (i) d'un système d'afflux activé par un choc hyper-osmotique et réprimé par un choc hypo-osmotique, (ii) de deux systèmes d'efflux : un transporteur activé par un choc hypo-osmotique et inhibé par un choc hyper-osmotique ainsi qu'un canal mécanosensible activé par un choc hypo-osmotique (Figure 9; Glaasker *et al.*, 1996 a). Seul un système d'afflux nommé QacT (Quaternary ammonium compound Transporter) a été décrit (Glaasker *et al.*, 1998). Il montre une forte affinité pour la GB et la carnitine et une faible affinité pour la proline. L'activité de ce transporteur serait stimulée par un choc hyper-osmotique et réprimée par la présence de GB et de proline dans le milieu de culture (Figures 10 et 11) (Glaasker *et al.*, 1998).

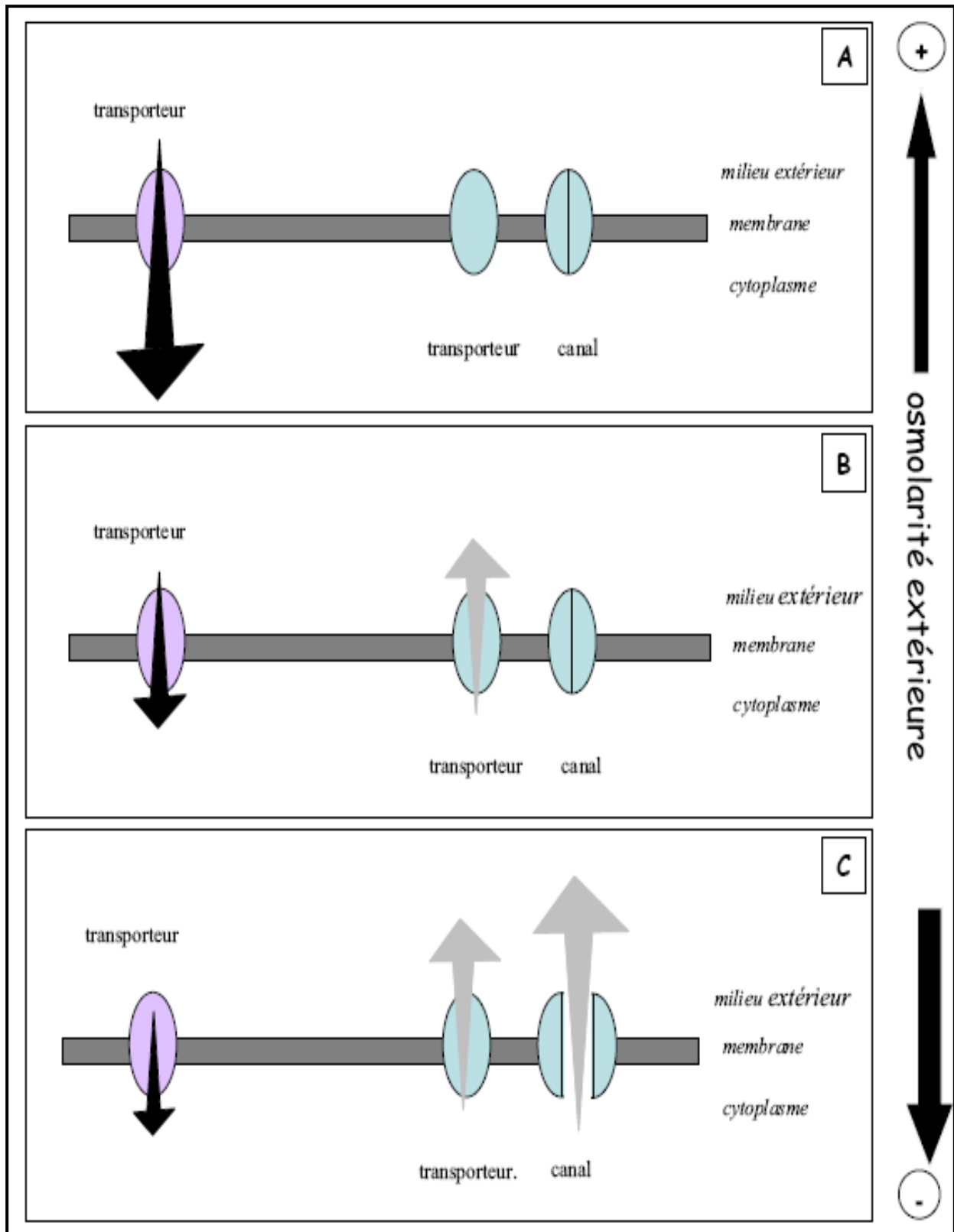


Figure 10 : Représentation schématique des flux de glycine bêtaïne en fonction de l'osmolarité extérieure chez *Lb. plantarum* (Glaasker *et al.*, 1998).

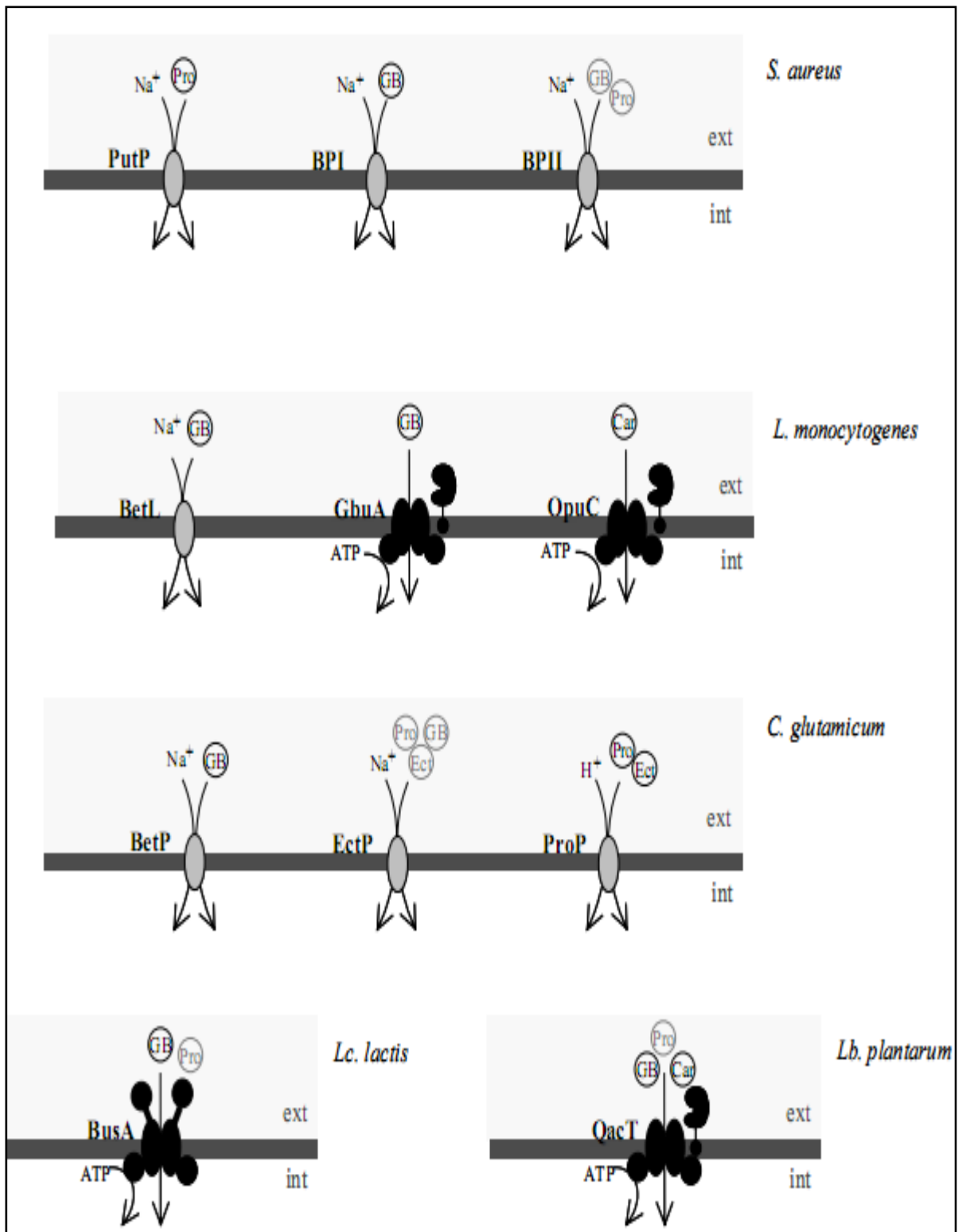


Figure 11 : Représentation schématique des systèmes de transport de solutés compatibles chez quelques bactéries à Gram positif (Baliarda, 2003).

1.6. STRESS ACIDE:

Le stress acide est un stress important pour les bactéries lactiques puisqu'elles acidifient leur milieu au cours de la croissance. La diminution du pH extracellulaire agit sur la flore microbienne des aliments en perturbant (i) l'équilibre ionique du milieu extérieur (certains ions métalliques, qui sont des cofacteurs enzymatiques précieux, formant alors des complexes insolubles non utilisables par la bactérie), (ii) la perméabilité membranaire les perméases cationiques, saturées en ion H⁺, n'assurant alors plus le transport d'autres cations indispensables à la bactérie), (iii) certaines activités enzymatiques essentielles à la croissance microbienne (**Brul et Coote, 1999**).

Les acides peuvent diffuser passivement à travers la membrane. Après leur entrée dans le cytoplasme, ils se dissocient rapidement en protons et en dérivés chargés, auxquels la membrane est imperméable. La chute de pH du milieu de culture entraîne celle du pH interne (pH_{int}). Ainsi, un abaissement du pH du milieu de 6,75 à 5,00 avec de l'acide lactique provoque une chute du pH_{int} de *Lc. lactis* de 7,00 à 5,25 (**Sanders et Huis in't Veld, 1999**). Cette baisse du pH_{int} entraîne des dommages sur les protéines (dont la réduction de l'activité de certaines enzymes) et sur l'ADN (**Van De Gutche et al., 2002**).

1.6.1. Effets de l'acide lactique sur les bactéries :

Les bactéries lactiques produisent au cours de la croissance de l'acide lactique qui inhibe pour partie le développement de la flore indésirable dans les produits fermentés (**Shelef, 1994**). L'acide lactique est un acide faible (pKa=3,86). Il existe sous deux formes: la forme non dissociée CH₃CHOHCOOH (acide lactique) et la forme dissociée CH₃CHOHCOO⁻ (lactate) (**Sunny-Roberts et Knorr, 2008**). L'équilibre entre les deux formes dépend du pH de la solution : plus le pH est bas, plus la forme non dissociée est représentée. Sous sa forme non dissociée, l'acide lactique peut diffuser à travers la membrane. Le pH intracellulaire étant plus élevé que le pH externe (pour les conditions de croissance à pH neutre ou acide), l'acide lactique entrant se dissocie en lactate et libère un proton (**Russell et Diez Gonzalez, 1998**).

Le lactate, molécule chargée, ne diffuse pas à travers la membrane et s'accumule dans la cellule. L'entrée d'acide lactique se faisant par diffusion passive, celle-ci s'arrête lorsque la concentration interne en acide lactique est égale à celle de l'extérieur. Comme l'équilibre

entre les formes dissociée et non dissociée dépend du pH, l'entrée passive d'acide lactique dans la cellule est dépendante du Δ pH et se fait tant que le pH interne est supérieur au pH externe (Mira De Orduna *et al.*, 2001).

L'acide lactique induit donc l'acidification du cytoplasme et l'accumulation de lactate dans la cellule (Van De Guchte *et al.*, 2002). Outre les effets délétères de l'acidification du cytosol, l'accumulation de lactate dans la cellule peut conduire à l'inhibition de la fermentation lactique, à une perte d'activité de l'eau et à la chélation d'éléments nécessaires (Presser *et al.*, 1997).

1.6.2. Mécanismes de résistance au stress acide des BL

Chez les bactéries neutrophiles et notamment chez les bactéries lactiques, l'incubation à un pH sublétal (pH d'adaptation) améliore la résistance à une épreuve acide létale : ce phénomène est appelé « Acid Tolerance Response » (ATR). Cette ATR a été décrite chez différents lactobacilles comme *Lb. sanfranciscensis* (De angelis *et al.*, 2001), *Lb. collinoides* (Laplace *et al.*, 1999), *Lb. acidophilus* (Lorca *et al.*, 1998), *Lb. plantarum* (Mc Donald *et al.*, 1999) et *Lb. bulgaricus* (Lim *et al.*, 2001) ainsi que pour des lactocoques, streptocoques et enterocoques (Van De Guchte *et al.*, 2002).

Les mécanismes de résistance au stress acide décrits peuvent être classés en différentes catégories (Cotter et Hill, 2003): les mécanismes de maintien de la force protomotrice, ceux permettant la production de composés alcalins, les modifications de l'enveloppe cellulaire, les mécanismes de prise en charge des protéines dénaturées et les mécanismes de réparation de l'ADN (Glaasker *et al.*, 1996.a ; Figure 12).

Des études sur des lactobacilles probiotiques (*Lb. rhamnosus* GG et E800, *Lb. paracasei* NFBC 338, *Lb. salivarius* UCC 500 et *Lb. gasseri* ATCC 33323) ont montré que leur survie à un environnement acide était augmentée en présence de sucres métabolisables et notamment de glucose (Corcoran *et al.*, 2005).

Chez *Lb. brevis* (Ueno *et al.*, 1997), *Lactobacillus* E1 (Higuchi *et al.*, 1997) et *Lc. lactis* (Sanders *et al.*, 1998), une glutamate décarboxylase a été mise en évidence, couplée à un antiport Glutamate-/GABA. *Lb. brevis* présente également une tyrosine décarboxylase dont le rôle potentiel dans la résistance à l'acidité n'a pas été étudié (Lucas *et al.*, 2003).

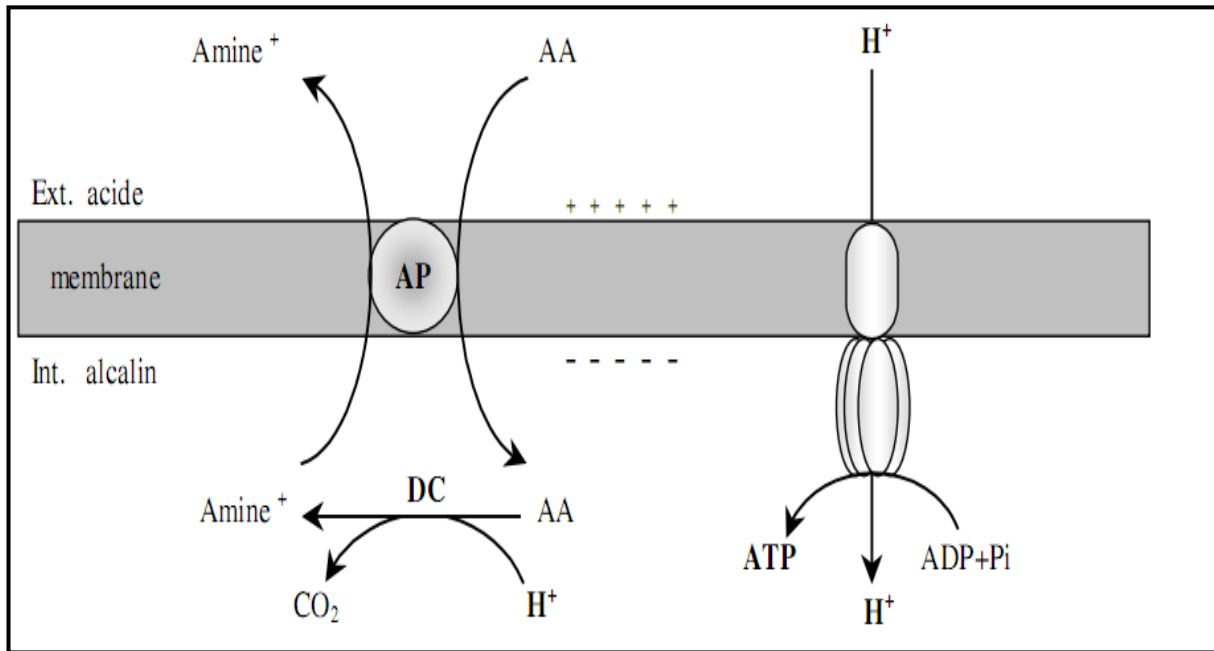


Figure 12 : Modèle de la création de la force protomotrice par la décarboxylation d'acides aminés et de son utilisation pour la synthèse d'ATP (Penaud, 2006)

Un autre moyen de contrôler le pH lors de l'acidification du milieu est de produire des composés alcalins comme l'ammoniac (NH_3). Le NH_3 contribue à alcaliniser le milieu en réagissant avec un proton pour former du NH_4^+ . Chez les BL, deux voies enzymatiques produisant du NH_3 sont connues : la voie de l'arginine déiminase et de l'uréase. Chez *Lb. reuteri*, la présence d'arginine lors de l'adaptation à l'acidité est indispensable à la mise en place de l'ATR (Rollan *et al.*, 2003).

La présence d'arginine augmente la survie et le pH de fin de culture de *Lb. sakei* (Champomier-Verges *et al.*, 2001), de *Lb. sanfranciscensis* (De Angelis *et al.*, 2002), de *Lb. buchneri* (Mira De Orduna *et al.*, 2001) et de *Lb. reuteri* (Rollan *et al.*, 2003). Chez *Lb. reuteri*, la présence d'arginine lors de l'adaptation à l'acidité est indispensable à la mise en place de l'ATR (Champomier-Verges *et al.*, 1999), *Lb. plantarum* (Spano *et al.*, 2004).

Le mécanisme de réparation des dommages causés par l'acidité est important pour la tolérance acide. *Lb. bulgaricus* possède les gènes *recA* et *uvrA*, dont les produits sont impliqués dans la réparation des lésions de l'ADN et les gènes *clpP* et *htrA*, dont les inactivations altèrent la tolérance à l'acidité chez *Sc. mutans* et qui interviennent dans la dégradation des protéines dénaturées (Champomier-Verges *et al.*, 2001).

1.7. STRESS THERMIQUE:

La conservation par élévation/abaissement de la température provoque des perturbations importantes de la croissance qui font suite à des lésions de la membrane et de la paroi ainsi que des altérations des macromolécules cytoplasmiques (protéines, ADN, ARN, ribosomes ; **Van De Guchte *et al.*, 2002**). La réponse face au stress thermique se traduit par la synthèse de protéines de types Hsp (pour Heat Shock Protein) ou de type Csp (pour Cold Shock Protein) réparant les dommages (réduction des superenroulements négatifs de l'ADN, dégradation/repliement des protéines dénaturées) et préparant les bactéries à survivre dans des conditions plus délétères (maintien du niveau de transcription et de traduction, modification de la proportion d'acides gras courts et/ou insaturés dans les lipides, activation des mécanismes de réponse générale au stress (**Abee et Wouters, 1999 ; Phadtare *et al.*, 2000 ; Van De Guchte *et al.*, 2002 ; De Angelis *et al.*, 2002 ; Phadtare, 2004**)).

1.7.1. Stress hyperthermique :

Un choc thermique chaud provoque une dénaturation des protéines et leur agrégation, une déstabilisation des ribosomes et de l'ARN ainsi qu'une modification de la fluidité membranaire (**Annous *et al.*, 1999**). Les BL présentent une réponse au stress hyper-thermique similaire à celles des autres bactéries à Gram positif : *Lc. lactis* (**Whitaker et Batt, 1991 ; Auffray *et al.*, 1992 ; Kilstrup *et al.*, 1997**), *Leu. Mesenteroides* (**Salotra *et al.*, 1995**), *Ent. Faecalis* (**Flahaut *et al.*, 1996**), *O. oeni* (**Guzzo *et al.*, 1997**), *Lb. bulgaricus* (**Gouesbet *et al.*, 2002**)).

Ainsi les protéines induites par un choc thermique chaud correspondent principalement à des protéines chaperonnes (DnaK, DnaJ, GrpE, Gro ES et GroEL) et à différentes protéases (Clp, HtrA, FstH), très conservées dans le monde bactérien (**Csonka et Hanson, 1991**). Les gènes correspondants sont inductibles par un choc hyperthermique et sont répartis en quatre classes chez *B. subtilis*, les gènes de classe I (*dnaK, dnaJ, grpE, groel, groES...*) possèdent un promoteur végétatif associé à des éléments répétés de neuf paires de bases nommés CIRCE (Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression) qui est reconnu par le répresseur HrcA. Les protéines chaperonnes GroEL et DnaK appartiennent au régulon CIRCE. Ce régulon serait plus généralement induit par la présence de protéines dégradées (**Mogk *et al.*, 1997**). Les gènes de classe II sont sous le contrôle du facteur

alternatif σ^B . Les gènes de classe III (*clp C*, *clpP*, *clpE*, *groEL*, *groES*) possèdent dans leur région promotrice une séquence opératrice de sept paires de bases, reconnue par le répresseur transcriptionnel CtsR (Classe three stress Regulator ; **Derre et al., 1999 a**). Enfin, les gènes de classe IV (*trxA*, *ftsH*, *htpG*...) sont exprimés indépendamment de σ^B et ne possèdent pas de séquences opératrices de types CIRCE ou CtsR (**Derre et al., 1999 b ; Abee et Wouters, 1999**).

Des régulateurs de type Hrc-CIRCE ont été identifiés en amont de diverses gènes chez *Lc.lactis* (**Van Asseldonk et al., 1993**), *St. thermophilus* (**Martirani et al., 2001**) et chez *St. mutans* (**Lemos et al., 2002**). Chez *Lc. lactis*, plusieurs éléments suggèrent un rôle de HrcA dans la réponse au choc thermique (i) la présence d'élément CIRCE en amont des opérons *hrcA-gprE-dnaK* et *groES-groEL* et des gènes *dnaJ* (ii) l'induction transcriptionnelle de ces gènes en situation de choc thermique (iii) la démonstration du rôle de l'élément CIRCE dans l'induction thermique de *dnaJ* (**Guédon et al., 2001**).

Des séquences opératrices de type CtsR ont été également identifiées en amont de gènes codant des protéases de type Clp chez différentes BL : *Lb. sakei*, *Lb. helveticus*, *O. oeni*, *St. Salivarius*, *St. thermophilus* et chez *St. pneumoniae* (**Smeds et al., 1998 ; Derre et al., 1999. a ; Chastanet et al., 2004 ; Guédon et al., 2001**). A l'opposé du régulon HrcA, qui jouerait un rôle uniquement lors d'un stress thermique, CtsR régulerait des gènes impliqués dans d'autres fonctions (synthèse de protéines ribosomales, synthèse de constituants essentiels de l'enveloppe,...) (**Chastanet et al., 2004**).

1.7.2. Stress hypothermique :

La croissance à basse température provoque des modifications physiologiques importantes comme la baisse de la fluidité membranaire (et donc une perturbation de l'activité des protéines membranaires) et la stabilisation des structures secondaires des ARNs et de l'ADN dont résulte une chute de l'efficacité de la traduction, de transcription et de réplication de l'ADN (**Jaenicke, 1991 ; Berry et Foegeding, 1997**). Les microorganismes sont capables de développer une réponse adaptative transitoire pendant laquelle un certain nombre de protéine de stress sont synthétisés. Ces protéines de choc froid auront des rôles différents au sein de la cellule en assurant par exemple le maintien de la fluidité membranaire par augmentation de la proportion de lipide à chaîne carbonée et/ou d'acides gras

insaturés (Sinensky, 1974 ; Annous *et al.*, 1997 et 1999). Chez les BL, des approches de protéomique ont conduit à l'identification de 22 protéines chez *Lc. lactis* (Panoff *et al.*, 1994 ; Wouters *et al.*, 1998), 24 chez *St. thermophilus* (Wouters *et al.*, 1999) et 17 chez *Ent. faecalis* (Panoff *et al.*, 1998).

Les protéines induites peuvent se révéler différentes (en nombre et/ou en structure et/ou suivant leur fonction) selon que la contrainte est de type choc ou de type croissance prolongée à basse température (acclimatation). Ainsi, chez *L. monocytogenes* différentes protéines sont induites en réponse à une diminution de la température de 37°C à 5°C (Phan-Thanh et Gormon, 1995 ; Bayles et Wilkinson, 2000), tandis que seules quatre protéines sont synthétisées en réponse à une croissance prolongée à 5°C (Bayles et Wilkinson, 2000). C'est également le cas chez *E. coli* (Riehle *et al.*, 2003).

Parmi les protéines induites par un choc froid, certaines sont appelées les Csp (Cold Shock Protein) qui auraient un rôle de régulation et d'induction d'autres protéines de froid. Cinq Csp sont identifiées chez *Lc. lactis* MG1363 et seulement deux chez *Lc. lactis* IL1403 (Guédon *et al.*, 2001).

Ces Csp sont capables structurellement de s'associer soit à l'ADN simple brin soit à l'ARN et de maintenir des niveaux de transcription et de traduction compatibles avec la croissance de la bactéries à basse température (Phadtare *et al.*, 2000, Van De Guchte *et al.*, 2002). Elles joueraient notamment le rôle de chaperonne à ARN en prévenant la formation de structures secondaires au niveau des ARNs messagers, facilitant la transcription puis la traduction à basse température (Graumann et Marahiel, 1998 ; Jiang *et al.*, 1997).

Les protéines Csp maintiennent également le niveau de surenroulement de l'ADN, par réduction des surenroulements négatifs, (Redon, 2005) propose que la modification du surenroulement de l'ADN causée par un abaissement de la température pourrait participer à la transduction du signal de stress thermique froid *via* des protéines de liaisons à l'ADN comme les topoisomérases et les gyrases (Smith, 2001).

Différentes protéines induites par un choc froid chez *Lc. lactis* interviennent également dans le métabolisme des sucres, la transduction du signal et de l'adaptation au stress (Baliarda, 2003).

1.8. STRESS OXYDATIF:

Un des principaux agents responsables de la dégradation des produits alimentaires au cours du temps est l'oxygène. En effet, celui-ci est à l'origine des phénomènes d'oxydation du produit et du développement de microorganismes aérobies. Les conséquences sont multiples : formation de composés indésirables, altération du produit, perte de ses qualités organoleptiques, baisse de sa valeur nutritionnelle (**O'Byrne et Booth, 2002**).

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

Les mécanismes de défense des bactéries vis-à-vis du stress oxydatif consistent à (i) prévenir la formation des molécules d'oxygène actives en consommant l'oxygène libre (grâce à l'augmentation de l'activité désaturase consommatrice d'oxygène chez *Lb. helveticus* (**Guerzoni et al., 2007**) ou de l'activité NADH-oxydase chez *Lb. delbruekii* ssp. *bulgaricus* (**Zeller et Klug, 2006**) (ii) éliminer les molécules d'oxygène actives par dégradation enzymatique (grâce aux activités catalase/pseudocatalase chez *Lb. bulgaricus* (**Simova et Beshkova, 1994**), *Lb. sakei* (**Knauf et al., 1992**) et *Lb. plantarum* (**Kono et Fridovich, 1983**) ou superoxyde dismutase chez *Lc. lactis* (**Sanders et al., 1995**), (iii) protéger les protéines des méfaits du stress oxydatif (protection des groupements thiol grâce au pool de zinc intracellulaire chez *Lc. lactis* (**Obis et al., 1999 ; Scott et al., 2000**), (iv) réparer les dommages causés par le stress oxydatif (grâce au système RecA chez *Lc. Lactis* (**Duwat et al., 2001**) et des mécanismes généraux de la réponse au stress (**O'Connell-Motherway et al., 2000**).

La résistance au stress oxydant peut impliquer des mécanismes de détoxification, la synthèse ou le transport de molécules protectrices comme les polyamines, la réduction ou la protection des protéines oxydées (**Van De Guchte et al., 2001**).

L'existence de deux régulateurs des gènes impliqués dans la tolérance au stress oxydatif est supposée chez les BL et chez *Lc. lactis* en particulier: Fur (Ferric uptake Regulator) et RmaJ (homologue à Ohr de *B. subtilis*) (**Penaud, 2006**).

Clicours.COM

La résistance au stress oxydant peut impliquer des mécanismes de détoxication, la synthèse ou le transport de molécules protectrices comme les polyamines, la réduction ou la protection des protéines oxydées. (Van De Guchte *et al.*, 2001). Le **Tableau 5** résume les gènes impliqués dans la résistance au stress oxydant chez *Lb.bulgaricus*.

Tableau 5 : Gènes impliqués dans la résistance au stress oxydant présents dans le génome de *Lb.bulgaricus* ATCC11842 (Penaud, 2006)

Gène	Fonction	N° du gène
Détoxication		
<i>pox</i>	Pyruvate oxydase	Ldb2213
Synthèse des molécules protectrices		
<i>odc</i>	Ornithine décarboxylase	Ldb1775/ldb0547
<i>Suf B/D</i>	Conserved protein involved in Fe/S cluster assembly	Ldb1817/1820
<i>iscU</i>	NitU homolog involved in Fe/S cluster formation	Ldb1818
<i>sufS</i>	Cysteine desulfutase/selenocysteine lyase	Ldb1819
<i>sufC</i>	ATP-binding protein involved in Fe/S cluster assembly	Ldb1821
Transport de molécules protectrices		
<i>pot</i>	Spermidine/putresceine ABC transporter	Ldb0647-50/ldb2178-81
	ABC-type Mn/Zn transporter systems	Ldb2037
<i>flp</i>	Transcriptional regulator	Ldb0482
Protection des protéines		
<i>rrxB</i>	Thioredoxin reductase	Ldb0613/ldb1586
<i>rrxA</i>	Thioredoxin	Ldb1524/ldb1602
<i>Spx</i>	Global regulator	Ldb0578
<i>hslO</i>	Redox regulated chaperon	Ldb0369
<i>msrA</i>	Peptide methionine sulfoxide reductase	Ldb0673
<i>msrB</i>	Protein methionine-S-oxide reductase	Ldb1971

1.9. REPONSE CROISEE ET ETAT DE MULTIRESISTANCE:

Les bactéries préviennent les dommages plutôt que les réparer (**Hengge-Aronis et Lowen, 2002**). Aussi, une bactérie dispose de différents systèmes protégeant la cellule des contraintes extérieures dont les activités seront modulées par les variations des paramètres environnementaux (**Chastanet et al., 2004**). La plupart du temps, il s'agira pour la bactérie de détecter le signal stress puis d'activer ou de réprimer la transcription de différents gènes permettant une réponse rapide et efficace. Cette réponse est spécifique de la nature du stress appliqué et/ou générale (réponse globale indépendante de la nature du stress appliqué) (**Molennar et al., 1993**).

Les régulateurs potentiels de la réponse au stress chez les bactéries sont nombreux : il en existe par exemple 138 chez *Lc. lactis* (**Guédon et al., 2001**). Deux types de régulateurs jouent un rôle important chez les bactéries. Il s'agit des facteurs de transcription et des systèmes à deux composants. La multiplication des approches (physiologie, créations de mutants, analyse protéomique, transcriptome...) montre que certains acteurs de la réponse au stress peuvent être spécifiques d'un stress donné, tandis que d'autres sont recrutés lors de contraintes diverses (protéines dites générales de stress) (**Winter et al., 2005**).

1.9.1. Les régulateurs globaux de la réponse au stress :

Les bactéries répondent aux variations de leur environnement en activant ou en réprimant certains gènes. La détection du signal stress et la régulation des gènes protecteurs supposent l'existence de systèmes plus ou moins généraux de régulation. Deux grandes familles de régulateurs existent: les systèmes dits à deux composants et les facteurs de transcription (facteurs sigma ; **Glaasker et al., 1998**).

Les systèmes à deux composants comprennent une protéine Histidine Kinase senseur (HK) et une protéine régulatrice de réponse (RR). Les protéines senseurs intégrées dans la membrane s'autophosphorylent au niveau de résidus histidine lorsqu'elles perçoivent un signal de type stress (**Neidhart et al., 2004**). Elles sont alors capables d'activer les protéines régulatrices par phosphorylation. Ceci s'effectue au niveau d'un résidu aspartate de la protéine RR. Sous leur état phosphorylé, ces protéines RR activent une réponse cellulaire appropriée, souvent par induction transcriptionnelle ; les RR sont pour la plupart des protéines

de liaison à l'ADN (**Guédon et al., 2001**). La régulation de la réponse générale au stress est également contrôlée par des **facteurs de transcription (facteurs sigma)** qui, en se fixant à l'ARN polymérase, lui confèrent une spécificité de reconnaissance vis-à-vis de certains promoteurs (**Neidhart et al., 2004**).

1.9.2. La réponse générale au stress :

Les facteurs σ sont utilisés par de nombreuses bactéries pour moduler l'expression de leurs gènes en fonction de leur environnement (**Novel, 1993**). Parmi les facteurs σ contrôlant des régulons de réponse aux stress identifiés chez les bactéries à Gram (+), le plus étudié est probablement σ^B , qui contrôle la réponse générale au stress de *B. subtilis*. σ^B est induit en condition de stress osmotique et oxydant, en présence d'éthanol et en phase stationnaire (**Boylan et al., 1993**).

D'autres études ont montré que σ^B répond à d'autres stimuli environnementaux comme le stress hypothermique (**Brigulla et al., 2003**) et hyperthermique (**Benson et Haldenwang, 1993**), le stress acide (**Kovacs et al., 1998**) et des conditions de carence en glucose, oxygène (**Volker et al., 1994**) ou phosphate (**Volker et al., 1999**). L'activation du régulon σ^B permet à la bactérie d'améliorer sa résistance à différents stress (**Volker et al., 1999**).

Parmi les gènes régulés par σ^B se trouvent des gènes pour lesquels la relation avec la résistance aux stress est évidente comme par exemple ceux codant pour la catalase (*katX* ; **Wood et al., 2001**), la thioredoxine (*trxA*) et une protéine de liaison au fer (*dps*), impliquées dans la résistance au stress oxydant, des transporteurs de proline (*opuE*) et de GB (*opuD*) impliqués dans la résistance au stress osmotique ou *clpC* (**Higuchi et al., 1997**), codant une sous-unité des protéases Clp impliquées dans la résistance au stress hyperthermique (**Hoper et al., 2005**).

L'absence probable de tels facteurs σ de stress chez *Lc. lactis* soulève la question de l'existence d'une réponse générale au stress dans ce micro-organisme (**Ueno, 1997**).

1.9.3. Etat de multi-résistance et protéines générales de stress :

Chez *Lc. lactis*, l'imposition d'un stress modéré permet une survie accrue lors de la survenue de ce stress à des niveaux normalement létaux. Cette réponse a été particulièrement caractérisée dans le cas des stress acide et thermique (**Whitaker et Batt, 1991; Hartke et al., 1996; Rallu et al., 1996; Kim et al., 1999**). Cependant, en plus de cette réponse adaptative, des phénomènes de protections croisées sont observés dans ce micro-organisme. Ainsi, l'imposition d'une condition de stress permet une résistance à ce stress particulier mais également à d'autres stress (**Csonka et al., 1989**). Une résistance aux stress thermique, osmotique, oxydatif et éthanol a ainsi été observée suite à une adaptation à pH 5 de *Lc. lactis* NCDO712 (**O'Sullivan et Condon, 1999**). De même, une exposition aux UV confère la résistance aux stress acide, hyperthermique et oxydatif chez *Lc. lactis* IL1403 (**Hartke et al., 1995**). Il semble toutefois que les résistances acquises dépendent du type de stress imposé lors de l'adaptation mais également des souches utilisées (**Van de Guchte et al., 2002 ; Coucheney et al., 2005**).

Par ailleurs, les carences nutritionnelles confèrent également de nombreuses résistances aux stress physico-chimiques. **Hartke et al. (1997)** ont mis en évidence que *Lc. lactis* IL1403 carencé en glucose est plus résistant aux stress thermique (52 °C), éthanol (20 %), acide (pH 4) et osmotique (3,5 M NaCl). Des observations similaires ont été faites chez *Ent. faecalis* (**Giard et al., 2002**) et *E. coli* (**Matin, 1991**). Cet état de multi-résistance généré par les carences nutritionnelles semble généralisable à l'ensemble des réponses observées en phase stationnaire, indépendamment de la cause d'arrêt de croissance et de l'espèce bactérienne.

Les mécanismes de résistance au stress seraient mis en place dès l'entrée de la phase stationnaire dans l'éventualité d'un stress ultérieur. En effet, l'installation des réponses étant demandeuse d'énergie, leur induction lors d'une carence avancée deviendrait moins efficace du fait de l'altération des ressources énergétiques (**Nystrom, 2004**).

Ces phénomènes de protections croisées et de multi-résistances suggèrent l'existence éventuelle d'une réponse générale mise en place dans différentes conditions de stress chez *Lc. lactis*, avec un mécanisme restant à définir. Les réponses à différents stress, référencées dans le **Tableau 6**, ont été caractérisées d'un point de vue protéique chez *Lc. lactis* mais la majorité

des protéines induites ne sont pas encore identifiées. L'observation des profils protéiques obtenus lors de différents stress met en évidence l'induction de protéines communes.

Tableau 6 : Caractérisation de l'induction de protéines en réponse au stress chez *Lc. lactis*.

Stress	Condition	Protéines induites	Protéines identifiées	Référence
Acide	pH 3,9 et 5,5	33	<i>DnaK, GroEL, GroES</i>	Hartke et al., 1996 Hartke et al., 1997
	pH 4,5 et 5,5	23	<i>DnaK, GroEL, GroES, GrpE, ClpE, ClpP, SodA, AhpC, LuxS</i>	Frees et al., 2005
Hypothermique	8 °C	12	-	Panoff et al., 1994
	10 °C	17 - 22	<i>Hpr, CcpA, CspA, B, C, D, E, F, CspG, L9, OsmC, HslA, PGM, LlrC</i>	Wouters et al., 1999 Wouters et al., 2000a Wouters et al., 2000b Wouters et al., 2001
Hyperthermique	42 °C	13	<i>DnaK, GroEL</i>	Whitaker et Batt, 1991
	40 °C	16	<i>DnaK, GroEL, GroES</i>	Auffray et al., 1992
	43 °C	17	<i>DnaK, GroEL, GroES, HrcA</i>	Kilstrup et al., 1997
Osmotique	2,5 % NaCl	12	<i>DnaK, GroEL, GroES</i>	Kilstrup et al., 1997
Carence	0 % glucose	21	-	Kunji et al., 1996
	0 % glucose	14	-	Hartke et al., 1994

Ainsi, chez *Lc. lactis* IL1403, 33 protéines sont induites en stress acide dont 9 le sont également en stress thermique, 4 en stress UV et 2 en stress oxydatif (Hartke et al., 1995). De même, les protéines induites chez *Lc. lactis* MG1363 en stress osmotique (2,5 % NaCl) sont toutes des protéines de choc thermique (Kilstrup et al., 1997). Toutefois, les protéines induites dans la totalité des conditions de stress (carences, stress acide, thermique, osmotique, oxydatif), nommées protéines générales de stress (GSP), semblent peu nombreuses chez *Lc. lactis* et les bactéries lactiques en général. En effet, hormis les chaperonnes DnaK, GroEL et GroES, une seule GSP a été mise en évidence chez *Lc. lactis*, GlS24 (anciennement YtgH, Giard et al., 2002) et elles sont au nombre de 6 seulement chez *Streptococcus mutans* (Svensater et al., 2000).

Ceci contraste fortement avec ce qui est observé chez les micro-organismes modèles *B. subtilis* et *E. coli*, qui présentent une réponse générale au stress (GSR) beaucoup plus étendue, et laisse donc en suspens notre interrogation sur l'existence d'une réponse générale au stress chez *Lc. lactis*.

1.9.4. Les BL et la régulation des réponses aux stress :

Chez les BL, peu de régulons de stress sont caractérisés. La plupart des études menées sont des études globales permettant d'identifier des gènes induits ou des protéines surproduites en condition de stress. Cependant, ces études ne se sont généralement pas focalisées sur la régulation des mécanismes de résistance mis en jeu. Les génomes des BL dont la séquence a été publiée montrent que ces bactéries possèdent en général peu ou pas de facteur σ alternatif et notamment pas d'homologue de σ^B (Wood, 1999).

Parmi les systèmes de régulation, les systèmes à deux composants semblent de bons candidats pour la régulation coordonnée de la réponse aux changements environnementaux. Certaines études ont été réalisées par l'inactivation spécifique de ces systèmes chez *Lc. lactis* (O'Connell-Motherway *et al.*, 2000) et chez *Lb. sakei* (Morel-Deville *et al.*, 1998). Chez *Lc. lactis*, l'inactivation d'un des systèmes à deux composants induit la perte de l'activité de la voie arginine déiminase et une augmentation de la sensibilité au stress acide. Chez *Lb. sakei*, certains mutants sont plus sensibles à certains stress comme le stress hyperthermique, acide ou oxydant (Hutson et Dowing, 1968).

Cependant, dans les deux cas, les régulons des systèmes à deux composants étudiés ne sont pas déterminés. Récemment, une étude portant sur un système à deux composants de *Lb. acidophilus* a été réalisée en transcriptomique (Azcarate-Peril *et al.*, 2005). Le mutant est plus sensible au stress acide et la comparaison entre la souche sauvage et le mutant montre que la plupart des gènes différentiellement exprimés appartiennent aux systèmes de protéolyse et de transport d'acides aminés ou de peptides. Cependant, encore une fois, le mécanisme d'activation de ce système à deux composants est inconnu et rien ne permet de conclure à une action directe sur les promoteurs de ces gènes ou à une action indirecte (Pascard *et al.*, 2003).

1.10. CARACTERES TECHNOLOGIQUES :

La protéolyse est parfois à l'origine de peptides de petite taille ayant une hydrophobicité élevée (partie C-terminale constituée de leucine, phénylalanine ou de tyrosine) et leur accumulation est responsable d'un défaut d'amertume (**Broadbent et al., 2002; Rodriguez et al., 2003**).

La spécificité des protéinases de paroi pour les caséines joue donc un rôle sur le développement de l'amertume (**Broadbent et al., 2002**). A côté de l'importance de la protéolyse chez les bactéries lactiques vis-à-vis des propriétés organoleptiques des produits laitiers finaux, certaines souches sont capables de produire des peptides possédant des activités biologiques (ou peptides bioactifs), qui peuvent promouvoir la santé au delà de la nutrition traditionnelle (**Meisel, 2004; Korhonen et Pihlanto, 2003**).

Les caséines sont particulièrement la source principale des peptides bioactifs. *Lb helveticus* CP790, *Lb rhamnosus* GG, *Lb bulgaricus* SS1, *Lc lactis* subsp *cremoris* FT4 sont connus pour leur capacité à produire de tels peptides par protéolyse (**Gobbetti et al., 2002**). La fabrication de peptides à activités biologiques à l'échelle industrielle sous formes de suppléments ou de préparations pharmaceutiques, reçoit actuellement beaucoup d'intérêt (**Meisel, 2004; Korhonen et Pihlanto, 2003**).

Le choix des souches est particulièrement important pour éviter le défaut de l'amertume généré au cours de la protéolyse par les protéinases. Des souches de bactéries lactiques déficientes en protéinases, dites «non amères» possèdent des activités peptidasiques capables de dégrader les peptides amers en peptides non amers et acides aminés libres (**Hussain et al., 2009**).

Une partie de ces acides aminés, notamment ceux pour lesquels les bactéries lactiques sont auxotrophes, servira à la synthèse de nouvelles protéines, et une autre partie participera à la formation des arômes (**Marilley et Casey, 2004; Yvon et Rijnen, 2001**).

2. MATERIEL
ET
METHODES

2. 1. Matériel biologique :

Dans notre étude, nous avons utilisé trois souches de lactobacilles, ces souches proviennent de la collection du Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie (LBMB) de l'université d'Oran (**Tableau 7**). Le choix de ces souches repose sur une étude ultérieure de leur capacité à résister au sel et leur comportement en présence de la proline et la glycine-bétaine en condition de stress osmotique. (**Baghdad Belhadj-Semar, 2009**).

Tableau 7 : Origine des souches utilisées.

Nom	Code	Origine
<i>Lactobacillus brevis</i>	CHTD27	Lait de chamelle (<i>Camelus dromedarius</i>) de Tindouf
<i>Lactobacillus plantarum</i>	BH14	Lait de chamelle (<i>Camelus dromedarius</i>) d'Illizi
<i>Lactobacillus ssp</i>	CHM18	Lait de chamelle (<i>Camelus dromedarius</i>) de Mauritanie

2. 2. Conditions de culture :

En conditions normales (non stressantes), les souches sont cultivées à 30°C dans le milieu MRS liquide ou solide.

2. 3. Milieux de culture :

2. 3. 1. Milieu MRS :

Le milieu utilisé pour les lactobacilles est le milieu MRS décrit par **Man, Rogosa et Sharpe (1960)**, sa composition figure dans l'annexe. Le milieu solide est obtenu par addition de 15g/l d'agar-agar aux milieux liquides. L'autoclavage se fait à 120°C pendant 20min.

2. 3.2. Lait écrémé : (Régilait UCA, St-Martin, Belle-Roche, France)

Reconstituée dans de l'eau distillée à 10 % (m/v). Le lait ainsi préparé est autoclavé à 110°C pendant 10 min. Il est utilisé pour la conservation des souches

La composition des milieux de culture figure dans l'annexe.

2. 4. Vérification de la pureté des souches :

Les souches étaient conservées à -20°C sur milieu MRS-glycérol (20%), elles doivent être cultivées par un ensemencement par stries sur MRS solide. Après incubation à 30°C pendant 48 heures, on prélève des colonies sur lesquelles isolées sont effectuées les examens suivants :

- **Examen macroscopique :**

Les caractéristiques macroscopiques sont obtenues à partir des cultures bactériennes sur milieu gélosé, les caractères examinés sont l'aspect, le contour, la couleur et le diamètre de la colonie.

- **Examen microscopique :**

De chaque boîte, on prélève une colonie bien isolée sur laquelle on effectue une coloration de Gram. Une observation microscopique permet de noter le Gram, la taille, la forme et le mode d'association de chaque souche.

- **Test de catalase :**

La catalase est mise en évidence par émulsion d'une colonie dans une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes. La présence de la catalase est détectée par le dégagement de bulles d'air.

2. 5. Conservation des souches :

La conservation de courte durée est effectuée sur géloses inclinées à 4°C après croissance des bactéries.

Pour une conservation plus longue, les cultures sont ensemencées soit dans du lait écrémé à 10%, incubés à 30°C jusqu'à la coagulation du lait puis conservées à -20°C, soit sur milieu MRS-glycérol stérile à 20%.

2. 6. Estimation des conditions inhibitrices (NaCl, T°, pH) de croissance :

2. 6. 1. Estimation de la concentration minimale inhibitrice de NaCl :

Des cellules issues d'une préculture jeune (18 heures) sont utilisées pour inoculer des bouillons MRS salés (concentration en NaCl 0,6M ; 1,1M ; 1,6M et 1,8M) de façon à obtenir une DO_{600nm} initiale de 0,1 (Baliarda, 2003). La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la plus faible concentration en NaCl empêchant la croissance bactérienne.

2. 6. 2. Estimation de la température inhibitrice de croissance :

Des cellules issues d'une préculture jeune (18 heures) sont utilisées pour inoculer des bouillons MRS de façon à obtenir une DO_{600nm} initiale de 0,1. Les tubes sont incubés à différentes températures : -20°C, 4°C, 18°C, 30°C, 37°C, 45°C et 60°C. La température inhibitrice (TI) de croissance correspond à la plus faible ou la plus haute température empêchant la croissance bactérienne.

2. 6. 3. Estimation du pH minimal inhibiteur de croissance :

Des cellules issues d'une préculture jeune (18 heures) sont utilisées pour inoculer des bouillons MRS acidifié avec HCl : pH 1 ; 1,5 ; 2,5 ; 3,5 ; 4,5 et 6,5 de façon à obtenir une DO_{600nm} initiale de 0,1. Le pH minimum inhibiteur correspond au plus faible pH empêchant la croissance bactérienne.

2. 7. Protocoles d'application des stress :

Les conditions de stress sont considérées comme modérées lorsqu'elles produisent une faible létalité sur la population testée (entre 5% et 60% de mortalité) ou un simple ralentissement de la croissance (sub-optimal). Pour les stress létaux, les conditions entraînent une létalité accrue (environ 99,9% de mortalité).

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

Deux approches expérimentales ont été suivies. La première consiste à étudier les capacités d'adaptation vis-à-vis d'un choc léthal. La seconde approche vise à étudier les capacités de croissance des cellules après une préadaptation en conditions sub-optimales de croissance.

2. 7. 1. Préparation des cellules en phase exponentielle :

Un volume de 50 ml de bouillon MRS est inoculé de façon à obtenir une DO_{600nm} initiale de 0,1. Lorsque l'absorbance atteint 0,6, 40 ml de cette culture sont centrifugés (5000 g pendant 10 min) et le culot est rincé par 10 ml d'eau physiologique.

Après une nouvelle centrifugation, les cellules sont resuspendues dans 4 ml d'eau physiologique. Les cellules ainsi concentrées (10 fois) seront ensuite diluées dans différents milieux MRS (Généralant une DO initiale = 0,6) où elles subiront un « panel » de contraintes différentes en nature et en intensité (**Baliarda, 2003**).

2. 7. 2. Application d'un stress modéré :

L'effet de l'application d'un stress modéré sur la capacité d'adaptation des cellules bactériennes à un stress intense de même nature, a été évalué. L'intensité et la durée des stress ont été déterminées en étudiant l'impact de différentes contraintes (thermique, saline et acide) sur la mortalité cellulaire.

2. 7. 2. 1. Détermination de la létalité de différentes contraintes :

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

- **Contrainte thermique** : un volume de 1 ml de cellules concentrées est ajouté à 9 ml de bouillon MRS, et l'ensemble est incubé à -20°C, 4°C, 18°C, 37°C, 45°C, ou 60°C.
- **Contraintes saline** : l'ensemencement se fait de façon identique dans 9 mL de bouillon MRS contenant 0,6M ou 1,1M de NaCl pour les souches BH14 et CHM18 et 0,6M ; 1,1M ou 1,6M de NaCl pour la souche CHTD27.
- **Contrainte acide** : on procède de la même manière, l'acidification des milieux se fait à l'aide de HCl. Les pH sont : 1,5 ; 2,5 ; 3,5 ; 4,5 ou 5,5.
- **Le témoin** : obtenu par ensemencement de 9ml de milieu MRS par 1ml de cellules concentrées. Le pH est de 6,2 et l'incubation se fait à 30°C.

Les trois contraintes sont appliquées pendant des temps variables (24h- 48h- 72h- 96h- 120h et 144h). La concentration cellulaire (en Unités Formant Colonies/ml ou UFC/ml) est estimée au temps T_0 d'application du stress et à son issue. La létalité du traitement est traduite par la formule :

$$[(\text{UFC/ml à } T_0) - (\text{UFC/ml à un temps déterminé})] / (\text{UFC/ml à } T_0)$$

et est exprimée en pourcentage (**Baliarda, 2003**).

2. 7. 2. 2. Procédure d'adaptation- challenge :

Trois échantillons sont préparés. Le premier subit un stress modéré visant à induire une adaptation pendant une durée t_1 . Il est ensuite placé en conditions de stress intense pendant un temps t_2 .

Le second échantillon ne subit pas d'adaptation ; il est uniquement placé en conditions de stress intense pendant un temps t_2 .

Le troisième échantillon (témoin) ne subit ni adaptation ni challenge ; il s'agit d'un témoin de croissance en conditions non stressantes.

Les pourcentages de cellules survivantes au challenge sont calculés pour l'essai adapté et pour l'essai non adapté [UFC fin de challenge (t_2)/UFC début de challenge x 100]. Le facteur de tolérance induit par l'adaptation est déduit en calculant le rapport du

Pourcentage de survie des cellules adaptées après un stress / pourcentage de survie après stress chez les cellules non adaptées (Baliarda, 2003).

2. 8. Croissance des souches en conditions de stress et en présence d'osmoprotecteurs :

Pour cette étude, nous avons choisi la proline et la glycine-bétaine car ce sont les osmoprotecteurs les plus efficaces pour le groupe des bactéries lactiques. Pour cela, il faut d'abord déterminer la concentration optimale de chaque osmoprotecteur pour chaque stress et pour chaque souche.

2. 8. 1. Détermination de la concentration optimale de la proline et de la glycine-bétaine :

Des tubes contenant 5ml de milieu MRS liquide et des concentrations différentes de proline et de glycine-bétaine (10mM, 30mM, 60mM et 90mM) sontensemencés par des cellules concentrés de façon à obtenir une DO _{initiale} de 0,6, ces tubes sont placés en conditions de stress (les cellules ne sont pas préadaptées). Après une incubation de 48 heures, la croissance se traduit par l'apparition d'un trouble, la densité optique à 600 nm est notée.

2. 8. 2. Croissance en conditions de stress et en présence de la concentration optimale d'osmoprotecteurs :

La croissance des cellules est suivie en présence de concentration optimale de proline et de glycine-bétaine, les cellules sont placées en conditions de stress décrites précédemment et la DO_{600nm} est mesurée à des temps différents (0h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h).

2. 9. Analyse des protéines totales par SDS-PAGE :

2. 9. 1. Cultures des bactéries :

Des cultures bactériennes sont réalisées dans des tubes contenant 20ml de milieu à des concentrations différentes de NaCl et à des pH différents. Ces cultures sont incubées à 30°C pendant 72heures.

2. 9. 2. Récolte et lyse des bactéries :

La récolte des cellules se fait par une centrifugation à 5.000rpm pendant 15min, le culot obtenu est standardisé (les culots cellulaires doivent avoir le même poids) et lavé trois fois dans de l'eau physiologique stérile puis resuspendu dans 200µl d'eau distillé stérile.

La lyse des cellules est réalisée après 50 cycles de congélation-décongélation, chaque cycle correspond à une congélation de 1 heure à -20°C suivi par une décongélation de 30min à 30°C. Un surnageant est obtenu après une centrifugation de 5.000rpm pendant 15min.

2. 9. 3. Dosage des protéines :

La méthode utilisée est celle de Bradford où le bleu de Coomassie G250 forme avec les protéines un complexe de couleur bleue. L'intensité de la coloration sera fonction du nombre de liaisons peptidiques par gramme de protéines et non de la masse molaire de protéines. Le complexe présente un maximum d'absorption à 595nm.

Une gamme étalon est établie avec une solution de sérum albumine bovine BSA (1mg/ml). Une série de deux tubes en doubles exemplaire est préparée (**Tableau 8**).

Tableau 8: Gamme étalon pour le dosage des protéines

Tube	1	2	3	4	5	6
Solution de BSA 1mg/ml (µl)	0	10	20	30	40	50
Eau distillée (µl)	50	40	30	20	10	0
Réactif de Bradford (ml)	2	2	2	2	2	2

Après une homogénéisation, les tubes sont incubés pendant 2min à l'obscurité et à température ambiante. Une lecture de l'absorbance à 595nm permet de tracer la courbe étalon (densité optique en fonction de la concentration protéique).

Le dosage des protéines des échantillons est effectué sur un aliquote de 50µl de chaque échantillon à analyser de la même manière décrite précédemment. On détermine graphiquement la concentration en protéines de chaque échantillon à l'aide de la courbe étalon par extrapolation.

2. 9. 4. Electrophorèse des protéines :

L'électrophorèse est réalisée en conditions dissociantes (les protéines sont séparées en leurs sous-unités) en présence d'un détergent anionique le n-dodécylsulfate de sodium (SDS) qui, d'une part dissocie les complexes protéiques en monomères, et d'autre part leur attribue une charge électrique négative.

Dans ces conditions, les protéines migrent sous l'effet d'un champ électrique continu et sont séparées dans le gel essentiellement en fonction de leurs poids moléculaire.

2. 9. 4. 1. Préparation des gels de migration :

Nous avons utilisé des gels plats de polyacrylamide (« stab gels ») de 18 × 24cm et 1,5 cm d'épaisseur. Ces gels sont composés d'une partie supérieure dite gel supérieur ou gel de focalisation (ou encore gel de concentration) à 5% d'acrylamide, qui permet de concentrer les protéines et d'une partie inférieure dite gel inférieur ou gel de séparation à 11% d'acrylamide permettant de fractionner des protéines de masse moléculaire allant de 10 à 100 k Da. La concentration en acrylamide peut être modifiée selon la taille des protéines à séparer.

Après avoir assemblé les plaques de verres, on prépare la solution de gel inférieur en utilisant les ingrédients figurant dans l'annexe, puis on homogénéise la solution, on coule immédiatement le mélange entre les deux plaques en laissant de l'espace pour le gel supérieur. On recouvre avec quelques millilitres d'eau distillée.

Après polymérisation du gel et après élimination de l'eau distillée, on place le peigne et on prépare le gel supérieur qu'on coule au dessus du gel inférieur en évitant la formation de

bulles d'air. Dès que le gel supérieur est polymérisé, on enlève le peigne et on recouvre le gel avec le tampon de migration. Les cuves supérieure et inférieure sont aussi remplies du même tampon.

2. 9. 4. 2. Dépôt des échantillons :

50µg de quantité protéique (prélevée de chaque échantillon) additionnée de 1/5 (v/v) de tampon de charge est chauffée à 100°C pendant 2min, puis déposée au fond des poches du gel à l'aide d'une microseringue.

2. 9. 4. 3. Migration :

La migration est réalisée à température ambiante en appliquant un courant électrique continu de 50mA jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le bas du gel de séparation.

2. 9. 4. 4. Révélation :

Après la migration, le gel est démoulé et on écarte le gel de focalisation. Le gel de séparation est coloré pendant 45min dans une solution de coloration à 0,5% de bleu de comassie R250 (Merk) (composition : voir annexe), la même solution mais sans colorant est ensuite utilisée pour la décoloration. Cette décoloration est faite sous agitation lente dans deux ou trois bains.

2. 10. Mesure de l'acidité et la production d'acide lactique :

2. 10. 1. Préparation des cultures :

Des tubes contenant 10ml de MRS liquide sont ensemencés de façon à obtenir une DO_{600nm} initiale de 0,6 et sont placés à différents temps (24h, 48h, 72h, 96h, 120h et 144h), à différentes concentrations en NaCl (0,6M NaCl, 1,1M NaCl et 1,6M NaCl), à différentes températures (-20°C, 4°C, 18°C, 37°C, 45°C et 60°C) et à différents pH (1,5 ; 2,5 ; 3,5 ; 4,5 et 5,5). A chaque temps et à partir de chaque tube, on standardise la DO et on prélève de

chaque tube 1ml qui sert à ensemencer des flacons contenant 30ml de MRS liquide qui seront par la suite incubés à 30°C pendant 24heures.

2. 10. 2. Mesure de l'acidité :

Les pH des prélèvements des milieux ensemencés sont directement mesurés à l'aide de l'électrode du pH-mètre (ino Lab, D-82362 Weilheim Germany)

2. 10. 3. Mesure de la production d'acide lactique :

Le contenu de chaque flacon ensemencé préalablement, est réparti dans trois béchers à raison de 10ml par bécher (trois essai par mesure). Sous agitation et en mesurant le pH, on ajoute goutte à goutte de la soude Dornic (N/9) jusqu'à ce que le pH initial soit atteint.

Les résultats sont exprimés en degré Dornic (°D) selon la formule suivante : Acidité (°D)= $n \times 10$; n : le volume de soude ajoutée pour titrer 10ml.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

Dans ce travail, nous avons utilisé trois souches de lactobacilles : CHTD27 (*Lactobacillus brevis*), BH14 (*Lactobacillus plantarum*) et CHM18 (*Lactobacillus ssp*). Ces trois souches proviennent de la collection du LBMB (Laboratoire de Biologie des Microorganismes et de Biotechnologie) et ont été isolées à partir de laits de chamelles de différentes régions d'Algérie. Le choix de ces souches repose sur une étude ultérieure de leur capacité à résister au sel et leur comportement en présence de la proline et la glycine-bétaine en condition de stress osmotique. (Baghdad Belhadj-Semar, 2009).

Nous nous sommes intéressés à l'étude de la réponse de ces bactéries à trois stress qu'elles sont susceptibles de rencontrer dans des contextes agroalimentaires ou biotechnologiques : le stress osmotique (salage, déshydratation de l'aliment, lyophilisation des ferments), le stress acide (abaissement du pH en fin de fermentation, acidité de l'estomac) et le stress thermique (chauffage, conservation des aliments et des souches).

3.1. Vérification de la pureté des souches et leur appartenance au groupe lactique :

L'examen macroscopique des souches sur milieu MRS-gélosé révèle que les colonies formées présentent toutes un aspect lisse, de couleur blanchâtre, à contour régulier et d'un diamètre qui varie entre 0,5 et 1mm (Figure 13).

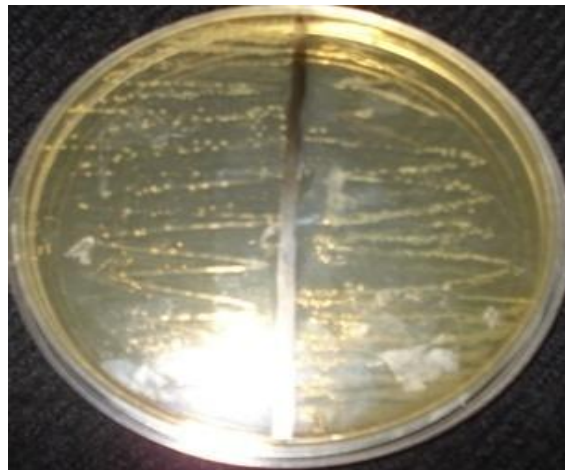


Figure 13 : Aspect de la souche BH14 sur MRS-gélosé

La coloration de Gram nous a permis de confirmer que les bactéries sont à Gram positif et se présentent sous forme de bacilles pour CHTD27 et BH14 et sous forme de cocobacilles pour CHM18 (Figure 14). Le test de catalase est négatif pour les trois souches.

Ces résultats confirment que les trois souches appartiennent au groupe des lactiques.

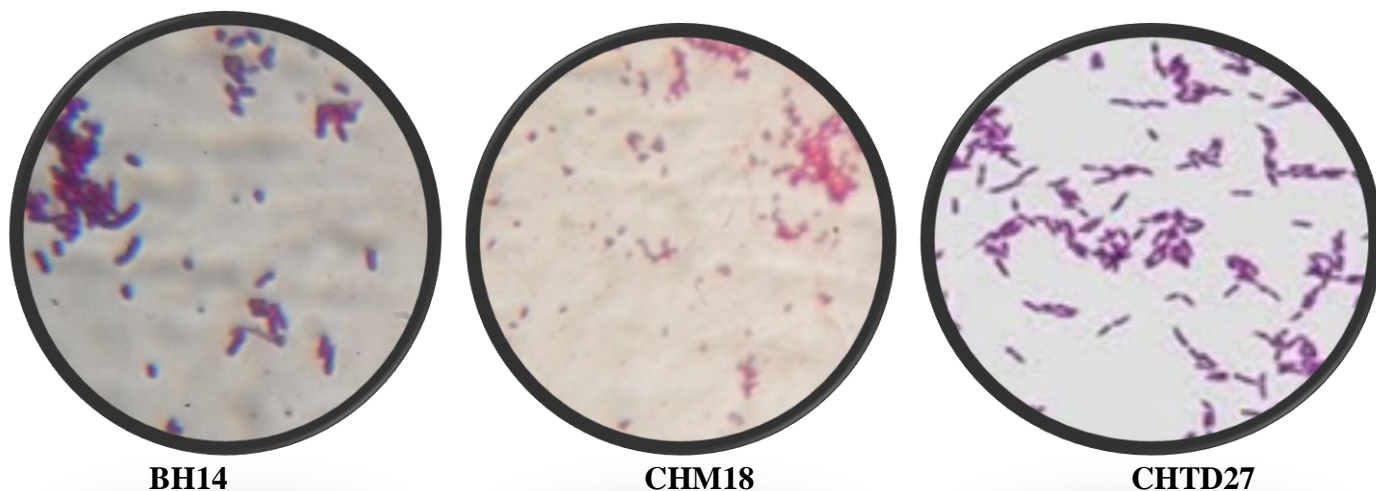


Figure 14 : Aspect des souches étudiées sous microscope optique (GX1000)

3.2. Estimation des conditions inhibitrices de croissance :

3. 2.1. Estimation de la concentration minimale inhibitrice de NaCl :

Ce test est effectué en vue de confirmer les résultats précédents (Baghdad Belhadj-Semar, 2009) et de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI). Le test révèle que les trois souches poussent à 0M, 0,6M et 1,1M de NaCl, alors que seule CHTD27 peut croître à 1,6M. On a ainsi déduit la CMI en NaCl pour chaque souche (Tableau 9).

Tableau 9: CMI de NaCl correspondantes à chaque souche.

Souche	CHTD27	BH14	CHM18
CMI	1,8M	1,6M	1,6M

Ces résultats rejoignent ceux décrits dans la littérature. En effet, l'estimation de la CMI en NaCl au sein du groupe des bactéries lactiques montre une différence importante en matière de tolérance au sel. Trois groupes bactériens peuvent être distingués : le premier comprend l'espèce halophile de *T. halophila* (CMI de 3,5 M NaCl), le second rassemble les genres *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (CMI

entre 1,5 M et 1,7 M NaCl) tandis que le dernier groupe est composé des genres *Lactococcus* et *Oenococcus* (CMI inférieure ou égale à 1M NaCl) (Robert, 2000).

La tolérance vis-à-vis du sel est donc un caractère propre à chaque espèce. L'estimation de la CMI en NaCl au sein du groupe des bactéries lactiques est souche-dépendante. Cela a été montré chez des espèces de *Pediococcus* (Baliarda, 2003) et de *Lactobacillus* (Lemay et al., 2000 ; Kim et al., 2002). O'Callaghan et Condon (2000) ont également constaté que la tolérance vis-à-vis du sel chez *Lc. lactis* est souche-dépendante. Ils proposent de classer les différentes souches de *Lc. lactis* suivant leur capacité à se développer en présence de concentrations en NaCl inférieures ou égales à 0,35 M (souche sensible) ou à 0,7 M (souche tolérante).

Il est à noter que les souches les plus tolérantes vis-à-vis du sel sont celles qui ont été isolées de laitières animales, ce qui est le cas de nos souches. Nous pouvons supposer que cet environnement, particulièrement stressant, favorise le développement de bactéries présentant une bonne tolérance vis-à-vis du stress hyper-osmotique.

3. 2. 2. Estimation de la température inhibitrice de croissance :

Le but de ce test est de déterminer la température inhibitrice (TI). Les résultats indiquent que les trois souches poussent à 4°C, 18°C, 30°C et 37°C. A -20°C et 45°C la croissance est fortement affectée, alors qu'aucune croissance n'est observée à 60°C. Le **tableau 10** résume les résultats obtenus.

Tableau 10 : TI de croissance correspondant à chaque souche.

Souche	CHTD27	BH14	CHM18
TMI	60°C	60°C	60°C

La tolérance des souches vis-à-vis la température peut être du à l'environnement à partir duquel elles sont isolées (Lait de chamelle). En effet, ces résultats rejoignent ceux décrits dans la littérature. Récemment Allouche et al. (2010) ont isolé des souches de *Lactobacillus* thermophiles à partir de lait cru et de ferment lactique commercial qui sont capables de croître à 45°C. Une de ces souches est même capable de survivre à 65°C pendant 90min.

3. 2. 3. Estimation du pH minimal inhibiteur de croissance :

Ce test a permis de déterminer le pH minimal inhibiteur de croissance (pHMI) pour chaque souche. Les trois souches se comportent de la même manière et le pHMI est de 1 comme montré dans le **tableau 11**.

Tableau 11 : pHMI correspondant à chaque souche.

Souche	CHTD27	BH14	CHM18
pHMI	1	1	1

3.3.Effet des différents stress sur les paramètres de croissance :

La mesure de la turbidité de la suspension bactérienne au cours du temps (mesure de la valeur de la DO_{600nm} finale et de la vitesse de croissance) permettra d'évaluer l'effet du stress sur la croissance des souches.

3.3.1. Essai non adapté :

Des cellules concentrées sont utilisées pour ensemercer des milieux MRS puis mises sous différentes conditions de stress (salin : 0,6M, 1,1M et 1,6M ; thermique : -20°C, 4°C, 18°C, 37°C, 45°C et 60°C ; acide : pH=1,5 ; 2,5 ; 3,5 ; 4,5 et 5,5), en plus du témoin (cellules incubées à 30°C dans du MRS à 0M de NaCl et pH=6,2). Les résultats de l'impact de tel stress sur les valeurs de la vitesse de croissance et de la DO_{600nm} sont représentés dans les **figures 15, 16 et 17**.

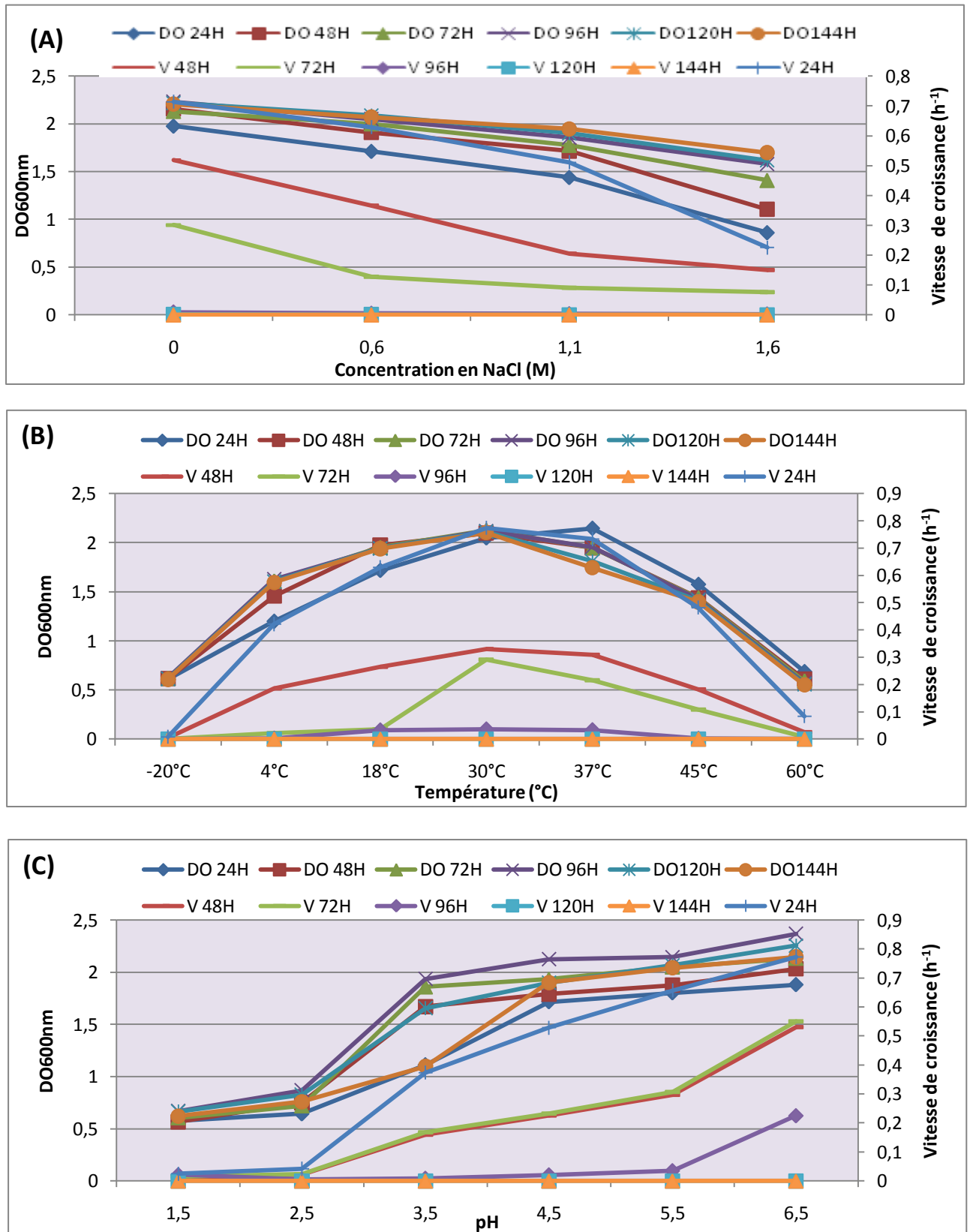


Figure 15 : Effet des divers stress sur les paramètres de croissance de la souche CHTD27 (Essai non adapté)

(A) : Stress hyperosmotique

(B) : Stress thermique

(C) : Stress acide

H : heures

V : Vitesse de croissance

Ces valeurs sont les résultats de la moyenne de trois expériences différentes

Le stress hyperosmotique : la vitesse de croissance des souches décroît progressivement avec l'augmentation des concentrations en NaCl. Les valeurs des DO_{600nm} décroissent aussi en fonction de l'augmentation en NaCl (relation inversement proportionnelle). A partir de 96h, les vitesses de croissance diminuent fortement jusqu'à ce qu'elles s'annulent à 120 et 144h (**Figure 15.A, 16.A et 17.A**).

Ce double impact du stress osmotique sur la physiologie des bactéries suggère que l'ajout de NaCl dans le milieu modifie les capacités des souches à utiliser les nutriments du milieu (les DO_{600nm} sont affectées avant les vitesses de croissance).

Des travaux réalisés sur *Lc. lactis* ont montré que dans un milieu à 1,1M de NaCl, la croissance est réduite de 25% à 50% par rapport à une croissance à pression osmotique normale (**Kilstrup et al., 1997 ; Romeo et al., 2001**). Des travaux réalisés chez *Lb. sakei* dans un milieu de culture synthétique ont montré que l'ajout de NaCl dans le milieu provoque la diminution de la densité cellulaire et de la vitesse de croissance de la bactérie (**Marceau et al., 2003**), c'est aussi le cas chez *P. pentosaceus* (**Baliarda, 2003**).

Le stress thermique : la croissance des souches à un stress thermique est un phénomène biphasique : les valeurs des DO_{600nm} sont représentées sous forme de cloches (**Figures 15.B, 16.B et 17.B**); de -20°C à 30°C, on note une augmentation des vitesses de croissance, entre 37°C et 60°C, et on note une diminution progressive des DO_{600nm} jusqu'à des valeurs très basses à 60°C (croissance nulle). Cette observation est la même pour les trois souches et à différent temps (de 24 à 144h).

Pour la vitesse de croissance, les graphes obtenus à 24 et 48h indiquent que c'est un phénomène biphasique et la forme de cloche est encore présente : entre -20°C et 30°C, on remarque une augmentation linéaire des vitesses de croissance, en revanche, pour des températures entre 37°C et 60°C, on note une diminution linéaire des vitesses de croissance. A partir de 72h, la forme de la cloche disparaît jusqu'à une linéarisation des vitesses où elles s'annulent à 120h.

Ceci implique que la température modifie et affecte directement la croissance des bactéries où on note que la DO_{600nm} et les vitesses de croissance sont les deux affectés. Ces mêmes résultats sont obtenus avec *P. pentosaceus* (**Baliarda, 2003**).

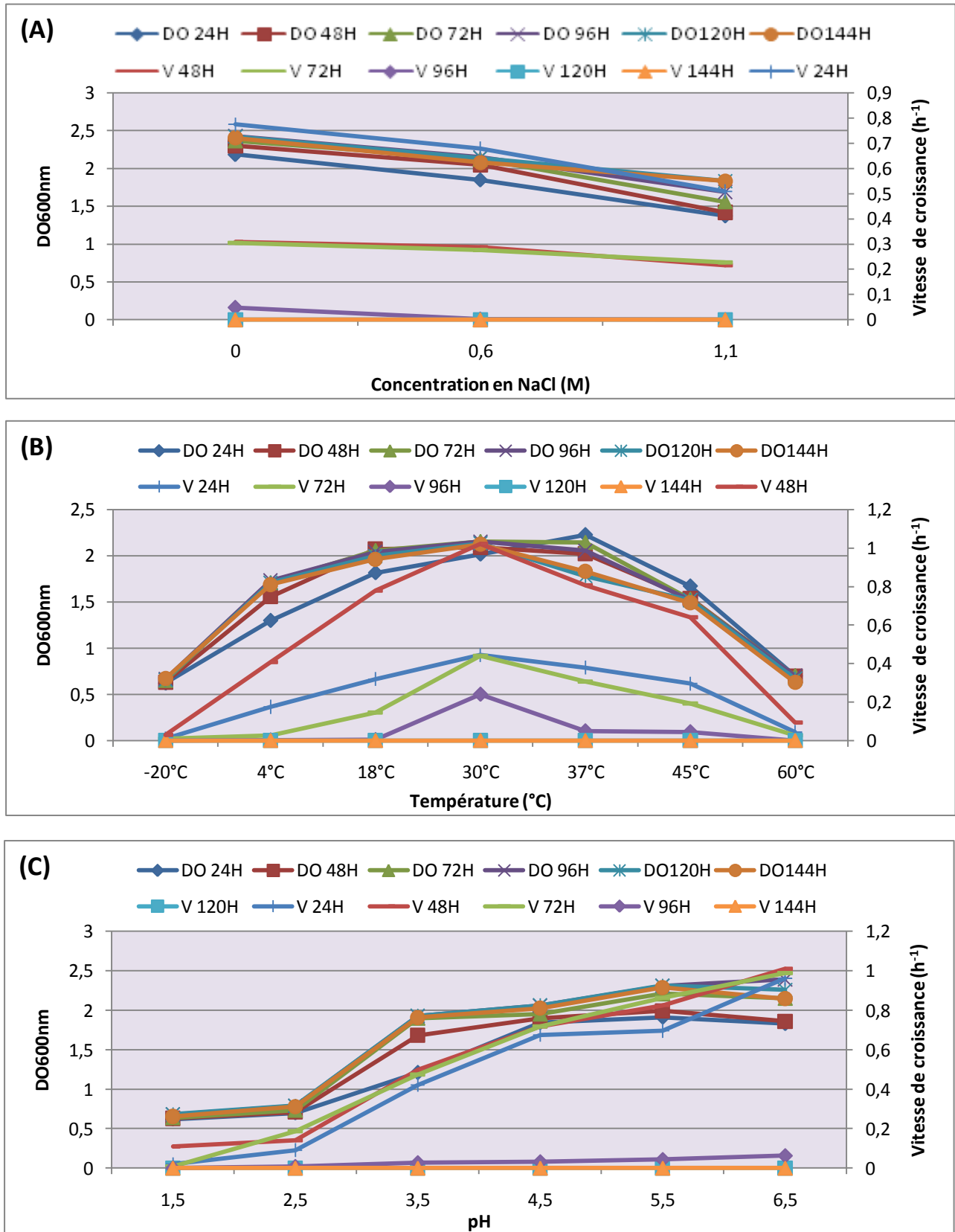


Figure 16 : Effet des divers stress sur les paramètres de croissance de la souche BH14

(essai non adapté)

(A) :Stress hyperosmotique

(B) :Stress thermique

(C) :Stress acide

H : heures

V : Vitesse de croissance

Ces valeurs sont les résultats de la moyenne de trois expériences différentes

Par contre, **Allouche et al. (2010)** ont montré que des souches de *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. lactis* et *Lb. bulgaricus* isolées à partir de lait cru sont des thermophiles et sont capables de croître à 45°C sans que les vitesses de croissance soit fortement affectées.

Le stress acide : les valeurs des DO_{600nm} sont affectées à leurs tours par le stress acide, on note une linéarisation où les DO_{600nm} augmentent en fonction de l'augmentation des pH (relation proportionnelle). Les vitesses de croissance, quant à elles, chutent d'une façon significative pour des valeurs de pH inférieures à 4,5. Pour les valeurs de pH comprises entre 4,5 et 6,5, on note une stabilisation (**Figures 15.C, 16.C et 17.C**).

Ces résultats sont similaires à ceux observés par **Guillouard et al. (2004)**. Ces auteurs ont trouvé que les vitesses de croissance sont affectées par les changements de pH chez des souches de *Lb. bulgaricus*. Les mêmes résultats sont observés chez *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (**Silva et al., 2005**).

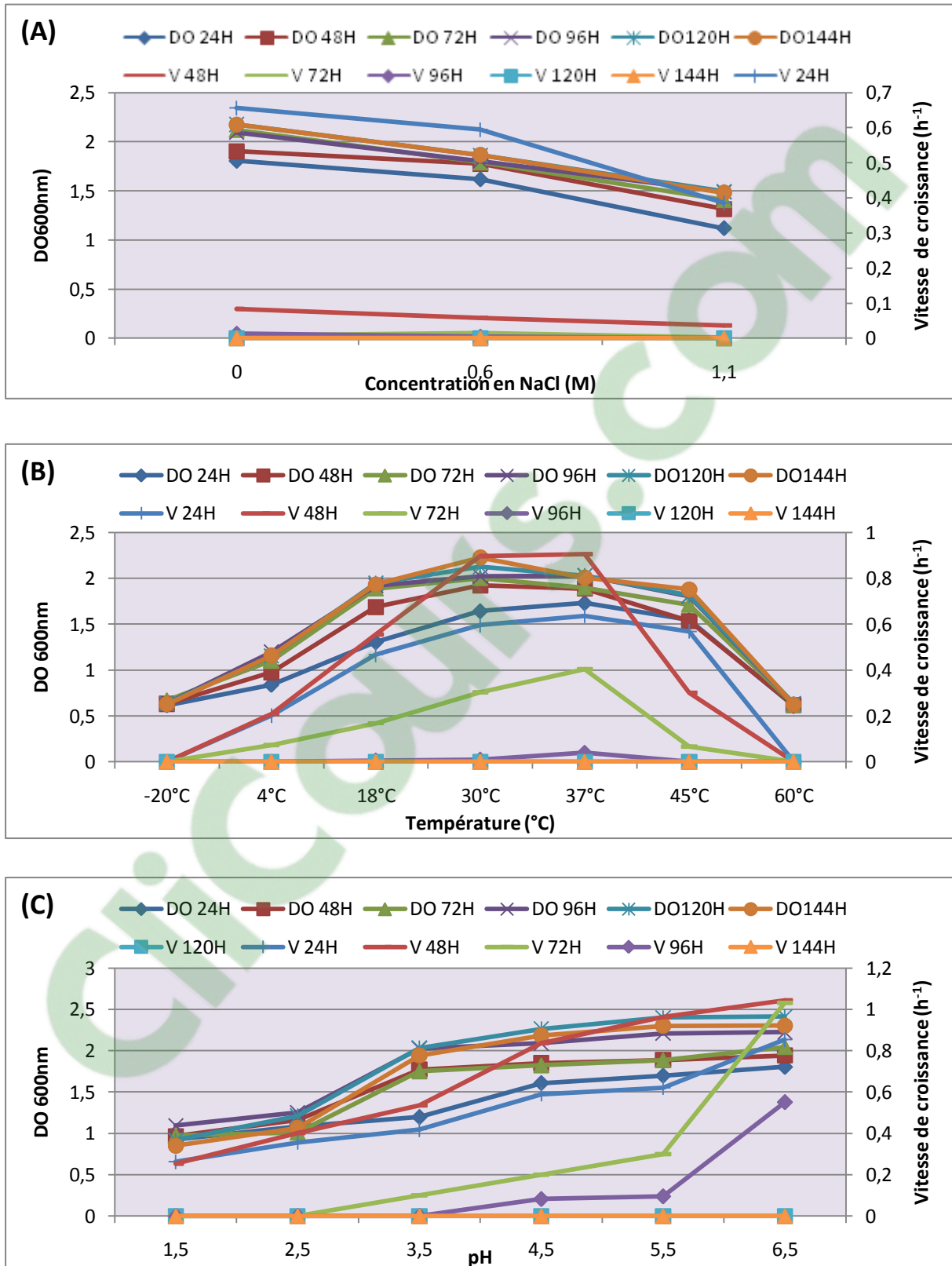


Figure 17 : Effet des divers stress sur les paramètres de croissance de la souche CHM18 (essai non adapté)

(A) : Stress hyperosmotique

(B) : Stress thermique

(C) : Stress acide

H : heures

V : Vitesse de croissance

Ces valeurs sont les résultats de la moyenne de trois expériences différentes

3.3.2. Essai adapté :

Après l'adaptation des cellules, on remarque que les souches deviennent plus résistantes aux stress hyperosmotique, thermique et acide. Les valeurs des DO_{600nm} augmentent par des valeurs qui changent d'une souche à une autre. Les valeurs des vitesses de croissance changent à leurs tours mais elles restent nulles à 120h et 144h (**Figures 18, 19 et 20**). Ces observations montrent qu'une adaptation préalable des cellules à un stress, permet à ces cellules de mieux résister aux stress.

L'exposition des bactéries à un stress donné affecte les capacités de se multiplier et les vitesses de croissance des cellules, ces modifications changent d'une souche à une autre, d'un stress à un autre et d'une intensité d'un même stress à un autre.

Une adaptation préalable d'une cellule à un stress donné améliore ses capacités à se multiplier et à croître.

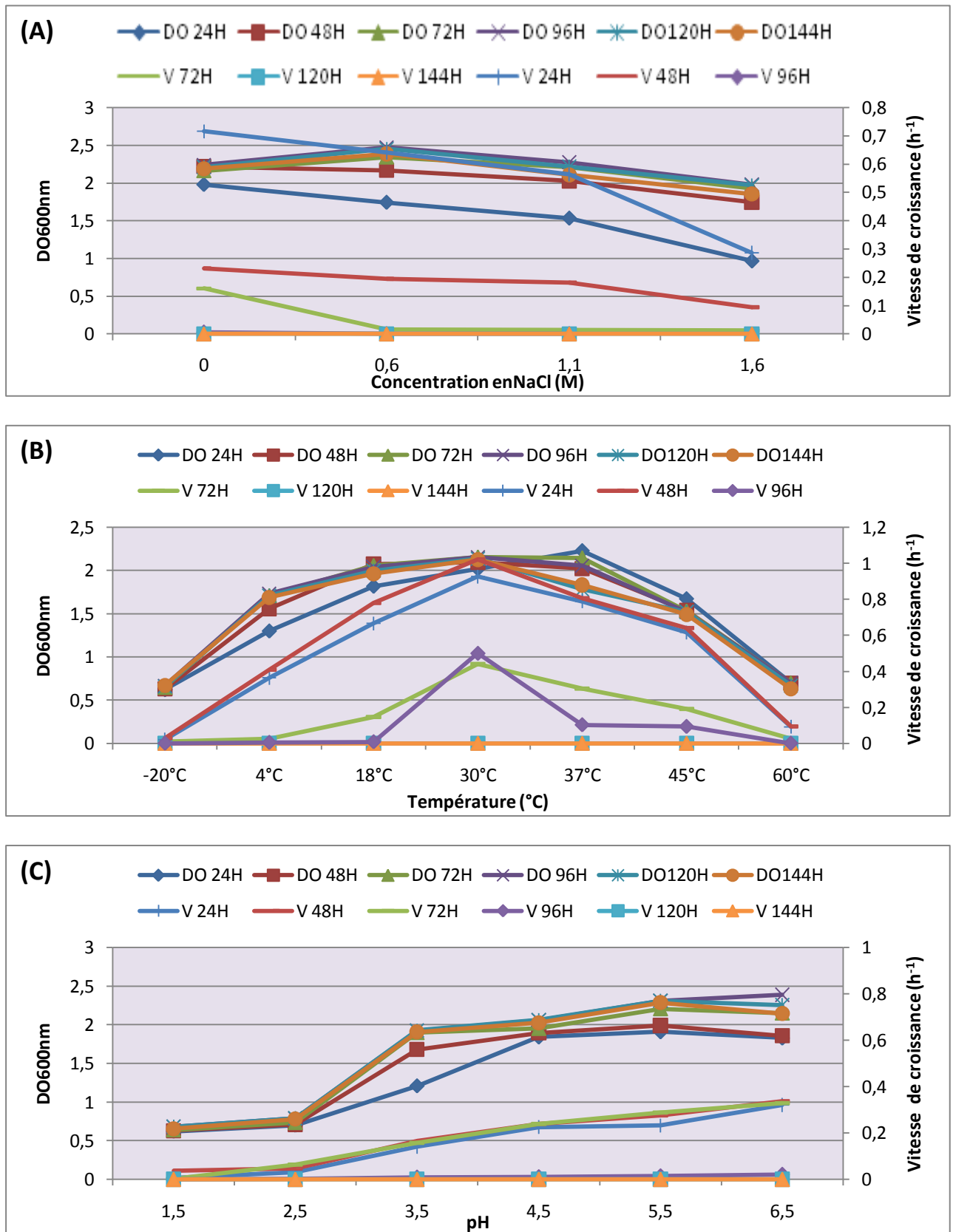


Figure 18 : Effet des divers stress sur les paramètres de croissance de la souche CHTD27 (essai adapté)

(A) : Stress osmotique (B) : Stress thermique (C) : Stress acide
 H : heures V : Vitesse de croissance
 Ces valeurs sont les résultats de la moyenne de trois expériences différentes

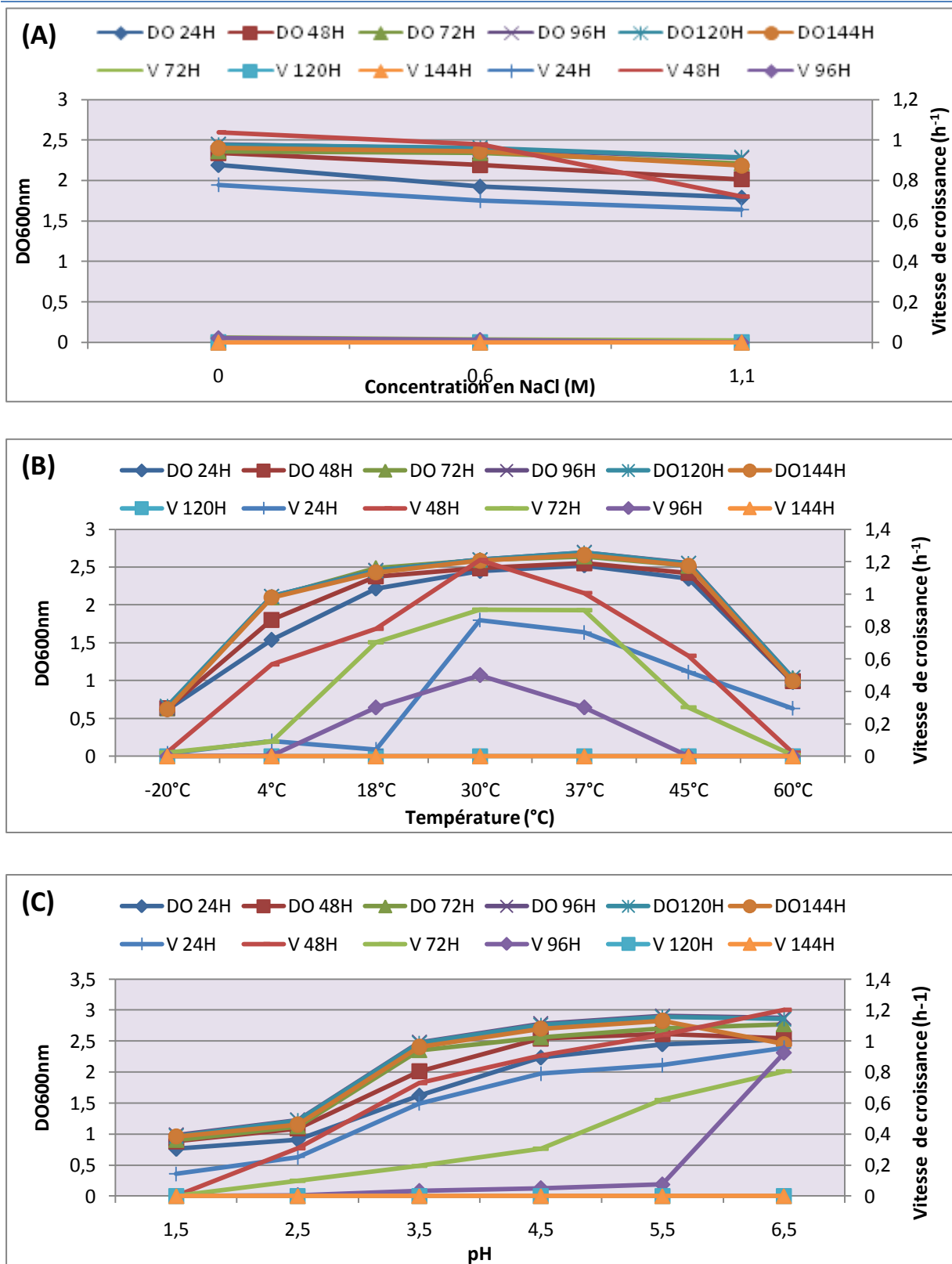


Figure 19 : Effet des divers stress sur les paramètres de croissance de la souche BH14 (essai adapté)

(A) :Stress osmotique

(B) :Stress thermique

(C) :Stress acide

H : heures

V : Vitesse de croissance

Ces valeurs sont les résultats de la moyenne de trois expériences différentes

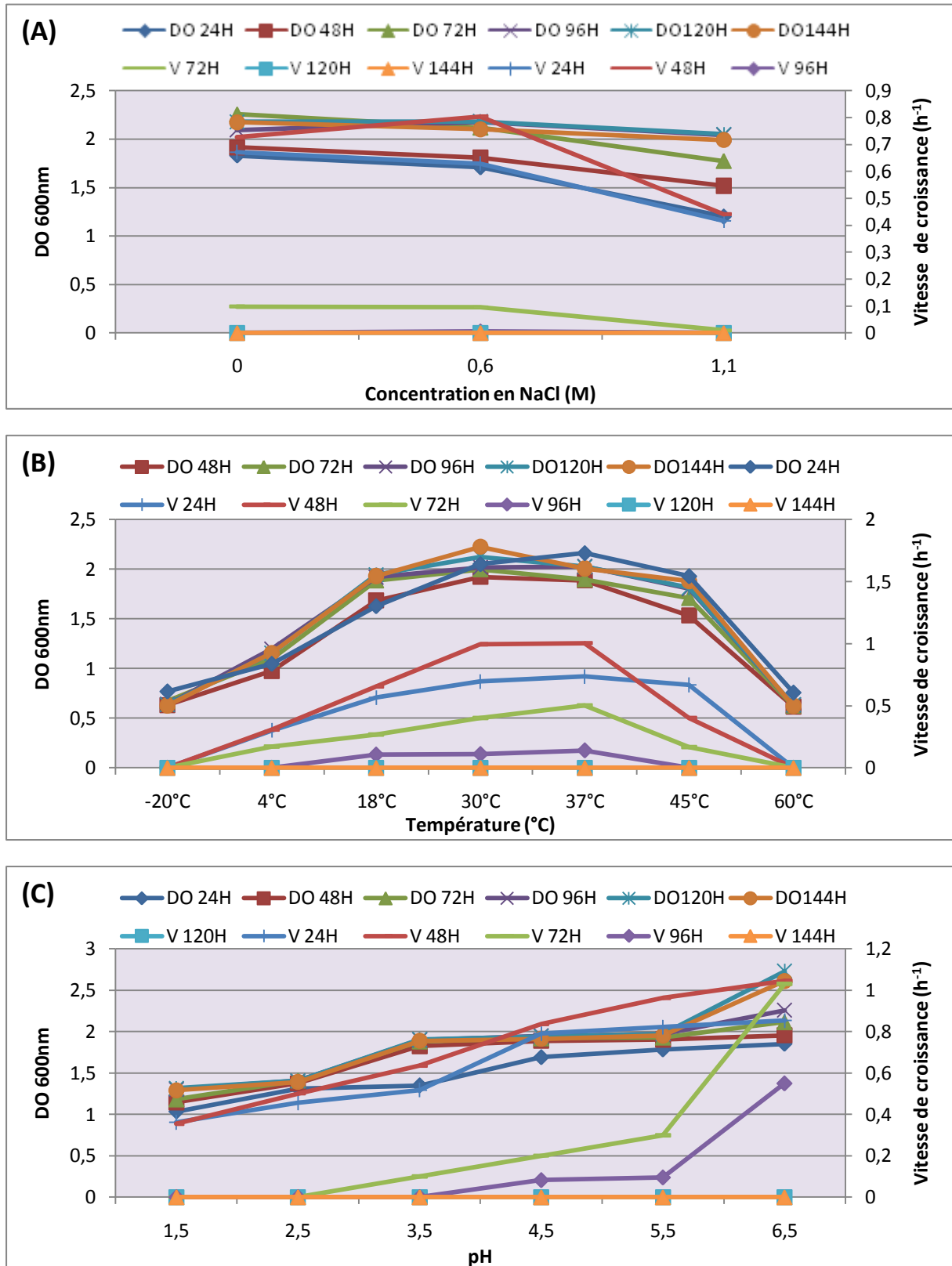


Figure 20 : Effet des divers stress sur les paramètres de croissance de la souche CHM18

(essai adapté)

(A) : Stress hyperosmotique

(B) : Stress thermique

(C) : Stress acide

H : heures

V : Vitesse de croissance

Ces valeurs sont les résultats de la moyenne de trois expériences différentes

3.4. Effet des différent stress sur la croissance et la viabilité des cellules :

Des cellules issues d'une préculture d'une nuit sont inoculées soit dans du MRS non stressant soit dans du MRS stressant. L'évolution des populations est estimée journallement par mesure de la turbidité du milieu et numération. Les résultats sont représentés dans les **figures 21, 22 et 23**.

3.4.1. Essai non adapté :

Dans les conditions non stressantes (conditions normales), on note une augmentation progressive des DO_{600nm} pendant la phase exponentielle, puis une stabilisation de cette DO_{600nm} ce qui implique que les cellules sont en phase stationnaire et cela à partir du 2^{ème} jour d'incubation.

Durant la phase exponentielle, la densité cellulaire augmente jusqu'à atteindre environ 10^8 à 10^9 cellules/ml. Cependant, l'entrée de la phase stationnaire s'accompagne d'une chute de la survie des cellules, elle est lente au début puis elle est rapide entre le 3^{ème} et le 6^{ème} jour, puis elle s'annule à partir du 6^{ème} jour environ. Puisque la DO_{600nm} ne décroît pas par la suite, ceci implique que la perte de viabilité ne s'accompagne pas par une lyse cellulaire chez les trois souches.

Durant **le stress hyperosmotique**, les capacités de croissance sont diminuées (ralentissement de la croissance et réduction de la DO_{600nm}). La survie est aussi diminuée : à 1,1M de NaCl, on note qu'elle s'annule comme à 0M au 6^{ème} jour. Cependant, au delà de 1,1M de NaCl, la survie est fortement affectée par le sel (**Figures 21.A, 22.A et 23.A**).

D'autres auteurs ont trouvé qu'un stress hyper-osmotique sub-optimal de 1 M NaCl améliore la survie de *P. pentosaceus* en phase stationnaire et prolonge sa durée de vie (**Baliarda, 2003**). Des résultats similaires ont été obtenus chez *Lb. sakei* 23K. Les auteurs de ces travaux supposent que les stratégies de réponse aux stress développées par *Lb. sakei* visent à améliorer sa survie plutôt que sa croissance (**Marceau et al., 2003**).

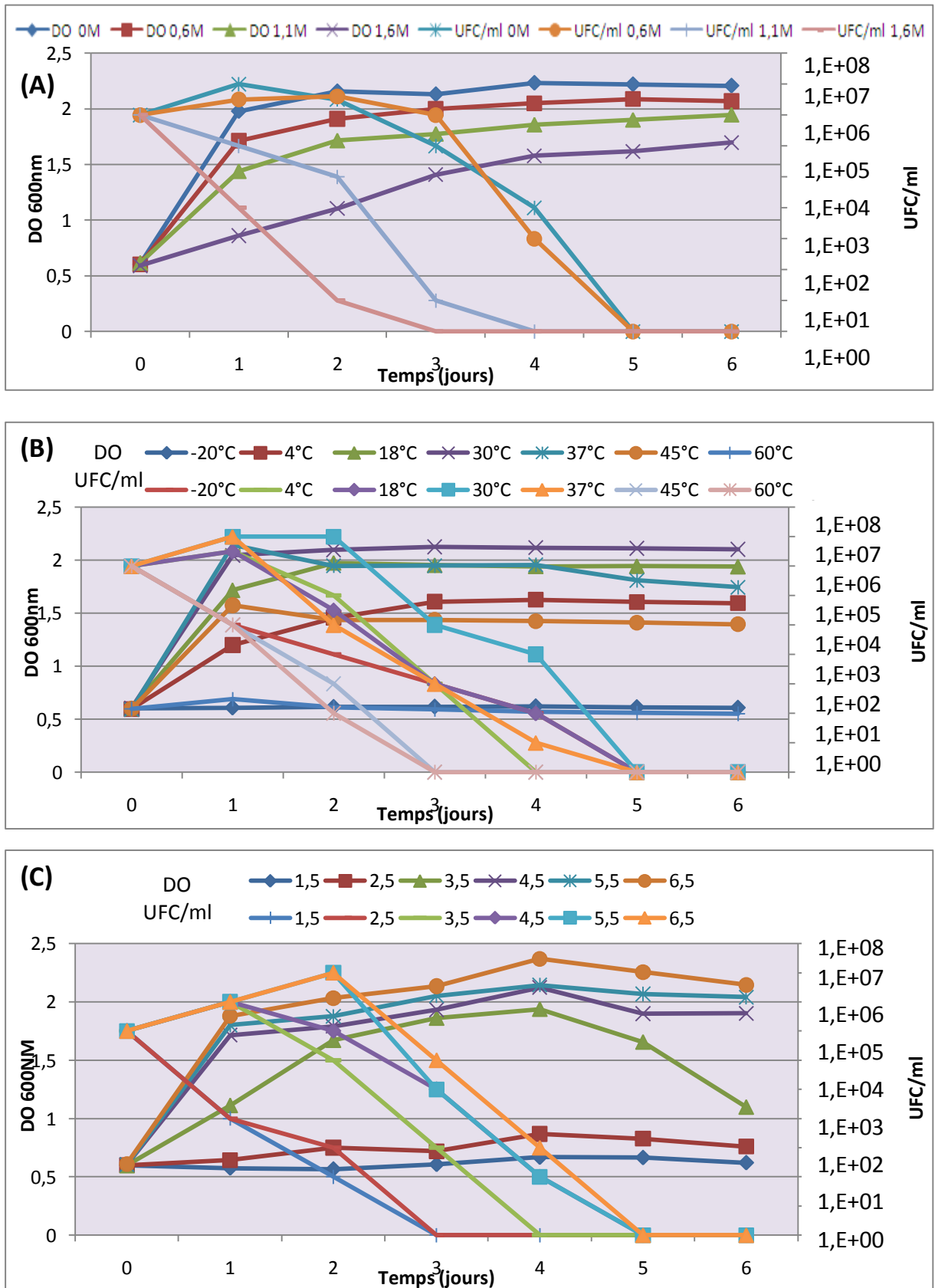


Figure 21: Effet des divers stress sur la croissance et la viabilité de la souche CHTD27

(Essai non adapté)

(A) : Stress hyperosmotique

(B) : Stress thermique

(C) : Stress acide

Ces valeurs sont les résultats de la moyenne de trois expériences différentes

Le stress thermique à son tour affecte la survie des cellules, plus on s'éloigne de la température optimale de croissance (30°C), plus la survie est diminuée jusqu'à ce qu'elle s'annule (**Figure 21.B, 22.B et 23.B**).

Des études menées sur *Lb. rhamnosus* ont montré que l'exposition des cellules à une température de 50°C améliore la survie des cellules pendant la phase stationnaire pendant quelques jours (**Prasad et al., 2003**). **Gwenola** a étudié l'influence du stress thermique sur la viabilité de deux souches de *Lb. bulgaricus*. Il a constaté que la viabilité des cellules n'est affectée qu'au-delà de 55°C (**Gwenola et al., 2001**). Les mêmes résultats ont été observés chez *Lb. helveticus* (**Di Cagno et al., 2006**), *St. thermophilus*, *Lb. delbruckii* et *O. oeni* (**Jobin et al., 1998**) et chez *Lb. delbruckii* ssp. *bulgaricus* (**Silva et al., 2005**).

Le stress acide diminue aussi la survie des cellules : à pH=1,5 et 2,5, la survie est fortement affectée et on note une mort rapide des cellules (absence de cellules viables et cultivables à partir de 72h d'incubation). A partir de pH=3,5, la durée de vie des cellules augmente (4 jours), jusqu'à ce qu'elle atteigne 6 jours à pH4,5 et 5,5 ce qui est aussi noté à 6,5 (pH optimum) (**Figure 21.C, 22.C et 23.C**).

Guillouard et ces collaborateurs ont montré que la résistance de cinq souches de *Lb. bulgaricus* est variable selon les souches et diffère d'une souche à une autre (**Guillouard et al., 2004**).

3.4. 1. Essai adapté :

La représentation des DO_{600nm} et le nombre de cellules viables et cultivables montre que l'adaptation des cellules affecte positivement les DO_{600nm} et le nombre d'UFC/ml, on remarque que les valeurs sont directement augmentées jusqu'à ce que ça soit presque égale aux valeurs témoins : à 1,1M de NaCl, 18°C, 37°C 4,5 et 5,5. Cependant, aux valeurs extrêmes (-20°C, 60°C, pH1,5 et 2,5), après une adaptation, on remarque qu'on a toujours presque les mêmes DO_{600nm}. Ceci est de même pour la survie cellulaire (**Figures 24, 25 et 26**).

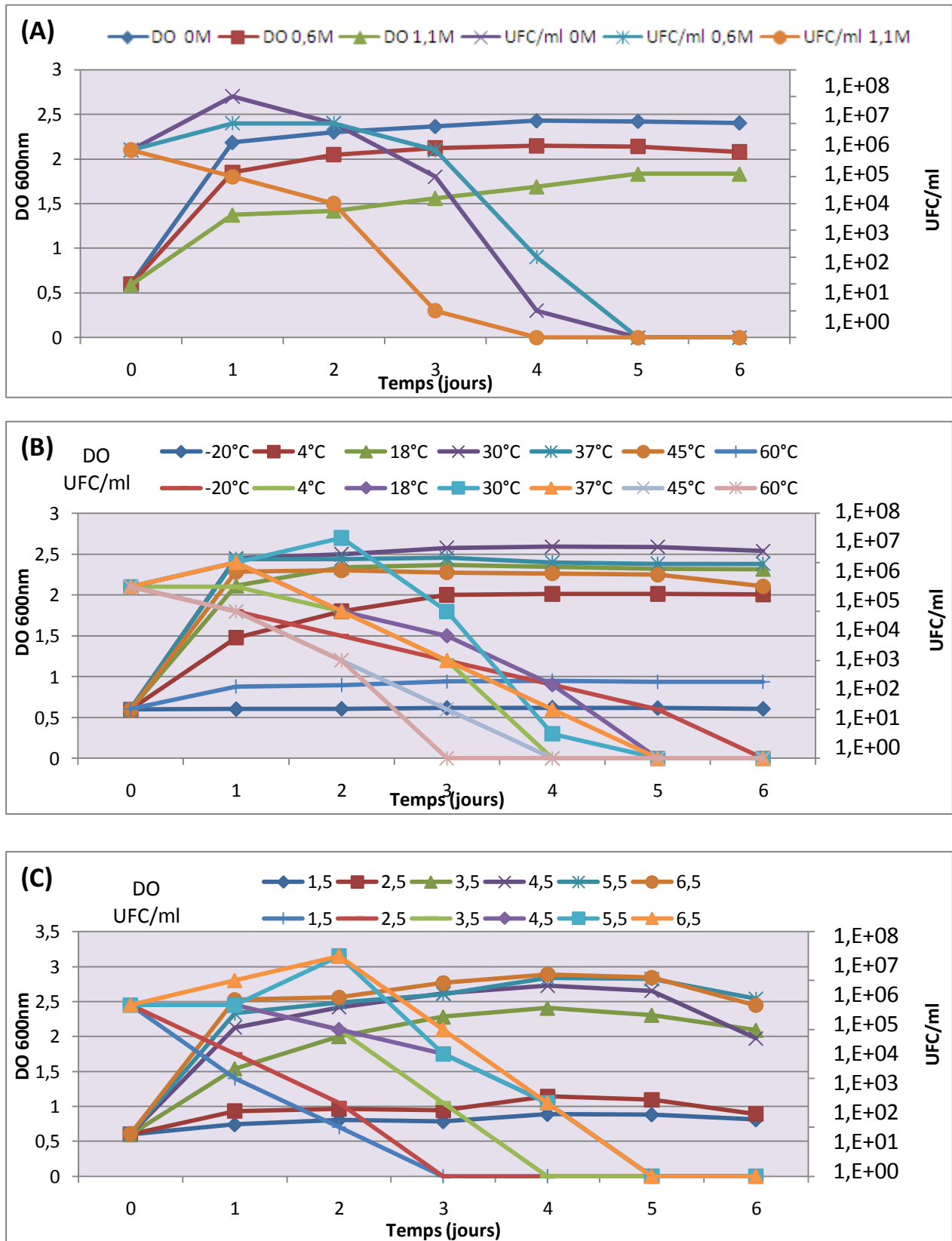


Figure 22: Effet des divers stress sur la croissance et la viabilité de la souche BH14 (essai non adapté)

(A) : Stress hyperosmotique (B) : Stress thermique (C) : Stress acide
 Ces valeurs sont les résultats de la moyenne de trois expériences différentes

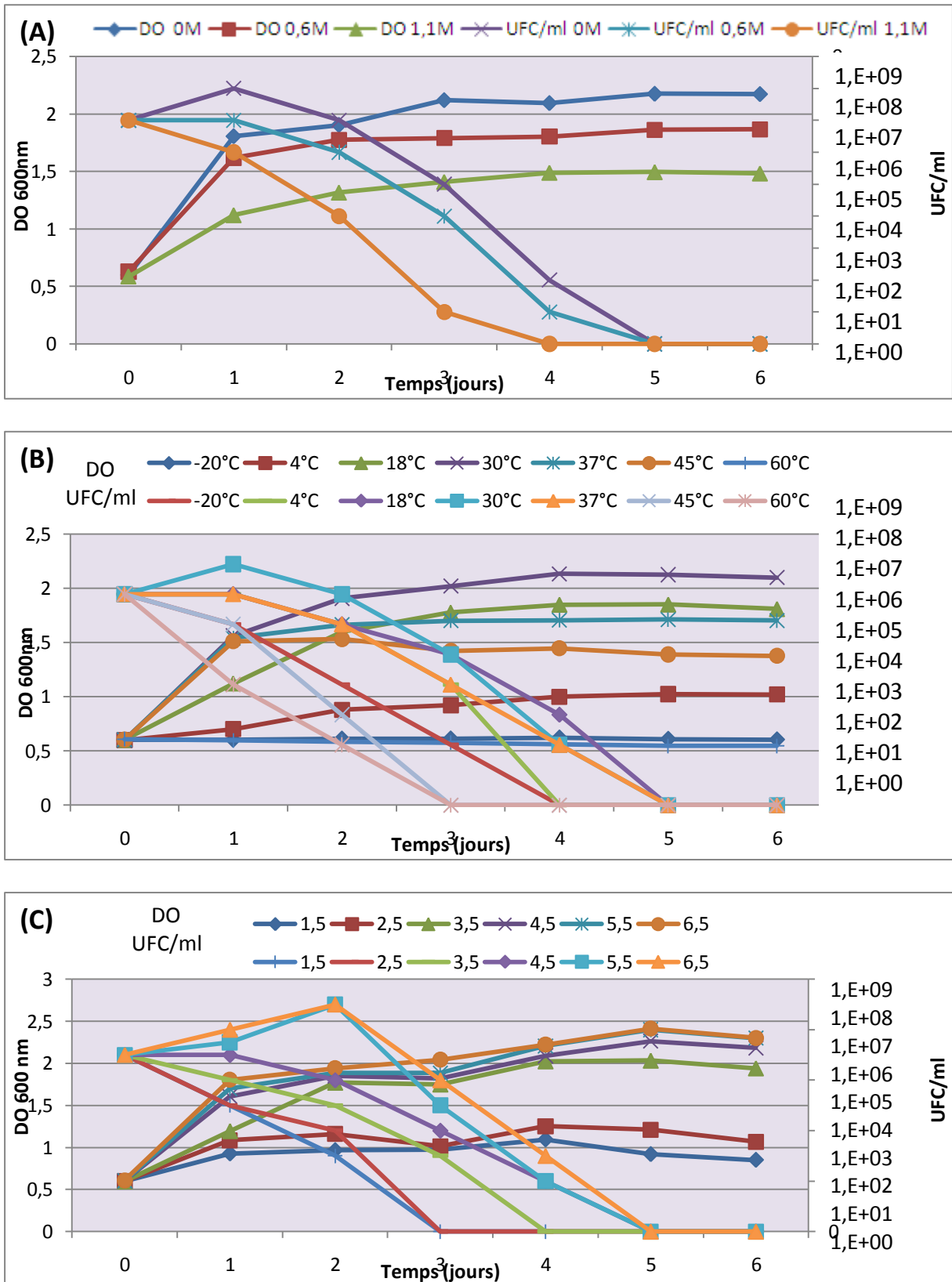


Figure 23: Effet des divers stress sur la croissance et la viabilité de la souche CHM18

(essai non adapté)

(A) :Stress hyperosmotique

(B) :Stress thermique

(C) :Stress acide

Ces valeurs sont les résultats de la moyenne de trois expériences différentes

Chez *Lb. bulgaricus*, les cellules acquièrent une thermotolérance vis-à-vis d'un choc thermique à 65°C durant 10min, c'est-à-dire une viabilité accrue, après exposition à un prétraitement thermique modéré à 50°C (Gwenola *et al.*, 2001). D'autres souches de *Lb. bulgaricus* devenaient environ 250 fois plus tolérantes au choc acide quand elles avaient subi une adaptation préalable à un pH de 4,75 (Penaud, 2006).

Des souches de *Lb. bulgaricus* ayant subi des adaptations à l'acidité ont donné des taux de survie supérieurs à ceux observés avec des souches qui n'ont subi aucune adaptation (Guillouard *et al.*, 2004).

Les stress sublétaux peuvent induire une réponse de type formes Viables Non Cultivables (VNC). Le nombre de bactéries décrites sous formes VNC a largement augmenté ces dernières années, la plupart sont des bactéries à Gram-négatif. La perte de capacité à former des colonies a également été montrée chez quelques bactéries à Gram-positif. La température et la concentration en NaCl sont les facteurs les plus importants induisant la perte de capacité à former des colonies (Besnard *et al.*, 2000).

L'hypothèse "Viable Non Cultivable" est un sujet d'intérêt et de discussion pour plusieurs microbiologistes des aliments et soulève des questions sur le potentiel de menace des bactéries qui ne peuvent pas être détectées par les tests standards de microbiologie, l'existence de formes VNC pose ainsi un problème de santé publique.

Les différents stress ont un effet direct sur la survie des cellules viables et cultivables, elle est diminuée en conditions stressantes. Les valeurs des DO_{600nm} stables en fin de phase stationnaire et la chute de la survie des cellules indiquent que la mort cellulaire ne s'accompagne pas par un phénomène de lyse des cellules.

L'adaptation des cellules affecte les DO_{600nm} et la survie des cellules et les rendent plus résistantes aux stress (cette adaptation n'est pas significative aux valeurs extrêmes de chaque contrainte).

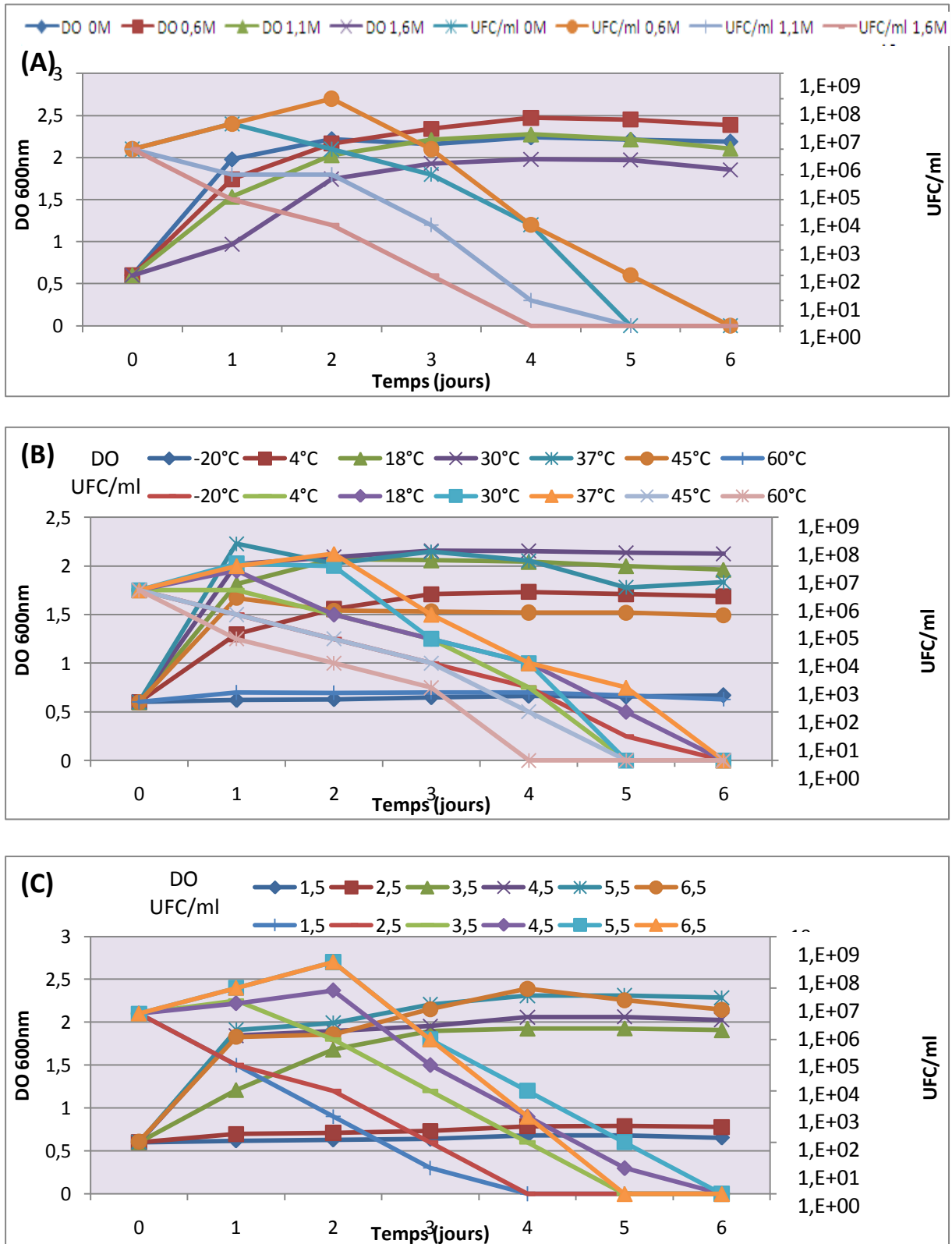


Figure 24: Effet des divers stress sur la croissance et la viabilité de la souche CHTD27 (essai adapté)

(A) : Stress hyperosmotique

(B) : Stress thermique

(C) : Stress acide

Ces valeurs sont les résultats de la moyenne de trois expériences différentes

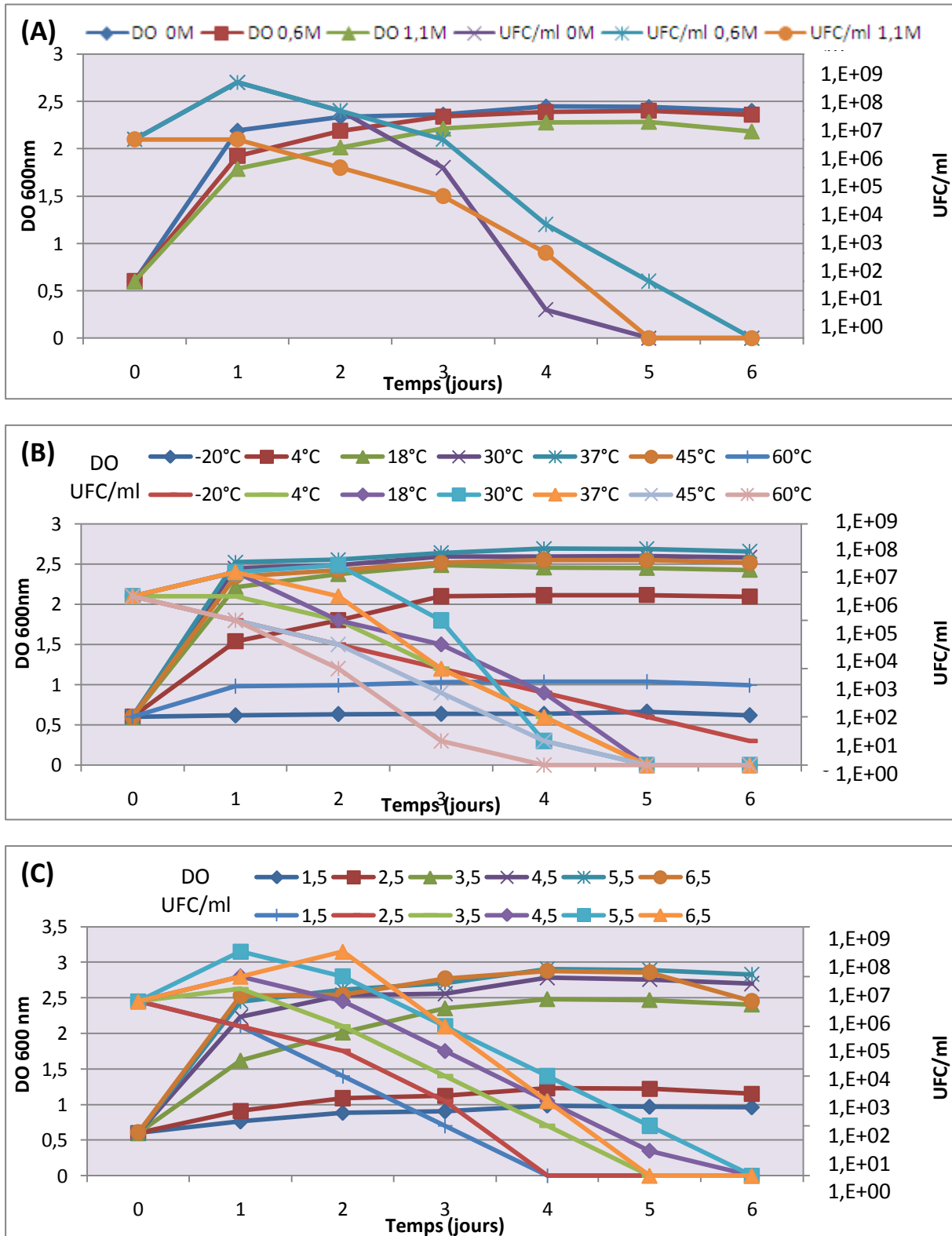


Figure 25: Effet des divers stress sur la croissance et la viabilité de la souche BH14 (essai adapté)

(A) : Stress osmotique (B) : Stress thermique (C) : Stress acide

Ces valeurs sont les résultats de la moyenne de trois expériences différentes

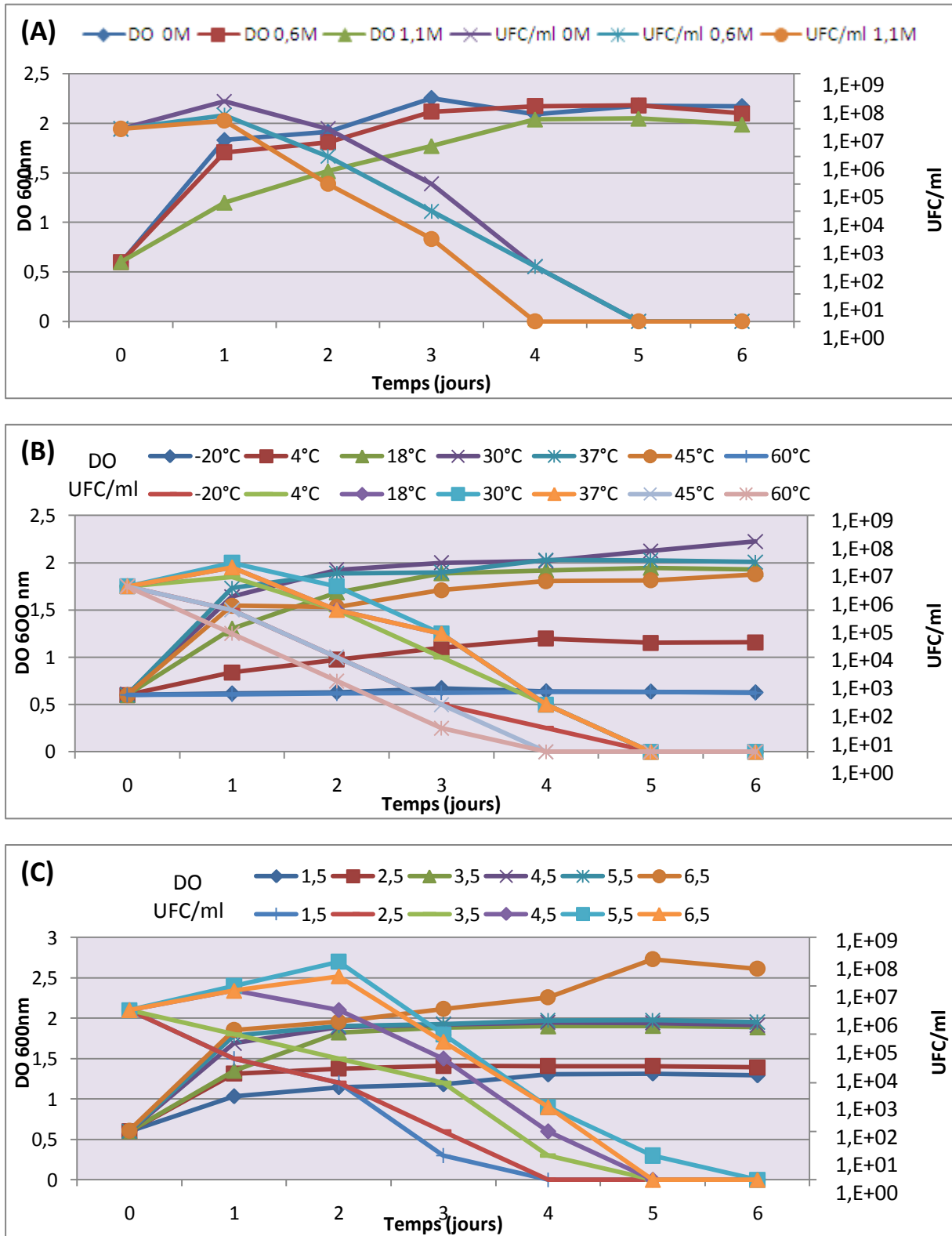


Figure 26: Effet des divers stress sur la croissance et la viabilité de la souche CHM18 (essai adapté)

(A) : Stress hyperosmotique

(B) : Stress thermique

(C) : Stress acide

Ces valeurs sont les résultats de la moyenne de trois expériences différentes

3. 5. Effet des différents stress sur le taux de mortalité des cellules :

Des stress de natures différentes, dont l'intensité et la durée varient, ont été appliqués à des cellules prélevées en phase exponentielle de croissance. Leurs effets sur la mortalité des cellules ont été étudiés. La létalité du traitement est traduite par la formule suivante :

$$[(\text{UFC/ml à } T_0) - (\text{UFC/ml à un temps déterminé})] / (\text{UFC/ml à } T_0)$$

Les pourcentages de mortalité associés à chaque traitement sont représentés dans les figures 27, 28 et 29.

3.5.1. Essai non adapté :

Le choc hyperosmotique : au début de l'expérience (24 à 48h), la concentration de 1,1M de NaCl a peu d'effet sur la viabilité des cellules stressées : entre 0% et 4,5% de mortalité pour CHTD27 et BH14. Pour CHM18, l'effet commence à partir de 48h.

Une concentration de 1,6M de NaCl provoque plus de mortalité. Pour CHTD27 on note que le taux de mortalité est trop élevé : 99,70% après 24h d'incubation (**Figures 27.A, 28.A et 29.A**).

Toutes ces données suggèrent que les cellules sont sensibles au stress hyperosmotique mais à des degrés qui diffère d'une souche à une autre, d'un temps donné à un autre et d'une concentration à une autre.

Des études indiquent qu'un choc hyperosmotique (2 M de NaCl et 4 M de NaCl), a peu d'effet sur la viabilité des cellules stressées. Aucune mortalité n'est observée après 6h, 20h ou 40h d'exposition à 2 M NaCl. Une mortalité de 45% est obtenue après 20h d'exposition à 4 M NaCl. Ces données suggèrent que les cellules de *P. pentosaceus* sont particulièrement résistantes au choc hyperosmotique, comparativement à *Ent. faecalis* : 45% de mortalité après 2h d'exposition à 1,1 M en milieu BHI (**Flahaut et al., 1996**), *Lb. acidophilus* CRL639 : 99,6% de mortalité après 24h d'exposition à 3 M NaCl (**Lorca et Font de Valdez, 1999**), *Lb. acidophilus* LA1-1 : 54% de mortalité après 2h d'exposition à 3 M NaCl en milieu MRS (**Kim et al., 2001**) et *Lc. lactis* ssp *cremoris* NCDO712 : 99,7% de mortalité après 2h d'exposition à 3,5 M NaCl (**O'Sullivan et Condon, 1997**).

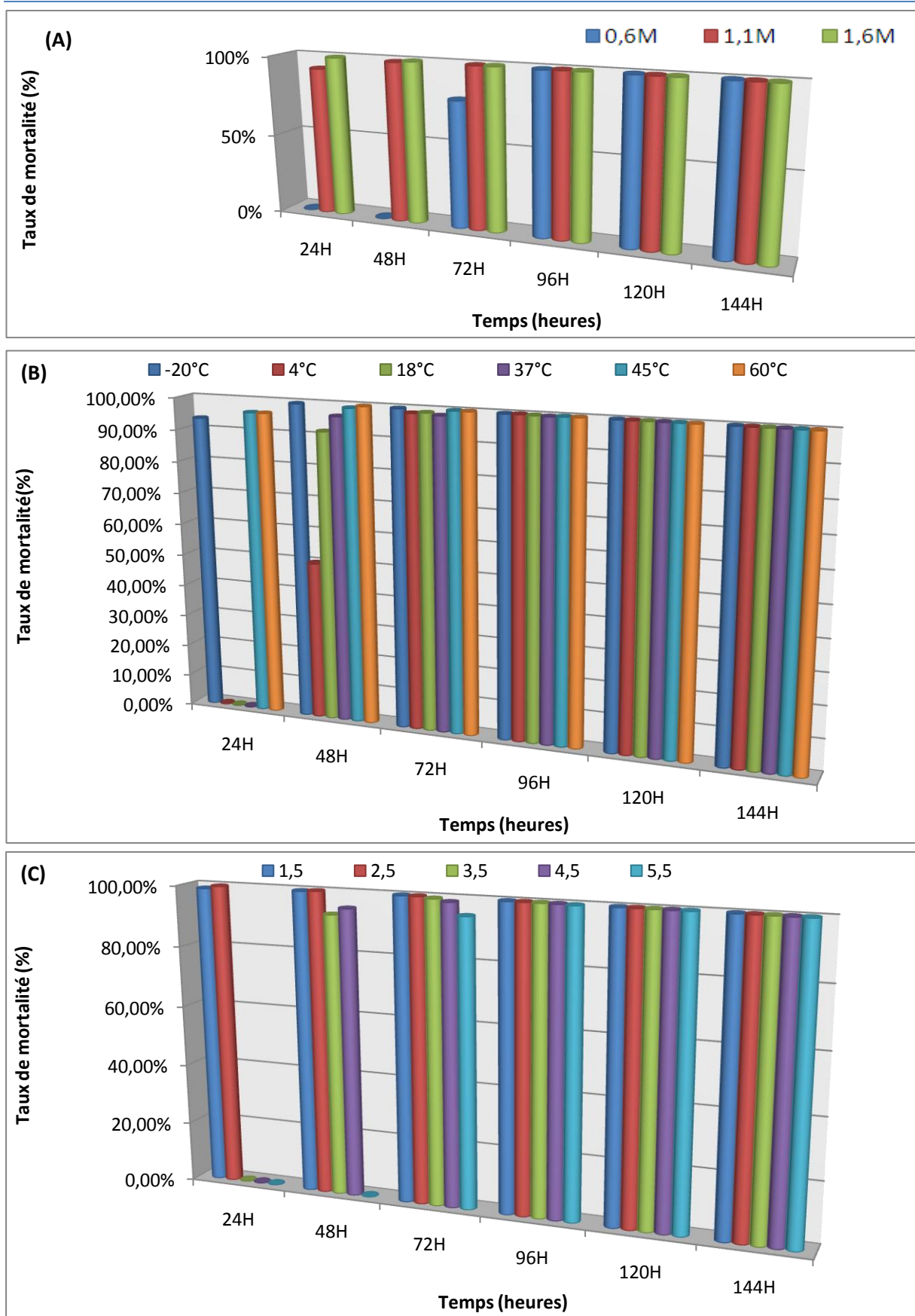


Figure 27: Effet des divers stress sur le taux de mortalité de la souche CHTD₂₇

(A) : Stress hyperosmotique (essai non adapté) (B) : Stress thermique (essai non adapté)

(C) : Stress acide (essai non adapté)

Ces valeurs sont les résultats de la moyenne de trois expériences différentes

Le choc thermique : l'augmentation brutale de la température à 60°C entraîne une forte mortalité des cellules et à partir de 24h d'incubation il atteint 99,60% pour CHTD27, 74,90% pour BH14 et 98,50% pour CHM18. L'effet de l'incubation à 45°C commence à mieux apparaître à 48h ; à 24h on note des taux de mortalité moins drastiques qu'à 60°C.

Les cellules sont moins sensibles aux températures de 37°C, 18°C et 4°C. Cependant, cette résistance observée à 24 et 48h d'incubation, n'est plus valable à partir de 72h (**Figures 27.B, 28.B et 29.B**).

A -20°C, on note une mortalité assez importante, ce qui est inattendu vu que les cellules se conservent habituellement à -20°C, ceci peut être expliqué par le fait que le milieu MRS ne contient pas de cryoprotecteurs, substances habituellement utilisées pour protéger les cellules bactérienne du froid de la congélation.

Ces résultats sont similaires à ceux trouvés chez *P. pentosaceus*. Un choc thermique consistant à augmenter brutalement la température d'incubation de 37°C à 42°C ou à 50°C n'entraîne qu'une faible mortalité, L'augmentation de la température à 53°C produit une forte mortalité. La tolérance de *P. pentosaceus* ATCC33316 à la chaleur (98,2% de mortalité après un traitement à 53°C) est proche de celle observée chez *O. oeni* LOD004 (99,6% de mortalité après un traitement à 53°C; (**Garbay et Lonvaud-Funel, 1996**). La souche *Lb. acidophilus* LA1-1 est plus résistante (pas de mortalité après un traitement de 30 min à 53°C) (**Kim et al., 2001**).

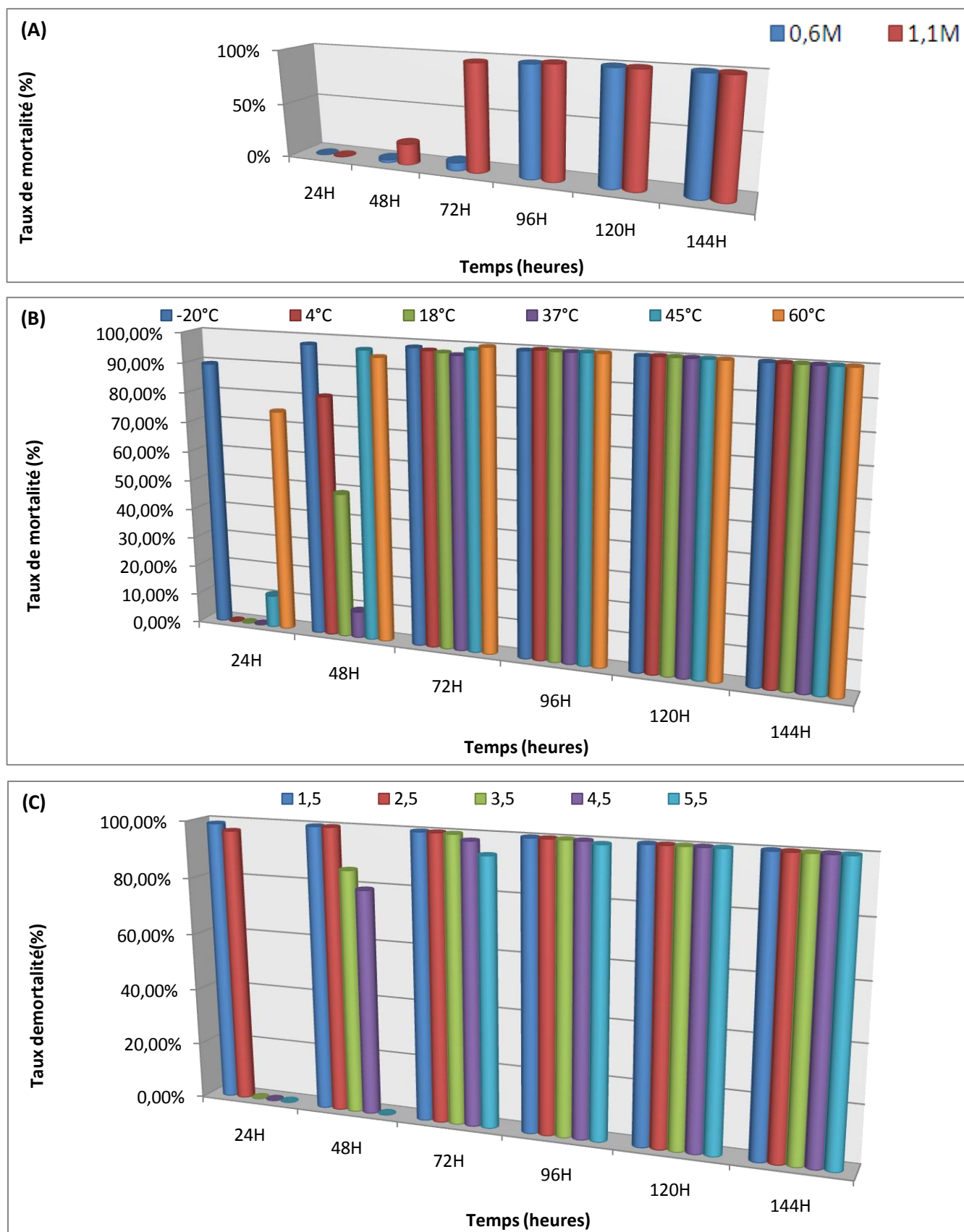


Figure 28: Effet des divers stress sur le taux de mortalité de la souche BH14

(A) :Stress hyperosmotique (essai non adapté)

(B) :Stress thermique (essai non adapté)

(C) :Stress acide (essai non adapté)

Ces valeurs sont les résultats de la moyenne de trois expériences différentes

Un choc acide consistant à réduire le pH du milieu de culture de pH=6,5 à 5,5 est sans effet sur les cellules des trois souches à 24 et 48h. Son effet ne commence à apparaître qu'à partir de 72h où le taux de mortalité augmente jusqu'à atteindre les 99,99% à la fin de l'expérience. Des pH de 4,5 et 3,5 semblent aussi sans effet à 24h, à faible effet à 48h et fortement létale à partir de 72h. En revanche, les pH de 1,5 et 2,5 donne des taux de mortalité les plus importants et à partir de 24h seulement : mortalité allant de 96,70% pour BH14 à 99,81% pour CHTD27 (**Figures 27.C, 28.C et 29.C**).

Ces résultats suggèrent que les souches peuvent résister à un stress acide de pH 3,5 à pH 5,5 et à une durée de temps bien définie et réduite.

Des tests réalisés sur *P. pentosaceus* consistant à réduire le pH du milieu de culture pH 6,5 à pH 4,0 montrent un effet très faiblement létal pour *P. pentosaceus* (5% de mortalité), lorsque le pH du milieu de culture est abaissé à pH 3,0 on observe que la mortalité augmente avec le temps d'incubation (**Baliarda, 2003**). *P. pentosaceus* présente un bon niveau de tolérance au stress acide comparativement à *Lc. lactis* spp *lactis* LL41-1, *Lb. acidophilus* CRL639 (**Lorca et Font de Valdez, 1999**) et *Ent. faecalis* spp *faecalis* ATCC19433 (**Flahaut et al., 1996**).

3.5.2. Essai adapté :

Le but de cette partie est de définir si une pré-exposition des cellules à un stress modéré, peut améliorer la réponse des cellules à un stress intense ultérieur.

On note que l'efficacité de l'adaptation est variable d'une souche à une autre et d'un stress à un autre. Cependant cette adaptation ne donne de bons résultats qu'à des temps d'incubation de 24, 48h et parfois 72h, mais à partir de 96h, le taux de mortalité des cellules reste toujours élevé (**Figures 30, 31 et 32**).

Pour mieux explorer les résultats, on doit se référer aux facteurs de tolérance étudiés par la suite.

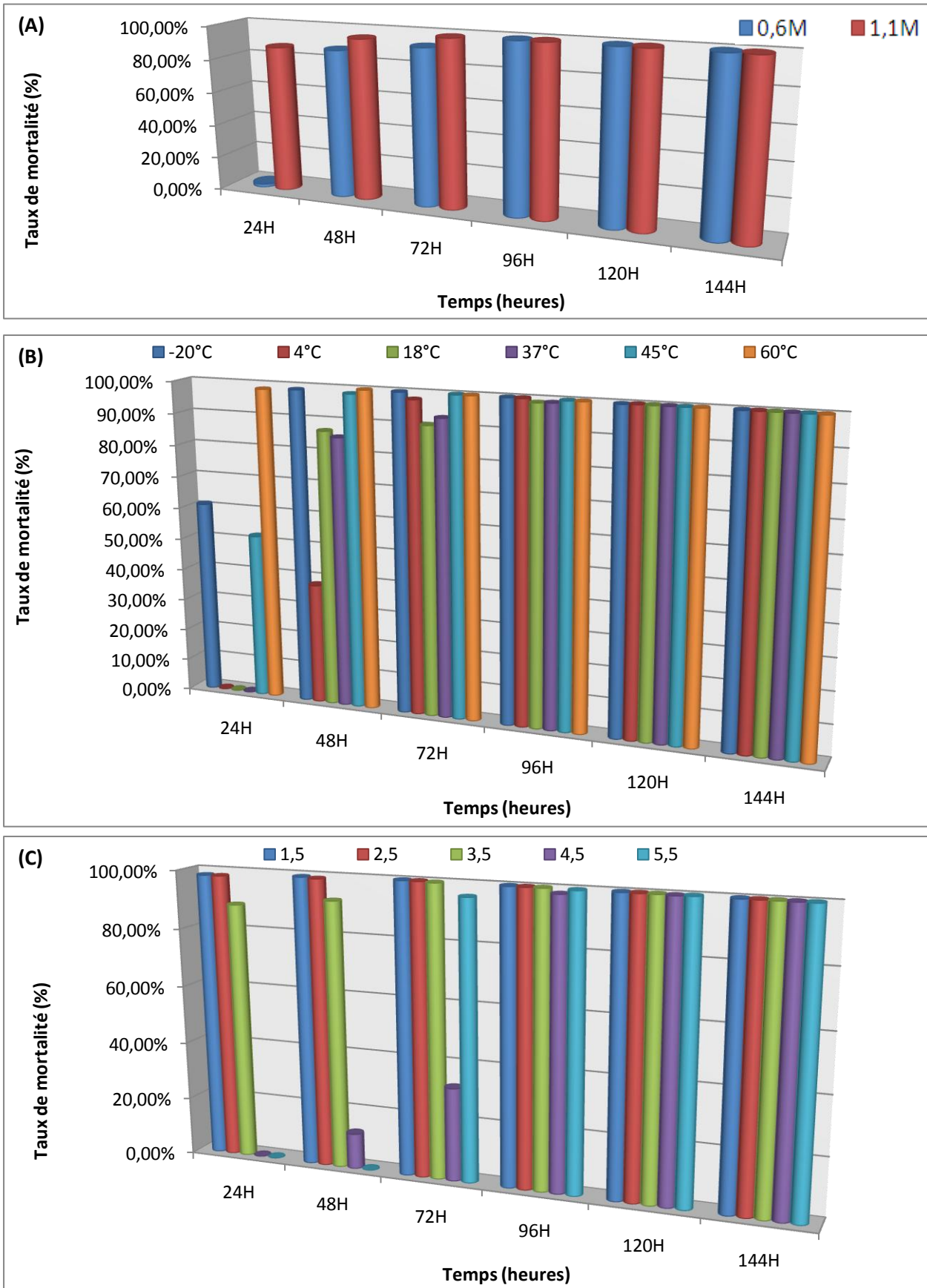


Figure 29: Effet des divers stress sur le taux de mortalité de la souche CHM18
(A) : Stress hyperosmotique (essai non adapté) (B) : Stress thermique (essai non adapté)
(C) : Stress acide (essai non adapté)
 Ces valeurs sont les résultats de la moyenne de trois expériences différentes

Une réduction ou une augmentation de la température de la culture par rapport à la température optimale de la bactérie, surtout pour les bactéries thermophiles, affecte leur stabilité pendant la congélation, la lyophilisation et le stockage. Cet effet a été démontré par **Wang et al. (2005)** pour la souche *Lb. acidophilus* RD758. Avec des fermentations conduites à trois températures différentes (30°C, 37°C et 42 °C), ces auteurs observent que les cellules cultivées à 30°C (température inférieure à leur température optimale de 37°C) ont mieux résisté à la congélation et ont maintenu une activité acidifiante élevée après 365 jours de stockage à -20°C.

Murga et al. (2000) ont également montré que les cellules de *Lb. acidophilus* CRL640, cultivées à 25°C sont plus résistantes à la congélation que les cellules cultivées à 37°C. Leur taux de survie est de 67% au lieu de 16%.

Certains auteurs observent que la résistance des cellules aux étapes de conservation dépend du pH auquel la culture est conduite. Les cellules de *Lb. reuteri* ATCC 55730, cultivées à pH 5 sont plus résistantes à la lyophilisation que les cellules cultivées à leur pH optimal (pH 6) (**Palmfeldt et Hahn-Hägerdal, 2000**). Un résultat similaire a été obtenu.

Wang et al. (2005) ont montré que les cellules de *Lb. acidophilus* RD758 cultivées à pH 5 sont plus résistantes à la congélation et au stockage sous forme congelée que les cellules cultivées à pH 6 (pH optimal) ou à pH 4,5. Ces résultats indiquent qu'une fermentation conduite à un pH trop acide, loin du pH optimal des cellules, a un effet négatif sur leur résistance. Cela s'explique par le fait qu'une diminution du pH extracellulaire empêche les cellules de maintenir leur pH intracellulaire à une valeur adéquate pour les réactions métaboliques (**Hutkins et Nannen, 1993**).

Les résultats obtenus montrent que la résistance ou la sensibilité des cellules varient d'une souche à une autre et dépendent de la nature des stress et de leur intensité.

L'adaptation des cellules semble avoir un effet mais seulement à des temps d'incubation réduits.

3. Résultats et discussion

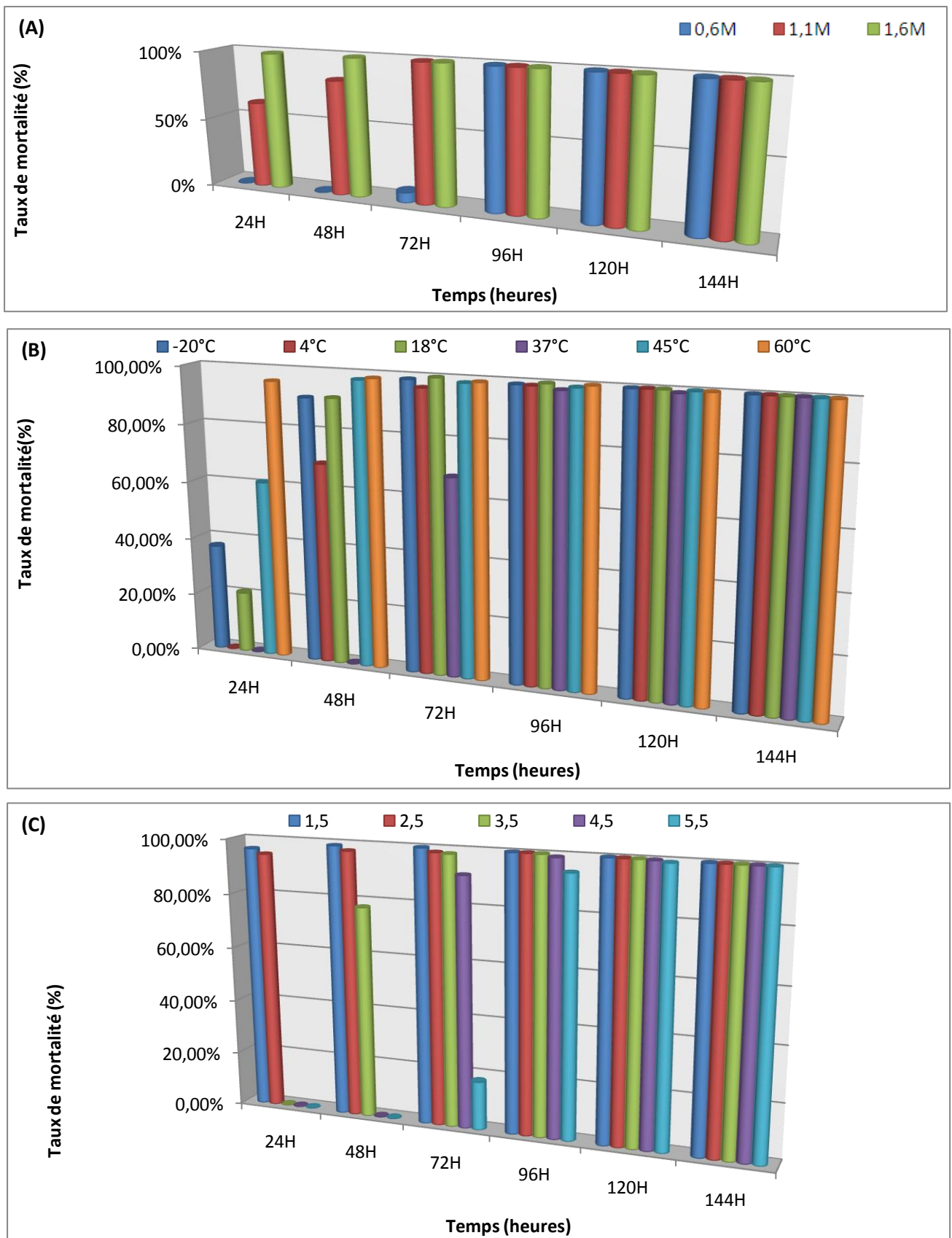


Figure 30: Effet des divers stress sur le taux de mortalité de la souche CHTD27

(A) : Stress hyperosmotique (essai adapté)

(B) : Stress thermique (essai adapté)

(C) : Stress acide (essai adapté)

Ces valeurs sont les résultats de la moyenne de trois expériences différentes

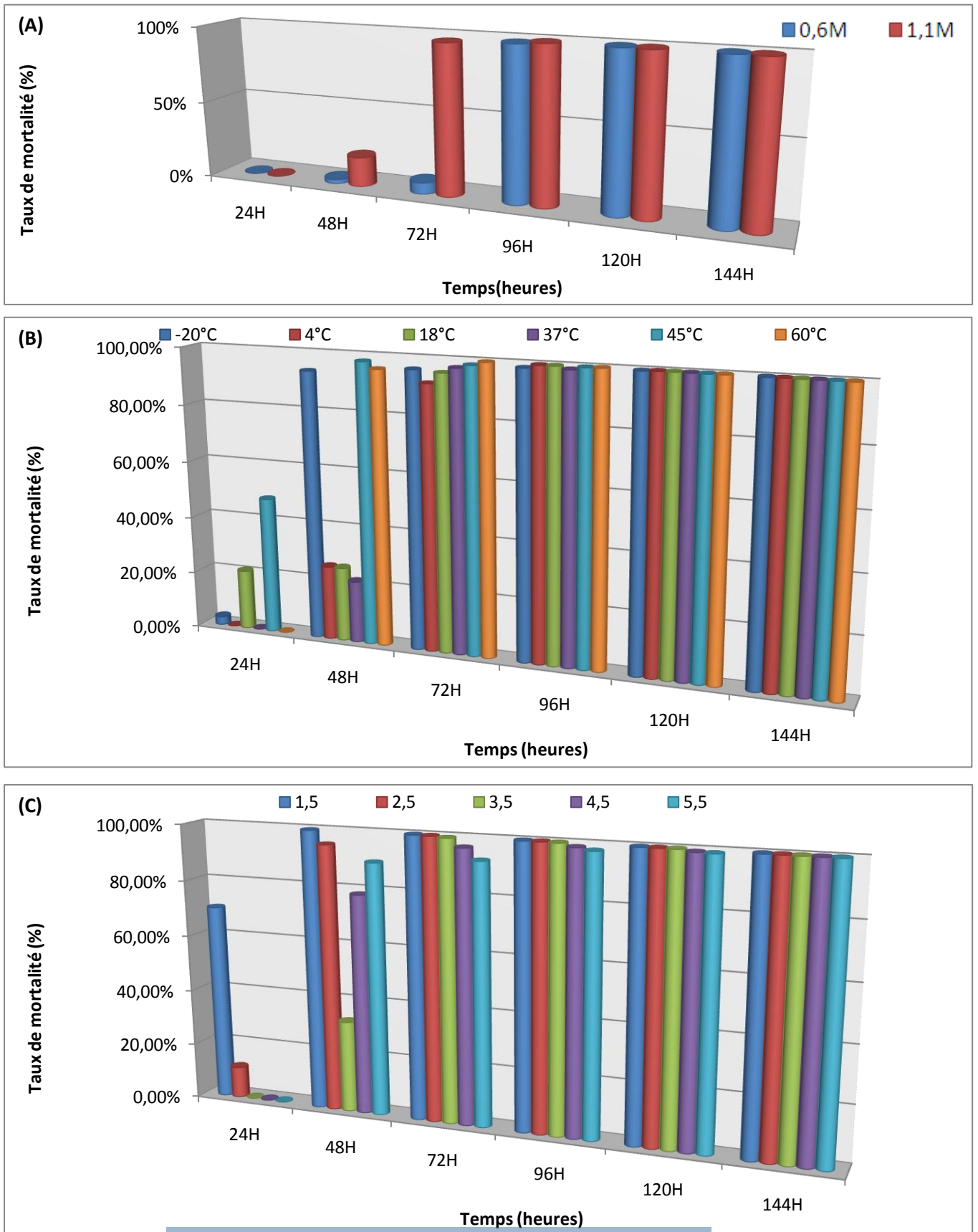


Figure 31: Effet des divers stress sur le taux de mortalité de la souche BH14

(A) : Stress hyperosmotique (essai adapté) (B) : Stress thermique (essai adapté)

(C) : Stress acide (essai adapté)

Ces valeurs sont les résultats de la moyenne de trois expériences différentes

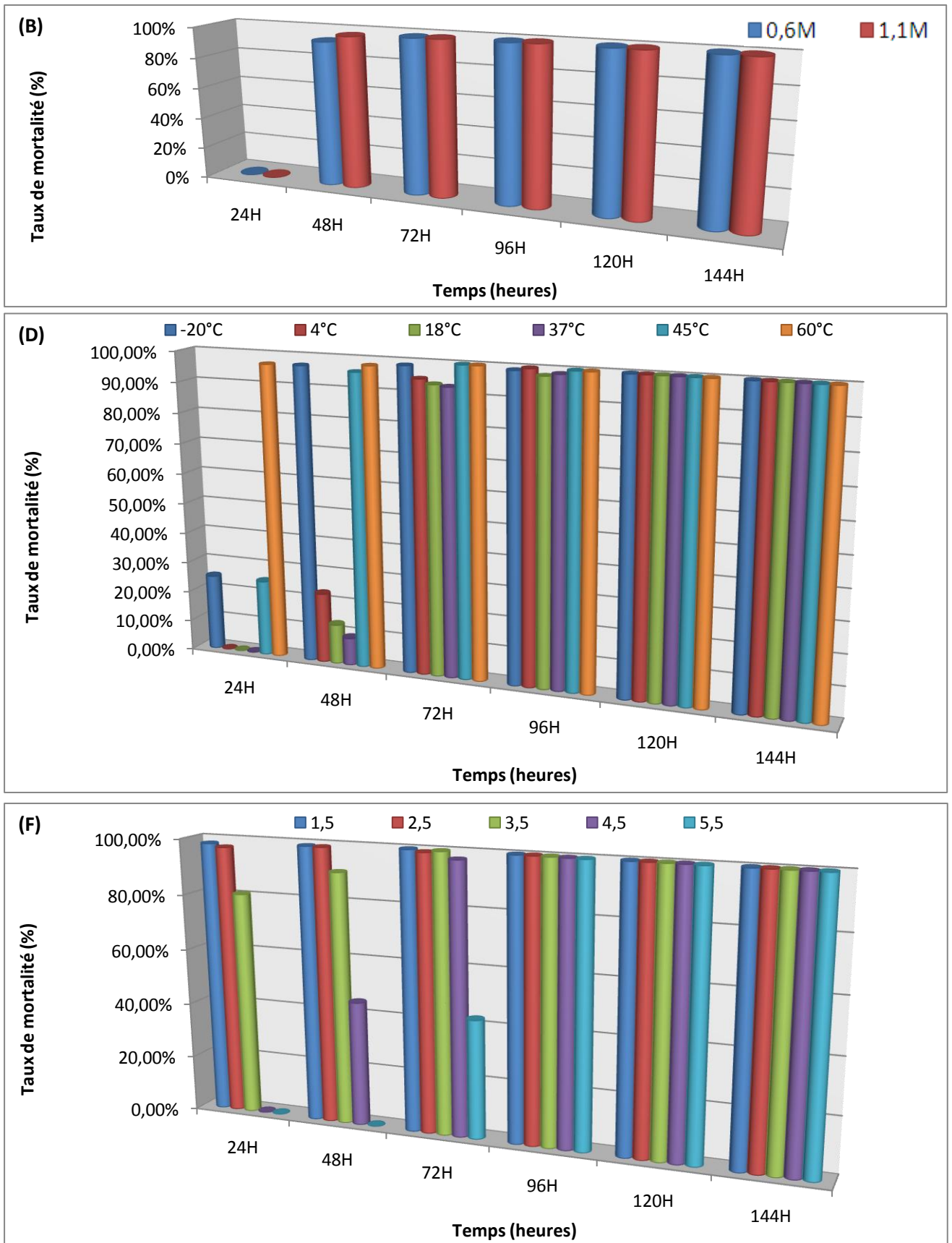


Figure 32: Effet des divers stress sur le taux de mortalité de la souche CHM18

(A) : Stress hyperosmotique (essai adapté) (B) : Stress thermique (essai adapté)

(C) : Stress acide (essai adapté)

Ces valeurs sont les résultats de la moyenne de trois expériences différentes

3.6. Facteurs de tolérance :

A partir des résultats obtenus précédemment, on calcule les facteurs de tolérance pour chaque souche et à chaque stress, le facteur de tolérance est défini comme étant le **pourcentage de survie des cellules adaptées après un stress / pourcentage de survie après stress chez les cellules non adaptées (Baliarda, 2003)**.

Les résultats obtenus sont représentés dans les **tableaux 12, 13 et 14**.

On peut dire que l'efficacité de l'adaptation est variable selon la nature de la contrainte : les facteurs de tolérance optimaux sont d'environ 473, 169 et 173 pour les stress hyperosmotique, acide et thermique respectivement pour CHTD27 ; 442, 193 et 265 pour BH14 ; 205, 28 et 13 pour CHM18.

On note aussi que l'adaptation est un phénomène transitoire : les facteurs optimaux chutent si on prolonge l'incubation des cellules. D'autre part, l'intensité du stress est aussi un paramètre important, on remarque que pour chaque intensité, il faut un temps bien précis pour que l'adaptation soit mise en évidence.

A partir de ces résultats, on peut conclure que l'adaptation effectuée sur BH14 a donné les meilleurs résultats.

Tableau 12 : Facteurs de tolérance de la souche CHTD27

		24H	48H	72H	96H	120H	144H
CONTRAINTE SALINE	0,6 M	4.04	17.24	1.25	5.37	ND	ND
	1,1 M	2.22	42.4	1440	ND	ND	ND
	1,6 M	3.5	473.21	ND	ND	ND	ND
CONTRAINTE THERMIQUE	-20°C	9.69	2.64	2.3	47.16	ND	ND
	4°C	1.31	0.62	92.3	ND	ND	ND
	18°C	1.14	1.03	16.76	2.28	ND	ND
	37°C	1.15	169.44	58.81	42.2	ND	ND
	45°C	10	52.80	ND	ND	ND	ND
	60°C	1.07	131.7	ND	ND	ND	ND
CONTRAINTE ACIDE	1.5	31.7	10.06	ND	ND	ND	ND
	2.5	30.05	5.72	ND	ND	ND	ND
	3.5	1.1	1.17	68.13	ND	ND	ND
	4.5	2.78	8.69	6.91	11.95	ND	ND
	5.5	0.14	1.79	15.43	173.68	ND	ND

ND : non déterminé

Tableau 13 : Facteurs de tolérance de la souche BH14

		24H	48H	72H	96H	120H	144H
CONTRAINTE SALINE	0,6 M	33.02	7.45	1	1.88	ND	ND
	1,1 M	5.87	21.02	442.3	ND	ND	ND
CONTRAINTE THERMIQUE	-20°C	9.15	2.68	2.26	1.56	0.73	ND
	4°C	2.73	3.89	2.54	ND	ND	ND
	18°C	0.92	1.45	1.76	1.67	ND	ND
	37°C	15.26	193.78	154.67	31.31	ND	ND
	45°C	0.58	5.72	19.54	ND	ND	ND
	60°C	2.39	1.57	ND	ND	ND	ND
CONTRAINTE ACIDE	1.5	155.33	51.64	ND	ND	ND	ND
	2.5	25.67	265.7	ND	ND	ND	ND
	3.5	4.78	4.67	6.16	ND	ND	ND
	4.5	62.5	10.53	0.73	1.07	ND	ND
	5.5	16.06	56.81	11.36	14.76	ND	ND

ND : non déterminé

Tableau 14 : Facteurs de tolérance de la souche CHM18

		24H	48H	72H	96H	120H	144H
CONTRAINTE SALINE	0,6 M	5.53	3.12	4.59	7.61	ND	ND
	1,1 M	24.8	72.38	205.71	ND	ND	ND
CONTRAINTE THERMIQUE	-20°C	1.92	4.68	1.27	ND	ND	ND
	4°C	2.03	1.24	1.81	ND	ND	ND
	18°C	3.48	6.59	0.67	1	ND	ND
	37°C	6.74	6.1	8.97	4.4	ND	ND
	45°C	1.56	13.07	ND	ND	ND	ND
	60°C	6.8	28.73	ND	ND	ND	ND
CONTRAINTE ACIDE	1.5	1.07	1.24	ND	ND	ND	ND
	2.5	1.63	3.33	ND	ND	ND	ND
	3.5	1.74	1.14	2.84	ND	ND	ND
	4.5	0.54	1.10	3.79	1.29	ND	ND
	5.5	1.72	2.7	13.8	1.15	ND	ND

ND : non déterminé

Les capacités des trois souches de lactobacilles CHTD27, BH14 et CHM18 à se développer en situation de contrainte osmotique, thermique et acide ont été étudiées en milieu MRS, par suivi d'absorbance. Toutefois, le MRS contient des sources en osmoprotectants (extrait de levure, extrait de viande, peptones) notamment la GB et la carnitine pouvant minimiser l'impact des stress salin, thermique et acide sur les capacités de croissance des cellules bactériennes.

Il serait donc intéressant de suivre la croissance des souches en milieu chimiquement défini (DM) et ceci en absence de composés connus pour leur activité osmoprotectrice. Des études ont montré que *T. halophila*, seule bactérie lactique modérément halophile (optimum de croissance entre 0,4 M et 0,8 M NaCl) est capable de croître en présence de fortes concentrations salines, jusqu'à 3,2 M NaCl en milieu MRS. Cette bactérie est également capable de se développer en milieu dans le milieu DM, *T. halophila* montre également une bonne tolérance au sel. La croissance est obtenue jusqu'à 1,4 M NaCl (**Robert *et al.*, 2000**).

L'adaptation des cellules donne des résultats variables d'une contrainte à une autre, elle est aussi transitoire. Ces observations rejoignent celles observés chez *P. pentosaceus* (Baliarda, 2003).

3.7. Croissance des souches en conditions de stress et en présence**d'osmoprotecteurs :****3.7. 1. Détermination de la concentration optimale de l'osmoprotecteur :**

Les **tableaux 15, 16 et 17** résument les résultats concernant les concentrations optimales de croissance pour chaque osmoprotecteur et pour chaque souche obtenue après 72 heures d'incubation.

Tableau 15 : Concentrations optimales de proline et GB du stress osmotique

	CHTD27		BH14		CHM18	
	Proline	Glycine-bétaine	Proline	Glycine-bétaine	Proline	Glycine-bétaine
0,6 M	/	10 mM	/	10 mM	90 mM	10 mM
1,1 M	/	10 mM	/	10 mM	90 mM	10 mM
1,6 M	/	10 mM	/	10 mM	90 mM	10 mM
1,8 M	/	10 mM	/	/	/	/

Tableau 16: Concentrations optimales de proline et GB du stress thermique

	CHTD27		BH14		CHM18	
	Proline	Glycine-bétaine	Proline	Glycine-bétaine	Proline	Glycine-bétaine
-20°C	10 mM	30 mM	10 mM	30 mM	10 mM	60 mM
4°C	30 mM	30 mM	10 mM	60 mM	90 mM	90 Mm
18°C	10 mM	90 mM	10 mM	60 mM	10 mM	30 Mm
37°C	10 mM	30 mM	60 mM	90 mM	60 mM	90 mM
45°C	10 mM	30mm	30 mM	60 mM	30 Mm	30 mM
60°C	10 mM	60 mM	10 mM	30 mM	60 mM	90 mM

Tableau 17: Concentrations optimales de proline et GB du stress acide

	CHTD27		BH14		CHM18	
	Proline	Glycine-bétaine	Proline	Glycine-bétaine	Proline	Glycine-bétaine
1,5	30 mM	30 mM	30 mM	30 mM	30 mM	30 mM
2,5	30 mM	30 mM	30 mM	30 mM	30 mM	30 mM
3,5	30 mM	30 mM	30 mM	30 mM	30 mM	30 mM
4,5	90 mM	90 mM	90 mM	90 mM	90 mM	90 mM
5,5	90 mM	90 mM	90 mM	90 mM	90 mM	90 mM

D'après ces résultats on peut faire les observations suivantes :

- La proline n'a aucun effet protecteur sur les souches CHTD27 et BH14 face à un stress hyperosmotique ;
- La concentration optimale de GB pour lever l'inhibition causée par le stress hyperosmotique est de 10 mM pour toutes les concentrations en NaCl et pour chaque souche ;
- Les concentrations optimales de proline et de GB pour lever l'inhibition du stress thermique sont différents d'une souche à une autre et d'une concentration à une autre ;
- Pour le stress acide, la concentration optimale utilisée de pH=1,5 à 3,5 est de 30mM pour les trois souches et les deux osmoprotecteurs, et de 90 mM pour les pH de 4,5 et 5,5.

Robert et al. (2000) ont montré qu'un spectre d'osmoprotectants comporte les ammoniums quaternaires suivants : la GB, la carnitine, la choline, ainsi que l'ectoïne. Ces molécules améliorent la croissance pour des stress d'intensité moyenne et permettent une croissance à forte salinité d'autre part.

Chez les bactéries lactiques pour lesquelles un inventaire des osmoprotectants a été effectué (*P. pentosaceus*, *T. halophila*, *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *Ent. faecalis*), on note la prépondérance de l'accumulation de GB, de carnitine, de choline et de proline en situation de contrainte hyper-osmotique. L'état des recherches actuelles laisse supposer que chaque membre du groupe des bactéries lactiques possède son propre spectre de solutés compatibles préférentiels (**Zambou et al., 2008**).

L'ectoïne, par exemple, semble spécifique du genre *Tetragenococcus*, ce qui est probablement à relier au caractère halophile de ce groupe. La choline, quant à elle, n'est pas osmoprotectrice chez *Lc. lactis* tandis qu'elle l'est chez *P. pentosaceus*, *T. halophila*, *Lb. plantarum* et *Ent. faecalis*. La proline intervient dans l'osmoadaptation de *P. pentosaceus* et *Lb. plantarum* mais son rôle est controversé chez *Lc. lactis*. Son taux important dans le vin laisse suggérer un rôle dans l'osmotolérance d'*O. oeni* (**Molenaar et al., 1993**).

Ces différences en matière de spectre de solutés compatibles accumulés sont probablement basées sur des différences d'équipement en transporteurs en termes de structure, de nombre ou encore d'affinité. Les voies d'accumulation de GB, l'osmoprotectant le plus efficace, ont été étudiées plus spécifiquement (**Angelidis et Smith, 2003**).

En plus de leur rôle dans l'osmoprotection, les osmoprotecteurs ont aussi un rôle dans la cryoprotection. La GB et la carnithine sont les deux accumulés à des fortes concentrations chez *L. monocytogenes* mise en condition de stress froid même en absence de contrainte osmotique (**Smith, 2001 ; O'Byrne et Booth, 2002**). En général, les molécules qui ont un meilleur rôle en osmoprotection, jouent aussi un rôle dans la cryoprotection (**Bayels et Wilkinson, 2000**). Plusieurs théories tendent à expliquer le rôle cryoprotecteur de la GB ; une des théories se base sur l'effet stabilisateur de ce soluté compatible sur la conformation des protéines (**Angelidis et Smith, 2003**). **Smith (2001)** a proposé que le stress thermique déstabilise la structure quaternaire des protéines et que cela puisse être amélioré par la présence de solutés compatibles.

On peut donc conclure que la concentration optimale d'osmoprotecteurs varie d'un osmoprotecteur à un autre, et d'une concentration à une autre pour un même osmoprotecteur, selon la souche.

3.7. 2. Croissance en conditions stressantes et de la concentration optimale d'osmoprotecteurs :

Des tubes contenant du milieu MRS et la concentration optimale de proline ou de GB sontensemencés par des cellules en phase exponentielle d'une façon à obtenir une $DO_{600nm} = 0,6$ et placées en conditions de stress décrites précédemment et la DO_{600nm} est prélevée à des temps différents. Les résultats sont représentés dans les **figures 33, 34, 35, 36, 37 et 38**.

Lors d'un **choc hyperosmotique**, on note que les souches présentent une meilleure croissance en présence de GB qu'en présence de proline (**Figures 33 et 34**) ; on remarque aussi que la croissance en présence d'osmoprotecteurs donne des résultats similaires à ceux obtenus lors de l'adaptation des cellules. D'autre part, l'effet osmoprotecteur de la proline et la GB est transitoire et on note que la croissance diminue après des temps d'incubation importants.

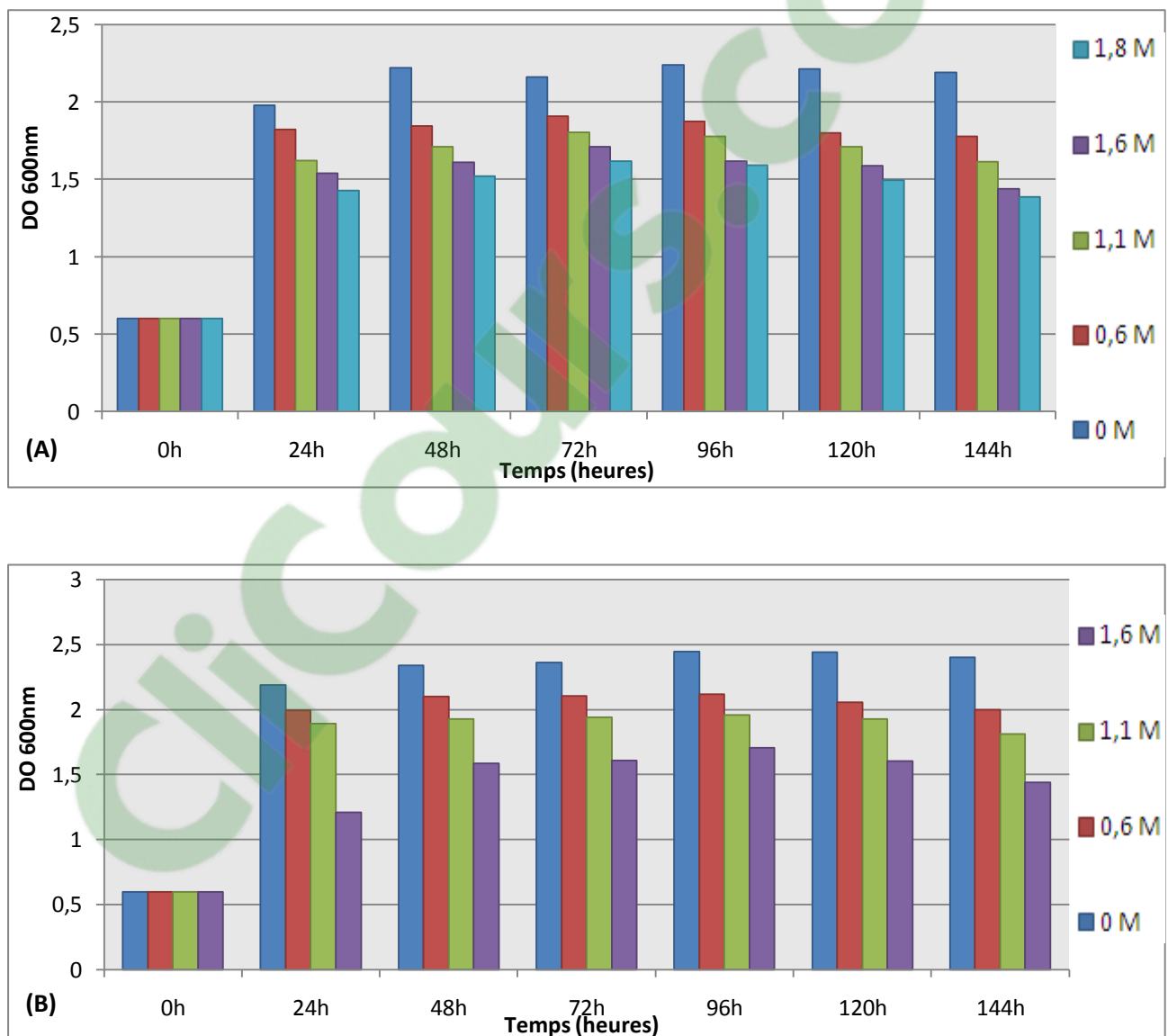


Figure 33: Effet de la GB sur la croissance des cellules pendant le stress osmotique
(A) : Effet sur la CHTD27 **(B) : Effet sur la BH14**

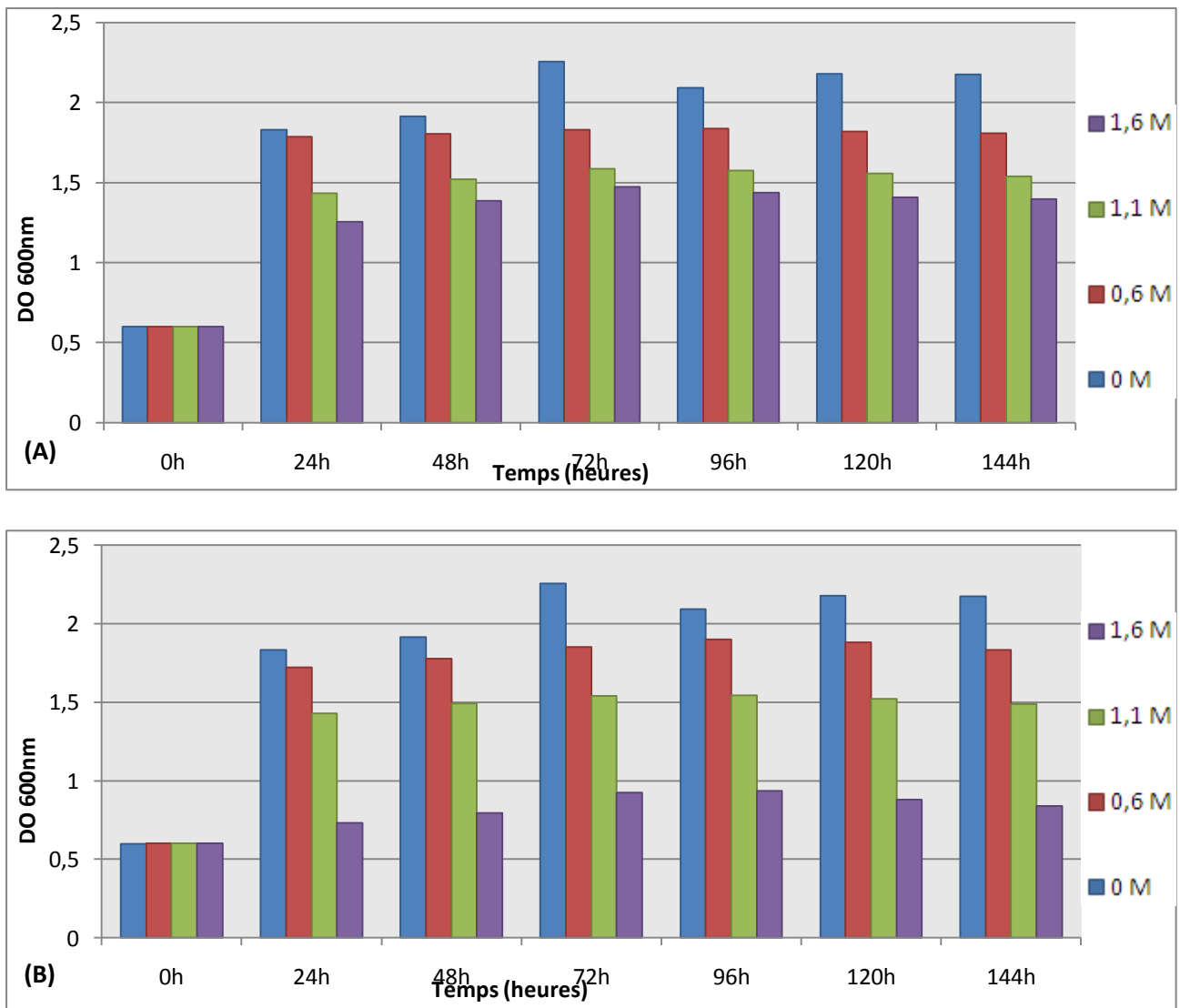


Figure 34: Effet de la proline et la GB sur la croissance des cellules CHM18 pendant le stress osmotique

(A) : Effet de la proline

(B) : Effet de la GB

Durant le **stress thermique**, et aux températures extrêmes (-20°C et 60°C), l'osmoprotection a un effet négligeable voire nulle pour les trois souches. Aux températures 4°C , 18°C , 37°C et 45°C , l'effet osmoprotecteur est présent et notable avec des variations d'une souche à une autre : la souche CHTD27 semble être la mieux protégée (à 37°C et 18°C , les DO obtenues sont supérieures au témoin), alors que CHM18 donne des DO qui ne dépassent pas les 1,6. Cela est valable pour la proline et la GB (**Figure 35 et 36**).

3. Résultats et discussion

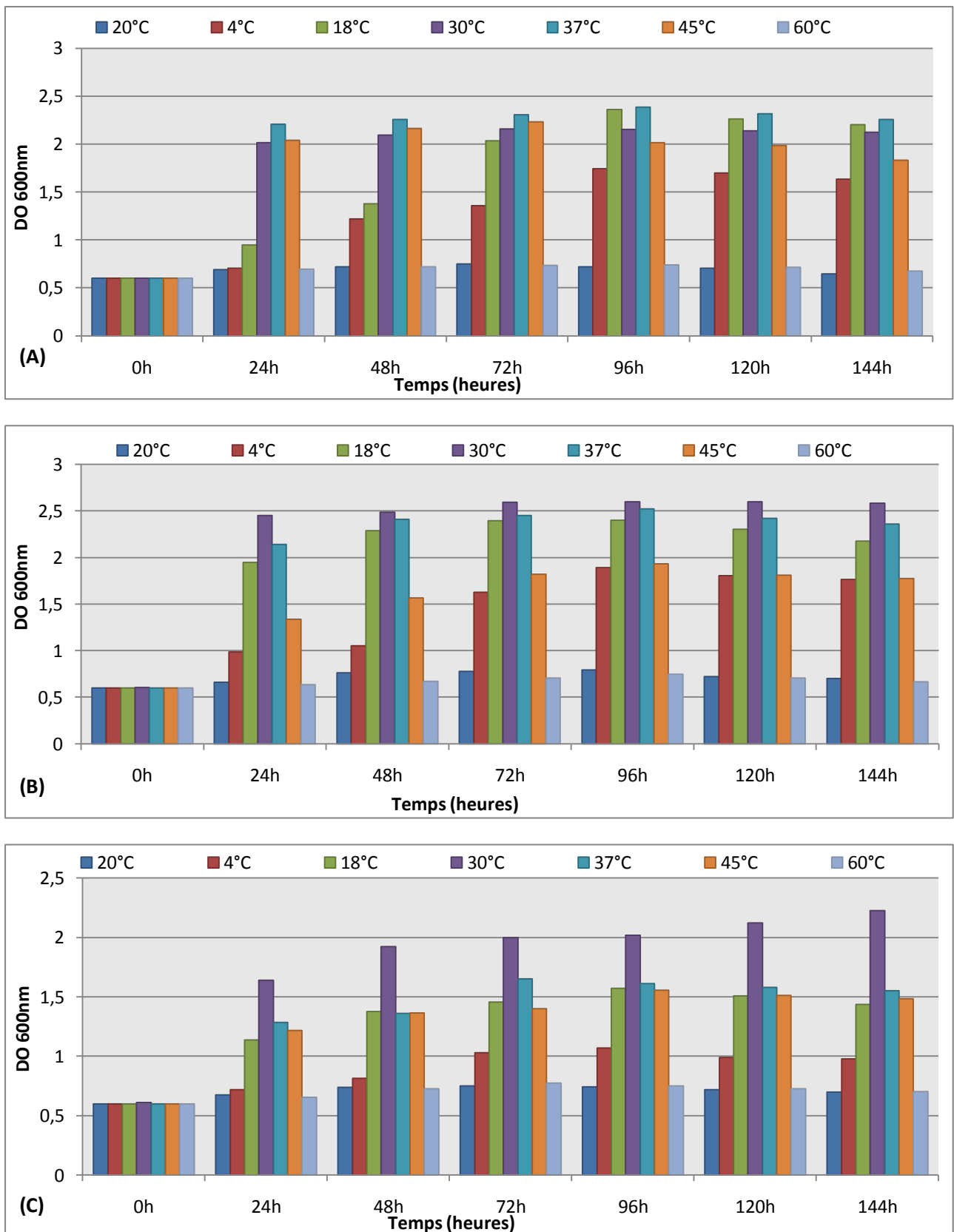
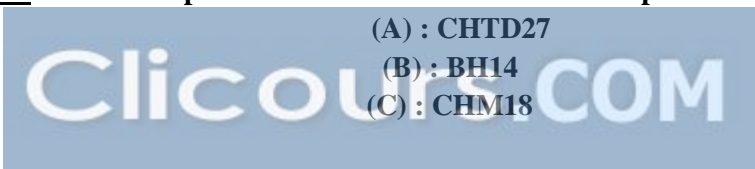


Figure 35: Effet de la proline sur la croissance des cellules pendant le stress thermique

(A) : CHTD27

(B) : BH14

(C) : CHM18



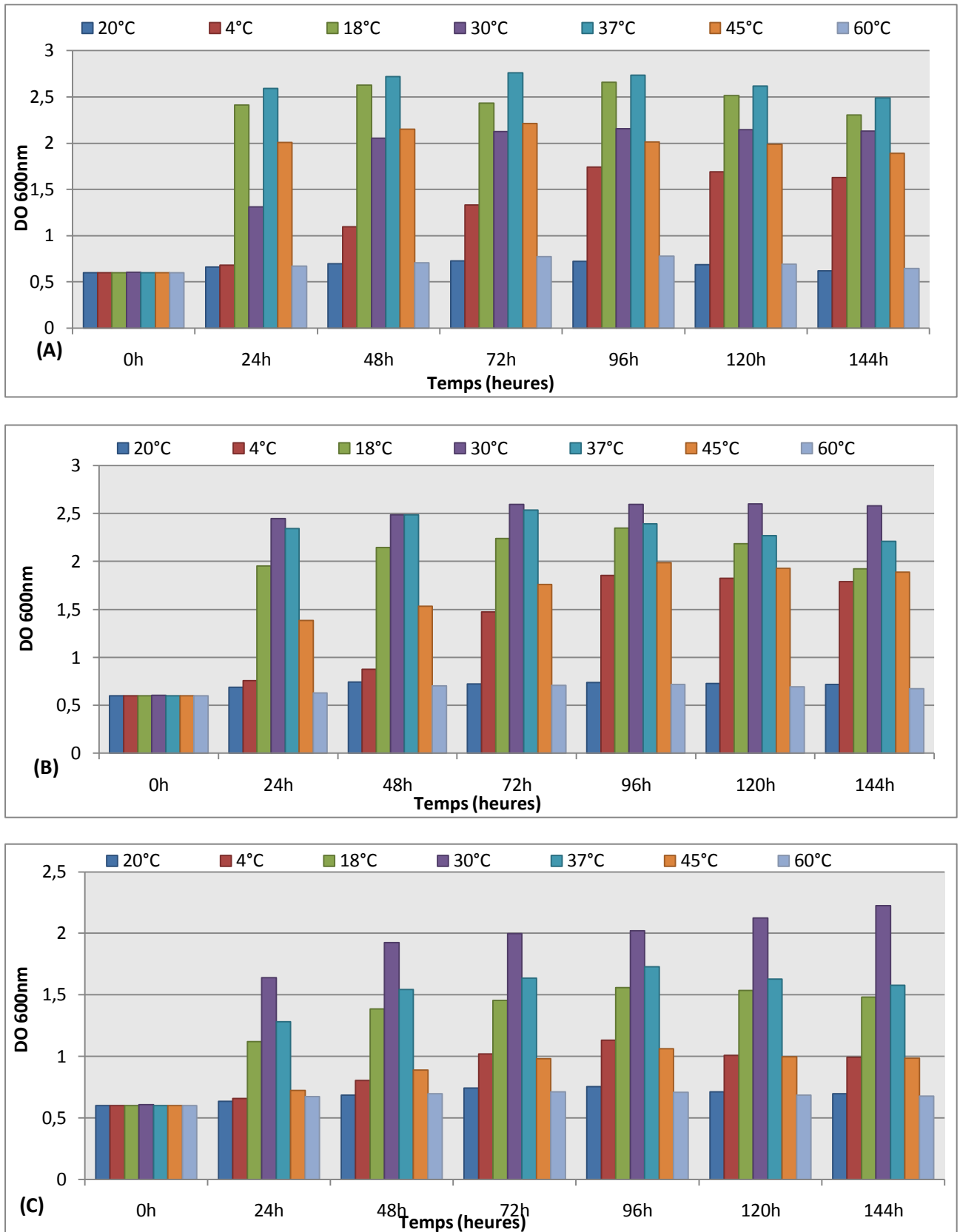


Figure 36: Effet de la GB sur la croissance des cellules pendant le stress thermique

(A) : CHTD27

(B) : BH14

(C) : CHM18

Pendant **un stress acide** et à des pH trop bas (1,5 et 2,5), la proline et la GB semblent être sans aucun effet, ou à faible effet. L'effet osmoprotecteur commence à apparaître à partir de pH=3,5 avec des variations d'une souche à une autre dans l'efficacité de la protection. Aux pH=4,5 et 5,5, la proline et la GB donnent les meilleurs résultats, on distingue bien leurs effets, cet effet donne des DO supérieures à ceux obtenues par le témoin de la souche CHTD27 (**Figures 37 et 38**).

Les données actuelles sur la réponse des bactéries lactiques aux stress concernent essentiellement les deux modèles *Lc. lactis* et *Lb. plantarum*. A la différence des Entérobactéries et des bactéries à Gram positif comme *B. subtilis*, les bactéries lactiques ne possèdent pas de voies de biosynthèse de solutés compatibles : leur accumulation en réponse à un choc hyper-osmotique est exclusivement due au transport (**Robert, 2000; Romeo et al., 2001**). La capacité de réponse au stress hyper-osmotique des bactéries lactiques dépendra donc à la fois de paramètres extrinsèques (nature du pool de solutés compatibles présents dans le milieu, niveau de stress imposé) et de paramètres intrinsèques (nombre de systèmes de transport, spectre et modalité de régulation) (**Guzzo et al., 1997**).

Les résultats de l'étude physiologique et de l'osmoprotection indiquent que nos souches sont des bactéries d'intérêt en agro-alimentaire et sur lesquelles peu de données sont disponibles concernant la réponse aux différents stress, l'osmorégulation et les différents transporteurs de GB en particulier vu que ce soluté compatible s'avère le plus efficace.

En effet, les critères de performance recherchés au niveau industriel, indépendamment de la propriété fonctionnelle envisagée, sont la résistance aux bactériophages, aux traitements mécaniques, à la chaleur, à la congélation, aux fortes concentrations en NaCl (notamment dans la production des salaisons et des fromages), à l'acidité (vu que les BL produisent de l'acide lactique), ou à la lyophilisation et au stockage (**Béal et al., 2008**).

Durant cette étude, trois paramètres sont testés sur trois souches, et les résultats obtenus indiquent que la souche qui peut être choisie dans un contexte d'utilisation industrielle est la souche BH14. Une des applications possibles de ce travail consisterait à favoriser l'implantation de BH14 en milieu hostile afin d'optimiser les procédés de fermentation alimentaire ou biotechnologique.

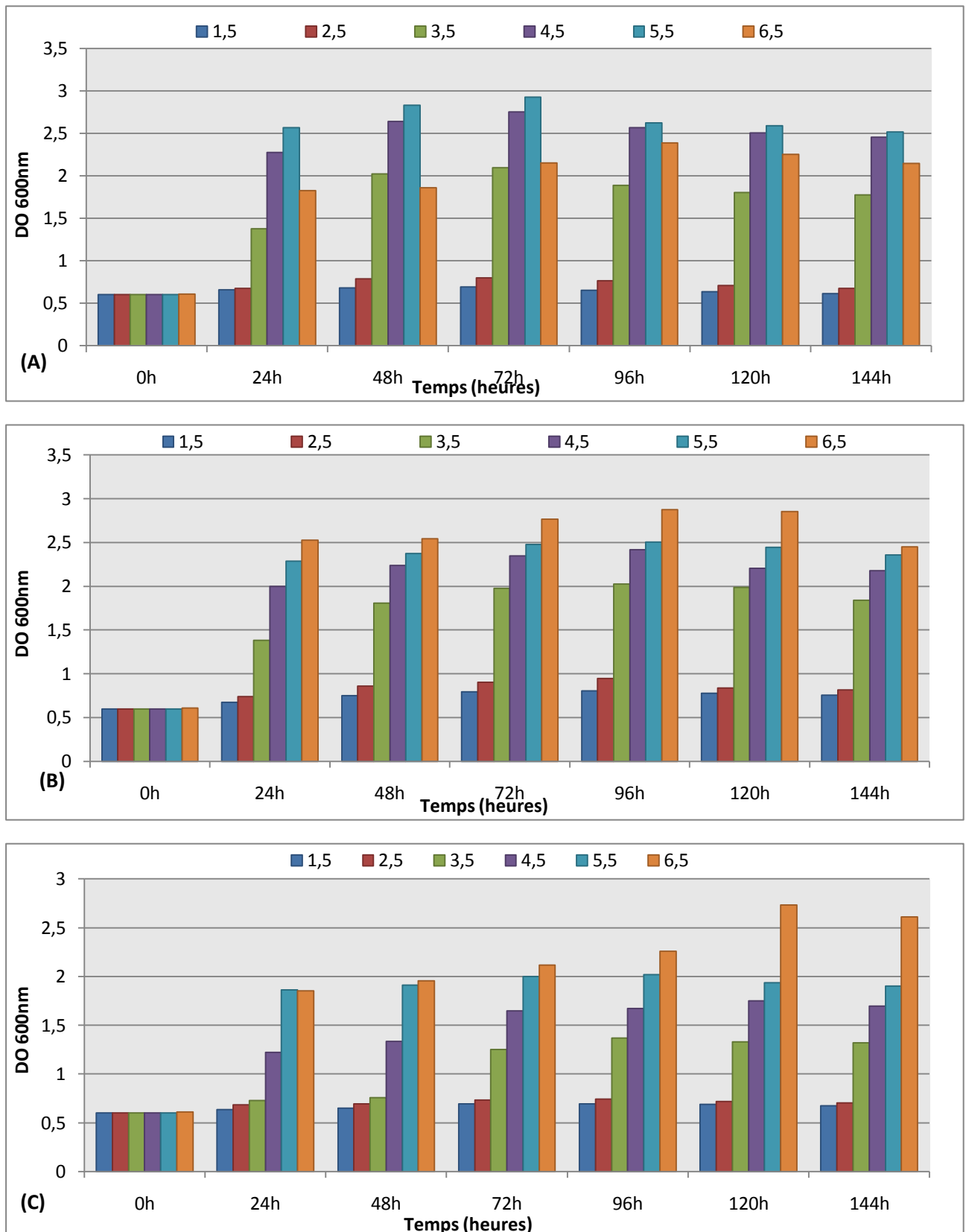


Figure 37: Effet de la proline sur la croissance des cellules pendant le stress acide

(A) : CHTD27

(B) : BH14

(C) : CHM18

3. Résultats et discussion

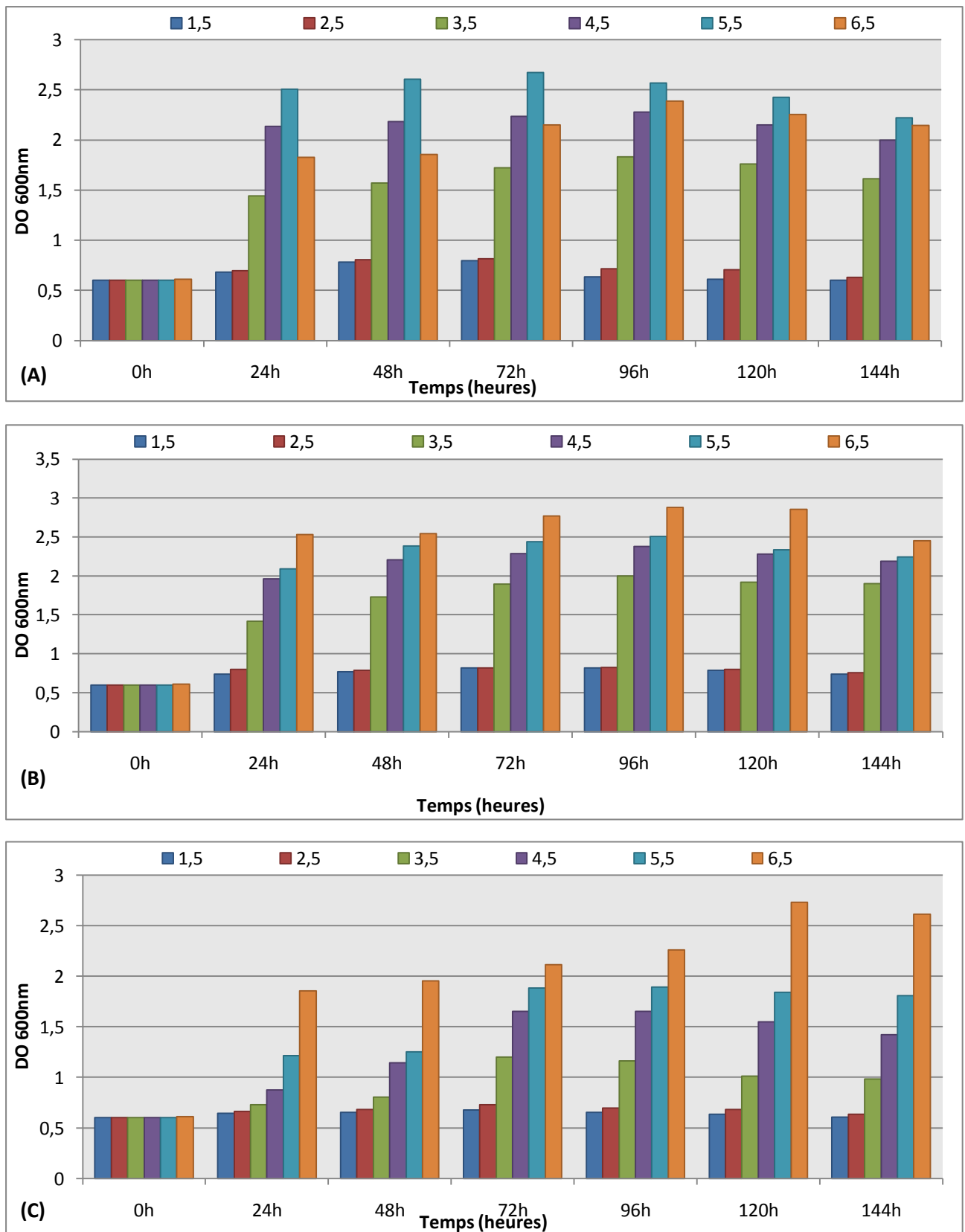


Figure 38: Effet de la GB sur la croissance des cellules pendant le stress acide

(A) : CHTD27

(B) : BH14

(C) : CHM18

Pour cela la suite de notre étude va porter sur une analyse des protéines synthétisée lors des stress osmotique, thermique et acide, puis une initiation à l'étude d'un caractère intérêt industriel majeur et qui est la capacité à acidifier le milieu.

On peut donc dire que l'osmoprotecteur le plus efficace, pour nos souches, pour lever l'inhibition et protéger contre les différents stress est la GB. On conclue aussi que l'utilisation d'osmoprotecteur donne des résultats meilleurs que ceux obtenus par l'adaptation préalable des cellules.

3. 8. Analyse des protéines par SDS-PAGE :

A partir de cette étape, on a choisi la souche BH14 pour effectuer les tests qui vont suivre, le choix de cette souche repose sur le fait qu'elle a donné les meilleurs résultats en matière de DO, vitesse de croissance, nombre de cellules viables et les facteurs de tolérance.

Le **tableau 18** montre les résultats du dosage des protéines après 50 cycles de lyse thermique et à différents temps d'incubation. On remarque que la quantité de protéines synthétisées diffère avec le temps, cette quantité passe par un pic puis elle chute par la suite, ce pic change d'un stress à un autre, et dans un même stress, d'une intensité à une autre, ces pics sont représentés dans le tableau en rouge.

La présence de pics peut être expliquée par le fait que la synthèse des protéines de stress est induite par le temps d'exposition au stress et aussi par l'intensité de ce dernier.

Tableau18: Quantité de protéines produites par les cellules de BH14 exposées aux stress osmotique et acide après 50 cycles de lyse thermique

		24 H	48H	72H	96H	120H	144H	
Témoin	DO	0.183	0.146	0.549	0.936	0.400	0.195	
	Quantité de protéines (µg/µl)	0.366	0.292	1.098	1.872	0.800	0.390	
Contrainte osmotique	0,6M	DO	0.169	0.190	0.625	0.258	0.274	0.194
		Quantité de protéines (µg/µl)	0.338	0.382	1.250	0.516	0.548	0.388
	1,1M	DO	0.151	0.212	0.567	0.370	0.214	0.331
		Quantité de protéines (µg/µl)	0.302	0.424	1.134	0.740	0.428	0.662
Contrainte acide	1.5	DO	0.187	0.105	0.190	0.162	0.199	0.141
		Quantité de protéines (µg/µl)	0.374	0.210	0.380	0.324	0.398	0.282
	2.5	DO	0.176	0.167	0.149	0.290	0.197	0.131
		Quantité de protéines (µg/µl)	0.352	0.334	0.298	0.580	0.394	0.626
	3.5	DO	0.155	0.104	0.195	0.163	0.279	0.283
		Quantité de protéines (µg/µl)	0.310	0.208	0.390	0.326	0.588	0.566
	4.5	DO	0.163	0.133	0.193	0.187	0.125	0.304
		Quantité de protéines (µg/µl)	0.326	0.266	0.384	0.374	0.304	0.608
	5.5	DO	0.121	0.134	0.719	0.480	0.305	0.395
		Quantité de protéines (µg/µl)	0.242	0.268	1.438	0.960	0.610	0.790

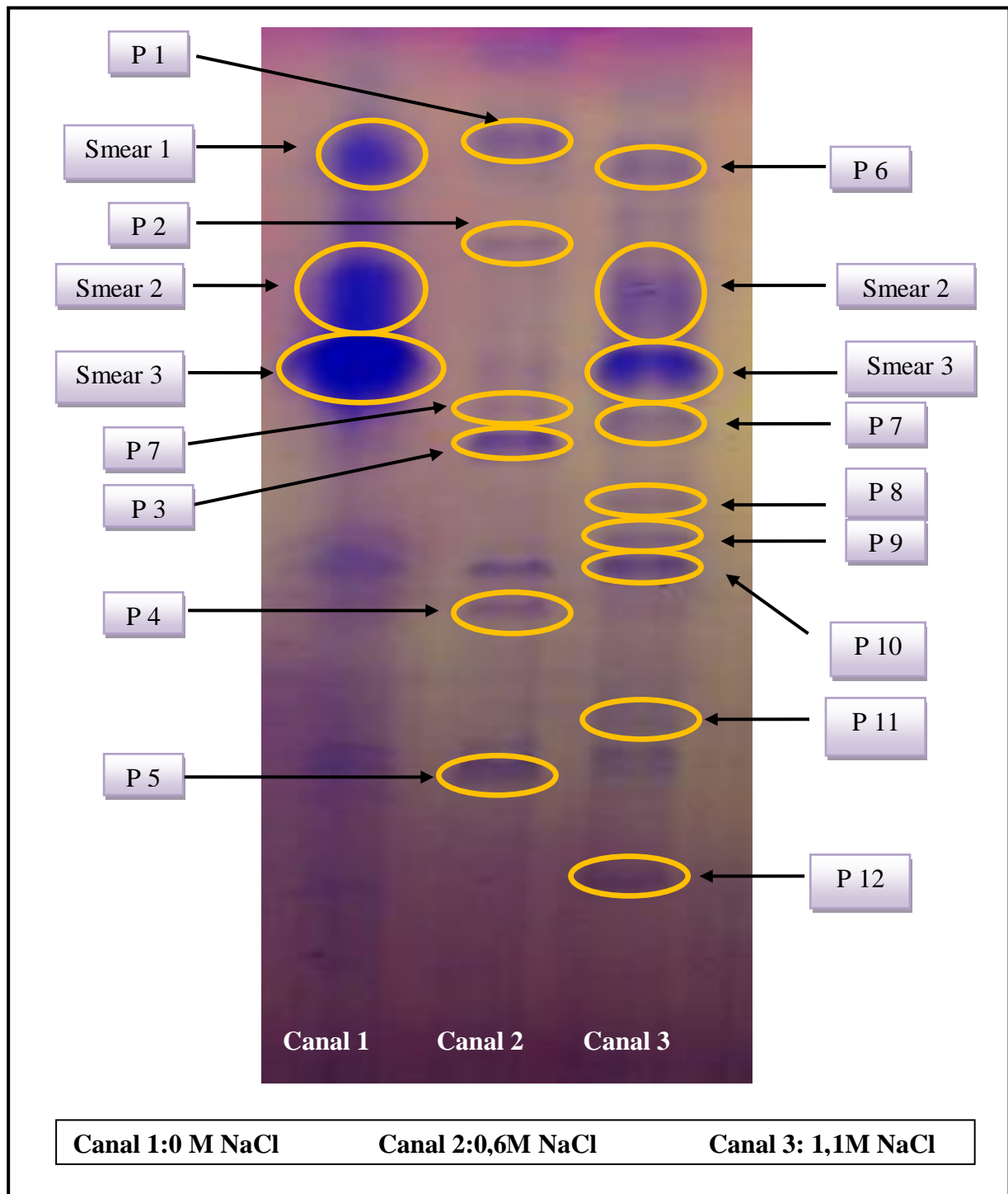


Figure 39 : Analyse des protéines totales synthétisées lors du stress osmotique de la souche BH14 par électrophorèse SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide 11%.

La comparaison des profils protéiques chez BH14 sous différentes contraintes (**figure 39**) nous permet de constater l'apparition des protéines P1, P2, P3, P4 et P5 en présence de 0,6M de NaCl. Ces protéines disparaissent à 1,1M de NaCl.

A 1,1M de NaCl, on remarque l'apparition de nouvelles protéines, il s'agit des P6, P8, P9, P11 et P12. On note aussi que l'intensité des bandes correspondantes aux protéines P7 et P10 augmente par rapport à 0M et 1,1M de NaCl. D'autre part, l'intensité des smears 2 et 3 diminue. Ces smears correspondent à des protéines non séparées.

L'utilisation de l'électrophorèse SDS-PAGE a permis de détecter des différences dans les profils protéiques de la souche BH14 cultivées en absence et en présence de sel, ce qui confirme que le sel induit des modifications qualitatives et quantitatives dans la synthèse des protéines. Ces protéines peuvent correspondre à des protéines dont la synthèse serait induite par de fortes concentrations en NaCl.

L'analyse de la production des protéines après un choc osmotique chez *Lc. lactis* montre une diminution de synthèse globale de protéines d'environ 50% lorsque les bactéries sont cultivées dans un milieu à 1,1M de NaCl (Kilstrup *et al.*, 1997). Cependant, la synthèse d'au moins 12 protéines est augmentés dans de telles conditions ; parmi celles-ci se trouvent des protéines impliquées dans la réponse à d'autres stress, comme les protéines DnaK, GroEL et GroES impliquées dans la réponse au stress thermique. Les autres protéines n'ont pour la plupart pas été caractérisées (Romeo *et al.*, 2001).

Elmnasser *et al.* (2006) ont montré que des protéines synthétisées lors d'un stress osmotique correspondaient à des protéines de choc thermique (Heat Shock Protein), autrement dit, lors d'un choc thermique, les bactéries adaptées à ce genre d'agression développent aussi une tolérance au stress osmotique, ce qui est défini comme étant une réponse croisée. Ce type de mécanisme est largement retrouvé chez des espèces de lactobacilles.

Ces protéines peuvent être aussi synthétisées et utilisées pour modification de la composition de la membrane plasmique qui à tendance à changer de fluidité en modifiant la fraction des acides gras lors d'un choc osmotique (Guillot *et al.*, 2000).

Afin de relier la présence des protéines dans des conditions de stress à un mécanisme de résistance, il sera intéressant d'approfondir l'étude en utilisant une technique de lyse plus efficace (la sonication).

3. 9. Mesure de l'acidité et la production d'acide lactique :

L'activité acidifiante des souches a été déterminée en mesurant la quantité d'acide lactique produite et le pH du milieu.

Lors d'un **stress hyperosmotique**, on remarque que le pH du milieu décroît en fonction du temps, on note aussi que le pH est inférieur en présence de 0,6M de NaCl par rapport à 1,1M de NaCl et même au témoin (**Figure 40.A**). La quantité d'acide lactique produite est inférieure à celle produite par le témoin (**Figure 41.A**), cette quantité reste relativement faible (valeur maximale est environ 13g/l et 10 g/l à 0,6M et 1,1M de NaCl respectivement).

Durant un **stress thermique**, on note que le pH du milieu ne change pas ou change légèrement pour les températures de -20°C, 4°C et 60°C en fonction du temps ; pour les autres températures, le pH diminue en fonction du temps puis se stabilise à partir de 72h (**Figure 40.B**). En ce qui concerne la production d'acide lactique, elle reste relativement faible et stable, comparativement au témoin (à -20°C, 4°C et 60°C), les meilleures valeurs sont obtenues pour les températures de 18°C et 37°C (**Figure 41.B**).

Pendant le **stress acide**, le pH du milieu diminue en fonction du temps jusqu'à atteindre une valeur plus au moins stable à partir de 72h et jusqu'à la fin de l'expérience (**Figure 40.C**). La quantité d'acide lactique produite augmente en fonction du temps et du pH stressant mais ne dépasse pas les valeurs obtenues avec le témoin (**Figure 41.C**).

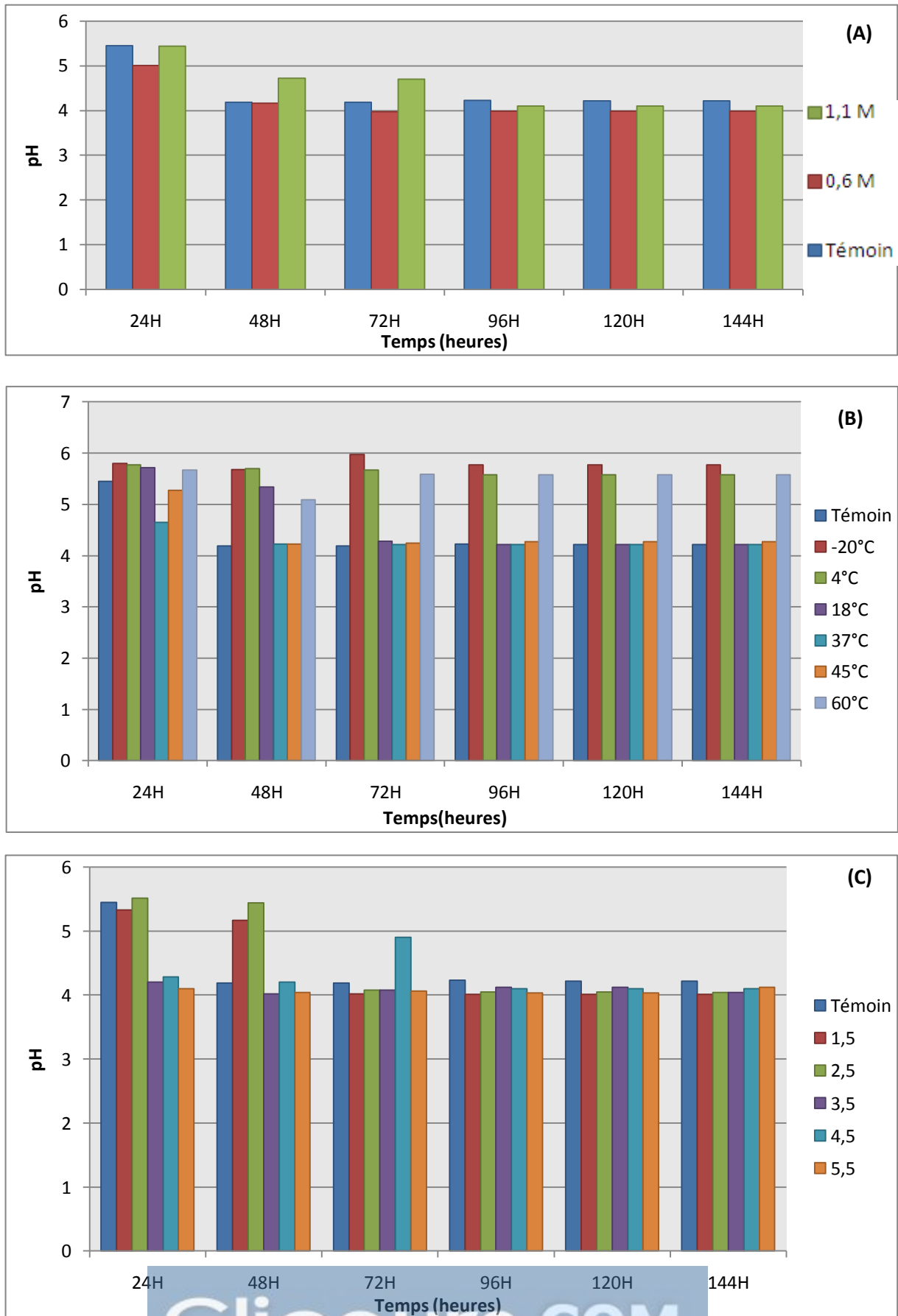


Figure 40: Evolution du pH au cours du temps de la souche BH14 durant :
 (A) : Stress hyperosmotique (B) : Stress thermique (C) : Stress acide

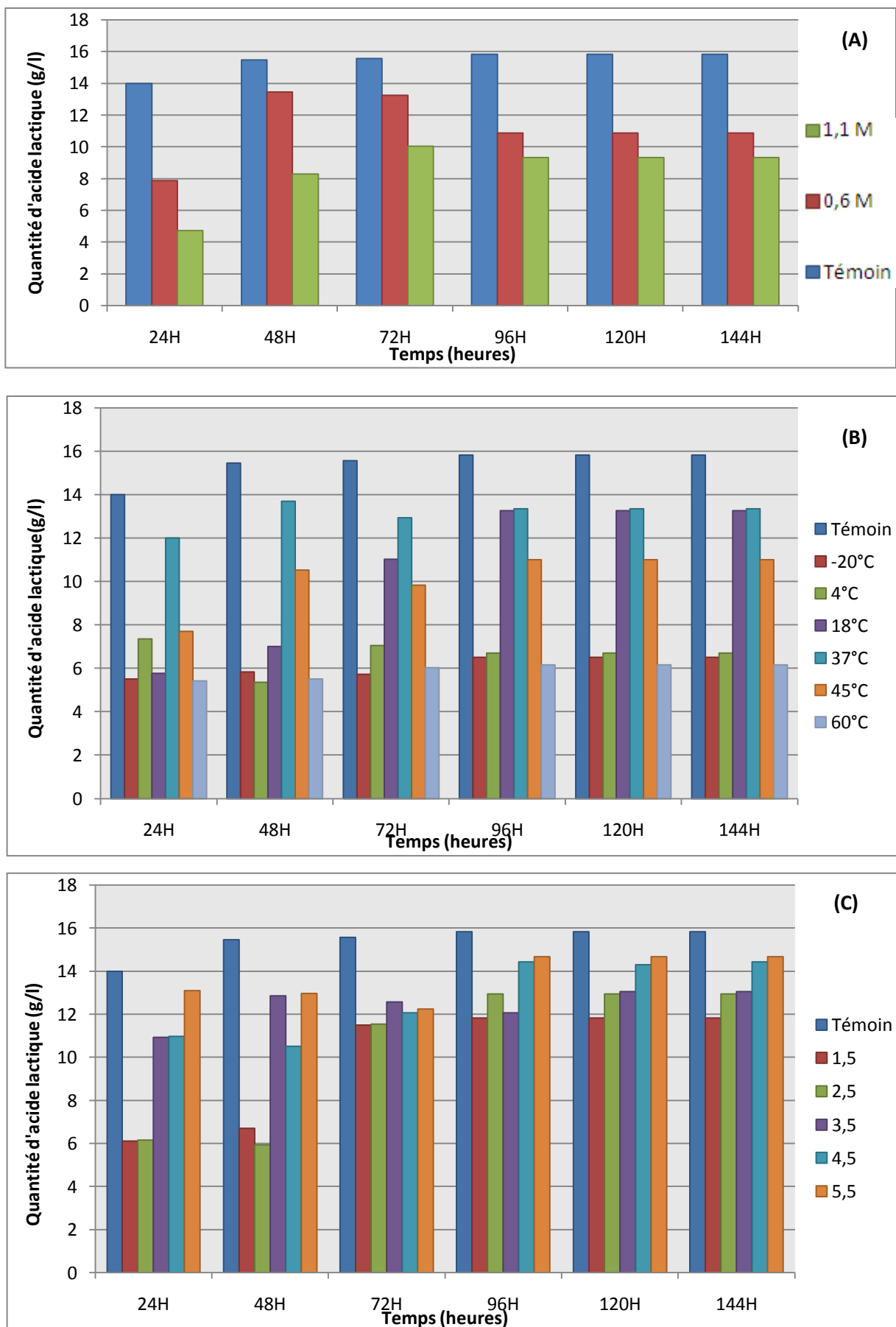


Figure 41: Evolution de la production d'acide lactique au cours du temps de la souche BH14 durant :

(A) : Stress hyperosmotique

(B) : Stress thermique

(C) : Stress acide

L'acidité titrable est une méthode traditionnelle qui permet de déterminer l'acidité du produit (en degrés Dornic) grâce à un titrage de sa concentration en acide lactique. Cette technique ne peut cependant pas être utilisée en ligne et souffre d'une grande marge d'erreur, liée à l'appréciation par l'opérateur de la zone de virage de l'indicateur coloré. La mesure du pH d'une culture est une méthode plus rapide et plus simple pour mesurer son acidité. Cette technique exige une attention particulière par rapport au nettoyage, à la régénération et à l'étalonnage des électrodes de pH. Ces deux méthodes sont considérées comme statiques, car elles ne prennent pas en compte la dynamique de la culture.

La transformation du lactose en acide lactique conduit à l'acidification du produit. Cette acidification accroît sa durée de vie, en limitant sa contamination par les microorganismes d'altération ou pathogènes, et lui confère des caractéristiques organoleptiques particulières (**Frank et Hassan, 1998; Mäyrä-Mäkinen et Bigret, 1998**).

L'activité acidifiante des BL représente leur principale activité métabolique. Elle s'accompagne d'autres activités qui peuvent présenter un intérêt selon le type d'application du ferment, comme les activités aromatisante, texturante, protéolytique et gazogène (**Béal et al., 2008**).

D'après **Durlu-Ozkaya et al. (2001)** les souches de lactobacilles diffèrent initialement dans leur aptitude à réduire le pH du lait et sont des souches qui ne changent pas le pH du lait après 6h d'incubation. Les lactobacilles métabolisent le lactose plus lentement que les lactocoques, mais la production finale d'acide lactique peut être égale ou même supérieure à celle des espèces du genre *Lactococcus* (**Herreros et al., 2003**). Par ailleurs les lactocoques qui fermentent lentement le lactose contiennent la β -galactosidase et la phospho- β -galactosidase, alors que ceux qui le fermentent rapidement possèdent seulement l'enzyme phospho- β -galactosidase (**Cogan et al., 1997**). Chez *Lb. casei* et *Lb. plantarum*, le lactose est utilisé à travers une activité β -galactosidase, mais certaines souches de *Lb. plantarum* peuvent aussi posséder une activité phospho- β -galactosidase (**Herrero et al., 2003**).

La souche BH14 est une souche à caractère homofermentaire, en condition de stress, l'aptitude à acidifier le milieu et à produire l'acide lactique est modifiée et fortement affectée.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Les enjeux de ce travail étaient de définir les niveaux de tolérance à différentes contraintes technologiques et de comprendre les mécanismes de réponse développés chez ce genre bactérien. Ces connaissances sont essentielles dans l'optique de favoriser la prolifération et/ou la survie de ces bactéries utilisées en tant que levains dans des matrices hostiles.

Notre étude a débuté par une confirmation de l'appartenance des espèces *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus ssp* utilisées dans ce travail au groupe lactique.

L'étude de l'effet des stress osmotique, acide et thermique sur les cellules montre que l'exposition des bactéries à un stress donné affecte les capacités de se multiplier et les vitesses de croissance des cellules, et affecte aussi la survie des cellules viables et cultivables.

L'étude du taux de mortalité indique que la résistance ou la sensibilité des cellules à un stress donné diffère d'une souche à une autre ce qui indique qu'il y a un effet souche.

L'adaptation des cellules aux différents stress montre que l'adaptation à des effets positifs sur les cellules, les paramètres de croissance, la survie des cellules et les rendent plus résistantes aux stress tout en étant sans effet aux valeurs extrêmes de chaque contrainte.

La deuxième partie de l'étude a consisté à étudier l'effet de deux osmoprotecteurs : la proline et la glycine-bétaine sur les souches utilisées. Dans un premier temps nous avons déterminé la concentration optimale de chaque osmoprotecteur correspondant à chaque souche et à chaque contrainte. Les résultats obtenus montrent qu'elle varie d'un osmoprotecteur à un autre, et d'une concentration à une autre pour un même osmoprotecteur, selon la souche.

Dans un second temps, nous avons testé la croissance des cellules en conditions de stress et en présence de la concentration optimale de proline et/ou de glycine-bétaine. Nous avons constaté que l'osmoprotecteur le plus efficace, pour nos souches, pour lever l'inhibition et protéger contre les différents stress est la glycine-bétaine. On conclut aussi que l'utilisation d'osmoprotecteur donne des résultats meilleurs que ceux obtenus par l'adaptation préalable des cellules.

L'application de l'électrophorèse SDS-PAGE a permis de détecter des différences dans les profils protéiques en conditions stressantes de la souche BH14 cultivées en absence et en présence de concentrations différentes de sel ce qui confirme que le sel induit des modifications qualitatives et quantitatives dans la synthèse des protéines. Les profils protéiques obtenus en conditions de stress acide ne sont pas exploitables.

L'étude des caractères technologiques a montré que la capacité à acidifier le milieu et à produire de l'acide lactique de la souche BH14 est fortement affectée en condition de stress.

Ces résultats montrent que l'étude de l'adaptation au stress est intéressante et mérite d'être approfondie. Les prochaines étapes du travail devrait porter sur:

- Un dosage de proline et de glycine-bétaine en vue d'estimer leur accumulation à l'intérieur des cellules bactériennes ;
- Une utilisation de techniques permettant d'évaluer plus précisément la viabilité bactérienne en situation de contraintes (cytométrie de flux, RT-PCR...) ;
- Un test d'autres techniques de lyse sur les souches ;
- Une étude de l'impact d'une préadaptation au stress sur le démarrage de la croissance en milieu hostile ;
- Une étude de la corrélation entre la résistance au stress et la présence de plasmide ;
- Utilisation d'un milieu chimiquement défini dépourvu de l'effet osmoprotecteur du milieu MRS ;
- Etudier et déterminer les systèmes de transport de solutés compatibles de nos souches ;
- Une étude des mécanismes moléculaires impliqués dans cette réponse des bactéries au stress en particulier l'activation des différents systèmes de transport de solutés compatibles ;
- Une étude sur la conformité membranaire en cas de stress acide ;
- Etudier la réponse croisée.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

- **Abee T., & Wouters J. A. (1999).** Microbial stress response in mineral processing. *Int Food Microbiol.* **50**(1-2)65-91.
- **Allouche F. N., Hellal A. & Laraba A. (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature & Technologie* **3** :13-20.
- **Alice A. & Sanchez-Rivas C. (1997).** DNA supercoiling and osmoresistance in *Bacillus subtilis* 168. *Current Microbiology*, **35**:309-315.
- **Amegaza M.R., Davidson I., Mc Laggan D., Verheul A., Abee T., & Booth I.R. (1995).** The role of peptides metabolism in the growth of *Listeria monocytogenes* in a minimal medium. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 1359-1363.
- **Angelidis A. S. & Smith G. M. 2003.** Three transporters mediate uptake of glycine betaine and carnithine by *Listeria monocytogenes* in response to hyperosmotic stress. *Appl Environ Microbiol.* **69**:1013-22.
- **Annous B.A., Backer L.A., Bayles D. O., Labeda D.P. & Wilkinson B. J. (1997).** Critical role of anteiso – 15C:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl Environ Microbiol.* **63** (10): 3887-94.
- **Annous B. A., Kozempel M. F. & Kurantetz M. J. (1999).** Changes in membrane fatty acid composition of *Pediococcus* sp. Strain NRRL B-2354 in response to growth conditions and its effect on thermal resistance. *Appl Environ Microbiol.* **65** (7):2857-62.
- **Auffray Y., Gansel, X., Thammavongs, B. & Boutibonnes, P. (1992)** Heat shock-induced protein synthesis in *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *Curr Microbiol.* **24**: 281-284.
- **Asakura H., Makino S., Takagi T., Kuri A, Kurazono T., Watarai M. & Shirahata T. (2002).** Passage in mice causes a change in the ability of *Salmonella enteric* serovar *Oranieburg* to survive NaCl osmotic stress; resuscitation from the viable but non-culturable state. *FEMS Microbiol Lett.* **212** (1): 87-93.
- **Azcarate-Peril M.A., Alterman E., Hoover-Fitzula R.L., Cano R.L. and Klaenhammer T.R. (2004).** Identification and inactivation of genetic loci involved with *Lactobacillus acidophilus* acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: pp5315-5322.
- **Azcarate-Peril M.A., McAuliffe O., Altermann, E. Lick, S., Russell W.M. & Klaenhammer, T. R. (2005).** Microarray analysis of a two-component regulatory system

involved in acid resistance and proteolytic activity in *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 5794-5804.

B

- **Backhed F., Ley R. E., Sonnenburg J. L., Peterson D. A. & Gordon, J. I. (2005).** Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **307**, 1915-1920.
- **Baghdad Belhadj-Semar (2009).** Résistance au sel et osmoprotection par la proline et la glycine-bétaïne chez les lactobacilles. Thèse d'ingénieur d'état. Université d'Oran.
- **Baliarda A. (2003).** Evaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* : Approches physiologiques et génétiques. Thèse de doctorat. École doctorale de sciences du vivant, géosciences, Sciences de l'environnement.
- **Bayles D. O., & Wilkinson B. J. (2000).** Osmoprotectant and cryoprotectant for *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol.* **30**(1):23-7.
- **Béal C., Marin M., Fontaine, E., Fonseca, F. & Obert J. P. (2008).** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments. *Tec&Doc Lavoisier, Paris*, 61-785.
- **Benson A. K. & Haldenwang, W. G. (1993).** The sigma B-dependent promoter of the *Bacillus subtilis* sigB operon is induced by heat shock. *J Bacteriol.* **175**, 1929-1935.
- **Bernard T., Jebbar M., Rassouli Y., Himdi-Kabbab S., Hamelin J., & Blanco C. (1993).** Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens*. *J. Gen. Microbiol.* **139**:129-136.
- **Berry E. D. & Foegeding P. M. (1997).** Cold temperature adaptation and growth of microorganisms. *J. Food Protect.* **60**:1583-1594.
- **Besnard V., Federighi M., & Cappelier J. M. (2000).** Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol.* **31**(1):77-81.
- **Beumer R. R., Te Giffel M. C., Cox L. J., Rombouts F. M., & Abee T. (1994).** Effect of exogenous proline, betaine and carnithine on growth of *Listeria monocytogenes* in a mineral medium. *Appl Environ Microbiol.* **60**(4): 1359-63.

- **Bolton L. F., & Frank J. F. (1999).** Simple method of observe the adaptative response of *Listeria monocytogenes* in food. *Lett Appl Microbiol.* **29(5)**: 350-3.
- **Booth I. R. 2002.** Stress and the signal cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *Int J Food Microbiol* **78** (1-2):19:30.
- **Bourlioux P., Koletzko B., Guarner F. & Braesco V. (2007).** The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine". *The American Journal of Clinical Nutrition*, **78**:675-683.
- **Bourot S., Sire O., Trautwetter A., Touze T., Wu L. F., C.Blanco, & Bernard T. (2000).** Glycine betaine-assisted protein folding in a lysA mutant of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **275(2)**:1050-6.
- **Bouvier J., Bordes P., Romeo Y., Fourçans A., Bouvier I., & Gutierrez C. (2000).** Characterization of OpuA, a glycine betaine uptake system of *Lactococcus lactis*. *J.Mol. Micribiol. Biotechnol.*, **2**:199-205.
- **Boyd D.A., Peters G.A., & Mulvey M.R. (2000).** Pratical characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enteric Typhymurium DT104*. *FEMS Microbiol Lett* **189**:285-291.
- **Boylan S. A., Redfield A. R., Brody M. S. & Price, C. W. (1993).** Stress-induced activation of the sigma B transcription factor of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **175**:7931-7937.
- **Bremer E., & Krämer R. (2000).** Coping with osmotic challenges : osmoregulation though accumulation and release of compatible solutes in bacteria. *ASM Press Washington DC*: 79-97.
- **Brigulla M., Hoffmann T., Krisp, A., Volker A., Bremer, E. & Volker, U. (2003).** Chill induction of the SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaptation. *J Bacteriol* **185**: 4305-4314.
- **Broadbent J. R., Barnes M., Brennand C., Strickland M., Houck K., Johnson M. E., & Steele J. L. (2002).** Contribution of *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase specificity to peptide accumulation and bitterness in reduced-fat Cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** :1778-1785.
- **Brown A. D. & Simpson J. R. (1972).** Water relations of sugar-tolerant yeasts : the role of intracellular polyols. *J Gen Microbiol.* **72(3)**: 589-91.
- **Brul S., & Coote P. (1999).** Preservative agents in foods. Mode of action and microbiol resistance mechanisms. *Int J Food Microbiol.* **50(1-2)**:1-17.

C

- **Cannon J. P., Lee T. A., Bolanos J. T. & Danziger, L. H. (2005).** Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **24** :31-40.
- **Canovas D., Vergas C., Kneip S., Moron M.J., Ventosa A., Bremer E., & Nieto J. (2000).** Genes for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from choline in the moderately halophilic bacterium *Halmonas elongata* DSM3043. *Microbiology*, **146**:455-463.
- **Carpita N. C. (1985).** Tensile strength of cell walls of living cells. *Plant physiol.* **79**: 485-488.
- **Carvalho A. S., J. Silva P. Ho, P. Teixeira F. X. Malcata & P. Gibbs (2003).** Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *J Appl Microbiol.* **94** (6): 947-52.
- **Chaillou S., Champomier-Verges M.-C., Cornet M., Crutz-LeCoq A.-M., Dudez A.-M., Martin, V., Beaufils S., Darbon-Rongre E., Bossy R. & Loux V. (2005)** The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23k. *Nat. Biotechnol.*, **23**:1527–1533.
- **Champomier-Verges M. C., Chaillou S., Cornet, M. & Zagorec, M. (2001).** *Lactobacillus sakei*: recent developments and future prospects. *Res Microbiol* **152**:839-848.
- **Champomier Verges M. C., Zuniga M., Morel-Deville F., Perez-Martinez G., Zagorec M. & Ehrlich S. D. (1999).** Relationships between arginine degradation, pH and survival in *Lactobacillus sakei*. *FEMS Microbiol Lett* **180**:297-304.
- **Chastanet A., Derre I., Nair S., & Msadek T. (2004).** ClpB, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance. *J. Bacteriol.* **186**: pp1165-1174.
- **Colwell R.R. & Grimes D. J. (2000).** Sematies and strategies. In Colwell R.R. , Grimes D. J. (Eds). Non culturable microorganisms in the environment. *ASM Press, Washington DC* (1-6).
- **Cogan T. M., Barbosa M., Beuvier E., Bianchi S. B., Coccon-Celli P. S., Fernandez I., Gomez M. J., Gomez R., Kalantzopoulos G., Ledda, A., Medina M., Rea M. R. & Rodriguez E. (1997).** Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* **64** : 409-421.

- **Corcoran B. M., Stanton C., Fitzgerald G. F. & Ross R. P. (2005).** Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Appl Environ Microbiol.* **71**:3060-3067.
- **Cotter P. D. & Hill C. (2003).** Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**:429-53.
- **Coucheney F., Gal L., Beney L., Lherminier J., Gervais P., and Guzzo J. (2005).** A small HSP, Lo18, interacts with the cell membrane and modulates lipid physical state under heat shock conditions in a lactic acid bacterium. *Biochim. Biophys. Acta* **1720**:92-98.
- **Culham D. E., Dalgado C., Gyles C. L., Mamelak D., MacLellan S., & Wood J. M. (1998).** Osmoregulatory transporter ProP influences colonization of the urinary tract by *Escherichia coli*. *Microbiology.* **144** (1): 91-102.
- **Cummings J. H. & Macfarlane G. T. (1997).** Colonic microflora: nutrition and health. *Nutrition* **13**:476- 478.
- **Csonka L.N. (1989)** Physiologie and genetic respons of bacteria to osmotic stress. *Microbiol.Rev*, **53**:121-147.
- **Csonka L.N., & Hanson A.D. (1991).** Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.*, **45**:569-606.

D

- **De Angelis M., Bini L., Pallini V., Cocconcelli P.S. & Gobbetti M. (2001).** The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis CBI*. *Microbiology* **147**:1863-1873.
- **De Angelis M., Mariotti L., Rossi J., Servili M., Fox P.F., Rollan G. 1., & Gobbetti M. (2002).** Arginine catabolism by sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of the arginine deiminase pathway enzymes from *Lactobacillus sanfranciscensis CBI*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:6193-6201.
- **Delmas F., Pierre F., Coucheney F., Divies C., & Guzzo J. (2001).** Biochemical and physiological studies of the small heat shock protein Lo18 from the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**:601-610.
- **Derre, I., Rapoport G., Devine K., Rose M. & Msadek T. (1999a).** ClpE, a novel type of HSP100 ATPase, is part of the CtsR heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **32**:581-593.

- **Derre I., Rapoport G. & Msadek, T. (1999b).** CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls clp and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **31**:117-131.
- **De Roissart H., & Luquet F.M. (1994).** Bactéries lactiques, **2**, Lorica (Chemain de Saint Georges, F-384. 10, France), pp25-428.
- **Derzelle S., Hallet B., Francis K.P., Ferain T., Delcour J., & Hols P. (2000).** Changes in cspL, cspP and cspC mRNA abundance as a function of cold shock and growth phase in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **182**:105-5133.
- **Dinbier U., Limpinsel E., Schmid R, & Bakker E. P. (1988).** Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch Microbiol.* **150**(4): 348-57.
- **Di Cagno R., De Angelis M., Limitone A., Fox P. F. & Gobbetti M (2006)** Response of *Lactobacillus helveticus* PR4 to heat stress during propagation in cheese whey with a gradient of decreasing temperatures. *Appl Environ Microbiol.* **72**(7): 4503-14.
- **Doyle R. J., & Marquis R. E. (1994).** Elastic, flexible peptidoglycan and bacterial cell wall properties. *Trends Microbiol.* **2**(2):57-60.
- **Dromigny J. (2008).** Monographie de microbiologie: *Bacillus subtilis*. *Edition Lavoisier. Paris*, 68-80.
- **Durlu-Özkaya F., Xanthopoulos V., Tunail, N., & Litopoulou Tsaneki E. (2001).** Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from Beyaz cheese made from raw ewe's milk. *J. Appl. Microbiol.* **91** : 861-870.
- **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

- **El Soda M., Ahmed N., Omran N., Osman G., & Morsi, A. (2003).** Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheese making. *Emir. Agric. Sci*, **15** : 51-71.

- **Elmnasser N., Ritz-Bricaud M., Guillou S., Leroi F., Orange N., Bakhlof A. & Federighi M. (2006).** Réponse adaptative de *Listeria monocytogenes* au stress osmotique et froid: implication en sécurité des aliments. *Revue Méd.Vét.* **157** :92-101.
- **Engel A., Fujiyoshi Y., & Agre P. (2000).** The importance of aquaporin water channel protein structures. *Embo J.* **19**(5): 800-6.
- **Essaid I., Medini M., & Hassouna M. (2009).** Technological and safety proprieties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat Science* **81**:203-208.

F

- **Farwick M., Siewe R.M., & Kramer R. (1995).** Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*, **177**: 4690-4695.
- **Flahaut S., Hartke A., Giard J.C., Benachour A., Boutibonnes P., Auffray Y. (1996).** Relationship between stress response toward bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*, *FEMS Microbiol. Lett.* **138**:49–54.
- **Fox P. F. (1993).** Cheese: an overview. In *Cheese: chemistry, physics microbiology*, 1-36.
- **Frank J. F. & Hassan A. N. (1998).** Starters cultures and their use. *Applied Dairy Microbiology. Marcel Dekker, Inc., New York*, 131-172.
- **Frees D., Thomsen L.E., & Ingmer H. (2005).** *Staphylococcus aureus* ClpYQ plays a minor role in stress survival. *Arch. Microbiol.* **183**: 286-291.

G

- **Gaillot O., Bregenholt S., Jaubert F., Di Santo J.P. et Breche P. (2001).** Stress-induced ClpP serine protease of *Listeria monocytogenes* is essential for induction of lysteriolysine O-dependent protective immunity. *Infect. Immun.* **69**(8): 4938-43.
- **Galinski E. A. (1995).** Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol.* **37**: 272-328.

- **Galinski E. A., & Truper H. G. (1982).** Betaine, compatible solutes in extremely halophilic photobacterium *Ectiorhodospira halochloris*. *FEMS Microbiol Lett.* **13**: 357-360.
- **Garbay S., & Lonvaud-Funel. A. (1996).** Response of *Leuconostoc oenos* to environmental changes. *J. Appl. Bacteriol.***81**:619-625.
- **Geneviève Lazure-Demers. 2000.** Mise au point d'une méthode rapide d'extraction des autolysines chez *Lactobacillus bulgaricus* ssp. *delbrueckii*. Mémoire de maître en sciences et technologie des aliments, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Faculté des études supérieures de l'université Laval, Canada.
- **Giard J.C., Verneuil N., Auffray Y., & Hartke, A. (2002).** Characterization of genes homologous to the general stress-inducible gene *gls24* in *Enterococcus faecalis* and *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett* **206**: 235-239.
- **Glaasker E., Koning W.N., & Poolman B. (1996a).** Glycine betaine fluxes in *Lactobacillus plantarum* during osmostasis and hyper- and hypo-osmotic shock. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**:10060-10065.
- **Glaasker E., Koning W.N., & Poolman B. (1996b).** Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. *J.Bacteriol.*, **178**: 575-582.
- **Glaasker E., Tjan F.S., Ter Sterg P.F., Koning W.N., & Poolman B. (1998).** Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress. *J.Bacteriol.*, **180**: 4718-4723.
- **Gobbetti M., Stepaniak L., De Angelis M., Corsetti A., & Di Cagno R. (2002).** Latent bioactive peptides in milk proteins. Proteolytic activation and significance in dairy processing. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **42** : 223-239.
- **Gouesbet G., Jan G. & Boyaval, P. (2002).** Two-dimensional electrophoresis study of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thermotolerance. *Appl Environ Microbiol* **68**:1055-1063.
- **Gouffi K., & Blanco C. (2000).** Is the accumulation of osmoprotectant the unique mechanism involved in bacterial osmoprotection ? *Int J Food Microbiol.* **55** (1-3): 171-4.
- **Graumann P.L. & Marahiel M.A. (1998).** A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends Biochem Sci* **23**: 286-290.
- **Graham J. E., & Wilkinson B. J. (1992).** *Staphylococcus aureus* osmoregulation : roles for choline, glycine betaine, proline and taurine. *J Bacteriol.* **174**(8) : 2711-6.
- **Gurner F. & Malagelada J. R. (2003).** Gut flora in health and disease. *Lancet* **361**: 512-519.

- **Guerzoni M. E., Vernocchi P., Nadgijimana M., Gianotti A. & Lanciotti R. (2007).** Generation of aroma compounds in sourdough: effects of stress exposure and lactobacilli-yeast interactions. *Food Microbiology* **24**:139-148.
- **Guillot A., Obis D., Gripon J.-C., Renault P., Bolotin A., & Mistou M.Y. (2000).** Genetic and biochemical characterization of high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals anew functional organization with bacterial ABC transporters. *J.Bacteriol.*, **181**: 6238-6246.
- **Guillouard I., Lim E. M., Van de Guchte M., Grimaldi C., Penaud S. & Maguin, E. (2004).** Tolerance and adaptative acid stress response of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Le Lait* **84**:1-6.
- **Guillouet S., & Engasser J. M. (1995).** Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as a response to an osmotic saline upshock. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **43**:315-320.
- **Guédon E., Renault P., Ehrlich S.D. & Delorme C. (2001).** Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptides supply. *Journal of Bacteriology*, **183**: 3614-3622.
- **Guzzo J., Delmas F., Pierre F., Jobin M. P., Samyn B., Van Beeumen J., Cavin J. F. & Divies C. (1997).** A small heat shock protein from *Leuconostoc oenos* induced by multiple stresses and during stationary growth phase. *Lett Appl Microbiol.* **24**(5):393-6.
- **Gwenola G., Gwenaël J. & Patrick B. (2001)** *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* thermotolerance. *Lait* **81**: 301–309.

H

- **Hartke A., Bouche S., Gansel X., Boutibonnes P., & Auffray, Y. (1994).** Starvation-induced stress resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Appl Environ Microbiol* **60**: 3474-3478.
- **Hartke A., Bouche S., Giard J.C., Benachour A., Boutibonnes P., & Auffray Y. (1996).** The lactic Acid Stress Response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr Microbiol* **33**: 194-199.

- **Hartke A., Bouche S., Laplace J.M., Benachour A., Boutibonnes,P., & Auffray, Y. (1995).** UV-inducible proteins and UV-induced cross-protection against acid, ethanol, H₂O₂ or heat treatments in *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *Arch Microbiol* **163**: 329-336.
- **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*. *Curr Microbiol* **34**, 23-26.
- **Hengge-Aronis & R. Loewen P.C. (2002).** The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation. *Annu Rev Microbiol* **48**: 53-80.
- **Herreros M. A., Fresno J. M., González Prieto M. J., & Tornadijo M. E. (2003).** Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). *Int. Dairy J.* **13** : 469-479.
- **Higuchi T., Hayashi H., & Abe K. (1997).** Exchange of glutamate and gamma-aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain. *J. Bacteriol.* **179**:3362-3364.
- **Hill M. J. (1997).** Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev. Suppl* **1**:43- 45.
- **Hiron A. (2007).** Les transporteurs de peptides de *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat d'état. INRA ; 15-18.
- **Holzappel W. H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J. & Schillinger U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr* **73**:365-373.
- **Hoper D., Volker U. & Hecker, M. (2005).** Comprehensive characterization of the contribution of individual SigB-dependent general stress genes to stress resistance of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **187**:2810-2826.
- **Hussain M. A., Rouch D., & Britz M. (2009).** Biochemistry of non-starter lactic acid bacteria isolate *Lactobacillus casei* GCRL163: Production of metabolites by stationary-phase cultures. *International Dairy Journal* **19**: 12-21.
- **Hutson J.Y., & Dowing M. (1968).** Pyrimidine biosynthesis in *Lactobacillus leichmannii*. *J. Bacteriol.* **96**:1249-1254.
- **Hutkins R. W. & Nannen N. L. (1993).** pH homeostasis in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* **76**:2354-2365.

I

- **Imhoff J. F. (1986).** Survival strategies of microorganisms in extreme saline environments. *Adv Space Res.* **6**(12): 299-306.
- **Isom L. L., Khambatta Z. S., Moluf J. L., Akers D. F., & Martin S. E. (1995).** Filament formation in *Listeria monocytogenes*. *J Food Protect.* **9**:1031-1033.
- **Isolauri E., Salminen S. & Ouwehand A. C. (2004).** Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **18**:299-313.

J

- **Jaenicke R. (1991).** Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur J Biotechnol.* **37**:631-637.
- **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.
- **Jobin M.-P., Delmas F. et Guzzo J. (1998)** Caractérisation des protéines de choc thermique de faible poids moléculaire chez les bactéries lactiques. *Lait* **78** :165-171.

K

- **Karam N.-E. (1995).** Constitution d'un soucier de bactéries lactiques à interet biotechnologique: Etude biochimique et moléculaire. Thèse de doctorat d'état. Université d'Oran.
- **Kazmierczak M.J., Mithoe S.C., Boor K.J. & Wiedmann M. (2003).** *Listeria monocytogenes* sigma B regulates stress response and virulence functions. *J. Bacteriol.* **185** (19): 5722-34.
- **Kempf B., & Bremer E. (1998).** Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress response to high osmolality environment. *Arch.Microbiol.*, **170**:319-330.

- **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 W. S., J. Ren & N. W. Dunn (1999).** Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiol Lett.* **171** (1): 57-65.
- **Kim W. S., Park J. H., Ren J., Su P., & N. Dunn W. (2001).** Survival response and rearrangement of plasmid DNA of *Lactococcus lactis* during long-term starvation. *Appl Environ Microbiol.* **67**(10) 4594-602.
- **Kim W. S., Park J. H., Tandianus J. E., Ren J., & Dunn N. W., (2002).** A distinct physiological state of *Lactococcus lactis* cells that confers survival against a direct and prolonged exposure to severe stresses. *FEMS Microbiol Lett.* **212** (2): 203-8.
- **Klaenhammer T. R. (1988).** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**:337-349.
- **Kleerebezem M., Boekhorst J., & van Kranenburg R. (2003).** Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:1990-1995.
- **Knauf H. J., Vongel R. F. & Hammes W. P. (1992).** Cloning, sequence and phenotypic expression of *kataA*, which encodes the catalase of *Lactobacillus sakei* LTH677. *Appl Environ Microbiol.* **58**:832-839.
- **Koch A. L. (1982).** On the growth and form of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol.* **128** (11): 2527-39.
- **Koch A. L. (1984).** Shrinkage of growing *Escherichia coli* cells by osmotic challenge. *J Bacteriol.* **159**(3): 919-24.
- **Koch A. L., & Pinette M. F. (1987).** Nephelometric determination of turgor pressure in growing gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* **169** (8): 3654-63.
- **Kogure K., Simidu U. & Taga N. (1979).** A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can J Microbiol.* **25** (3): 415-20.
- **Kono Y. & Fridovich I. (1983)** Functional significance of manganese catalase in *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol.* **155**(2)742-6.
- **Korber P., Stahl J.M., Neirhaus K.H., & Bardwell J.C. (2000).** Hsp15: a ribosome-associated heat shock protein. *Embo. J.* **19**: 741-748.
- **Korhonen H. & Pihlanto A. (2003).** Food-derived bioactive peptides opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Des.* **9** : 1297-1308.

- **Kovacs T., Hargitai A., Kovacs K. L. & Mecs I. (1998).** pH-dependent activation of the alternative transcriptional factor sigmaB in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **165**:323-328.
- **Kumalaningshi S., Masdiana P. & Vitta R. (2011).** Encapsulation of *Lactobacillus* sp. With Moring oleifera leaves extract for food supplement. *International Research Journal of Agricultural and Soil Science*, **1** (7):273-277.
- **Kunji E.R., Mierau I., Hagting A., Poolman B., & Konings W.N. (1996).** The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**: 187-221.
- **Kunin C. M., & Rudy J. (1991).** Effect of NaCl-induced osmotic stress on intracellular concentrations of glycine betaine and potassium in *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and staphylococci. *J Lab Clin Med.* **188**(3): 217-24.

L

- **Lane C. N., & Fox P. F. (1996).** Contribution of starter and added lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy J.* **6** : 715-728.
- **Langella P., Nouaille S., Commissaire J., Bolotine A., Gruss A., & Leloir, Y. (2001).** Characterization of host factors affecting heterologous proteins secretion in *Lactococcus lactis*. *Le Lait.* **81** : 19-28.
- **Lanyi J. K. (1974).** Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev.* **38**(3):272-90.
- **Laplace J.M., Sauvageot N., Hartke A., & Auffray Y. (1999).** Characterization of *Lactobacillus collinoides* response to heat, acid and ethanol treatments. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**: 659-663.
- **Lemay M. J., Rodrigue N., Garipey C., & Saucier L. (2000).** Adaptation of *Lactobacillus alimentarius* to environmental stresses. *Int J Food Microbiol.* **55** (1-3) : 249-53.
- **Lemos J. A. C., & Burne R. A. (2002).** Regulation and physiological significance of ClpC and ClpP in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology* **184**:6357-6366.
- **Le Rudulier D. (1993).** L'osmoregulation chez les bactéries : aspects physiologiques et génétiques. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **8**(3) : 167-169.

- **Lim E.M., Lafon A., Dridi L., Boudelbouze S., Ehrlich S.D., & Maguin E. (2001).** Identification des protéines de stress chez *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* par électrophorèse bidimensionnelle. *Lait*, **81** :317-325.
- **Lindgren S. W., Stojiljkovic I., & Heffron F. (1996).** Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93(9)**: 4197-201.
- **Lipper K., & Galinski E. A. (1992).** Enzyme stabilisation by ectoine-type compatible solutes : protection against heating, freezing and drying. *Pro Nalt Acad Sci USA.* **93**:4197-201.
- **Lorca G. L. & Font de Valdez G. (1999).** The effect of suboptimal growth temperature and phase on resistance of *Lactobacillus acidophilus* to environmental stress. *Cryobiology.* **39** (2):144-9.
- **Lorca G.L., Raya R.R. Taranto M.P., & De Valdez G.F. (1998).** Adaptative acid tolerance response in *Lactobacillus acidiphillus*. *Biotechnology Letters* **20**: 239-241.
- **Lucas P., Landete J., Coton M. Coton E., & Lonvaud-Funel A., (2003).** The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB9809: characterization and conservation in tyramine-producing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **229**: 65-71.
- **Lou Y., & Yousef A. E. (1997).** Adaptation to sublethal environmental stress protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl Environ microbial.* **63(4)**:1252-5.
- **Lynch C. M., McSweeney P. L. H., Fox P. F., Cogan, T. M., & Drinan, F. D. (1996).** Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *Int. Dairy J.* **6** : 851-867.

M

- **Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. (1960).** A medium for cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **23** : 130-135.
- **Marilley L., & Casey M. G. (2004.)** Flavours of cheese products : metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int. J. Food Microbiol.* **90** : 139-159.

- **Marceau A., M. Zagorec & M. C. Champomier-Verges. (2003).** Positive effects of growth at suboptimal temperature and high salt concentration on long-term survival of *Lactobacillus sakei*. *Res Microbiol.* **154** (1): 37-45.
- **Martin M. G., Magni C., de Mendoza D. & Lopez, P. (1995).** CitI, a transcription factor involved in regulation of citrate metabolism in lactic acid bacteria. *J Bacteriol* **187**:5146-5155.
- **Martirani L., Raniello R., Naclerio G., Ricca E. & De Felice M. (2001).** Identification of the Dna-binding protein, HrcA, of *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol Lett.* **198**(2);177-82.
- **Matin A. (1991).** The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**: 3-10.
- **Mäyrä-Mäkinen A. & Bigret M. (1998).** Industrial use and production of lactic acid bacteria. In Salminen, S. et Von Wright, A. (ed.). Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. *Marcel Dekker, Inc., New York*, 73-102.
- **Mc Donald L.C., Fleming H.P., & Hussan H.M. (1999).** Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2120-2124.
- **McLaggan D., & Epstein W. (1991).** *Escherichia coli* accumulates the eukaryotic osmolyte taurine at high osmolarity. *FEMS Microbiol Lett.* **65**(2): 209-13.
- **Meisel H. 2004.** Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors.* **21** : 55-61.
- **Mira De Orduna R., Patchett M.L., Liu S.Q., & Pioline G.J. (2001).** Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus bunchneri* and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1657-1662.
- **Miyazawa E., Iwabuchi A. & Yoshida, T. (1996).** Phytate breakdown and apparent absorption of phosphorus, calcium and magnesium in germfree and conventionalized rats. *Nutrition Research*, **16**:603-613.
- **Mogk A., Homuth G., Scholz C., Kim L., Schmid, F. X. & Schumann W. (1997).** The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *Embo J* **16**:4579-4590.
- **Molennar D., Hagting A., Alkema H., Drissen A.J., & Koning W.N. (1993).** Characteristics and osmoregulatory roles of uptake system for proline and glycine betaine in *Lactococcus lactis*. *J.Bacteriol.* **175**: 5438-5444.
- **Morbach S. & R. Kramer (2002).** Body shaping under water stress: osmosing and osmoregulation of solute transport in bacteria. *ChemBiochem.* **3** (5): 384-97.

- **Morel-Deville F., Fauvel F. & Morel P. (1998).** Two-component signal-transducing systems involved in stress responses and vancomycin susceptibility in *Lactobacillus sakei*. *Microbiology* **144**:2873-2883.
- **Murga M. L., De Ruiz Holgado A. P. & De Valdez G. F. (1998).** Survival rate and enzyme activities of *Lactobacillus acidophilus* following frozen storage. *Cryobiology* **36**:315-319.

N

- **Neidhart F.C., Ingraham J.L., & Schaechter M. (2004).** Physiologie de la cellule bactérienne: une approche moléculaire. Edition Masson. Paris.
- **Novel G., (1993).** Les bactéries lactiques In. Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel, ed : *Leveau J.Y., Bouix M. Techniques et documents Lavoisier. Paris. pp171-215.*
- **Nystrom T. (2004)** Stationary-phase physiology. *Annu Rev Microbiol* **58**: 161-181.

O

- **Obis D., Guillot A., Gripon J.-C., Renault P., Bolotin A., & Mistou M.Y. (1999).** Genetic and biochemical characterization of high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals anew functional organization with bacterial ABC transporters. *J.Bacteriol.* **181**:6238-6246.
- **Oren A. (1999).** Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**(2): 334-48.
- **Overmann J., Lehmann S., & Pfennig N. (1991).** The effect of starvation stress on the porin protein expression of *Escherichia coli* in lake water. *Lett Appl Microbiol.* **35**(6): 533-7.
- **Özer B., Kirmaci H.A, Şenel E., Atmar M., & Hayaloğlu A. (2009).** Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lctobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *International Dairy Journal*, **19**:22-29.

- **O’Byrne C, & Booth I.R., (2002).** Osmoregulation and its importance to food-borne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, **74**:203-216.
- **O’Callaghan, J., & Condon, S. (2000).** Growth of *Lactococcus lactis* strains at low water activity: correlation with the ability to accumulate glycine betaine. *Int. J. Food Microbiol.* **55**:127–131.
- **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** (4): 935-947.
- **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**:2287-93.

P

- **Palmfeldt J. & Hahn-Hägerdal B. (2000).** Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. *International Journal of Food Microbiology* **55**:235-238.
- **Panoff J.M., Legrand S., Thammavongs B., & Boutibonnes P. (1994).** The cold shock response in *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *Curr Microbiol* **29**: 213-216.
- **Panoff J. M., Thammavongs B., Gueguen M. & Boutibonnes P. (1998).** Cold stress responses in mesophilic bacteria. *Cryobiology* **36**:75-83.
- **Penaud S. (2006).** Analyse de la séquence génomique et étude de l’adaptation à l’acidité de *Lactobacillus delbrueckii ssp.bulgaricus* ATTC11842. Thèse de doctorat d’état. Institut National Agronomique De-Paris-Grignon. pp267.
- **Phadtare S. (2004).** Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr Issues Mol Biol* **6**:125-136.
- **Phadtare S., Yamanata K., & Inouye M. (2000).** The cold shock response in Storz G. and Hengge-Aronis R. (Eds). *Bacterial Stress Response*. *ASM Press, Washington DC*: 33-45.
- **Phan-Thanh L., & Gormon T.(1995).** Analysis of heat and cold shock protein in *Listeria* by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*. **16**(3):444-50.

- **Pietrerse B., Leer R.J., Schuren F.H.J., & Werf M.J. (2005).** Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. *Microbiology* **151**:3881-3894.
- **Piuri M., Sanchez-Rivas C., & Ruzal S.M. (2003).** Adaptation to high salt in *Lactobacillus*: role of peptides and proteolytic enzyme. *Journal of Applied Microbiology*, **95**: 372-379.
- **Prasad J., P. McJarrow, & Gopal P. (2003).** Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Appl Environ Microbiol.* **69.** (2): 917-25.
- **Prescott L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. (1995).** La cellule procaryote. Structure et fonctions. Chapitre 3. Dans *Microbiologie*, Ed. *De Boeck Université, Bruxelles*, pp. 40-68.
- **Prescott L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. (1999).** *Microbiology*, 4th edn. *New York: WCB/McGraw-Hill.*
- **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. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:2355-2360.
- **Poolman B., Spitzer J.J., & Wood J.M. (2004).** Bactericidal osmosing : roles of membrane structure and electrostatics in lipid-protein and protein-protein interaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1666**:88-104.
- **Pot B. 2008.** The taxonomy of lactic acid bacteria. In *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments.* Ed. *Corrieu, G. et Luquet, F.-M. Tec & Doc. Lavoisier, Paris.* pp1-152.
- **Potts M. (1994).** Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev.* **58**(4):755-805.

Q

- **Qi, Y., et Miller K. J. (2000).** Effect of low water activity on staphylococcal enterotoxin A and B biosynthesis. *J Food Prot.* **63** (4): 473-8.

R

- **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
- **Rammelsberg M., Müller E. & Radler F. (1990).** Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Archives of Microbiology* **154**:249-252.
- **Ravel J., Hill R. T., & Colwell R. R. (1994).** Isolation of a *Vibrio cholerae* transposon-mutant with an altered viable but nonculturable response. *FEMS Microbiol Lett.* **120** (1-2): 57-61.
- **Redon E. (2005).** Identification des déterminants de l'expression génique lors de l'adaptation de *Lactococcus lactis* au stress : intégration des données de transcriptome et de stabilité des ARN messagers. These De Doctorat. Institut de Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries
- **Reid G. & Burton J. (2002).** Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection* **4** :319-324.
- **Richmond C.S., Glasner J.D., Mau R., Jin H., & Blattner F.R. (1999).** Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acides Res.* **27**:3821-3835.
- **Riehle M. M., Bennett A. F., Lenski R. E., & Long A. D. (2003).** Evolutionary changes in heat-inducible gene expression in lines of *Escherichia coli* adapted to high temperature. *Physiol Genomisc.* **14**(1):47-58.
- **Rigaux P. (2008).** Evaluation des propriétés immunomodulatrices de la bactérie lactique *Lactobacillus plantarum* NCIMB8826 dans le cadre de l'allergie aux acariens. Thèse de doctorat d'état. Université Libre de Bruxelles.
- **Robert H., Le Marrec C., Blanco C., & Jebbar M. (2000).** Glycine betaine, carnithine and choline enhance salinity tolerance and prevent the accumulation of sodium to level inhibiting growth of *Tetragenococcus halophila*. *Appl Environ Microbiol.* **66**(2): 509-17.
- **Rodriguez J. M., Martínez M. I., Horn N., & Dodd, H. M. 2003.** Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **80** : 101-116.
- **Rollan G., Lorca G. L. & Font de Valdez G. (2003).** Arginine catabolism and acid tolerance response in *Lactobacillus reuteri* isolated from sourdough. *Food Microbiology* **20**:313-319.

- **Romeo Y., Bouvier J., & Gutierrez C. (2001).** La réponse au stress osmotique des bactéries lactiques *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum*. *Lait*, **81** :49-55.
- **Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J., & Zoon P. (2002).** An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **12** : 163-171.
- **Ruffert S., Lambert C., Peter H., Wendisch V. F., & Kramer R. (1997).** Exflux of compatible solutes in *Corynebacterium glutamicum* mediated by osmoregulated channel activity. *Eur J Biochem.* **24**(2): 572-80.
- **Russell J. B. & Diez Gonzalez F. (1998).** The effects of fermentation acids on bacterial growth. *In Advances in Microbial Physiology*, **39**: 205-234.

S

- **Saad D. (1997).** Mise en évidence de *Lactococcus lactis* résistantes à 7.5% de NaCl. Mémoire de D.E.S. Université d'Oran.
- **Salotra P., Singh D. K, Seal K. P., Krishna N., Jaffe H., & Bhatnagar R. (1995).** Expression of DnaK and GroEL homologs in *Leuconostoc mesenteroides* in response to heat shock, cold shock or chemical stress. *FEMS Microbiol Lett.* **31**(1):57-62.
- **Sánchez B., Bressdier P., Chaignepain S., Schmitter J.M., & Urdaci M.C. (2009).** Identification of surface-associated proteins in the probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus*GG. *International Dairy Journal* **19**:85-88.
- **Sanders M. E. (1998).** Developpement of consumer probiotics for the US market. *Br Nutr.* **80**(4):213-8.
- **Sanders J. W., Leenhouts K. J., Haandrikman A. J., Venema G., & Kok J. (1995).** Dstress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *J Bacteriol.* **177**(18):5254-60.
- **Sanders M. E., & Huis in't Veld J. (1999).** Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbial, product, regulatory and labeling issues. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **76**(1-4):293-315.
- **Schleifer K. H. & Ludwig, W. (1995).** Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *System Appl Microbiol* **18**, 461-467.

- **Schleifer K. H., Kraus J., Dvorak C., Kilpper-Bälz R., Collins, M. D. & Fischer, W. (1985).** Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst Appl Microbiol* **6**:183-195.
- **Schleyer M., Schmid R., & Bakker E. P. (1993).** Transient, specific and extremely rapid release of osmolytes from growing cells of *Escherichia coli* K-12 exposed to hyperosmotic shock. *Arch Microbiol.* **160**(6): 424-31.
- **Scott C., Rawsthorne H., Upadhyay M., Shearman C.A., Gasson M.J., Guest, J.R., & Green J. (2000).** Zinc uptake, oxidative stress and the FNR-like proteins of *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett* **192**: 85-89.
- **Selkh A. (1995).** Contribution à l'étude des protéines et de bactéries lactiques du lait de chamelle de Timimoun. Mémoire de D.E.S. Université d'Oran.
- **Servin A. L. (2004).** Antagonistic activities of *lactobacilli* and *bifidobacteria* against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 405-440.
- **Siegmund H., Rechinger K. B., & Jakobsen M. (2000).** Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** : 2330-2335.
- **Simova E. & Beshkova D. 2007.** Effect of growth phase and growth medium on peptidase activities of starter lactic acid bacteria. *Le Lait.* **87** : 555-573.
- **Sinensky M. (1974).** Homeoviscous adaptation-a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad USA.* **71**(2):522-5.
- **Sleator R.D., & Hill C. (2002).** Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacteria stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, **26**:46-71.
- **Sleator, R. D., Wouters J., Gahan C. G., Abee T, & Hill. C. (2001).** Analysis of the role of OpuC, an osmolyte system in salt tolerance and virulence potential of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* **67** (6): 2692-8.
- **Silva J., Carvalho A. S., Ferreira R., Vitorino R., Amado F., Domingues P., Teixeira P. & Gibbs P.A. (2005).** Effect of the pH of growth on the survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to stress conditions during spray-drying. *J Appl Microbiol* **98**:775-782.
- **Smeds A., Varmanen P., & Palva A. (1998).** Molecular characterization of a stress-induced gene from *Lactobacillus helveticus*. *J Bacteriol.* **180**(23)6148-53.
- **Smith D. (2001).** Provision and maintenance of micro-organisms for industry and international research networks. *Cryo Letters* **22**:91-96.

- **Spano G., Chieppa G., Beneduce L. & Massa S. (2004).** Expression analysis of putative *arcA*, *arcB* and *arcC* genes partially cloned from *Lactobacillus plantarum* isolated from wine. *J Appl Microbiol* **96**:185-193.
- **Stiles M. E. & Holzapel W. H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol* **36**:1-29.
- **Streit F. (2008).** Influence des conditions de récolte et de concentration sur l'état physiologique et la cryotolérance de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* cfl1. Thèse de Doctorat d'état. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement.
- **Svensater G., Sjogreen B., & Hamilton I.R. (2000).** Multiple stress responses in *Streptococcus mutans* and the induction of general and stress-specific proteins. *Microbiology*, **146** (1): 107-117.
- **Sunny-Roberts E.O., & Knorr D. (2008).** Evaluation of the response of *Lactobacillus rhamnosus* VTTE-97800 to sucrose-induced osmotic stress. *Food Microbiology*, **25**: 183-189.

U

- **Ueno Y., Hayakawa K. Takahashi S., & Oda K. (1997).** Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO12005. *Biosci. Biochem.* **61**: 1168-1171.

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.
- **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.
- **Van De Guchte M., Ehrlich S. D. & Maguin, E. (2001).** Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *J Appl Microbiol* **91**, 147-153.

- **Van De Guchte M., Ehrlich S.D., & Maguin E. (2002).** Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *J. Appl. Microbiol.* **55**: 224-28.
- **Van Der Heide T., & Poolman B. (2000).** Glycine betaine transport in *Lactococcus lactis* is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity. *J. Bacteriol.*, **182**: 203-206.
- **Ventosa A., Nieto J. J., & Oren A. (1998).** Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**(2): 504-44.
- **Verheul A., E. Glaasker B. Poolman & T. Abee. (1997).** Betaine and L-carnithine transport by *Listeria monocytogenes* ScottA in response to osmotic signals. *J Bacteriol.* **179**(22): 6979-85.
- **Vijaranakul U., Nadakavukaren M. J., de Jonge B. L., Wilkinson B. J. & Jayaswal R. K. (1995).** Increased cell size and shortened peptidoglycan interpeptide bridge of NaCl-stressed *Staphylococcus aureus* and their reversal by glycine betaine. *J. Bacteriol.* **177** (17): 5116-21.
- **Volker U., Engelmann S., Maul B., Riethdorf S., Volker A., Schmid R., Mach, H. & Hecker M.(1994).** Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **140** (4):741-752.
- **Volker U., Maul B. & Hecker M. (1999).** Expression of the sigmaB-dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**:3942-3948.

W

- **Walsby A. E., Hayes P. K., & Boje R. (1995).** The pressure relationship of gas vacuoles. *Proceeding of the Royal Society of London.* **178**: 201-206.
- **Wang Y., Delettre J., Guillot A., Corrieu G. and Béal, C. (2005).** Influence of cooling temperature and duration on cold adaptation of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Cryobiology* **50**:294-307.
- **Welsh D. T. (2000).** Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from signal cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev.* **24**(3): 263-90.
- **Whatmore A. M., & Reed R. H. (1990).** Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis* : a possible role for K⁺ in turgor regulation. *J Gen Microbiol.* **136**(12): 2521-6.

- **Whitaker R. D., & Batt C. A. (1991).** Characterization of the heat shock response in *Lactococcus* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1408-1412.
- **Winter J., Linke k., Jatzek A., & Jakob U (2005).** Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33. *Mol. Cell.* **17**:381-392.
- **Wisselink H. W., Weusthuis R. A., Eggink G., Hugenholtz J., Grobben G. J. (2002).** Mannitol production by lactic acid bacteria. A review. *Int. Dairy J.* **12** : 151-161.
- **Wong L. S., Johnson M. S., Sandberg L. B., & Taylor B. L. (1995).** Amino acid efflux in response to chemotactic and osmotic signals in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**:2410-2417.
- **Wood J.M. (1999).** Osmosing by bacteria: Signals and membrane-based sensors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **63**: 230-262.
- **Wood J.M., Bramer E., Csonka L.N., Karger R., Poolman B., Van Der Heide T., and Smith L.T. (2001).** Osmosing and osmoregulation compatible solute accumulation by bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, **130**: 437-460.
- **Wouters J.A., Sanders J.W., Kok J., de Vos W.M., Kuipers O.P., and Abee T. (1998).** Clustered organization and transcriptional analysis of a family of five csp genes of *Lactococcus lactis* MG1363. *Microbiology* **144** (10): 2885-2893.
- **Wouters J.A., Jeynov B., Rombouts F.M., de Vos W.M., Kuipers O.P., & Abee, T. (1999).** Analysis of the role of 7 kDa cold-shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 in cryoprotection. *Microbiology* **145** (11): 3185-3194.
- **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., Frenkiel H., de Vos W.M., Kuipers O.P., and 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**: 5171-5178.

X

- **Xu J., Bjursell, M. K., Himrod J., Deng S., Carmichael L. K., Chiang H. C., Hooper L.J. I. (2003).** A genomic view of the human-Bacteroides. *Symbiosis* 2074-2076.

Y

- **Yvon M., Rijnen, L. 2001.** Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int. Dairy J.* **11** : 185-201.

-

Z

- **Zadi-Karam H. (1998).** Bactéries lactiques isolées de lait de *Chamelus dromedaries*. Etude microbiologique et biochimique caractéristique technologique, élaboration de ferments lactiques mésophiles et fabrication de fromage. Thèse de doctorat d'état. Université de Costantine.
- **Zadi-Karam H. et Karam N.-E. (2006).** Bactéries lactiques du lait de chamelle d'Algérie: mise en évidence de souche de *Lactococcus* résistantes au sel. *Tropiculture*, 153-156.
- **Zambou N. F., Sieladie, D. V., Fonteh A. F., Moundipa F. P., Tchouanguép M. F., & El Soda M. (2008).** Phenotypic characteristics of lactic acid bacteria isolate from cow's raw milk of Bororo cattle breeders in western highland region of Cameroon. *Res. J. Microbiol.* **3** (6) : 447-456.
- **Zeller T. & Klug, G. (2006).** Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. *J Bacteriol* **176**:1359-1363.

ANNEXE

Milieux de culture

Milieu MRS :

Petone	10g
Extrait de levure	5g
Extrait de viande	10g
Glucose	20g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	1g
Sulfate de magnésium	0.1g
Sulfate de manganèse	0.05g
Phosphate di potassique	2g
Tween 80	1ml
Eau distillée qsp	1000ml

pH=6.5

Stérilisation à 120°C pendant 20min

Lait écrémé :

Lait écrémé	10g
Extrait de levure	0.5g
Eau distillée	1000ml

Stérilisation à 110°C pendant 15min

Lait écrémé reconstitué à 10%

Poudre de lait écrémé 10 g

Eau distillée 100 ml

Stérilisation à l'autoclave à 110°C pendant 10 min

Tampons

Tampon de migration (pH=8.3)

Tris	3.03g
SDS	14.4g
Glycérol	1g
Eau distillée qsp	100ml

Tampon Tris-EDTA (pH=7.5)

Tris HCl	50mM
EDTA	5mM

Tampon d'échantillon (pH=6.5)

Tris	0.15g
SDS	0.4g
Glycérol	2g
Bleu de Bromophénol	0.01g
B-Mercaptoéthanol	0.05g
Eau distillée qsp	1000ml

Tampon TBE (pH=8)

Tris HCl	0.09mM
EDTA	2.80mM
Acide borique	0.09mM

Tampon de charge

Bleu de bromophénol	25%
Glycérol	40%

Solutions

Solutions utilisée pour l'électrophorèse SDS-PAGE

- Acrylamide mix 30% : 29% d'acrylamide, 1% de N,N méthylène-bisacrylamide.
- Tris 1.5M : 18.17g de tris dans 1000ml d'eau distillée.
- Tris 1M : 12.11g de tris dans 100ml d'eau distillée.
- SDS : 1g de SDS dans 10ml d'eau distillée.
- Persulfate d'ammonium : 100mg de persulfate d'ammonium dans 1ml d'eau distillée.
- Temed ou N, N, N, N-tétraméthylene diamine : solution commercial (Kodak).

Solution de coloration :

Bleu de coomassie R250 (Merk)	0.5g
Méthanol. H ₂ O (V/V)	90ml
Acide acétique	10ml

Solution de décoloration :

Méthanol / eaudistillée (V/V)	900ml
Acide acétique	100ml

Réactifs

Réactif de Bradford :

Bleu de coomassie G250 (Merk)	100mg
Acide orthophosphorique 85%	10ml
Ethanol 95%	5ml
Eau distillée qsp	1000ml

Solvant pour la chromatographie sur couche mince :

Butanol	80ml
Acide acétique	20ml
Eau distillée	20ml

Résumé

Nous avons étudié le comportement de trois souches de lactobacilles : CHTD27, BH14 et CHM18 mises en contact de différentes contraintes (osmotique, thermique et acide). Les paramètres de croissance, la viabilité et les taux de mortalité sont fortement affectés en conditions de stress et changent d'une souche à une autre.

L'adaptation des cellules bactériennes aux différentes contraintes indique que l'adaptation a un effet positif sur les paramètres de croissance tout en étant négligeable aux conditions stressantes extrêmes.

Nous avons ensuite évalué le comportement des cellules stressées en présence de deux osmoprotecteurs : la proline et la glycine-bétaïne. Il s'est avéré qu'ils ont un effet osmoprotecteur et que la glycine-bétaïne est l'osmoprotecteur le plus efficace pour nos souches pour lever l'inhibition causée par les différents stress.

L'application de l'électrophorèse sur les contenus protéiques de la souche BH14 cultivées en absence et en présence de stress révèle l'apparition de protéines liées au stress.

L'étude de la capacité d'acidification du milieu et la production d'acide lactique de la BH14 indique qu'ils sont fortement affectés.

Mots clés : Lactobacille – Stress Osmotique – Stress Acide – Stress Thermique – Adaptation – Taux de Mortalité – Facteurs de Tolérance - Proline – Glycine-bétaïne – Electrophorèse SDS-PAGE.

Abstract

We studied the behavior of three strains of lactobacilli CHTD27, BH14 and CHM18 put in contact of various constraints (osmotic, thermal and acid). The results showed that the parameters of growth, viability and death rates are strongly affected in conditions of stress. These effects change from a strain to another.

The adaptation of the bacterial cells to the various constraints indicates that the adaptation has a positive effect on the parameters of negligible growth while being in the stressing conditions extreme.

We then evaluated the behavior of the cells stressed in the presence of two osmoprotectors: the proline and glycine-betain. It proved that they have an osmoprotector effect and that glycine-betain is the most effective osmoprotector for our stocks to raise the inhibition caused by the various stresses.

The application of the electrophoresis on the protein contents of stock BH14 cultivated in absence and in the presence of stress reveals the appearance of proteins related to the stress.

The capacity of acidification of the medium and the production of lactic acid of the BH14 was strongly affected.

Key words: Lactobacilli – Osmotic stress – Acid stress - Thermal stress- Adaptation - Death Rice – Tolerance Factor -Proline - Glycine-betain - Electrophoresis SDS-PAGE.

المخلص

لقد قمنا بدراسة ثلاثة سلالات من العصيات اللبنية في أوساط تحتوي على تراكيز اسموزية، حمضية و حرارة غير ملائمة للنمو. النتائج بينت ان نمو هذه السلالات يتغير في هذه الأوساط. تأقلم هذه السلالات يسمح بتحسين النمو.

ان دراسة نمو السلالات في وجود الجزيئات المحافظة على الاسموزية : البرولين و الغليسين-بيبتين بين بانهما تحافظان على هذه السلالات و هذا التأثير يختلف من سلالة إلى أخرى، كما ان الغليسين-بيبتين أحسن من البرولين بالنسبة لسلالاتنا.

النامية في وسط مقلق يبين وجود بروتينات لها علاقة بالتأقلم. إن دراسة القدرة على إنتاج الحمض اللبني تبين أنها تتغير في وجود وسط البروتينات مقارنة بواسطة الرحلان الكهربائي لسلالة BH14 غذائي مقلق.

الكلمات المفتاحية: العصيات اللبنية – اسموز – حمض – حرارة – تأقلم – نسبة الموت – نسبة المقاومة – برولين – غليسين-

ClicCours.com