Réponse au stress acide chez Streptococcus thermophilus : purification, identification et caractérisation d'une protéine surexprimée

Humberto Gonzalez Marquez

▶ **To cite this version:**

Humberto Gonzalez Marquez. Réponse au stress acide chez Streptococcus thermophilus : purification, identification et caractérisation d'une protéine surexprimée. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1997. Français. NNT : 1997NAN10018 . tel-01747549

HAL Id: tel-01747549
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747549

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

FACULTÉ DES SCIENCES

U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques

École doctorale Biologie et Santé

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY I EN BIOCHIMIE

par

Humberto GONZALEZ-MARQUEZ

Réponse au stress acide chez *Streptococcus thermophilus*. Purification, identification et caractérisation d'une protéine surexprimée

Soutenance publique le 13 Mai 1997 devant la commission d'examen :

mbres du jury :

sident :	M. Guy LINDEN	Professeur, Université Henri Poincaré-Nancy 1
pporteurs :	M. Charles DIVIES	Professeur, ENSBANA, Université de Bourgogne
	M. Jean-Claude GRIPON	Directeur de Recherche INRA Jouy en Josas
aminateurs :	M. Yannick AUFFRAY	Professeur, Université de Caen
	M. Patrice BRACQUART	Professeur, Université Henri Poincaré-Nancy 1
	Mme. Christiane GUIMONT	Maître de Conférences, Université Henri Poincaré-Nancy 1

Laboratoire des Biosciences de l'Aliment
Faculté des Sciences - 54500 VANDŒUVRE-LÈS-NANCY

Avant-propos

Ce travail a été réalisé au Laboratoire des BioSciences de l'Aliment des Professeurs Guy Linden, Jean-Yves Le Déaut et Jean Luc Gaillard. Je les remercie de m'y avoir accueilli.

Je suis très reconnaissant à Monsieur le Professeur Patrice Bracquart, qui a encadré ce travail, pour ses précieux conseils.

Je voudrais remercier également Madame Christiane Guimont d'avoir suivi avec intérêt ce travail depuis mon arrivée au Laboratoire.

Mes remerciements s'adressent aux rapporteurs et membres de la commission d'examen qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail :

-Monsieur C. DIVIES, Professeur à l'ENSBANA de Dijon

-Monsieur J-C GRIPON, Directeur de Recherche à l'INRA, Jouy en Josas

-Monsieur Y. AUFFRAY, Professeur à l'Université de Caen

Une partie de ce travail a été réalisée au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (LSMBO) de la Faculté de Chimie de Strasbourg. J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur A. Van Dorsselaer, pour m'y avoir accueilli et à Madame O. Sorokine, pour ses précieux conseils et sa disponibilité dont elle a fait preuve.

Je suis particulièrement reconnaissant à Mademoiselle Clarisse Perrin pour sa collaboration étroite, par sa disponibilité pour la discussion journalière des résultats et pour la grande amitié qu'elle m'a montré.

Je tiens à remercier plus spécialement, Anne Lagrange, Sylvie Campagna, Chantal Poirson, Véronique Breton, Monique Leprince, Laurent Miclo, Jean-Michel Girardet, Franck Saulnier, Gérard Humbert, Dominique Tscheiller, et toutes les personnes du Laboratoire des BioSciences de l'Aliment pour leur aide.

J'ai aussi une pensée pour mes anciens amis qui ont déjà passé leur thèse mais qui m'ont laissé leur amitié et conseils, spécialement Hayette Louailèche, Martine Aubert, Luc Etienne et Manu Perrin.

Je tiens enfin à remercier très spécialement ma femme, Reyna-Carmen et ma fille Carmen-Lorena, pour m'avoir encouragé tout au long de ma thèse. A toutes deux ma reconnaissance infinie.

Ce travail a été partiellement financé par le Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), du Mexique et l'Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Abréviations

1D	:	Monodimensionnelle
2D	:	Bidimensionnelle
A $_{xxx\ nm}$	:	Absorption à xxx nm
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ARNm	:	Acide ribonucléique messager
ATCC	:	*American Type Culture Collection*
ATP	:	Adénosine triphosphate
BLAST	:	*Basic Local Alignment Search Tool* (Outil pour la recherche des alignements locaux)
BSA	:	*Bovine serumalbumine* (sérumalbumine bovine)
C	:	Rapport en pourcentage de la masse de bisacrylamide par rapport à la masse d'acrylamide + bisacrylamide
DTT	:	Dithiothréitol
D.O.	:	Densité optique
EDTA	:	Acide éthylène diaminotétraacétique
ES	:	*Électrospray*
Endo Arg-C	:	Endoprotéinase arginine-C
FAB	:	*Fast atom bombardment* (Bombardement atomique rapide)
FPLC	:	*Fast protein liquid chromatography* (chromatographie liquide rapide des protéines)
gb	:	*Gene bank*
GCG	:	*Genetic Computer Group*
GOR	:	Méthode d'alignement de séquences de Garnier *et al.*, 1978
HCA	:	*Hydrophobic clusters analysis* (identification de "clusters" hydrophobes)
HPLC	:	*High performance liquid chromatography* (chromatographie liquide haute performance)
Hsp	:	*Heat shock protein* (Protéine de choc thermique)
IEF	:	Isoélectrofocalisation
MALDI-TOF	:	*Matrix-Assisted Laser Desorption - Time of Flight*
MAP	:	*Multiple alignment program*
MEME	:	*Multiple EM for Motif Elicitation*
MM	:	Masse moléculaire

M_r	:	Masse moléculaire relative
MS	:	Spectrométrie de masse
MSA	:	*Multiple sequence alignment* (Alignement de séquences multiples)
NAD^+/NADH	:	Nicotinamide-adénine-dinucléotide (forme oxydée/forme réduite)
ORIs	:	Agent producteur d'oxygène actif
p/v	:	Poids par volume
PAGE	:	*Polyacrylamide gel electrophoresis* (électrophorèse en gel de polyacrylamide)
PDA	:	*Photodiode array detector* (détecteur à barrette de diodes)
pHext	:	pH externe
pHint	:	pH interne
pI	:	Point isoélectrique
PIMA	:	*Pattern-Induced (local) Multiple Alignment*
PVDF	:	Membrane de Polyvinyldifluoride
SDS	:	Sodium dodécylsulfate
T	:	Rapport en pourcentage de la masse de (bisacrylamide + masse d'acrylamide) par rapport au volume de tampon
TCA	:	Acide trichloroacétique
TFA	:	Acide trifluoroacétique
Tris	:	α, α ,α-tris(hydroxyméthyl) méthylamine
UFC	:	unité formant colonie
UV	:	Ultraviolet
v/v	:	Volume par volume

Table des Matières

Avant-propos 2
Abreviations 3
Table des Matières 5
I. Synthèse bibliographique 17
1. Une bactérie thermophile : *Streptococcus thermophilus* 17
1.1. Caractéristiques générales - Systématique 17
1.2. Position taxonomique et écologie 18
1.3. Physiologie générale de *S. thermophilus* 19
1.3.1. Métabolisme des glucides 19
1.3.2. Métabolisme azoté 22
1.3.3. Production de polysaccharides exocellulaires 23
2. Facteurs environnementaux influençant le développement d'un micro-organisme : rôle du stress. 23
2.1. La chaleur comme facteur de stress. 24
2.2. Le stress chaud chez les bactéries lactiques 28
2.2.1. Régulation de la synthèse des protéines de choc thermique chez *Lactococcus lactis* 28
2.3. Le froid comme facteur de stress 35
2.3.1. Effet de la baisse de température chez *E. coli* 35
2.4. Réponse à une carence en nutriments : la phase stationnaire 38
2.5. Réponse bactérienne aux agents producteurs d'oxygène réactif (ORIs) 43
2.5.1. Stress oxydatif 43
2.5.2. Réponse oxydative chez *E. coli* et *S. typhimurium*. 45
2.5.2.1. OxyR : le senseur de H_2O_2 47
2.5.2.2. SoxR/S : la chaîne de réponse au superoxyde 48
2.5.3. Réponse aux ORIs chez les bactéries lactiques 48

2.6. Réponse bactérienne à l'acidité 49
2.6.1. Le pH interne (pHint) 49
2.6.2. Influence du pH dans la croissance 50
2.6.3. Dommages produits pendant la croissance à bas pH 51
2.6.4. Homéostasie 52
2.6.5. Rôle physiologique du pHint 56
2.6.6. Régulation du pHint 56
2.6.6.1. Pouvoir tampon du cytoplasme 57
2.6.6.2. Production des métabolites acides ou basiques. 57
2.6.6.3. Système symport de transport de protons 58
2.6.6.4. ATPase translocatrice de protons 59
2.6.7. Expression génique régulée par le pH 61
2.6.7.1. Mécanisme de détection du pH chez les êtres vivants 61
2.6.7.2. Gènes répondant au pH 62
2.6.7.3. Influence de la topologie de l'ADN sur l'expression des gènes régulés par le pH 68
II. Objectifs du travail 71
III. Matériel et Méthodes 73
1. Matériel et Réactifs 73
2. Enzymes 75
3. Souches et milieux de culture 76
3.1. Souches 76
3.2. Milieux de culture 77
3.3. Conditions de culture 77
4. Préparation des extraits bactériens 78
4.1. PAGE-SDS en gradient de polyacrylamide et la PAGE-2D 78
4.2. Purification de protéines. 78
5. Techniques électrophorétiques. 80
5.1. Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS 0,1% (PAGE-SDS). 80
5.2. Électrophorèse PAGE-SDS en gradient de polyacrylamide 81
5.3. Révélation des gels d'électrophorèse. 81

5.4. Électrophorèse bidimensionnelle (PAGE-2D) 82
5.4.1. Protocole expérimental 83
5.5. Transfert des protéines sur membrane (Blot) 86
6. Chromatographie liquide 86
6.1. FPLC d'échange d'ions analytique et préparative 86
6.2. HPLC en phase inverse analytique et préparative 87
7. Interrogation de banques de données et prédiction de structures secondaires 89
8. Spectrométrie de masse 89
8.1. Rappel de définitions 90
8.1.1. La résolution 90
8.1.2. Contribution isotopique, masse monoisotopique, masse chimique 91
8.2. Présentation générale de trois techniques : FAB (Fast Atom Bombardement) ; Électrospray et MALDI-TOF 92
8.2.1. Mode d'ionisation par FAB 92
8.2.1.1. Principe 92
8.2.1.2. Description de la technique 92
8.2.1.3. Nature des ions obtenus 93
8.2.1.4. Analyseur magnétique 94
8.2.2. Mode d'ionisation par électrospray 95
8.2.2.1. Principe 95
8.2.2.2. Nature des ions obtenus 96
8.2.2.3. Interprétation des spectres de peptides. Fragmentation 97
8.2.2.4. Analyseur quadripolaire 97
8.2.2.5. Étalonnage 98
8.2.2.6. Interprétation des spectres 99
8.2.3. Désorption laser (MALDI-TOF) en mode positif 100
9. Protocole de séquence 100

IV. Résultats 102
Chapitre 1. Conditions physiologiques pour l'expression de la famille protéique de 16 kDa chez Streptococcus thermophilus PB18 103
1. Étude de la croissance de PB18 dans les milieux synthétiques TPPY et M17 103
1.1. Mesure de la relation entre la croissance et la biomasse de PB18 103
1.2. Caractéristiques de la croissance de PB18 104
1.3. Paramètres d'acidification de PB18 108
1.4. Résistance de PB18 à un choc acide 110
2. Étude des conditions physiologiques nécessaires à l'expression protéique de la famille protéique de 16 kDa chez PB18 analysée par PAGE-SDS 1D 112
2.1 Analyse du profil protéique des protéines solubles totales de la souche PB18 112
2.2. Effet du pHe sur l'expression de la famille protéique de 16 kDa dans des conditions limitantes en lactose 114
2.3. Étude du choc acide sur PB18 117
2.3.1. Réponse physiologique 117
2.3.2. Autoradiographie des protéines exprimées par *S. thermophilus* après un choc acide 120
3. Nouvelle approche du profil protéique de PB18 par électrophorèse bidimensionnelle 120
3.1. Mise au point de la détermination des paramètres de l'électrophorèse 2D (pI, Mr). 120
3.2. Analyse des profils protéiques en PAGE-2D de PB18 en phase exponentielle et stationnaire de croissance 125
4. Discussion 131
Chapitre 2. Purification des protéines de la famille de 16 kDa. .. 135
1. Fractionnement analytique de la famille protéique de 16 kDa. 135
1.1 Obtention des protéines solubles 135
1.2. Essai de précipitation séquentielle des protéines 136
1.3. Fractionnement des protéines par extraction dans des solutions de sulfate d'ammonium à concentrations décroissantes. 136

1.4. Fractionnement par chromatographie d'échange d'anions (FPLC) 138
2. Fractionnement semi-préparatif de la famille des protéines de 16 kDa. 140
2.1. Mise au point du protocole de sonication pour de grands volumes 140
2.2. Obtention des protéines 142
2.3. Précipitation des protéines au sulfate d'ammonium 143
2.4. Chromatographie d'échange d'anions semi-préparative. 144
2.5. Chromatographie en phase inverse semi-préparative (HPLC, colonne C4) 147
2.6. Vérification de la pureté de la protéine de 16 kDa ... 149
2.6.1. Analyse des fractions purifiées par électrophorèse capillaire 149
2.6.2. Spectres de masse des fractions purifiées.. 149
2.6.3. Analyse de la pureté des fractions par analyse du spectre différentiel U.V. 152
2.6.4. PAGE-SDS 1D des fractions purifiées 154
2.6.5. PAGE 2D des fractions purifiées 155
3. Discussion 156
Chapitre 3. Détermination de la séquence de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* PB18 et analyse informatique 160
1. Séquence de la protéine purifiée par dégradation d'Edman . 161
2. Identification dans les banques de données d'une protéine homologue à la protéine de 16 kDa purifiée de *S. thermophilus* PB18 161
2.1. Recherche de séquences homologues avec la séquence de la protéine de 16 kDa 161
2.2. Analyse de la séquence du plasmide pST1 de *S. thermophilus* 162
3. Utilisation de la séquence en bases pour établir un protocole d'hydrolyse de la protéine de 16 kDa. 166
3.1. Hydrolyse enzymatique de la protéine de 16 kDa 167
3.2. Hydrolyse trypsique 167
3.3. Le cas de l'hydrolyse avec l'endoprotéase Arg-C 167

4. Détermination par spectrométrie de masse Électrospray et FAB et par dégradation d'Edman de la masse moléculaire des peptides issus des hydrolyses protéasiques 169
5. Étude assistée par ordinateur de la séquence de la protéine de 16 kDa purifiée de *S. thermophilus* PB18 173
5.1 Analyse approfondie des homologies de séquence de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* 173
5.2. Recherche de domaines d'homologie de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* 174
5.2.1. Localisation des motifs avec un haut degré d'homologie de séquence en utilisant le logiciel Blockmaker 176
5.2.2. Localisation des motifs avec un haut degré d'homologie de séquence utilisant le logiciel MEME 178
5.2.3. Localisation des domaines avec le logiciel ProDom 180
5.2.4. Localisation des domaines avec le logiciel Prosite 180
5.3. Prédiction de la structure secondaire 184
5.3.1. Alignement des séquences 184
5.3.2. Prédiction de structure secondaire par analyse d'un groupe de séquences alignées 192
5.3.3. Analyse de la séquence de Hsp20 avec la méthode "Hydrophobic Cluster Analysis" (HCA) 194
5.4. Analyse de la séquence du plasmide pNST18 porté par la souche de *S. thermophilus* PB18 197
6. Discussion 201
V. Conclusion et Perspectives 206
VI. Références Bibliographiques 209

Liste des Figures

Introduction

Figure 1. Relations phylogénétiques entre les genres *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* et genres voisins 20
Figure 2. Diagramme général du réseau stimulus-réponse. 26
Figure 3. Régulation de l'expression des gènes de choc thermique chez *E. coli* et *B. subtilis* 30
Figure 4. Pourcentage de dissociation des acides faibles 52
Figure 5. a. Relation entre le pH intracellulaire et le pH extracellulaire de *S. thermophilus* 573 55
Figure 6. Effet du pH extracellulaire sur le pouvoir tampon du cytoplasme 58
Figure 7. Systèmes de transport des solutés chez les bactéries lactiques 60
Figure 8. Modèle hypothétique du contrôle du locus *aniG* 70

Matériel et Méthodes

Figure 1. Obtention des protéines solubles totales pour électrophorèses mono et bidimensionnelle et pour la purification de la protéine de 16 kDa 79
Figure 2. Étapes de l'électrophorèse bidimensionnelle 85
Figure 3. Système de blot semi sec à graphite 88
Figure 4. Schématisation de la résolution dans la spectrométrie de masse. 90
Figure 5. Principe de la désorption-ionisation en FAB. 93
Figure 6. Trajectoire des ions positifs dans un champ magnétique. 94
Figure 7. Trajectoire des ions positifs dans un champ électrostatique. 95
Figure 8. Principe de la désorption d'ions de gouttelettes chargées en ionisation par électrospray 96
Figure 9. Analyseur quadripolaire 98
Figure 10. Calcul de masse à partir du spectre ES en mode d'ionisation positif 99

Résultats

Chapitre 1

Figure 1. Relation entre la D. O. à 650 nm et le dénombrement d'unités formant des colonies de *S. thermophilus* PB18 105
Figure 2. Courbes de croissance et d'acidification de *S. thermophilus* PB18 107
Figure 3. Vitesse d'acidification de *S. thermophilus* dans le milieu TPPY 109
Figure 4. Survie au choc acide de *S. thermophilus* 111
Figure 5. PAGE-SDS des protéines issues de diverses souches de *S. thermophilus* 113
Figure 6. Cinétique de surproduction de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* PB18 114
Figure 7. a. Courbes de croissance de *S. thermophilus* PB18 dans le milieu M17 additionné avec différentes concentrations de lactose 116
Figure 8. Réponse physiologique de *S. thermophilus* PB18 au choc acide 118
Figure 9. PAGE-SDS des protéines solubles totales issues de *S. thermophilus* PB18 après un choc acide avec les acides lactique ou acétique 119
Figure 10. Autoradiographie des protéines synthétisées chez *S. thermophilus* PB18 après un choc acide 121
Figure 11. Détermination de la masse moléculaire dans la PAGE 2D 122
Figure 12. Gamme étalon de masse moléculaire 123
Figure 13. Détermmination du pI dans la PAGE 2D 124
Figure 14. Gamme étalon de pI 125
Figure 15. PAGE 2D des protéines de *S. thermophilus* 126

Chapitre 2

Figure 1. Profils électrophorétiques (PAGE-SDS) des fractions protéiques obtenues après extraction avec des solutions de concentrations décroissantes de sulfate d'ammonium 137
Figure 2. Profil chromatographique de la fraction protéique extraite par 80% de sulfate d'ammonium 139

Figure 3. Profils électrophorétiques (PAGE-SDS) de la fraction protéique obtenue après extraction avec une concentration de 80% de sulfate d'ammonium 139
Figure 4. Séquence de l'extrémité N-terminale de la protéine de 16 kDa 140
Figure 5. Mesure de la quantité de protéines solubles totales cellulaires extraites par sonication. 142
Figure 6. Profils protéiques (PAGE-SDS) des protéines extraites avec des solutions de concentrations décroissantes de sulfate d'ammonium après purification semi-préparative 143
Figure 7. Profil chromatographique des fractions extraites avec des solutions décroissantes de sulfate d'ammonium et après chromatographie semi-préparative 145
Figure 8. Profil électrophorétique (PAGE-SDS) des fractions éluées à 45 - 53 min après chromatographie d'échange anionique 146
Figure 9. Chromatogrammes des protéines de *S. thermophilus* PB18 148
Figure 10. Profil chromatographique obtenu après électrophorèse capillaire de la fraction de temps de rétention 68 min de l'échantillon 80% 150
Figure 11. Spectres de masse des protéines de PB18 contenues dans la fraction de temps de rétention 17 min de l'échantillon obtenu à 55% de saturation de sulfate d'ammonium. 151
Figure 12. Spectre différentiel de la fraction de temps de rétention 17 minutes de l'échantillon 55%. 153
Figure 13. Profils électrophorétiques (PAGE-SDS) des fractions éluées après chromatographie en phase inverse 154
Figure 14. Electrophorèse bidimensionnelle de la fraction de l'échantillon 55 des protéines de PB18 155

Chapitre 3

Figure 1. Séquence de la protéine de 16 kDa à partir de la protéine purifiée 161
Figure 2. Séquence nucléotidique complète du plasmide pST1 163
Figure 3. Schéma de l'analyse de la séquence du plasmide pST1 de *S. thermophilus* No. 29 pour retrouver les cadres ouverts de lecture . 165

Figure 4. Séquence complète de la protéine hypothétique de 16,4 kDa de *S. thermophilus* et stratégie de coupure enzymatique avec la trypsine ou l'endoprotéase Arg-C. 166
Figure 5. Profils chromatographiques en phase inverse (C18) des peptides issus de l'hydrolyse de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* PB18. 168
Figure 6. Récapitulatif de l'identification des peptides de l'hydrolyse de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* PB18 avec la trypsine et l'endoprotéase Arg-C 172
Figure 7 a. Blocs de séquences homologues trouvés par Protomat ... 177
Figure 8. Blocs consensuels dans la séquence des petites Hsp d'après le logiciel MEME 179
Figure 9. Séquence qui présente le domaine 291 de ProDom 182
Figure 10. Protéines répertoriées qui présentent le domaine 291 dans la base de séquences de ProDom 183
Figure 11. Alignement des séquences homologues de la Hsp16 de *S. thermophilus* 185
Figure 12. Alignement optimisé des séquences des petites Hsp homologues de la Hsp16 de *S. thermophilus* 191
Figure 13. Prédiction de la structure secondaire de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* PB 18 193
Figure 14 Comparaison des séquences des Hsp Classe I par la méthode HCA 195
Figure 15. Plasmides de *S. thermophilus* codant pour la protéine de 16 kDa 198
Figure 16. Comparaison des séquences GR1, GR2, GR3 et GR4 avec la séquence du plasmide pST1 199

Liste des Tableaux

Introduction

Tableau. 1. Caractéristiques physiologiques de *S. thermophilus*..... 21
Tableau 2. Protéines de stress décrites actuellement..... 29
Tableau 3. Effet de la chaleur et de divers agents "thermomimétiques" sur la néosynthèse des protéines de choc thermique (Hsps) et le développement de la thermotolérance chez *Lc. lactis* 31
Tableau 4. Principales caractéristiques des gènes de choc thermique clonés et séquences chez *Lactococcus lactis*..... 33
Tableau 5. Séquences nucléotidiques remarquables et conservées chez les gènes de choc thermique de *Lactococcus lactis* 34
Tableau 6. Comparaison de la réponse aux stress chaud et froid chez *Escherichia coli* 39
Tableau 7. Protéines induites par le stress hypothermique chez *Escherichia coli* 40
Tableau 8. Gènes contrôlés par *rpoS* chez *Escherichia coli*..... 44
Tableau 9. Réactivité des ORIs avec des molécules organiques 46
Tableau 10. pH optimal des enzymes intracellulaires de bactéries lactiques..... 54
Tableau 11. Gènes régulés par le pH..... 63

Chapitre 1

Tableau 1. Comparaison des paramètres (D.O.) entre les milieux M17 et TPPY pour *S. thermophilus* PB18 108
Tableau 2. Protéines de *S. thermophilus* PB18 spécifiquement produites lors de la phase de croissance 128
Tableau 3. Protéines de *S. thermophilus* PB18 dont le taux d'expression est au moins cinq fois plus grand dans la phase exponentielle que dans la phase stationnaire 129

Tableau 4. Protéines de *S. thermophilus* PB18 dont le taux d'expression est au moins cinq fois plus grand dans la phase stationnaire que dans la phase exponentielle 130

Chapitre 2

Tableau 1. Récapitulatif de la purification de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* PB18 141
Tableau 2. Récapitulatif des résultats de la pureté de la protéine de 16 kDa après HPLC préparative 150
Tableau 3. Rapport Tyr/Phe de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* PB18 152

Chapitre 3

Tableau 1. Récapitulatif des résultats de la détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse des peptides issus de l'hydrolyse trypsique 170
Tableau 2. Récapitulatif des résultats de la détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse des peptides issus de l'hydrolyse avec l'enzyme Endo-Arg-C 171
Tableau 3. Récapitulatif des résultats de la recherche de séquences homologues à la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* PB18 par TBLASTN, TFastA et SSearch..... 175

I. Synthèse bibliographique

1. Une bactérie thermophile : *Streptococcus thermophilus*

1.1. Caractéristiques générales - Systématique

Les bactéries lactiques représentent un ensemble de bactéries d'importance économique considérable soit parce que ces bactéries interviennent dans la fermentation de produits agro-alimentaires, ou comme agent d'altération de ces produits, soit par le caractère hautement pathogène de certaines espèces pour l'homme ou les animaux (Parker, 1978; Wilson & Salt, 1978), en particulier du genre *Streptococcus*.

Ce groupe, hétérogène, est traditionnellement scindé depuis Orla-Jensen (1919) en deux sous-ensembles : les espèces en coques et celles en bâtonnets. Celles-ci sont à leur tour différenciées selon le type de produits finaux de fermentation des glucides, entre bactéries homo et hétérofermentaires (Dellaglio *et al.*, 1994).

Le genre *Streptococcus* a regroupé pendant longtemps l'ensemble des bactéries lactiques en coques homofermentaires. Récemment, ce groupe a éclaté en plusieurs genres (Schleifer *et al.*, 1985), dont certains comme le genre *Enterococcus* est phylogénétiquement éloigné des autres cocci lactiques. Le genre *Streptococcus* représente actuellement 38 espèces dont la plupart sont importantes sur le plan de la santé (Holt *et al.*, 1994) .

S. thermophilus est une bactérie lactique thermophile, principalement utilisée en technologie laitière, d'une part en fabrication fromagère, en particulier pour les fromages à pâte pressée cuite, d'autre part et surtout pour la production des yaourts et autres laits fermentés. Cette bactérie se présente sous forme de cellules sphériques ou ovoïdes de 0,9 à 1,7 nm de

diamètre, groupées en paires ou en longues chaînes. Elle est homofermentaire et produit de l'acide lactique L(+), et se caractérise par : l'absence d'antigène connu ; sa température de croissance minimale de 19-21 °C et optimale de 42-43 °C ; sa résistance à un chauffage à 60 °C pendant 30 minutes ; son inaptitude à croître en présence de 4 % de NaCl (souvent même à 2%), ainsi qu'à pH 9,6 et un profil fermentaire des glucides très limité.

1.2. Position taxonomique et écologie

La position taxonomique de *S. thermophilus* a été très controversée. Les études d'hybridation ADN/ARN (Garvie & Farrow, 1981) l'ont regroupé avec *S. acidominimus*, *S. agalactiae* et *S. dysgalactiae*, tandis que Kilpper-Bälz *et al.*, (1982) l'ont rapproché de *S. salivarius*.

Bien que *S. thermophilus* possède un peptidoglycane du type Lys, Ala-2,3 comme *Enterococcus faecalis* et un pourcentage en G+C (37-40%) proche de celui des entérocoques et des lactocoques, son ADN ne s'associe qu'à un niveau très bas (10%) avec celui des autres coques, à l'exception de *S. salivarius*. De plus, des études de composition en acides gras à longues chaînes (Farrow & Collins, 1984) et l'existence d'une forte homologie des profils de restriction des ADNs de *S. salivarius* et *S. thermophilus* (Colmin *et al.*, 1987), ont fait classer transitoirement *S. thermophilus* comme une simple sous-espèce de *S. salivarius*. Depuis, d'autres études d'hybridations ADN-ADN ont montré 60% d'homologie en conditions optimales, contre seulement 30% en conditions stringentes (Schleifer & Kilpper-Bälz, 1987). Ces dernières données, ainsi que le taux de divergence nucléotidique des gènes d'ARNr 16s entre ces deux espèces, qui est supérieur à celui habituellement rencontré à l'intérieur d'une même espèce de streptocoques (Bentley *et al.*, 1991), et des biotopes

distincts (la bouche, le tractus intestinal pour *S. salivarius* et les laits chauffés pour *S. thermophilus*), ont amené à réhabiliter *S. thermophilus* comme une espèce à part entière (Schleifer *et al.*, 1991). La Figure 1 montre les relations phylogénétiques actuellement admises dans le groupe des bactéries lactiques.

1.3. Physiologie générale de *S. thermophilus*

La physiologie de *S. thermophilus* est relativement différente des autres bactéries lactiques. Un résumé des caractéristiques physiologiques principales est présenté dans le Tableau 1. Une description plus précise du métabolisme de *S. thermophilus* sera exposée par la suite.

1.3.1. Métabolisme des glucides

L'espèce *S. thermophilus* transforme le lactose du milieu en acide lactique isomère L(+), par la voie de Embden-Meyerhorf-Parnas. Elle transporte le lactose dans la cellule par un système de perméase, celui-ci sera clivé par une enzyme de type β–galactosidase (EC 3.2.1.23). Le système de transport de peptides dépendant de phosphoénolpyruvate (PEP-PTS) plus la β-P-galactosidase, typique des streptocoques du groupe N, ne semble pas être utilisé. Le gène codant pour la protéine responsable du transport du lactose (*lacS*) a été cloné et séquencé. La partie C-terminale est hydrophile et s'apparente à l'Enzyme III du PEP-PTS. Ce domaine peut être phosphorylé *in vitro* en présence de PEP, de l'Enzyme I et de HPr purifiées

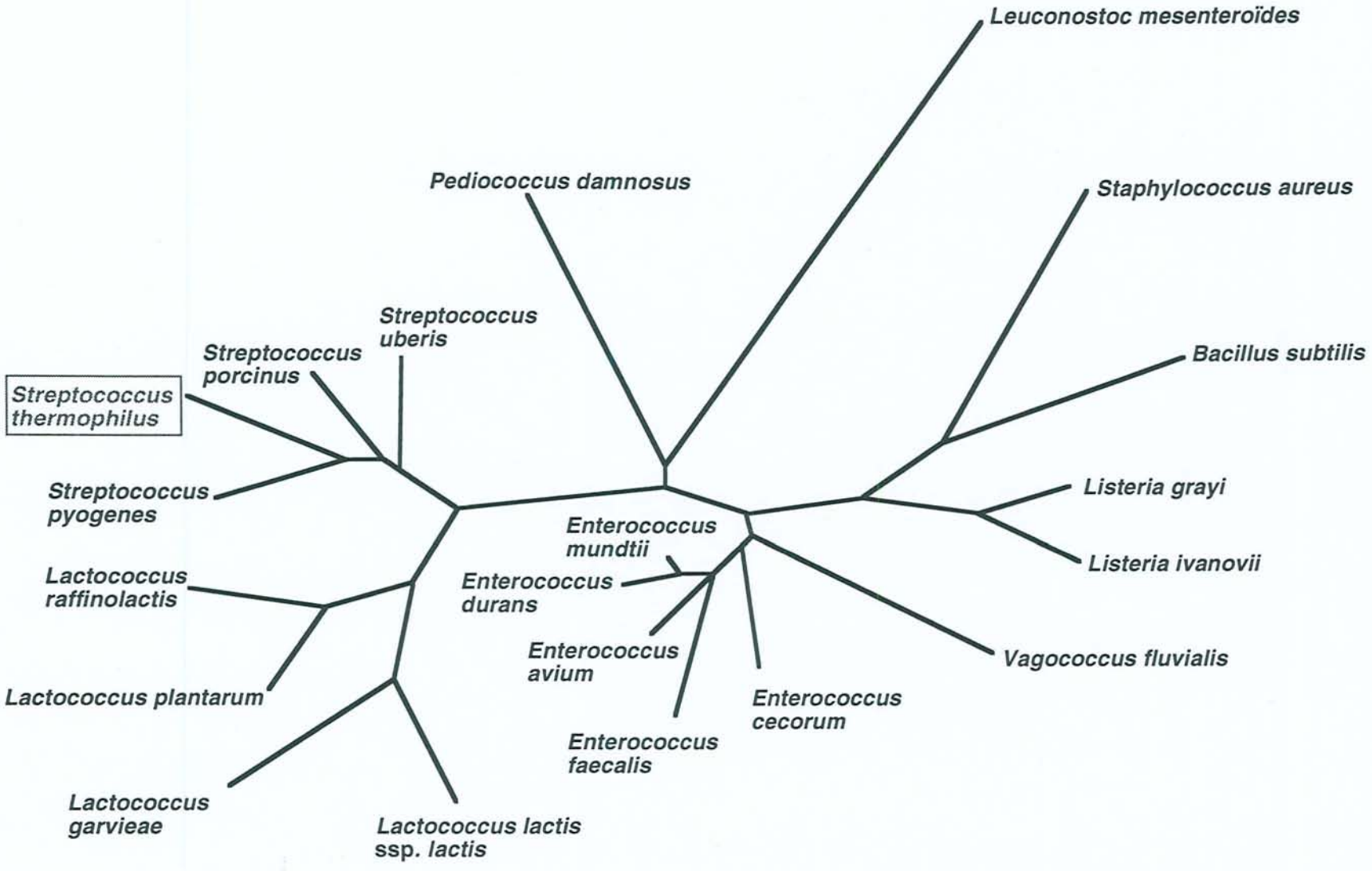


Figure 1. . Relations phylogéniques entre les genres *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* et genres voisins. Arbre sans racine établi par comparaison des séquences des ARN 16S (d'après Collins *et al.*,1989)

Tableau. 1. Caractéristiques physiologiques de *S. thermophilus* (d'après Garvie, 1984; Jones, 1978; Lancefield, 1933; Schleifer *et al.*, 1985).

	Groupe Sérologique	Pas d'antigène de Lancefield
	% GC de l'ADN	37-40
	Lactate	L (+)
	Lactate déhydrogènase	L (+)
	Croissance	15-45 °C pH = 5-8
	Pas de croissance	10°C ou 2% NaCl
	Lait tournesolé	Acidifié-coagulé non réduit rapidement
Utilisation :	L-Arginine	-
	Urée	+ (en phase exponentielle de croissance)
	Citrate	-
	Esculine	-
	Glucose	+
	Fructose	+
	Lactose	+
	Saccharose	+
	Galactose	+/-
	Mannitol, Xylitol	-
	Arabinose, Ribose	-
	Tréhalose, Maltose	-
	Raffinose	-/+
	Mélézitose	-
	Dextrines	-
	Glycérol	-
	Salicine	-

\+ : > 90% de souches positives
+/- : plus de 50 % de souches positives
-/+ : moins de 50 % de souches positives
\- : négatif

provenant d'autres bactéries à Gram positif (Thompson & Gentry-Weeks, 1994). Le transport du lactose se produit selon un mode "antiport" lactose-galactose, indépendant de la force motrice protonique ou pmf.

Seules certaines souches de *S. thermophilus* peuvent fermenter le galactose et ceci, seulement quand le lactose n'est pas disponible et que la répression catabolique est annulée. Les souches les plus importantes du point de vue industriel sont incapables d'utiliser le galactose (Dellaglio *et al.*, 1994);.

Très peu de souches de *S. thermophilus* possèdent des plasmides et en particulier, il n'a pas été décrit de plasmide codant pour la dégradation du lactose, le gène de la β–galactosidase est chromosomique et il a été cloné et séquencé (Herman & McKay, 1987; Schroeder *et al.*, 1991).

1.3.2. Métabolisme azoté

De même que la majorité des bactéries lactiques, *S. thermophilus* requiert une source de petits peptides et des acides aminés libres. La fraction azotée de faible masse moléculaire du lait est très importante pour le développement de *S. thermophilus* même s'il existe des grandes différences entre les souches. En plus du besoin en acides aminés essentiels, chez *S. thermophilus* certains acides aminés non-essentiels comme la valine, la méthionine, la leucine et le tryptophane, sont requis pour stimuler la croissance. La présence des protéases indigènes du lait stimulent *S. thermophilus*, car cette espèce ne possède pas une activité protéasique élevée, elle ressemble plutôt aux variants Prt^- de *Lc. lactis* (Monnet & Gripon, 1994). La relation symbiotique que *S. thermophilus* entretient avec *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* repose sur la production d'une protéase extracellulaire par le lactobacille et par conséquent, la

production de petits peptides ; en retour, *S. thermophilus* produit du formiate et du dioxyde de carbone qui sont nécessaires pour le développement de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* .

1.3.3. Production de polysaccharides exocellulaires

Plusieurs souches de *S. thermophilus* sont capables de produire des polysaccharides exocellulaires. La production de polysaccharides exocellulaires est souvent estimée indirectement par le développement de la viscosité ou de la consistance (Bouillanne & Desmazeaud, 1980). Le phénotype de production des polysaccharides est instable et n'est pas encore entièrement élucidé : perte d'un plasmide (Vescovo *et al.*, 1989), activation d'enzymes du type glycosidases (Cerning *et al.*, 1988).

2. Facteurs environnementaux influençant le développement d'un micro-organisme : rôle du stress.

Le métabolisme d'une cellule vivante est l'ensemble des réactions de dégradation (catabolisme) et de synthèse (anabolisme) permettant d'établir un cycle d'échanges avec le milieu environnant pour assurer sa survie, sa croissance et sa reproduction (Desmazeaud & de Roissart, 1994). Cette suite de réactions est un ensemble coordonné qui met en jeu les machineries génétiques et biochimiques cellulaires. La cellule vivante se trouve donc normalement, dans un état d'équilibre dynamique où la cellule se développe et se reproduit. Si dans le milieu extérieur arrive une modification physique ou chimique brusque, la bactérie s'éloigne de son point d'équilibre et à ce moment précis, l'organisme est victime de stress.

Les bactéries montrent une étonnante capacité de survie et de développement dans des environnements hostiles. Beaucoup de micro-organismes ont adapté leur style de vie pour vaincre les environnements néfastes : thermophiles, halophiles ou acidophiles. Dans un groupe donné, la gamme des valeurs d'une variable environnementale peut être très grande. Cependant, la tolérance ne peut être poussée au maximum que si les cellules disposent d'un temps suffisant pour s'adapter à ces conditions extrêmes. Les conditions nuisibles pour les bactéries et la façon dont la bactérie réagit pour survivre ont été étudiées, notamment les changements de température, de pH et de force ionique, les agents qui endommagent l'ADN ou ceux qui sont oxydants.

2.1. La chaleur comme facteur de stress.

Le premier stress décrit au niveau cellulaire est le choc thermique observé pour la première fois en 1962, par Ritosa (1962), chez la *Drosophile.* Les larves de cette mouche présentent un changement dans les boursouflures des chromosomes en réponse à une hausse de température. Aujourd'hui, nous savons que ces gonflements sur les chromosomes polytènes des glandes salivaires de diptères correspondent à une intense activité transcriptionnelle, donc les nouvelles boursouflures représentent la synthèse de protéines inhabituelles (Tissieres *et al.*, 1974), qui furent appelées *heat shock proteins* ou Hsps. Ce bouleversement du spectre protéique, consécutif à une augmentation de température, fut reconnu chez de nombreuses espèces animales ou végétales avant d'être identifié chez *Escherichia coli* (Lemaux *et al.*, 1978; Yamamori *et al.*, 1978). La réponse à la chaleur, comme toute autre réponse déclenchée par un stress

physico-chimique, permet aux organismes de mettre en place des dispositifs physiologiques temporaires qui assurent un ajustement des voies métaboliques aux nouvelles contraintes ou menaces de l'environnement. Ces réponses sont bénéfiques car elles confèrent aux organismes la capacité de survivre, du moins transitoirement, à des conditions ou épreuves létales, homologues ou proches de celles qui en ont commandé le déclenchement. Cette capacité à survivre est nommée tolérance. La production des Hsps et la tolérance coexistent mais la question est de savoir si la deuxième est l'effet de la première ou non ; cette question n'est pas encore complètement résolue (Boutibonnes *et al.*, 1992). Les deux composants de la réponse au stress thermique sont universels, ils sont présents chez tous les êtres vivants et chez toutes les cellules en culture. En fait, il s'agit d'un "réseau stimulus-réponse", terme qui désigne les groupes de protéines ou gènes co-régulés sans distinguer les détails dans sa régulation (VanBogelen & Neidhardt, 1990a) (Fig. 2).

La réponse au choc thermique se déroule d'une façon très similaire chez tous les organismes et fait intervenir :

1. Un agent "stresseur" ou stimulateur, la chaleur ou tout autre agent thermomimétique tel que :

- l'alcool ;
- certains antibiotiques comme la puromycine, qui interrompt l'élongation de la chaîne polypeptidique et forme des protéines anormales ;
- des analogues d'acides aminés, comme l'azétidine analogue de la proline ou la canavanine, proche de l'arginine ;
- les agents chaotropiques, qui affectent le repliement régulier des protéines ou occasionnent la formation d'agrégats (la caféine, la coumarine, l'acétylsalicylate).

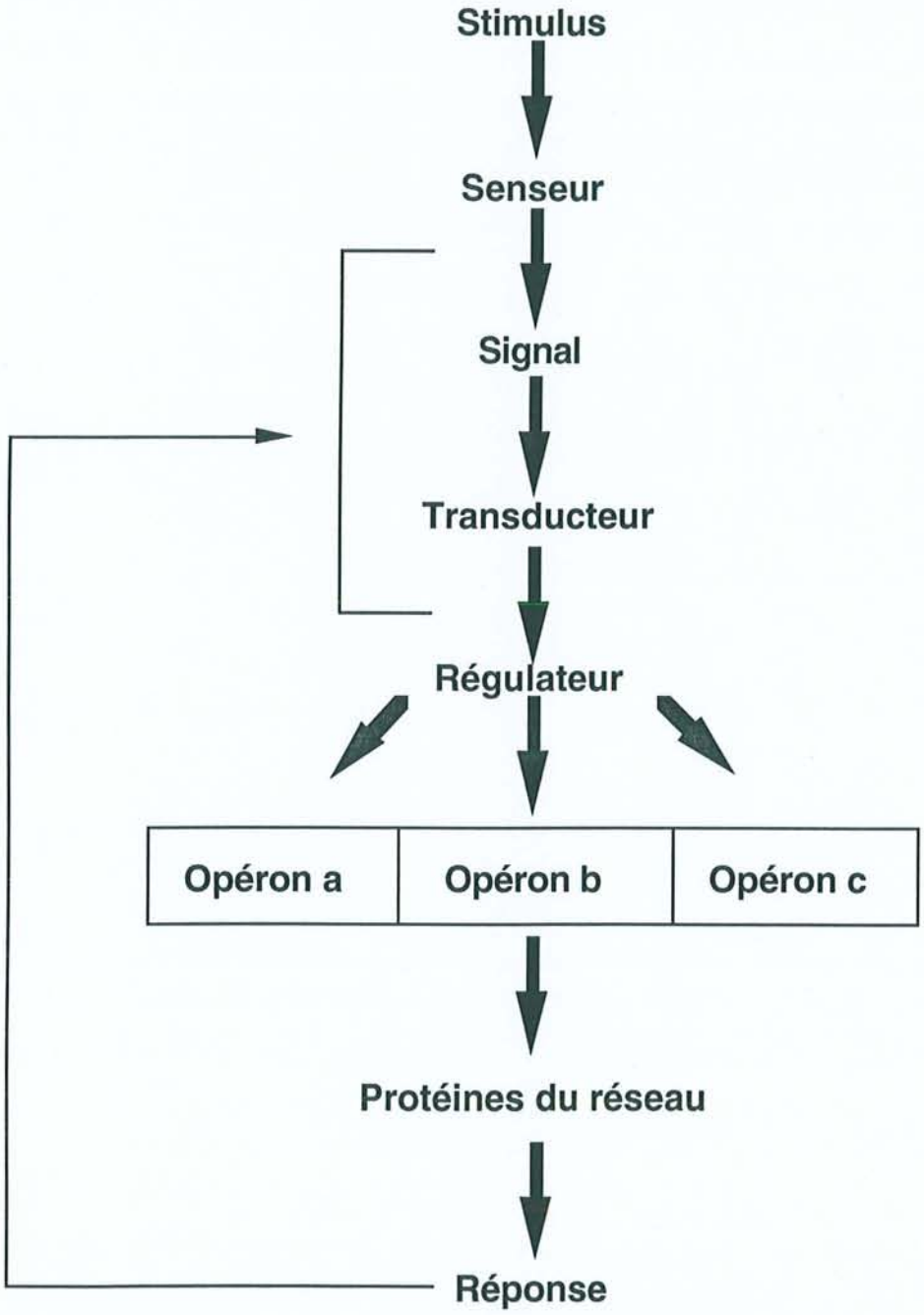


Figure 2. Diagramme général du réseau stimulus-réponse. Le diagramme commence avec un stimulus de l'environnement et il décrit les voies de la réponse. Le senseur est la cible cellulaire touchée par le stimulus. Le signal est généré par le senseur, le transducteur transmet le signal au régulateur qui à son tour modifie la synthèse ou l'activité du régulateur. Le régulateur contrôle la production de molécule(s) cellulaire(s). La réponse est normalement une adaptation aux conditions environnementales et l'arrêt de la réponse dépend du nouvel équilibre trouvé par la cellule (d'après VanBogelen & Neidhardt, 1990a).

2. Un capteur ou "senseur" qui est la cible cellulaire sensible.

3. Un effecteur responsable de la bascule transcriptionnelle qui conduit à la "différenciation métabolique".

4. Des modulateurs ou régulateurs négatifs qui tempèrent l'amplitude de la réponse.

La réponse est rapide et transitoire : elle se manifeste quelques minutes après le choc mais elle est de courte durée. En général 1 ou 2 h après le déclenchement du dispositif, les organismes ou les cellules retournent à un état de repos qui est une nécessité, pour pouvoir répondre à une nouvelle sollicitation du milieu extérieur.

La réponse au choc thermique est sûrement apparue très tôt dans l'évolution puisque les mêmes protéines présentent, au moins dans leurs zones fonctionnelles, les mêmes structures. Elles diffèrent dans leurs masses moléculaires mais assurent les mêmes fonctions même si elles reçoivent des noms différents (Tableau 2), : le repliement correct des protéines immatures, la restauration de la conformation native des structures endommagées par des agents dénaturants, l'hydrolyse des protéines inutilisables et des fonctions diverses qui ne sont pas encore bien élucidées.

Le modèle de régulation de la réponse au choc thermique le mieux connu à l'heure actuelle est celui d'*E. coli* (Fig. 3a) (Boutibonnes *et al.*, 1992), Les bactéries lactiques ne semblent pas avoir les mêmes mécanismes de régulation qu'*E. coli* mais présentent des similitudes avec ceux de *Bacillus subtilis* (Arnosti *et al.*, 1986). Ce mécanisme de régulation, moins élaboré, est peut-être plus archaïque (Fig. 3b).

2.2. Le stress chaud chez les bactéries lactiques

Chez les bactéries lactiques, l'espèce qui a été la plus étudiée vis-à-vis des thermomimétiques et de la thermotolérance est *Lc. lactis* (Tableau 3). Nous observons qu'à l'exception de la chaleur elle-même, et à un moindre degré, l'alcool puis la puromycine et des antibiotiques, la plupart des inducteurs froids de la synthèse des Hsps, reconnus dans la littérature, sont sans effet chez *Lc. lactis*. A l'inverse, la majorité d'entre eux déclenchent un processus physiologique indépendant : la thermotolérance.

2.2.1. Régulation de la synthèse des protéines de choc thermique chez *Lactococcus lactis*.

Sept gènes des Hsps majeures ont été clonés, puis séquencés chez *L. lactis* (Tableau 4). Ces gènes peuvent être isolés ou groupés en petits opérons, qui rappellent ceux d'*E. coli* (*groEL-ES*), (Kim & Batt, 1993), de *B. subtilis* (*grpE-dnaK*) (Barril *et al.*, 1992), ou des deux espèces (*rpoD-dnaE*) (*B. subtilis*) ou (*rpoD-dnaG*) (*E coli*). Cependant, chez *Lc. lactis* l'opéron *dnaK* comprend deux autres cadres ouverts de lecture (Eaton *et al.*, 1993), de plus, *dnaJ*, habituellement couplé à *dnaK* fait défaut ici (Van Asseldonk *et al.*, 1993).

L'alignement des séquences en acides aminés des produits des gènes clonés, avec celles des protéines homologues de diverses espèces bactériennes, démontre une homologie importante. Cependant, chez *Lc lactis* comme chez les autres bactéries à Gram positif, on note la délétion de certaines régions (Boutibonnes, 1996).

Tableau 2. Protéines de stress décrites actuellement (d'après (Becker & Craig, 1994; Gething & Sambrook, 1992; Parsell & Lindquist, 1993)

Groupe	Dénomination spécifique				
	E. coli (Cy)	*S. cerevisiae*	*Drosophila*	Mammifères	Végétaux
Hsp100	ClpB (Cy)	Hsp104 (Cy)			
Hsp90	HtpG (Cy)	Hsp83 (Cy) Hsc83 (Cy)	Hsp90 (Cy)	Hsp90 (Cy) Grp94 (Re)	
Hsp70	DnaK (Cy)	Ssa1-4p (Cy)	Hsp68 (Cy) Hsp70 (Cy) Hsc1,2,3 (Cy)	Hsp70 (Cy) Hsc70 (Cy) BiP (Re) Hsp70 (Mi)	
Hsp60	GroEL (Cy)	Hsp60 (Mi)		Hsp60 (Mi)	RuSBP (Cl)
Hsp10	GroEs (Cy)	HSP10 (Mi)		Hsp10 (Mi)	Cpn10 (Cl)

BiP : *Binding protein* (protéine d'union)
Cpn : Chaperonine
Grp : *Glucose-related protein* (Protéine reliée au glucose)
Hsc : *heat shock cognate* (
Hsp : *heat shock protein* (Proteine de choc thermique)
RuSBP : *Rubisco subunit binding protein* (Protéine d'union à la Rubisco)
Le numéro à droite du nom indique la masse moléculaire relative de la protéine

Cy : Cytosol
Re : Réticulum endoplamique
Mi : Mitochondies
Cl : Chloroplastes

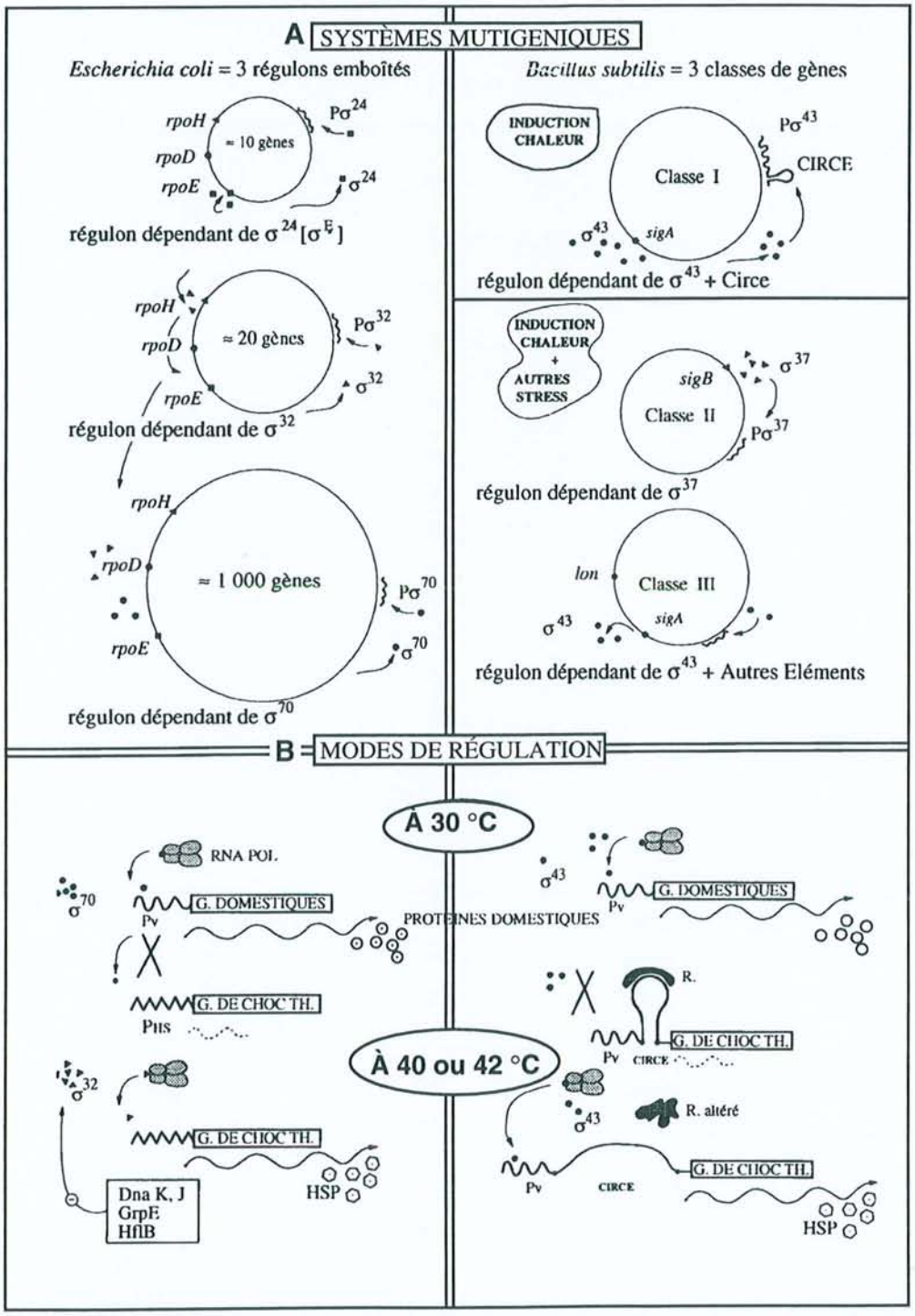


Figure 3. Régulation de l'expression des gènes de choc thermique chez *E. coli* et *B. subtilis*. a. Systèmes multigéniques impliqués dans la réponse au choc thermique chez ces 2 espèces. b. Modes de régulation de l'expression des gènes (d'après Boutibonnes, 1996).

σ70 (*rpoD*) ; σ32 (*rpoH*) ; σE (*rpoE*) ; P : ARN-polymérase ; Pv : promoteur végétatif dépendant de σ70 (E. coli) ou de σ43 (*B. subtilis*) ; Phs : promoteur de choc thermique reconnu par σ32 ; CIRCE : séquence IR (inversion répétée) constituant l'élément de choc thermique de *B. subtilis* ; R : protéine "répresseur" hypothétique ; G : gène.

Tableau 3. Effet de la chaleur et de divers agents "thermomimétiques" sur la néosynthèse des protéines de choc thermique (Hsps) et le développement de la thermotolérance chez *Lc. lactis*. (Modifié d'après Boutibonnes, 1996)

Agents	Amplification				FT
	DnaJ	GrpE	GroEL	Hsp104	
Température 42°C	+++	++	+++	+++	+++
Alcool [2 ou 4 % (v/v)]	+	+	++	+/-	++
Puromycine	-	++	++	0	++
Streptomycine	+	++	+++	0	-
Kanamycine	+/-	-	++	0	-
Erythromycine	+	0	+	0	-
Spiramycine	+	0	++	0	-
Choramphénicol	-	0	-	0	-
Azétidine	-	0	+	0	+
Canavanine	-	0	+	0	+
Chlorure de cadmium	0	0	+	++	+++
Chlorure mercurique	0	0	-	-	+
Azide de sodium	0	0	-	-	+++
β-mercaptoéthanol	0	0	+	++	++
Phase stationnaire	-	-	-	-	++

-, pas d'amplification ; +, amplification visible ; ++, amplification ≥2 ; +++, amplification ≥ 3 ; 0, recherche omise ; FT, facteur de thermotolérance

Les orf de *Lc. lactis* (Tableau 5) sont précédées par :

- un promoteur végétatif présentant des séquences -35 et -10 caractéristiques (TTGACA et TAAAAT) (Eaton *et al.*, 1993) ;
- une répétition inversée, (IR) de 9 à 12 pb formant une structure en tige-boucle identique à celle repérée chez *B. subtilis* et chez d'autres bactéries à Gram positif (Eaton *et al.*, 1993) ;
- un site de fixation des ribosomes (Shine-Dalgarno) complémentaire de l'ARN 16S.

Par contre, aucun ne montre le motif consensuel qui signe l'existence d'un promoteur reconnu par un facteur sigma alternatif, comme σ^{32} ou σ^{24} (σ^{E}) d'*E. coli* (Lindquist, 1986).

Compte tenu de la parenté phylogénétique et des quelques éléments actuellement connus, la régulation de la réponse au choc thermique chez les bactéries lactiques ressemble plus à celle de *B. subtilis*. Ce mécanisme de régulation est basé sur des promoteurs canoniques, reconnus par le facteur σ^{43} (homologue de σ^{70} d'*E. coli*), qui ont été identifiés en amont d'un groupe de gènes thermorégulés de classe I, et une séquence inversée répétée de 9 pb appelée CIRCE (*Controlling IR of Chaperone Expression*), séquence inversée répétée contrôleuse de l'expression des chaperonnes (Zuber & Schumann, 1994). Cette séquence est habituellement intercalée entre le signal de transcription et le début du cadre ouvert de lecture. La fixation d'une protéine répresseur sur ce motif limiterait ou interdirait l'expression du gène. Ce même répresseur constituerait le capteur qui, par un changement de conformation, provoquerait son détachement de l'IR et donc permettrait la transcription du gène correspondant (Yura *et al.*, 1993; Zuber & Schumann, 1994). La régulation négative de la réponse au choc thermique chez *B. subtilis* n'est encore pas très bien connue. L'hypothèse la plus généralement acceptée est que le système CIRCE-Répresseur

Tableau 4. Principales caractéristiques des gènes de choc thermique clonés et séquencés chez diverses souches de *Lactococcus lactis*.

Gènes	Souches de *Lc. lactis*	Orf (nombre de nt)	Nombre d'acides aminés	MM calculée Da (a)	Promoteur de choc thermique	Promoteur végétatif (b)	Séquence IR (b)	Séquence de Shine-Dalgarno (RBS) (b)	Organisation en opéron	Homologie (%)	Auteurs
dnaJ	NIZO R5	1173	379	40786	-	+	+	+	*orf 2* *dnaK*	45,2 Ec 37,5 Mt 57,0 Bs	(Van Asseldonk *et al.*, 1993)
dnaK	MG 1363 LM 0230	1824	602 (607)	64900	-	+	+	+	*orf1-grpE-dnaK-orf4*	57,0 Ec 77,0 Bs 77,4 Bm 66,1 Cq	(Eaton *et al.*, 1993) (Barril *et al.*, 1992)
groEL	CC 9	1629	542	nd	-	+	-	+		71,2 Bs	(Kim & Batt, 1993)
groES	CC 9	285	94	nd	-	+	+	+	*groES-groEL*	48,9 Bs	
grpE	MG 1363	540	179	20600	-	+	+	+	*orf1-grpe* *dnaK-orf4*	47 Ec 36 Sc	(Eaton *et al.*, 1993)
hflB *(ftsH)*	CH CC 286	2088	696	nd	-	+	+ (+T) (d)	+	près de *htp*	60,8 Ec	(Nilsson *et al.*, 1994)
rpoD	ATCC 19435	1020	340	38884	-	+	T	+		60,8 Ec	(Araya *et al.*, 1993)
	NCD 763			38872				+	*dnaE-rpoD*	64,9 Bs 54,7 Ec 64,1 Bs 67,6 Sa	(Gansel *et al.*, 1993a; Gansel *et al.*, 1993b)

nt : nucléotides ; (a) nd : non déterminé par les auteurs ; (b) voir tableau suivant ; (c) Bm : *Bacillus megaterium* ; Bs : *Bacillus subtilis* ; Ca : *Clostridium acetobutilicum* ; Ec : *Escherichia coli* ; Mt : *Mycobacterium tuberculosis* ; Sc : *Saccharomyces cerevisiae* ; Sa : *Staphylococcus aureus* ; (d) T : terminateur

Tableau 5. Séquences nucléotidiques remarquables et conservées chez les gènes de choc thermique de *Lactococcus lactis*.

Gènes (a)	Promoteur végétatif			Séquence inversée répétée (IR)	Séquence de Shine-Dalgarno (RBS)
	-35		-10		
dnaJ	5' TTGCA	17 pb)	TAAAT 3'	AATTAGCACTCTT (5 pb) AAGAGTGGTA	AAAGGA
dna grpEK	5' TTGACa	(17 pb)	TATAAT 3'	TTAGCACTC (11 pb) GAGTGCTAA + terminateur indépendant de rho AAAAAAGTACTGA (8 pb) TCAGTACTTTTTT	(AA) AGGAG
groES-EL	5' TTGCCA	(17 pb)	TAAAAT 3'	GTTAGCACTC (9 pb) GACTGCTAA	GGAGG
hflB	5' ATTAGCA	(12 à 16 pb)	TATAA 3'	TTTAG (4 pb) CTAAA + terminateur indépendant de rho AAACAGCC (5 pb) GGCTGTTT	AGGA
rpoD	5' TTATGA	(16 pb)	TATATT 3'	terminateur indépendant de rho AAAACTTACTGA (8 pb) TCAGTAACTTT	GAAG (-6) AGAA (?) (-3) AAAGG (?) (-5)

Les séquences se rapportent aux gènes dans le Tableau 4.

interagit à nouveau et interrompt la production des Hsps (Boutibonnes, 1996). Cependant, il a été proposé une autre voie originale de contrôle impliquant à la fois RecA et HflB, par une réaction en cascade. L'intervention de HflB sous-entend la médiation par un facteur σ alternatif de type σ^{32}, qui, jusqu'à ce jour, n'a pas été identifié (Duwat *et al.*, 1995).

2.3. Le froid comme facteur de stress

Les premiers études ont porté essentiellement sur les eucaryotes. La réponse au stress hypothermique se traduit par l'arrêt ou la diminution de la synthèse des protéines basales et par l'expression de protéines spécifiques qui, chez les eucaryotes, ont des rôles très différents :

- maturation des ARN ribosomaux chez la levure ;
- induction de pigments chez certains mammifères ;
- acclimatation au froid de certaines plantes.

2.3.1. Effet de la baisse de température chez *E. coli*

Les premières études faites avant les années 1980 montrent que la traduction n'est plus initiée à 8°C. A cette température, la phase d'élongation de la traduction se produit mais il n'y a plus de nouvelle initiation de cette traduction (Broeze *et al.*, 1978; Friedman *et al.*, 1971). La traduction est donc bloquée et les ribosomes et les ARN messagers libres s'accumulent. Cependant, si on transfère une culture d'*E. coli* en phase exponentielle de croissance de 37°C à 10°C, la croissance reprend après une période de latence de 4 heures mais avec un temps de

génération de 24 heures (Jones *et al.*, 1987), beaucoup plus long que celui habituellement obtenu (30 minutes).

De la même manière que le choc thermique chaud, le choc froid déclenche une réponse du niveau des protéines synthétisées mis en évidence par l'analyse des profils électrophorétiques des protéines totales solubles. Ainsi, on peut observer :

- l'induction de plusieurs protéines appelées **protéines de choc froid** (Csps, *cold shock proteins*) ;
- la surexpression des protéines impliquées dans la transcription et la traduction ;
- la répression des Hsps.

La réponse atteint son maximum durant les trois premières heures qui suivent le passage de 37°C à 10°C, ensuite, il y a une reprise de la synthèse protéique habituelle et de la croissance. L'écart de température optimal pour déclencher la réponse au choc froid est de 13°C et l'amplitude de l'induction est proportionnelle à l'écart de température. Il semble clair que la réponse au choc froid (la synthèse de nouvelles protéines) soit une réponse adaptative qui facilite l'expression de certains gènes impliqués dans la transcription et la traduction. (Jones & Inouye, 1994).

De manière similaire aux thermomimétiques pour le choc chaud, on trouve des agents qui miment le froid. Ce sont principalement, les antibiotiques de type C (chloramphénicol, tétracyclines, érythromycine, acide fusidique) (Jiang *et al.*, 1993), qui produisent dans la cellule :

- baisse de la capacité de traduction ;
- stimulation de la formation des ribosomes ;
- répression des Hsps ;
- induction des Csps.

Dans les deux cas, il semblerait que les ribosomes jouent le rôle de cibles qui détectent et déclenchent la réponse au froid (VanBogelen & Neidhardt, 1990b). La possible fonction de la réponse au choc froid est de surmonter l'inhibition de la traduction en augmentant la capacité traductionnelle de la cellule (Jiang *et al.*, 1993). La comparaison des stress chaud et froid chez *E. coli* est faite dans le Tableau 6.

Les protéines induites par le choc froid augmentent leurs taux d'expression de 2 à 200 fois, ceci, de deux heures à deux heures et demie après le choc (VanBogelen *et al.*, 1987). Parmi ces protéines certaines sont identifiées et elles ont toutes un rôle soit dans la transcription, soit dans la traduction. Ces protéines sont indiquées dans le Tableau 7.

La régulation de la réponse au choc froid est basée sur celle de la protéine CspA qui est la Csp la plus étudiée. Cette protéine a une masse moléculaire de 7,4 kDa et sa synthèse est multipliée par 200 pendant les 2 heures qui suivent le choc froid (Jones *et al.*, 1987). La séquence de la CspA est connue et révèle un domaine RNP1 qui est un domaine de fixation aux acides nucléiques. Cela confère à CspA une forte homologie avec des protéines humaines qui se lient à l'ADN comme DbpA et B ou YB-1 qui se fixent à une séquence CCAAT des gènes HLA de classe II (Wistow, 1990). Bien qu'aucun facteur de transcription σ particulier n'ait été mis en évidence, la régulation de l'expression de la protéine CspA semble se faire au niveau transcriptionnel par un système d'activation (Jiang *et al.*, 1993). Dans ce système, la région promoteur -73 -35, à température normale (37°C) n'est pas occupée par l'activateur, qui, bien qu'il soit synthétisé de façon constitutive, n'a pas d'affinité pour le site. Par contre à faible température, l'activateur, actuellement non identifié, récupère son affinité pour la région -73 -35 et entraîne donc une synthèse élevée d'ARNm.

La régulation négative de l'expression de CspA et probablement celle des gènes de choc froid est attribuée aux alarmons ppGpp et pppGpp (Jones *et al.*, 1992b). Différents rôles physiologiques sont attribués à CspA comme activateur transcriptionnel, impliqué dans la régulation de la transcription des gènes *hns* et *gyrA* (Jones *et al.*, 1992b). De plus, CspA se fixe à des séquences consensus ATTGG localisées en amont des séquences promotrices des gènes. La séquence consensus ATTGG est trouvée en amont des gènes *recA*, *nusA*, *cspA*, et *pnpA* (Brandi *et al.*, 1994; Graumann & Marahiel, 1994).

2.4. Réponse à une carence en nutriments : la phase stationnaire

L'environnement naturel des bactéries contient, en général, des quantités limitées de nutriments et ne peut donc soutenir qu'une croissance sporadique. Dans le cas de nombreuses BL, l'environnement où elles se développent (le lait) n'est peut-être pas l'environnement originel où elles sont apparues, mais c'est un milieu riche. Par conséquent, les BL risquent d'avoir une capacité limitée de survie dans des conditions de privation nutritionnelle (*starvation*). Les connaissances sur l'adaptation à des manques nutritionnels et l'entrée en phase stationnaire ont été développées récemment.

Chez *E. coli*, les réponses sont spécifiques pour chaque type de nutriment (Hengge-Aronis, 1993) et impliquent :

- cAMP/CRP pour la source carbonée ;
- NtrB/NtrC/σ^{54} pour l'azote ;
- PhoR/PhoB pour le phosphore.

Tableau 6. Comparaison de la réponse aux stress chaud et froid chez *Escherichia coli*

Type de stress	**Froid**	**Chaud**
Mimétique	Antibiotique C*	Antibiotique H*
Cibles possibles	ADN Ribosomes C*	ADN Ribosomes H* Protéines
Signal d'induction	? Ribosomes	Protéines dénaturées
Effecteurs	CspA (?)	σ32 σ24
Réponses biochimiques	Synthèse de ≈28 Csps -Protéines de liaison à l'ADN -Protéines ribosomales -?	Synthèse de ≈20 Hsps -Chaperons moléculaires -facteurs de transcription -protéases -?
Réponses physiologiques	Cryotolérance Reprise de la croissance	Thermotolérance Reprise de la croissance
Régulation négative	Alarmons ppGpp pppGpp	DnaK, J GrpE HflB

D'après Van Bogelen et Neidhart (VanBogelen & Neidhardt, 1990b), (Panoff *et al.*, 1995), (Perrin, 1995) modifié.

* C et H : les antibiotiques agissent sur des sites d'action différents du ribosome et miment respectivement le choc froid (*cold*) et le choc chaud (*hot*).

Tableau 7. Protéines induites par le stress hypothermique chez *E. coli*

Protéine	*Gène*	Fonction	Référence
NusA	*nusA*	Terminaison et antiterminaison de la transcription	(Guarlezi & Pon, 1990)
Facteurs d'initiation 2α et 2β	*infA,B*	Fixation de l'ARNt fMet chargé sur la sous-unité 30S ribosomale	(Guarlezi & Pon, 1990)
Polynucléotide phosphorylase	*pnp*	Assure la dégradation d'ARNm	
RecA	*recA*	Système S.O.S.	
H-NS (*Histone-like nucleotide structure protein*)	*hng*	Condensation du nucléoïde	(Laurent-Winter *et al.*, 1995)
Sous-unité A de la Topoisomérase II	*gurA*	Enroulement de l'ADN	(Jones *et al.*, 1992a)
CspA	*cspA*	Fixation aux acides nucléiques	(Jones *et al.*, 1987)
Pyruvate deshydrogénase et Dihydrolipoamide acétyltransférase	*aceE* *AcdF*	Décarboxylation du pyruvate	
Protéines ribosomales de chaque sous-unité: Proteines non identifiés			

Ces systèmes régulateurs contrôlent un grand nombre de groupes de gènes structuraux, dont les produits géniques permettent un métabolisme plus actif du nutriment en question. Si les sources sont présentes dans le milieu de culture, les cellules continuent à croître et à se diviser. Si le milieu est épuisé, pour un nutriment essentiel, les cellules entrent en phase stationnaire. La réponse est spécifique pour chaque nutriment mais indépendante du type de milieu utilisé. Les principaux changements cellulaires qui interviennent au cours de la phase stationnaire sont :

- des altérations dans la composition de la membrane ;
- des modifications dans la superhélicité et le compactage de l'ADN (Siegele & Kolter, 1992) ;
- la synthèse de composés de réserve tels que le glycogène, des polyphosphates ou des substances de protection comme le tréhalose (Hengge-Aronis *et al.*, 1991) ;
- la modification de l'ARN polymérase (EC 2.7.7.6) (Wada *et al.*, 1990)
- la formation de dimères 100 S à partir de monomères du ribosome 70S (Ozaki *et al.*, 1991)
- l'expression d'un groupe particulier de protéines au cours de la phase stationnaire qui sont induites spécifiquement pour chaque type de nutriment (source de carbone, source d'azote et source de phosphore) (Groat *et al.*, 1986).

Les nouvelles protéines exprimées pendant la phase stationnaire ont été mises en relation avec la protection contre les stress (Matin, 1991), car les cellules en phase exponentielle sont par contre très sensibles au choc chaud, aux fortes concentrations en H_2O_2 et en NaCl (Jenkings *et al.*, 1990). La capacité de résistance à ces diverses conditions de stress semble indiquer que les cellules en phase stationnaire possèdent des systèmes qui ne sont pas exprimés dans la phase de croissance exponentielle, pour

réparer l'ADN, protéger les membranes et les protéines. Le signal intracellulaire commun à toutes les conditions induisant la phase stationnaire n'a pas encore été identifié. Cependant, plusieurs gènes induits dans la phase stationnaire ont été décrits. Parmi ceux-ci, *rpoS* code pour une protéine régulatrice ayant un rôle central dans la transition à la phase stationnaire (Hengge-Aronis, 1993). Le gène *rpoS* a été découvert dans plusieurs contextes, il est allélique avec les gènes :

- *nur*, dont une mutation va rendre les cellules plus sensibles à l'irradiation par les U.V. proches (Tuveson, 1980) ;
- *katF*, qui empêche la production de catalase (EC 1.11.1.6) (Samartano *et al.*, 1986) ;
- *appR*, qui est indispensable pour l'expression d'une phosphatase acide (EC 3.1.3.2) (Touati *et al.*, 1986) ;
- la fusion *csi-2::lacZ*, qui confère les mêmes phénotypes que *katF* et *appR* mais dont les cellules sont plus sensibles aux stress (Lange & Hengge-Aronis, 1991).

Une fois établie l'allélicité et localisé le gène *rpoS*, la séquence prédictive en résidus d'acides aminés a montré une forte homologie avec la famille des gènes du facteur σ (Lange & Hengge-Aronis, 1991).

Pendant la phase stationnaire, *E. coli*, en plus d'une résistance à divers stress, a une forme plus sphérique, fait la synthèse du glycogène et peut survivre longtemps au manque de nourriture. Tous ces phénotypes sont dépendants d'un allèle *rpoS* normal. La liste des gènes contrôlés par *rpoS* se trouve dans le Tableau 8.

2.5. Réponse bactérienne aux agents producteurs d'oxygène réactif (ORIs)

2.5.1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif peut être défini comme un excès de prooxydants dans la cellule. L'oxygène moléculaire (O_2) a un nombre pair d'électrons. Cependant, il a deux électrons non appariés. L'oxydation par l'oxygène moléculaire est limité à l'acceptation d'électrons, néanmoins, un autre corps paramagnétique (métal de transition tel que le Fe ou le Cu) peut catalyser la réduction d'un seul électron de l'oxygène. La réactivité de l'oxygène augmente quand il accepte un, deux ou trois électrons, formant respectivement un radical superoxyde (O_2^-), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ou un radical hydroxyle (OH^-), ou quand il y a un changement de spin pour arriver à un oxygène singulet ($^1\Sigma_g$ O_2) (Farr & Kogoma, 1991). La réactivité des molécules d'oxygène actif ou intermédiaires d'oxygène actif (ORIs) est résumée dans le Tableau 9.

Les ORIs sont produites comme des intermédiaires inéluctables du métabolisme aérobie, et leur production est augmentée par l'exposition des cellules à des conditions environnementales spécifiques. La toxicité de l'oxygène intervient quand le degré de stress oxydatif dépasse la capacité des systèmes de défense cellulaire (Farr & Kogoma, 1991). Le stress oxydatif est très impliqué, chez les eucaryotes, dans le vieillissement et dans différentes maladies comme l'arthrite rhumatoïde ou l'athérosclérose. (Goodson & Rowbury, 1989)

Tableau 8. Gènes contrôlés par *rpoS* chez *E. coli*. (d'après Hengge-Aronis, 1993)

Gène ou Opéron	Position (min)	Produit	Fonction	Référence
bolA	10,0	Protéine régulatrice	Morphogènese , contrôle de la syntèse de PBP6	(Aldea *et al.*, 1989)
appY	13,0	Protéine régulatrice	Contrôle de la synthèse de *cyxAB-appA*	(Atlung *et al.*, 1989)
dps (vtm)	18,0	Protéine d'union à l'ADN	Protection de l'ADN, contrôle de l'expression gènique	(Almiron *et al.*, 1992)
cyxAB-AppA (appCBA)	22,4	Troisième cytochrome oxydase, phosphatase acide	?	(Dassa *et al.*, 1992)
csgA	23,1	*Curli subunit protein*	Union au fibrinogène	(Olsén *et al.*, 1993)
treA (osmQ)	26,0	Thréalase périplasmique	Ingestion du tréhalose dans les milieux à forte osmolarité	(Hengge-Aronis *et al.*, 1991)
osmB	28,0	Lipoprotéine	?	(Hengge-Aronis *et al.*, 1991)
katE	37,2	Catalase HPII	Résistance à l'H_2O_2	(Loewen & Triggs, 1984)
xthA	38,0	Exonucléase III	Réparation de l'ADN Résistance à l'H_2O_2	(Sak & Eisenstark, 1989)
otsBA	41,6	Tréhalose-6P-Phosphatase, tréhalose-6P-synthase	Synthèse du tréhalose, osmoprotection, thermotolérance	(Hengge-Aronis *et al.*, 1991)
gigS	66,6	GlgS	Synthèse du glycogène?	(Hengge-Aronis & Fisher, 1992)
csi-5 (osmY)	99,3	?	?	(Lange & Hengge-Aronis, 1991)
pex genes	?	?	?	(McCann *et al.*, 1991)
mcc	Plasmidique	Plusieurs protéines	Synthèse et secrétion de microcin C7	(Diaz-Guerra *et al.*, 1989)

2.5.2. Réponse oxydative chez *E. coli* et *S. typhimurium*.

Les micro-organismes, même anaérobies, peuvent être brutalement confrontés au stress oxydatif, soit produit par leur métabolisme ou en présence de macrophages activés, soit induit expérimentalement par exposition à l' irradiation, la lumière U.V., l'H_2O_2, ou des substances à activité redox tel que le paraquat®, la ménadione® ou la plumbagine® (Storz *et al.*, 1990). L'essentiel de ce type d'étude a été actuellement réalisé chez *E. coli* et *S. typhimurium*.

Les dommages entraînés par l'exposition au stress oxydatif portent essentiellement sur l'ADN. Des souches d'*E. coli* ayant des superoxyde dismutases (EC 1.15.1.1) (SOD) ou des catalases déficientes montrent des taux de mutation beaucoup plus élevés. (Greenberg & Demple, 1988). Des exonucléases sont d'ailleurs induites au cours des stress oxydatifs. La membrane plasmique ainsi que certaines protéines enzymatiques sont également altérées, mais les résultats *in vivo* sont nettement moins probants.

Le traitement de cellules d'*E. coli* par des concentrations micromolaires d'eau oxygénée permet une adaptation très forte aux agents oxydants, puisqu'elles peuvent alors résister à des concentrations millimolaires de cet agent. La réponse se traduit par l'expression de 30 à 40 polypeptides visibles par l'électrophorèse bidimensionnelle, certains de ceux-ci étant des protéines de choc thermique. Lorsque le traitement est effectué par un agent chimique producteur de radical superoxyde comme le désherbant paraquat®, on observe également une adaptation, avec la synthèse d'environ 40 nouvelles protéines induites par la transformation des superoxydes en H_2O_2 par les SOD de la bactérie. Il y a également dans

Tableau 9. Réactivité des ORIs avec des molécules organiques

Espèce	Composé oxydé	Référence
O_2^-	-Thiols -ascorbate -tocophérol -catécholamines -protéines avec $(Fe\text{-}S)_4$	(Hamilton & Buckley, 1991)
H_2O_2	-Groupes thiols des protéines -glutathione réduit -quelques cétoacides	(Goodson & Rowbury, 1989)
OH^-	Il réagit avec presque toutes les biomolécules au taux limite de sa diffusion	(Hutkins & Nannen, 1993)
$^1O_2$ ($^1\Sigma_g$ O_2)	Addition aux liaisons conjuguées, oléfines, diènes	(Mooney *et al.*, 1990)

ce cas en partie interférence avec les chocs chauds, puisque des Hsps comme GroEL, GroES et DnaK sont induites.

Deux facteurs transcriptionnels, OxyR et SoxR/S régulent l'expression génique dans ces conditions, OxyR est induit par H_2O_2, SoxR/S est activé par les superoxydes.

Sur environ 30 gènes induits par l'exposition d'*E. coli* ou *S. typhimurium* à H_2O_2, neuf ont été situés dans le régulon *oxyR*, contrôlé par le facteur de transcription OxyR (Christman *et al.*, 1985). Ces gènes codent pour des enzymes tel que la catalase (EC 1.11.1.6), et l'alkyl hydroperoxyde réductase (EC 1.1.1.35), qui détoxifient les ORIs (Pahl & Baeuerle, 1994).

E. coli possède un deuxième facteur de transcription sensible au potentiel redox, le senseur de superoxyde SoxR. Cette protéine fait partie d'une chaîne : SoxR activé induit la transcription du gène *soxS*, lequel induit à son tour l'expression de gènes défensifs tels que la superoxyde dismutase à Mn (MnSOD) (Padan & Schuldiner, 1994).

2.5.2.1. OxyR : le senseur de H_2O_2

Sur environ 30 gènes induits par l'exposition d'*E. coli* ou *S. typhimurium* à H_2O_2, neuf ont été situés dans le régulon *oxyR*, contrôlé par le facteur de transcription OxyR (Christman *et al.*, 1985). Ces gènes codent pour des enzymes tels que la catalase, et l'alkyl hydroperoxyde réductase, qui détoxifient les ORIs (Pahl & Baeuerle, 1994). Le taux de synthèse et la quantité de OxyR dans les cellules ne changent pas après une stimulation par H_2O_2 (Storz *et al.*, 1990). L'essai de "footprinting" a montré que OxyR purifié en conditions oxydatives ou réductrices se lie à

des séquences promoteurs cibles. Cependant, seul OxyR préparé dans des conditions oxydatives ou oxydé par la suite *in vitro*, était capable de stimuler la transcription *in vitro* des gènes cibles (Storz *et al.*, 1990). L'oxydation a changé aussi le patron de protection contre l'ADNase I (EC 3.1.21.1); ceci signifie que le stress oxydatif produit un changement conformationnel qui donne à OxyR la capacité d' activer en trans la transcription. Par contre, le même stress seul diminue très peu la capacité de OxyR à réprimer son propre promoteur.

2.5.2.2. SoxR/S : la chaîne de réponse au superoxyde

E. coli possède un deuxième facteur de transcription sensible au redox, le senseur de superoxyde SoxR. Cette protéine fait partie d'une chaîne : SoxR activé induit la transcription du gène *soxS*, lequel induit à son tour l'expression de gènes défensifs tels que la superoxyde dismutase à Mn^{++} (MnSOD) (Padan & Schuldiner, 1994). La protéine SoxR purifiée dans des conditions non-réductrices, possède un groupe fer-soufre ayant une activité redox. Le traitement de SoxR avec un agent réducteur comme le β-mercaptoéthanol qui élimine le fer, produit l'apo-SoxR. Les deux formes sont capables de s'unir à l'ADN avec une affinité égale. Cependant, seule la forme Fe-SoxR stimule la transcription du promoteur SoxS.

2.5.3. Réponse aux ORIs chez les bactéries lactiques

Il a été montré que les Streptocoques du groupe N produisent du peroxyde d'hydrogène par l'action de l'enzyme NADH-oxydase réduite qui catalyse l'oxydation faite par l'oxygène moléculaire. Cette enzyme est activée par le dinucléotide flavine adénine. Une partie du peroxyde

d'hydrogène ainsi formée, est éliminée (enlevée) par l'action de la NADH peroxydase mais l'autre partie reste présente (stockée) dans le milieu de culture et inhibe le développement, la respiration et la vitalité des cellules. La quantité de peroxyde d'hydrogène restant dans le milieu varie selon la souche et cette variation peut avoir un rapport avec les différentes propriétés de la NADH oxydase (Anders et al, 1993).

La fonction du gène recA dans l'organisme fermenteur microaérophillique *Lactococcus lactis* a été étudié. Les auteurs ont interrompu le gène recA d'une souche de *Lc. lactis*. Ils ont observé que ce gène intervient non seulement dans la réparation et la récombination du DNA mais aussi dans les réponses au stress oxydatif et thermique. Le stress oxydatif induit par l'aération (l'apport d'oxygène), provoque une diminution du développement et de la phase stationnaire de survie de la souche. Les résultats de cette étude indiquent que les radicaux d'oxygène ne sont pas suffisamment éliminés du milieu de culture, donc, la présence ou l'intervention du gène RecA est nécessaire pour limiter ou éliminer la nocivité des radicaux libres (Duwat *et al.*, 1995).

2.6. Réponse bactérienne à l'acidité

2.6.1. Le pH interne (pHint)

Les mécanismes qui préservent le pH interne (pHint) proche des valeurs physiologiques normales sont essentiels pour tout organisme qui se développe dans des pH extrêmes. Les molécules labiles telles que l'ATP et l'ADN ne pourraient pas exister si le pH intracellulaire atteignait les valeurs extrêmes du milieu extracellulaire. Cependant, il faut prendre en

compte que le concept classique du pH à l'intérieur d'une cellule n'est pas complètement vrai. Le pH est un index pratique de la concentration ou de l'activité des ions hydrogène dans des solutions, toutefois le cytoplasme cellulaire est un système colloïdal et non un système aqueux (Langwothy, 1978).

2.6.2. Influence du pH dans la croissance

Les valeurs extrêmes du pH de croissance des bactéries lactiques se situent entre 3,5 et 9 unités du pH, avec de grandes variations entre les espèces. Leur préférence (pH 6 à 7,5, en général), les caractérise plutôt comme neutrophiles. Parmi les espèces les plus utilisées dans l'industrie laitière, *S. thermophilus* est l'une des plus sensibles au pH. Elle arrête sa croissance à pH 5,0 et acidifie le milieu jusqu'à pH 4,5 et ce malgré des concentrations non limitées en éléments nutritifs ou l'absence de composés inhibiteurs (Thunell, 1988). Son pH optimal de croissance se situe entre 6,5 et 7,5 (Nannen & Hutkins, 1991a)

La régulation du pH du milieu de culture par neutralisation (addition d'une base) et/ou par élimination de l'acide lactique produit au cours de la fermentation (filtration sur membrane), permet de maintenir plus longtemps la croissance bactérienne et d'obtenir, en fin de culture, une biomasse plus abondante (Whitehead *et al.*, 1993). Ce type d'approche est utilisé dans l'industrie de production des levains industriels pour produire une plus grande biomasse (Branger *et al.*, 1994). La toxicité se pose surtout avec les acides faibles car le pH interne de la cellule est directement touché. En effet, à pH acide, un acide faible se trouve en grande partie sous forme non dissociée (Fig. 4) et de ce fait, il traverse facilement la membrane cellulaire.

2.6.3. Dommages produits pendant la croissance à bas pH

Lorsque la concentration en acide lactique augmente, les bactéries lactiques ralentissent leur croissance jusqu'à l'annuler. L'arrêt de la croissance et du métabolisme survient au moment où le pH intracellulaire atteint une valeur donnée, caractéristique de chaque souche (Kashket, 1987). Les BL tendent aussi à perdre leur activité lors de longs séjours à pH bas ; de plus, plus long est le séjour, plus lent est la récupération. L'effet inhibiteur de l'acide lactique s'explique par :

- une consommation accrue d'énergie pour maintenir la force protomotrice ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$) qui assure les échanges avec le milieu extérieur et la stabilité du pHint des cellules (Hutkins & Nannen, 1993),
- une déstabilisation de la membrane et la sortie de solutés mesurée principalement par la sortie du magnésium (Harvey, 1965; Marquis *et al.*, 1973),
- la réduction de l'activité spécifique de nombreux enzymes en particulier ceux de la voie de la glycolyse.

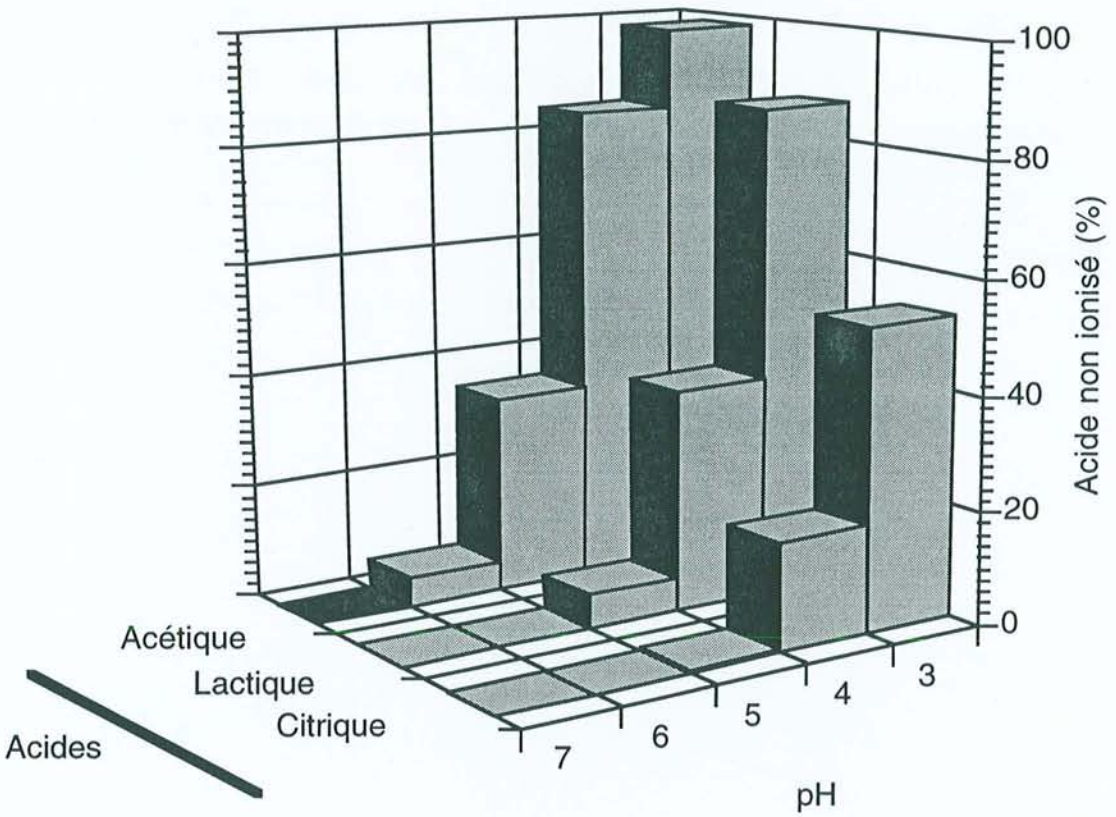


Figure 4. Pourcentage de dissociation des acides faibles

2.6.4. Homéostasie

En général, toutes les bactéries maintiennent un pH interne neutre. Même les acidophiles, qui ont un pHext optimal proche de 2,0 présentent un pHint autour de 7,0 (Matin, 1990). Ce fait n'est pas surprenant car beaucoup d'enzymes du métabolisme des glucides et des acides aminés ont un pH optimal proche de la neutralité (Tableau 10). Chez les bactéries lactiques, le pHint n'est pas constant, ainsi elles tolèrent des variations importantes de leur concentration interne en protons (Nannen & Hutkins, 1991a), (Fig. 5a). Cependant, le pH du cytoplasme des bactéries lactiques reste légèrement plus alcalin que le pH du milieu de culture, car les cellules excrètent l'acide lactique protoné dans le milieu

extracellulaire (Gätje *et al.*, 1991). Comme la membrane cellulaire est relativement imperméable aux protons et aux molécules de lactate, une différence de concentration de protons se forme et donc un gradient du pH (ΔpH). La formation et la maintenance du ΔpH sont importantes comme composantes de l'homéostasie du pH mais aussi comme composantes de la force motrice protonique ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$) ou pmf (*protonmotrice-force*) (Mitchell, 1993). Chez *S. thermophilus*, la génération et l'effondrement du ΔpH ont été étudiés par Nannen & Hutkins, (1991a). Quand le pHext diminue de 6,8 à une valeur comprise entre 5,2 et 5,0, le pHint est préservé (Fig. 5b). Cependant, quand le pHext continue à baisser, les cellules ne peuvent plus préserver le ΔpH, celui-ci s'effondre et la viabilité cellulaire baisse. La modification du pHint influe sur plusieurs activités métaboliques et par conséquent sur le développement des bactéries. Il a été démontré chez *Ec. faecalis que* le maintien d'un pHint neutre est indispensable pour une croissance rapide. Lorsque le pHint baisse de 7,4 à 6,6, la croissance de *Ec. faecalis* diminue de moitié (Harold & van Brunt, 1977; Kobayashi *et al.*, 1984). Chez *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, le pHint optimum pour la croissance se situe entre 7,0 et 7,5 et ce pH est maintenu si le pHext est compris entre 5,5 et 7,5 (Otto *et al.*, 1983).

L'utilisation d'un ionophore tel que la gramicidine D, s'est montrée utile pour comprendre le rôle du pHint sur la croissance et le métabolisme. Cette substance agit en permettant aux ions spécifiques (H^+, Na^+, K^+) de traverser la membrane cytoplasmique, ce qui provoque un effondrement du gradient ionique. Chez *S. thermophilus*, en présence de gramicidine, la croissance des cellules s'arrête quand le pHext est à peine 6,5 tandis que les cellules cultivées sans gramicidine sont viables même à pHext 4,5 (Hutkins & Nannen, 1993).

Tableau 10. pH optimal des enzymes intracellulaires de bactéries lactiques

Enzyme	Organisme	pH optimal	Référence
β–D-Galactosidase EC 3.2.1.23	*S. thermophilus*	7,1	(Greenberg & Mahoney, 1982)
β–D-Galactosidase EC 3.2.1.23	*S. thermophilus*	8,0	(Somkuti & Steinberg, 1979)
Phosphofructokinase EC 2.7.1.11	*Lb. bulgaricus*	8,2	(Bras *et al.*, 1991)
β-D-Phosphogalactoside galactohydrolase EC 3.2.1.85	*Lc. lactis ssp. cremoris*	7,0	(Molskness *et al.*, 1973)
Acylglycérol acylhydrolase (lipase) EC 3.1.1.4	*Lc. lactis ssp. lactis* *Lc. lactis ssp. cremoris*	7,0-8,5	(Kamaly *et al.*, 1990)
Pyruvate kinase EC 2.7.1.40	*Lc. lactis ssp. lactis*	6,9-7,5	(Collins & Thomas, 1974)
D-Tagatose1,6-diphosphate aldolase EC 4.1.2.40	*Lc. lactis ssp. lactis Lc. lactis ssp. cremoris*	7,0-7,3	(Crow & Thomas, 1982)
Glucose-6-phosphate déhydrogénase EC 1.1.1.49	*Lb. casei*	6,8	(Menezes *et al.*, 1989)
6-Phosphogluconate déhydrogénase EC 1.1.1.44	*Lb. casei*	6,8	(Menezes *et al.*, 1989)
Aminopeptidase	*Lc. lactis ssp. cremoris*	7,0	(Tan & Konings, 1982)
Dipeptidase	*Lb. casei*	7,6	(El Soda *et al.*, 1978)
Carboxypeptidase	*Lb. casei*	7,2	(El Soda *et al.*, 1978)
X-Prolyl dipeptidyl peptidase EC 3.4.14.11	*Lc. lactis ssp. lactis*	8,5	(Zevaco *et al.*, 1990)
X-Prolyl dipeptidyl aminopeptidase EC 3.4.14.11	*Lc. lactis ssp. cremoris*	7,0	(Kiefer-Partsch *et al.*, 1989)
X-Prolyl dipeptidiyl aminopeptidase EC 3.4.14.11	*Lb. bulgaricus*	6,5	(Miyakawa *et al.*, 1991)
X-Prolyl dipeptidyl aminopeptidase EC 3.4.14.11	*Lb. acidophilus*	6,5	(Bockelmann *et al.*, 1991)
H^+-ATPase[1] EC 3.6.1.37	*S. thermophilus*	7,0-7,5	(Nannen & Hutkins, 1991b)

[1] ATPase translocatrice de protons
D'après Hutkins et Nannen (Hutkins & Nannen, 1993)

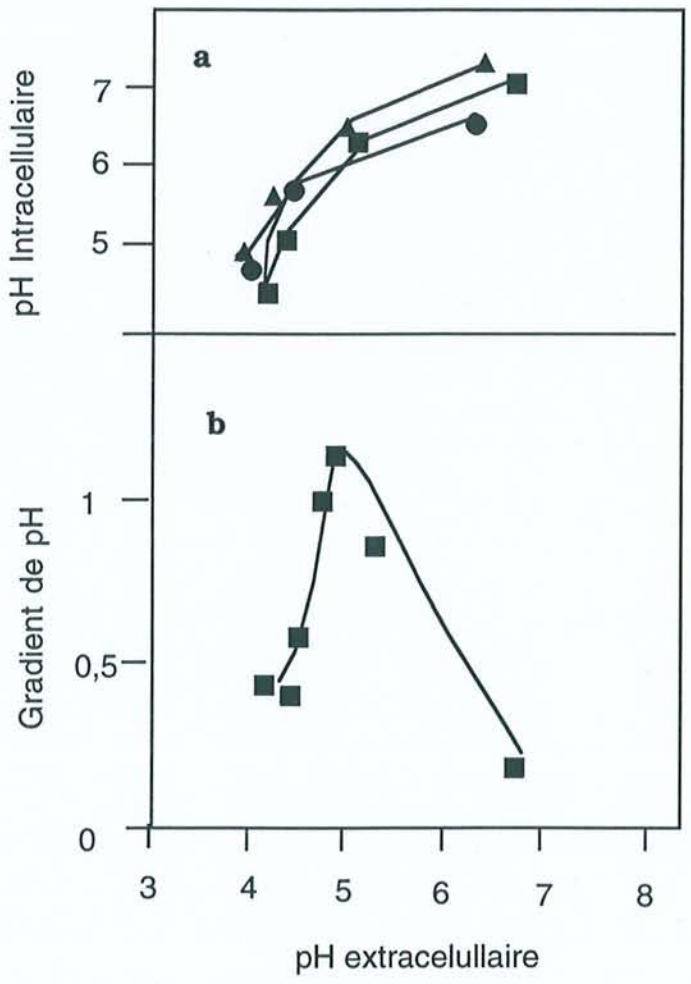


Figure 5. **a.** Relation entre le pH intracellulaire et le pH extracellulaire de *S. thermophilus* 573 pendant la croissance en bouillon d'Elliker-lactosé (●); bouillon M17-lactosé (■); et milieu lait "simulé" (▲). **b.** Évolution du gradient de pH pendant la croissance de *S. thermophilus* 573 en milieu lait "simulé" (d'après Hutkins & Nannen, 1993; Nannen & Hutkins, 1991a).

2.6.5. Rôle physiologique du pHint

L'importance du pHint réside dans le fait qu'il a été démontré des changements significatifs dans le taux d'une grande variété d'activités métaboliques quand le pHint diminue :

- Augmentation du taux d'échange d'ions potassium contre des protons (Kashket & Barker, 1977).
- Chez *Lc. lactis*, le taux maximal d'ingestion d'ion phosphate se produit à pHint 7,2-7,5 (pHext 5,5-8,0) (Poolman *et al.*, 1987b).
- Les systèmes de transport des acides aminés et peptides sont apparemment régulés par le pHint plutôt que par le ΔpH (Poolman *et al.*, 1987a). Bien que l'alanine et la sérine augmentent leur taux d'entrée pour un pHint plus acide, la majorité des acides aminés le diminue. De plus, les même auteurs ont postulé que les faibles taux d'entrée d'acides aminés essentiels à un pH <7,0, peuvent avoir un effet sur l'inhibition de la croissance de bactéries lactiques à pHext bas (Poolman *et al.*, 1987a),
- Chez *S. pneumoniae*, il a été postulé que l'entrée de l'ADN dans des cellules compétentes est fortement dépendante du pHint. Cette bactérie devient 100% compétente quand le pHint est 8,3 et ce mécanisme dépend également de la concentration intracellulaire d'ATP (Clavé & Trombe, 1989).

2.6.6. Régulation du pHint

L'imperméabilité relativement bonne de la membrane aux protons extracellulaires permet à la cellule de maintenir son pHint. Les bactéries lactiques en fermentation produisent des acides organiques

qui acidifient leur cytoplasme, aussi, il faut qu'elles développent des mécanismes additionnels de contrôle du pHint.

2.6.6.1. Pouvoir tampon du cytoplasme

Le pouvoir tampon cellulaire est fréquemment divisé en deux composants : celui de la surface de la cellule (T_o) et celui de l'intérieur de la cellule (T_i). T_o est défini comme le pouvoir tampon de cellules intactes en suspension et T_i est une valeur dérivée du pouvoir tampon total (T_t) de cellules perméabilisées (traitées avec 5% *n*-butanol ou 10% Triton X-100) moins la valeur de T_o (Ingraham, 1987). Ces valeurs ont été comparées chez deux bactéries neutrophiles : *B. subtilis* et *E. coli* et une alcalophile stricte : *B. firmus* (Krulwich *et al.*, 1985). Les résultats révèlent que dans tous les cas, To constitue une fraction significative de T_t à plusieurs valeurs de pH. En effet, dans tous les cas T_o est au moins la moitié de T_t. Les valeurs de T_i ont une grande variation qui dépend de la bactérie (Fig. 6). Les alcalophiles ont un pouvoir tampon interne plus fort dans la gamme de pH alcalin et *E. coli* présente un pouvoir tampon très bas entre pH 6,0 et 8,0, gamme dans laquelle elle se développe activement (Krulwich *et al.*, 1985). Aussi, le pouvoir tampon intracellulaire peut être considéré comme une réponse limitée pour atténuer les variations du pHint (Booth, 1985).

2.6.6.2. Production des métabolites acides ou basiques.

Plusieurs bactéries lactiques produisent des décarboxylases et/ou déaminases en réponse aux variations du pH. *Lb. buchnerii* produit une histidine décarboxylase tandis que *Lc. lactis* spp. *lactis* produit une arginine déiminase (Casiano-Colón & Marquis, 1988). Ces résultats

suggèrent que l'arginolyse à bas pH peut être une réponse adaptative générale des bactéries lactiques à des environnements acides.

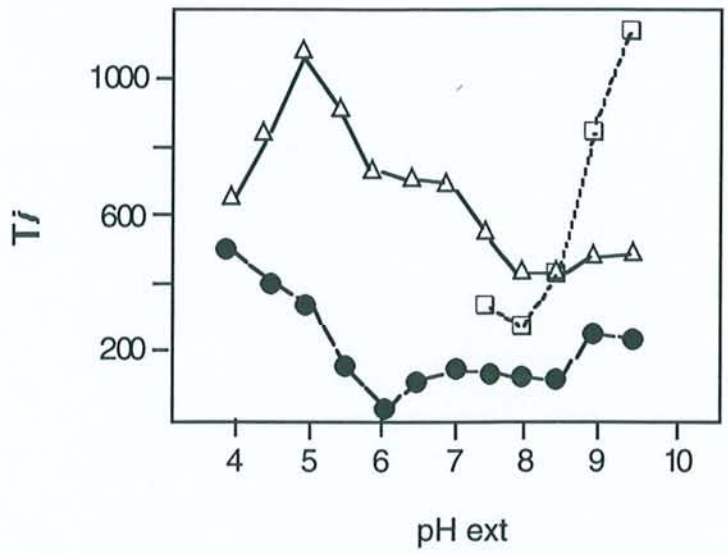


Figure 6. Effet du pH extracellulaire sur le pouvoir tampon du cytoplasme (T*i*) (nanomoles de H^+ par unité de pH et par milligramme de protéine) des bactéries neutrophiles *B. subtilis* (△) et *E. coli* (●) et de la bactérie alcalophile *B. firmus* (□) (d'après (Krulwich *et al.*, 1985).

Lb. plantarum et d'autres bactéries malolactiques peuvent décarboxyler l'acide malolactique (dicarboxylique) et la production de l'acide lactique qui s'ensuit (monocarboxylique) consomme un proton intracellulaire et fait monter le pH (Daeschel, 1988).

2.6.6.3. Système symport de transport de protons

Un mécanisme important pour diminuer le pH interne est de générer et maintenir un gradient électrochimique de protons ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$) par extrusion de protons grâce à un symport H^+/lactate (Kashket, 1987). La force conductrice de ce symport est l'efflux du produit final de fermentation, l'acide lactique (Fig. 7).

2.6.6.4. ATPase translocatrice de protons

Le mécanisme qui représente le moyen le plus important d'homéostasie du pH interne chez les bactéries fermentantes, est l'ATPase translocatrice de protons liée à la membrane (H^+-ATPase), Cette H^+-ATPase permet la sortie des protons en utilisant l'ATP généré par la glycolyse. Le $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ ainsi généré, peut être utilisé pour faire entrer des solutés. Chez les micro-organismes aérobiques en respiration, cette enzyme génère l'ATP. Bien que la synthèse d'ATP puisse aussi exister chez les bactéries lactiques, la fonction principale de la H^+-ATPase est la pompe à protons (Konings *et al.*, 1989).

Un des facteurs impliqués dans le contrôle du pH est la dépendance du système H^+-ATPase vis-à-vis du pHint, dont l'optimum est compris entre 6,0 à 8,0, avec une décroissance importante d'activité en dessous et au-dessus de ces valeurs (Kobayashi *et al.*, 1984). Ainsi, si le cytoplasme présente un pH supérieur à 8,0, la pompe à protons se ralentit, et le pHint diminue. Inversement, quand le pH du cytoplasme est compris entre 6.0 et 8.0, la pompe à protons fonctionne de façon optimale et le pHint est maintenu à la neutralité.

L'importance du système H^+-ATPase dans la régulation du pH interne a également été mise en évidence par des études réalisées chez *Ec. faecalis* (Kashket, 1987). Ces travaux ont utilisé des mutants qui cultivent bien à pH 7,5, mais pas à pH 6,0. Apparemment ces mutants sont déficients en systèmes de régulation du pHint. La membrane cellulaire de ces mutants est normalement imperméable aux protons, mais présente une déficience en activité ATPasique.

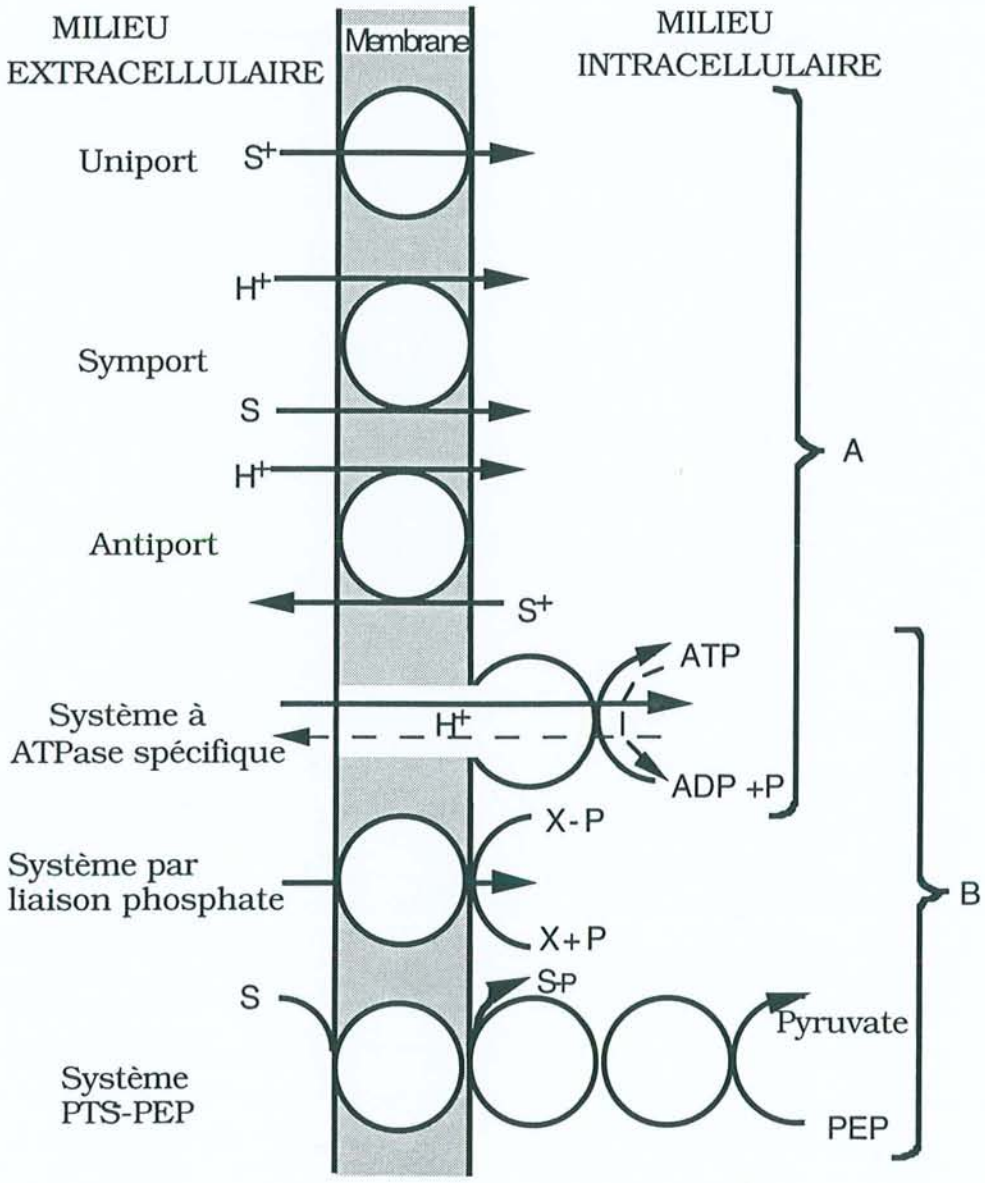


Figure 7. Systèmes de transport des solutés chez les bactéries lactiques (S) et des protons (H^+) à travers la membrane cellulaire des bactéries lactiques avec leurs dépendances énergétiques (D'après Desmazeaud et de Roissart, 1994 modifié)

(A) : système dépendant d'une force protomotrice

(B) : système impliquant des liaisons phosphate

2.6.7. Expression génique régulée par le pH

Depuis les travaux de Gale et Epps (1942), qui ont révélé que plusieurs désaminases et décarboxylases d'acides aminés d'*E. coli* étaient induites par le pH basique et acide respectivement, les connaissances de la relation du pH avec les êtres vivants se sont développées. Le concept de l'homéostasie du pH interne qui ainsi que le fait qu'il doit être diffèrent du pH de l'environnement externe s'est imposé.

2.6.7.1. Mécanisme de détection du pH chez les êtres vivants

Le mécanisme utilisé par les cellules pour évaluer le pHext et, postérieurement, altérer la transcription cellulaire est une question qui n'est pas encore entièrement résolue (Hall *et al.*, 1995). Le système possède deux composantes : une protéine *senseur/transmetteur* et une autre *régulatrice*. Le senseur/transmetteur est une protéine transmembranaire avec des domaines cytoplasmiques et extracytoplasmiques. Ces derniers sont sensibles à l'environnement et transfèrent le signal à travers la membrane vers le domaine cytoplasmique. L'activation du domaine cytoplasmique modifierait une deuxième protéine, la protéine régulatrice, qui pourrait alors s'unir à l'ADN et réguler l'expression génique. Le signal spécifique qui déclenche la réponse à un changement drastique du pH n'est pas connu. Les paramètres qui sont le plus souvent mentionnés comme producteurs de changements dans l'expression des protéines de choc acide sont le pH externe (pHo) ; le pH interne, (pHint) ; le ΔpH (pHo-pHint) ou la force motrice protonique ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$) ou pmf (Hall *et al.*, 1995).

2.6.7.2. Gènes répondant au pH

Actuellement, une soixantaine de gènes liés à la réponse au pH ont été décrits (Tableau 11).

Parmi ces gènes, on en distingue trois catégories :

a. Gènes dont la fonction est connue :

- ceux qui régulent l'homéostasie du pH intracellulaire pour le transport des ions (Tableau 9) ;
- ceux qui codent pour les décarboxylases, désaminases et déiminases qui sont induites par des conditions acides ou basiques pour aider à maintenir le pH optimal de croissance cellulaire ;
- ceux qui codent pour les enzymes spécifiques de fermentations, tels les enzymes intervenant dans la solventogénèse chez *Clostridium acetobutylicum*, quand le pH atteint une valeur comprise entre 4,3 et 5,0 (Rodgers, 1986).

b. Gènes à fonction inconnue :

Plusieurs études ont été faites pour rechercher des gènes régulés par le pH sans en connaître la fonction. Ces recherches utilisent la fusion de gènes avec un gène traceur (e.g. *lacZ*) ou l'électrophorèse bidimensionnelle. (Foster , 1993; Foster, 1991; Foster & Hall, 1991; Foster *et al.*, 1994; Heyde & Portalier, 1990; Hickey & Hirshfield, 1990; Slonczewski *et al.*, 1987). Au moins 15 gènes régulés par le pH ont été

Tableau 11. Gènes régulés par le pH (d'après Hall, *et al.*, 1995) (1/4).

Gène / Protéine	Fonction / Processus	Organismes	Référence
aceF	Dihydrolipoamide	*E. coli*	(Heyde & Portalier, 1990; Hickey & Hirshfield, 1990)
Acétaldéhyde deshydrogènase	Métabolisme de l'acétate	*Sarcina*	(Lowe & Zeikus, 1991)
aciA, B J, I	?	*S. typhimurium*	(Foster & Bearson, 1994)
aniC, I, aciK régulon	Induits par l'acide, ou la tyrosine/phénylalanine	*S. typhimurium*	(Foster & Bearson, 1994)
Protéines induites par l'acidité observées dans les électrophorèses	?	*A. tumefaciens*	(Mantis & Winans, 1992)
adh	Alcool deshydrogènase	*E. coli*	(Gale & Epps, 1942)
adi	Arginine décarboxylase	*E. coli* *P. aeruginosa*	(Auger & Bennett, 1989; Bingham *et al.*, 1990; Cunin *et al.*, 1986; Tabor & Tabor, 1985)
agr et gènes régulés par Agr	Régulation de la production d'exoprotéine	*S. aureus*	(Regasssa & Betley, 1992)
alx	? Induites par le pH alcalin	*E. coli*	(Bingham *et al.*, 1990)
aniG	? Co-induite par acidité externe et mannose	*S. typhimurium*	(Aliabadi *et al.*, 1988; Foster & Aliabadi, 1989)
Arginine déiminase	Catabolisme de l'arginine	*Streptocoques*	(Burne *et al.*, 1991; Cunin *et al.*, 1986)
aidB	Dommage à l'ADN, induit par l'alcalinité	*E. coli*	(Landini *et al.*, 1994; Smirnova *et al.*, 1994)
iroA	Réprimé par l'acidité et le fer	*S. typhimurium*	(Foster & Bearson, 1994)

Tableau 11—suite (2/4)

cadA, cadB	Lysine décarboxylase, Transporteur lysine/cadavérine	*E. coli* *S. typhimurium*	(Auger & Bennett, 1989; Auger *et al.*, 1989; Meng & Bennett, 1992a; Meng & Bennett, 1992b; Tabor & Tabor, 1985; Watson *et al.*, 1992)
cta/caa, oxydase	Oxydase terminale	*B. firmis* OF4	(Quirk *et al.*, 1991)
cydAB	Oxydase de type Cytochrome *d*	*E. coli*	(Cotter *et al.*, 1990)
cyoABCDE	Oxydase de type Cytochrome o	*E. coli*	(Cotter *et al.*, 1990)
gadS	Glutamate décarboxylase	*E. coli*	(Gale & Epps, 1942)
groEL, dnaK, htpG, htpM grpE	Protéines de stress	*E. coli*, *S. typhimurium*	(Abshire & Neidhardt, 1993; Foster, 1991; Heyde & Portalier, 1990; Taglicht *et al.*, 1987)
H^+-ATPase	Synthèses/Hydrolyse de l'ATP	*Ec. faecalis*	(Kobayashi *et al.*, 1984)
hrp gènes	Réponse pathogénique chez les plantes	*P. syringae pv. phaseolicola* *E. amylovora*	(Rahme *et al.*, 1992; Wei *et al.*, 1992)
hyd	Hydrogénase-3	*E. coli* *S. typhimurium*	(Foster *et al.*, 1994; Rossmann *et al.*, 1991)
inaA	? induit par des acides faibles, perméables à la membrane	*E. coli*	(Slonczewski *et al.*, 1987; White *et al.*, 1992)
katF (rpoS)	Facteur sigma de la phase stationnaire	*E. coli*	(Schellhorn & Stones, 1992)
lamb B	Transport du lactose	*E. coli*	(Heyde & Portalier, 1987)
ldh	Lactate deshydrogénase	*E. coli*	(Mat-Jan *et al.*, 1989)
lexA	Répresseur des gènes de réparation de l'ADN	*E. coli*	(Dri & Moreau, 1994)

Tableau 11—suite (3/4)

Lys U	Lysyl-tRNA synthétase	*E. coli*	(Hickey & Hirshfield, 1990; Hirshfield *et al.*, 1984; Lévêque *et al.*, 1991)
LysP (cadR)	Lysine perméase	*E. coli*	(Steffes *et al.*, 1992)
malE	Protéine d'union au maltose	*E. coli*	(Heyde *et al.*, 1991)
menCD	Synthèse de ménaquinone	*B. subtilis*	(Hill *et al.*, 1990)
Interrupteur métabolique de la fermentation acidigenique et de la solventogenique	Production de butanol	*C. acetobutylicum*	(Rodgers, 1986)
nhaA	Na^+/H^+ antiporteur	*E. coli*	(Karpel *et al.*, 1991; Rahav-Manor *et al.*, 1992)
nmpC	Protéine de la membrane externe	*E. coli*	(Coll *et al.*, 1994)
nodA, nodF	Nodulation	*R. leguminosarum biovar trifolii*	(Richardson *et al.*, 1988)
ompF, ompC	Porines	*E. coli* *S. typhimurium, Thiobacillus*	(Amaro *et al.*, 1991; Foster & Hall, 1990; Heyde *et al.*, 1991; Heyde & Portalier, 1987; Heyde & Portalier, 1990)
gènes *pag*	Facteur de virulence, survie de macrophages	*S. typhimurium*	(Alpuche Aranda *et al.*, 1992; Miller, 1991)
fusion de gènes *phm::phoA*	? Protéines membranaires Phospolipase C	*E. coli* *S. aureus*	(Heyde *et al.*, 1991; Marques *et al.*, 1991)
polA	Polymérase de l'ADN I	*E. coli*	(Hickey & Hirshfield, 1990)

Tableau 11—suite (4/4)

Protéines observés sur gels 2D après un traitement à pH acide	? Probablement en relation avec la tolérance à l'acidité	*E. coli* *S. typhimurium* *A. hydrophila*	(Abshire & Neidhardt, 1993; Foster , 1993; Foster & Hall, 1990; Hassani *et al.*, 1991; Heyde & Portalier, 1990; Hickey & Hirshfield, 1990)
proU	Transport de glycine bétaïne	*S. typhimurium*	(Karem & Foster, 1994; Thomas & Booth, 1992)
psaA	Facteur de virulence	*Y. pestis*	(Lindler *et al.*, 1990)
Pyruvate décarboxylase	Production d'éthanol	*Sarcina*	(Lowe & Zeikus, 1991)
gènes SOS	Réparation de l'ADN	*E. coli*	(Schuldiner *et al.*, 1986)
speF	Ornithine décarboxylase	*E. coli*	(Kashiwagi *et al.*, 1991; Tabor & Tabor, 1985)
gènes de sporulation	Sporulation	*Sarcina*	(Lowe *et al.*, 1989)
sulA	Division cellulaire	*E. coli*	(Smirnova *et al.*, 1994)
régulon *ToxR* (*taxA*, *aldA*)	Facteurs de virulence	*V. cholerae*	(Chen & Winans, 1991; DiRita, 1992; DiRita *et al.*, 1991; Mekalanos, 1992; Parsot & Mekalanos, 1991)
gènes vir	Interaction hôte-bactérie	*A. tumefaciens*	(Mantis & Winans, 1992; Turk *et al.*, 1991; Winans *et al.*, 1986; Winans, 1990; Winans, 1992)
Xylanase	Hydrolyse du xylane	*Thermomyces lanuginosus*	(Purkarthofer *et al.*, 1993)

identifiés avec la fusion *lacZ* chez *S. typhimurium*. Certains gènes (*ompC/F, hyd, cadA*), ont été identifiés par homologie avec ceux connus chez *E. coli*, mais pour la plupart, leur fonction reste inconnue. Parmi ceux-ci, les gènes *aniC, aniI, aciK* qui forment un régulon sous contrôle de OxrG et qui sont co-induits par le pH acide, l'anaérobiose et la tyrosine ou la phénylalanine (Foster *et al.*, 1994). Chez *Salmonella*, le locus *aniG*, composé de deux gènes (*amiA* et *amiB*) est très caractéristique. Le pH affecte la régulation de deux façons : d'une part, il modifie l'affinité du répresseur EarA (protéine de 33 kDa) pour la région opératrice d'*aniG* et d'autre part, il altère la topologie de la séquence d'ADN opérateur ce qui modifie aussi l'affinité pour le répresseur (Karem & Foster, 1993).

c. Gènes qui interviennent dans la pathogénicité :

La baisse du pH est une caractéristique de plusieurs situations de pathogénicité. Cela peut se produire dans l'estomac, dans certaines régions de l'intestin, certains abcès et, pour certains parasites intracellulaires, dans les phagosomes et phagolysosomes. L'étude de l'adaptation à l'acidité et l'expression des gènes régulés par l'acide va prendre de l'ampleur car il est clair qu'il exist des signaux "environnementaux de virulence" (Hall *et al.*, 1995). Parmi ceux-ci, le régulon *phoP/phoQ* est intéressant car il s'active en réponse à un environnement phagocytaire. PhoQ est le senseur de l'environnement acide et quand le pH est acide, PhoP altère la transcription des gènes cibles, qui permettent à *Salmonella* de vivre et de se disséminer en utilisant les macrophages comme véhicule.

2.6.7.3. Influence de la topologie de l'ADN sur l'expression des gènes régulés par le pH

La topologie de l'ADN (degré de superhélicité), est fortement influencée par les conditions environnementales telles que l'osmolarité, la température, le manque de nutriments et le pH (Thunell, 1988). De plus, l'expression de plusieurs gènes régulés par l'environnement est influencée par la topologie de l'ADN (Gauthier & Clément, 1994). Parmi ceux-ci, proU (induit par l'osmose et également régulée par le pH), *ompC*, *ompF*, *cad*, *adi* et *aniG* (Karem & Foster, 1993; McGowan *et al.*, 1994; Raja *et al.*, 1991). Il a été montré, chez *E. coli* et *S. typhimurium*, que le maintien d'un pH alcalin dans le milieu de culture tend à augmenter la superhélicité des plasmides alors qu'un pH acide la diminue. Les gènes affectés par des conditions environnementales répondent de façon différente à chacune de ces conditions s'ils sont placés dans des plasmides avec une superhélicité connue (Karem & Foster, 1993). Ces auteurs ont aussi postulé un modèle hypothétique pour expliquer le contrôle du locus *aniG* (Karem & Foster, 1993) (Fig. 8). Ce modèle prédit deux formes conformationnelles de EarA qui dépendent de la présence ou de l'absence de mannose et d'un pH bas. En absence de mannose (ou à pH élevé), la protéine EarA aurait une haute affinité pour l'opérateur, ce qui occasionnerait son union et la répression d'*aniG* dans toutes les conditions topologiques (Fig. 8a). Ce mécanisme peut être associé à un senseur membranaire et *earB* peut remplir ce rôle (Foster & Aliabadi, 1989).

Un autre facteur qui influence la topologie de l'ADN et qui a été mis en cause récemment, est le locus *hns*, formellement *osmZ*, qui code pour la protéine H-NS semblable aux histones (Hickey & Hirshfield,

1990). Les H-NS sont des protéines qui s'associent à l'ADN de façon non-spécifique et qui forment des complexes avec le chromosome bactérien, facilitant sa structure et son organisation. Des mutations dans le locus *hns* introduisent des changements dans l'expression de gènes d'autres loci. Parmi ces gènes, *cad* et *adi* s'expriment à pH 8 en réponse à des mutations en *hns* (Raja *et al.*, 1991).

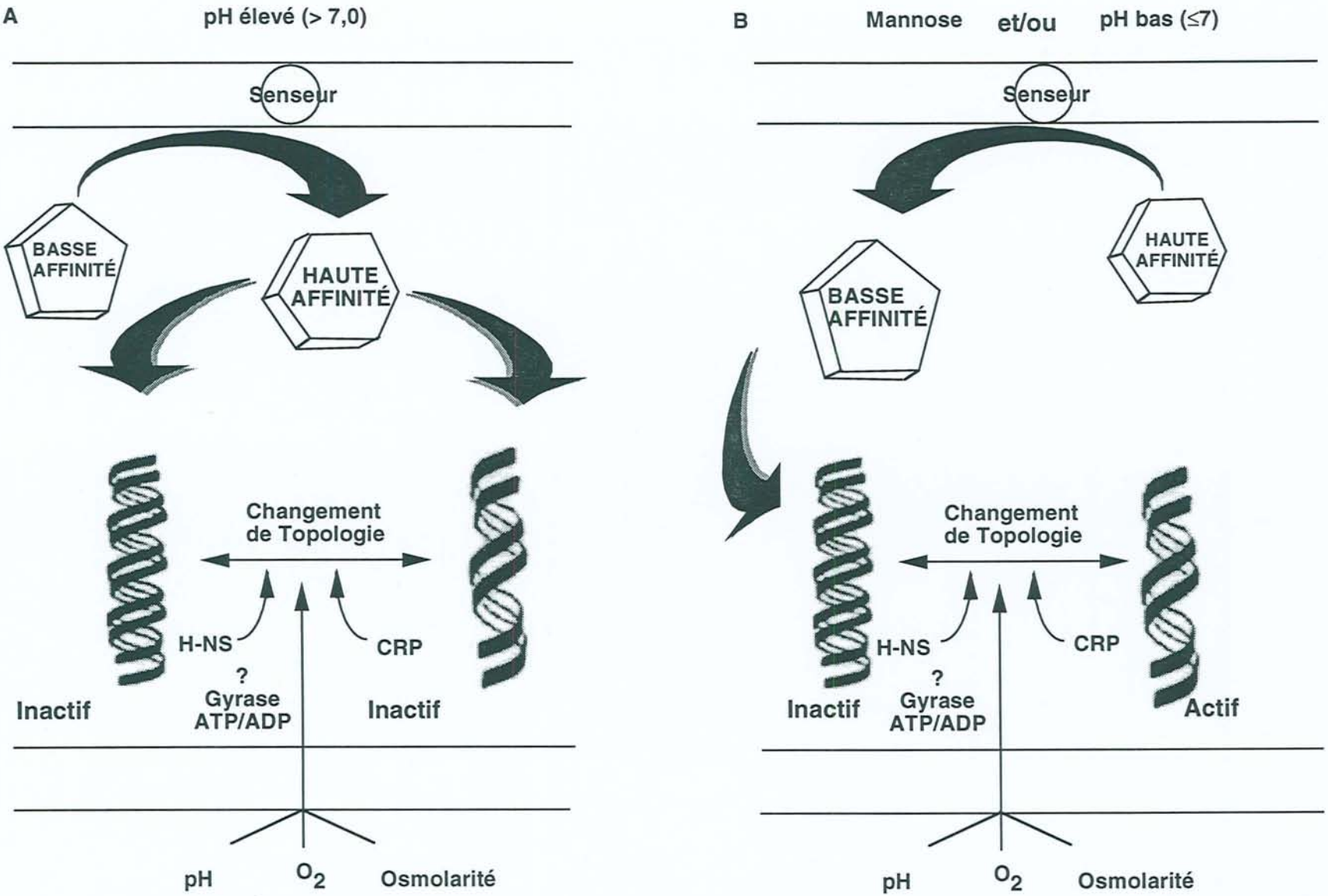


Figure 8. Modèle hypothètique du contrôle du locus *aniG* par de multiples variables environnmentales, quand le represseur est dans la forme de basse affinité et que l'ADN a une topologie ouverte la transcription se produit. L'hexagone et le pentagone réprésentent des formes alternatives de EarA (d'après Karem et Foster 1993).

II. Objectifs du travail

L'étude de la réponse bactérienne aux stress a été axé sur *E. coli* et *B. subtilis* mais il y a très peu de travaux dédiés à l'étude de ce type de réponse chez les bactéries lactiques et spécialement chez *Sc. thermophilus*. La réponse au stress est caractérisé par une série de protéines de fonctions diverses découvertes depuis peu : protéases, protéines de "retouche" de la structure tertiaire, protéines liées à la transcription et à la traduction. De nombreux gènes et protéines ont un rôle physiologique *in vivo* encore mal défini. On peut supposer que ces gènes et protéines interviennent dans des phénomènes de régulation ou dans une fonction qui ne sont pas encore décrits. Pourtant, la physiologie et la bioénergétique des bactéries lactiques dans les environnements acides sont bien connues (Kashket, 1987; Nannen & Hutkins, 1991a). Beaucoup moins d'informations existent sur l'induction protéique et sa réponse globale au stress acide bien qu'elles acidifient leur milieu par la production de l'acide lactique. En effet, le pH optimal de croissance des ces bactéries se situe entre 5,7 et 7,0 . Les lactobacilles arrêtent leur croissance à un pH extérieur (pHext), de 3,2-3,5 et les streptocoques et lactocoques le font à un pHext de 4,2-4,7, même si la fermentation peut continuer pour un pH légèrement inférieur à ces valeurs. À ces bas pH, les BL se développent très lentement, avec en plus, un risque d'altération des bactéries et une perte progressive de la viabilité. En général dans l'industrie des produits lactés fermentés, (comme les yaourts et les laits acidifiés), cette perte de viabilité après obtention du pH désiré n'est pas capital, du point de vue technologique (Hutkins, *et al.*, 1993), surtout que la post-acidification peut entraîner des défauts dans la saveur du produit fini. Cependant, la survie dans des conditions extrêmes d'acidité est

primordiale dans l'industrie des ferments destinés aux ensemencements, ainsi que pour les souches utilisées comme probiotiques.

C'est pourquoi le but de ce travail est de décrire la réponse d' une bactérie lactique industrielle, *Streptococcus thermophilus*, au stress acide et de caractériser une protéine de 16 kDa surexprimée dans la phase stationnaire de croissance, quand le milieu est extrêmement acide.

Notre travail se divise en trois parties principales :

I. Caractérisation physiologique pour l'expression protéique de la réponse de *Sc. thermophilus* PB18 à un environnement acide. Cette caractérisation est réalisée grâce à des techniques classiques de microbiologie (courbes de croissance, numération en boîte de Pétri), et biochimiques (électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et électrophorèse bidimensionnelle des protéines cellulaires solubles).

II. Purification de la protéine de 16 kDa à partir de l'ensemble des protéines solubles de la souche. Pour achever cette purification, nous avons mis au point un protocole en trois étapes : précipitation au sulfate d'ammonium suivie d'une chromatographie d'échange anionique et, enfin une chromatographie en phase inverse pour obtenir une protéine pure à l'homogénéité. Ce protocole à été mis au point à la fois pour obtenir des quantités analytiques de protéine et comme méthode semipréparative.

III. Caractérisation de la protéine purifiée par la détermination de sa séquence NH_2 terminale, de sa masse moléculaire par spectre de masse et de la masse moléculaire des peptides issus de son hydrolyse avec la trypsine et l'endopeptidase Arg-C. Enfin, ce chapitre se termine par une analyse informatique des homologies de la protéine avec des banques de données.

III. Matériel et Méthodes

1. Matériel et Réactifs

Chromatographie

a. FPLC

- Unité FPLC et colonne MonoQ HR 5/5 (*Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suède*) ;
- Colonne DEAE-TSK semi-préparative *(Merck, Allemagne)*

b. HPLC

- unité HPLC composée d'une pompe L-6200 *(Merck, Allemagne)*, d'un mélangeur dynamique *(Knauer, Berlin, Allemagne)* et injecteur automatique 655A-40 (*Merck*) ;
- détecteur U.V. L-3000 deux voies *(Merck, Allemagne)*, intégrateur D-2000 (Merck) ;
- détecteur à barrette de diodes 996 *(Waters, Milford, États-Unis)* couplé à un ordinateur 486/33i *(NEC, Boxborough, États-Unis)*. L'appareil enregistre 10 spectres seconde^{-1} (dans une zone comprise entre 200 et 300 nm). L'analyse est réalisée au moyen du logiciel Millenium version 2.0.1. *(Millipore , Milford, États-Unis)* ;
- colonnes Delta-Pak™ C4, 30 nm, 5 µm ; analytique 5 - 150 mm, semi-préparative 7,8 x 300 mm (*Waters, Milford, Massachusetts*) ;

Électrophorèse

- appareil pour électrophorèse format 150 x 150 mm (*Hœfer Scientific Instrument, USA*) ;
- appareil à gradient XPO 77 (*Hœfer Scientific Instrument, USA*) ;
- appareil pour électrophorèse monodimensionnelle Miniprotean II (*BioRad, Palo Alto California*)
- appareil pour électrophorèse bidimensionnelle "Investigator-2D" (*Millipore, Milford, USA*) ;
- logiciel "BioImage" version 6.01 pour analyse des gels d'électrophorèse (*Millipore, Milford, USA*) ;
- membrane de transfert PVDF (*BioRad, Palo Alto California*)
- système d'électrophorèse capillaire Quanta 4000 et capillaire en silice fondue de 75 µm de diamètre intérieur et 60 cm de long (*Waters, Milford, USA)* ;
- appareil de transfert de protéines Milliblot semi sec à graphite (*Millipore, Milford, USA*) ;

Séquençage

- Micro-séquenceur automatique 476A Perkin Elmer *(Applied Biosystems Division (ABI) Foster City, Californie)*

Spectrométrie de masse

- ESMS (Électrospray) : VG BioA (*Bio Tech, Manchester, UK)*
- MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption - Time of Flight) : Biflex équipé d'un réflectron *(Bruker, Bremen, Germany).*

Matériels divers

- évaporateur Speed-Vac RC 1010 (*Jouan, Saint-Herblain, France*) ;
- sonicateur Vibra-cell 600 W (*Bioblock Scientific, Illkirch, France*) ;
- centrifugeuse J2-21 (*Beckman, Palo Alto, Californie*) ;
- centrifugeuse Plasma T1000 (*Jouan, St-Nazaire, France*) ;

- lyophilisateur Hetosic (*Heto Lab. Equipment A/S, Birkerød, Danemark)* ;
- boudins de dialyse Visking (10000 Da) (*Polylabo, Block, France*) ;
- spectromètre UV2100 couplé à un système informatique (*Shimadzu, Kyoto, Japon*).

Réactifs divers

- acrylamide et N,N'-méthylène bisacrylamide (*B.D.H. Chemicals, Poole,. Grande-Bretagne*) ;
- ampholytes, pH 3-10 et pH 4-8 (*Millipore, Milford, USA*) ;
- dithiothreitol (DTT) (*Sigma Chemical corporation, Saint-Louis, États-Unis*) ;
- bleu de Coomassie R250 (*Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Allemagne*) ;
- nitrate d'argent (*ProLabo, France*) ;
- réactif OFM anion-BT et UV-Cat 2 pour électrophorèse capillaire (*Waters, Milford, USA*) ;
- chromate de sodium tétrahydraté et tropolone (*Aldrich, Milwaukee, États-Unis*) ;
- acétonitrile (*Rathburn Chemical Limited, Walkerburn, Royaume-Uni*) ;
- acide trifluoroacétique (TFA) (*Sigma Chemical corporation, Saint-Louis, États-Unis*) ;

2. Enzymes

- endoprotéinase Arg-C (EC 3.4.21.35) obtenue des glandes submaxilaires de souris. Purifiée par HPLC spécialement pour la séquence de protéines (*Sigma Chemical corporation, Saint-Louis, États-Unis*) ;

- trypsine (EC 3.4.21.4.) extraite de pancréas de boeuf. Purifiée par HPLC spécialement pour la séquence de protéines (*Sigma Chemical corporation, Saint-Louis, États-Unis*). ;
- ribonucléase A (EC 3.1.26.2.) (*Sigma Chemical corporation, Saint-Louis, États-Unis*) ;
- Dnase I (EC 3.1.21.1.) *(Sigma Chemical corporation, Saint-Louis, États-Unis).*

3. Souches et milieux de culture

3.1. Souches

L'étude de la réponse au stress et de la phase stationnaire a été réalisée avec la souche industrielle de *Streptococcus thermophilus*, **PB18**.

Cette souche fait partie de la collection du laboratoire des Biosciences de l'Aliment. Son origine est un levain mixte industriel de fromages à pâte pressée cuite, fourni par la Fédération Internationale Laitière (FIL). Son passé industriel et ses caractéristiques intéressantes du point de vue de la recherche nous on poussé à l'utiliser dans ce travail. Pour plus de commodité, nous garderons par la suite, l'appellation PB18 pour la définir. D'autres souches ont été utilisées ponctuellement dans ce travail. Les souches, sont conservées congelées à -20°C dans du lait écrémé reconstitué à 10 %, stérilisé à 110 °C pendant 15 minutes. Après une courte incubation, les tubes sont mis au congélateur immédiatement après la coagulation du lait. Avant toute expérience, une préculture est réalisée dans 10 ml de lait par

ensemencement de 0,1 ml de culture décongelée. La préculture est incubée à 42 °C pendant 16 heures.

3.2. Milieux de culture

Les milieux de culture TPPY (Bracquart, 1981), (proteose peptone nº 3, 7,0 g l^{-1}; tryptose, 7,0 g l^{-1}; extrait de levure, 2,0 g l^{-1}; lactose, 10,0 g l^{-1}) et M17 (Terzaghi & Sandine, 1975), (tryptone, 2,5 g l^{-1}; bacto-peptone, 2,5 g l^{-1}; soyase, 5,0 g l^{-1}; extrait de levure, 2,5 g l^{-1}; extrait de viande, 3,0 g l^{-1} (poudre) ou 5,0 (pâte) g l^{-1}; β-glycérophosphate de sodium, 19,0 g-l^{-1}; $MgSO4 \cdot 7H_2O$, 0,25 g l^{-1}; acide ascorbique, 0,5 g l^{-1}; lactose, 10 g l^{-1}), ont été utilisés tout au long de ce travail. Pour l' utilisation en boites de Pétri, ces milieux sont gélosés à raison de 15 g d'agar par litre de milieu. Les milieux sont stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant 15 minutes et la source carbonée (lactose) est ajoutée après, sous forme d'une solution stérilisée par filtration sur membrane.

3.3. Conditions de culture

Toutes les cultures sont ensemencées à raison de 1,0 % (v/v) de la préculture et incubées à 42 °C. La croissance bactérienne est estimée par turbidimétrie par la lecture de la densité optique à 650 nm (D.O.650) et par la mesure du pH.

4. Préparation des extraits bactériens

4.1. PAGE-SDS en gradient de polyacrylamide et la PAGE-2D

Le protocole de préparation des échantillons est présenté sur la figure 1. Après deux lavages en tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7,0), environ 0,5 g du culot bactérien (poids humide) en suspension dans le même tampon phosphate, sont lysés par sonication pendant 3 min à une puissance de 100 W et avec un cycle actif de 50%. Pour éviter l'échauffement, les cellules sont maintenues tout le temps dans un récipient placé dans de la glace fondante. Après centrifugation pendant 10 min à 13 000 g, les débris cellulaires et bactéries non désintégrées sont éliminées. Les fractions ainsi obtenues sont conservées à 4°C. La concentration protéique des extraits cellulaires est déterminée selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Ensuite, la quantité nécessaire de protéine est aliquotée et congelée.

4.2. Purification de protéines.

Les cellules issues de 10 l de milieu sont lavées comme précédemment. Elles sont resuspendues dans le tampon de sonication à 4°C (Tris-HCl, 50 mM, pH 7 ; DTT 0,1 mM ; glycérol, 20 %) et soniquées dans les conditions précédentes mais pendant 10 min, afin de favoriser le maximum de cassure de cellules. L'addition de di-thio-thréitol (DTT) dans le tampon de sonication permet de majorer le temps de sonication par la protection des protéines contre l'oxydation.

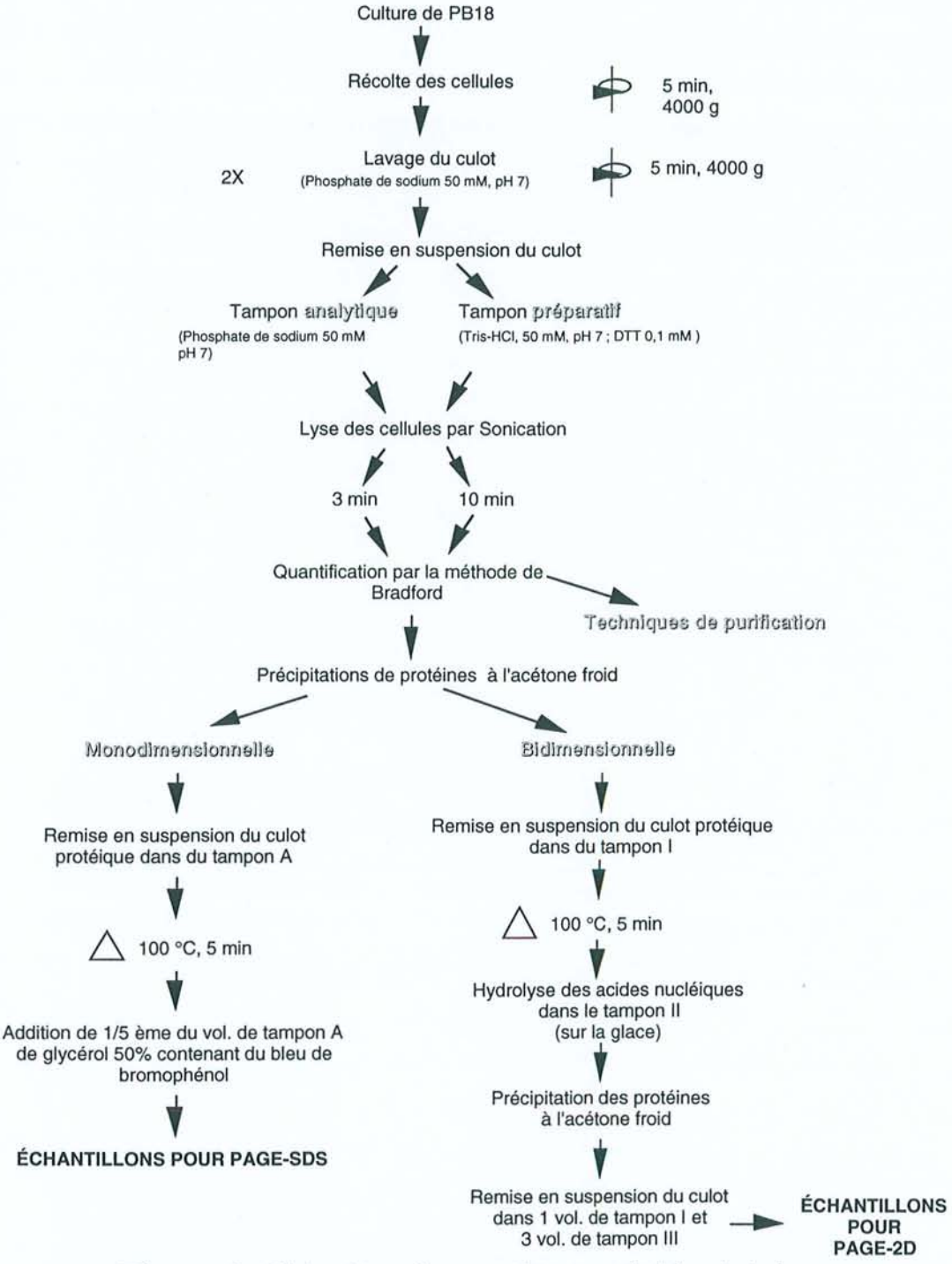


Figure 1. Obtention des protéines solubles totales pour électrophorèses mono et bidimensionnelle et pour la purification de la protéine de 16 kDa.
Tampon A : Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8.
Tampon I : Tris, 22 mM ; Tris-HCl, 28 mM ; DTT, 200 mM ; SDS 0,3% (v/v).
Tampon II : Tris 24 mM ; Tris-HCl, 476 mM ; $MgCl_2$, 50 mM ; Dnase I, 1 mg/ml ; Rnase A 0,25 mg/ml.
Tampon III : urée, 9,9 M ; ampholytes, 2,2% (v/v) ; DTT, 100 mM

centrifugation ; Δ, chauffage.

5. Techniques électrophorétiques.

5.1. Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS 0,1% (PAGE-SDS).

La méthode en tampons discontinus de Laemmli (Laemmli, 1970), est utilisée. Le gel est formé d'un gel de séparation (T=15,4% ; C=2,7%) en tampon Tris-HCl 0,38 M, pH 8,8 contenant 0,1% (p/v) de sodium dodécylsulfate (SDS) et d'un gel de concentration (T=4,9% ; C=2,7%) en tampon Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 contenant 2% (p/v) de SDS. Les échantillons (2 mg ml^{-1}) sont dissous dans un tampon Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 contenant 2% (p/v) de SDS et 5% (v/v) de β-mercaptoéthanol. Ils sont chauffées 3 min à 100°C avant addition d'un cinquième de glycérol à 50% (v/v) contenant du bleu de bromophénol. Le tampon d'électrodes contient du Tris 0,05 M, de la glycine 0,4M et 0,1% (p/v) de SDS. Les migrations sont effectuées à 60 mA et 30 W par gel et 500 V maximum, pour l'appareil de marque Hœfer et à 100 V constants dans le cas de la minichambre de BioRad. Le mélange commercial de *Sigma Chemical corporation, Saint-Louis, États-Unis* est utilisé comme marqueur de masse moléculaire. Il comprend : α -lactalbumine du lait bovin (14,2 kDa), inhibiteur trypsique du grain de soja (20,1 kDa), trypsinogène traité PMSF de pancréas bovin (24 kDa), anhydrase carbonique d'érythrocyte bovin (29 kDa), glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase du muscle de souris (36 kDa), ovalbumine (45 kDa) et sérum albumine bovine (66 kDa)].

5.2. Électrophorèse PAGE-SDS en gradient de polyacrylamide

Deux systèmes de gels sont utilisés pour réaliser un gradient linéaire d'acrylamide, l'un de faible concentration en acrylamide/ bisacrylamide (T = 10,3% ; C = 2,7%) et l'autre de forte concentration (T=28,7% ; C= 2,7%) contenant 3,9% de saccharose afin de stabiliser le gradient. Les tampons de gel sont identiques à ceux utilisés pour la PAGE-SDS classique.

Les solutions à 10 et 28% sont versées dans les compartiments de l'appareil à gradient pour obtenir le gradient de concentration linéaire de 10 à 28%. L'écoulement entre les deux plaques se fait à l'aide d'une pompe péristaltique. La linéarité du gradient obtenu a été vérifiée en utilisant les solutions à 10 et 28% sans agent réticulant et en présence de bleu de bromophénol, ce qui permet de suivre la densité optique du gel à 660 nm dans une cuve à spectrophotométrie en flux continu.

Les échantillons se préparent de façon identique à la PAGE-SDS classique.

5.3. Révélation des gels d'électrophorèse.

Les protéines des gels sont fixées dans l'acide trichloroacétique (TCA) à 12% (p/v) pendant 1 h, puis colorées pendant 2 h au bleu de Coomassie R250 à 0,1% (p/v) dissous dans un mélange de méthanol 50% (v/v) et TCA 2% (p/v). La décoloration a lieu pendant une nuit dans une solution de méthanol 30% (v/v) et d'acide acétique 7,5% (v/v), dans l'eau.

5.4. Électrophorèse bidimensionnelle (PAGE-2D)

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) en deux dimensions peut séparer les protéines par deux propriétés différentes, en général leur charge et leur masse moléculaire. Il existe quatre formats différents de gels : le système d'O'Farrell (1975 ; O'Farrell *et al.*, 1977), le système de Garrels (Thunell, 1988), le gel géant (Gauthier & Clément, 1994). et le minigel. Toutes utilisent pour la première dimension l'isoélectrofocalisation (IEF), qui sépare les protéines selon leur point isoélectrique (pI) et pour la seconde dimension, une SDS-PAGE. Les quatre systèmes diffèrent dans leurs dimensions physiques, par la quantité de protéine que l'on peut déposer et la quantité de spots résolus. Nous avons utilisé le système Investigator de chez Millipore qui est basé sur le modèle de O'Farrell.

Cinq étapes sont nécessaires pour réaliser une électrophorèse bidimensionnelle :

- la préparation des échantillons est essentielle car le résultat final sera fonction de cette première étape. Elle consiste à dénaturer et solubiliser les protéines afin qu'elles puissent pénétrer dans le gel d'IEF, tout en conservant leur intégrité ;
- l'isoélectrofocalisation consiste à faire migrer les polypeptides dans un gradient de pH généré par le passage d'un courant électrique constant dans un gel de polyacrylamide contenant des ampholytes. Les ampholytes sont composés d'un mélange complexe de molécules polyaminopoly-caboxyliques : molécules amphotères possédant des constantes de dissociation variées. L'IEF est une technique de séparation à l'équilibre : les polypeptides migrent jusqu'à une valeur de pH pour laquelle leur charge nette est nulle. Une fois le pI atteint, la migration des polypeptides s'arrête ;

- l'équilibrage est indispensable pour complexer le SDS aux protéines et pour éliminer l'urée, les ampholytes et le Triton X100 du gel IEF. Cette étape doit être de courte durée pour éviter la perte de protéines ;
- La deuxième dimension est une PAGE-SDS classique mais à la place d'utiliser un gel de concentration, le gel de la première dimension est utilisé comme tel ;
- La révélation des protéines se fait par coloration au nitrate d'argent, qui remplace la technique au bleu de Coomassie, moins sensible.

Les résultats sont exploités par analyse d'images qui permet la détection, la quantification et la classification des éléments contenus dans une image.

5.4.1. Protocole expérimental

Les différentes étapes de l'électrophorèse bidimensionnelle se déroulent sur 3 jours et sont résumées dans la figure 2.

❍ Premier jour : IEF

- Polymérisation des gels d'IEF (T=4,1% ; C=2,6%) dans des capillaires de 18 cm de longueur et de 1 mm de diamètre ;
- élimination des bulles présentes dans les capillaires avec le tampon de cathode et injection du tampon protecteur dit "overlay" qui va séparer l'échantillon et le gel, du tampon alcalin ;
- préfocalisation qui permet l'élimination du persulfate du gel et la formation du gradient de pH : 1 à 2 heures à 1500 V et à 110 mA ;
- dépôt de l'échantillon (20 µg) ;
- isoélectrofocalisation : 17H 30 à 18000 V h.

❍ Deuxième jour : PAGE-SDS

- Polymérisation des gels de deuxième dimension PAGE-SDS (T=12,5% ; C = 2,6%) pendant 1 à 2 H ;
- une fois l'IEF achevée, expulsion des gels d'IEF des tubes à l'aide d'une seringue et immersion 2 min dans le tampon d'équilibrage (Tris 0,3 M ; Tris-HCl 0,075 M ; SDS 3% (p/v) ; (DTT) 50 mM, bleu de bromophénol : 0,01% (p/v)) ;
- dépôt des gels d'IEF sur le haut des gels de deuxième dimension ;
- migration : 8 h à 500 V maximum et 1,6 mW par gel ;
- à la fin de la migration, on place les gels une nuit dans la solution fixatrice (méthanol 50% (v/v), acide acétique 10% (v/v) dans l'eau ultra pure).

❍ Troisième jour : révélation des gels

- lavage des gels 3 fois 20 min dans de l'eau ultra-pure ;
- 30 min dans la solution DTT ($5.\cdot10^{-4}$ %) ;
- imprégnation 30 min dans la solution de nitrate d'argent (0,2% (p/v)) ;
- rinçage 5 min dans de l'eau ultra-pure ;
- révélation 10 min dans la solution de carbonate de sodium (3,5% (p/v)), formaldéhyde (0,05% v/v)) ;
- trempage des gels dans la solution d'acide acétique (3% (v/v)) pour arrêter la réaction ;
- rinçage dans de l'eau ultra-pure et conservation des gels dans du glycérol (20% (v/v)).

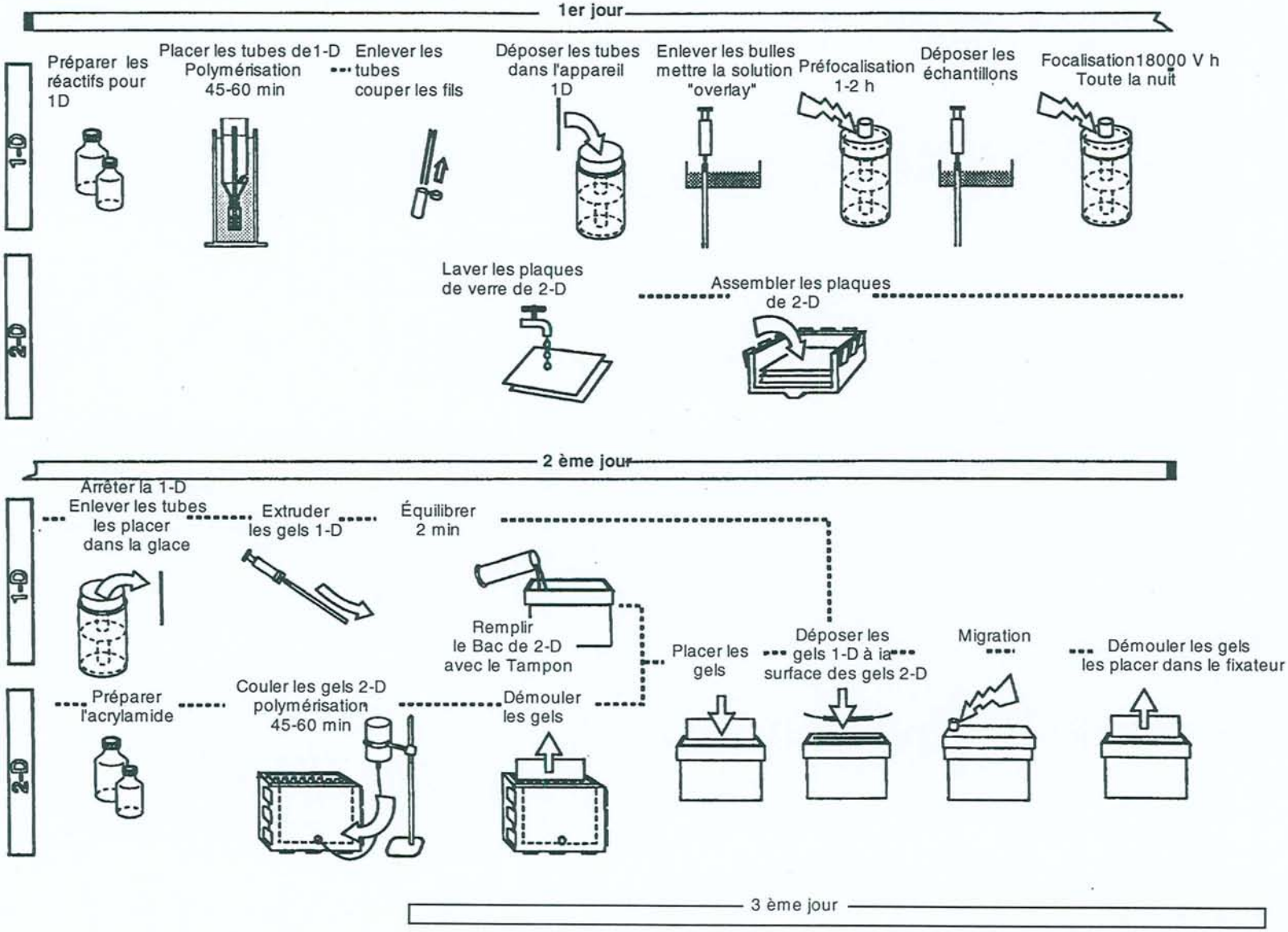


Figure 2. Étapes de l'électrophorèse bidimensionelle

5.5. Transfert des protéines sur membrane (Blot)

Après une électrophorèse, les protéines sont incluses dans le gel de polyacrylamide. Dans ce milieu, les protéines sont captives et ne peuvent être étudiées ainsi. Pour profiter du grand pouvoir de séparation que présente l'électrophorèse, et continuer l'étude des protéines, plusieurs techniques ont été développées : l'électroélution et l'électrotransfert de protéines sur membrane sont les plus performantes.

Après une PAGE-1D petit format, le gel est incubé dans le tampon de Towbin *et al.*, (1979), dilué de moitié dans l'eau distillée ultra pure et additionné de 0,1% de SDS. La membrane est équilibrée dans le même tampon et le "sandwich" est monté (Fig. 3). Le transfert est réalisé avec un courant de 1,2 $mA \cdot cm^{-2}$ pendant 30 minutes. Après transfert, la membrane PVDF est lavée à l'eau ultra pure, puis colorée au Bleu de Coomassie 0,1% dans du méthanol 40% pendant 5 minutes et décolorée dans du méthanol 50% pendant 10-15 minutes.

6. Chromatographie liquide

6.1. FPLC d'échange d'ions analytique et préparative

La colonne Mono Q analytique ainsi que la colonne semi-préparative DEAE 5 PW de 21,5 mm de diamètre et 150 mm de longueur sont utilisées. La phase mobile est constituée du tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 7. Le gradient de force ionique est réalisé avec

NaCl et croît linéairement de 0 à 0,35 M. Le débit appliqué est de 1 $ml \cdot min^{-1}$ en condition analytique (Mono Q) et de 8 ml. min^{-1} pour les fractionnements semi-préparatifs. La détection est réalisée à 215 ou 280 nm.

6.2. HPLC en phase inverse analytique et préparative

La purification de la protéine de 16 kDa a été réalisée par HPLC de phase-inverse sur une colonne C4. analytique ou préparative. Dans le cas de la chromatographie analytique, 200 µg de la fraction protéique pré-purifiée sont déposés sur la colonne. L'élution des protéines est réalisée pendant 60 minutes avec un débit de 1 ml min^{-1} à l'aide d'un gradient de 10 à 70 % (v/v) d'acétonitrile dans l'eau et 0,1 (v/v) de TFA. La purification semi-préparative se réalise à partir de 10 mg de protéines pré-purifiées et l'élution est réalisée par un gradient de 35 à 55 % d'acétonitrile - TFA 0,1 % pendant 20 minutes avec un débit de 2,8 ml min^{-1}.

L'analyse des hydrolysats enzymatiques de la protéine de 16 kDa est réalisée par HPLC de phase-inverse sur une colonne Microbore C18 de 2,5 x 100 mm dans une chaîne HPLC Perkin Elmer avec un gradient de 10 à 70% d'acétonitrile avec une concentration de TFA constante de 0,1% et un débit de 0,1 ml min^{-1}.

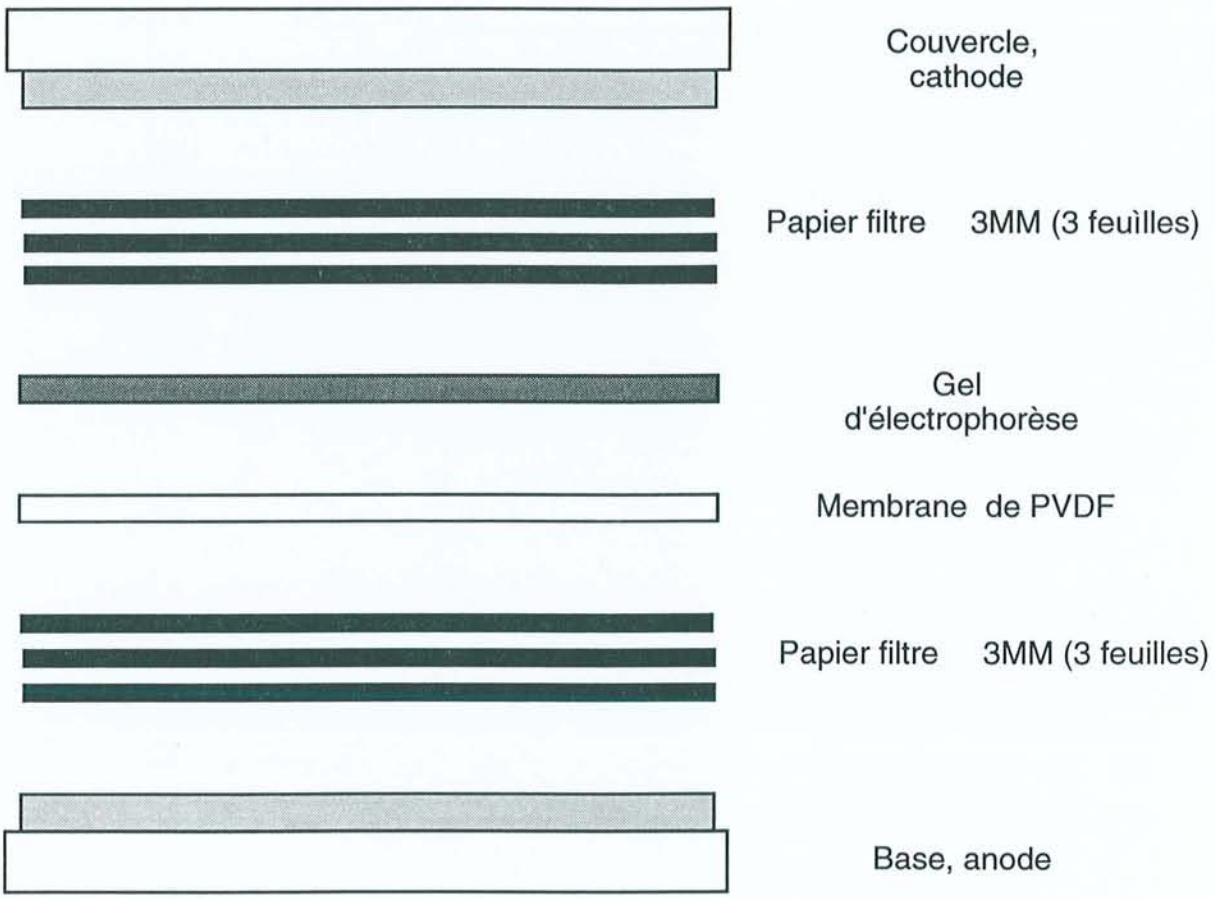


Figure 3. Système de blot semi sec à graphite. Le gel, la membrane et le papier filtre sont équilibrés avec le tampon de Towbin dilué de moitié et additionné de 0,1% de SDS (tampon de transfert). La membrane de PVDF est incubée tout d'abord en méthanol absolu, et ensuite équilibrée avec le tampon de transfert.

7. Interrogation de banques de données et prédiction de structures secondaires

Nous utilisons le logiciel GCG (Genetic Computer Group, Wisconsin, États-Unis) version 1991 (Service Commun de Biophysicochimie des Interactions Moléculaire, Université Henri Poincaré, Nancy I). L'interrogation des banques de données est réalisée par les programmes TFastA et TBLAST ((Altschul *et al.*, 1990). Le programme Plotstructure de GCG utilise l'algorithme de Chou et Fasman (1974) ou de Garnier *et al.*, (1978) pour prédire les structures secondaires. D'autres logiciels utilisés sont décrits et répertoriés avec leur adresse électronique dans la partie Résultats.

8. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique capable de produire des ions et de mesurer leur rapport masse sur charge (m/z). Les analyses ont été réalisées dans le laboratoire de Spectrométrie de Masse de la Faculté de Chimie de l'Université de Strasbourg dirigé par Monsieur le Professeur Vandorsealer.

8.1. Rappel de définitions

8.1.1. La résolution

La résolution est la capacité à différencier des pics d'ions de masses très proches. Elle est donc fonction de la largeur à la base des pics de masse. La définition de la résolution est : $R = m/\Delta m$ (Fig. 4)

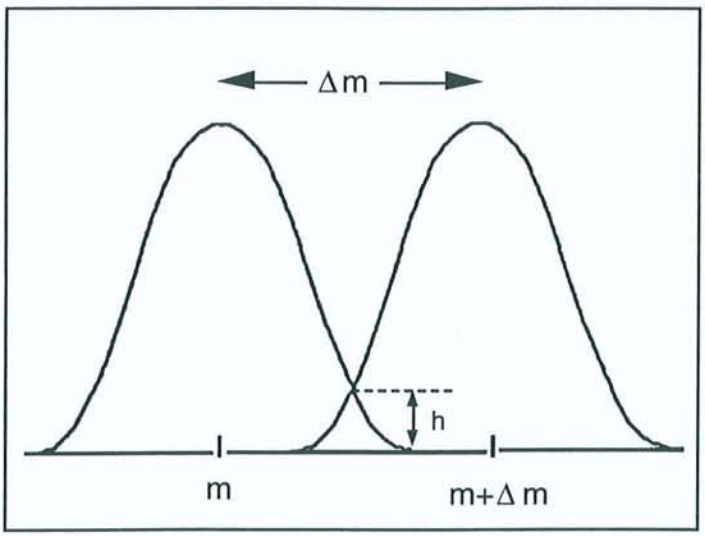


Figure 4. Schématisation de la résolution dans la spectrométrie de masse.

La largeur du pic est due à l'étalement des masses qui est fonction de la dispersion de l'ion mesuré. Réduire cette dispersion demande un réglage de l'appareil qui revient à diminuer la sensibilité. Dans le cas de haute masse moléculaire, cette résolution n'a pas besoin d'être élevée, car nous n'avons pas besoin de séparer des ions isotopiques qui diffèrent d'une unité de masse.

8.1.2. Contribution isotopique, masse monoisotopique, masse chimique

Les produits naturels sont constitués par des mélanges d'isotopes stables des différents éléments qui les composent. Un composé apparaît donc en spectrométrie de masse comme un mélange de produits de formules brutes identiques mais différentes par leurs compositions en isotopes mineurs. En mode FAB (Fast Atom Bombardement) , on note le pic P pseudomoléculaire $(M+H^+)^+$, dit *monoisotopique*, ne comportant que les isotopes les plus légers, le pic P+1 correspondant aux molécules ayant une unité de masse de plus par *contribution isotopique*, le P+2 et ainsi de suite. Dans les produits de faible masse moléculaire, le pic P est largement majoritaire et il n'y a aucun problème de reconnaissance mais dès que nous atteignons des masses élevées, le P devient très vite minoritaire et il n'est plus possible de le distinguer clairement sans faire une simulation par un calcul du profil isotopique. Il est alors très difficile et donc dangereux d'essayer de le reconnaître. Si l'on considère l'enveloppe de ce massif, on constate que nous avons à faire à une courbe asymétrique en cloche dont le barycentre correspond à la masse chimique de la molécule, c'est cette mesure que nous utiliserons dans le cas de mesure des masses élevées.

8.2. Présentation générale de trois techniques : a) Appareil magnétique avec ionisation en mode FAB (Fast Atom Bombardement) ; b) Quadripôle avec mode d'ionisation électrospray (ES) et c) Désorption-ionisation laser et détection à temps de vol (MALDI-TOF).

8.2.1. Mode d'ionisation par FAB

8.2.1.1. Principe

La technique FAB permet de volatiliser et d'ioniser simultanément des molécules qui ne sont pas ou peu volatiles. Cette méthode permet de travailler sur des produits en solution alors qu'avec les méthodes traditionnelles d'impact électronique et d'ionisation chimique, la molécule doit être volatilisée avant d'être ionisée. Cette méthode a été introduite par Barber (Barber *et al.*, 1988).

8.2.1.2. Description de la technique

Dans ce mode d'ionisation, le produit étudié est solubilisé dans une matrice et bombardé par un jet d'atomes (Argon, Xénon ou Césium) de forte énergie cinétique (8 à 10 keV). Dans le cas de mesure des hautes masses, le canon utilisé sera un canon au césium, dans le cas des peptides, nous utilisons un bombardement avec des atomes d'argon. (Fig. 5). Lors du bombardement, des ions négatifs ou positifs ainsi que des fragments et des molécules neutres sont expulsés. On peut donc choisir de détecter soit des ions positifs soit des ions négatifs.

La totalité des mesures présentées ici sont faites en détectant des ions positifs. Les mesures ont été faites à l'aide d'un spectromètre de masse comportant un secteur magnétique suivi d'un secteur électrostatique, cet appareil est dit à géométrie inversée.

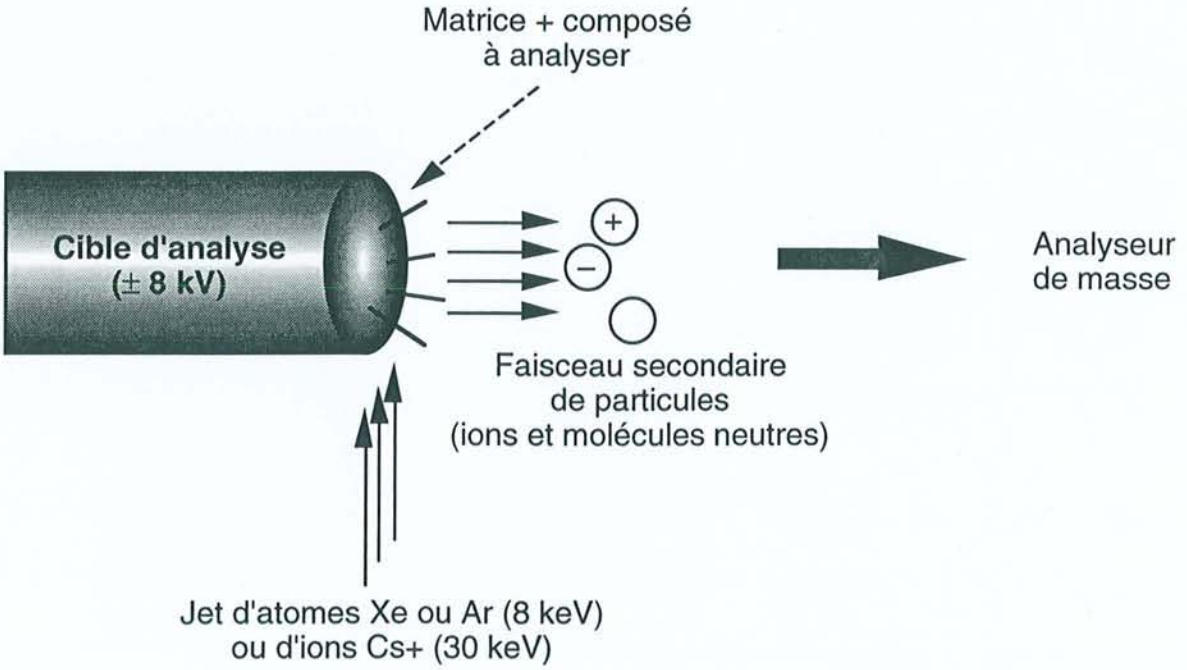


Figure 5. Principe de la désorption-ionisation en FAB.

8.2.1.3. Nature des ions obtenus

La formation des ions est due à un phénomène de désorption très complexe qui est encore sujet à controverse En mode positif l'ion pseudomoléculaire se présente sous la forme $(M+H)^+$, en mode négatif l'ion pseudomoléculaire se présente sous forme $(M-H)^-$. Différents types d'ions peuvent être obtenus, citons en mode positif les ions suivants:

- Ion pseudomoléculaire $(M+H)^+$
- ions de fragmentation

- ions multichargés $(M+nH)^{n+}$
- ions provenant de l'addition de métaux alcalins $(M+Na)^+$, $(M+K)^+$ etc.... ou de la matrice $(M+matrice+H)^+$.

8.2.1.4. Analyseur magnétique

Un analyseur magnétique comporte généralement un secteur magnétique (Fig. 6) et un secteur électrostatique (Fig. 7). Les ions formés dans la source sont accélérés sous une tension de 8 keV. Les ions qui traversent le champ magnétique sont déviés par la force magnétique et la force centrifuge. Les ions sont séparés d'après le rapport m/z, qui est fonction directe des variations du champ magnétique. Le secteur électrostatique va servir à focaliser tous les ions de même énergie sur le détecteur.

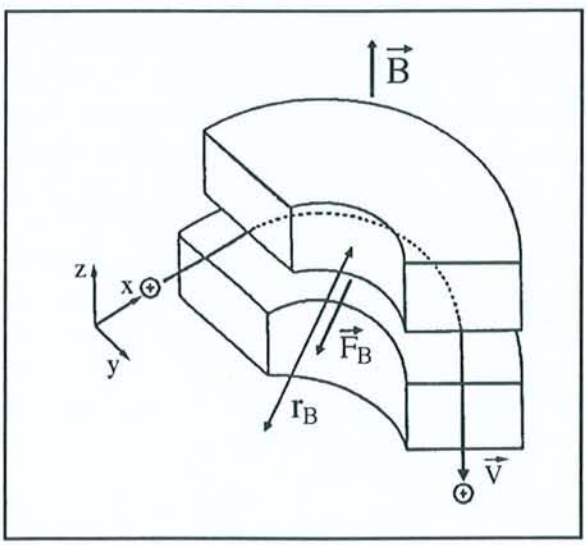


Figure 6. Trajectoire des ions positifs dans un champ magnétique.

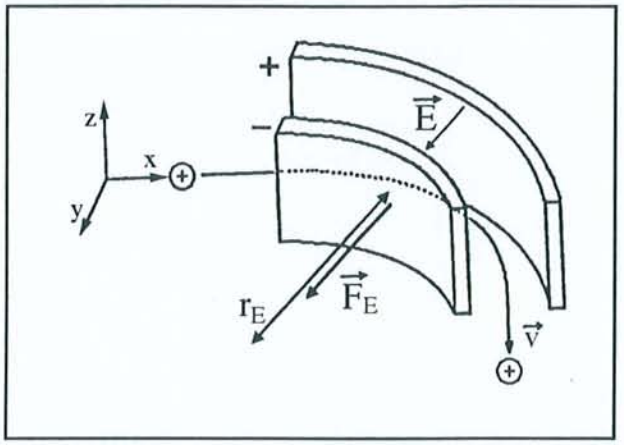


Figure 7. Trajectoire des ions positifs dans un champ électrostatique.

8.2.2. Mode d'ionisation par électrospray

8.2.2.1. Principe

Cette méthode est très particulière car elle utilise une source à la pression atmosphérique. L'échantillon en solution est amené dans la chambre de nébulisation par un capillaire à un débit de 2 à 4 ml/mn. Il existe entre la pointe du capillaire et la première électrode de l'analyseur une différence de potentiel de 3,2 kV. Sous l'effet de ce haut champ électrique, il y a formation d'un électrospray, c'est-à-dire d'une multitude de micro-gouttelettes très chargées (Fig. 8). Le solvant de ces gouttelettes est évaporé par le passage à contre-courant d'un flux d'azote chauffé à la température de la source (60 °C). Il y a désorption d'ions multichargés qui sont entraînés vers l'analyseur quadripolaire.

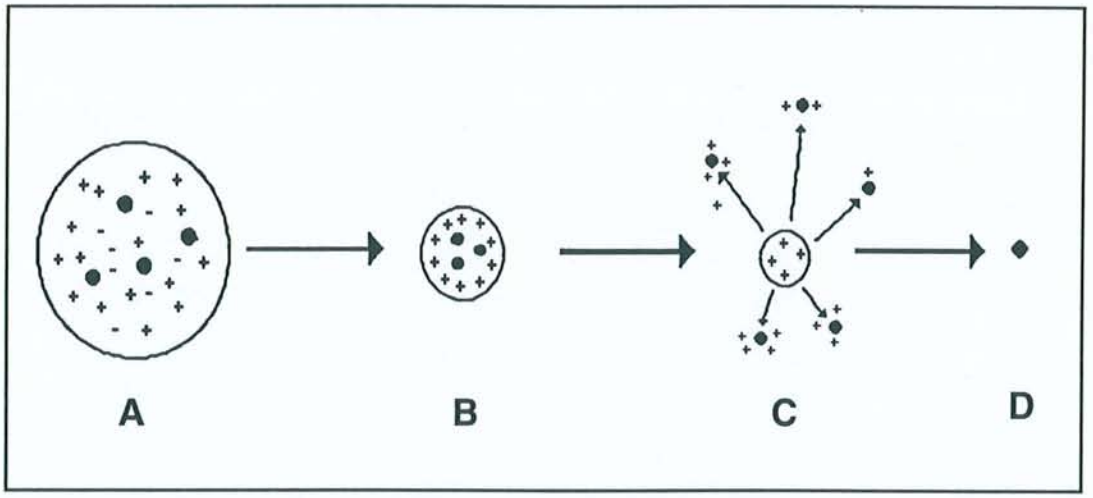


Figure 8. Principe de la désorption d'ions de gouttelettes chargées en ionisation par électrospray.
A : Gouttelette contenant une espèce chargée majoritaire. **B** : Réduction des gouttelettes par évaporation du solvant et explosions coulombiennes. **C** : Désorption d'ions de la surface du liquide sous l'effet du champ électrique. **D** : Résidu solide

8.2.2.2. Nature des ions obtenus

Les ions observés en électrospray sont des ions multichargés de type $(M+nH)^{n+}$ en mode positif. Des ions de cationisation du type $(M+aH+bNa)(a+b)^{+}$ peuvent être observés. En général, on observe peu ou pas d'ions fragmentés mais on peut cependant en provoquer en modifiant certains paramètres de source. Le nombre de charges présentes sur les protéines augmente avec la masse moléculaire. D'après Smith *et al.*, (1990) cette augmentation serait linéaire. Le nombre de charges observé est généralement inférieur au nombre de charges maximales que la protéine puisse porter. Ce nombre de charges varie en fait avec la nature de la protéine. Un peptide aura très facilement son nombre de charge maximum. Une protéine contenant des ponts disulfure aura généralement un nombre de charges inférieur à celui de la même protéine réduite.

8.2.2.3. Interprétation des spectres de peptides. Fragmentation

La première information donnée par le spectre de masse est le pic pseudomoléculaire $[M+H]^+$ qui donne la mesure de la masse moléculaire plus une unité de masse. On obtient des informations de structure grâce aux fragmentations. Les peptides se fragmentent préférentiellement au niveau des liaisons peptidiques ainsi qu'aux différentes liaisons adjacentes. Roepstorf et Fohlman (1984) ont proposé une nomenclature des différents types d'ions de fragmentations peptidiques.

8.2.2.4. Analyseur quadripolaire

La séparation des ions se fait selon un champ électrique à deux dimensions entre 4 barres d'acier parallèles qui jouent le rôle d'électrodes (Fig. 9). Ces barres sont connectées électriquement par paires. Les paires sont de polarité inversées l'une par rapport à l'autre. Le voltage V appliqué comprend une composante de tension constante U et une composante de tension sinusoïdale *Vo cos wt*. La trajectoire des ions se fera coaxialement à l'axe z. Pour qu'un ion puisse passer au travers du quadripôle, il faut que sa masse soit solution des équations suivantes:

$$mx+2e(U+Vo\ coswt)x/ro^2 = 0$$

$$my+2e(U+Vo\ coswt)y/ro^2 = 0$$

$$m = 0\ (ro = espace\ entre\ 2\ barres)$$

Dans le cas contraire l'ion heurtera une barre et n'atteindra donc pas le détecteur. Le spectre de masse s'obtient soit en faisant varier la radiofréquence w, avec U et V constants, soit en faisant varier U et V en maintenant un rapport U/V constant avec une radiofréquence w constante.

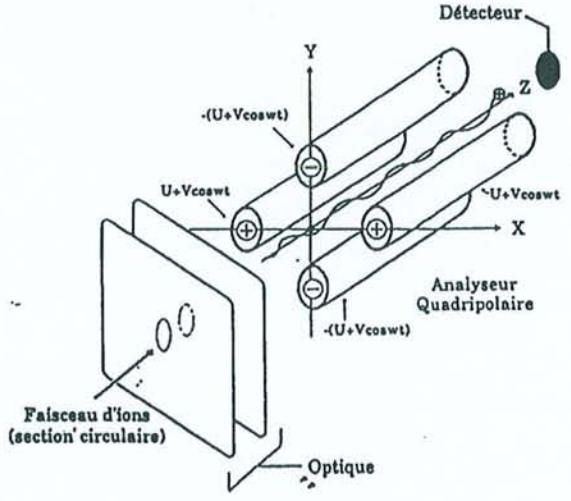


Figure 9. Analyseur quadripolaire.

8.2.2.5. Étalonnage

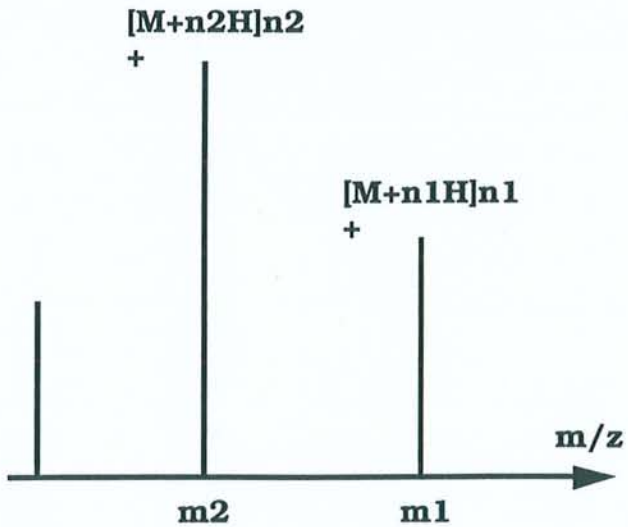
L'étalonnage du quadripôle est réalisé avec des molécules différentes, dont la structure est parfaitement connue. La substance étalon est choisie en fonction de la gamme de masse que l'on veut étalonner. Pour étalonner aux basses masses (m/z< 500) le polyéthylène glycol est utilisé (PEG 500 ou 1000). L'étalonnage entre les masses m/z 500 et 1500 se fait généralement avec la myoglobine de

coeur de cheval de masse 16951,5 Da ou avec l'ubiquitine de masse 8564,9 Da.

Les étalonnages aux masses m/z avoisinant 2000 peuvent être réalisés avec du lysozyme (oeuf ou poulet) 14305,1 Da ; du trypsinogène (bovin) 23980,9 Da ou encore de la β-lactoglobuline A du lait 18363,4 Da. Les concentrations utilisées sont de l'ordre de 10 à 20 picomoles par microlitre (en solution dans H_2O/MeOH 1:1, 1% acide acétique).

8.2.2.6. Interprétation des spectres

La distribution des charges est statistique autour d'un état de charge moyen. La masse moléculaire est calculée à partir de deux états de charges consécutives. Un écart type est calculé à partir des masses moléculaires déduites de tous les pics pseudo-moléculaires multi-chargés. La façon de calculer est décrite dans la figure 10.



$$m1=\frac{M+n1}{n1} \qquad m2=\frac{M+n2}{n2}$$

$$\text{si } n2=n1+1 \quad \text{alors } n2=\frac{m1}{m1-m2} \quad \text{et} \quad \boxed{M = n2x\,(m2-1)}$$

Figure 10. Calcul de masse à partir du spectre ES en mode d'ionisation positif.

8.2.3. Désorption laser (MALDI-TOF) en mode positif

L'échantillon est déposé sur une cible mélangée à une matrice. La désorption des ions se fait par un tir laser. Les ions sont détectés en fonction de leur vitesse (temps de vol). La matrice, l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique, est dissoute à saturation dans de l'acétone contenant 1% d'une solution de TFA/eau (1/100, v/v). 1 µl de l'échantillon dissous dans une solution à 2 picomoles·µl^{-1} d'H_2O/acétonitrile (50 : 50, v/v) est déposé sur la cible recouverte de matrice. Les ions observés sont généralement des ions mono-chargés. Suivant le type de protéine, on observe des ions multi-chargés.

9. Protocole de séquence

Le séquenceur utilise la chimie d'Edman. L'identification des PTH-AA est réalisée par HPLC en phase inverse, incluse dans le séquenceur sur une colonne PTH-C_{18} (2,1 x 220 mm). La détection se fait à 269 nm avec le gradient suivant :

Temps (min)	% B
0,0-0,4	9-14
0,4-10	14-34
10-18	34
18-23	90

Le solvant A est du tétrahydrofuranne 3,5% dans l'eau additionné de tampon Premix 30 $ml \cdot l^{-1}$ permettant une meilleure résolution des PTH-AA. Le solvant B est de l'acétonitrile. L'acquisition et le traitement des données sont effectués par le logiciel 610A Data Analysis System (ABI).

IV. Résultats

Chapitre 1. Conditions physiologiques pour l'expression de la famille protéique de 16 kDa chez *Streptococcus thermophilus* PB18

Nous avons réalisé l'étude de la réponse de la souche *S. thermophilus* PB18 aux conditions physiologiques de stress acide et de survie en phase stationnaire.

Comparativement à d'autres souches de *S. thermophilus*, dont certaines de la collection INRA CNRZ, PB18 présente une expression protéique différente dans des conditions physiologiques identiques. Au laboratoire, Guimont *et al.* (Guimont *et al.*, 1994), ont montré la présence d'une protéine de 16 kDa et de pI 5,5, lors de la croissance de la souche PB18 en phase stationnaire et en milieu non tamponné (TPPY). Comme toutes les souches de l'industrie laitière, PB18 a été soumise à des changements environnementaux tels que des changements de température (42°C à 53°C), à l'acidification et à la lyophilisation. L'étude de sa réponse à l'un de ces stress, le stress acide, s'est avérée intéressante car PB18 présente une acidification rapide, aussi bien dans le lait que dans un milieu faiblement tamponné.

1. Étude de la croissance de PB18 dans les milieux synthétiques TPPY et M17

1.1. Mesure de la relation entre la croissance et la biomasse de PB18

Afin de mieux connaître les paramètres de développement de PB18 dans les milieux synthétiques classiquement utilisés au laboratoire, nous avons établi les corrélations entre la mesure de la turbidimétrie et

la biomasse. Les milieux synthétiques utilisés sont le TPPY qui est un milieu non tamponné et le milieu M17 fortement tamponné par le β-glycérophosphate. Nous avons choisi la mesure de la densité optique (D.O.) à une longueur d'onde de 650 nm et la mesure des U.F.C. ml^{-1} après étalement sur le milieu TPPY gélosé. La $D.O._{650}$ mesurée est proportionnelle à la concentration cellulaire mais le facteur de proportionnalité est lié au type de cellules et dans certains cas à l'absorbance intrinsèque du milieu.

Les résultats sont présentés dans la figure 1. On peut constater que les droites de régression sont de pente identique (pente = 3,5 ± 0,1) pour les 2 milieux mais la biomasse finale obtenue en M17 est 3,5 plus élevée par rapport à celle obtenue en TPPY. Le calcul des UFC par unité de $D.O._{650}$ est de 3,14 $x10^8$ pour le milieu TPPY et de 3,85 $x10^8$ pour le milieu M17, ce qui peut traduire soit une légère différence dans la taille des cellules, soit une longueur moyenne légèrement plus grande des chaînes de cocci dans le milieu TPPY.

1.2. Caractéristiques de la croissance de PB18

Les courbes et les paramètres de croissance de PB18 dans les milieux TPPY et M17 sont présentés dans la figure 2 et le tableau 1.

On constate que la phase de latence dans le milieu TPPY est plus courte (1,5 h) que dans le milieu M17 (2,0 h). De même, nous pouvons observer que la biomasse en fin de phase exponentielle est trois fois plus importante en M17 qu'en TPPY. Ce résultat s'explique car les bactéries arrivent à un pH externe critique (5,0) plus rapidement dans le TPPY que dans le M17. Ceci est dû à la forte teneur en β-glycérophosphate (19 g l^{-1}) du M17 qui lui confère un pouvoir tampon élevé et donc, permet l'utilisation d'une plus grande quantité de lactose

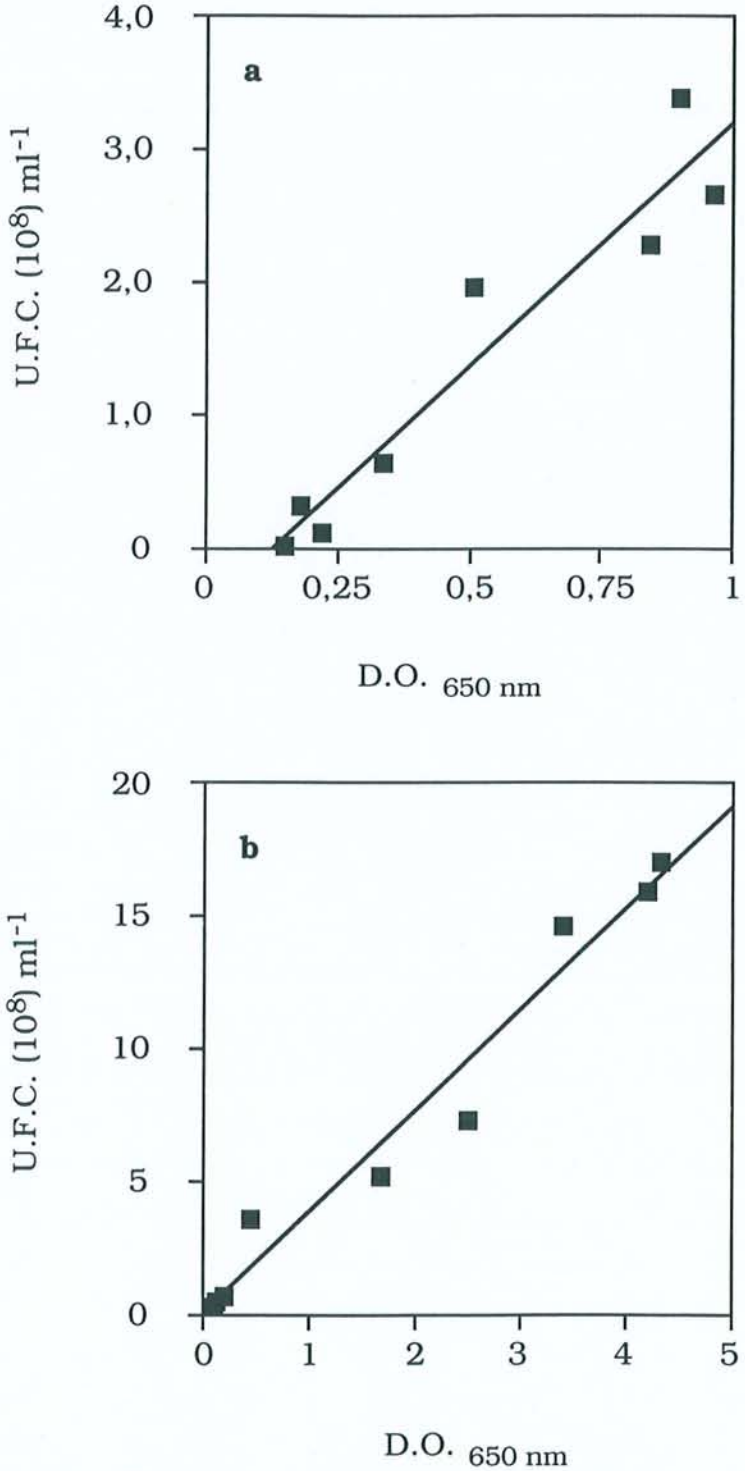


Figure 1. Relation entre la D. O. à 650 nm et le dénombrement d'unités formant des colonies de *S. thermophilus* PB18.

a) TPPY : $y = (3{,}6\ 10^8)\ x - 4{,}6\ (10^7)$; $r^2 = 0{,}930$

b) M17 : $y = 3{,}8\ (10^8)\ x + 3{,}4\ (10^6)$; $r^2 = 0{,}965$

par les cellules. De plus, dans les figures 2 a et 2 b, on peut voir que les écarts types des valeurs de densité optique obtenues en phase stationnaire sont très importants. Cela peut s'expliquer par le fait que les cellules ont tendance à s'agréger et à floculer dès que le pHext atteint une valeur proche de 5. En effet, nous avons constaté ce comportement à la fois dans le milieu TPPY et dans le milieu M17 pour cette même valeur de pHe. La remise en suspension des cellules est alors très difficile, d'où des valeurs qui peuvent être sensiblement variables. Cette floculation se produit pour une majorité de souches de *S. thermophilus* lorsque le milieu devient acide. L'intensité de la floculation est identique quelque soit le milieu de culture (TPPY ou M17), à partir du moment où un pH acide (en général en dessous de pH 5) est atteint. Dans ces conditions, aucune de ces souches ne montre, par contre, la bande de 16 kDa visible chez PB18. Par ailleurs, l'addition d'une petite quantité de soude, permettant d'élever le pH du milieu jusqu'à une valeur proche de la neutralité, conduit à la disparition de l'aspect floculé chez PB18.

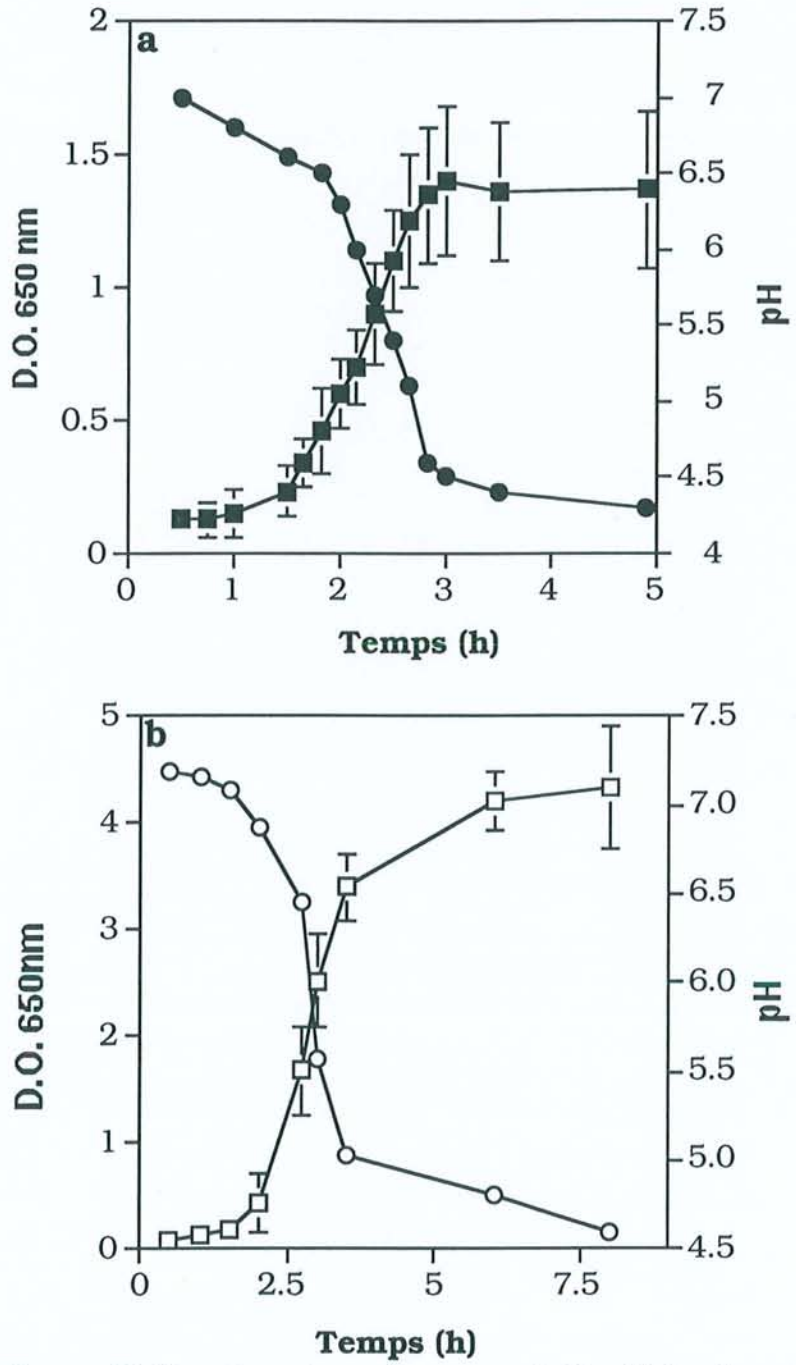


Figure 2. Courbes de croissance et d'acidification de *S. thermophilus* PB18 dans du milieu :
a) TPPY (■ : D.O.; ● : pH)
b) M17 (□ : D.O.; ○ : pH).

Tableau 1. Comparaison des paramètres (D.O.) entre les milieux M17 et TPPY pour *S. thermophilus* PB18.

Paramètre	TPPY	M17
D.O. $_{650nm}$[1]	1,4	4,5
pH[1]	4,5	4,6
Vitesse d'acidification[2] (ΔpH min^{-1})	0,027	0,021
Temps de doublement[2] (min)	28	31

[1] : Mesurés en fin de phase stationnaire
[2] : Calculés à partir de l'analyse des courbes de croissance du log(10) de la D.O.$_{650}$ et de l'acidification et au milieu de la phase exponentielle.

1.3. Paramètres d'acidification de PB18

Afin de connaître les capacités d'acidification de PB18, nous avons comparé à la fois sa courbe et sa vitesse d'acidification par rapport à deux souches de la collection CNRZ (CNRZ 308 et CNRZ 302) dans les mêmes conditions de croissance dans le milieu TPPY. La vitesse d'acidification de PB18 mesurée en phase exponentielle est de 0,027 ΔpH·min^{-1} contre 0,016 ΔpH min^{-1} pour la souche CNRZ 308 et 0,010 ΔpH·min^{-1} pour la souche CNRZ 302. Dans le milieu lait, PB18 présente une vitesse d'acidification bien moins élevée et égale à 0,006 ΔpH·min^{-1}. La figure 3 présente les courbes de corrélation entre les valeurs du pHe et le temps de croissance. Nous pouvons constater que la courbe de PB18 présente une pente plus importante que celle obtenue pour CNRZ 308 ou CNRZ 302.

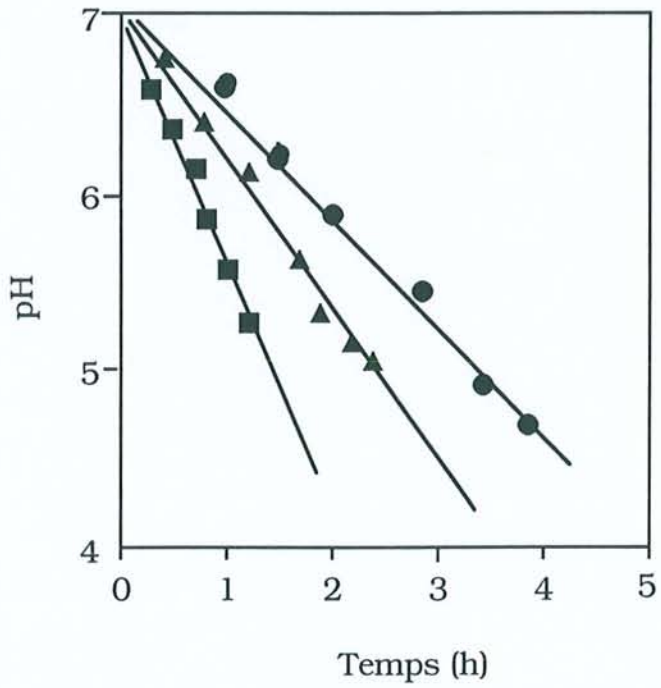


Figure 3. Vitesse d'acidification de *S. thermophilus* dans le milieu TPPY.

■ PB18	y = -1,627 X + 9,49	r = 0,995
▲ CNRZ 308	y = -0,954 X + 8,55	r = 0,994
● CNRZ 302	y = -0,616+ X + 7,00	r = 0,992

1.4. Résistance de PB18 à un choc acide

Pour appréhender la réponse de PB18 aux changements du pH extracellulaire, nous avons établi la courbe de survie de PB18 après une expérience de choc acide. Pour cela, les cellules prélevées en phase exponentielle de croissance, dans un fermenteur dont le pH du milieu était maintenu à 7 pour le témoin, ou à 6,5, ont été replacées brutalement dans le même milieu acidifié par l'acide lactique tout en respectant la même concentration cellulaire (Fig. 4). Pour réaliser cette expérience, nous avons choisi d'utiliser le M17 car dans le milieu TPPY l'acidification naturelle bactérienne est trop importante et peut apporter une source supplémentaire et non contrôlée d'acide lactique dans le milieu. De plus, nous avons réalisé les expériences avec des cellules cultivées à pHe 7 et à pHe 6,5 afin de contrôler leur adaptation à un pHe légèrement plus faible ; à titre de comparaison, le même essai a été réalisé avec la souche ATCC 19258. Cette souche a été choisie, car elle était la souche type, et de plus, elle était peu acidifiante, et semblait donc à priori peu résistante à l'acidification.

La figure 4 a montre que pour les cellules maintenues à pH 7,0, la viabilité des deux souches testées diminue de façon identique et linéaire. Par contre, pour les cellules qui ont été maintenues à pH 6,5, la courbe est biphasique. Pour les chocs de pH jusqu'à 4,5, il n'y a pas de diminution drastique du nombre de cellules survivantes, au-delà, les courbes rattrapent très rapidement les valeurs atteintes par les témoins. Traduites en pourcentages, la survie de PB18 à pH 5 est de 6% et, à pH 4,5, elle est de l'ordre de 1%. Pour les cellules développées à pH 6,5, les taux de survie atteignent 48% à pH 5 et 27% à pH 4,5. Les taux de survie sont similaires pour la souche ATCC 19258.

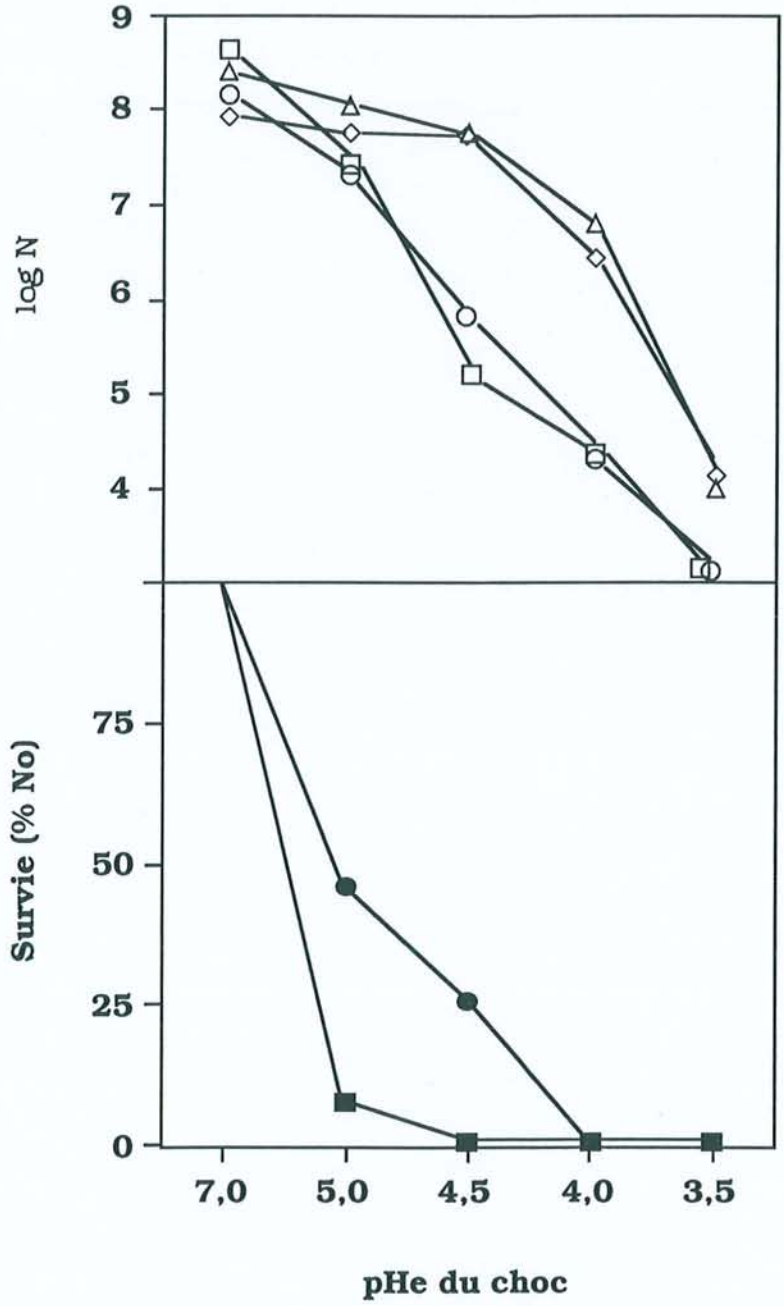


Figure 4. Survie au choc acide de *S. thermophilus* PB18 (□, △) et ATCC 19258 (○, ◇).

a : Les cellules ont été cultivées dans du milieu M17 à pH 7 (□, ○) ou à pH 6,5 (Ç, A), transférées dans le même milieu acidifié avec de l'acide lactique à différents pH et incubées pendant 2 heures, puis diluées et étalées sur boite dans du milieu TPPY

b : Les cellules ont été cultivées dans du milieu M17 à pH 7 (■) ou à pH 6,5 (●), transférées dans le même milieu acidifié avec de l'acide lactique à différents pH, incubées pendant 2 heures, puis diluées et étalées sur boîtes de milieu TPPY.

2. Étude des conditions physiologiques nécessaires à l'expression protéique de la famille protéique de 16 kDa chez PB18 analysée par PAGE-SDS 1D

2.1 Analyse du profil protéique des protéines solubles totales de la souche PB18

Comme il avait déjà été démontré au laboratoire, nous constatons que le profil protéique global de *S. thermophilus* obtenu par PAGE-SDS 1D est très reproductible pour les souches analysées et ce profil montre 60 bandes environ. Cependant, seule la souche PB18 présente une bande de forte intensité située aux environs de 16 kDa alors que ce n'est pas le cas du profil protéique des autres souches (Fig. 5). De plus, on remarque que cette protéine ou famille de protéines est très significativement exprimée chez PB18 au cours de la phase stationnaire de croissance.

Nous avons réalisé l'analyse densitométrique de ces profils électrophorétiques et ceci nous a permis d'établir les résultats présentés dans la figure 6. Ceux-ci montrent l'intensité relative de la famille protéique de 16 kDa en fonction du pHe correspondant aux différentes étapes de la croissance bactérienne. On peut constater que l'expression de cette protéine commence à augmenter à partir d'un pHe de 5,1 et croît ensuite régulièrement, pour atteindre une valeur maximale de 13% des protéines totales solubles, après deux heures de phase stationnaire.

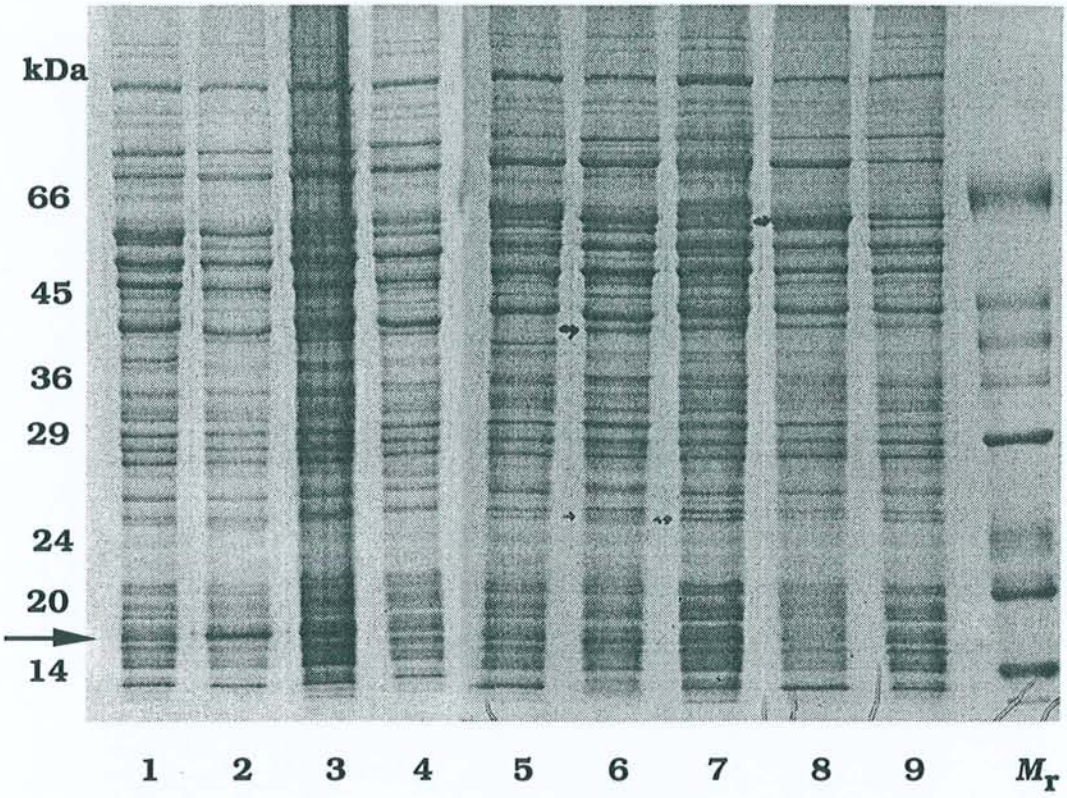


Figure 5. PAGE-SDS des protéines issues de diverses souches de *S. thermophilus*. Les bactéries ont été développées dans le milieu TPPY jusqu'à la phase stationnaire (pH 4,5).

Piste
1 : CRNZ 404
2 : PB18
3 : CRNZ 455
4 : CRNZ 21
5 : CRNZ 160
6 : ATCC 19258
7 : CNRZ 445
8 : CRNZ 391
9 : CNRZ 7
10 : Marqueurs de Masse moléculaire

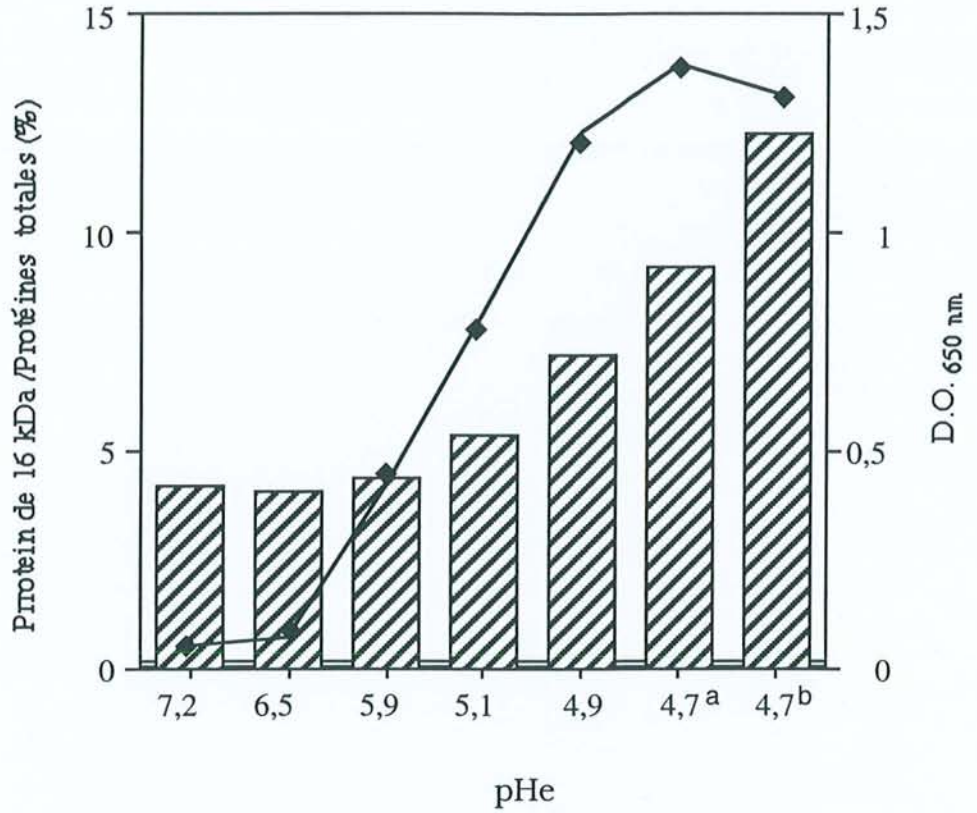


Figure 6. Cinétique de surproduction de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* PB18. Les cellules ont été cultivées en milieu TPPY et recueillies à différents points de la phase de croissance.

◆—◆ D.O. 650 nm

▨ Protéine de 16 kDa/Protéines totales dans le gel (%).

a = début de phase stationnaire

b = après 2 h de phase stationnaire

2.2. Effet du pHe sur l'expression de la famille protéique de 16 kDa dans des conditions limitantes en lactose

A la vue de ces résultats, nous avons essayé de démontrer quelles sont les conditions physiologiques exactes responsables de cette expression protéique accrue. Pour cela, nous avons réalisé en parallèle des expériences en conditions de faible teneur en lactose et donc limitantes pour l'acidification du milieu de culture et en conditions

d'acidification artificielle du milieu capables d'induire un choc acide.

La figure 7 présente les résultats obtenus lorsque PB18 a été cultivé dans le milieu M17 contenant différentes concentrations de lactose. Les courbes de croissance montrent que PB18 entre plus ou moins tôt en phase stationnaire, ce qui doit correspondre à l'épuisement du lactose dans le milieu de culture. Lorsque la concentration en lactose dans le milieu est limitée à 5 $g{\cdot}l^{-1}$ ou 10 $g{\cdot}l^{-1}$, la biomasse mesurée est fortement diminuée par rapport à la biomasse maximum obtenue pour la concentration de 20 $g{\cdot}l^{-1}$ (biomasse respectivement égale à 20% et 50 % de cette dernière). Parallèlement, le pHe atteint dans ces différentes conditions varie de 6,3 à 4,7 ± 0,2 (figure 7 a).

Le profil protéique en PAGE-SDS des protéines solubles totales (Fig. 7 b) ne montre pas de surexpression de la bande protéique de 16 kDa pour les concentrations en lactose de 5 $g{\cdot}l^{-1}$ et 10 $g{\cdot}l^{-1}$ et donc pour les pHe de 6,3 et 5,5. Par contre, le profil protéique des cellules cultivées en présence de 20 g de lactose présente la bande très intense correspondant à la famille protéique de 16 kDa.

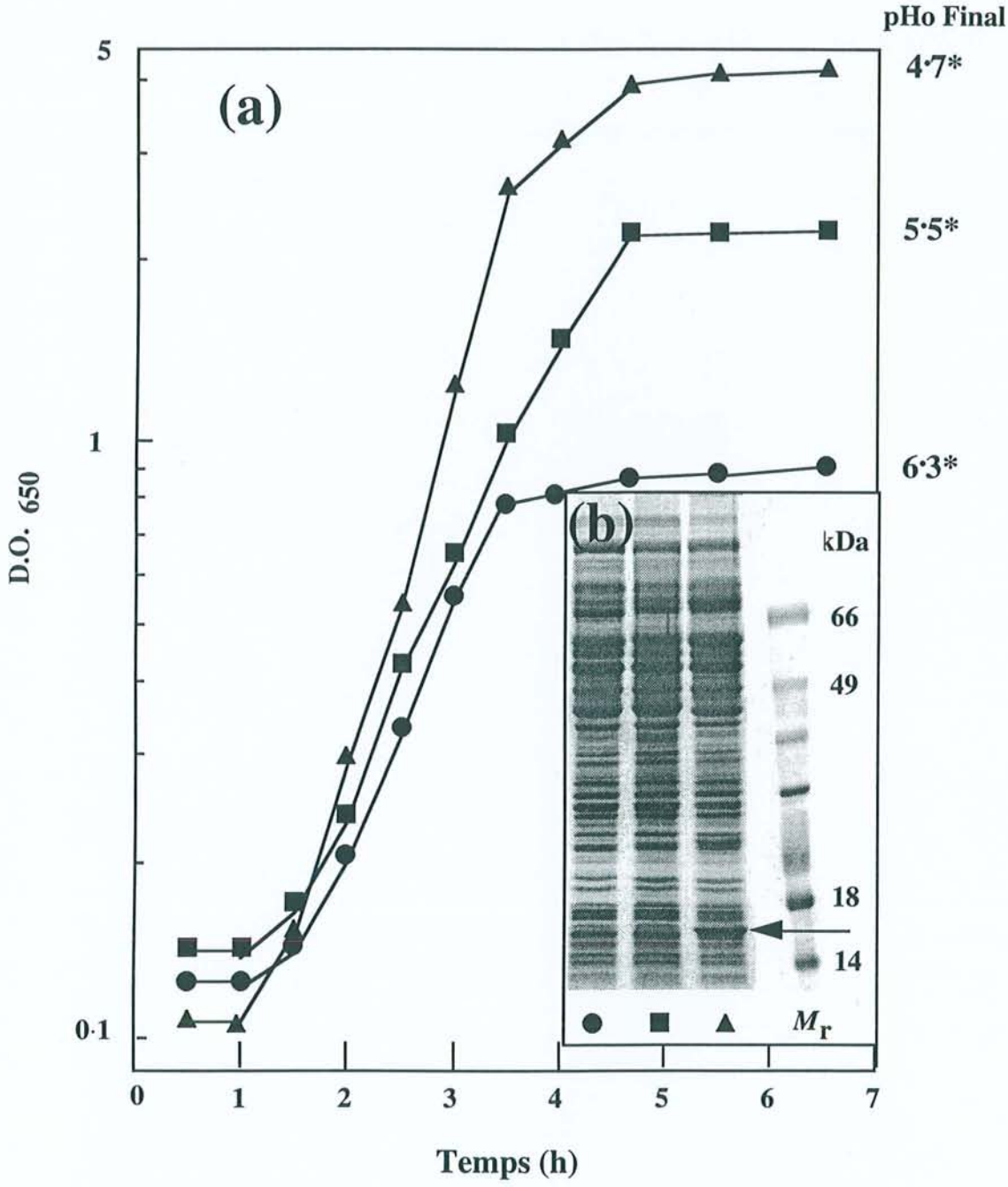


Figure 7. a. Courbes de croissance de *S. thermophilus* PB18 dans le milieu M17 additionné avec différentes concentrations de lactose. b. Profil PAGE-SDS des protéines solubles totales extraites de cellules en phase stationnaire (la flèche montre la protéine de 16 kDa) (●) 5 ; (■) 10 ; (▲) 20 $g{\cdot}l^{-1}$ de lactose ; M_r : Étalon de masse moléculaire

2.3. Étude du choc acide sur PB18

2.3.1. Réponse physiologique

Pour appuyer l'hypothèse de l'acidité comme facteur de déclenchement de la surproduction de la bande protéique de 16 kDa, les bactéries ont été cultivées dans le milieu M17, puis lorsque la $D.O._{650}$ atteint la valeur de 1,0, les cellules sont centrifugées et remises en suspension dans le milieu M17 acidifié à pH 5 par de l'acide lactique ou bien de l'acide acétique (Fig. 8). Le témoin représente des cellules n'ayant pas subi le choc acide et maintenues en croissance normale.

Les bactéries soumises au choc acide arrêtent immédiatement leur développement (Fig. 8 b), mais par contre leur nombre ne diminue pas, même après plus de deux heures de présence dans l'un ou l'autre acide (Fig. 8 c). Le témoin continue normalement son développement, et atteint à la fin de l'essai, un pH identique à celui des milieux artificiellement acidifiés (Fig. 9 a).

Les profils électrophorétiques (Fig. 9) montrent que la cinétique d'apparition de la protéine de 16 kDa est similaire chez le témoin et chez les cellules soumises au choc acide (Figs. 9 a et 9 b). Ces essais montrent que si la multiplication cellulaire n'est plus possible lorsque le pHe est acide (pHe 4,9 ± 0,2), par contre, cette bactérie survit bien à ce pHe, même après un abaissement brutal de celui-ci, et que certains mécanismes de synthèses protéiques restent fonctionnels, au moins pendant un certain temps.

Ces résultats soutiennent l'hypothèse que la ou les protéines qui composent la bande protéique de 16 kDa sont exprimées en réponse à l'acidité plutôt qu'à la phase de croissance.

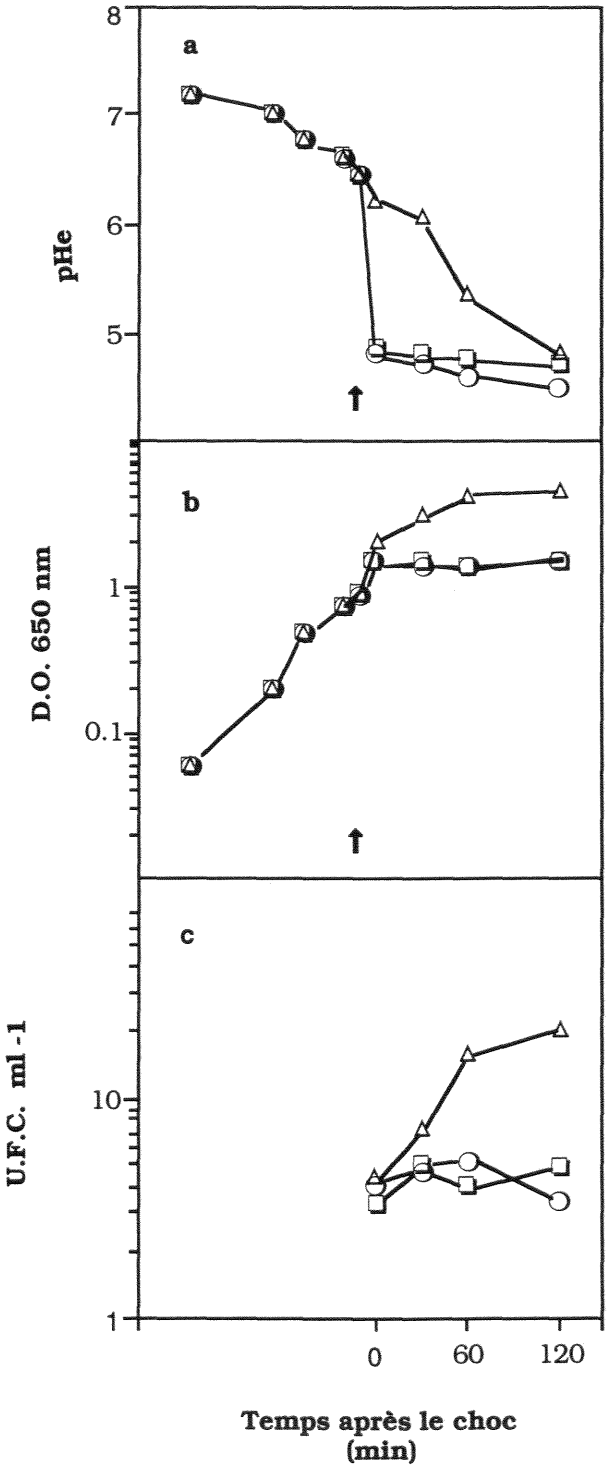


Figure 8. Réponse physiologique de *S. thermophilus* PB18 au choc acide. Les cellules ont été cultivées dans du milieu M17 à une $D.O._{650}$ de 1, puis centrifugées et remises en suspension dans du M17 acidifié avec acide lactique ou acide acétique.

(Δ) : Témoin ; (O) : Acide lactique ; (□) : Acide acétique

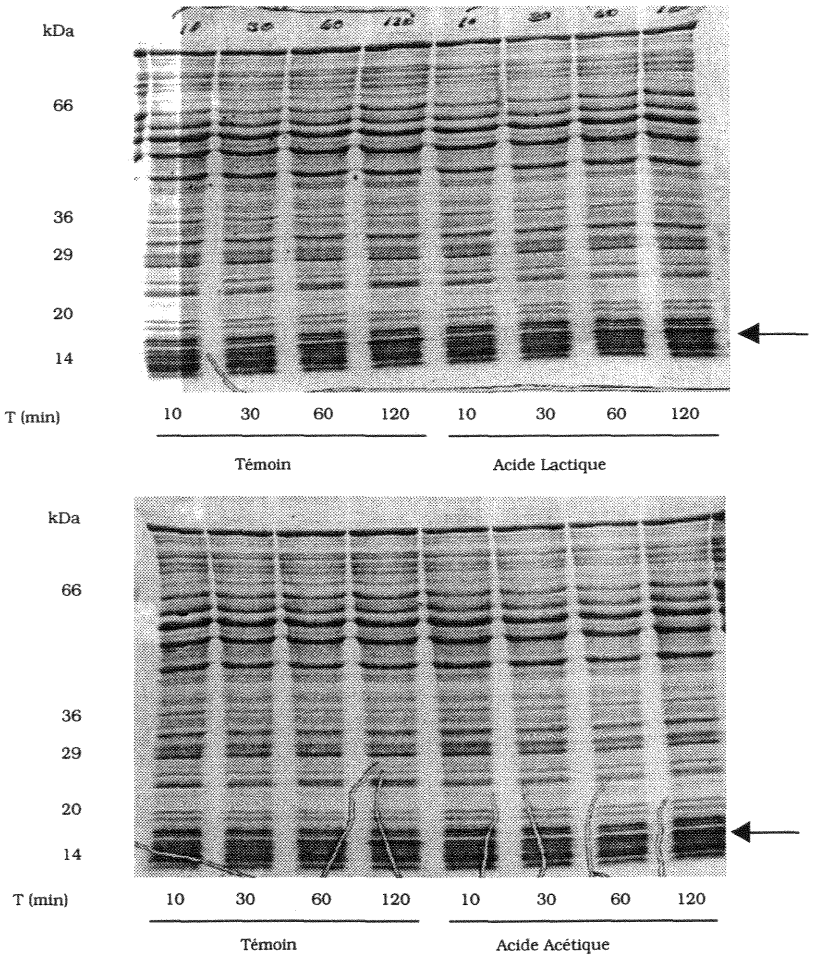


Figure 9. PAGE-SDS des protéines solubles totales issues de *S. thermophilus* PB18 après un choc acide avec les acides lactique ou acétique. La culture est réalisée dans du milieu M 17 jusqu'à ce qu'elle atteigne une $D.O._{650}$ de 1. Après centrifugation, les cellules sont resuspendues dans du milieu M17 préacidifié à pH 5. Le témoin est resuspendu en milieu M17 normal. Les cellules sont récupérées et lavées deux fois dans du tampon phosphate 50 mM, pH 7,5, et soniquées. Les protéines sont séparées par électrophorèse en gradient d'acrylamide 10-25 % et colorées avec du Bleu de Coomassie R 250.

← 16 kDa

2.3.2. Autoradiographie des protéines exprimées par *S. thermophilus* après un choc acide

Afin de confirmer nos résultats précédents sur l'expression spécifique de la protéine de 16 kDa, nous avons réalisé un marquage radioactif des protéines synthétisées lors du choc acide par incorporation de ^{35}S-Met (120 minutes, pHe = 4,9 ± 0,2). L'autoradiographie des protéines synthétisées par les bactéries n'ayant pas subi le choc acide présente un profil comparable au profil protéique obtenu par coloration (Fig. 10, piste 2). L'autoradiographie du profil des protéines des cellules ayant subi le choc acide révèle que seulement 11 bandes sont visibles dans ces conditions. Parmi ces bandes dont les masses moléculaires varient de 8 à 70 kDa, on confirme la présence d'une bande d'environ 16 kDa. (Fig. 10, piste 1).

3. Nouvelle approche du profil protéique de PB18 par électrophorèse bidimensionnelle

3.1. Mise au point de la détermination des paramètres de l'électrophorèse 2D (pI, M_r).

Le pI et la masse moléculaire apparents des protéines de PB18 ont été calculés à l'aide de marqueurs internes. Ces marqueurs internes sont des mélanges de protéines standards dont le pI et la masse moléculaire sont connus. Les figures 11 et 13 présentent les résultats obtenus à la fois avec les standards de masse et les standards de pI et les mêmes standards utilisés comme marqueurs internes. Les marqueurs de masse moléculaire ont été facilement identifiables et le calcul des masses moléculaires relatives des protéines a été fait en

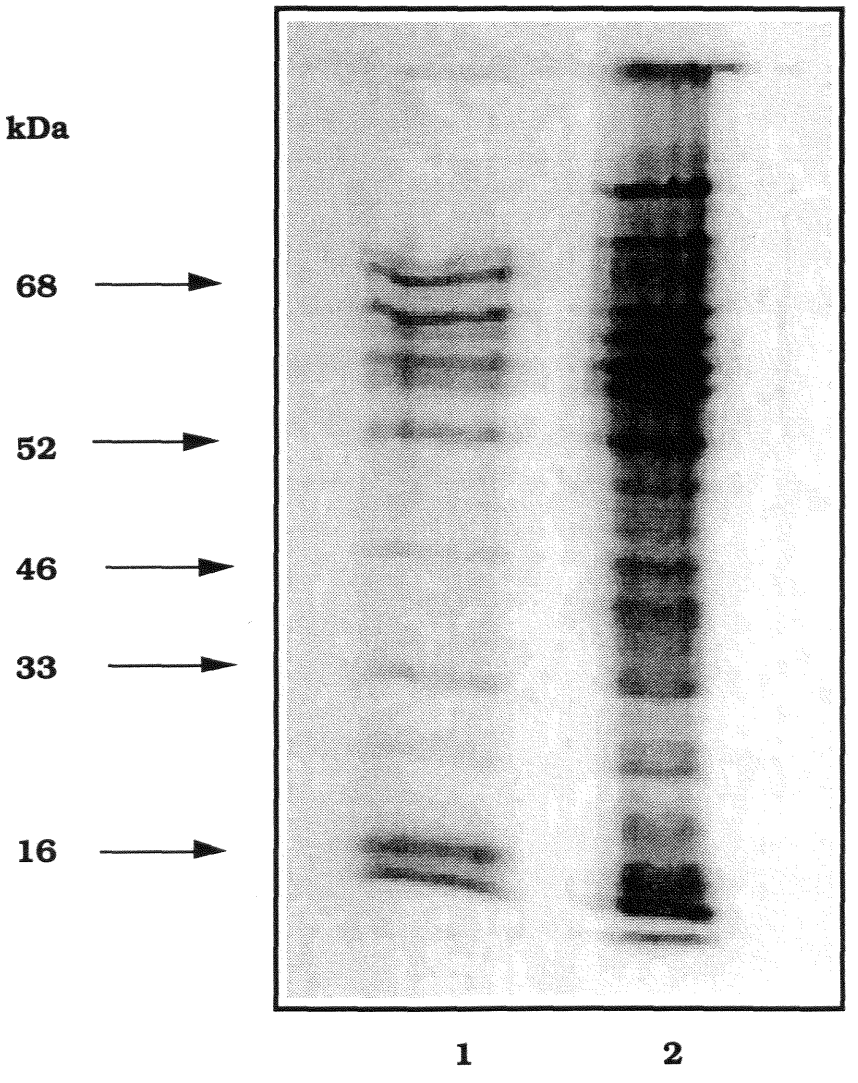


Figure 10. Autoradiographie des protéines synthétisées chez *S. thermophilus* PB18 après un choc acide. Les bactéries ont été cultivées dans le milieu M17. Quand le pH est arrivé à 6,5, les cellules ont été centrifugées, remises en suspension et concentreéees 10 fois soit dans un milieu M17 préacidifié à pH 5,0 (cellules choquées), soit dans un milieu M17 à pH 7,0 (cellules témons). Les célules ont eté alors incubées a 42 °C; dix minutes après le choc, nous avons aditioné 50 microcuries par ml et le marqua a duré pendant 1 heure.

Piste 1 : Protéines issues de cellules après un choc acide.
Piste 2 : Protéines de cellules témoins.

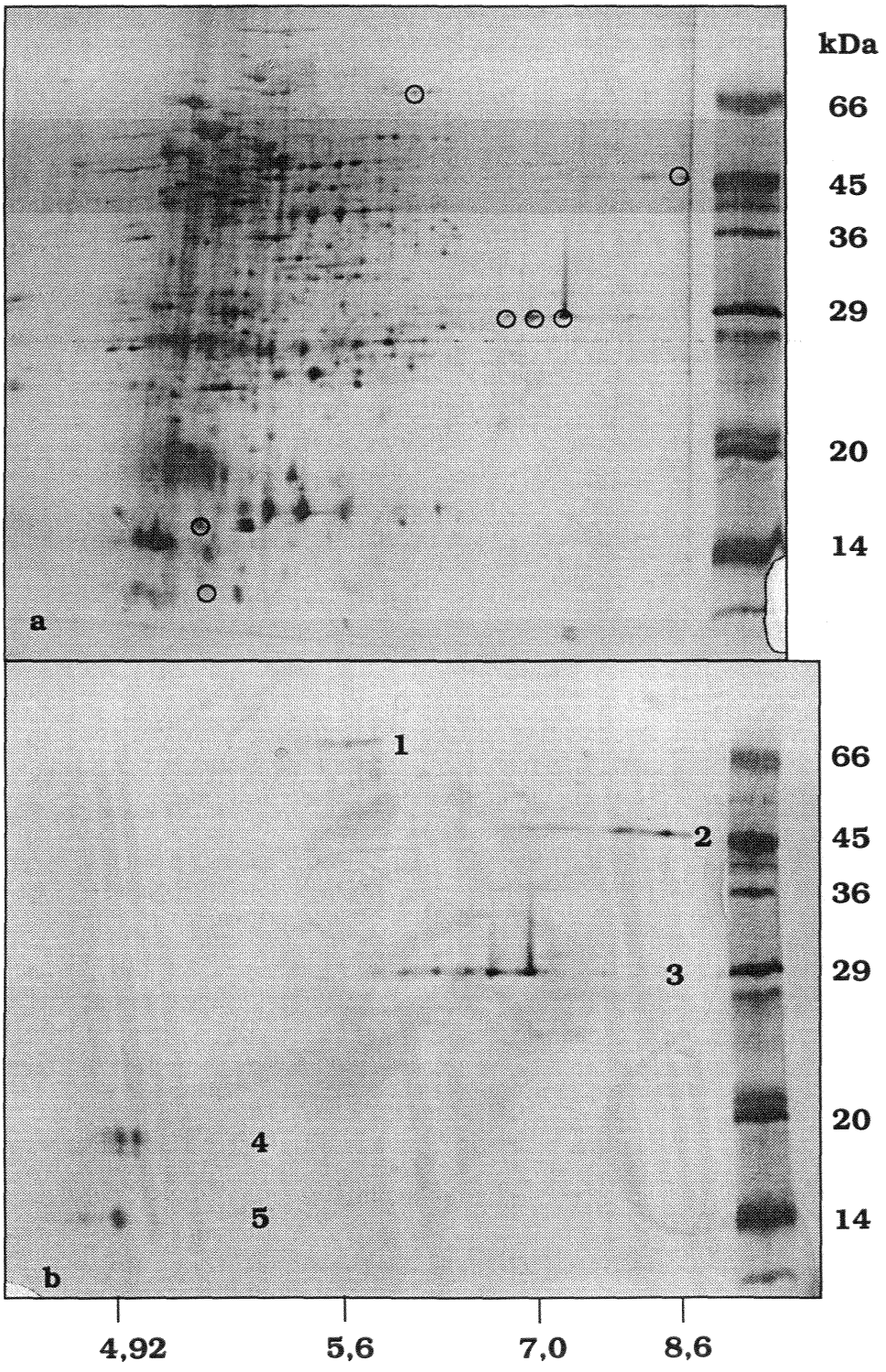


Figure 11. Détermination de la masse moléculaire relative dans la PAGE-2D.

a. Marqueurs de masse moléculaire additionnés de protéines de *S. thermophilus*. b. Marqueurs de masse moléculaire : ○ (Sigma)

1 : Sérum albumine bovine (66 kDa) ;
2 : Fumarase de coeur porcine (48,5 kDa) ;
3 : Anhydrase carbonique d'érythrocytes de bovin (29 kDa) ;
4 : β-lactoglobuline du lait bovin (18,4 kDa) ;
5 : α–lactalbumine du lait bovin (14,2 kDa).

relation avec la courbe de corrélation (Fig. 12). Les marqueurs de pHi ont été difficilement identifiables car ils présentent des spots très bien définis lors d'une isoélectrofocalisation normale en plaque mais par contre ils présentent plusieurs spots en PAGE-2D (Fig. 13 b). Cependant, nous pouvons observer que la corrélation des pI en fonction de la distance de migration électrophorétique est satisfaisante (Fig. 14) (r = 0,9). Dans tous les cas (Fig. 16 a et 18 a), on repère facilement les marqueurs ajoutés à nos préparations protéiques et ceci nous permet de calculer les paramètres de chaque spot protéique visualisé.

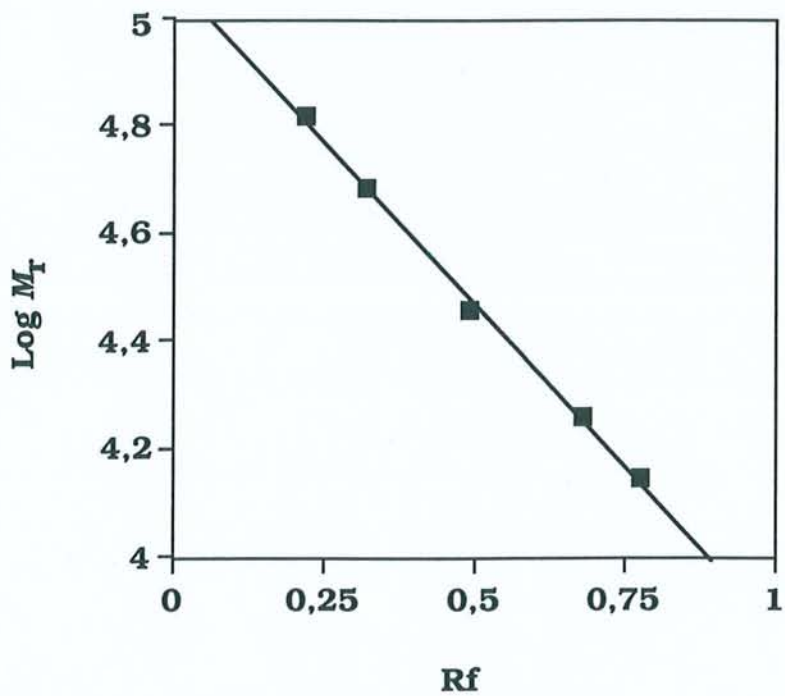


Figure 12. Gamme étalon de masse moléculaire relative réalisée à partir des marqueurs de la Fig. 16.
y = -1,202x + 5,073 r = 0,999

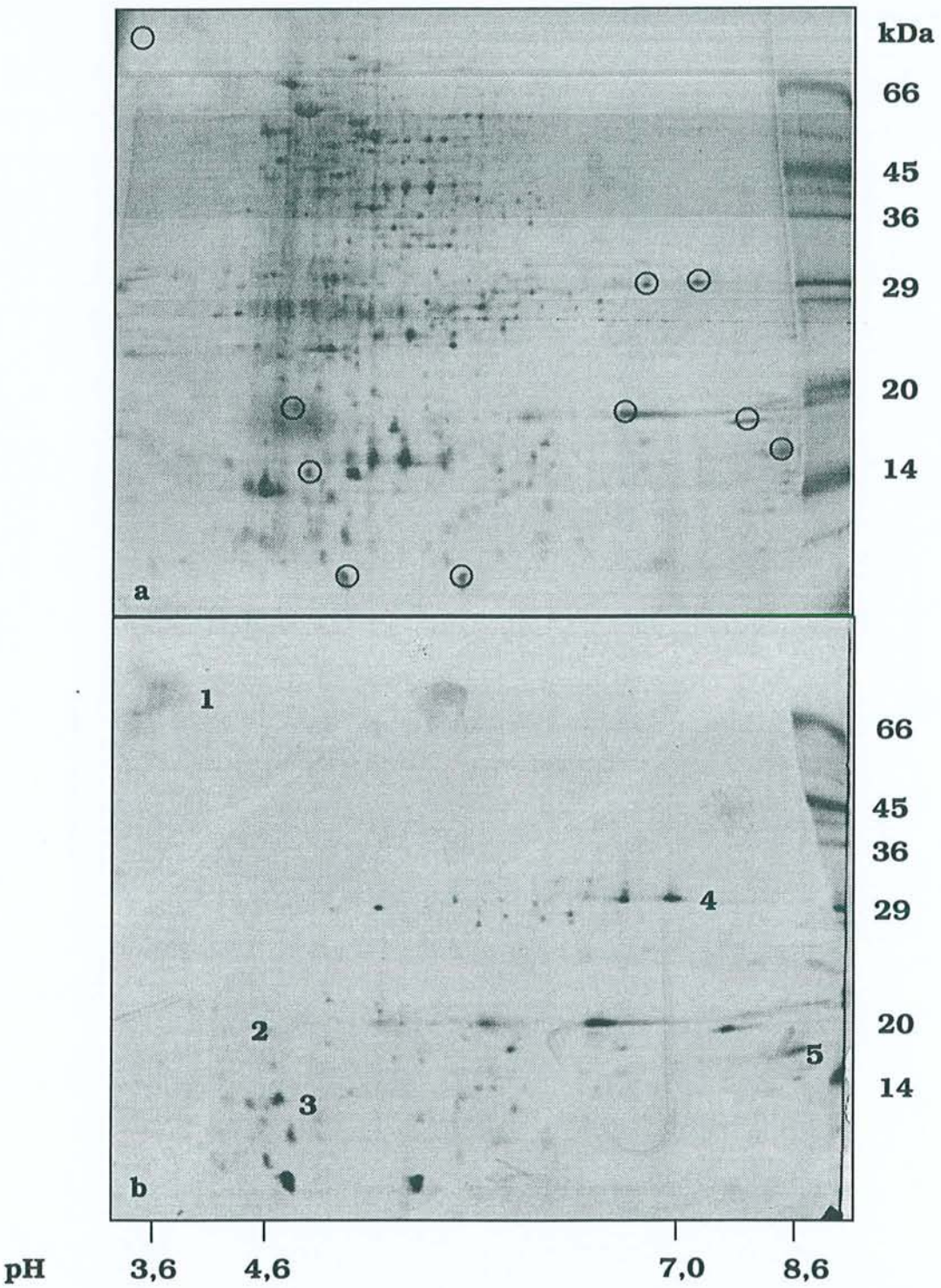


Figure 13. Détermination du point isoélectrique (pI) dans la PAGE 2D. a Protéines de *S. thermophilus* PB18 plus les marqueurs du pI. b. Marqueurs de pI : O (Marqueurs de pI pour isoélectrofocalisation en plaque, Sigma).
1 : Amyloglucosidase d'*Aspergillus niger* (pHi= 3,6) ;
2 : Inhibiteur de trypsine de graine de soja (pHi=4,6) ;
3 : β-lactoglobuline A du lait bovin (pHi=5,1) ;
4 : Anhydrase carbonique d'érytohrocytes humain (pHi=7,0) ;
5 : Myoglobine du cœur de cheval (pHi=7,6) ;
6 : Lectine de *Lens culinaris* (pHi=8,2, 8,6, 8,8) ;
7 : Trypsinogène de pancréas bovin (pHi= 9,3).

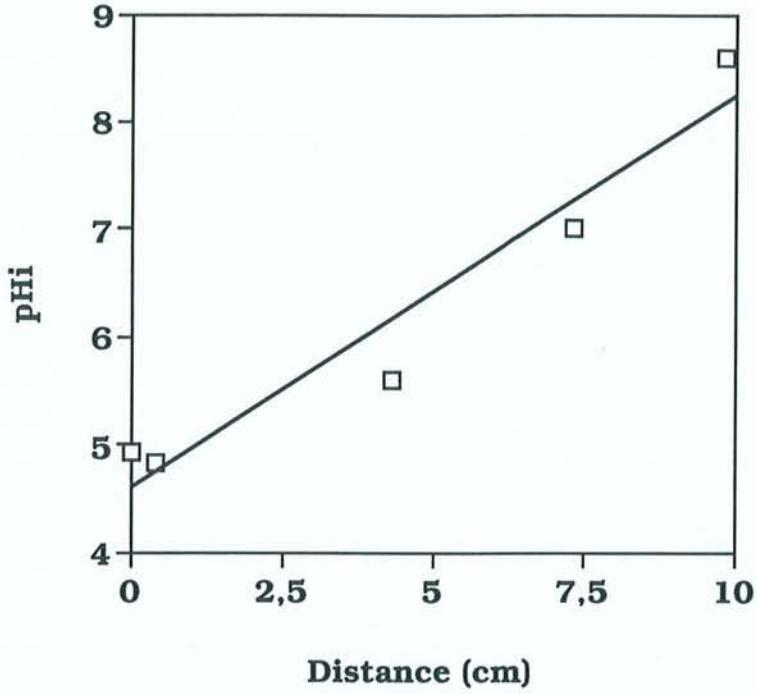


Figure 14. Gamme étalon de pHi réalisée à partir des marqueurs de point isoélectrique de la Fig. 13.
y = 0,363x + 4,609 r = 0,966

3.2. Analyse des profils protéiques en PAGE-2D de PB18 en phase exponentielle et stationnaire de croissance

L'électrophorèse 2D des protéines exprimées pendant la phase exponentielle (Fig. 15 a) et pendant la phase stationnaire (Fig. 15 b) par *S. thermophilus* PB18 permet de mettre en évidence des différences entre ces deux phases. L'analyse des gels montre que 17 protéines au moins sont exprimées spécifiquement pendant la phase exponentielle (Tableau 2 et protéines entourées d'un cercle de la Fig. 15 a), et 10 protéines sont exclusivement exprimées pendant la phase stationnaire (Tableau 2 et protéines entourées d'un cercle de la Fig. 15 b). Les masses moléculaires sont comprises entre 9 et 52 kDa pour les protéines spécifiques de la phase exponentielle et de 16 à 43 kDa dans le cas de la phase stationnaire. De plus, pour 25 protéines communes aux deux phases,

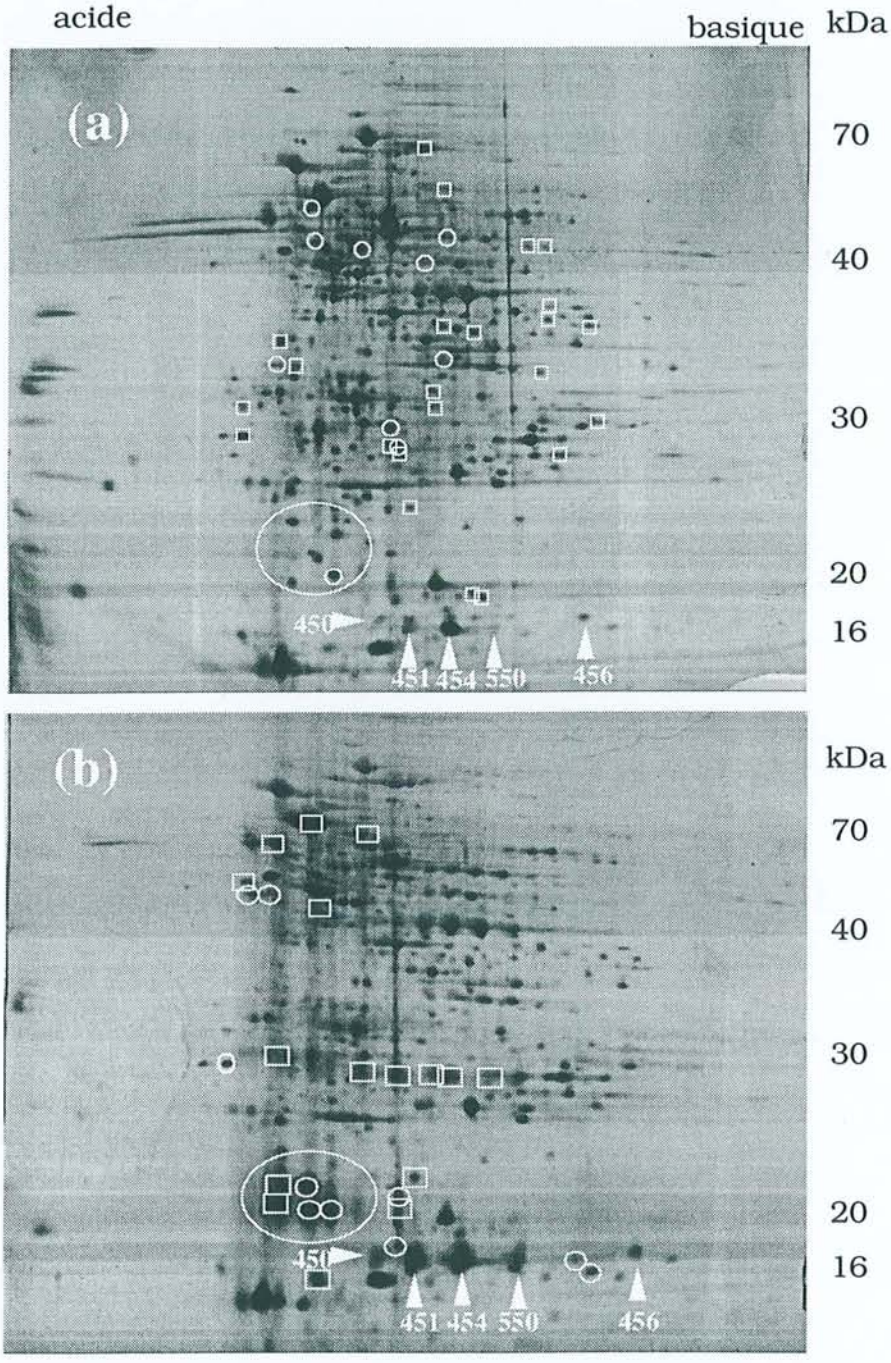


Figure. 15. PAGE 2D des protéines de *S. thermophilus*.
a. Phase exponentielle (pHo 6.5);
b. Phase stationnaire (pHo 4.7).
□ Protéines qui s'expriment au moins 5 fois plus.
○ Protéines qui s'expriment exclusivement dans cette phase de croissance. Les flèches signalent les protéines de la famille de 16 kDa.

on montre une augmentation d'intensité du spot (5 fois au plus) en phase stationnaire comparativement à la phase exponentielle (Tableau 3). Par ailleurs, 24 autres protéines communes aux deux phases et de localisation différente montrent une augmentation d'intensité du spot (5 fois au plus) en phase exponentielle comparativement à la phase stationnaire (Tableau 4).

L'analyse de la figure 15 b met en évidence la forte intensité d'un groupe de spots de masse moléculaire de 16 kDa visible en phase stationnaire. Ces spots correspondent à des protéines de pI différents (de 5,3 à 5,7). Le Tableau 4 montre l'augmentation très significative surtout de l'intensité des spots 451 (25 fois) et 550 (149 fois), (en gras dans le Tableau 2).

Tableau 2. Protéines de *S. thermophilus* PB18 spécifiquement produites lors de la phase de croissance.

Exponentielle				Stationnaire			
kDa	pHi	Numéro de "Match"	% I.I.	kDa	pHi	Numéro de "Match"	% I.I.
53,5	4,7	43	0,190	42,9	4,4	486	0,116
46,8	4,8	99	0,147	42,9	4,5	487	0,098
45,4	5,9	106	0,268	32,3	4,1	496	0,294
32,7	4,5	227	0,141	23,7	4,6	438	0,096
32,6	5,5	236	0,138	19,8	5,2	528	0,506
31,3	4,8	267	0,240	19,2	4,6	526	2,192
28,4	5,2	331	0,205	19,2	4,7	525	3,022
27,1	5,5	336	0,167	17,4	5,2	533	0,201
9,1	4,9	431	0,390	16,7	6,2	536	0,121
				16,2	6,3	538	0,182

% I,I, : Pourcentage de l'Intensité Totale Intégrée)

Tableau 3. Protéines de *S.thermophilus* PB18 dont le taux d'expression est au moins cinq fois plus grand dans la phase exponentielle que dans la phase stationnaire

kDa	pHi	Numéro de "Match"	I.I.e	I.I.s	I.I.e/I.I.s
72,0	5,5	605	0,286	0,015	19,07
55,2	5,6	55	0,107	0,005	21,40
45,9	6,1	128	0,062	0,007	8,86
45,7	6,2	129	0,027	0,002	13,50
43,1	4,8	107	0,168	0,021	8,00
37,1	6,2	190	0,036	0,004	9,00
36,0	6,2	218	0,075	0,002	37,50
35,5	6,5	223	0,034	0,004	8,50
35,5	5,5	208	0,068	0,006	11,33
35,1	5,7	215	0,110	0,004	27,50
34,4	4,6	194	0,388	0,043	9,02
32,6	4,7	229	0,075	0,006	12,50
32,1	4,3	283	0,072	0,004	18,00
30,8	5,4	278	0,143	0,006	23,83
29,8	4,3	287	0,184	0,005	36,80
29,8	5,5	303	0,070	0,005	14,00
28,8	6,6	315	0,132	0,016	8,25
26,5	5,3	367	0,038	0,005	7,60
26,5	6,2	384	0,257	0,026	9,88
26,4	5,5	368	0,118	0,011	10,73
23,0	5,3	419	0,065	0,005	13,00
20,2	5,3	434	0,092	0,010	9,20
18,2	5,7	447	0,083	0,009	9,22
18,0	5,6	445	0,060	0,006	10,00

I,I,: Intensité Intégrée; e: Phase exponentielle; s: Phase stationnaire

Tableau 4. Protéines de *S. thermophilus* PB18 dont le taux d'expression est au moins cinq fois plus grand dans la phase stationnaire que dans la phase exponentielle

kDa	pHi	Numéro de "Match"	I.I.e	I.I.s	I.I.s/I.I.e
57,0	4,8	44	27,68	142,37	5,14
55,2	5,2	48	0,53	3,52	6,59
51,7	4,6	64	2,51	20,22	8,06
45,0	4,9	97	0,30	4,79	15,74
40,8	4,7	137	0,85	5,53	6,54
28,6	4,6	318	1,35	11,23	8,32
27,8	5,7	339	1,11	15,00	13,48
27,7	5,1	327	1,54	26,88	17,46
27,7	5,45	337	1,33	9,97	7,50
27,3	4,9	333	1,61	8,96	5,58
27,1	5,3	329	0,70	5,60	7,95
26,9	5,5	371	1,44	26,45	18,37
21,0	5,35	585	0,20	4,78	24,28
20,1	4,6	429	0,72	21,49	29,69
19,9	4,8	430	3,51	42,47	12,09
19,0	5,3	435	1,11	6,32	5,70
18,7	4,6	437	2,53	46,09	18,21
18,7	4,5	590	0,59	18,20	30,80
18,3	5,1	439	0,74	3,86	5,20
16,9	**6,2**	**456**	**1,74**	**12,59**	**7,25**
16,9	**5,1**	**450**	**1,26**	**23,43**	**18,62**
16,8	**5,5**	**454**	**30,18**	**130,55**	**4,33**
16,7	**5,3**	**451**	**4,51**	**113,63**	**25,19**
16,5	**5,8**	**550**	**0,28**	**41,25**	**149,45**
15,6	4,8	462	2,63	22,03	8,37

I.I.: Intensité Intégrée; e: Phase exponentielle; s: Phase stationnaire

Les numéros en gras correspondent à la famille de 16 kDa

4. Discussion

Nous avons montré que *S. thermophilus* PB18 se développe rapidement et acidifie fortement son milieu de culture et que de plus elle présente la caractéristique d'exprimer une famille de protéines de 16 kDa et de pI compris entre 5,0 et 5,5. L'ensemble de ces éléments nous amène à discuter sur les conditions physiologiques ou environnementales qui pourraient expliquer ce fait.

Comme une majorité de souches de *S. thermophilus*, la souche PB18 présente un phénotype d'agrégation en phase stationnaire quelque soit le milieu de culture et seulement quand le pHe est acide (pHe 5,0). Cependant, les autres souches n'expriment pas la protéine de 16 kDa dont on pouvait penser qu'elle soit responsable de cette agrégation et jouer le rôle de phéromone comme il a été décrit chez certains entérocoques. Ici, il semble donc que le phénomène observé soit plus simplement une floculation induite par l'acidification.

Comme on a pu le constater, la surexpression de la protéine de 16 kDa n'est pas affectée par la composition du milieu de culture, mais par la présence d'un tampon comme le β-glycérophosphate dans le milieu M17. De même, quand la concentration de lactose est le facteur limitant de la croissance (5 à 10 g l^{-1}), les cellules entrent en phase stationnaire avant les cultures témoins (20 g l^{-1} de lactose). On constate alors que la protéine de 16 kDa n'est pas surexprimée. Dans tous ces cas, le pHe n'est pas assez acide (pHe supérieur à 5) et les cellules ne floculent pas. Comme on a pu le voir dans les expériences de choc acide, la protéine de 16 kDa est surexprimée au moment où la

bactérie atteint un pH environnemental critique qui se situe autour de pH 5.

L'incorporation de ^{35}S-Met après un choc acide a montré que plusieurs protéines sont encore synthétisées quand on place les bactéries dans un milieu acidifié à pH 5 avec l'acide lactique ou avec l'acide acétique. Ces résultats sont en accord avec ceux de Hickey et Hirshfield (1990) qui ont trouvé que 13 polypeptides avaient leur synthèse augmentée (entre 1· 5 à 4 fois) chez *E. coli* quand elle a été soumise à des conditions de diminution du pH de 7,0 à 4,5 avec de l'acide chlorhydrique. Les mêmes auteurs ont décrit la surexpression de la synthèse de 19 peptides (2 à 14 fois) pour *S. typhimurium* soumis à un choc acide par rapport au témoin resté à pH 7. D'autres études ont montré que chez *S. typhimurium* un changement de pH de 7,7 à 4,5 produit un changement dans l'expression d'au moins 43 protéines (Foster & Hall, 1991). Le facteur sigma de phase stationnaire, σ^S, est aussi induit et il est responsable de l'induction de sept protéines additionnelles. (Lee *et al.*, 1995). Dans notre travail, quand PB18 a été soumise au choc acide, l'autoradiogramme a seulement mis en évidence onze protéines, dont une de 16 kDa. Tous ces résultats nous amène à penser que la surproduction de la protéine ou des protéines de 16 kDa est liée à un environnement acide du milieu.

L'analyse des protéines totales solubles par électrophorèse PAGE 2D a montré que la bactérie exprime différemment ces protéines en phase exponentielle ou en phase stationnaire, avec une augmentation spéciale dans une famille de protéines avec un pHi acide et de 16 kDa de masse moléculaire.

Très peu d'études ont été faites sur les bactéries lactiques qui permettent d'éclaircir la réponse protéique au stress, et il n'y a pas non

plus d'études approfondies du profil des protéines en PAGE-2D chez *S. thermophilus*. Auffray et al., (1995), ont montré que chez *S. thermophilus*, au moins 22 polypeptides avec une masse moléculaire comprise entre 30 et 100 kDa ont augmenté leur proportion relative ou ont été synthétisés *de novo* après un choc thermique. De façon intéressante, les protéines qui augmentent le plus ont une masse moléculaire de 84, 72, 63 et 31 kDa. Les gels publiés ne montrent pas cependant des protéines de moins de 30 kDa.

Une autre bactérie lactique étudiée, *Leuconostoc oenos*, a été soumis à un choc acide et suite à ce stress, elle a exprimé au moins cinq protéines. Ces protéines semblent être identiques à celles produites lors d'un choc chaud (Guzzo, *et al.*, 1994). Le même groupe de recherche a réussi à isoler une souche de *Ln. oenos* possédant une grande résistance au pH acide (pH 2,6). Dans cette souche, une protéine de 42 kDa est surexprimée (Guzzo, *et al.*, 1994).

Pour identifier des gènes régulateurs sensibles à l'acidité chez *Lc. lactis* MG1363, Rallu *et al.*, (1996) ont déterminé les conditions où cette souche n'était pas capable de développement (pH 4,5 à 37 °C). Ensuite, ils ont créé des mutants, par insertion d'un transposon et ces mutants ont été sélectionnés par leur capacité de survie dans les conditions acides. Une trentaine de mutants, qui présentent une résistance accrue à l'acidité, ont été isolés. L'identification des gènes par homologie de séquence a permis d'identifier le gène *ahrC*, probablement le gène régulateur du métabolisme de l'arginine et des gènes de la voie de la synthèse de (p)ppGpp (Baumberrg & Klingel, 1993). D'autres mutants semblent indiquer que la voie de la réponse stringente peut être impliquée dans la tolérance au pH acide.

Le profil PAGE-2D a montré que la protéine de 16 kDa observée en

PAGE-1D, était en réalité une famille de protéines de 16 kDa qui augmente son expression de 8,5 fois dans un environnement acide. Dans cette famille, c'est le spot mineur 550 qui a présenté la plus forte hausse relative d'intensité, mais les spots 451 et 454 sont parvenus à la plus grande valeur absolue (Tableau 4 et Fig 15 a). La somme des intensités relatives de tous les spots de 16 kDa explique la très forte intensité de la bande protéique observée en PAGE-1D.

Le profil PAGE-2D a également mis en évidence d'autres changements dans l'expression des protéines de *S. thermophilus* entre la phase exponentielle et la phase stationnaire. Ce changement correspond à l'induction de 10 protéines et à la répression de 9 autres. Chez *E. coli*, l'induction de 26 peptides a été facilement détectée par PAGE-2D de cellules soumises à une déprivation nutritionnelle en source carbonée et donc en phase stationnaire forcée (Groat *et al.*, 1986). Dans la phase stationnaire, la dégradation de lactose chez les bactéries lactiques produit l'accumulation de lactate et une acidification conséquente du milieu jusqu'à pH 4,0. L'acidification ou l'accumulation de lactate ou les deux, sont la cause de l'arrêt de la croissance chez les bactéries lactiques même si la concentration des nutriments est en excès (Piard & Desmazeaud, 1991); c'est pour cela que la réponse des bactéries lactiques à la phase stationnaire présente ses propres caractéristiques et semble très différente de la réponse d'*E. coli* dans les mêmes conditions.

Chapitre 2. Purification des protéines de la famille de 16 kDa.

Les protéines de la famille de 16 kDa ayant été identifiées par PAGE-2D, nous avons procédé à la mise en œuvre d'un protocole de purification. Cette purification nous a permis d'identifier et de caractériser la ou les protéines qui forment la famille protéique de 16 kDa. Le protocole mis au point comprend une précipitation au sulfate d'ammonium suivie d'une chromatographie d'échange d'anions et d'une chromatographie en phase inverse. Le résultat de ce travail est l'obtention d'une seule protéine avec un indice d'homogénéité de 99,7%.

1. Fractionnement analytique de la famille protéique de 16 kDa.

1.1 Obtention des protéines solubles

Les protéines ont été préparées à partir de cellules issues d'un litre de milieu TPPY inoculé avec 1% de préculture et incubé pendant 5 h à 42 °C, comme indiqué dans le chapitre "Matériel et Méthodes" (cf. § 4.2). Après la libération des protéines solubles totales par sonication (11,5 $mg \cdot ml^{-1}$), nous avons ajusté leur concentration à 10 $mg \cdot l^{-1}$ pour la suite du travail de purification.

1.2. Essai de précipitation séquentielle des protéines

Nous avons réalisé un premier essai de précipitation au sulfate d'ammonium en réalisant une gamme de concentration de 15, 25, 35, 45, 60, 80 et 100% de saturation à 0 °C et à pH 7. Les résultats peu reproductibles que nous avons obtenus avec ce type de précipitation nous ont conduit à modifier notre mode opératoire.

1.3. Fractionnement des protéines par extraction dans des solutions de sulfate d'ammonium à concentrations décroissantes.

Une très forte proportion de protéines a été précipitée dans une solution saturée de sulfate d'ammonium à 0°C. Après récupération du culot protéique total, une extraction, par resolubilisation des protéines précipitées, avec des solutions de concentration décroissantes en sulfate d'ammonium est réalisée d'après la technique d'Englard & Seifter (1990). Après dialyse, les fractions ont été analysées par SDS-PAGE (Fig. 1). On constate que toutes les fractions présentent une bande qui peut correspondre à une protéine de 16 kDa mais seules les fractions 25%, 65% et 80% contiennent la majeure partie de cette protéine. La fraction où la bande protéique de 16 kDa est la mieux isolée, correspond à la fraction extraite avec la solution de 80% de sulfate d'ammonium. Celle-ci a été bien évidemment analysée en priorité.

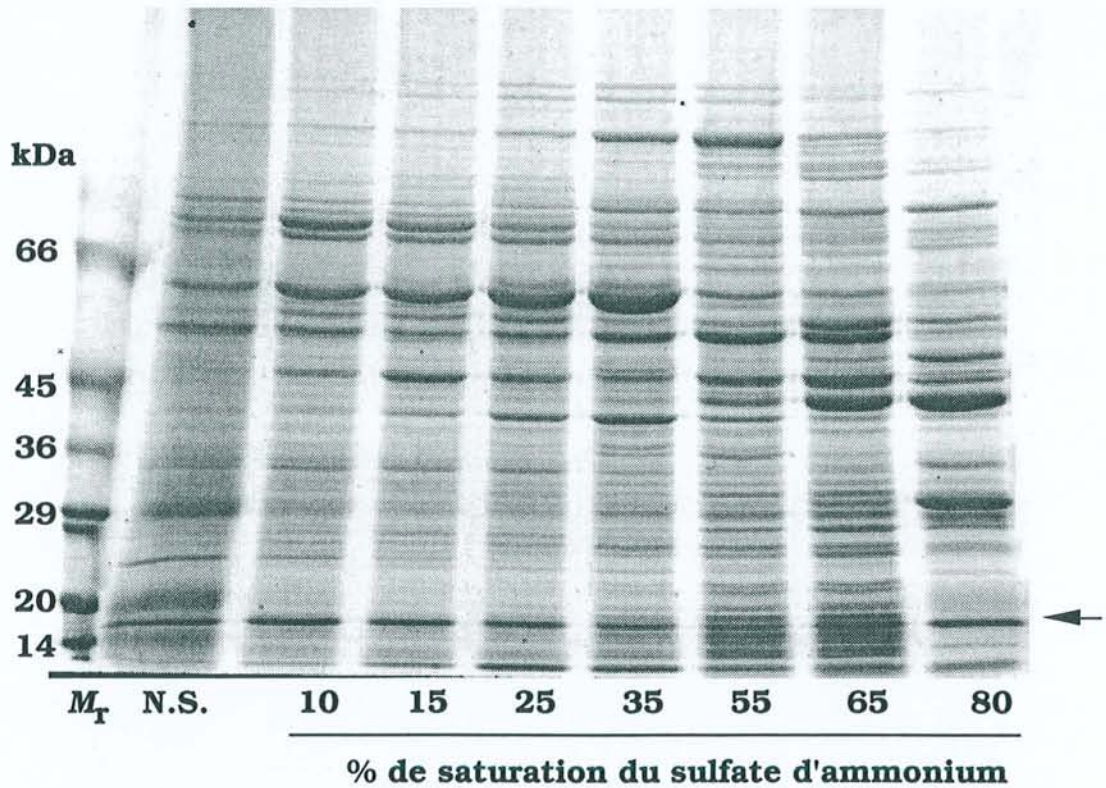


Figure 1. Profils électrophorétiques (PAGE-SDS) des fractions protéiques obtenues après extraction avec des solutions de concentrations décroissantes de sulfate d'ammonium.

Mr : Marqueurs de masse moléculaire

N.S. : Matériel non soluble

→ : protéines de 16 kDa

1.4. Fractionnement par chromatographie d'échange d'anions (FPLC)

La chromatographie d'échange d'anions sur une colonne MonoQ (échangeur d'anions fort), est réalisée avec un gradient de NaCl de 0 à 350 mM dans le tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7, pendant 30 minutes et avec un débit de 1 $ml \cdot min^{-1}$ (Fig 2). Les fractions obtenues ont été dialysées et la bande protéique de 16 kDa est retrouvée sur des gels PAGE-SDS dans les fractions correspondant aux temps de rétention de 27 à 30 min avec un maximum à 28 min (Fig. 3). Comme la bande protéique de 16 kDa est apparue suffisamment isolée, nous avons réalisé le transfert des protéines sur membrane de PVDF par électroblot semi sec, pour faire une analyse de la séquence des résidus d'acides aminés par dégradation d'Edman. Le résultat du séquençage de cette bande montre une séquence de 34 résidus d'acides aminés (Fig 4) avec une incertitude pour deux d'entre eux (résidu 21 : inconnu ; résidu 25 : tyrosine (Y) ou glutamine (Q)). Le fractionnement des échantillons 25% et 45% (Fig. 1) avec le même protocole et la séquence des extrémités N-terminales des protéines transférées, nous a permis de vérifier que les séquences N-terminales de ces protéines étaient identiques.

Comme l'analyse informatique de la séquence ainsi obtenue nous a indiqué une certaine homologie avec des protéines de choc thermique, —aussi bien bactériennes que végétales— nous avons décidé de mettre en œuvre un protocole de purification semi-préparatif à partir de 10 l de milieu de culture afin de caractériser complètement la séquence des résidus d'acides aminés des protéines de 16 kDa par des études de spectrométrie de masse et de dégradation d'Edman.

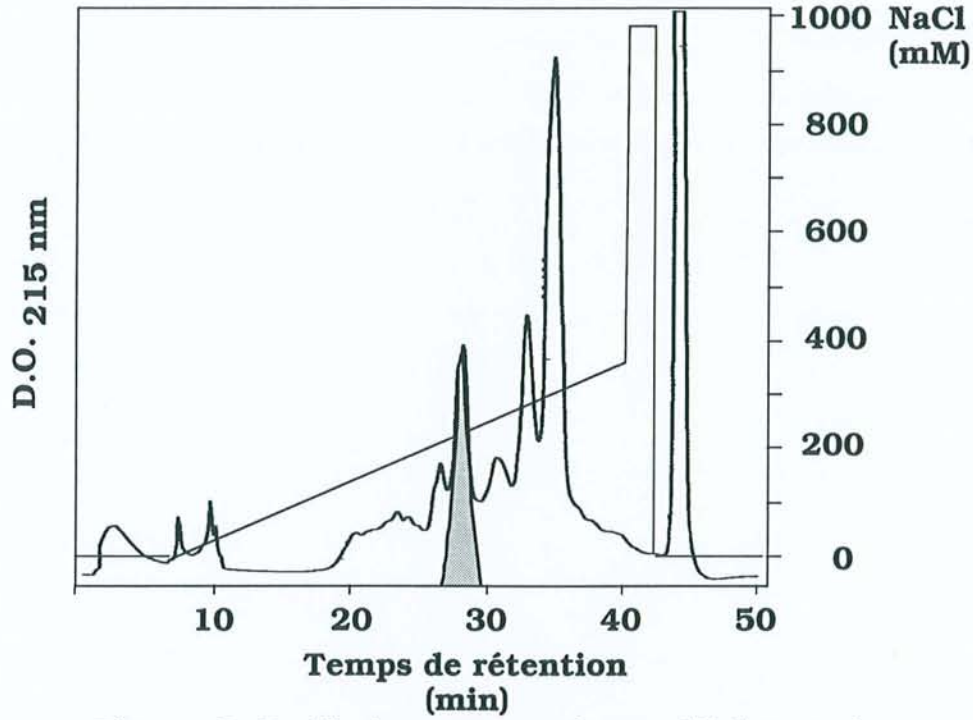


Figure 2. Profil chromatographique d'échange de anions (Colonne MonoQ), de la fraction protéique extraite par 80% de sulfate d'ammonium à 0 °C ☐ Protéine de 16 kDa

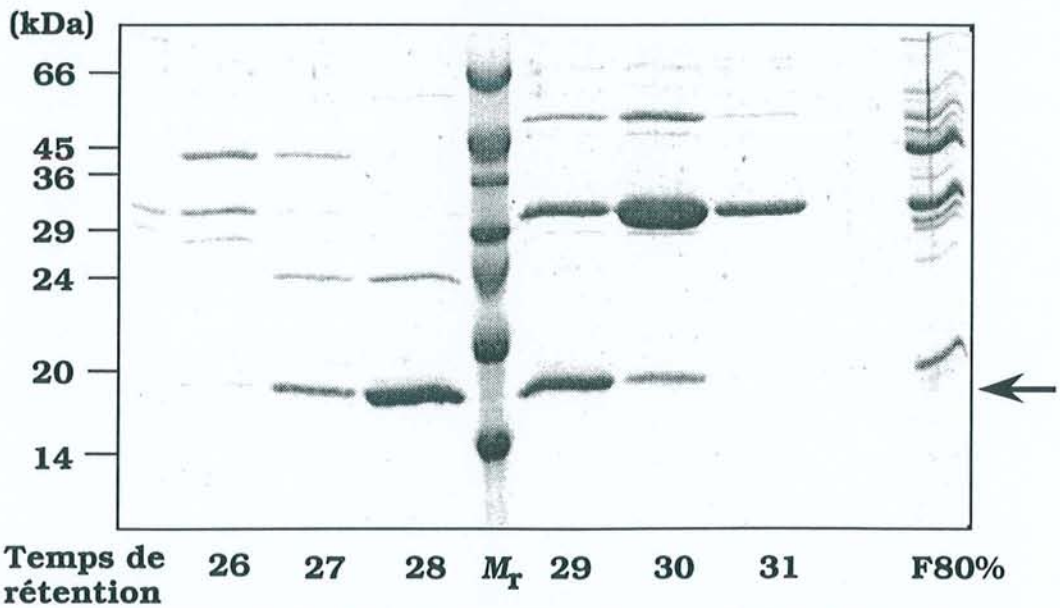


Figure 3. Profils électrophorétiques (PAGE-SDS) de la fraction protéique obtenue après extraction avec une concentration de 80% de sulfate d'ammonium (F80%).

Mr : Marqueurs de masse moléculaire

→ : protéines de 16 kDa

M	L	N	K	I	Q	H	R	N	L	N	T	Y	S	V	T	P	F	
1				5					10					15				18
-	F	D	F	(?)	E	E	F	Y	R	N	L	F	N	D	F	K	P	-
								(Q)										
18		20						25						30				34

Figure 4. Séquence de l'extrémité N-terminale de la protéine de 16 kDa transférée sur membrane de PVDF faisant suite à la chromatographie d'échange anionique (MonoQ) après pré-purification au sulfate d'ammonium.

2. Fractionnement semi-préparatif de la famille des protéines de 16 kDa.

Afin de réaliser la purification protéique à une plus grande échelle, nous avons mis au point et optimisé nos conditions expérimentales. Les rendements de la purification sont indiqués dans le Tableau 1.

2.1. Mise au point du protocole de sonication pour de grands volumes

La technique originale utilisée au laboratoire fait intervenir une sonication dans un tampon phosphate 50 mM pH 7 pendant 3 minutes, mais le volume étant fixé à 2 ml, nous avons eu besoin de mettre au point la technique de sonication pour des volumes de plus de 10 ml. Avec des volumes aussi grands, il fallait soit augmenter la puissance, avec un risque d'accroissement de la température, soit augmenter la durée de sonication, avec un risque d'oxydation des protéines. Nous avons choisi d'augmenter la durée de sonication ainsi que l'ajout de DTT à 1 mM (agent réducteur) afin de limiter l'oxydation.

Tableau 1. Récapitulatif de la purification de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* PB 18

Etape	Traitement	Protéines totales (mg)	Rendement estimé (%)	Pureté de la protéine de 16 kDa (%)*	Quantité estimée de la protéine de 16 kDa (mg)*
0	Départ	400,0	100,0	10,8	43,2
1	SA 80%	37,8	9,4	24,1	9,1
2	EA de 80	18,2	4,5	15,6	2,8
3	C_4 de 80	4,1	1,0	85,3	3,4
1	SA 65%	98,6	24,6	18,0	17,7
2	EA de 65	45,2	11,3	18,9	8,5
3	C_4 de 65	7,3	1,8	86,3	6,2
1	SA 35%	25,7	6,4	14,0	3,5
2	EA de 35	12,8	3,2	24,0	3,0
3	C_4 de 35	2,5	0,6	95,9	2,3
1	SA 25%	34,2	8,5	24,4	8,3
2	EA de 25	15,6	3,9	24,3	3,7
3	C_4 de 25	3,6	0,9	82,6	2,9
4	C_4 isocratique	**13,6**	**3,4**	**99,7**	**13,5**

Étapes :
1 : Extraction des protéines avec une solution de **X** % de la concentration saturante de sulfate d'ammonium (**SA**).
2 : Chromatographie d' échange d'anions (**EA**) sur colonne semi-préparative de DEAE-TSK.
3 : Chromatographie haute performance (HPLC) phase inverse **C_4** avec un gradient de concentration d'acétonitrile.
4 : Chromatographie haute performance (HPLC) phase inverse C_4 isocratique du mélange des fractions issu de l'étape 3..
* : Estimation à partir de la densitométrie des gels colorés avec du bleu de Coomassie R250

Pour déterminer le temps minimal de sonication permettant la meilleure destruction des cellules, la libération des protéines cellulaires est suivie par le dosage de Bradford (Fig. 5). Après 10 minutes de sonication, la libération des protéines se ralentit pour atteindre un plateau stable jusqu'à 20 minutes de sonication. Une durée de 10 minutes a donc été utilisée comme temps de sonication pour des volumes compris entre 30 et 50 ml.

2.2. Obtention des protéines

La purification semi-préparative de la famille protéique de 16 kDa de PB18, a été réalisée à partir de cellules issues de 10 l de milieu de culture TPPY cultivées pendant 5 heures à 42°C. La $D.O_{650}$ atteinte est alors de 1,2. Les bactéries sont lavées et remises en suspension dans 40 ml du tampon de sonication et soniquées pendant 10 minutes. La quantité de protéines obtenue correspond à 423 mg.

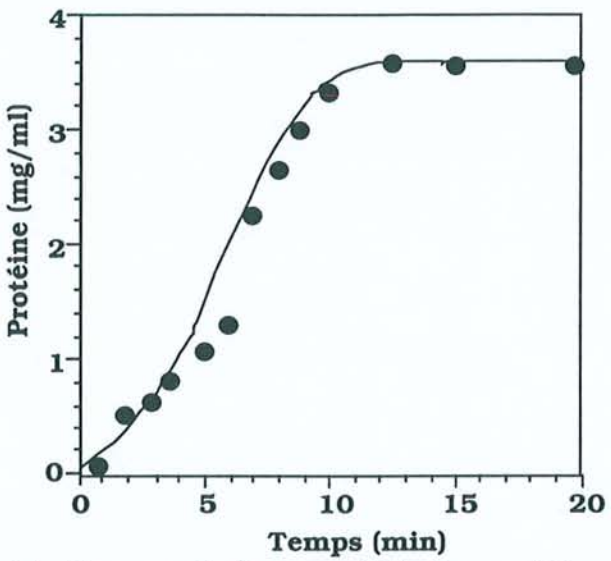


Figure 5. Mesure de la quantité de protéines solubles totales cellulaires extraites par sonication.
Tampon de sonication : Tris-HCl 50 mM, DTT 1 mM, pH 7,0, conditions : puissance 100 W, 50% cycle actif, sonde 0,5 cm, volume : 40 ml

2.3. Précipitation des protéines au sulfate d'ammonium

La précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium et l'étape d'extraction suivante sont analogues à celles de la méthode analytique (cf. § 1.1.2.), Cependant les étapes d'extraction à 65% et 45% ont été omises pour essayer d'enrichir les fractions résiduelles.

Les fractions choisies pour la purification sont donc celles correspondant à 80%, 55%, 35%, et 25% de saturation en sulfate d'ammonium (Fig. 6). Elles contiennent une grande proportion des protéines de 16 kDa (24%, 18%, 14%, et 24% respectivement) (Tableau 1) et sont traitées de façon séparées dans les étapes de purification suivantes. Le processus d'extraction terminé, il reste un reliquat insoluble dans l'eau ou dans un tampon sans agent dénaturant. Quand ce reliquat a pu être dissous et analysé par PAGE-SDS, il révèle un profil protéique total de PB18 (Fig. 6, piste 0). Ce reliquat représente plus de 50% du total des protéines de départ.

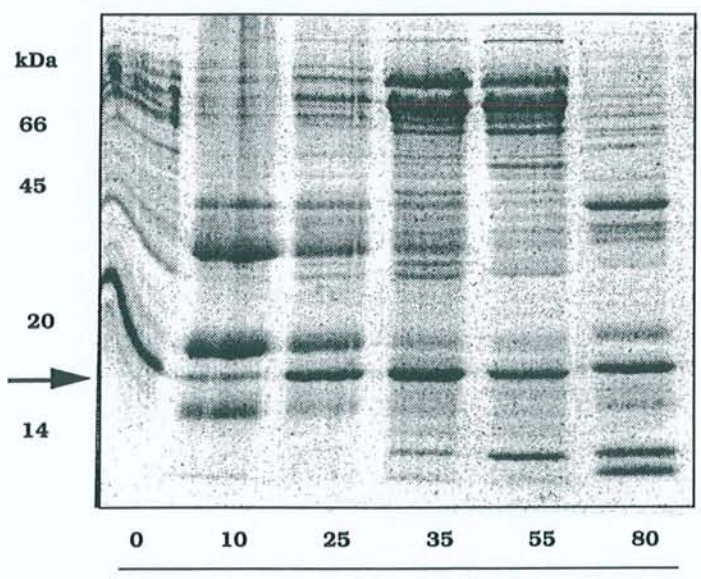


Figure 6. Profils protéiques (PAGE-SDS) des protéines extraites avec des solutions de concentrations décroissantes de sulfate d'ammonium après purification semi-préparative de la famille protéique de 16 kDa de *S. thermophilus* PB18.
0 : Matériel non resolubilisable
→ : 16 kDa

2.4. Chromatographie d'échange d'anions semi-préparative.

Nous avions à notre disposition une colonne semi-préparative d'échange d'anions DEAE-TSK qui présente des groupes d'échange ionique faibles, différents de ceux utilisés dans notre protocole analytique de purification. Des essais préliminaires nous ont permis d'obtenir des résultats satisfaisants pour la purification des protéines de la famille de 16 kDa.

Aussi, nous avons initialement mis à l'échelle les paramètres d'élution de la colonne en mode semi-préparatif en utilisant les équations suivantes (Pharmacia, 1985):

$$D_2 = D_1\left(\frac{d_2}{d_1}\right)^2 \qquad G_2 = G_1\left(\frac{L_2}{L_1}\right)$$

où D : Débit ($ml \cdot min^{-1}$) ; d : diamètre de la colonne (mm) ;
G : durée du gradient (min) ;
L : Largeur de la colonne (mm).

Nous avons calculé ainsi un débit de 8 $ml \cdot min^{-1}$ et un gradient de 80 min pour notre colonne semi-préparative.

On constate que les profils chromatographiques obtenus pour les fractions choisies sont très inégaux du fait de la différence en quantité et en qualité des protéines de chaque fraction (Fig. 7). Pourtant, les protéines de 16 kDa de masse moléculaire apparente sont éluées avec un temps de rétention très similaire compris entre 48 et 54 min. Comme exemple, nous présentons le profil électrophorétique des fractions obtenues à partir de la fraction extraite avec 55% de sulfate d'ammonium et dont le temps de rétention va de 45 à 53 min (Fig. 8).

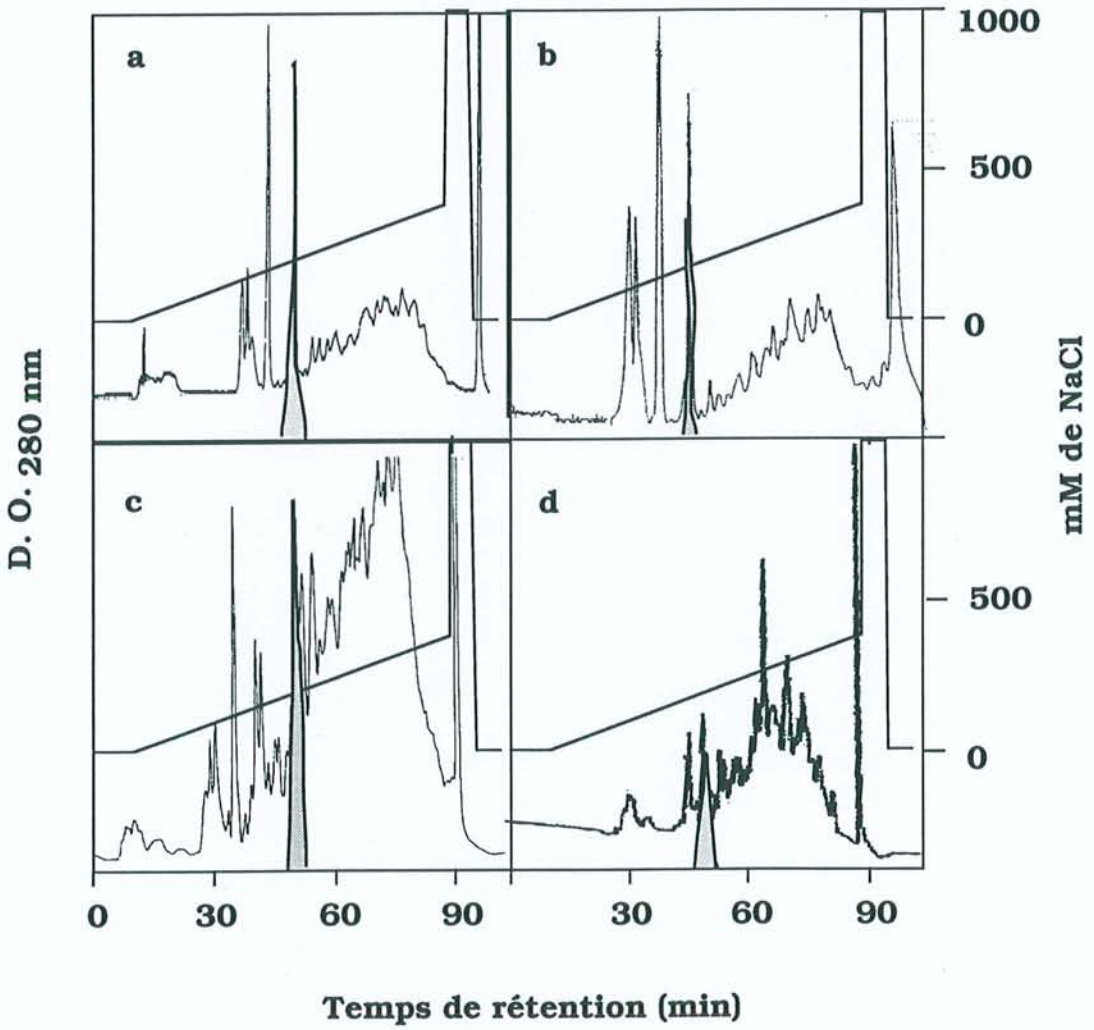


Figure 7. Profil chromatographique des fractions extraites avec des solutions décroissantes de sulfate d'ammonium et après chromatographie semi-préparative sur la colonne DEAE-TSK.
a : 25 %; **b** : 35 %; **c** : 55 % ; **d** : 80 %.

Protéine de 16 kDa

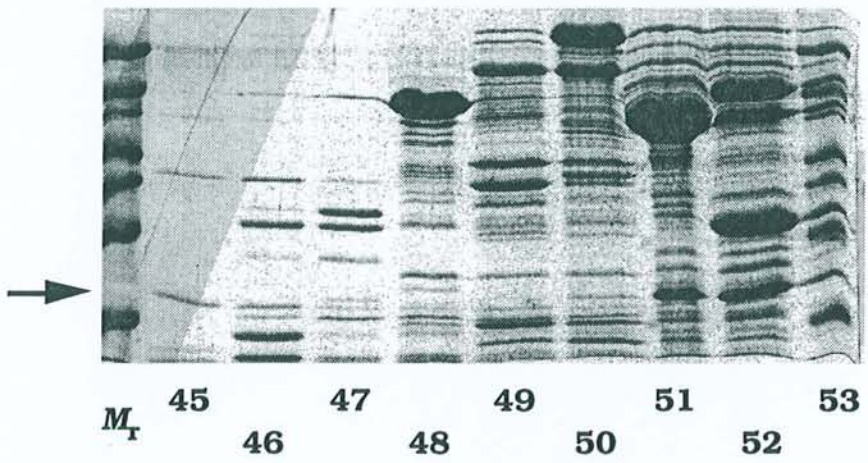


Figure 8. Profil électrophorétique (PAGE-SDS) des fractions éluées à 45 - 53 min après chromatographie d'échange anionique de la fraction extraite à 55% de sulfate d'ammonium
→ : 16 kDa

Les rendements pour cette deuxième étape de purification sont de 3 à 11% avec une pureté de la protéine comprise entre 15 et 24% (Tableau 1). L'enrichissement de la protéine de 16 kDa ne semble pas augmenter dans cette étape de purification mais il faut mentionner le fait qu'il y a un enrichissement simultané de plusieurs protéines et notamment d'une protéine de masse moléculaire de 50 kDa (Fig. 8, 51-52 min). Le taux de purification n'augmente pas mais le nombre de protéines accompagnant les protéines de 16 kDa a fortement diminué.

2.5. Chromatographie en phase inverse semi-préparative (HPLC, colonne C4)

L'étape suivante a consisté en une chromatographie en phase inverse par HPLC sur une colonne C_4 semi-préparative. La mise à l'échelle de l'HPLC en utilisant les équations du paragraphe 1.2.3 correspond à un gradient de 0 à 70% d'acétonitrile dans une solution à 0,1% de TFA pendant 140 minutes et avec un débit de 2,8 $ml \cdot min^{-1}$.

Le profil chromatographique de la fraction 80% (Fig. 9 a) montre un pic qui présente l'absorbance la plus élevée avec un temps de rétention de 68 minutes. Cela correspond à une concentration d'acétonitrile comprise entre 36 et 38%. Cette fraction a révélé la présence d'une protéine de 16 kDa. Aucune autre fraction n'a montré de protéine de 16 kDa. L'analyse préliminaire des fractions 55%, 35% et 25% présente le même pic majoritaire sortant à la même concentration d'acétonitrile. Dans les essais suivants, le gradient a été limité à 35 minutes et en limitant la solution d'acétonitrile à une concentration de 35 à 50% tout en maintenant la pente du gradient et le débit à 2,8 $ml \cdot min^{-1}$. Les profils chromatographiques des fractions 55%, 35% et 25% (Fig. 9 b, c et d) montrent une distribution des pics caractéristiques. Les fractions qui contiennent la protéine de 16 kDa ont des temps de rétention de 17, 13 et 11 min respectivement pour les échantillons 55%, 35% et 25% (Fig. 9). Dans cette étape, la pureté de la protéine de 16 kDa est de 85, 86, 95 et 82% respectivement pour les fractions 80%, 55%, 35% et 25% (Tableau 1)

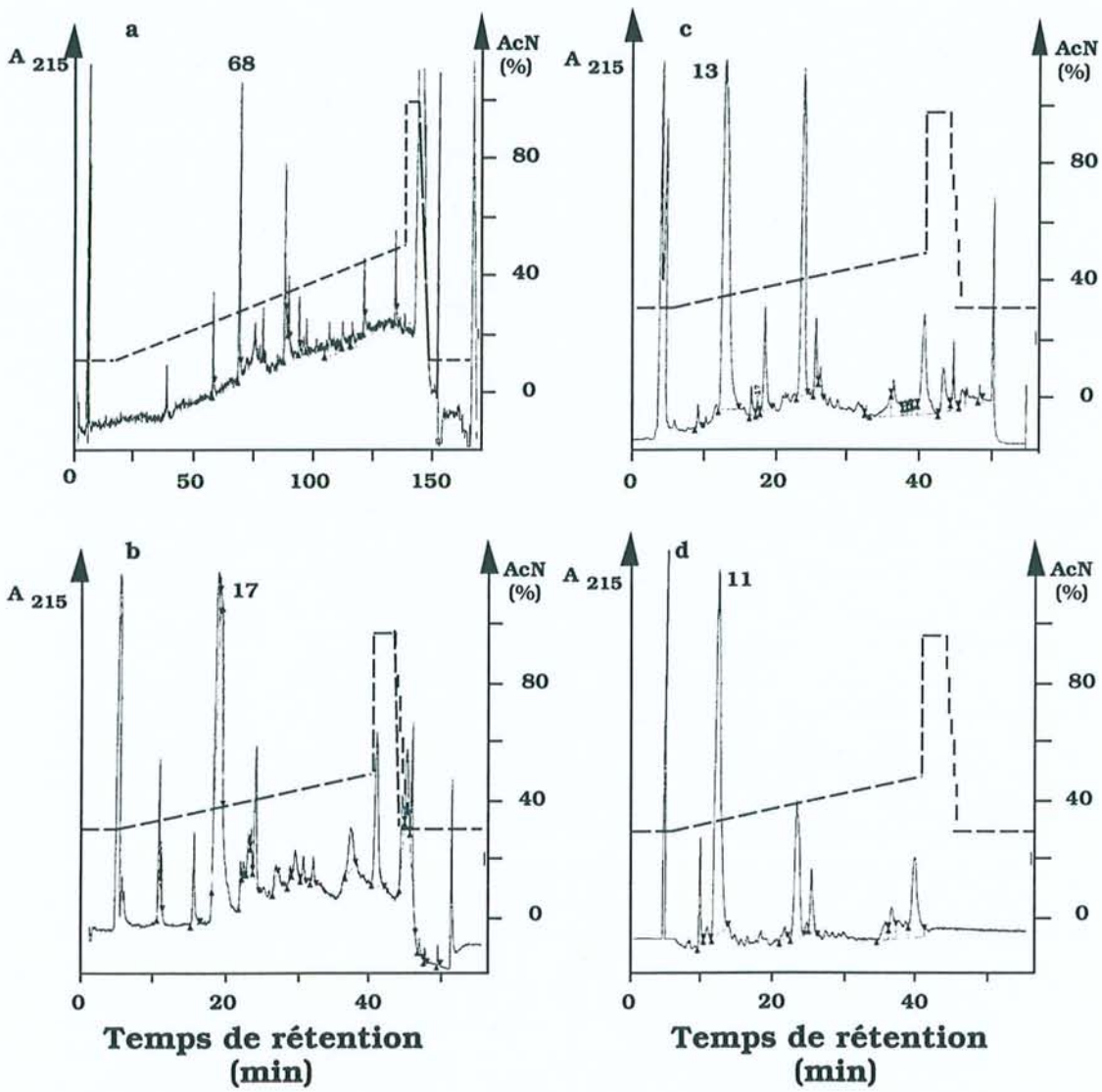


Figure 9. Chromatogrammes des protéines de *S. thermophilus* PB18 correspondant aux fractions : **a** = 80% ; **b** = 55%; **c** = 35% et **d** = 25 % de sulfate d'ammonium. La fraction contenant la protéine de 16 kDa est signalée par son temps de rétention indiqué au sommet du pic.

(AcN: acétonitrile; A_{215}: Densité optique à 215 nm)

2.6. Vérification de la pureté de la protéine de 16 kDa

Afin de déterminer la pureté et les caractéristiques physico-chimiques de la protéine de 16 kDa contenue dans les fractions de HPLC, nous avons utilisé :

- l'électrophorèse capillaire
- les électrophorèses mono et bidimensionnelle,
- la détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masses,
- analysé ses spectres différentiels dans l'ultraviolet .

2.6.1. Analyse des fractions purifiées par électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une technique très rapide pour vérifier la pureté d'un échantillon. Le temps d'analyse se limite à 20 minutes par échantillon et le temps de préparation de l'échantillon est négligeable. Le profil chromatographique montre que le temps de rétention de tous les échantillons précédemment préparés dans ce type d'électrophorèse se trouve proche de 7 min. Ceux-ci ont un taux de pureté compris entre 68 et 100% (Tableau 2, Fig. 10).

2.6.2. Spectres de masse des fractions purifiées.

Les masses des échantillons ont été déterminées par deux techniques :

- ionisation par désorption laser suivie par un analyseur de détection du temps de vol (MALDI-TOF) (Fig. 11 a).

- ionisation par électrospray suivie par un analyseur quadripolaire (ES) (Fig. 11 b)

Les résultats obtenus par électrospray donnent une masse moléculaire moyenne de 16443 Da par ES et de 16488,5 par MALDI-TOF pour les protéines purifiées à partir des fractions 80%, 55%, 35% et 25% (Tableau 2). Nous pouvons observer, dans les spectres MALDI-TOF des échantillons, un léger signal autour de 11000, qui peut être interprété comme le signal 3^+ du dimère.

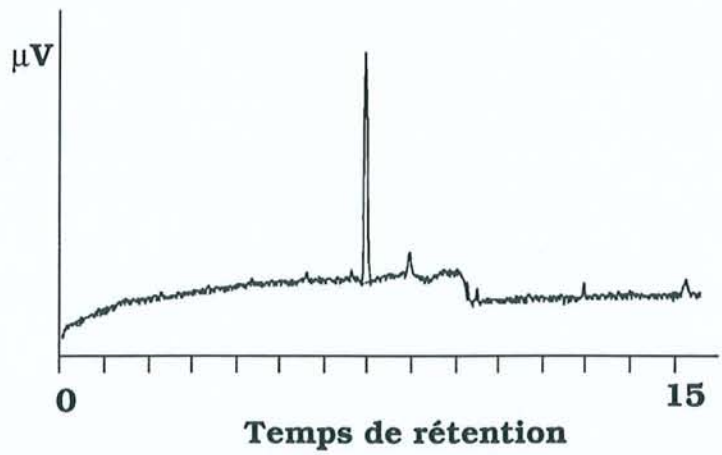


Figure 10. Profil chromatographique obtenu après électrophorèse capillaire de la fraction de temps de rétention 68 min de l'échantillon 80%. Le pic principal a un temps de rétention de 7 min.

Tableau 2. Récapitulatif des résultats de la pureté de la protéine de 16 kDa après HPLC préparative.

Échantillon	Temps de rétention (min)		Masse moléculaire (Da)		Rf
	HPLC	EC	ES	MALDI-TOF	
80	17,1	6,9	16442	16459	0,73
55	17,0	7,0	16442	16464	0,75
35	12,6	7,1	16443	16582	0,73
25	11,0	7,3	16444	16449	0,75

HPLC : Chromatographie haute performance ; EC : Electrophorèse capillaire ; Rf : par PAGE-SDS unidimensionnelle ; Masse moléculaire déterminée par spectre de masse : ES : électrospray.

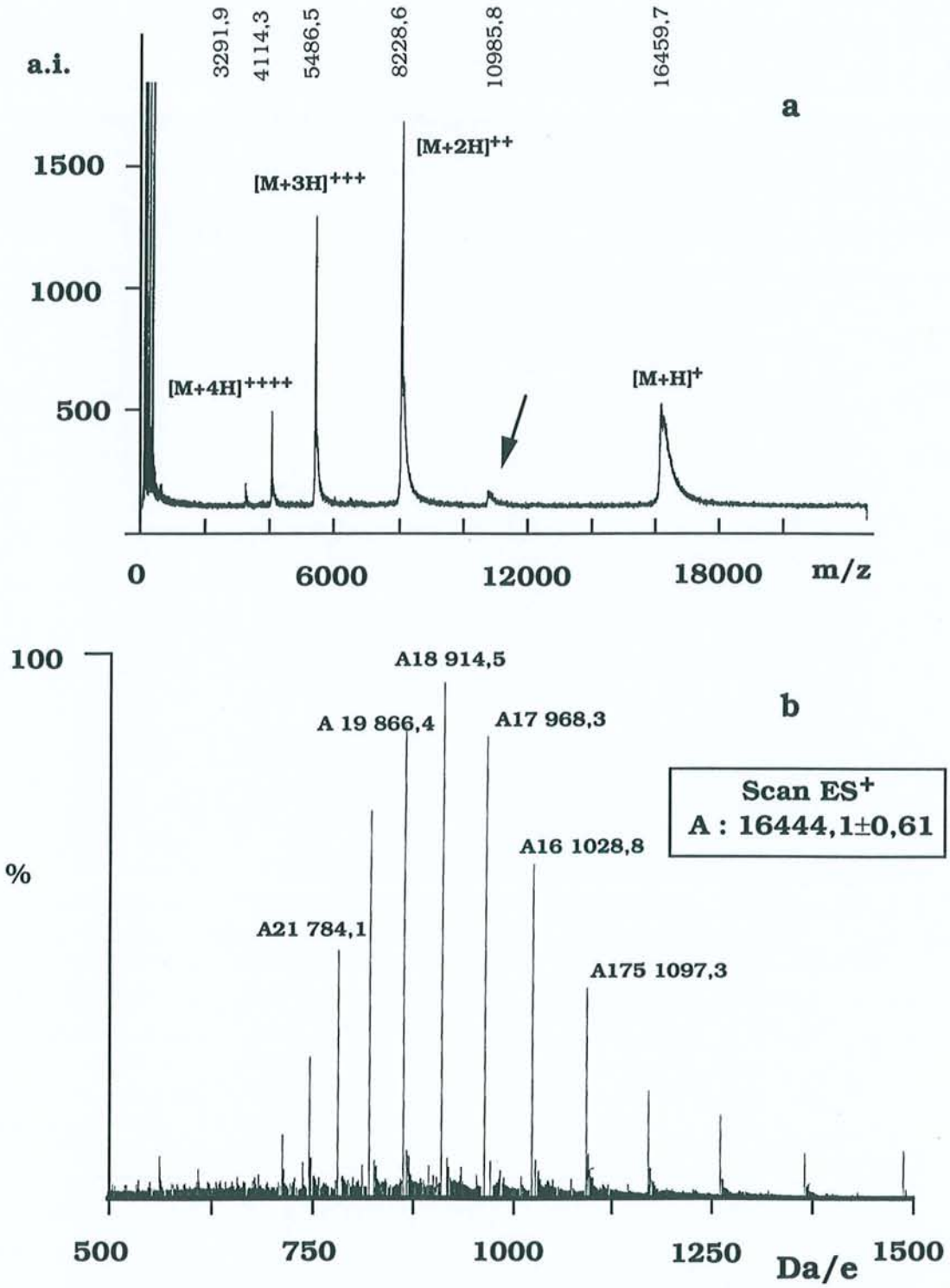


Figure 11. Spectres de masse des protéines de PB18 contenues dans la fraction de temps de rétention 17 min de l'échantillon obtenu à 55% de saturation de sulfate d'ammonium.

a. Spectre de masse utilisant l'ionisation par désorption laser et la détection par son temps de vol (MALDI-TOF). b. Spectre de masse utilisant l'ionisation par électrospray et un détecteur quadripolaire (ES). La flèche indique une possible dimérisation de la protéine.

2.6.3. Analyse de la pureté des fractions par analyse du spectre différentiel U.V.

Les peptides et protéines contenant des résidus aminoacyls aromatiques sont identifiables par une détection dans l'ultraviolet entre 240 et 310 nm. L'analyse et la comparaison des spectres nous permettent de prédire si deux protéines ayant un temps de rétention similaire sont identiques ou non ; la dérivée seconde du spectre permet également de déterminer le rapport Tyr/Phe des échantillons (Perrin *et al.*, 1995). Le spectre présenté ici pour une des fractions testées est caractéristique de peptides sans tryptophane (Fig. 12 a) car il ne présente pas l'épaulement à 290 nm caractéristique de Trp. Le rapport Tyr/Phe est en moyenne de 0,73 (Fig. 12 b, Tableau 3), ceci signifie que nous devons trouver dans la séquence de la protéine 3 résidus tyrosine pour 4 résidus phénylalanine. Nous retrouvons effectivement 5 résidus tyrosine et 8 résidus phénylalaline et le rappont est donc de 0,6.

Tableau 3. Rapport Tyr/Phe de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* PB18. Le calcul des relations Tyr/Phe a été fait selon la technique de Perrin *et al.*, (1995).

Fraction	Tyr/Phe
80	0,75
55	0,71
35	0,73
25	0,72

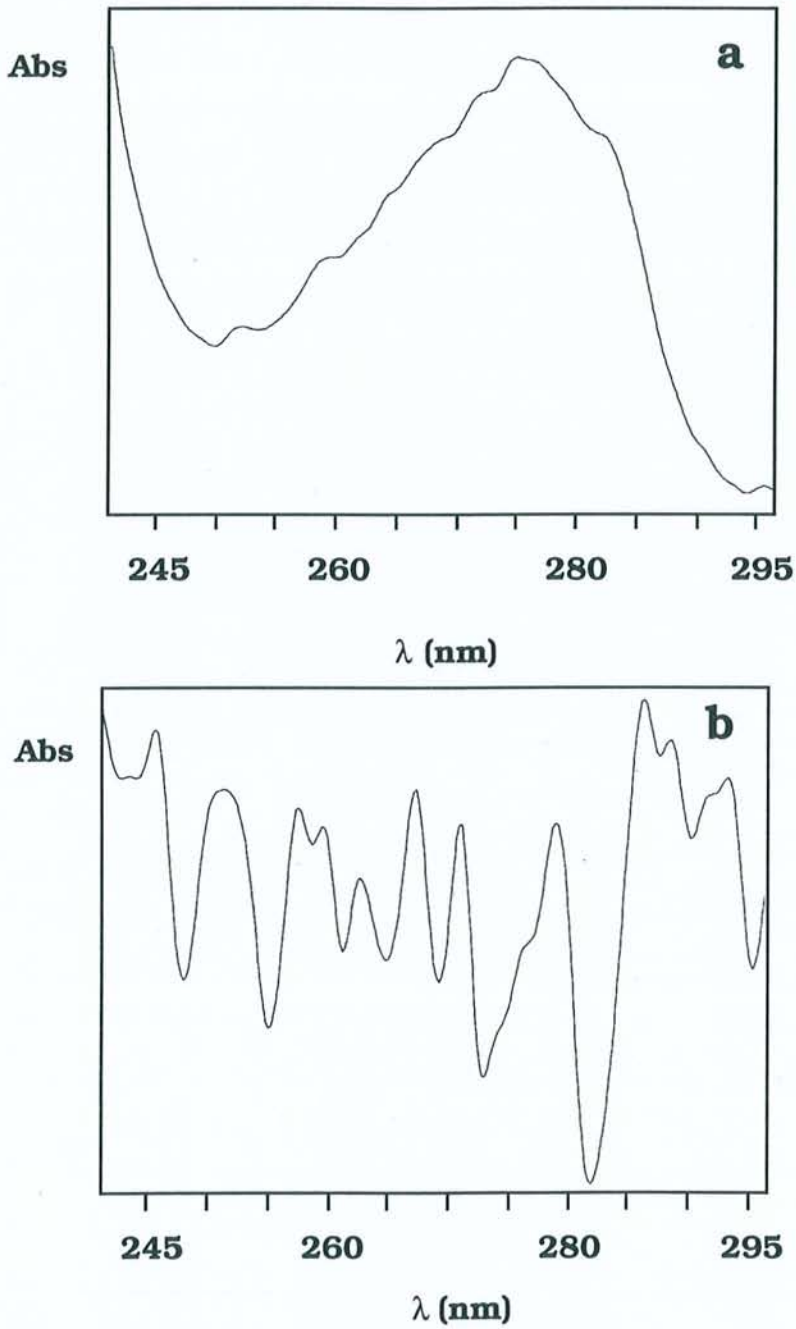


Figure 12. Spectre différentiel de la fraction de temps de rétention 17 minutes de l'échantillon 55%.

a = Spectre ultraviolet ; b = Dérivée seconde

2.6.4. PAGE-SDS 1D des fractions purifiées

La figure 13 montre les profils électrophorétiques monodimensionnels des fractions obtenues par chromatographie en phase inverse. Nous pouvons remarquer que la protéine obtenue est pure. Cependant, une double bande située à 66 kDa est observée dans chaque piste. Ceci pourrait être dû à la présence de β-mercaptoéthanol dans le tampon d'échantillon protéique comme il a été démontré par Beis et Lazou (1990).

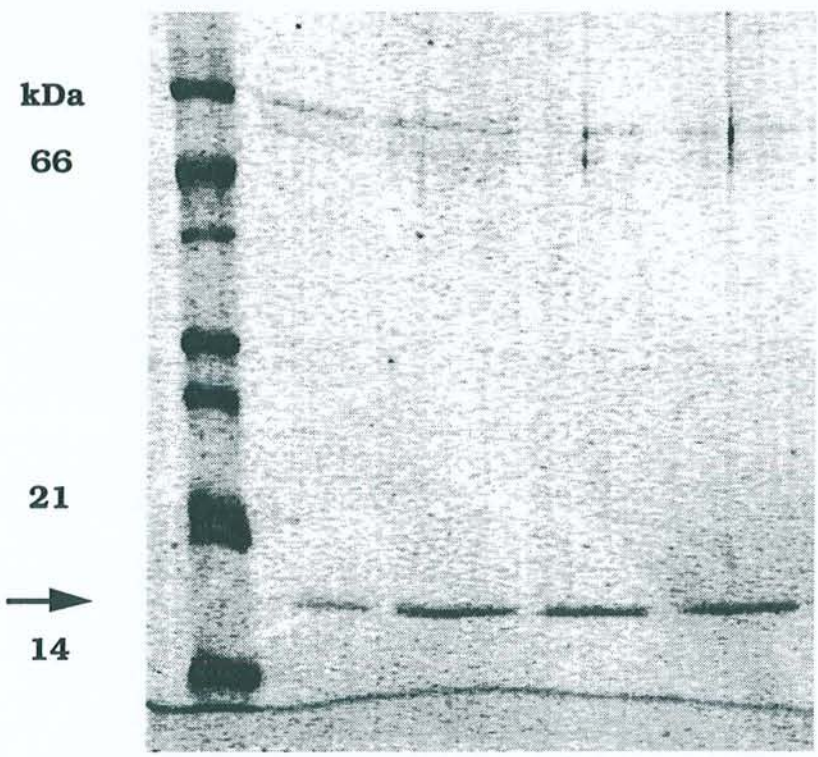


Figure 13. Profils électrophorétiques (PAGE-SDS) des fractions éluées après chromatographie en phase inverse (HPLC semi-préparative).

→ : 16 kDa

2.6.5. PAGE 2D des fractions purifiées

Après purification et analyse de la pureté de la protéine de 16 kDa, l'électrophorèse bidimensionnelle des fractions comportant la protéine de 16 kDa montre une famille de 4 spots de masse égale à 16 kDa et de pI égale à 5±0,2 (Fig. 14)

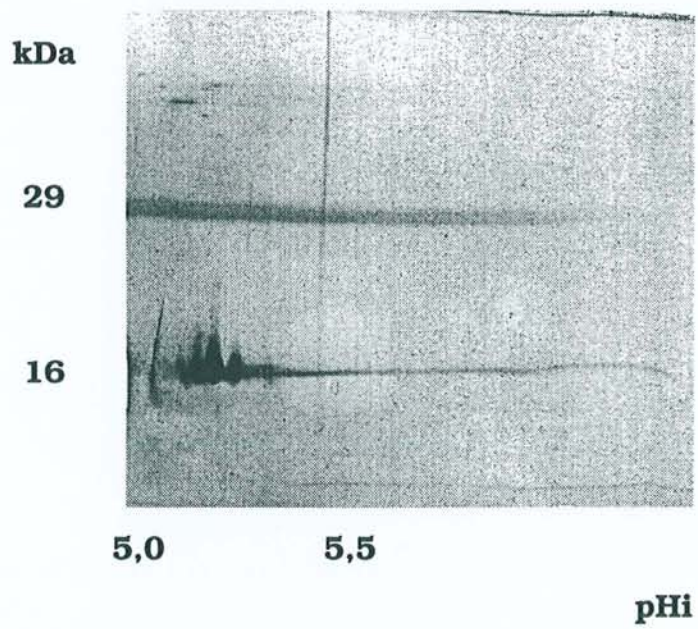


Figure 14. Electrophorèse bidimensionnelle de la fraction de l'échantillon 55 des protéines de PB18

3. Discussion

La purification des protéines obéit à des principes généraux mais les protocoles de purification doivent être adaptés à chaque protéine. Dans notre travail, la difficulté s'en est trouvée accrue par le fait que nous n'avions qu'un critère de traçabilité : celui de la masse moléculaire. Les différents problèmes que nous avons rencontrés lors de la purification peuvent se résumer ainsi :

(i) l'ensemble des protéines de PB18 précipitaient dans certaines étapes de purification ;

(ii) la protéine de 16 kDa était présente dans des fractions non-contigües, d'où l'hypothèse de la présence dans notre préparation de plusieurs protéines de même masse ;

(iii) le faible rendement de certaines étapes.

La première étape de la purification est de façon classique une précipitation au sulfate d'ammonium. La précipitation des protéines par l'addition de fortes concentrations en sel est due à la neutralisation des charges de surface des protéines et aussi à une diminution de la concentration effective de l'eau, ceci est connu comme "salting out effect" (effet de relargage) des protéines. La concentration en sel nécessaire pour précipiter une protéine donnée est fonction du nombre et de la distribution des charges et des groupes polaires non ioniques à la surface de la protéine mais aussi du nombre et de la distribution des résidus hydrophobes exposés au fur et à mesure que les charges sont neutralisées. La taille et la forme de la protéine sont également des facteurs qui peuvent modifier la précipitabilité des protéines. Cette technique permet aussi d'éliminer des contaminants tels que les acides

nucléiques et certains polysaccharides plus résistants à la précipitation au sulfate d'ammonium.

Nos premiers essais de précipitation au sulfate d'ammonium n'ont pas été très reproductibles et le fait de trouver la protéine que nous voulions purifier dans toutes les fractions nous a amené à chercher d'autres techniques de précipitation. Nous avons utilisé l'extraction par resolubilisation des protéines à partir d'une première précipitation avec une solution saturée de sulfate d'ammonium (Englard & Seifter, 1990). Cette technique bien que peu utilisée présente l'avantage d'être très reproductible car les concentrations en sulfate d'ammonium sont plus précises et le pH des solutions peut être maintenu à la neutralité tout au long du processus. D'après les résultats finaux de fractionnement par précipitation - extraction, on s'aperçoit que la protéine est présente dans toutes les fractions et il s'avère donc que l'enrichissement de la bande protéique de 16 kDa n'est pas assez important. Nous pensons qu'un protocole de purification plus performant pourrait comprendre une simple précipitation au sulfate d'ammonium à 85%, puis de continuer l'étape suivante de purification avec cette fraction protéique précipitée. Les avantages de la précipitation (élimination des contaminants et concentration de l'échantillon) sont garantis.

La séparation par chromatographie d'échange d'anions repose essentiellement sur l'échange des protéines chargées négativement et fixées sur la colonne (attachées aux groupes amine quaternaires, $-N^+R_3$) avec les ions Cl^- fournis par un gradient de NaCl. Du fait de la valeur estimée du pHi (pHi 5,5) de la protéine de 16 kDa (Guimont *et al.*, 1994), nous avons réalisé la chromatographie à pH 7,0. Ce protocole nous a permis de bien séparer les protéines bactériennes et d'isoler la protéine de 16 kDa de ses voisines de même taille. Du reste, lors d'une

prochaine chromatographie d'échange d'anions, nous suggérons de travailler à un pH légèrement acide —à pH 6, par exemple— ce qui nous permettra sans doute de mieux séparer encore cette protéine.

En outre, soulignons que le transfert de la protéine de 16 kDa s'est réalisé de façon très satisfaisante puisqu'il nous a permis de déterminer en une opération les 34 résidus de l'extrémité N-terminale.

Quiconque a été confronté à des problèmes de purification des protéines sait que la question du rendement est essentielle. Aussi, nous nous sommes beaucoup investis dans la mise au point de la sonication pour partir avec un extrait brut conséquent sur le plan qualitatif et quantitatif.

En transposant les conditions expérimentales de la chromatographie d'échange d'anions analytique à une échelle semi-préparative, nous avons obtenu un taux d'enrichissement plus faible de la protéine de 16 kDa, mais avec un rendement plus élevé. Ces valeurs peuvent sans doute encore être améliorées en utilisant un pH légèrement acide comme nous l'avons suggéré dans le précédent paragraphe.

L'étape HPLC semi-préparative a été performante au niveau de la séparation des fractions. Toutefois, la dérive du temps de rétention a perturbé quelque peu nos résultats. Ce problème a été en partie résolu par l'emploi d'un dégazeur en ligne et par la thermorégulation des colonnes.

L'emploi de plusieurs méthodes électrophorétiques de contrôle de la pureté de notre préparation nous a permis de montrer la présence de plusieurs protéines ayant un Rf de 7,3-7,5 et un pHi de 5,0.

De même, la détermination de la masse moléculaire de la protéine de 16 kDa par deux méthodes de spectrométrie de masse nous conduit à

retenir l'hypothèse d'une seule protéine de ce type, mais sans doute associée à d'autres ; d'où sa co-précipitation dans une large gamme de concentration en sulfate d'ammonium.

Au total, nous avons purifié 13 mg de protéine dont l'homogénéité est de 99,7%. Le rendement de purification est de 3%. Ces valeurs sont à considérer avec prudence car l'analyse densitométrique des gels colorés au bleu de Coomassie est une technique semi-quantitative mais dans notre cas c'était le seul moyen de vérifier la présence de la protéine étudiée.

Chapitre 3. Détermination de la séquence de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* PB18 et analyse informatique

Ayant obtenu une quantité suffisante de la protéine de 16 kDa purifiée, notre but était alors de déterminer la séquence totale en résidus d'acides aminés de celle-ci afin de trouver des arguments pour un éventuel rôle biologique. Pour cela, à partir de la protéine purifiée, nous avons envisagé plusieurs approches :

1) Répétition du séquençage de l'extrémité N-terminale afin de lever le doute sur certains résidus et d'en identifier un plus grand nombre.

2) Hydrolyse avec deux enzymes protéolytiques (trypsine et endoprotéase Arg-C) afin d'obtenir des peptides de taille appropriée (du dipeptide au décapeptide), et de confirmer l'identité de la séquence de notre protéine à celle de la protéine putative codé par la séquence du plasmide pST1 de *S. thermophilus* (Hashiba *et al.*, 1993). La détermination de la structure primaire a été effectuée soit par spectrométrie de masse, soit par la dégradation récurrente d'Edman.

Puis, la consultation des banques de données de structure des protéines nous a permis, en plus, de rechercher des homologies, de déterminer le point isoélectrique ainsi qu'une prédiction de structure secondaire.

1. Séquence de la protéine purifiée par dégradation d'Edman

La protéine purifiée a été à nouveau séquencée par dégradation d'Edman de l'extrémité N-terminale et nous avons réussi à obtenir 36 résidus d'acides aminés (Figure 1) et à lever le doute sur le résidu 21 que nous n'avions pas réussi à déterminer et sur le résidu 25 où deux résidus étaient proposés. Nous avons ainsi déterminé la présence d'une phénylalanine (F) en position 21 et confirmons une tyrosine (Y) pour le résidu 25.

M - L - N - K - I - Q - H - R - N - L - N - T - Y - S - V - T - P - F- D - F
5 10 15 20

- F - E - E - F - Y - R - N - L - F - N - D - F - K - P - N - F
25 30 36

Figure 1. Séquence de la protéine de 16 kDa à partir de la protéine purifiée.

2. Identification dans les banques de données d'une protéine homologue à la protéine de 16 kDa purifiée de *S. thermophilus* PB18

2.1. Recherche de séquences homologues avec la séquence de la protéine de 16 kDa

La recherche d'homologie de la séquence confirmée de la région N-terminale de la protéine de 16 kDa a été réalisée en utilisant les

logiciels TFastA, TBLASTN et SSearch. La lettre T dans les sigles signifie que la recherche se fait dans les bases de données d'acides nucléiques, mais la comparaison se fait avec la traduction de ces mêmes séquences dans les 6 cadres de lecture (3 cadres pour chaque brin complémentaire d'ADN). Les résultats de cette recherche confirment que les 36 premiers résidus de la protéine de 16 kDa présentent une identité de séquence avec une protéine hypothétique codée par un fragment du plasmide pST1 d'une souche de *S. thermophilus* 29 (Hashiba *et al.*, 1993) et à un moindre degré avec des protéines de choc thermique de *Clostridium acetobutylicum* (Sauer & Durre, 1993) et *Lactobacillus delbrueckii* (ACCESSION : Z71782). Il y a également des homologies avec d'autres protéines de choc thermique, notamment de la famille des petites protéines de choc thermique (*small heat shock proteins*) des végétaux.

2.2. Analyse de la séquence du plasmide pST1 de *S. thermophilus*

Le plasmide pST1 a été trouvé au Japon par Hashiba *et al.*, (1993) dans la souche 29 de *S. thermophilus*. C'est un plasmide replicatif de 2,79 kb. Il a été purifié et séquencé complètement (ACCESSION S67974). L'expression des protéines qu'il code a été étudiée sur des maxicellules d'*E. coli*. Seule la protéine RepA (pI : 9.87 ; M : 22455.9 ; PID:g461065), responsable de la réplication du plasmide a été trouvée par les auteurs (Hashiba *et al.*, 1993).

La localisation exacte de la séquence dans le plasmide de *S. thermophilus* pST1 se trouve entre les bases 2244 et 2672 (Fig. 2). Ceci correspondrait à une protéine de 142 acides aminés avec une

```
   1 gatatcataa gttaggattt tgccttcttt ttgaagaatt tctttgtatt tccagagcct
  61 tctatattct gtgacatcac agattctttt ggttcatcca aatgacacac cctataaaaa
 121 acttgaaatt ggcatgcgat acaagaaaat accttgtcgt ggctctccta aaagcccata
 181 atagggggcgg tggtcgtttt taaacctggt ctaggtgaac aagatcctgc cccttatata
 241 aaatcgtgct gtcgggcgtt ttagaggggt gtggcgactt atctatttta gttcgtccaa
 301 ctgttgaata attggggtgt tttatagaga ccacatcatt attccaacaa ttaggggttt
 361 tatatcaact atatcaatct aaagcgctag tgaatgcctg aaagtagtca atatctttgg
 421 agggtctagg acgcgttagg accatcccga gagtacccgt ccccgaagag aacccgtttg
 481 tcatatccag gggttttacg cagttattgt attgctacaa taagttggta tttctcgaag
 541 ttttcgttta gttgagttgc ctatgatttg ccattattgt ctcgtttcac gtcaccatta
 601 agagcgattt attccgagag aactcttgtc agtaatctga gcgatttaga ctgagagtgt
 661 ctgagtcgca agactgaaag cttgcgataa ggacacgaag tctagaaaat cagcgaaagg
 721 ttacttgctg acaagaggaa attggaataa aaagcgataa gtttgatggt gaatttttac
 781 tgaaaagaaa agagggctga aagccaaaaa aagcaggctt ttgcctgctt tcttcttatc
 841 ttgatacgta ttacgagata attcacgggg attttttag ccgtagggtt ctaaaaccct
 901 tgtcattact ggtttttgg gcaaaaaaac aatccgtttc atttctgaaa aggtttcgtg
 961 ttataatttt atgtgtcgaa ggggaaaaat ataacattca tgaaaggaga aatacggatt
1021 tttttgcatc gcaaattaat ttgtatatat agtatagcat gacggatttt aaaaacaagg
1081 ggaaattctt gtcgataaga acagtcgagg acaaagaacg agactggcga ggacgaaaaa
1141 tattaagttt gcaattagct gatattttta aagaattgca gtacaagaag acttttgttg
1201 aaagagtaat atcgtgtggt gatactttac aatttattca aaatcaagac ggtaacctaa
1261 agctctatca agcctatttt tgtaaaaaca agctatgtcc tatgtgcaac tggagacgtt
1321 caatgaaata ttcttatcag acatcaagaa tcgttgatga ggcaataaaa caaagcccta
1381 aaggacgctt tctctttcta acattgactg ttaagaacgt cgaggggcaa gcattgaata
```

Figure 2. Séquence nucléotidique complète du plasmide pST1 (d'après Hashiba, et al., 1993). Les cadres de lecture ont été retrouvés par le logiciel *Frames* de GCG.

nnnnnn : Cadres ouverts de lecture
nnnnnn : Boîtes promotrices
nnnnnn : Séquence de Shine-Dalgarno
* : codon de terminaison

```
1441 gcacgattag tcagctcaca aaatcatttg accgtttatt taagcgtgct aaagttcaaa
1501 ggaatctgtt gggatatttg cgttcagttg aagtgaccca caatgaaaat gacaagacat
1561 atcaccctca tattcatgtt ttgatgatgg tgagacctag ttattttcag tcaaaaaaag
1621 atcattgaaa gttgattatg tccctatgat cgacattcga acagtaaaag agactggaaa
            *
1681 attatatcac tcaaaaagag tggagcgata tgtggtctca aggactgcga ggggcagttt
1741 tagagaccgc aaaatatcca actaagccga ttaagcttga tattgaaaat aagcaagttg
1801 ttgatgatct atacaacggt ttgtatcgaa aaagacaact tggctacggt ggtttattta
1861 aaaccatcaa aaaacaacta gcactagatg acgccgaaaa tggtgacttg gtacatacgt
1921 ctgaggataa tgaaaacata tcaaagggta cagaaatagt cgctatatgg aacgctagca
1981 agcaaaatta ttatttgaaa aaataaaata aagctcctcg aaagaggggc tttttagtat
                          *
2041 cagaagaaga gaataaaaag ctatcttctg ctactattga taaatctgat ttcaatatct
2101 gagtatttac tagcgataaa aaatatgctg ataccatcac atgaaaaata attttacaat
2161 tttcaaagag cataatactt gaaaactgac tttttcggac tataataatc atcgaaaaga
2221 gaatatagaa agaagtgact attatgctaa ataagattca acatcgtaac ttaaacacat
2281 atagtgtgac acctttttgat ttttttgaag aatttagtcg taatttattc aatgatttta
2341 agccaaattt catcaaaaca gatattcatg aaactgataa tgaatatctt gtagaagctg
2401 aactccctgg tatccctaaa gaaaacattc aagttactta cgaaaacgga gtattaacaa
2461 ttagtggcca acaacaaatt gatgcagtaa acgaagataa aaaaggaaag ttgattcgta
2521 gcgaacgtag tttaacaagt gtccaacgtc aatatttatt agaaaatgtt aaagaagacg
2581 aaataaaggc ttcttattca gatggagttc ttaaagtaac cttgccaaaa gatagtaaca
2641 aagaaataaa aaaatctatt tcaattgagt agtaattaaa aaattacgaa aaaaggcgtc
                                    *
2701 tataaaattt tataggcgcc ccttttttcgt agaaataaat tatttttttct ttcgccattc
2761 actatctaaa tcg
```

Figure 2 (suite). Séquence nucléotidique complète du plasmide pST1.

nnnnnn : Cadres ouverts de lecture
nnnnnn : Boîtes promotrices
nnnnnn : Séquence de Shine-Dalgarno
* : codon de terminaison

masse moléculaire de 16 kDa. L'analyse de la séquence du plasmide par le logiciel *Frames* de GCG montre en fait que trois cadres de lecture sont possibles (Fig. 3). Le premier de ces cadres s'étend du résidu nucléotidique numéro 1059 au résidu 1625 et correspond à la replicase du plasmide ; le deuxième de 1710 à 2003, est le plus petit et le troisième de 2244 à 2672, correspond à la protéine de 16 kDa. Cependant, la distance entre le premier cadre et le deuxième est de 75 bases et la distance entre le second et le troisième cadre de lecture est de 224 bases, distances trop grandes pour permettre théoriquement une transcription polycistronique (1 à 40 bases) (Lewin, 1987)). La recherche d'une séquence promotrice ou d'une séquence de Shine-Dalgarno (Shine & Dalgarno, 1975) (union aux ribosomes) à l'intérieur de ces régions intercadres s'est avérée infructueuse. Ceci explique sans doute pourquoi les deux autres protéines ne se sont pas exprimées dans la souche No. 29.

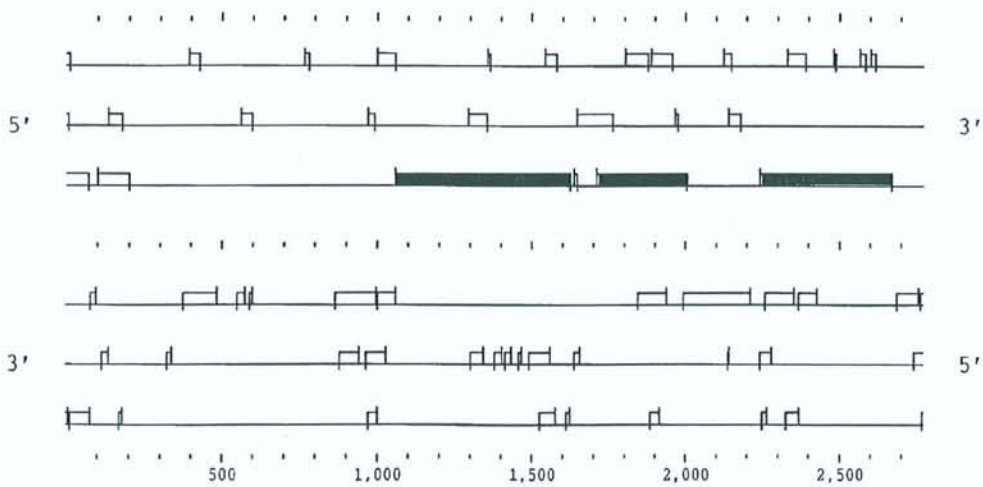


Figure 3. Schéma de l'analyse de la séquence du plasmide pST1 de *S. thermophilus* No. 29 pour retrouver les cadres ouverts de lecture

■ Cadres de lecture hypothétiques

3. Utilisation de la séquence nucléotidique pour établir un protocole d'hydrolyse de la protéine de 16 kDa.

Après l'identification complète de la séquence nucléotidique de la protéine hypothétique, nous avons fait la traduction de l'intégralité de cette séquence en utilisant l'outil *Translate* de GCG. La traduction correspond à une protéine de masse moléculaire de 16,4 kDa avec un pHi de 5,1 (Fig. 4). Une fois la séquence protéique établie, nous l'avons prise comme hypothèse de travail afin d'établir une stratégie d'hydrolyse enzymatique (Fig. 4), et de démontrer que la séquence putative était bien celle de notre protéine.

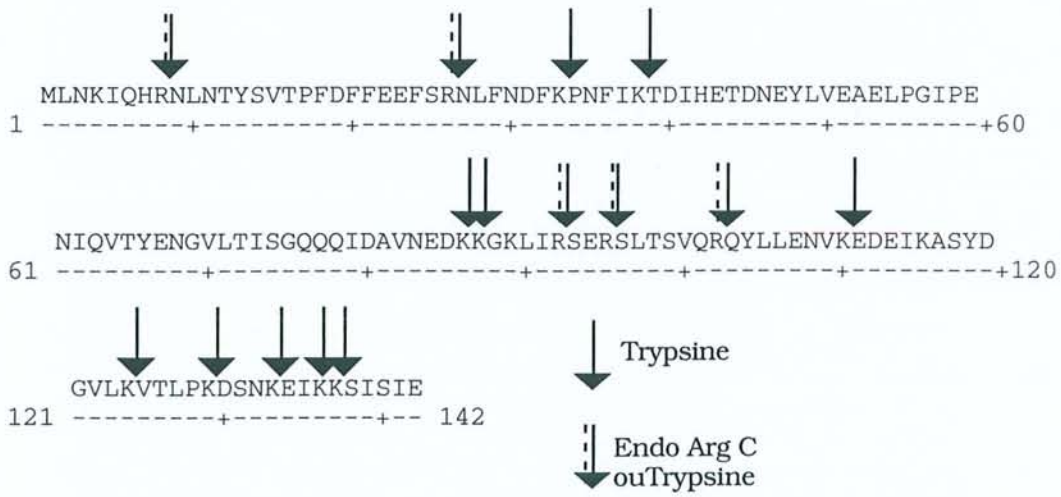


Figure 4. Séquence complète de la protéine hypothétique de 16,4 kDa de *S. thermophilus* et stratégie de coupure enzymatique avec la trypsine ou l'endoprotéase Arg-C.

3.1. Hydrolyse enzymatique de la protéine de 16 kDa

Les hydrolyses avec la trypsine et l'endoprotéase Arg-C ont été réalisées avec 1 mg de protéine purifiée incubée pendant 24 h à 37°C et une rapport enzyme/substrat égal au 1/100. Nous avons analysé les peptides issus de ces hydrolyses par spectrométrie de masse avec ionisation par électrospray, également avec une ionisation FAB qui fait éclater les peptides en différents fragments ionisés. Dans ce dernier cas, l'analyse permet d'identifier les acides aminés libérés qui composaient le peptide.

3.2. Hydrolyse trypsique

L'hydrolyse trypsique s'est réalisée presque complètement car nous pouvons observer que dans le profil chromatographique (Fig. 5 b), le pic correspondant à la protéine entière est très faible. L'hydrolyse a été réalisée à un degré de 89%.

3.3. Le cas de l'hydrolyse avec l'endoprotéase Arg-C

L'hydrolyse avec l'endo Arg-C a été partielle dans tous les essais que nous avons réalisés (Fig. 4). Dans le profil chromatographique, le pic correspondant à la protéine non hydrolysée correspond à 50% mais la quantité de peptides a néanmoins été suffisante pour réaliser les études de spectrométrie de masse.

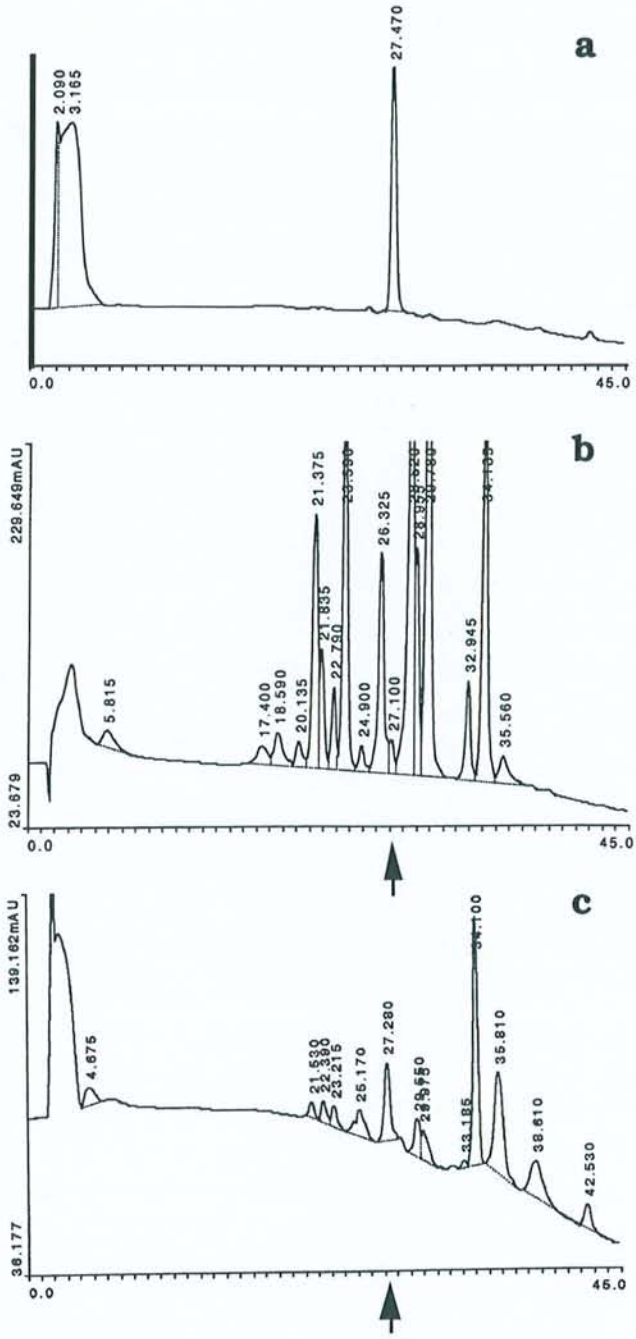


Figure 5. Profils chromatographiques en phase inverse (C_{18}) des peptides issus de l'hydrolyse de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* PB18.

a. Protéine non hydrolysée
b. Hydrolyse trypsique
c. Hydrolyse avec l'endoprotéase Arg-C
↑ . Protéine non hydrolysée

4. Détermination par spectrométrie de masse Électrospray et FAB et par dégradation d'Edman de la masse moléculaire des peptides issus des hydrolyses protéasiques

Les peptides issus des hydrolyses protéasiques sont séparés par chromatographie en phase inverse sur une colonne C_{18} couplée à un spectromètre de masse. Les fragments sont identifiés par leur masse moléculaire et en cas de doute une aliquote du même peptide a été analysée par FAB pour déterminer les acides aminés qui composaient ce peptide. Enfin, un peptide de la protéine a été séquencé par dégradation d'Edman.

Nous avons pu démontrer la présence de la quasi-totalité des peptides prédits par la théorie. Les peptides trypsiques numéros 4 (résidus 27-33) et 5 (résidus 34-38) de l'hydrolyse trypsique n'ont pas été retrouvés. Ceci indique une possible absence de coupure par la trypsine entre le résidu arginine 26 et le résidu asparagine 27 de la protéine. Par contre une hydrolyse non conventionnelle semble se produire entre le résidu asparagine 30 et le résidu leucine 31 et nous trouvons alors un peptide supplémentaire numéroté 4 bis (Tableau 1).

De l'hydrolyse avec l'endoprotéase Arg-C, nous avons pu retrouver seulement 4 des 6 peptides théoriques. Il manque donc les peptides 1 et 6. Des peptides d'hydrolyse partielle de la protéine ont été également retrouvés (Tableau 2).

Les fragments identifiés avec les différentes techniques utilisées sont rapportés dans la Figure 6. Nous observons fort heureusement un chevauchement des fragments identifiés à partir des différentes hydrolyses et techniques d'identification.

Tableau 1. Récapitulatif des résultats de la détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse des peptides issus de l'hydrolyse trypsique de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* PB18.

Fragment Hypothétique	Résidus d'acides aminés	Masse Moléculaire Théorique	Masse Moléculaire (S M)
1	1-4	504,6	505,3
2	5-8	552,6	553,4
3	9-26	2132,4	2213,3
4	27-33	897,0	N.D.
4 bis*	27-35	1108,2	1108,0
5	34-38	617,7	N.D.
4+5	27-38	1496,73	1495,9
6	39-59	2383,6	2383,5
7	60-86	3006,2	3005,5
8	87-87	146,2	N.D.
9	88-89	203,2	N.D.
10	90-92	400,5	401,4
11	93-95	390,4	391,3
12	96-102	789,9	790,4
13	103-110	1006,2	1005,8
14	111-115	632,7	634,0
15	116-124	939,0	938,8
16	125-129	556,7	557,5
17	130-133	462,5	N.D.
18	134-136	388,5	389,4
19	137-137	146,2	N.D.
20	138-142	547,6	548,4

N. D. : non détecté

▨ : A priori difficile à détecter car les appareils sont calibrés pour des masses moléculaires plus grandes

* : peptide supplémentaire

Tableau 2. Récapitulatif des résultats de la détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse des peptides issus de l'hydrolyse avec l'enzyme Endo-Arg-C de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* PB18.

Fragment Hypothétique	Résidus d'acides aminés	Masse Moléculaire Théorique	Masse Moléculaire SM
1	1-8	1039,4	ND
2	9-26	2213,4	2214,5
3	27-92	7546,4	7546,0
4	93-95	390,4	391,5
5	96-102	789,9	790,2
6	103-142	4553,2	ND
2-6*	9-142	132279,9	13223,6
3-6*	27-142	15493,3	15493,3
Total	1-142	16532,7	16446,0

ND : non détecté

* : peptide d'hydrolyse partielle

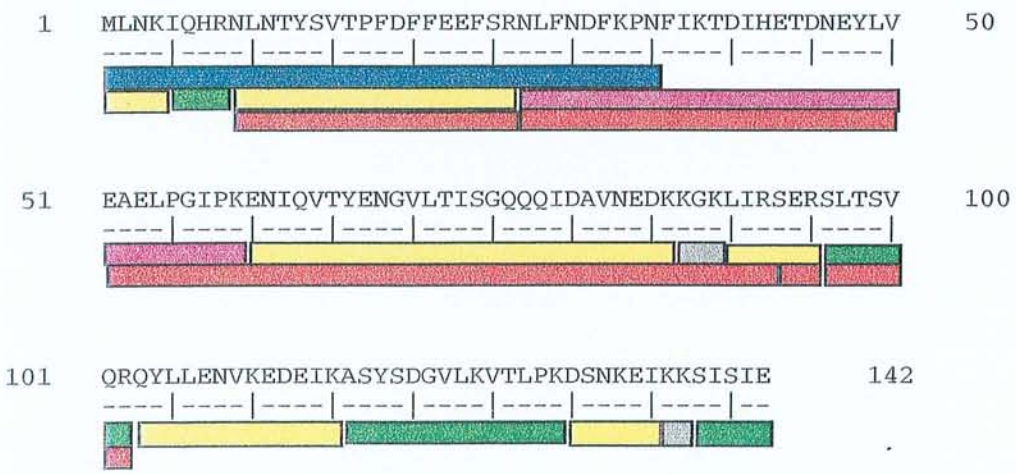


Figure 6. Récapitulatif de l'identification des peptides de l'hydrolyse de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* PB18 avec la trypsine et l'endoprotéase Arg-C.

- Séquençage par dégradation d'Edman du coté N-terminal
- Mesure de la masse par SM après hydrolyse trypsique
- Identification des acides aminés par FAB-SM
- Séquençage par dégradation d'Edman
- Mesure de la masse par SM après hydrolyse par l'Endo Arg-C
- Non identifié

5. Étude assistée par ordinateur de la séquence de la protéine de 16 kDa purifiée de S. *thermophilus* PB18

5.1 Analyse approfondie des homologies de séquence de la protéine de 16 kDa de S. *thermophilus*

La première étape dans l'analyse d'une nouvelle séquence est de réaliser une comparaison avec les banques de données afin de trouver des séquences homologues. Les recherches sont aujourd'hui accomplies à l'aide d'ordinateurs branchés sur le réseau Internet par connexion à différents serveurs situés dans diverses parties du monde (Voir liste dans Matériel et Méthodes § 7).

Il existe différentes méthodes de recherche d'homologie de séquences. Étant donné que le temps de recherche a fortement diminué (seulement quelque secondes dans certains cas), il est possible maintenant d'utiliser toutes les banques de séquences à notre disposition et plusieurs méthodes de recherche afin de pouvoir comparer les différents résultats et trouver le maximum d'homologues.

Les méthodes de recherche les plus utilisées sont :

- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990), très rapide mais qui ne supporte pas de "gaps", c'est à dire, de discontinuités dans la séquence ;
- FastA (Pearson & Lipman, 1988) : permet des "gaps", et aussi elle est plus sensible et lente ;
- Smith-Waterman (1981) : beaucoup plus lente mais beaucoup plus efficace car cette méthode permet de trouver des homologies éloignées.

Nous avons fait les trois types de recherches et les résultats montrent que les protéines qui présentent une homologie de séquence avec la protéine de 16 kDa sont principalement identifiées comme de petites protéines de choc thermique soit d'origine microbienne (*C. acetobutylicum* et de *L. delbrueckii*) soit d'origine végétale (Tableau 3).

5.2. Recherche de domaines d'homologie de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus*

La deuxième étape dans l'analyse de séquences est la recherche de motifs et de domaines. Un motif est une séquence fortement conservée parmi un groupe de séquences homologues. Un domaine est une chaîne polypeptidique comprise entre 50 et 350 résidus d'acide aminés qui combine des hélices α et des feuillets β groupés pour former une unité compacte. Les protéines de petite taille n'ont souvent qu'un seul domaine, tandis que les grosses protéines peuvent en posséder plusieurs, connectés par des régions polypeptidiques qui n'ont pas de structure secondaire rigide.

La recherche de motifs a été réalisée par les logiciels Blockmaker et MEME (*Motif discovery tool*) (McGowan *et al.*, 1994) et celle des domaines par les logiciels ProDom et PrositeScan (http://ulrec3.unil.ch/).

L'utilisation de Blockmaker et de MEME impose le choix d'un nombre limité de séquences où le logiciel peut retrouver les motifs consensuels. Nous avons donc choisi 10 séquences parmi les séquences du Tableau 3.

ProDom et Prosite utilisent une séquence cible pour la comparer avec des domaines déjà répertoriés dans ses bases de données.

Tableau 3. Récapitulatif des résultats de la recherche de séquences homologues à la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* PB18 par TBLASTN, TFastA et SSearch.

Numéro d'accession	Caractéristiques
gb|S67974|S67974	RepS = protéine de réplication du plasmide pST1 de *S. thermophilus*
emb|X65276|CAHSP18A	*C. acetobutylicum* :gène codant pour une protéine de choc thermique Hsp18
emb|Z71782|LDPEPGW	*L. delbrueckii* : gène codant pour une protéine de choc thermique
gb|U55047|BJU55047	*Bradyrhizobium japonicum* : petite protéine de choc thermique HspA
emb|X16076|ATHSP176	*Arabidopsis thaliana* : mRNA codant pour la Hsp17.6
gb|U66300|LEU66300	*Lycopersicon esculentum* : mRNA codant pour la Hsp21
dbj|D32070|ASNG034ARA	*Aspergillus nidulans* : mRNA codant pour la Hsp30
emb|X92984|PMLMWHSPB	*Pseudotsuga menziesii* : mRNA codant pour une petite Hsp
emb|X92983|PMLMWHSPA	*P.menziesii* : mRNA codant pour une petite Hsp
emb|X56138|LEHSPIR	*L. esculentum* : mRNA codant pour une petite Hsp classe I
emb|X15053|CRHSP22K	*Chlamydomonas reinhardtii* : 22kDa Hsp
emb|X54102|ATHSP21	*A.thaliana* : mRNA codant pour la Hsp21
gb|M80186|RICLMWHSP	*Oryza sativa* : mRNA codant pour la Hsp de basse masse molaire
gb|M94455|ATHHSP21A	*A. thaliana* : Hsp 21.
emb|Z48750|TGBAG1GN	*Toxoplasma gondii* : Hsp30
gb|L47717|PIAEMB27R	*Picea glauca* : mRNA codant pour la Hsp17
emb|X86222|PSRNAHSP	*Pisum sativum* : mRNA codant pour la Hsp22
gb|L12237|MSG8318K	*Mycobacterium avium* : mRNA codant pour une protéine de 18kDa
gb|U83669|OSU83669	*O. sativa* : petite Hsp17,3
emb|X54103|PHHSP21	*P.hybrida* mRNA codant pour la Hsp21
dbj|D12635|RICYLMWHSP	Riz : mRNA codant pour une petite Hsp
emb|X82213|TGBAG1	*T.gondii* : mRNA codant pour BAG-1
emb|X59701|HA176HSP	*Helianthus annuus* : mRNA codant pour une Hsp
emb|X64618|TAHSP169B	*Triticum aestivum* : mRNA codant pour une Hsp de 16,9 (gène b)
gb|U81385|OSU81385	*O. sativa* : Hsp 16,9 (gène C)
emb|X60820|OSLMWHSP	*O.sativa* : mRNA codant pour une Hsp16.9
emb|X58710|MSHSP181	*Medicago sativa* : mRNA codant pour une Hsp de 18,1 kDa
emb|X17293|ATHSP174	*Arabidopsis* : gène Hsp17.4
gb|L47741|PIAEMB22R	*Picea glauca* : Hsp23,5 mitochondriale
gb|M33899|PEAHSP181A	*Pisum sativum* : mRNA pour une Hsp18
emb|X58711|MSHSP182	*M.sativa* : mRNA codant pour une Hsp18
emb|Y07844|HV17HSP	*Hordeum vulgare* : mRNA codant pour une Hsp17 de classe I
gb|L12236|MSG12418K	*M. avium* : mRNA codant pour une Hsp18
emb|X65725|ZMHSP172	*Z.mays* : mRNA codant pour une Hsp de 17,2 kDa
emb|X01104|GMHSP2	*Glycine max* : gène hs6871 de choc thermique
gb|U21722|GMU21722	*G. max* : Hsp 23,9
emb|X94191|PGHSP170	*Pennisetum glaucum* : mRNA codant pour une Hsp17,0

Les séquences ont été ordonées d'après leur degré d'homologie avec la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus*

5.2.1. Localisation des motifs avec un haut degré d'homologie de séquence en utilisant le logiciel Blockmaker

Blockmaker utilise le système *Protomat* (Bender *et al.*, 1986) pour créer une base de données à partir des séquences individuelles. Cette base de blocs a été déposée dans le catalogue de Prosite et indexée avec la banque de séquences de protéines Swiss-Prot (Thunell, 1988). Le système est basé sur la localisation du meilleur groupe de blocs réalisée en deux étapes. La première étape consiste à retrouver des candidats aux alignements et la seconde étape prolonge les alignements. Il les présente alors de telle sorte que le meilleur groupe soit choisi. *Protomat* est la suite du logiciel *Motifs* (Gauthier & Clément, 1994) auquel on a ajouté la stratégie d'échantillonnage de Gibbs (Raja *et al.*, 1991). Ceci permet une recherche plus rapide et écarte moins de séquences que le logiciel *Motifs* mais si les séquences sont prises au hasard, il trouvera des blocs quand même.

Avec *Motifs*, nous avons trouvé deux blocs de séquences (Fig. 7 a). Le premier comprend 40 résidus d'acides aminés et commence entre les résidus 39 et 53, sauf pour *L. delbrueckii* pour qui la séquence est amputée du côté N-terminal d'une vingtaine de résidus. Le deuxième comprend 37 résidus et commence entre les résidus 93 et 106, sauf pour *L. delbrueckii* qui commence au résidu 73. Il faut noter que le logiciel a exclu une séquence correspondant à *B. japonicum* car il considère qu'elle ne présente pas le même motif. Les résultats changent si on utilise la méthode d'échantillonnage de Gibbs. Avec cette méthode, nous pouvons identifier seulement un bloc d'homologie, qui correspond au deuxième bloc de la méthode antérieure et la séquence de l'espèce *B. japonicum* est incluse dans l'alignement (Fig. 7 b).

Bloc 1

Bloc 2

***Figure 7* a**. Blocs de séquences homologues trouvés par *Protomat* utilisant uniquement le logiciel *Motifs*.

Bloc unique

***Figure 7* b**. Blocs de séquences homologues trouvés par *Protomat* utilisant l'échantillonnage de Gibbs.

5.2.2. Localisation des motifs avec un haut degré d'homologie de séquence utilisant le logiciel MEME

MEME est un outil qui permet de découvrir des motifs homologues dans un groupe de séquences proches d'ADN ou de protéine. Un motif, est un fragment de séquence qui apparaît souvent dans un groupe de séquences apparentées d'ADN ou de protéine. MEME représente les motifs comme des matrices de probabilité de lettres et qui sont dépendantes de leur position. Ceci décrit la probabilité de chaque lettre possible dans chaque position de l'arrangement. Les séquences qui contiennent des interruptions sont coupées par MEME pour former deux motifs ou plus différents.

Nous pouvons remarquer que MEME retrouve un premier motif de 9 résidus (Fig. 8), qui débute entre les résidus 102 et 135 de toutes les séquences sauf chez *B. japonicum* où il débute au résidu 69, ce même motif se trouve répété chez *S. thermophilus* et démarre également au résidu 69. Un deuxième motif de 20 résidus se trouve exclusivement chez les végétaux. Ce motif débute entre les résidus 99 et 103. Le dernier motif retrouvé par MEME existe chez toutes les espèces sauf *B. japonicum*. Celui-ci correspond à une longueur de 18 résidus et débute du résidu 21 au 53. Nous pouvons remarquer que la partie N-terminale de cette séquence chez *L. delbrueckii* semble être délétée.

Séquence consensus 1 **GVLTVTVPK**
L

Séquence nom	Début	Site		
S. thermophilus	69	KENIQVTYEN	**GVLTISGQQ**	QIDAVNEDKK
S. thermophilus	121	EDEIKASYSD	**GVLKVTLPK**	DSNKEIKKSI
C. acetobutylicum	129	DSKIDASFLD	**GVLRITLPK**	KVKGKDNGRR
L. delbrueckii	102	KKGISAKLDG	**GVLTVTLPK**	VAPEENADTI
B. japonicum	69	PDEITVTAEQ	**SVLTIEGRK**	GEKGRRDFVY
A. thaliana	134	MEEIKASMEN	**GVLSVTVPK**	VPEKKPEVKS
L. esculentum	131	MDQVKASMEN	**GVLTVTVPK**	EEVKKPEVKS
O. sativa	131	PEQIKASMEN	**GVLTVTVPK**	EEPKKPDVKS
P. sativum	135	MDKVKASMEN	**GVLTVTVPK**	EEIKKAEVKS
Z. mays	129	VDKVAAVCRD	**GVLTVTVEK**	LPPPEPKKPK
G. max	130	VDQVKASMEN	**GVLTVTVPK**	EEIKKPDVKA
D. carota	134	VDEVKAAMAN	**GVVTVTVPK**	VEIKKPEVKA

Séquence consensus 2 **WHRVERSSGKFLRRFRLPEN**

Séquence nom	Début	Site		
A. thaliana	102	SNENEEKNDK	**WHRVERSSGKFTRRFRLPEN**	AKMEEIKAS
L. esculentum	99	NVEKEDKNDK	**WHRMERSSGKFMRRFRLPEN**	AKMDQVKAS
O. sativa	99	IKEQEEKTDK	**WHRVERSSGKFLRRFRLPEN**	TKPEQIKAS
P. sativum	103	SVEKEDKNDE	**WHRVERSSGKFLRRFRLPEN**	AKMDKVKAS
Z. mays	97	RRREEREDAK	**YLRMERRMGKFMRKFVLPDN**	ADVDKVAAV
G. max	98	NVEKEDKNDT	**WHRVERSSGKLVRRFRLPEN**	AKVDQVKAS
D. carota	102	NKEKEEKNDK	**WHRVERSSGKFLRRFRLPEN**	AKVDEVKAA

Séquence consensus 3 **DWKETPEAHVFKADLPGL**

Séquence nom	Début	Site		
S. thermophilus	40	NDFKPNFIKT	**DIHETDNEYLVEAELPGI**	PKENIQVTYE
C. acetobutylicum	48	TFNGNAGFKV	**DIKEDDDKYTVAADLPGV**	KKDNIELQYE
L. delbrueckii	21	SHAFRNILQS	**DVAEDEHEYTVKIDVPGM**	SKDDIHLSYT
A. thaliana	53	DVAAFTNAKV	**DWRETPEAHVFKADLPGL**	RKEEVKVEVE
L. esculentum	50	ESSAFANTRI	**DWKETPEPHVFKVDLPGL**	KKEEVKVEVE
O. sativa	50	DAAAFAGARI	**DWKETPEAHVFKADVPGL**	KKEEVKVEVE
P. sativum	54	ENPAFVSTRV	**DWKETPEAHVFKADLPGL**	KKEEVKVEVE
Z. mays	49	DARAMAATPA	**DVKELAGAYAFVVDMPGL**	STGDIRVQVE
G. max	49	ENSAFVSTRV	**DWKETPEAHVFKADIPGL**	KKEEVKLEIQ
D. carota	53	ETAAFVNTHI	**DWKETPQAHVFKADLPGL**	KKEEVKVELE

Figure 8. Blocs consensuels dans la séquence des petites Hsp d'après le logiciel MEME (Bayley & Elkan, 1994) http://kiwi.imgen.bcm.tmc.edu:8088/search-launcher/launcher.html

5.2.3. Localisation des domaines avec le logiciel ProDom

La base de données ProDom consiste en une compilation automatique de domaines protéiques homologues décelés dans la banque de séquences de protéines de Swiss-Prot (Bairoch & Boeckamnn, 1991). Ceci est réalisé à l'aide de l'algorithme Domainer (Sonnhammer & Kahn, 1994). La base a été développée pour l'aide à l'analyse de l'arrangement des domaines des protéines (Gouzy *et al.*, 1996).

Nous constatons que la partie C-terminale de la séquence de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* est homologue au domaine 291 de la base de données de ProDom. Ce domaine est fondamentalement présent chez les Hsp de classe I (Fig. 9). Pour le moment ce domaine compte 47 représentantes parmi lesquelles nous identifions des protéines de 12 kDa de masse moléculaire chez : les mycobactéries, *Arabidopsis*, la carotte, le soja, le blé ; des protéines de 20 kDa chez : *C. acetobutylicum*, le maïs et la levure et également d'autres protéines de 30 et 40 kDa. Dans la figure 10, nous pouvons observer une représentation graphique du domaine 291. Nous constatons que dans certaines protéines le domaine 291 est le seul présent, par contre, un certain nombre de protéines présentent un ou deux domaines supplémentaires. La protéine de 16 kDa possède seulement le domaine 291.

5.2.4. Localisation des domaines avec le logiciel Prosite

Cette recherche nous indique que la séquence de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* présente le domaine des protéines Hsp20 qui

compte à présent 85 représentants. Ce domaine est caractéristique des petites protéines qui sont produites en réponse à un choc thermique. Cette famille, avec une masse moléculaire moyenne de 20 kDa, est dénommée Hsp20. L'ensemble de ces protéines semblent avoir un rôle de chaperon moléculaire qui peut protéger les autres protéines de la dénaturation et de l'agrégation. Les Hsp20 semblent former de grands agrégats hétéro-oligomériques. La famille est actuellement composée des membres suivants :

- Protéines de choc thermique des vertébrés de type Hsp27 ou Hsp25, en réponse à plusieurs stress ;
- protéines de choc thermique de *Drosophila* Hsp22, Hsp23, Hsp26, Hsp27, Hsp67BA et BC ;
- protéines de choc thermique Hsp26 chez la levure de panification et *Neurospora crassa* ;
- petites protéines de choc thermique chez les plantes, Classe I et Classe II qui sont cytoplasmiques, de Classe III du chloroplaste et Classe IV qui se trouve dans les endomembranes ;
- chaînes A et B de l'alpha-cristallin présente dans l'oeil ;
- l'antigène p40 qui est l'antigène principal de *Schistosoma mansoni* . Il est constitué de deux domaines de Hsp20 ;
- plusieurs protéines procaryotiques comme IbpA et IbpB chez *E. coli*, Hsp18 chez *C. acetobutylicum*, HspA chez *Stigmatisa*, et les antigènes de 18 kDa et de 14 kDa chez *M. leprae* et *M. tuberculosis*, respectivement.

Cette famille se caractérise par la présence d'un domaine C-terminal d'environ 100 résidus. Le profil développé pour détecter les membres de la famille Hsp20 a été basé sur son alignement.

Figure 9. Séquences qui présentent le domaine 291 de ProDom. Toutes les protéines sont des Hsp de masse moléculaire faible

Figure 10. Protéines répertoriées qui présentent le domaine 291 dans la base de séquences de ProDom

Domaine 291

Autres domaines

—— Séquences sans domaine reconnu

5.3. Prédiction de la structure secondaire

Les premières méthodes de prédiction de structure secondaire ont été développées à partir de l'analyse d'une seule séquence de protéine. Les plus célèbres de ces méthodes sont celles de Chou et Fasman (1974), Garnier, *et al.*, (1978) (GOR) et Lim.(1978). À présent, les taux de réussite sont seulement de 56 à 60% (Kabsch et Sanders, 1984). De nouvelles méthodes qui utilisent la prédiction groupée d'une famille de séquences améliore la prédiction. Nous avons fait 7 prédictions de structure secondaire, 2 qui utilisent l'analyse d'une seule séquence (Chou et Fasman et GOR) et 5 autres que utilisent une analyse groupée. De plus, nous avons utilisé une méthode d'identification des "clusters" hydrophobes (HCA) (Woodcock *et al.*, 1992). Cette méthode, nous permet de localiser des groupes de résidus d'acides aminés hydrophobes qui peuvent être répartis en hélices α.

5.3.1. Alignement des séquences

Nous avons choisi neuf séquences de la famille des petites protéines de choc thermique (Tableau 6) pour les aligner avec la Hsp 16 de *S. thermophilus*. Les techniques utilisées pour les alignements étaient Pileup de GCG (Higgins & Sharp, 1989), Multisequence alignement (MSA) (Lipman *et al.*, 1989), Multialin (Corpet, 1988) , Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) et PIMA (Smith & Smith, 1992) (Fig. 11). Bien qu'elle soit proche de la séquence de *S. thermophilus*, la

a

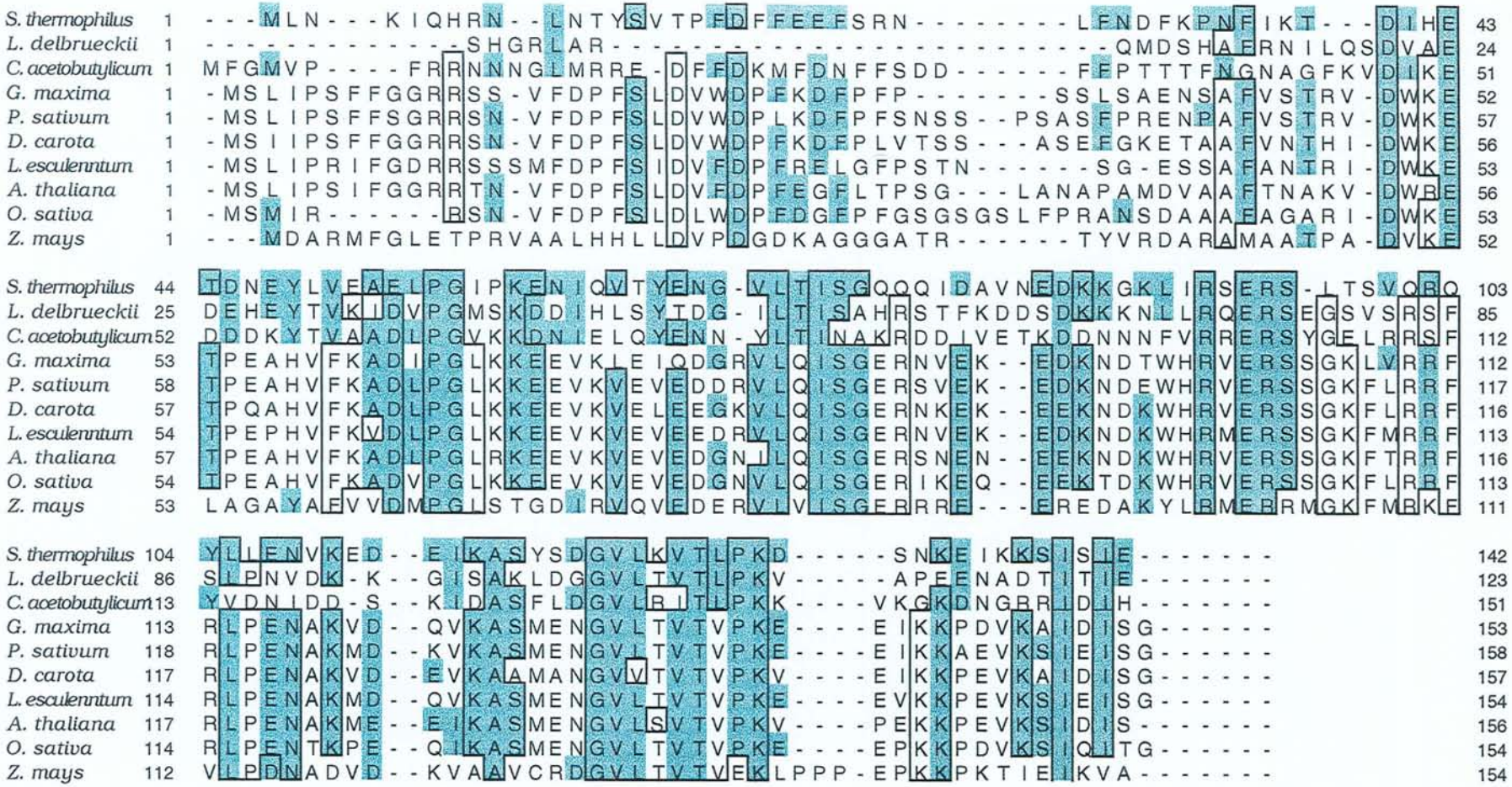


Figure 11. Alignements de séquence des petites protéines de choc thermique de classe I homologues à la protéine de 16 kDa de *Sc. thermophilus* PB18.
a : Clustal W ; b : MAP-MSA ; c : Multialin ; d : Pileup ; e : PIMA

Figure 11. (suite)
a : Clustal W ; b : MAP-MSA ; c : Multialin ; d : Pileup ; e : PIMA

c

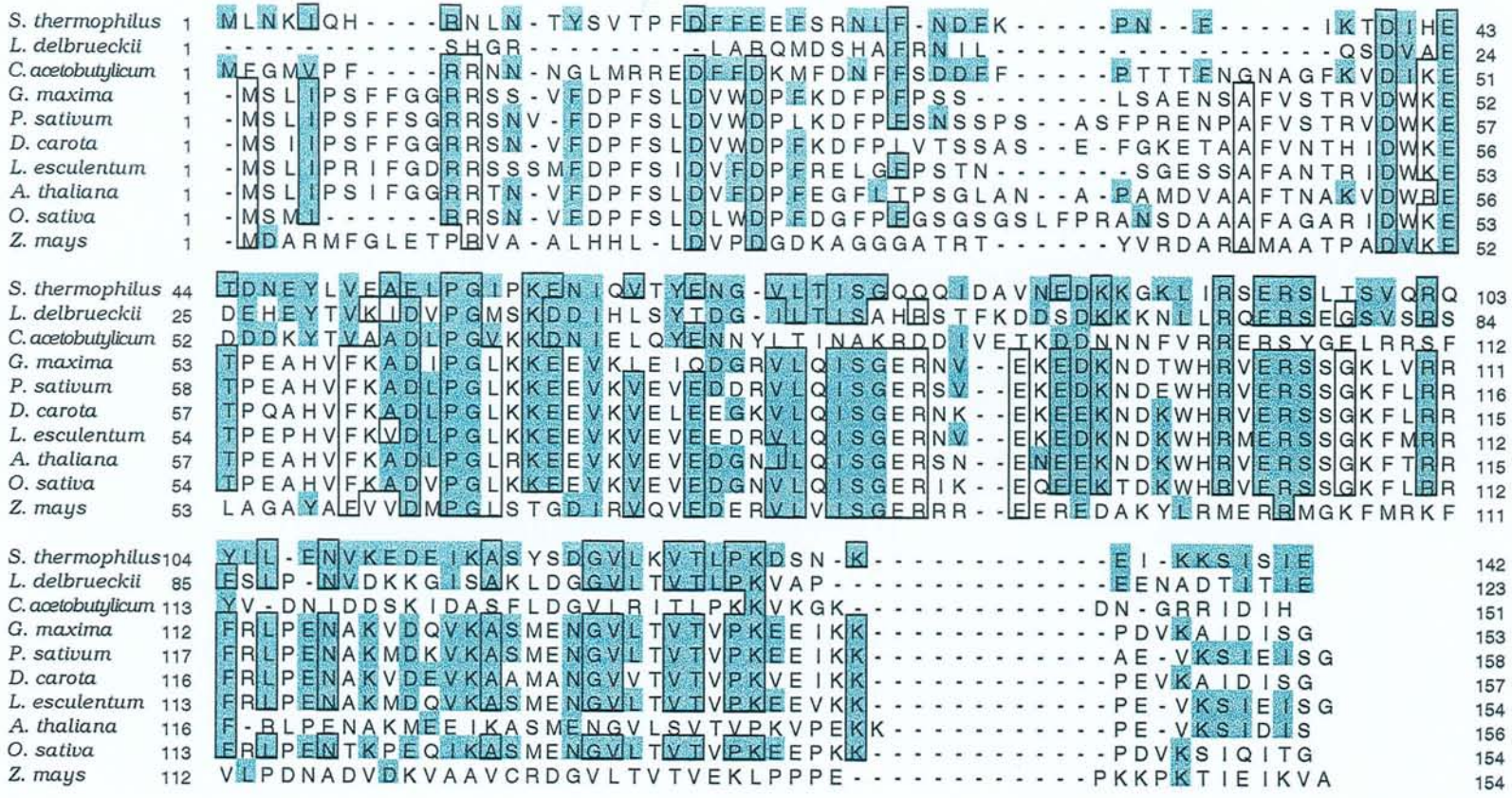


Figure 11. (suite)
a : Clustal W ; b : MAP-MSA ; c : Multialin ; d : Pileup ; e : PIMA

d

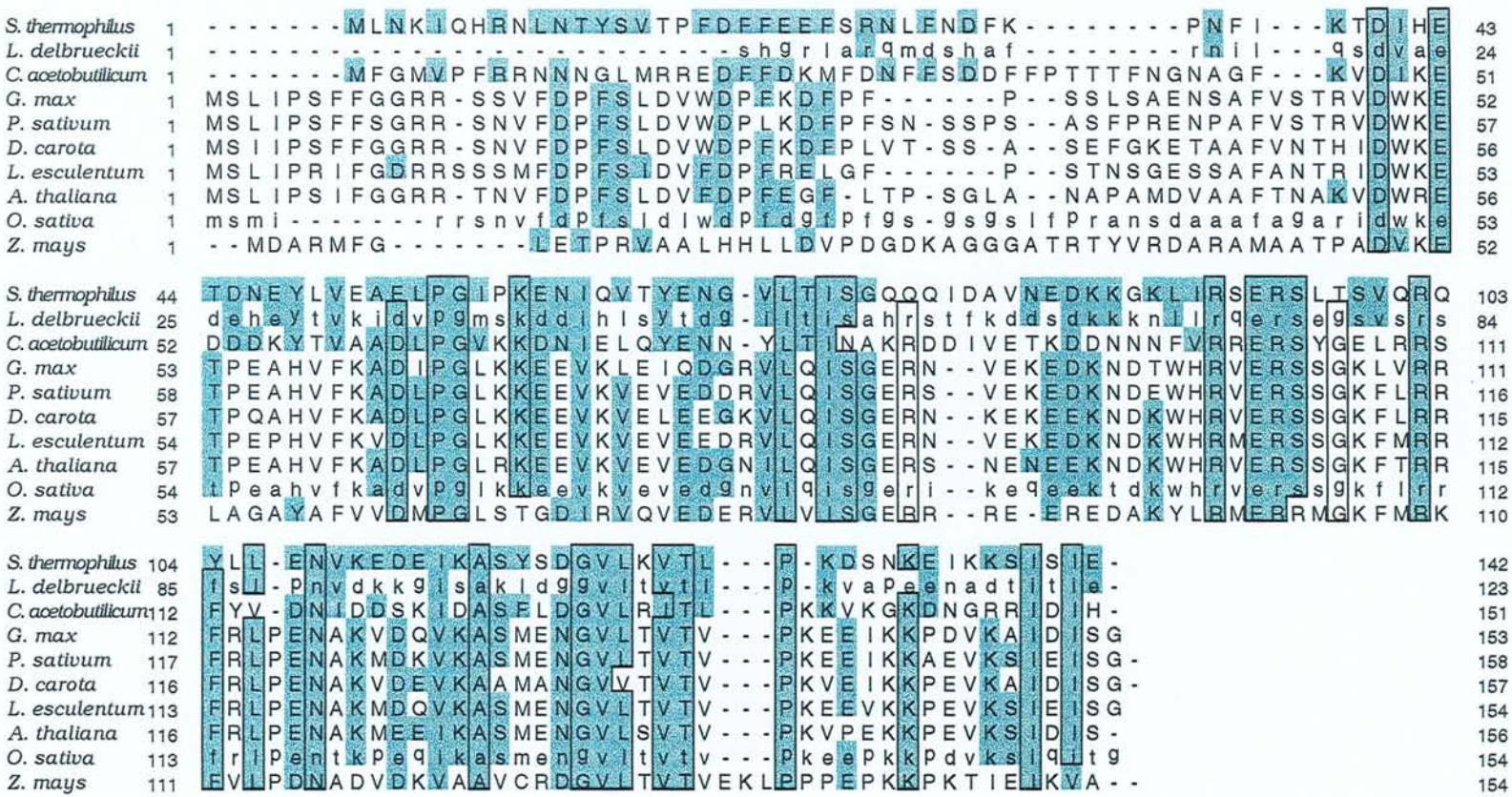


Figure 11. (suite)
a : Clustal W ; b : MAP-MSA ; c : Multialin ; d : Pileup ; e : PIMA

e

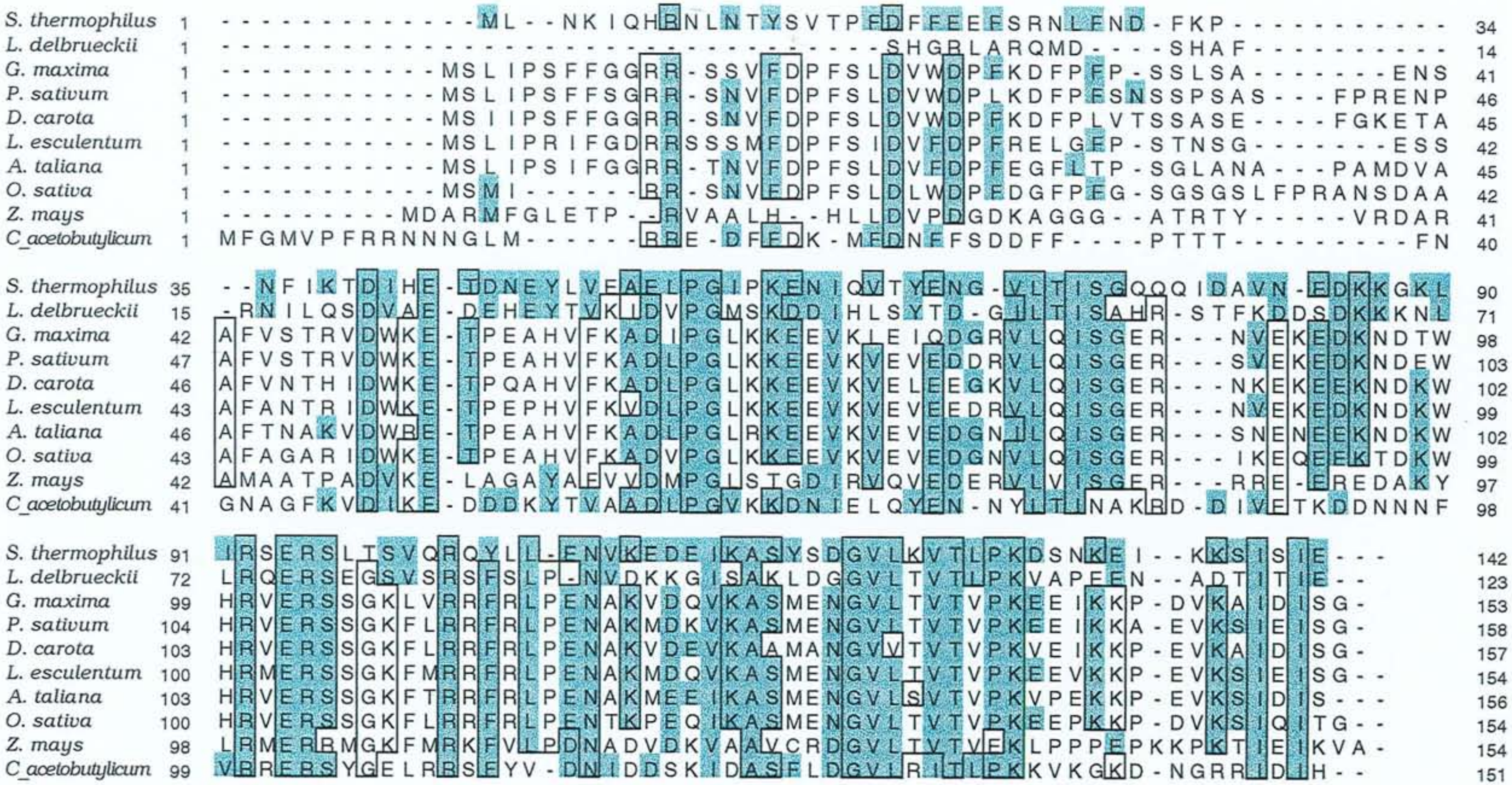


Figure 11. Continuation
a : Clustal W ; b : MAP-MSA ; c : Multialin ; d : Pileup ; e : PIMA

HspA de B. *japonicum* modifie trop l'alignement de la protéine dans les résultats de recherche d'homologie (Tableau 5) ; pour cette raison, nous l'avons éliminée de l'analyse. Dans les alignements finaux, nous constatons qu'il y a une grande variabilité du côté N-terminal des protéines. Dans tous les alignements, les différentes méthodes imposent des gaps importants. Chez les végétaux, la séquence N-terminale :

1 MSLIPSFFSGRRSN-VFDPFSLDVXDVF **28**

est très bien conservée mais elle n'est présente ni chez les bactéries, ni chez le maïs. Proche du résidu numéro 50, nous trouvons la séquence :

~50 FKADLPGLKKEEVKVXVEDXXVLQISGER
V V I L Y

Celle-ci est très bien conservée, surtout les résidus proline - glycine qui sont conservés dans toutes les séquences et les résidus isoleucine - sérine - glycine qui ont un fort taux de conservation. Plus loin les triplets glutamate - arginine - sérine et glycine - valine - leucine sont conservés dans tous les alignements.

Après l'analyse des alignements, nous avons réalisé des modifications mineures et nous avons postulé un alignement qui regroupe principalement la partie N-terminale de l'alignement réalisé par la méthode Multialin. Étant donné que la partie C-terminale est assez similaire dans toutes les méthodes, nous avons pu obtenir un consensus qui est donné dans la figure 12.

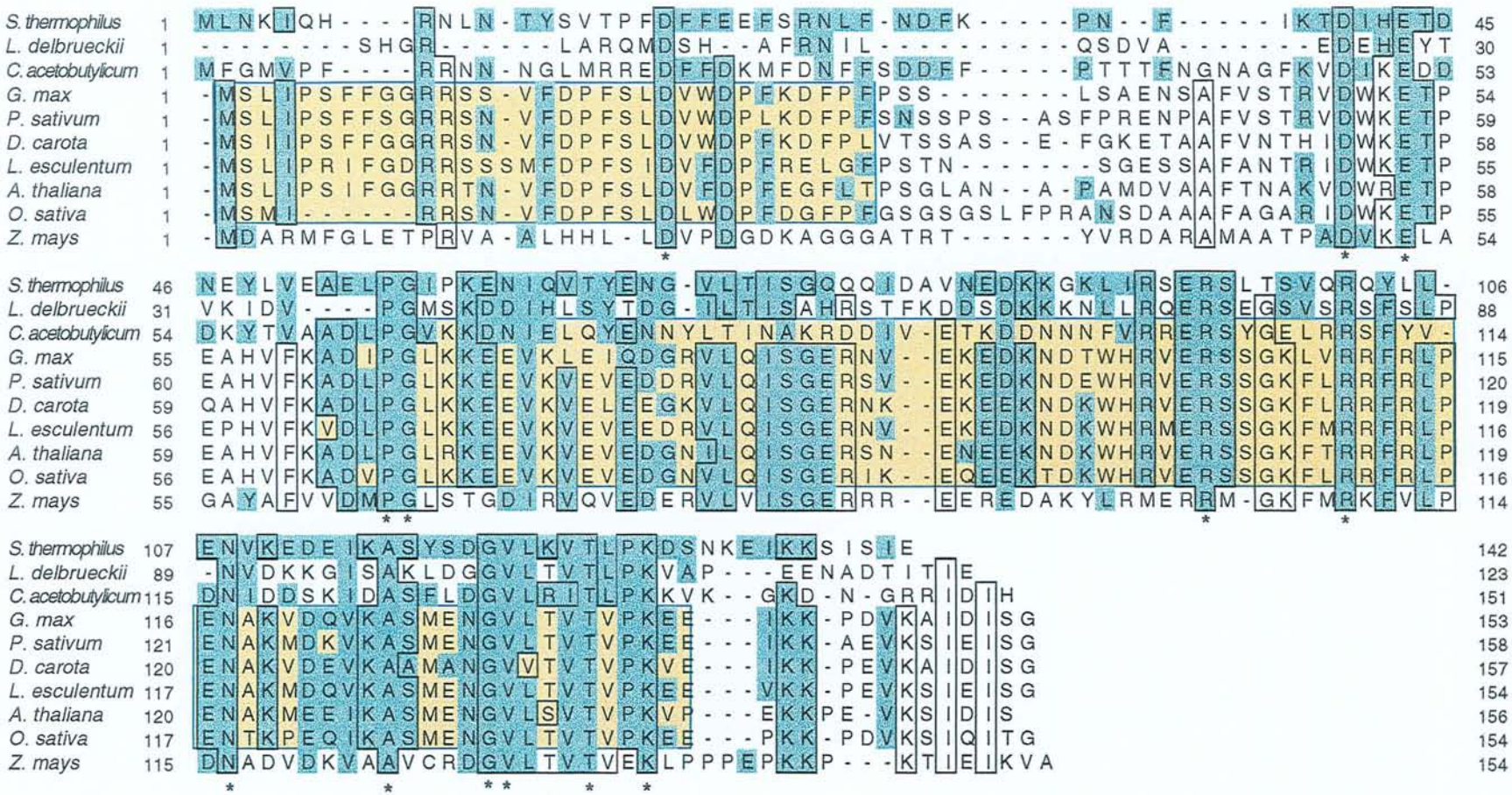


Figure 12. Alignement optimisé des séquences des petites Hsp homologues de la Hsp16 de *S. thermophilus*.
Encadrements: régions homologues

* : Résidu totalement conservé

: Homologie avec la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus*

: Homologie entre les petites Hsp de végétaux

5.3.2. Prédiction de structure secondaire par analyse d'un groupe de séquences alignées

Les méthodes plus récentes de prédiction de structure secondaire les plus fiables, utilisent un alignement de séquences rattachées pour prédire les régions où se trouvent les arrangements secondaires. Nous avons utilisé deux méthodes de prédiction uni-séquence (GOR et CF), 4 méthodes utilisant l'alignement consensus de la figure 12 (Gibrat, Levin DPM et SOPMA) et une dernière méthode qui utilise la prédiction de structure par la technique des réseaux neuronaux (neural networks).

A partir de ces prédictions, nous avons fait un consensus en prenant 4 prédictions minimales pour chaque résidu.

Nous constatons que dans la partie N-terminale il y a 3 petites régions qui peuvent prendre la conformation d'hélice α. Ses portions débutent dans le résidu 1, 20 et 45 (Fig 13). Dans la partie C-terminale, nous observons deux régions qui présentent une conformation probable d'hélice α dans la région 77-88 et la plus grande entre les résidus 99-116.

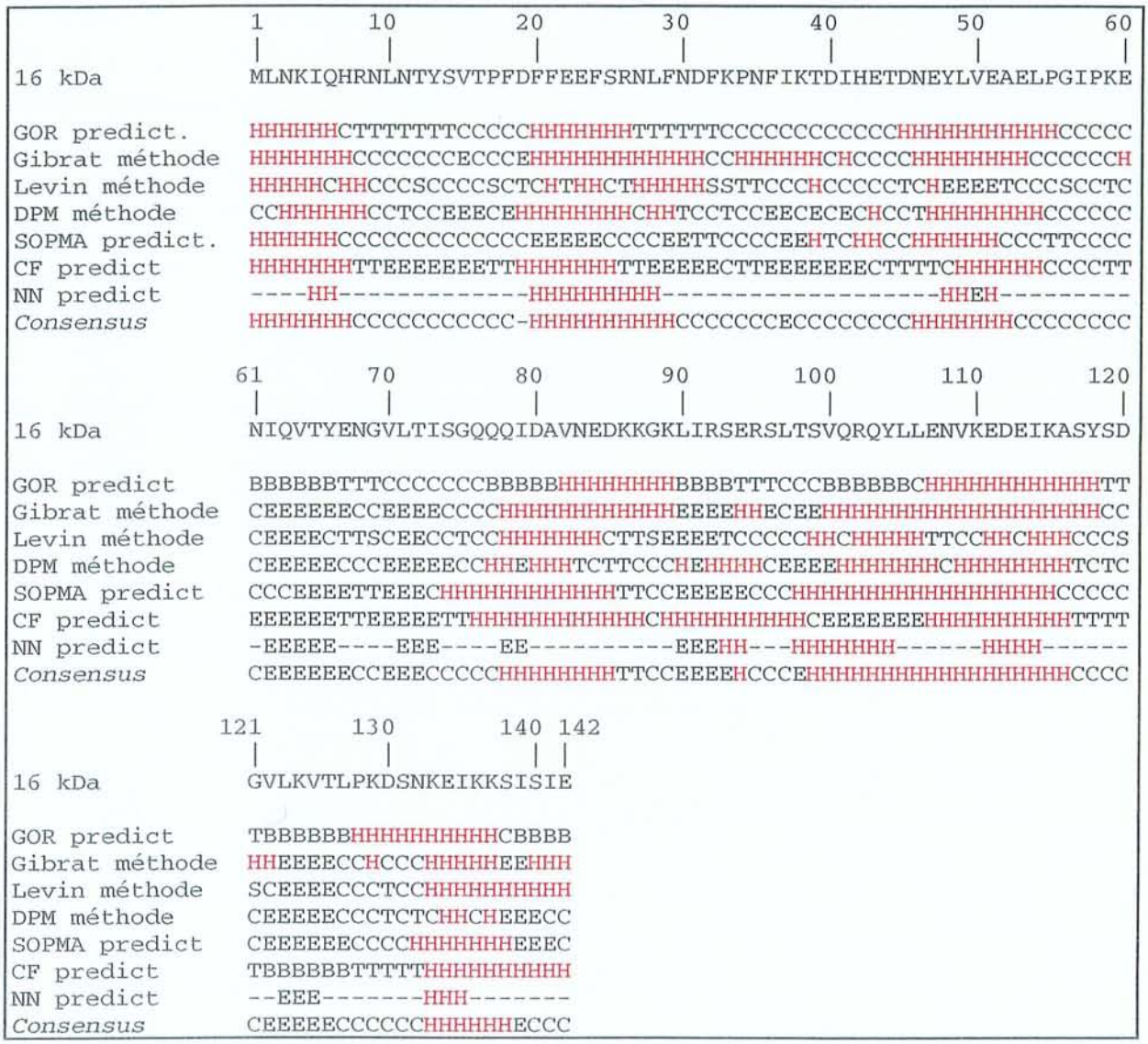


Figure 13. Prédiction de la structure secondaire de la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* PB 18

H : Hélice α
E : Feuillet β
C : "random coil"

5.3.3. Analyse de la séquence de Hsp20 avec la méthode "Hydrophobic Cluster Analysis" (HCA)

La méthode HCA dérive de la méthode décrite par Lim ; elle a été réalisée par le groupe de Mornon (Lemesle-Varloot *et al.*, 1990; Woodcock *et al.*, 1992). En détectant les acides aminés hydrophobes et hydrophiles sur une séquence enroulée en hélice, puis aplanie, les motifs que forment ces acides aminés sont caractéristiques des structures secondaires adoptées par ces acides aminés (Fig. 14). A partir d'une banque de structures, ils ont construit une banque de motifs hydrophobes. Le feuillet β ne peut pas être analysé à partir de ce type d'analyse. La répétition de ces amas hydrophobes donne d'autre part une idée précise de la segmentation de la protéine et peut servir de base aux alignements. Ainsi, il est possible de détecter des similarités de structures pour des séquences ayant des pourcentages d'identité inférieurs à 25 %. L'analyse informatique des séquences par HCA est depuis peu, disponible sur Internet par l'intermédiaire du serveur du Laboratoire de Minéralogie - Cristallographie de Paris à Jussieu (http://www.lmcp.jussieu.fr/~soyer/www-hca/hca-form.html).

La figure 14 montre l'étude par la méthode HCA des Hsp 20 de 11 espèces bactériennes homologues à la protéine décrite dans ce travail. Nous observons la présence de groupes d'amas hydrophobes tout au long de la protéine, ces amas sont conservés dans les différentes protéines, y compris pour la protéine de *B. japonicum* qui avait été rejetée par les autres systèmes d'alignement.

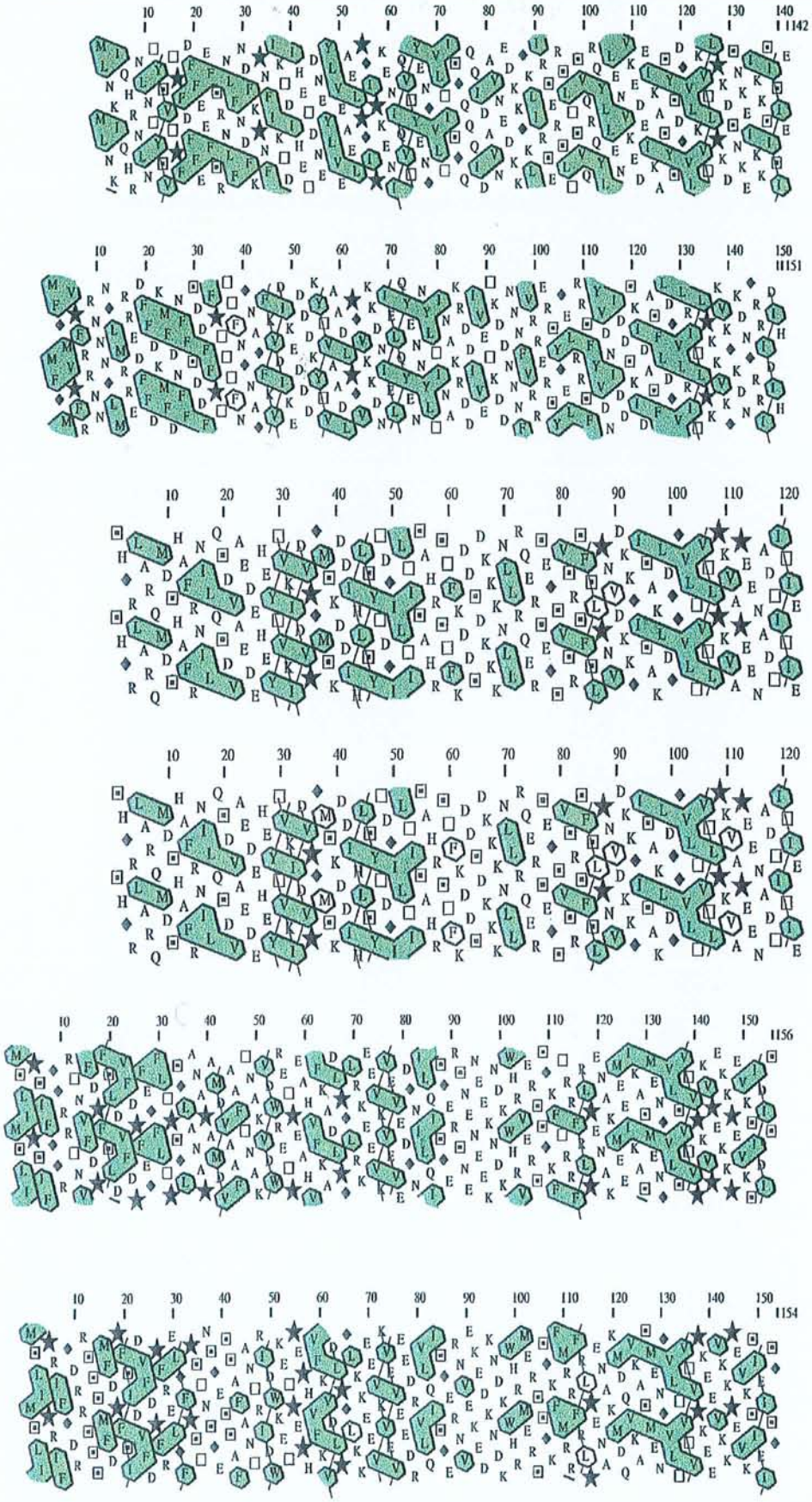
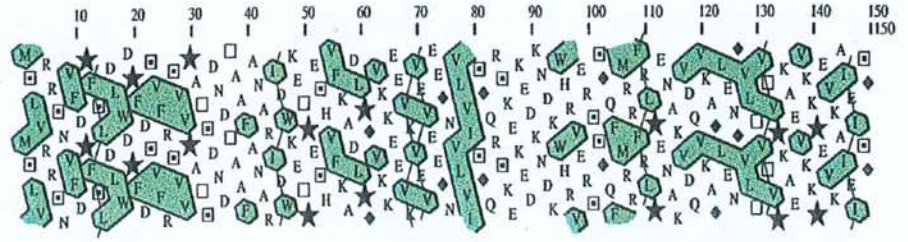
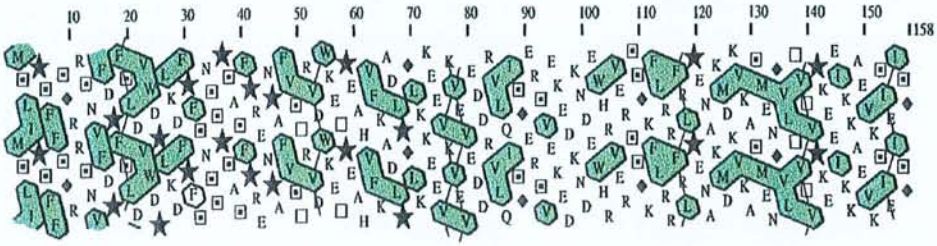


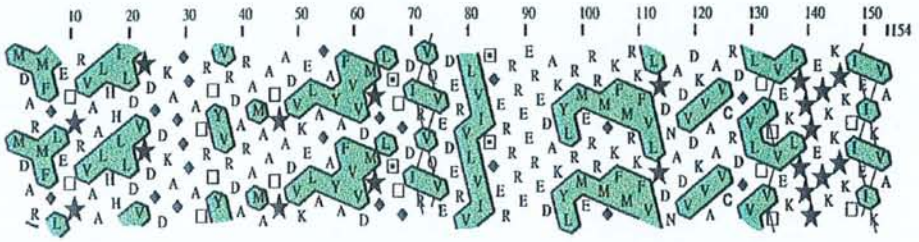
Figure 14 a. Réprésentation en deux dimensions des séquences des petites Hsp pour l'analyse HCA
▭ : amas hydrophobes ; ⬡ résidu hyrophobe ; ★ : Proline ; ♦ Glycine



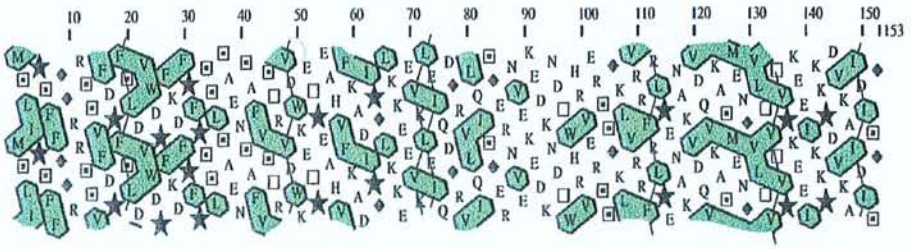
O. sativa



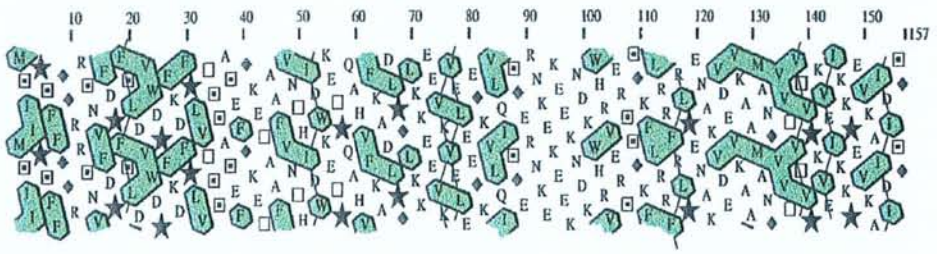
P. sativum



Z. mais



G. max



D. carota

Figure 14 b. Réprésentation en deux dimensions des séquences des petites Hsp pour l'analyse HCA

▭ : amas hydrophobes ; ⬡ résidu hyrophobe ; ★ : Proline ; ♦ Glycine

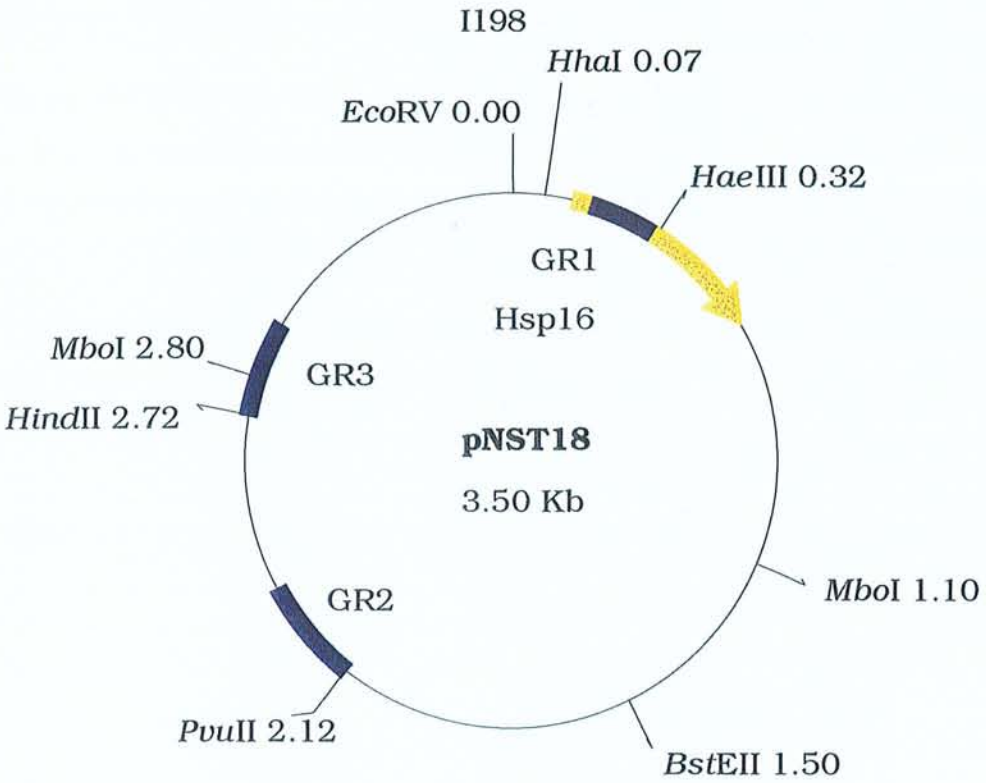
5.4. Analyse de la séquence du plasmide pNST18 porté par la souche de *S. thermophilus* PB18

Dans un précédent travail réalisé au laboratoire sur le criblage de onze souches de *S. thermophilus*, il a été montré que seules 2 souches portaient un plasmide et 1 souche portait 3 plasmides. Les deux souches porteuses d'un plasmide sont d'origine industrielle et la souche porteuse de 3 plasmides est une souche de la collection de l'Institut Pasteur (IP6631). Cette souche se différencie de *S. thermophilus* par le phénotype et le typage protéique.

Au laboratoire, les caractéristiques fondamentales du plasmide pNST10 de la souche PB10 et du plasmide pNST18 de la souche PB18 (Ouahrani, 1990; Ouzzine, 1988; Roupert, 1991) ont été déterminées. Ces plasmides, dont la taille respective est de 2 et 3,5 kb, sont présents en 8 et 20 copies par cellule et possèdent un système de réplication par cercle roulant (mise en évidence d'intermédiaires d'ADN simple brin par gel d'agarose). Cependant, les 2 plasmides ont semblé, à l'époque, cryptiques comme ceux décrits dans la littérature (Jansen *et al.*, 1992).

Le clonage de la séquence partielle du plasmide pNST18 montre 31-35% en GC. L'analyse de la séquence GR3 par TFastA a montré que le motif YKSLT pourrait être codé par cette séquence et qu'il est commun à de nombreuses Hsp (Roupert, 1991).

Au vue de ces résultats, nous avons réalisé une comparaison de cartes de restriction des plasmides pNST18 et pST1 (Fig. 15). Ces deux plasmides possèdent des sites de coupure communs à plusieurs enzymes dont *Mbo*I, *Eco*RV, HaeIII et *Bst*EII. La recherche d'homologie de séquence en bases entre le plasmide pST1 (Hashiba *et al.*, 1993) et les séquences GR1, GR2 et GR3 montre une forte homologie (Fig. 16).



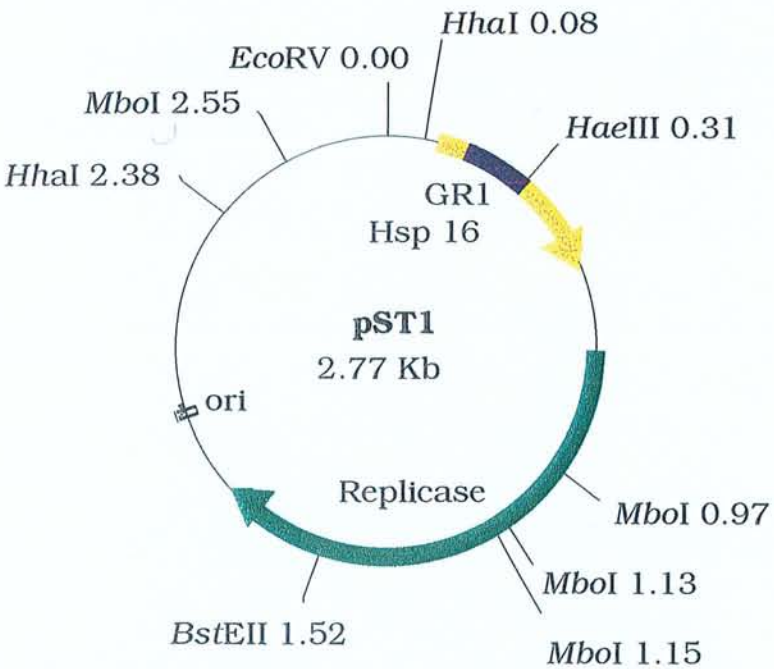


Figure 15. Plasmides de *S. thermophilus* codant pour la protéine de 16 kDa.
pNST18 : 3,5 kb, *S. thermophilus* PB18
pST1 : 2,8 kb : *S. thermophilus* 29

Figure 16. Comparaison des séquences GR1, GR2, GR3 et GR4 avec la séquence du plasmide pST1 de Hashiba *et al.*, (1993)

```
 s67974 x GR3
Similarité : 47.7 %  ; Identité : 47.7 %

    2401 AACTCCCTGGTATCCCTAAAGAAAACATTCAAGTTACTTACGAAAACGGA 2450
            ||  || |  ||| |  || |||  |  ||   |  |      |
       1 ...caacttATAACGGTAAGGGTAATATTAGACATAAAAAACACCCAAAA 47
    2451 GTATTAACAATTAGTGGCCAACAACAAATTGATGCAGTAAACGAAGATAA 2500
           ||| | | |          || |    |||| |   | | || |  |||
      48 CCATTGATATT.........ACTAGGTTTTGAGGTGATTACCGTACTTAA 88
    2501 AAAAGGAAAGTTGATTCGTAGCGAACGTAGTTTAACAAGTGTCCAACGTC 2550
         || | |||||  | |||  ||   ||  |    | | |    || ||
      89 AACAAGAAAGGTAATTTTTAAGTAAGTTCTGATCATAGTATTCAAAATCA 138
    2551 AATATTTATTAGAAAATGTTAAAGAAGACGAAATAAAGGCTTCTTATTCA 2600
         ||||   ||     | |
     139 AATACGAATGGCTGACT.............................. 155


 s67974 x pNST18  GR4
Similarité : 44.3 %   Identité : 44.3 %

    2351 CATCAAAACAGATATTCATGAAACTGATAATGAATATCTTGTAGAAGCTG 2400
                                                      ||
       1 .....................................agctcggt 8
    2401 AACTCCCTGGTATCCCTAAAGAAAACATTCAAGTTACTTACGAAAACGGA 2450
         | |   ||  || |  ||| |  || |||  |  ||   |  |      |
       9 acccaacttataacggtaagggtaatattagacataaaaaacacccaaaa 58
    2451 GTATTAACAATTAGTGGCCAACAACAAATTGATGCAGTAAACGAAGATAA 2500
           ||| | | |          || |    |||| |   | | || |  |||
      59 ccattgatatt.........actaggttttgaggtgattaccgtacttaa 99
    2501 AAAAGGAAAGTTGATTCGTAGCGAACGTAGTTTAACAAGTGTCCAACGTC 2550
         || | |||||  | |||  ||   ||  |    | | |    || ||
     100 aacaagaaaggtaatttttaagtaagttctgatcatagtattcaaaatca 149
    2551 AATATTTATTAGAAAATGTTAAAGAAGACGAAATAAAGGCTTCTTATTCA 2600
         ||||   ||     | | |  |   |||    | |    |    | ||
     150 aatacgaatggctgactttgtagatagattttacacctacggtatgttat 199
    2601 GATGGAGTT..CTTAAAGTAACCTTGCCAAAAGATAGTAACAAAGAAATA 2648
         ||   ||||  | |  ||    |     ||| || |      || |  ||
     200 gaaaaagttaccgtttaggttacagtttaaatgacatacggtaacatcta 249
    2649 AAAAAATCTATTTCAATTGAGTAGTAATTAAAAAATTACGAAAAAAGGCG 2698
          ||    ||   ||| ||       |
     250 taagtcccttactcagttttactcaa..................... 275
```

Figure 16. Suite

6. Discussion

Le séquençage de protéines par la méthode de la dégradation d'Edman est une technique qui permet l'identification de séquences de résidus d'acides aminés avec des quantités de plus en plus faibles de protéines (de l'ordre de quelques picomoles). Cette technique, réalisée à partir de protéines transférées sur membrane de PVDF après une électrophorèse uni ou bidimensionnelle, permet une détermination rapide de l'extrémité N-terminale, mais du fait du faible consommation en matière première des techniques de spectrométrie de masse, le séquençage total des protéines par degradation d'Edman est déconseillé.

La méthode de choix donc, pour déterminer la structure primaire d'une protéine sans passer par le clonage de l'ADN, est la digestion de la protéine purifiée avec plusieurs endopeptidases ou par rupture chimique du polypeptide, suivie d'un fractionnement des peptides par chromatographie liquide de phase inverse, avec le développement des techniques de spectrométrie de masse (FAB-MS et MALDI-TOF). La détermination de la masse moléculaire et plus encore la séquence complète de ces peptides peuvent être réalisées par ces méthodes en utilisant des quantités de l'ordre de 100 pmol. Par ailleurs, la spectrométrie de masse est une technique beaucoup moins coûteuse (hors amortissement) que le séquençage par dégradation d'Edman (Thunell, 1988).

La spectrométrie de masse permet ainsi dans l'analyse des protéines de :

(i) confirmer une séquence putative,

(ii) identifier et localiser un résidu d'acide aminé modifié,

(iii) déterminer la séquence de peptides inconnus.

En combinaison avec d'autres méthodes plus spécifiques de l'analyse de peptides comme la dégradation d'Edman et la composition en acides aminés, nous pouvons répondre à toutes les questions qu'un peptide ou une protéine peuvent nous poser.

En première instance, nous avons essayé la dégradation d'Edman sur la protéine purifiée, et le choix s'est révélé utile. Nous avons pu obtenir une première séquence de 34 acides aminés avec seulement deux ambiguïtés, puis au cours du second séquençage aller jusqu'au 36 résidus et éclaircir les incertitudes du premier séquençage.

La recherche de séquences homologues dans les banques de données en utilisant les moyens informatiques et le réseau Internet nous a permis de trouver une séquence d'ADN plasmidique chez un autre *S. thermophilus* qui peut coder pour un polypeptide homologue à la protéine que nous venons de purifier. Ceci nous a permis d'établir, comme hypothèse de travail, qu'il s'agissait de la même protéine et de postuler un protocole de séquençage pour valider la séquence putative comme la séquence de la protéine récemment purifiée.

Le choix des enzymes (trypsine et endoprotéinase Arg-C), a été réalisée en fonction de la présence de plusieurs résidus arginine et lysine qui devaient être susceptibles de produire des peptides de taille satisfaisante pour l'analyse par spectrométrie de masse. De plus, les peptides résultant de l'hydrolyse par l'Endo Arg-C regroupent des peptides issus de l'hydrolyse trypsique.

La trypsine est la plus utilisée des enzymes protéolytiques, sa spécificité et sa reproductibilité pour l'hydrolyse du groupe carboxyle de la lysine et l'arginine en font une enzyme de choix (Gauthier & Clément, 1994). L'hydrolyse trypsique s'est révélée comme la technique

d'hydrolyse la plus facile à réaliser et nous a donné les informations importantes. Nous avons retrouvé pratiquement tous les fragments peptidiques attendus théoriquement sauf les fragments 4 et 5. Ceci implique l'absence d'une coupure entre les résidus lysine (33) et proline (34). Ce comportement est décrit dans la littérature car les taux relatifs de clivage de la lysine et de l'arginine sont influencés par les chaînes latérales des résidus voisins. La trypsine hydrolyse rarement les liaisons lysine-proline ou arginine-proline (Gauthier & Clément, 1994; Thunell, 1988). La coupure non conventionnelle entre l'asparagine 27 et la leucune 28 observée ici, est un phénomène qui, à notre connaissance, n'a pas encore été décrit dans la littérature.

L'endoprotéase Arg-C s'est révélée peu efficace dans l'hydrolyse de la protéine de 16 kDa, elle semble être résistante à l'hydrolyse totale. Nous avons utilisé trois milieux d'hydrolyse de composition différente et deux sources d'enzyme d'origine différente et les résultats ont été très similaires.

L'étude de la séquence de la protéine de 16 kDa purifiée au cours de ce travail nous permet d'affirmer qu'elle est identique à une protéine hypothétique codée par une partie de la séquence du plasmide pST1 de la souche 29 de *S. thermophilus* (Hashiba, 1993). Cette protéine n'avait pas été décrite antérieurement.

La confirmation des séquences de protéines par spectrométrie de masse est utilisée de plus en plus. Elle a ainsi été utilisée pour confirmer la structure primaire de l'α-cristalline de lapin (Raja *et al.*, 1991) et du β-cristalline humaine (McGowan *et al.*, 1994). Cependant, la plupart des applications l'utilisent pour déterminer les modifications prost-traductionnelles des protéines comme des phosphorylations, adénylations, etc... (Hickey & Hirshfield, 1990).

La recherche d'homologues de la séquence de la protéine récemment purifiée s'avère fructueuse. Le groupe d'homologues de notre protéine est assez vaste. Elle inclue des protéines bactériennes proches, des protéines plus éloignées que l'on trouve chez des végétaux et des "cousins" lointains chez certains animaux. Toutes correspondent à des protéines dont la masse moléculaire est comprise entre 11 et 30 kDa. L'analyse poussée de ces séquences par les outils ProDom et Prosite nous a apporté une liste plus ciblée des protéines homologues avec un domaine bien défini, le domaine 291 de ProDom et le domaine Hsp20 de Prosite. Curieusement, ce domaine a été le premier déposé dans la base de données Prosite. et contient en particulier les petites Hsp de Classe I des plantes (protéines cytoplasmiques). Toutes les protéines appartenant à ce groupe de protéines de choc thermique ont une masse moléculaire de 30 kDa. Pourtant, la structure secondaire et tertiaire de ce groupe de protéines n'a pas été encore décrit. L'évolution moléculaire de ces protéines a été étudiée (Waters, 1995) et il a été postulé que ces petites protéines de choc thermique ont suivie, pour une raison inconnue, une diversification très grande, spécialement chez les végétaux. Chez les champignons et chez les animaux, il n'existe par contre, en général qu'un seul type de ces protéines. Ces protéines sont également apparentées à la protéine du crystallin de l'oeil des vertébrés. Comme on a pu l'observer dans les études de recherche de motifs et d'alignement de séquences, toutes partagent un domaine particulier des protéines de choc thermique dans la région carboxyle terminale.

Récemment, dans le laboratoire de Microbiologie de l'ENSBANA de Dijon, le groupe du Professeur Diviès (Jobin *et al.*, 1997), a montré que différents stress dont les stress à la chaleur, à l'éthanol et à l'acidité, induisent fortement l'expression d'une protéine de 18 kDa qu'ils

appellent Lo18. Le gène qui code pour cette protéine (*hsp18*) a été cloné et séquencé, il code pour une protéine de 148 acides aminés avec une masse moléculaire de 16,9 kDa. Ils ont aussi réussi à séquencer la région promotrice qui présente une forte homologie avec la séquence consensus des promoteurs de bactérie à Gram positive. Cette protéines Lo18 est homologue à la protéine Hsp16 de *S. thermophilus* notamment du côté de l'extrémité C terminale.

Les études de structure secondaire ont montré que la Hsp16 de *S. thermophilus* présente 6 régions en hélice α localisées entre les résidus 1-10, 20-30, 45-52, 78-87, 98-117, toutes, sauf la dernière sont de petites hélices. Il doit exister également 3 régions en feuillet β entre les résidus 37-40, 61-71 et 89-96.

S. thermophilus est une bactérie qui possède très peu de plasmides (Girard *et al.*, 1987; Herman & McKay, 1985; Somkuti & Steinberg, 1986). D'après l'analyse des cartes de restriction des plasmides pST1 et pNST18, les deux plasmides semblent apparentés mais une étude approfondie s'impose.

V. Conclusion et Perspectives

Tous les organismes présentent une réponse plus ou moins similaire aux stress (Morimoto *et al.*, 1992). Un changement radical de l'expression de certaines protéines est le résultat de cette réponse. De nombreuses protéines de choc thermique ont été identifiées chez tous les organismes notamment les protéines majeures de choc thermique (Becker & Craig, 1994; Lindquist, 1986), dont la structure primaire et secondaire ont été étudiées. Les études ont été faites principalement pour GroES, GroEl, DnaK, DnaJ et GrpE qui sont les protéines de choc thermique les plus fortement exprimées. Elles ont un rôle de chaperons moléculaires au cours de la physiologie normale de la cellule. Au moment d'un choc thermique et de façon plus générale lors de stress, elles sont surexprimées. Le stress et sa réponse sont des sujets de recherche très étudiés à l'heure actuelle car la maîtrise de la réponse au stress des organismes, en particulier d'intérêt technologique, nous donne des outils pour pouvoir rendre plus résistantes les cellules aux agressions de l'environnement.

Tout d'abord, ce travail a consisté à étudier la réponse à un environnement acide de *S. thermophilus* ; ceci nous a amené à corréler la surexpression d'une protéine de 16 kDa avec la réponse à l'acidité chez cette bactérie. Nous avons démontré que la protéine de 16 kDa de *S. thermophilus* est surexprimée en réponse à un environnement acide et nous avons éliminé l'hypothèse qu'elle soit exprimée en réponse à la phase stationnaire.

L'identification de la protéine de 16 kDa en électrophorèse bidimensionnelle a démontré qu'il s'agissait d'une famille de protéines

de 16 kDa qui augmente son expression dans un environnement acide. Le fait d'avoir entre les mains une protéine de "choc acide" exprimée en quantité importante nous a permis de mettre en route la purification afin de déterminer sa structure primaire.

La purification de cette protéine de 16 kDa à l'homogénéité se réalise en trois étapes. La première consiste dans la précipitation-extraction des protéines solubles totales par le sulfate d'ammonium, cette étape s'est avérée inutile. La deuxième, une chromatographie d'échange d'anions nous a permis l'enrichissement de cette protéine. La troisième, une chromatographie en phase inverse permet de la purifier jusqu'à l'homogénéité.

Le séquençage de l'extrémité N-terminale de la protéine nous a donné l'enchaînement des 36 premiers résidus d'acides aminés. Les techniques récentes de recherche d'homologie de séquence nous ont permis d'identifier rapidement la protéine étudiée comme membre de la famille des protéines de choc thermique Hsp20 et d'identifier ses domaines protéiques communs. L'analyse approfondie des alignements de la séquence de la Hsp16 avec des protéines de choc thermique de Classe I des végétaux nous a permis de prédire une structure secondaire.

Actuellement, nos investigations se poursuivent vers différentes voies:

(i) La Hsp16 de *S. thermophilus* appartient à une grande famille de protéines de choc thermique, cependant, aucune d'entre elles n'a été l'objet d'études sur leur structure secondaire ni tertiaire. Ceci est dû au fait que la purification et cristallisation de protéines sont des travaux difficiles. La caractérisation approfondie des structures secondaires et tertiaires de la Hsp16 de *S. thermophilus* est peut-être facilitée grâce au

protocole de purification, bien établi qui doit nous permettre de fournir des quantités suffisantes pour les études de cristallisation en vue d'une analyse de la structure tertiaire par diffraction aux rayons X.

(ii) Le clonage du gène de la protéine Hsp16 s'avère très intéressant, car nous pouvons, alors, étudier la physiologie fine de l'expression de la protéine Hsp16 de *S. thermophilus* en regardant spécifiquement la transcription de son ARN messager avec une sonde d'ADN. Cette façon d'étudier l'expression présente le grand avantage d'être spécifique mais également de pouvoir être utilisée pour identifier les protéines homologues à la Hsp16 chez d'autres bactéries lactiques.

(iii) L'étude de la séquence complète du plasmide pNST18 s'impose car une comparaison avec les autres plasmides de *S. thermophilus*, déjà séquencés, nous montrera la diversification phylogénétique de cette famille de plasmides chez *S. thermophilus*.

VI. Références Bibliographiques

1. **Abshire, K. Z. & Neidhardt, F. C. (1993)**. Analysis of proteins Synthesized growth within a host macrophage. *J Bacteriol* **175**, 3734-3743.

2. **Aldea, M., Garrido, T., Hernández-Chico, C., Vicente, M. & Kushner, S. R. (1989)**. Induction of a growth-phase-dependent promoter triggers transcription of *bolA*, an *Escherichia coli* morphogene. *EMBO J* **8**, 3923-3931.

3. **Aliabadi, Z., Park , Y. K., Slonczewski, J. L. & Foster, J. W. (1988)**. Novel regulatory loci controlling oxygen- and pH-regulated gene expression in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **170**, 842-851.

4. **Almiron, M., Link, A., Furlong, D. & Kolter, R. (1992)**. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev* **6**, 2646-2654.

5. **Alpuche Aranda, C. M., Swanson, J. A., Loomis, W. P. & Miller, S. I. (1992)**. *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 10079-10083.

6. **Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E. Z. & Lipman, D. J. (1990)**. Basic local alignment search tool. *J Molec Biol* **215**, 403-410.

7. **Amaro, A. M., Chamorro, D., Seeger, M., Arredondo, R., Peirano, I. & Jerez, C. A. (1991)**. Effect of external pH perturbations on *In Vivo* protein syntheses by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferooxidans*. *J Bacteriol* **173**, 910-915.

8. **Araya, T., Ishibashi, N., Shimamura, T. & Tanaka, K. T., H (1993)**. Genetic and molecular analysis of the *rpoD* gne from *Lactococcus lactis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **57**, 88-92.

9. **Arnosti, D. N., Singer, V. L. & Chamberlin, M. J. (1986)**. Characterization of heat shock in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **168**, 1243-1249.

10. **Atlung, T., Nielsen, A. & Hansen, F. G. (1989)**. Isolation, characterization, and nucleotide sequence of *appY*, a regulatory gene for growth-phase-dependent gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**, 1683-1691.

11. **Auffray, Y., Lecesne, E., Hartke, A. & Boutibonnes, P. (1995)**. Basic features of the *Streptococcus thermophilus* heat shock response. *Curr Microbiol* **30**, 87-91.

12. **Auger, E. A. & Bennett, G. N. (1989)**. Regulation of lysine decarboxylase activity in *Escherichia coli* K-12. *Arch Microbiol* **151**, 466-468.

13. **Auger, E. A., Redding, K. E., Plumb, T., Childs, L. C., Meng, S.-Y. & Bennett, G. N. (1989)**. Construction of lac fusions to the inducible arginine- and lysine decarboxylase genes of *Escherichia coli* K12. *Molec Microbiol* **3**, 609-620.

14. **Bairoch, A. & Boeckamnn, B. (1991)**. The SWISS-PROT protein sequence data bank. *Nucl Acids Res* **19**, 2247-2249.

15. **Barber, M., Bell, D. J., Morris, M., Tetler, W., Woods, M. D., Monaghan, J. J. & Morden, W. E. (1988)**. The interaction of meta-nitrobenzyl alcohol with compounds under fast atom bombardment conditions. *Rap Comm Mass Spectrom* **2**, 181-183.

16. **Barril, J. S., Lecesne, E., Hartke, A. & Boutibonnes, P. (1992)**. Cloning and sequencing of the *Lactococcus lactis* subsp *lactis dnaK* gene using a PCR based approach. *Gene* **142**, 91-96.

17. **Baumberrg, S. & Klingel, U. (1993)**. Biosynthesis of arginine, proline, and related compounds. *in* "*Bacillus subtilis* and Other Gram-positive Bacteria", 299-306 pp. Ed. Sonenshein, A. L., Losick, R. & Hochch, J. A. ASM press.

18. **Bayley, T. L. & Elkan, C. (1994)**. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *in* "Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology", 28-36 pp. . Menlo Parck, CA. AAAI PMress.

19. **Becker, J. & Craig, A. (1994)**. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem* **219**, 11-23.

20. **Beis, A. & Lazou, A. (1990)**. Removal of artifactual bands associated with the presence of 2-mercaptoethanol in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* **190**, 57-59.

21. **Bender, G. R., Sutton, S. V. W. & Marquis, R. E. (1986)**. Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infect Immun* **53**, 331-338.

22. **Bentley, R. Z., Leigh, J. & Collins, M. D. (1991)**. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* **41**, 487-494.

23. **Bingham, R. J., Hall, K. S. & Sloczewski, J. L. (1990)**. Alkaline induction of a novel gene locus, *alx*, in *E.coli*. *J Bacteriol* **172**, 2184-2186.

24. **Bockelmann, W., Fobker, M. & Teuber, M. (1991)**. Purification and characterization of the X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus and *Lactobacillus acidophilus*. *Int Dairy J* **1**, 51-66.

25. **Booth, I. R. (1985)**. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol Rev* **49**, 359-378.

26. **Bouillanne, C. & Desmazeaud, M. J. (1980)**. Some characteristics of strains of *Streptococcus thermophilus* used in the manufacture of yoghurt, and a proposed method of classification. *Lait* **60**, 458-473.

27. **Boutibonnes, P. (1996)**. Les protéines de choc thermique chez *Lactococcus lactis* : synthèse et régulation ; thermotolérance. *Lait* **73**, 111-128.

28. **Boutibonnes, P., Tranchard, C., Hartke, A., Thammavongs, B. & Auffray, Y. (1992)**. Is thermotolerance correlated to heat-shock protein synthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*? *Int J Food Microbiol* **16**, 227-236.

29. **Bracquart, P. (1981)**. An agar medium for the differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in yoghurt. *J Appl Bacteriol* **51**, 303-305.

30. **Bradford, M. M. (1976)**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

31. **Brandi, A., Pon, C. L. & Gualerzi, C. O. (1994)**. Interaction of the main cold shock protein CS7.4 (CspA) of *Escherichia coli* with the promoter region of *hns*. *Biochimie* **76**, 1990-1998.

32. **Branger, A., Champagne, C., Grenache, C., Goulet, J. & Millet, J. (1994)**. Propagation des ferments sur les lieux d'utilisation. *in* "Bactéries Lactiques. Aspects Fondamentaux et Technologiques", 523-553 pp. Ed. de Roissart, H. & Luquet, F. M. Uriage. Lorica.

33. **Bras, G. D. L., Deville-Bonne, D. & Garel, J.-R. (1991)**. Purification and properties of the phosphofructokinase from *Lactobacillus bulgaricus*. *Eur J Biochem* **198**, 683-687.

34. **Broeze, R. J., Solomon, C. J. & Pope, D. H. (1978)**. Effect of low temperature on *in vivo* and *in vitro* protein synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* **134**, 861-874.

35. **Burne, R. A., Parsons, D. T. & Marquis, R. E. (1991)**. *in* "Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci", 276-290 pp. Ed. Dunny, M., Clearly, R. P. & McKay, L. L. Washington, DC. ASM.

36. **Casiano-Colón, A. & Marquis, R. E. (1988)**. Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Appl Environ Microbiol* **54**, 1318-1324.

37. **Cerning, K., Bouillanne, C., Landon, M. & Desmazeaud, M. J. (1988)**. Exocellular polysacharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnol Lett* **10**, 255-260.

38. **Chen, C. Y. & Winans, S. C. (1991)**. Controlled expression of the transcriptional activator gene vir G in *Agrobacterium tumefaciens* by using the *Escherichia coli lac* promotor. *J Bacteriol* **173**, 1139-1144.

39. **Chou, P. Y. & Fasman, G. D. (1974)**. Prediction of protein conformation. *Biochemistry* **13**, 222-244.

40. **Christman, M., Morgan, R., Jacobson, F. & Ames, B. (1985)**. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* **41**, 753-762.

41. **Clavé, C. & Trombe, M. C. (1989)**. DNA uptake in competent *Streptococcus pneumoniae* requires ATP and is regulated by cytoplasmic pH. *FEMS Microbiol Lett* **65**, 113-118.

42. **Coll, J. L., Heyde, M. & Portalier, R. (1994)**. Expression of the *nmpC* gene of *Escherichia coli* K-12 is modulated by external pH. Identification of cis-acting regulatory sequences involved in this regulation. *Molec Microbiol* **12**, 83-93.

43. **Collins, L. B. & Thomas, T. D. (1974)**. Pyruvate kinase of *Streptococcus lactis*. *J Bacteriol* **120**, 52-58.

44. **Colmin, E. B., Larbi, D., Simonet, J. M. & Decaris, B. (1987)**. Strain identification in the genus *Streptococcus* by DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol Revs* **46**, 14-30.

45. **Corpet, F. (1988)**. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res* **16**, 10881-10890.

46. **Cotter, P. A., Chepuri, V., Gennis, R. B. & Gunsalus, R. P. (1990)**. Cytochrome o (*cyoABCDE*) and d (*cydAB*) oxidase gene

expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH, and the *fnr* gene product. *J Appl Bacteriol* **172**, 6333-6338.

47. **Crow, V. L. & Thomas, T. D. (1982)**. D-Tagatose 1,6-diphosphate aldolase from lactic streptococci : purification, properties and use in measuring intracellular tagatose 1,6-diphosphate. *J Bacteriol* **151**, 600-608.

48. **Cunin, R., Glandsdorff, N., Piérard, A. & Stalon, V. (1986)**. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol Rev* **50**, 314-352.

49. **Daeschel, M. A. (1988)**. A pH control system based on malate decarboxylation for the cultivation of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* **54**, 1627-1629.

50. **Dassa, J., Fsihi, H., Marck, C., Dion, M., Kieffer-Bontemps, M. & Boquet, P. L. (1992)**. A new oxygen-regulated operon in *Escherichia coli* comprises the genes for a putative third cytochrome oxidase and for pH 2.5 acid phosphatase (*appA*). *Molec Gen Genet* **229**, 342-352.

51. **Dellaglio, F., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. C. & Janssens, D. (1994)**. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *in* "Bactéries Lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques", 25-116 pp. Ed. de Roissart, H. d. & Luquet, F. M. Uriage. Lorica.

52. **Desmazeaud, M. J. & de Roissart, H. (1994)**. Métabolisme général des bactéries lactiques. *in* "Bactéries Lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques", 169-207 pp. Ed. de Roissart, H. & Luquet, F. M. Uriage. Lorica.

53. **Diaz-Guerra, L., Moreno, F. & SanMillan, J. L. (1989)**. *appR* gene product activates transcription of microcin C7 plasmid genes. *J Bacteriol* **171**, 2906-2908.

54. **DiRita, V. J. (1992)**. Co-ordinate expression of virulence genes by Tox P in *Vibrio cholerae*. *Molec Microbiol* **6**, 451-458.

55. **DiRita, V. J., Parsot, C., Jander, G. & Mekalanos, J. J. (1991)**. Regulatory cascade controls virulence in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 5403-5407.

56. **Dri, A.-M. & Moreau, P. L. (1994)**. Control of the Lex A regulon by pH : evidence for a reversible inactivation of the Lex A repressor during the growth cycle of *Escherichia coli*. *Molec Microbiol* **12**, 621-629.

57. **Duwat, P., Ehrlich, S. D. & Gruss, A. (1995)**. The recA gene of *Lactococcus lactis*: characterization and involvement in oxidative and thermal stress. *Molec Microbiol* **17**, 1121-1131.

58. **Eaton, T., Shearman, C. & Gasson, M. (1993)**. Cloning and sequence analysis of the *dnaK* gene region of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J Gen Microbiol* **139**,

59. **El Soda, M., Desmazeud, M. J. & Bergère, J.-L. (1978)**. Peptide hydrolases of *Lactobacillus casei* : isolation and general properties of various peptidase activities. *J Dairy Sci* **45**, 445-455.

60. **Englard, S. & Seifter, S. (1990)**. Precipitation Techniques. *in* "Methods in Enzymology", 285-300 pp. .

61. **Farr, S. B. & Kogoma, T. (1991)**. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev* **55**, 561-585.

62. **Farrow, J. A. E. & Collins, M. D. (1984)**. DNA base composition, DNA-DNA homology and long-chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J Gen Microbiol* **130**, 357-362.

63. **Foster , J. W. (1993)**. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. *J Bacteriol* **175**, 1981-1987.

64. **Foster, J. W. (1991)**. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptative acid tolerance response. *J Bacteriol* **173**, 6896-6902.

65. **Foster, J. W. & Aliabadi, Z. (1989)**. pH-regulated gene expression in *Salmonella*: genetic analysis of *aniG* and clonig of the *earA* regulator. *Molec Microbiol* **3**, 1605-1615.

66. **Foster, J. W. & Bearson, B. (1994)**. Acid-sensitive mutants of *Salmonella typhimurium* identified through a dinitrophenol lethal screening strategy. *J Bacteriol* **176**, 2596-2602.

67. **Foster, J. W. & Hall, H. K. (1990)**. Adaptive acidication tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **172**, 771-778.

68. **Foster, J. W. & Hall, H. K. (1991)**. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **173**, 5129-5135.

69. **Foster, J. W., Park, Y. K., Karem, K., Betts, H., Hall, H. K. & Shaw, E. (1994)**. Regulatory events involved with pH regulated gene expression in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* **140**, 341-352.

70. **Friedman, H., Lu, P. & Rich, A. (1971)**. Temperature control of initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *J Molec Biol* **61**, 105-121.

71. **Gale, E. F. & Epps, H. M. R. (1942)**. *Biochemical J* **36**, 600-604.

72. **Gansel, X., Dutreix, M., Hartkle, P., Boutibons, P. & Auffray, Y. (1993a)**. Partical characterization of an *rpoD* -like gene of *Lactococcus*

lactis subsp *lactis* ML3 with a polymerase chain reaction based approach. *Curr Microbiol* **27**, 267-271.

73. **Gansel, X., Hartkle, P., Boutibons, P. & Auffray, Y. (1993b)**. Nucleotide sequence of the *Lactococcus lactis* NCDO 763(ML3) *rpoD* gene. *Biochimi Biophisi Acta* **1216**, 115-118.

74. **Garnier, J., Ogusthorpe, D. J. & Robson, B. (1978)**. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J Molec Biol* **120**, 97-120.

75. **Garvie, E. & Farrow, J. A. E. (1981)**. Sub-divisions within the genus *Streptococcus* using deoxyribonucleic acid/ribosomal ribonucleic acid hybridization. *Zbl Bqkt Hyg I Abt Orig* **C2**, 299-310.

76. **Garvie, E. I. (1984)**. Taxonomy and identification of bacteria important in cheese and fermented dairy products. *in* "Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk", 35-66 pp. Ed. Davies, F. L. & Law, B. A. London. Elsevier Applied Science Publ.

77. **Gätje, G., Müller, V. & Gottschalk, G. (1991)**. Lactic acid excretion via carrier-mediated facilitated diffusion in *Lactobacillus helveticus*. *Appl Microbiol Biothechnol* **34**, 778-783.

78. **Gauthier, M. J. & Clément, R. (1994)**. Effect of a short period of starvation in oligotrophic waters on the resistance of enteric bacterial pathogens to gastric pH conditions. *FEMS Microbiol Ecol* **14**, 275-284.

79. **Gething, M. J. & Sambrook, J. (1992)**. Protein folding in the cell. *Nature* **355**, 33-45.

80. **Girard, F., Lautier, M. & Novel, G. (1987)**. DNA-DNA homology between plasmids from *Streptococcus thermophilus*. *Lait* **67**, 3863-3869.

81. **Goodson, M. & Rowbury, R. J. (1989)**. Resistance of acid-habituated *Escherichia coli* to organic acids and its medical and applied significance. *Lett Appl Microbiol* **8**, 211-214.

82. **Gouzy, J., Corpet, F. & Kahn, D. (1996)**. Graphical interface for ProDom domain families. *Trends Biochem Sci* **21**, 493.

83. **Graumann, P. & Marahiel, M. A. (1994)**. The major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB binds with high affinity to the ATGG- and CCAAT sequences in single strandes oligonucleotides. *FEBS Lett* **338**,

84. **Greenberg, J. & Demple, B. (1988)**. Overproduction of peroxide-scavenging enzymes in *Escherichia coli* suppresses spontaneous mutagenesis and sensitivity to redox-cycling agents in oxyR-mutants. *EMBO J* **7**, 2611-2617.

85. **Greenberg, N. & Mahoney, R. R. (1982)**. Production and characterisation of β-D-galactosidase of *Streptococcus thermophilus*. *J Food Sci* **47**, 1824-1835.

86. **Groat, R. G., Schultz, J. E., Zychlinsky, E., Bockman, A. & Matin, A. (1986)**. Starvation proteins in *Escherichia coli* : Kinetics of synthesis and role in starvation. *J Bacteriol* **168**, 486-493.

87. **Guarlezi, C. O. & Pon, C. L. (1990)**. Initiation of mRNA translation in procaryotes. *Biochemistry* **29**, 5881-5889.

88. **Guimont, C., Clary, D. & Bracquart, P. (1994)**. Analysis of whole-cell proteins of *Streptococcus thermophilus* by 2 electrophoretic methods. *Lait* **74**, 13-21.

89. **Guzzo, J., Cavin, J. F. & Divies, C. (1994)**. Induction of stress proteins in *Leuconostoc oenos* to permit direct inoculation of wine. *Biotechnol Lett* **16**, 1189-1194.

90. **Hall, H. K., Karem, K. L. & Foster, J. W. (1995)**. Molecular responses of microbes to environmental pH stress. *in* "Advances in Microbiol Physiology", 229-272 pp. .

91. **Hamilton, I. R. & Buckley, N. D. (1991)**. Adaptation by *Streptococcus mutans* to acid tolerance. *Oral Microbiol Immunol* **6**, 65-71.

92. **Harold, F. M. & van Brunt, J. (1977)**. Circulation of H^+ and K^+ across the plasma membrane is not obligatory for the bacterial growth. *Science* **197**, 372-373.

93. **Harvey, R. J. (1965)**. Dammage to *Streptococcus lactis* resulting from growth at low pH. *J Bacteriol* **90**, 1330-1336.

94. **Hashiba, H., Takiguchi, R., Joho, K., Aoyama, K. & Hirota, T. (1993)**. Identification of the replication region of *Streptococcus thermophilus* No. 29 plasmid pST1. *Biosci Biotechnol Biochem* **57**, 1646-1649.

95. **Hassani, M., Saluto, M. V., Bennett, G. N. & Hirsfield, I. N. (1991)**. Partial characterization of a *lysU* mutant of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **173**, 1965-1970.

96. **Hengge-Aronis, R. (1993)**. Survival of hunger and stress : The role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* **72**, 165-168.

97. **Hengge-Aronis, R. & Fisher, D. (1992)**. Identification and molecular analysis of *glgS*, a novel growth phase-regulated and *rpoS*-dependent gene involved in glycogen synthesis in *Escherichia coli*. *Molec Microbiol* **6**, 1877-1886.

98. **Hengge-Aronis, R., Klein, W., Lange, R., Rimmele, M. & Boos, Z. (1991)**. Trehalose synthesis genes are controled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**, 7918-7924.

99. **Herman, F. & McKay, L. (1985)**. Isolation and partial characterization of plasmid DNA from *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **50**, 1103-1106.

100. **Herman, R. E. & McKay, L. L. (1987)**. Cloning and expression of the β-D-galactosidase from *Streptococcus thermophilus* in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **52**, 45-50.

101. **Heyde, M., Coll, J.-C. & Portalier, R. (1991)**. Identification of *Escherichia coli* genes whose expression increases as a function of external pH. *Molec Gen Genet* **229**, 197-205.

102. **Heyde, M. & Portalier, R. (1987)**. Regulation of major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K-12 by pH. *Molec Gen Genet* **208**, 511-517.

103. **Heyde, M. & Portalier, R. (1990)**. Acid shock proteins of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **69**, 19-26.

104. **Hickey, E. W. & Hirshfield, I. N. (1990)**. Low-pH-Induced effects on patterns of protein synthesis and on internal pH in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1038-1045.

105. **Higgins, D. G. & Sharp, P. M. (1989)**. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Computational Applied Bioscience* **5**, 151-153.

106. **Hill, K. F., Mueller, J. P. & Taber, H. W. (1990)**. The Bacillus subtilis *menCD* promoter is responsive to extacellular pH. *Archives in Microbiology* **153**, 355-359.

107. **Hirshfield, I. N., Tenreiro, R., Vanbogelen, R. A. & Neidhardt, F. (1984)**. *Escherichia coli* K-12 lysyl-tRNA synthetase mutant with a novel reversion pattern. *J Bacteriol* **158**, 615-620.

108. **Holt, J. G., Krig, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, G. T. & Williams, S. T. (1994)**. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. New York. Williams & Wilkins.

109. **Hutkins, R. W. & Nannen, N. L. (1993)**. pH homeostasis in lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* **76**, 2354-2365.

110. **Ingraham, J. L. (1987)**. Effect of temperature, pH, water activity and pressure on growth. *in* "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : cellular and molecular biology", 1543-1554 pp. Ed. Neidhardt, F. C.,

Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. & Umbarger, H. E. Washington D. C. American Society for Microbiology.

111. **Jansen, T., Kleinschmidt, J., Neve, H. & Geis, A. (1992)**. Sequencing and characterization of pST1, a cryptic plasmid from *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol Lett* **95**, 175-180.

112. **Jenkings, D. E., Chaisson, S. Q. & Matin, A. (1990)**. Starvation-induced cross protection against osmotic chalenge in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**, 2779-2781.

113. **Jiang, W., Jones, P. & Inouye, M. (1993)**. Cloramphenicol induces the transcription of the major cold shock gene of *Escherichia coli*, *cspA*. *J Bacteriol* **175**, 5824-5828.

114. **Jobin, M. P., F, Garmyn, D., Diviès, C. & Guzzo, J. (1997)**. Molecular characterization of the gene encoding an 18-kilodalton small heat shock protein associated with the membrane of *Leuconostoc oenos*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 609-614.

115. **Jones, D. (1978)**. Composition and differenciation of the genus *Streptococcus*. *in* "*Streptococci*", 1-49 pp. Ed. Skinner, F. A. & Quesnel, L. B. London. Academic Press.

116. **Jones, P. G., Cashel, M., Glaser, G. & Neidhardt, F. C. (1992a)**. Dna gyrase, CS7.4, and the cold shock response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**, 5798-5802.

117. **Jones, P. G., Cashel, M., Glaser, G. & Neidhardt, F. C. (1992b)**. Function of a relaxed-like state following temperature downshifts in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**, 3903-3914.

118. **Jones, P. G. & Inouye, M. (1994)**. The cold-shock response -a hot topic. *Molec Microbiol* **11**, 811-818.

119. **Jones, P. G., VanBogelen, R. A. & Neidhardt, F. C. (1987)**. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**, 2092-2095.

120. **Kamaly, K. M., Takayama, K. & Marth, E. H. (1990)**. Acylclycerol acylhydrolase (lipase) activities of *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, and their mutants. *J Dairy Sci* **73**, 280-290.

121. **Karem, K. & Foster, J. W. (1993)**. The influence of DNA topology on the environmental regulation of a pH-regulated locus in *Salmonella typhimurium*. *Molec Microbiol* **10**, 75-86.

122. **Karem, K. L. & Foster, J. W. (1994)**. Adaptative acid tolerance response (ATR) in *Aeromonas hidrophila*. *J Gen Microbiol* **140**, 1731-1736.

123. **Karpel, R., Alon, T., Glaser, g., Schuldiner, S. & Padan, E. (1991)**. Expression of a sodium antiporer (NhaA) in *Escherichia coli* is induced by Na^+ and Li^+ ions. *J Biol Chem* **266**, 21753-21759.

124. **Kashiwagi, K., Suzuki, T., Suzuki, F., Furuchi, t., Kobayashi, H. & Igarashi, K. (1991)**. Coexistence of the genes for putrescine transport protein and ornithine decarboxylase at 16 min on *Escherichia coli* chromosome. *J Biol Chem* **266**, 20922-20927.

125. **Kashket, E. R. (1987)**. Bioenergetics of lactic acid bacteria : cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol Revs* **46**, 233-244.

126. **Kashket, E. R. & Barker, S. L. (1977)**. Effects of potassium ions on the electrical and pH gradients across the mambrane of *Streptococcus lactis* cells. *J Bacteriol* **130**, 1017-1023.

127. **Kiefer-Partsch, B., Bockelmann, W., Geis, A. & Teuber, M. (1989)**. Purifiation of an X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from the cell wall proteolytic system of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl Microbiol Biothechnol* **31**, 75-78.

128. **Kilpper-Bälz, R., Fischer, G. & Schleifer, K. H. (1982)**. Nucleic acid hybridizataion of group N and group D streptococci. *Curr Microbiol* **7**, 245-250.

129. **Kim, S. G. & Batt, C. A. (1993)**. Cloning and sequencing of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* GroESL operon. *Gene* **127**, 121-126.

130. **Kobayashi, M., Suzuki, T., Kinoshita, N. & Unemoto, T. (1984)**. Amplification of the *Streptococcus faecalis* proton-translocating ATPase by a decrease in cytoplasmic pH. *J Bacteriol* **158**, 1157-1160.

131. **Konings, Z. N., Poolman, B. & Driessen , A. J. M. (1989)**. Bioenergetics and solute transport in lactococci. *CRC Crit Rev Microbiol* **16**, 419-476.

132. **Krulwich, T. A., Agus, R., Scheier, M. & Guffanti, A. A. (1985)**. Buffering capacity of bacilli that grow in different pH ranges. *J Bacteriol* **162**, 768-772.

133. **Laemmli, U. K. (1970)**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

134. **Lancefield, R. C. (1933)**. A serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. *J Exp Med* **57**, 571-595.

135. **Landini, P., Hajec, L. I. & Volker, M. R. (1994)**. Structure and transcriptional regulation of the *Escherichia coli* adaptative response gene *aidB*. *J Bacteriol* **176**, 6583-6589.

136. **Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1991)**. Identification of a central regulator of stationary-phase. *Molec Microbiol* **5**, 49-59.

137. **Langwothy, T. A. (1978)**. Microbial life in extreme pH values. *in* "Microbial life in extreme environments", 279-315 pp. Ed. Kushner, D. J. London. Academic Press.

138. **Laurent-Winter, C., Lejeune, P. & Danchin, A. (1995)**. The *Escherichia coli* DNA-binding protein H-Ns is one of the first proteins to be synthesized after a nutritional upshift. *Res Microbiol* **11**, 833-839.

139. **Lee, I. S., Lin, J., Hall, H. K., Bearson, B. & Foster, J. W. (1995)**. The stationary-phase sigma factor σ^S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella typhimurium*. *Molec Microbiol* **17**, 155-167.

140. **Lemaux, P. G., Herendeen, S. L., Bloch, P. L. & Neidhardt, F. C. (1978)**. Transient rate of synthesis of individual polypeptides in *Escherichia coli* following temperature shifts. *Cell* **13**, 427-434.

141. **Lemesle-Varloot, L., Henrissat, B., Gaboriaud, C., Bissery, V., Morgat, A. & Mornon, J. P. (1990)**. Hydrophobic cluster analysis: procedures to derive structural and functional information from 2-D-representation of protein sequences. *Biochimie* **72**, 555-574.

142. **Lévêque, F., Gazeau, M., Fromant, M., Blanquet, S. & Plateau, P. (1991)**. Control of *Escherichia coli* lysyl-tRNA synthetase expression by anaerobiosis. *J Bacteriol* **173**, 7903-7910.

143. **Lewin, B. (1987)**. Genes. New York. John Wiley and Sons.

144. **Lim, V. I. (1978)**. Polypeptide chain folding through a highly helical intermediate as a general principle of globular protein structure formation. *FEBS Lett* **89**, 10-14.

145. **Lindler, L. E., Klempner, M. & SC, S. (1990)**. *Yersinia pestis* pH 6 antigen: genetic, biochemical, and virulence characterization of a protein involved in the pathogenesis of bubonic plague. *Infect Immun* **58**, 2569-2577.

146. **Lindquist, S. L. (1986)**. The heat shock response. *Annu Rev Biochem* **55**, 1151-1191.

147. **Lipman, D. J., Altschul, S. F. & Kececioglu, J. D. (1989)**. A tool for multiple sequence alignment. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 4412-4415.

148. **Loewen, P. C. & Triggs, B. L. (1984)**. Genetic maping of *katF*, a locus that with *katE* affects the synthesis of a second catalase species in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **160**, 668-675.

149. **Lowe, S. E., Pankratz, H. S. & Zeikus, J. G. (1989)**. Influence of pH extreme on sporulation and ultrastructure of *Sarcina ventriculi*. *J Bacteriol* **171**, 3775-3781.

150. **Lowe, S. E. & Zeikus, J. G. (1991)**. Purification and characterization of acetaldehyde deshydrogenase from *Sarcina ventriculi*. *Arch Microbiol* **155**, 325-330.

151. **Mantis, N. J. & Winans, S. C. (1992)**. The *Agrobacterium tumefaciens vir* gene transcriptionally induced by acid pH and other stress stimuli. *J Bacteriol* **174**, 1189-1196.

152. **Marques, M. B., Weller, P. F., Parsonnet, J., Ransil, B. & Nicholson-Weller, A. (1991)**. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, a possible virulence factor of *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol* **25**, 125-133.

153. **Marquis, R. E., Bender, G. R., Murray, D. R. & Wang, A. (1973)**. Acid-base titration of streptococci and the physical states of intracellular ions. *J Bacteriol* **114**, 491-498.

154. **Mat-Jan, F., Alam, K. Y. & Clark, D. P. (1989)**. Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *J Bacteriol* **171**, 342-.

155. **Matin, A. (1990)**. Keeping a neutral cytoplasm: the bioenergetics of obligate acidophiles. *FEMS Microbiol Revs* **75**, 307-325.

156. **Matin, A. (1991)**. The molecular basis of carbon-starvation-induced general resitence in *Escherichia coli*. *Molec Microbiol* **5**, 3-10.

157. **McCann, M. P., Kidwell, J. P. & A, M. (1991)**. The putative sigma factor KatF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**, 4188-4194.

158. **McGowan, C. C., Cover, T. L. & Blaser, M. J. (1994)**. The proton pump inhibitor omeprazole inhibits acid survival of *Helicobacter pylori* by a urease-independent mechanism. *Gastroenterol* **107**, 738-743.

159. **Mekalanos, J. J. (1992)**. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* **174**, 1-7.

160. **Menezes, L., Kelkar, S. M. & Kaklij, G. S. (1989)**. Glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Lactobacillus casei* : responses with different modulators. *Indian J Biochem Biophys* **26**, 329-333.

161. **Meng, S. Y. & Bennett, G. N. (1992a)**. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli rad* operon : a system for neutralisation of low extracellular pH. *J Bacteriol* **174**, 2659-2669.

162. **Meng, S. Y. & Bennett, G. N. (1992b)**. Regulation of the *Escherichia coli cad* operon: location of a site required for acid induction. *J Bacteriol* **174**, 2670-2678.

163. **Miller, S. I. (1991)**. PhoP/PhoQ : macrophage specific modulators of *Salmonella* virulence? *Molec Microbiol* **5**, 2073-2078.

164. **Mitchell, P. (1993)**. Performance and conservation of osmotic work by proton-coupled solute porter systems. *Journal of Bionergetics* **4**, 63-91.

165. **Miyakawa, H., Kobayashi, S., Shimamura, S. & Tomita, M. (1991)**. Purification and characterization of an X-propyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus* LBU-147. *J Dairy Sci* **74**, 2375-2381.

166. **Molskness, T. A. D., Lee, D. R., Sandine, W. E. & Elliker, P. R. (1973)**. β-D-Phosphogalactoside galactohydrolase of lactic streptococci. *Appl Microbiol* **27**, 317-380.

167. **Monnet, V. & Gripon, J. C. (1994)**. Métabolisme azoté des bactéries lactiques. *in* "Bactéries Lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques", 331-366 pp. Ed. de Roissart, H. & Luquet, F. M. Uriage. Lorica.

168. **Mooney, C., Munster, D. J., Bagshaw, P. F. & Allardyce, R. A. (1990)**. *Helicobacter pylory* acid resistance. *The Lancet* **335**, 1232.

169. **Morimoto, R. I., Sarges, K. D. & Abravaya, K. (1992)**. Transcriptional regulation of heat shock genes : A paradigm for inducible genomic responses. *J Biol Chem* **267**, 21987-21990.

170. **Nannen, N. L. & Hutkins, R. W. (1991a)**. Intracellular pH effects in lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* **74**, 741-746.

171. **Nannen, N. L. & Hutkins, R. W. (1991b)**. Proton-translocating adenosine triphophatase activity in lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* **74**, 747-751.

172. **Nilsson, D., Lauridsen, A. A., Tomoyasun, T. & T, O. (1994)**. A *Lactococcus lactis* gene encodes a membrane protein with putative ATP-ase activity that is holomogous to the essential *Escherichia coli ftsH* gene product. *Microbiology* **140**, 2601-2610.

173. **O'Farrell, P. H. (1975)**. High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**, 4007-4021.

174. **O'Farrell, P. Z., Goodman, H. M. & O'Farrell, P. H. (1977)**. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* **12**, 1133-1142.

175. **Olsén, A., Arnqvist, A., Sukupolvi, S. & Normark, S. (1993)**. The RpoS σ factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Molec Microbiol* **7**, 523-536.

176. **Orla Jensen, S. (1919)**. The Lactic Acid Bacteria. Copenhagen. Host & Son.

177. **Otto, R., Brink, B., Veldkamp, H. & Konings, W. N. (1983)**. The relation between growth rate and electrochemical proton gradients of *Streptococcus cremoris*. *FEMS Microbiol Lett* **16**, 69-.

178. **Ouahrani, S. (1990)**, Caracterisation d'un plasmide cryptique de *Streptococcus thermophilus*. Clonage, et essai de séquençage, Université Nancy 1. DEA de Toxicologie de l'environnement, Memoire de DEA.

179. **Ouzzine, M. (1988)**, Isolement et caractérisation moléculaire de plasmides de *Streptococcus thermophilus*, Universite de Nancy I. DEA de Biologie Appliquée à la Nutrition et aux Bioindustries, Mémoire de DEA.

180. **Ozaki, M., Wada, A., Fujita, N. & Ishihama, A. (1991)**. Growth-phase-dependent modification of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Molec Gen Genet* **230**, 17-23.

181. **Padan, E. & Schuldiner, S. (1994)**. Molecular physiology of the Na^+/H^+ antiporter in *Escherichia coli*. *J Exp Biol* **196**, 443-456.

182. **Pahl, H. L. & Baeuerle, P. A. (1994)**. Oxygen and the control for gene expression. *BioAssays* **16**, 497-502.

183. **Panoff, J., Thammavongs, B., Laplace, J., Boutibonnes, P. & Auffray, Y. (1995)**. Le stress hypothermique chez deux bacteéries lactiques. Aspects physilogique et biochimique. 4ème Congrès National de la S.F.M., ME-5, S.F.M.

184. **Parker, M. T. (1978)**. The pattern of streptococcal disease in man. *in* "Streptococci", 71-106 pp. Ed. Skinner, F. A. & Quesnel, L. B. London. Academic Press.

185. **Parsell, D. A. & Lindquist, S. (1993)**. The function of heat-shock proteins in stress tolerance. Degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* **27**, 437-496.

186. **Parsot, C. & Mekalanos, J. J. (1991)**. Expression of the vibrio choleral gene encoding aldehyde dehydrogenase is under control of ToxR, the cholera toxin transcriptional activator. *J Bacteriol* **173**, 2842-2851.

187. **Pearson, W. R. & Lipman, D. J. (1988)**. Improved tools for biological sequence comparisons. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 244-2448.
188. **Perrin, C. (1995)**, Analyse de la réponse d'une bactérie lactique à intérêt industriel (*Streptococcus thermophilmus*) soumise à des conditions de températures basses, Universite Henri Poicanré, Nancy 1, Mémoire de D E A.
189. **Perrin, E., Miclo, L., Driou, A. & Linden, G. (1995)**. Rapid determination of the ratios of three aromatic residues in peptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography with a high-resolution photodiode-array detector. *J Chromato* **664**, 267-276.
190. **Pharmacia (1985)**. FPLC Ion Exchange and Chromatofocusing; Principles & Methods. Pharmacia, Laboratory Separation Division.
191. **Piard, J. C. & Desmazeaud, M. (1991)**. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* **71**, 525-541.
192. **Poolman, B., Driessen, A. J. M. & Konings, W. N. (1987a)**. Regulation of solute transport in streptococci by external and internal pH values. *Microbiol Rev* **51**, 498-508.
193. **Poolman, B., Hellingwerf, K. J. & Konings, W. N. (1987b)**. Dependence of *Streptococcus lactis* phosphate transport on internal phosphate concentration and internal pH. *J Bacteriol* **169**, 5373-5378.
194. **Purkarthofer, H., Sinner, M. & Steiner, W. (1993)**. Effect of shear rate and culture pH on the production of xylanase by *Thermomyces lanuginosus*. *Biotechnol Lett* **15**, 405-410.
195. **Quirk, P. G., Guffanti, A. A., Plass, R. J., Clejan, S. & Krulwich, T. A. (1991)**. Protonophore-resistance and cytochrome expression in mutant strains of the facultative alkaliphile *Bacillus firmus* OF4. *Biochimi Biophisi Acta* **1058**, 131-140.
196. **Rahav-Manor, O., Carmel, O., Karpel, R., Taglicht, D. & Glacer, G., Schuldiner, S Padan, E (1992)**. NhaR, a protein homologous to a family of bacterial regulatory proteins (LysR), regulates *nhaA*, the sodium proton antiporer gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**, 10433-10438.
197. **Rahme, L. G., Mindrinos, M. N. & Papopoulos, N. J. (1992)**. Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J Bacteriol* **174**, 3499-3507.

198. **Raja, N., Goodson, M. & Chui, W. C. M. (1991)**. Habituation to acid in *Escherichia coli* : conditions for habituation and its effects on plasmid transfer. *J Appl Bacteriol* **70**, 59-65.

199. **Rallu, F., Gruss, A. & Maguin, E. (1996)**. *Lactococcus lactis and stress. Antonie van Leeuwenhoek* **70**, 243-251.

200. **Regasssa, L. B. & Betley, M. (1992)**. Alkaline pH decreases expression of the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **174**, 5095-5100.

201. **Richardson, A. E., Simpson, R. J., Djordjevic, M. A. & Rolfe, B. G. (1988)**. Expression of nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* is affected by low pH and Ca^{+} and Al^{++} ions. *Appl Environ Microbiol* **54**, 2541-2548.

202. **Ritosa, A. (1962)**. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**, 571-573.

203. **Rodgers, P. (1986)**. *Advances in Applied Microbiology* **31**, 1-5.

204. **Roepstorff, P. & Fohlman, J. (1984)**. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry* **11**, 601-605.

205. **Rossmann, R., Sawers, G. & Böck, A. (1991)**. Mechanism of regulation of the formate-hydrogen lyase pathway by oxigen, nitrate, and pH : definition of the formate regulon. *Molec Microbiol* **5**, 2807-2814.

206. **Roupert, G. (1991)**, Caractérisation d'un plasmide cryptique de *S. salivarius* ssp. *thermophilus*. Essais de séquençage simple et double brin, Universite de Nancy I. DEA de Microbiologie-Enzymologie, Nutrition, Mémoire de DEA.

207. **Sak, B. D. & Eisenstark, A. T. D. (1989)**. Exonuclease III and the catalase hydroperoxidase II in *Escherichia coli* are both regulated by the *katF* gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 3271-3275.

208. **Samartano, L. J., Tuveson, R. W. & Davenport, R. (1986)**. Control of sensitivity to inactivation by H_2O_2 and broad-spectrum. Near-UV radiation by the *Escherichia coli katF* locus. *J Bacteriol* **168**, 13-21.

209. **Sauer, U. & Durre, P. (1993)**. Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding a small heat shock protein of *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* **175**, 3394-3400.

210. **Schellhorn, H. E. & Stones, V. L. (1992)**. Regulation of RatF and RatE in *Escherichia coli* K-12 by weak acids. *J Bacteriol* **174**, 4769-4776.

211. **Schleifer, K. H., Ehrmann, M., Krusch, U. & Neve, H. (1991)**. Revival of the specie *Streptococcus thermophilus* (ex Orla-Jensen, 1919) nom. rev. *System Appl Microbiol* **14**, 386-388.

212. **Schleifer, K. H. & Kilpper-Bälz, R. (1987)**. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of *Streptococci*, *Enterococci* and *Lactococci*. *System Appl Microbiol* **10**, 1-19.

213. **Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M. & Fischer, W. (1985)**. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *System Appl Microbiol* **6**, 183-195.

214. **Schroeder, C. J., Robert, C., Lenzen, G., McKay, L. L. & Mercenier, A. (1991)**. Analysis of the *lacZ* sequences from two *Streptococcus thermophilus* strains: comparison with the *Escherichia coli* and *Lactobacillus bulgaricus* β-galactosidase sequences. *J Gen Microbiol* **137**, 369-380.

215. **Schuldiner, S., Agmon, V., Brandsma, J., Cohen, A., Friedman, E. & Padan, E. (1986)**. Induction of SOS function by alkaline intracellular pH in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **168**, 936-939.

216. **Shine, J. & Dalgarno, L. (1975)**. Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature* **254**, 34-38.

217. **Siegele, D. A. & Kolter, R. (1992)**. Life after Log. *J Bacteriol* **174**, 345-348.

218. **Slonczewski, J. L., Gonzalez, T. N., Bartholomew, F. M. & Holt, N. J. (1987)**. Mu d-directed *lacZ* fusions regulated by low pH in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**, 3001-3006.

219. **Smirnova, G. V., Oktyabrsky, O. N., Moshonkina, E. V. & Zakirova, N. V. (1994)**. Induction of the alkylation-inducible *aidB* gene of *Escherichia coli* by cytoplasmic acidification and N-ethylmaleimide. *Mutat Res, DNA Repair* **314**, 51-56.

220. **Smith, R. D., Loo, J. A., Edmonds, C. G., Barinaga, C. J. & Udseth, H. (1990)**. New developments in biochemical mass spectrometry: Electrospray Ionisation. *Anal Chem* **62**, 882-899.

221. **Smith, R. F. & Smith, T. F. (1992)**. Induced Multi-sequence Alignment (PIMA) algorithm employing secondary structure-dependent gap penalties for comparitive protein modelling. *Protein Eng* **5**, 35-41.

222. **Smith, T. & Waterman, M. (1981)**. Identification of common molecular subsequences. *J Molec Biol* **147**, 195-197.
223. **Somkuti, G. & Steinberg, D. H. (1986)**. Distribution and analysis of plasmids in *Streptococcus thermophilus*. *J Ind Microbiol* **1**, 157-163.
224. **Somkuti, G. A. & Steinberg, D. H. (1979)**. β-D-Galactoside galactohydrolase of *Streptococcus thermophilus* : induction, purification and properties. *J Appl Biochem* **1**, 357-368.
225. **Sonnhammer, E. L. & Kahn, D. (1994)**. Modular arrangement of proteins as inferred from analysis of homology. *Protein Sci* **3**, 482-492.
226. **Steffes, C., Ellis, J., Wu, J. & Rosen, B. P. (1992)**. The *lysP* gene encodes the lysine-specific permease. *J Bacteriol* **174**, 3242-3249.
227. **Storz, G., Tartaglia, L. A., Farr, S. B. & Ames, B. N. (1990)**. Bacterial defences against oxidative stress. *Trends Genet* **6**, 363-366.
228. **Tabor, C. W. & Tabor, H. (1985)**. Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev* **49**, 81-99.
229. **Taglicht, D., Padan, E., Oppenheim, A. B. & Schuldiner, S. (1987)**. An alkaline shift induces the heat shock response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**, 885-887.
230. **Tan, P. S. T. & Konings, W. N. (1982)**. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* WG2. *Appl Environ Microbiol* **56**, 526-532.
231. **Terzaghi, B. E. & Sandine, W. (1975)**. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl Microbiol* **29**, 807-813.
232. **Thomas, A. D. & Booth, I. R. (1992)**. The regulation of expression of the porin gene *ompC* by acid pH. *J Gen Microbiol* **138**, 1829-1835.
233. **Thompson, J. & Gentry-Weeks, C. R. (1994)**. Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. *in* "Bactéries Lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques", 239-290 pp. Ed. de Roissart, H. & Luquet, F. M. Uriage. Lorica.
234. **Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994)**. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* **22**, 4673-4680.
235. **Thunell, R. K. (1988)**. pH-Controled starter : a decade reviewed. *Cult Dairy Prod J* , 10-15.
236. **Tissieres, A., Mitchell, H. K. & Tracy, U. M. (1974)**. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Molec Biol* **84**, 121-128.

237. **Touati, E., Dassa, E. & Boquet, P. L. (1986)**. Pleiotropic mutations in *appR* reduce pH 2.5 acid phosphatase expression and restore succinate utilisation in CRP-deficient strains of *Escherichia coli*. *Molec Gen Genet* **202**, 257-264.

238. **Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979)**. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350-4354.

239. **Turk, S. C., Melchers, L. S., den Dulk-Ras, H., Regensburg-Tuïk, A. J. & Hooykaas, P. J. (1991)**. Environmental conditions differentially affect vir gene inductionin different *Agrobacterium* strains. Role of the VirA sensor protein. *Plant Molec Biol* **16**, 1051-1059.

240. **Tuveson, R. Z. (1980)**. Genetic control of near-UV sensitivity independent of excision deficiency (*uvrA6*) in *Escherichia coli* K12. *Photochem Photobiol* **32**, 703-705.

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

242. **VanBogelen, R. A., Kelley, P. M. & Neidhardt, F. C. (1987)**. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**, 26-32.

243. **VanBogelen, R. A. & Neidhardt, F. C. (1990a)**. Global systems approach to bacterial physiology : protein responders to stress and starvation. *FEMS Microbiol Ecol* **74**, 121-128.

244. **VanBogelen, R. A. & Neidhardt, F. C. (1990b)**. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 5589-5593.

245. **Vescovo, M., Scoleri, G. L. & Botazzi, V. (1989)**. *Biotechnol Lett* **11**, 709-711.

246. **Wada, A., Yamazaki, Y., Fujita, N. & Ishihama, A. (1990)**. Structure and probable genetic location of a "ribosome modulation factor" associated with 100S ribosomes in stationary-phase *Escherichia coli* cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 2657-2661.

247. **Watson, N., Dunyak, D. S., Rosey, E. L., Slonczewski, J. L. & Olson, E. R. (1992)**. Identification of elements involved in transcriptional regulation of the *Escherichia coli cad* operon by external pH. *J Bacteriol* **174**, 530-540.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

248. **Wei, Z. M., Sneath, B. J. & Beer, S. V. (1992)**. Expression of *Erwinia amylovora hrp* genes in response to environmental stimuli. *J Bacteriol* **174**, 1875-1882.

249. **White, S., Tuttle, F. E., Blankenhorn, D., Dosch, D. C. & Slonczewski, J. L. (1992)**. pH dependence and gene structure of *inaA* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**, 1537-1543.

250. **Whitehead, W. E., Ayers, J. W. & Sandine, W. E. (1993)**. A review of starter media for cheese making. *J Dairy Sci* **76**, 2344-2353.

251. **Wilson, C. D. & Salt, G. F. H. (1978)**. The pattern of streptococcal disease in man. *in* "Streptococci", 143-156 pp. Ed. Skinner, F. A. & Quesnel, L. B. London. Academic Press.

252. **Winans, S., Ebert, P., Stachel, S., Gordon, M. & Nester, E. (1986)**. A gene essential for *Agrobacterium* virulence is homologous to a family of positive regulatory loci. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 8278-8282.

253. **Winans, S. C. (1990)**. Transcriptional induction of an *Agrobacterium* regulatory gene at promoter by plant-released phenotic compounds, phosphate starvation and acidic growth media. *J Bacteriol* **172**, 2433-2438.

254. **Winans, S. C. (1992)**. Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol Rev* **56**, 12-31.

255. **Wistow, G. (1990)**. Cold shock and DNA binding. *Nature* **344**, 823-824.

256. **Woodcock, S., Mornon, J. P. & Henrissat, B. (1992)**. Detection of secondary structure elements in proteins by hydrophobic cluster analysis. *Protein Eng* **5**, 629-635.

257. **Yamamori, T., Ito, K., Nakamura, Y. & Yura, T. (1978)**. Transient regulation of protein synthesis in Escherichia coli upon shift-up of growth temperature. *J Bacteriol* **134**, 1133-1140.

258. **Yura, T., Nagai, H. & Mori, H. (1993)**. Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **47**, 321-350.

259. **Zevaco, C., Monnet, V. & Gripon, C. (1990)**. Intracellular X-prolyl dipeptidyl peptidase of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* : purification and properties. *J Appl Bacteriol* **68**, 357-366.

260. **Zuber, U. & Schumann, W. (1994)**. CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**, 1359-1363.

Université HENRI POINCARÉ
NANCY 1

Nom : **GONZALEZ MARQUEZ**

Prénom : **Humberto**

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY-I

en BIOCHIMIE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 16 JUIN 1997 UHP 047/97

Le Président de l'Université

J.P. FINANCE

3C-F9

UNIVERSITE HENRI POINCARE NANCY I
24-30, rue Lionnois B.P.3069 54013 Nancy cedex
Tél : 83 32 81 81 Fax : 83 32 95 90
Adresse électronique : _____ @presn1.u-nancy.fr

Résumé

Streptococcus thermophilus est une bactérie lactique d'un grand intérêt technologique. Elle a suivi différentes pressions de sélection (stress) lors des protocoles de fabrication; par exemple, les montées et descentes de la température et l'acidification du milieu.

Dans ce travail, nous mettons en évidence, dans un premier temps, que *Streptococcus thermophilus* PB18 surexprime une protéine de masse moléculaire apparente de 16 kDa quand elle arrive en phase stationnaire de croissance en milieu M17 (lactose 20g/l, pH≤5). Nous avons également observé que cette protéine est exprimée quand la croissance est arrêtée brusquement par addition d'acide lactique exogène, afin d'obtenir un pH inférieur à 5,0. Des études d'électrophorèse bidimensionnelle ont montré que cette protéine correspond à une famille de 4 spots protéiques dont le point isoélectrique est compris entre 5 et 5,5 unités de pH.

Dans un second temps, les extrémités N-terminale des deux spots principaux obtenus en électrophorèse bidimensionnelle ont été séquencées. Les séquences se sont révélées identiques entre elles. La comparaison de la séquence avec les banques de données a permis de montrer l'identité avec la séquence d'une protéine hypothétique de la souche japonaise de *S. thermophilus* No. 29 codée par le plasmide de 3,5 Kb, pST1.

Enfin, nous avons mis au point un protocole de purification qui nous a permis de d'obtenir cette protéine avec une haute homogénéité relative. Le protocole présente quatre étapes de purification : 1) Précipitation des protéines au sulfate d'ammonium, 2) Chromatographie d'échange anionique (DEAE-TSK), 3) Chromatographie de phase inverse sur une colonne C4 et 4) Chromatographie de phase inverse isocratique. La première avec un gradient en acétonitrile et le deuxième isocratique. La séquence putative de la protéine de 16 kDa a été vérifiée par spectrométrie de masse et par dégradation d'Edman des fragments d'hydrolyse avec la trypsine et l'endoprotéase Arg-C.

Une étude comparative des séquence a montré que la protéine de 16 kDa serait homologue à des protéines de choc thermique de Classe I chez les végétaux, et plus spécifiquement à la famille des Hsp20. Ceci est la troisième petite protéine de choc thermique de Classe I décrite pour des bactéries après la Hsp18 de *Clostridium acetobutylicum* et son homologue de *Lactobacillus delbrueckii*.

MOTS-CLEFS

Streptococcus thermophilus, choc acide, environnement acide, Hsp20, électrophorèse bidimensionnelle, petite Hsp.