



HAL
open science

**Streptococcus thermophilus : réponses physiologiques
aux températures basses et étude de deux protéines de
choc froid ; premières étapes de la cartographie
protéomique**

Clarisse Perrin

► **To cite this version:**

Clarisse Perrin. Streptococcus thermophilus : réponses physiologiques aux températures basses et étude de deux protéines de choc froid ; premières étapes de la cartographie protéomique. Biochimie [q-bio.BM]. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1999. Français. NNT : 1999NAN10267 . tel-01747553

HAL Id: tel-01747553

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747553v1>

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.



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

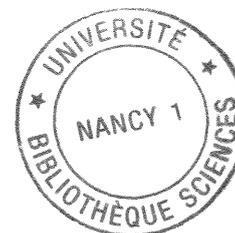
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



FACULTE DES SCIENCES

U.F.R. Sciences et Techniques biologiques
Ecole Doctorale Biologie et Santé



Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I

en Biochimie

par

Clarisse PERRIN

***Streptococcus thermophilus* :**

**Réponses physiologiques aux températures basses
et étude de deux protéines de choc froid ;**

Premières étapes de la cartographie protéomique.

Soutenance publique le 4 novembre 1999 devant la commission d'examen

Président : M. Jean-Luc GAILLARD Professeur, Université Henri Poincaré-Nancy I

Rapporteurs : M. Yannick AUFFRAY Professeur, Université de Caen
M. Jean GUZZO Professeur, Université de Bourgogne

Examineurs : M. Patrice BRACQUART Professeur, Université Henri Poincaré-Nancy I
M. Michel DESMAZEAUD Directeur de Recherche, INRA Jouy-en-Josas
Mme Christiane GUIMONT Maître de Conférences, Université Henri Poincaré-Nancy I
M. Michel HEBRAUD Chargé de Recherche, INRA Theix

Avant - propos

Ce travail a été réalisé au Laboratoire des BioSciences de l'Aliment des Professeurs Guy Linden et Jean-Luc Gaillard. Je les remercie de m'y avoir accueillie. Je suis très reconnaissante au Professeur G. Linden de m'avoir fait confiance et donné les moyens de réaliser ce travail dans de bonnes conditions. Je tiens à remercier le Professeur J-Luc Gaillard pour avoir prolongé cette aide et de m'avoir épaulée notamment lors des corrections de ce mémoire et des différents articles.

Je remercie le Professeur Patrice Bracquart d'avoir encadré ces travaux et corrigé ce mémoire durant cet été.

Je suis particulièrement reconnaissante à Mme Christiane Guimont de m'avoir proposé mon premier sujet de stage au Laboratoire des BioSciences de l'Aliment, et d'avoir co-encadré avec intérêt tous ces travaux.

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

Monsieur Yannick AUFFRAY Professeur à l'Université de Caen

Monsieur Jean GUZZO Professeur à l'Université de Bourgogne

Monsieur Michel DESMAZEAUD Directeur de Recherche à l' INRA de Jouy-en-Josas

Monsieur Michel HEBRAUD Chargé de Recherche à l'INRA de Theix

Un grand merci "direction Mexico" à Humberto Gonzalez-Marquez avec qui j'ai partagé mes premiers doutes et premières joies liés à la recherche et qui m'a convaincue de poursuivre dans cette voie.

Mes remerciements s'adressent également à Chantal Poirson, Franck Saulnier et Jean-Michel Girardet pour leur soutien et leur aide technique.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont guidée lors de mes premiers pas en enseignement, notamment Marie-France Guingamp et Laurent Miclo à l'IUT ; Alain Driou et Anne Lagrange à la Faculté des Sciences.

Enfin, merci à tous les membres du Laboratoire des BioSciences de l'Aliment pour leur soutien et leur bonne humeur : Mustapha Blel, Sylvie Campagna, Antônio Silvio do Egito, Gérard Humbert, Henni Palupi, Katy Poiret, Thierry Saint-Denis, Corinne Scheider, Jérôme Tausin, Dominique Tscheiller, sans oublier les "anciens" et les stagiaires qui m'ont été confiés au cours de cette thèse.

Enfin, je tiens à remercier les proches qui m'ont soutenue tout au long de mes études.

Abréviations

1D	:	Monodimensionnelle
2D	:	Bidimensionnelle
A_{xxx}	:	Absorbance à XXX nm
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ARNm	:	Acide ribonucléique messenger
ATP	:	Adénosine triphosphate
Bis	:	N,N'-méthylène-bis-acrylamide
BLAST	:	"Basic Local Alignment Search Tool"
BSA	:	"Bovine serum albumine "
C	:	Rapport en % de la masse de "crosslinker" (Bisacrylamide ou Pipérazine diacrylamide) sur la masse totale (acrylamide + crosslinker)
CIP	:	"Cold Induced Protein"
cpm	:	Coup par minute
Csp	:	"Cold shock protein"
DTT	:	Dithiothréitol
D.O._{xxx nm}	:	Densité optique à XXX nm
HPLC	:	"high performance liquid chromatography " (chromatographie liquide haute performance)
Hsp	:	"Heat Shock Protein"
IEF	:	Isoélectrofocalisation
IPG	:	"Immobilized pH gradient"

Mr	:	Masse moléculaire relative
p/v	:	Rapport poids sur volume
PAGE	:	"Polyacrylamide gel electrophoresis" (électrophorèse en gel de polyacrylamide)
PDA	:	Piperazine diacrylamide
pHe	:	pH extracellulaire
pI	:	Point Isoélectrique
PVDF	:	Polyvinylidene difluoride
qsp	:	Quantité suffisante pour
SDS	:	Sodium dodécylsulfate
T	:	Rapport en % de la masse (acrylamide + crosslinker) sur le volume de tampon
TBS	:	"Tris buffer saline"
TCA	:	Acide trichloroacétique
TEMED	:	N,N,N',N'-tetra methylethylenediamine
TFA	:	Acide trifluoroacétique
Tris	:	α,α,α -tris(hydroxyméthyl) méthylamine
UFC	:	Unité formant colonie
UTR	:	"untranslated region" (région non traduite)
UV	:	Ultraviolet
v/v	:	Rapport volume sur volume

Table des matières

Avant - propos.....	2
Abréviations.....	4
Table des Matières.....	6
Table des Figures.....	11
Table des Tableaux.....	14
I. Synthèse Bibliographique.....	15
1. Les bactéries lactiques.....	16
1.1. Caractéristiques générales.....	16
1.2. <i>Streptococcus thermophilus</i>	18
1.2.1. Présentation générale.....	22
1.2.2. Métabolisme du lactose.....	23
2. Réponses bactériennes aux facteurs environnementaux.....	26
2.1. Réponse au stress chaud chez <i>E. coli</i>	26
2.1.1. Régulation de l'expression des gènes de heat shock d' <i>E. coli</i>	29
2.1.2. Protéines de choc chaud chez <i>E. coli</i>	31
2.1.2.1. HSP60 et HSP10.....	31
2.1.2.2. DnaK, DnaJ et GrpE.....	32
2.1.2.3. Quelques protéases.....	32
2.1.2.4. Le facteur σ_{32}	32
2.2. Réponse au stress chaud chez <i>B. subtilis</i>	33
2.3. Réponse au stress chaud chez les ferments lactiques.....	35
2.3.1. Rôles des principales Hsp chez <i>Lc. lactis</i>	36
2.3.2. Régulation de l'expression des gènes "heat shock" de <i>Lc. lactis</i>	36
2.3.3. Réponse au choc thermique d'autres ferments lactiques.....	37
2.3.3.1. Chez <i>Lactobacillus</i>	37
2.1.3.2. Chez <i>Sc. thermophilus</i>	37
2.3.4. Expression de smHsp chez les ferments lactiques.....	38
2.4. Réponse au stress acide.....	41
2.4.1. Chez les bactéries lactiques.....	42
2.4.2. Gènes impliqués dans la réponse au choc acide.....	44
2.5. Réponse au stress froid chez les bactéries.....	45
2.5.1. Chez des bactéries mésophiles comme <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i>	46
2.5.1.1. Protéines induites par le choc froid.....	46
2.5.1.2. La protéine CspA.....	50
2.5.1.2.1. Régulation de la synthèse de CspA au niveau transcriptionnel... 50	

2.5.1.2.2. Régulation au niveau post-transcriptionnel - Stabilité des ARNm des protéines de classe I	50
2.5.1.2.3. Contrôle de la réponse au choc froid au niveau traductionnel.....	52
2.5.1.2.4. Intervention du (p)ppGpp	56
2.5.1.2.5. Rôles de CspA	57
<i>CspA : protéine RNA chaperonne</i>	57
<i>CspA : activateur transcriptionnel</i>	57
2.5.1.2.6. Régulation fine du gène de <i>cspA</i>	59
<i>au niveau transcriptionnel</i>	59
<i>au niveau post-transcriptionnel</i>	59
<i>au niveau traductionnel</i>	61
2.5.1.2.7. Structure de la protéine CspA et ses homologues	63
2.5.1.3. Superenroulement de l'ADN et régulation thermique de la synthèse des acides gras insaturés	68
2.5.2. Réponse au choc froid chez les bactéries psychrophiles et psychrotrophes	69
2.5.2.1. Synthèse de protéines d'acclimatation au froid	69
2.5.2.2. CspA homologue chez les bactéries psychrotrophes.....	71
2.5.3. Choc froid chez les bactéries lactiques.....	73
2.5.3.1. Réponse au choc froid chez <i>Lc. lactis</i>	73
2.5.3.2. Réponse au choc froid chez <i>Lb. plantarum</i>	73
2.5.3.2. Gène de la protéine majeure de choc froid	74
2.5.3.3. Cryotolérance.....	74
2.6. Comment aborder la réponse à un choc	75
2.6.1. Recherche des gènes impliqués dans la réponse aux stress	75
2.6.1.1. Mutagénèse par transposition	75
2.6.1.2. Recherche d'un gène "connu"	77
2.6.2. Abondance d'ARNm	78
2.6.3. Abondance de certains métabolites.....	78
2.6.4. Expression protéique	78
3. Le Protéome	79
3.1 Historique	79
3.2. Méthodologie de l'électrophorèse bidimensionnelle	80
3.2.1. Méthodologies utilisées pour la première dimension	80
3.2.1.1. La méthode d'O'Farrell.....	80
3.2.1.2. La méthode du gradient de pH immobilisé	81
3.2.2. Méthodologie pour la deuxième dimension	81
3.3. Essor de l'électrophorèse bidimensionnelle	82
3.4. Intérêt de l'étude protéomique.....	82
II. Objectifs du travail	88
III. Matériel et Méthodes	91
1. Matériel et réactifs	92
1.1. Chromatographie.....	92
1.2. Electrophorèse	93
1.3. Séquençage	93

1.4. Matériels divers	93
1.5. Réactifs divers.....	93
2. Souches et milieux de culture	95
2.1. Souches	95
2.2. Milieux de culture	96
2.3. Conditions de culture.....	96
2.4. Recherche des activités enzymatiques par le système API-ZYM.....	98
3. Préparation des extraits bactériens	98
3.1. Obtention des protéines solubles totales.....	98
3.2. Marquage des protéines.....	99
3.3. Purification des protéines issues de choc froid	99
3.3.1. Précipitations successives au sulfate d'ammonium	100
3.3.2. Chromatographie basse pression	100
3.3.3. HPLC en phase inverse analytique.....	102
4. Techniques électrophorétiques	103
4.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de S.D.S. (PAGE-SDS)	103
4.2. Electrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE-)	106
4.2.1. Principe.....	106
4.2.2. Préparation des différentes solutions pour la 2D-PAGE	107
4.2.2.1. Solution stock pour IEF	107
4.2.2.2. Solution de remplissage des capillaires	108
4.2.2.3. Solution d'équilibrage	108
4.2.3. Déroulement de la 2D-PAGE.....	108
4.3. Transfert des protéines sur membrane (Western blot).....	110
4.4. Standards de masses moléculaires.....	110
4.5. Révélation des protéines dans un gel	113
4.5.1. Coloration au bleu de Coomassie R250	113
4.5.2. Révélation au nitrate d'argent.....	113
4.5.3. Révélation au sulfate de zinc	114
4.6. Révélation des protéines sur membrane.....	115
4.6.1. Coloration au bleu de Coomassie.....	115
4.6.2. Immunodétection	115
4.7. Autoradiographie	116
4.8. Electrophorèse capillaire	116
4.8.1. Principe de l'électrophorèse capillaire	117
4.8.1.1. Dosage des glucides	117
4.8.1.2. Dosage des acides organiques	117
5. Séquençage de l'extrémité N-terminale par dégradation d'Edman	119
5.1. Le couplage.....	119

5.2. Le clivage	119
5.3. La conversion	120
6. Composition en résidus acides aminés <i>in situ</i> dans le gel.....	120
7. Digestion trypsique	120
8. Analyseur d'image	122
8.1. Acquisition des images.....	122
8.2. Exploitation des images	122
9. Banques de données.....	123
IV. Résultats et Discussions	125
Chapitre 1. Réponse physiologique à des conditions de culture à températures basses chez <i>Sc. thermophilus</i> PB18 et Y105	126
1.1. Etude de la croissance de PB18 et Y105 à la température optimale.....	126
1.1.1. Caractéristiques de la souche Y105	126
1.1.2. Caractéristiques de la souche PB18	127
1.1.3. Caractéristiques de croissance de PB18 et Y105.....	129
1.2. Réponse physiologique à des conditions de températures basses.....	132
1.2.1. Etudes préliminaires	132
1.2.2. Paramètres physiologiques de <i>Sc. thermophilus</i> à 15 et 20°C en conditions de choc.....	134
1.2.3. Réponse physiologique à 15°C – Comparaison entre choc et transfert.	136
1.3. Discussion	141
Chapitre 2. Etude des profils électrophorétiques des protéines solubles totales de <i>Sc. thermophilus</i> soumis à des conditions de choc froid	144
2.1. Profils monodimensionnels pour l'étude de l'expression protéique de <i>Sc. thermophilus</i> en condition de température basse	144
2.2. Profils électrophorétiques bidimensionnels obtenus avec <i>Sc. thermophilus</i>	150
2.2.1. Recherche des paramètres pI et Mr des protéines de <i>Sc. thermophilus</i>	150
2.2.2. Profils protéiques en 2D-PAGE de PB18 en phase exponentielle de croissance et après un choc froid	152
2.2.3. Analyse du changement de l'expression protéique par 2D-PAGE.....	155
2.3. Discussion	158
Chapitre 3. Fractionnement des protéines solubles totales de <i>Sc. thermophilus</i> cultivé en condition de choc froid - Caractérisation de deux protéines de choc froid.....	165
3.1. Obtention des protéines solubles	165
3.2. Fractionnement au sulfate d'ammonium.....	165
3.3. Purification de la protéine de 21,5 kDa.....	167

3.3.1 Mise en évidence de la protéine de 21,5 kDa après Chromatographie sur DEAE cellulose	167
3.3.2. Séquençage de la protéine de 21,5 kDa à partir de "blots"	171
3.3.2.1. Transfert à partir d'un gel monodimensionnel	171
3.3.2.2. Transfert à partir d'un gel bidimensionnel	174
3.3.3. Purification par Chromatographie HPLC en phase inverse de la protéine de 21,5 kDa	176
3.4. Recherche d'une protéine de 7,5 kDa	181
3.4.1. Chromatographie en phosphocellulose	181
3.4.2. Chromatographie sur DEAE cellulose	184
3.4.2.1. Essai de séquençage de la protéine	184
3.4.2.2. Etude à l'aide d'un anticorps dirigé contre CapB de <i>Pseudomonas fragi</i>	186
3.4.2.3. Composition en acides aminés	189
3.4.2.4. Séquençage de la protéine de 7,5 kDa	191
3.5. Discussion	193
Chapitre 4. Début de cartographie des protéines totales de <i>Sc. thermophilus</i>	197
4.1. Caractérisation de quelques protéines localisées sur 2D-PAGE	197
4.1.1. Protéines issues de chromatographies réalisées durant le présent travail	201
4.1.1.1. Protéine non identifiée de 21,5 kDa	201
4.1.1.2. La protéine "HU like"	201
4.1.1.3. La protéine de choc froid	201
4.1.1.4. La protéine ribosomale L7/L12	201
4.1.1.5. La β -galactosidase	203
4.1.2. Protéines isolées à partir de fractions purifiées antérieurement	204
4.1.2.1. "Acid shock protein".	204
4.1.2.2. Chaperonine GroEL	208
4.1.2.3. La phosphoglycérate kinase	208
4.1.2.4. La glycéraldéhyde 3-phosphate deshydrogénase	209
4.1.2.5. La fructose 1,6-diphosphate aldolase	209
4.1.2.6. La superoxide dismutase	210
4.1.2.7. Protéine inconnue	210
4.2. Application : comparaison des autoradiographies de profils protéiques bidimensionnels de deux souches de <i>Sc. thermophilus</i> PB18 et Y105	211
4.3. Discussion	211
V. Conclusions et Perspectives	218
VI. Références Bibliographiques	226
VII. Annexe	247
VIII. Liste des Publications et Communications	251

Table des Figures

Figure 1. Voies métaboliques de la plupart des bactéries lactiques.	20
Figure 2. Dendrogramme représentant les relations phylogéniques des principales espèces de streptocoques	21
Figure 3. Schéma de la glycolyse.....	25
Figure 4. Modèle de régulation de l'expression des gènes de "heat shock" chez <i>Escherichia coli</i>	30
Figure 5. Schéma récapitulatif de la régulation des gènes de choc thermique de classe I chez <i>B. subtilis</i>	34
Figure 6. Alignements de séquences des smHsp de <i>Sc. thermophilus</i>	40
Figure 7. Alignements des séquences protéiques de CspA, CspB, CspC, CspD, CspE, CspF, CspG, CspH, CspI	49
Figure 8. Structure secondaire putative de la région non traduite de l'ARNm <i>cspA</i>	51
Figure 9. Réponse aux chocs thermiques chez <i>E. coli</i>	54
Figure 10. Modèle d'adaptation des ribosomes au choc froid	55
Figure 11. Modèle hypothétique de la fonction " RNA chaperone" de la protéine de choc froid Csp, couplant la transcription par l'ARN polymérase et l'initiation de la traduction	58
Figure 12. A. Alignements de séquences des membres de la famille CspA et des protéines eucaryotes Y-Box ayant des domaines dits de "cold shock". B. Homologies de domaines CSD de la protéine YB1 humaines et de CspA d' <i>E. coli</i>	60
Figure 13. Complémentarité entre l'ARNr 16S et une séquence juste en aval du codon d'initiation de <i>cspA</i>	63
Figure 14. Schéma récapitulatif de la régulation fine de l'expression de CspA	64
Figure 15. Structures tridimensionnelles A : CspA d' <i>E. coli</i> B : CspB de <i>B. subtilis</i>	65
Figure 16. Schéma des 5 brins β de la protéine CspA d' <i>E. coli</i>	67
Figure 17. Schéma récapitulatif de la réponse au choc froid chez <i>E. coli</i> et d'autres bactéries mésophiles.....	76
Figure 18. Cartographie bidimensionnelle d' <i>Escherichia coli</i> sur le site SWISS-2DPAGE avec certains spots identifiés.....	87
Figure 19. Obtention des protéines solubles totales pour analyse électrophorétique mono et bidimensionnelle	104
Figure 20. Principales étapes de l'électrophorèse bidimensionnelle	109
Figure 21. Electrotransfert des protéines incluses dans un gel sur une membrane 109PVDF.....	111
Figure 22. Schéma de l'électrophorèse capillaire	118

Figure 23. Electrophorèse monodimensionnelle des protéines solubles totales de <i>Sc. thermophilus</i> Y105 et PB18 cultivées à 42°C.....	128
Figure 24. Courbes de croissance (a) et d'acidification (b) de <i>Sc. thermophilus</i> PB18 et Y105 à température optimale de croissance à 42°C	130
Figure 25. Profils obtenus par électrophorèse capillaire de l'évolution de la concentration du lactose et du galactose dans le milieu de culture, lors d'une croissance de <i>Sc. thermophilus</i> PB18.....	133
Figure 26. Réponses physiologiques de <i>Sc. thermophilus</i> à un choc froid.....	137
Figure 27. Réponses physiologiques de <i>Sc. thermophilus</i> à 15°C dans des conditions de choc et de transfert	139
Figure 28. Electrophorèse monodimensionnelle des protéines solubles totales de la souche <i>Sc. thermophilus</i> PB18 soumise à un choc à températures de 15 ou de 20°C	145
Figure 29. Electrophorèse monodimensionnelle des protéines solubles totales de <i>Sc. thermophilus</i>	147
Figure 30. Autoradiographie du profil monodimensionnel des protéines solubles totales de <i>Sc. thermophilus</i> marquées à la ³⁵ S-Met	148
Figure 31. Electrophorèse monodimensionnelle des protéines solubles totales de PB18 colorées soit au bleu de Coomassie R250, soit à l'argent	149
Figure 32. Profils électrophorétiques bidimensionnels	151
Figure 33. Cartographie des protéines choisies comme marqueurs internes de <i>Sc. thermophilus</i> PB18.....	153
Figure 34. 2D-PAGE des protéines solubles totales de <i>Sc. thermophilus</i> PB18 cultivé en phase exponentielle de croissance et en conditions de choc froid.....	156
Figure 35. Autoradiographies de 2D-PAGE des protéines de <i>Sc. thermophilus</i> Y105 marquées à la [³⁵ S-Met].....	157
Figure 36. Différentes étapes de purification permettant l'obtention de trois protéines en vue de leur identification	166
Figure 37. Profil électrophorétique monodimensionnel de certaines fractions obtenues après précipitation au sulfate d'ammonium des protéines solubles totales de <i>Sc. thermophilus</i> ayant subi un choc froid de 20 h à 15°C.....	169
Figure 38. Profil électrophorétique monodimensionnel des fractions protéiques 18 à 28 issues de la séparation chromatographique sur DEAE cellulose	170
Figure 39. Profils électrophorétiques bidimensionnels des protéines solubles totales de <i>Sc. thermophilus</i> (A) et des protéines issues du mélange des fractions n°22-23 de la chromatographie sur DEAE cellulose (B).....	172
Figure 40. Profil électrophorétique monodimensionnel du mélange des fractions DEAE cellulose n°22-23	173
Figure 41. Séquences de l'extrémité N-terminale de la protéine de 21,5 kDa	175
Figure 42. Séparation par HPLC en phase inverse des protéines du mélange des fractions DEAE 22-23.....	177
Figure 43. Séquences nucléotidiques potentielles de l'extrémité N-terminale de la protéine de 21,5 kDa	180

Figure 44. Profils électrophorétiques des fractions protéiques issues de la chromatographie sur phosphocellulose de la fraction 100% de saturation en sulfate d'ammonium.....	183
Figure 45. Séquence de la bande protéique A obtenue après 1D-PAGE de la fraction 32 sortie de la phosphocellulose	185
Figure 46. Profil électrophorétique bidimensionnel de la fraction 26 issue de DEAE cellulose	187
Figure 47. Révélation immunologique avec l'anticorps dirigé contre CapB de <i>P. fragi</i>	188
Figure 48. Alignements multiples de séquences de l'extrémité N-terminale de protéines de choc froid Csps homologues à la protéine de 7,5 kDa de <i>Sc. thermophilus</i>	192
Figure 49. Alignements de la séquence de protéines de choc froid (Csps) homologues à une séquence hypothétique de 61 résidus acides aminé de la protéine de 7,5 kDa	196
Figure 50. Profil protéique bidimensionnel des protéines solubles totales de <i>Sc. thermophilus</i> PB18 cultivés à 42°C.....	198
Figure 51. Récapitulatif des différentes étapes de purifications pour obtenir les protéines séquencées à partir des fractions obtenues lors de ces travaux	202
Figure 52. Récapitulatif des différents pas de purification réalisés lors d'un précédent travail.....	205
Figure 53. Profil monodimensionnel de fractions issues de chromatographie DEAE cellulose	206
Figure 54. Cartographie de la fructose-1,6-diphosphate aldolase	207
Figure 55. Comparaison d'autoradiographies (2D-PAGE) de <i>Sc. thermophilus</i> Y105 et PB18	212

Table des Tableaux

Tableau 1. Caractéristiques de quelques bactéries lactiques utilisées en industrie alimentaire	19
Tableau 2. Utilisation de divers composés carbonés	24
Tableau 3. Quelques Hsps décrites	28
Tableau 4. Récapitulatif partiel des résultats de la recherche de séquences homologues à la protéine de 16,4 kDa de <i>Sc. thermophilus</i> par BLAST	39
Tableau 5. Protéines de choc froid (CIP) chez <i>E. coli</i>	48
Tableau 6. Classement des bactéries selon leur température de croissance	70
Tableau 7. Quelques outils informatiques pour l'identification des protéines	85
Tableau 8. Quelques banques de données proposant des 2D-PAGE	86
Tableau 9. Composition et utilisation des milieux de culture	97
Tableau 10. Quantité de sulfate d'ammonium à peser pour obtenir un % de saturation en sulfate d'ammonium.....	101
Tableau 11. Comparaison des paramètres physiologiques des souches <i>Sc. thermophilus</i> PB18 et Y105 cultivées à 42°C en milieu TPPY et M17.....	131
Tableau 12. Croissance et acidification des souches <i>Sc. thermophilus</i> PB18 et Y105 dans différentes conditions de culture à basses températures	135
Tableau 13. Paramètres physiologiques des souches de <i>Sc. thermophilus</i> PB18 et Y105, après un choc à 15 et 20°C.....	138
Tableau 14. Valeurs de <i>pI</i> et <i>Mr</i> des protéines marqueurs interne choisies.....	154
Tableau 15. <i>Mr</i> et <i>pI</i> apparents des protéines dont l'expression a changé chez <i>Sc. thermophilus</i> Y105 après le choc froid.	159
Tableau 16. Distribution des protéines dans chaque fraction issue de la précipitation au sulfate d'ammonium.....	168
Tableau 17. Composition en acides aminés de la protéine de 7,5 kDa comparée à celle de <i>Lc. lactis</i> et <i>Lb. plantarum</i>	190
Tableau 18. Séquence N-terminale, et paramètres apparents (<i>pI</i> et <i>Mr</i>) des spots protéiques (1 à 12) obtenus par 2D-PAGE	199
Tableau 19. Identification, caractéristiques de chaque spot protéique et comparaison des valeurs de <i>pI</i> et <i>Mr</i> apparents des spots protéiques avec ceux des protéines homologues	200

I. Synthèse Bibliographique

1. Les bactéries lactiques

1.1. Caractéristiques générales

Les bactéries lactiques au sens large sont caractérisées par la production d'acide lactique comme produit majeur de la fermentation des glucides. Elles réunissent des bactéries dont l'enjeu économique est important à plusieurs titres (Dellaglio *et al.*, 1994) :

- d'une part, elles interviennent dans des processus de fermentations ou d'altérations de produits agro-alimentaires (*Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Oenococcus oeni*....)
- d'autre part, de nombreuses espèces ont un caractère pathogène pour l'homme ou pour les animaux (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, etc....) (Aguirre and Collins 1993).

Nous nous intéresserons plus particulièrement aux espèces utilisées dans l'industrie agro-alimentaire, et souvent dénommées "ferments lactiques". Ces espèces non pathogènes pour l'homme sont souvent qualifiées de l'acronyme anglais "GRAS" (generally recognized as safe species). Les ferments lactiques sont utilisés empiriquement par l'homme depuis plus de 4000 ans. Sans connaissance de bases scientifiques, les peuples ont utilisé ces micro-organismes pour produire des aliments ayant une plus longue conservation, des saveurs et textures différentes du produit de départ. Une large variété d'aliments et de boissons fait intervenir les ferments lactiques : certaines charcuteries, les olives, la choucroute, le vin, le cidre, la bière... Ils sont en particulier très présents dans les produits fermentés lactés comme les fromages, la crème, le beurre, le yaourt, le kéfir, le koumiss...

Les bactéries lactiques font naturellement partie de notre environnement et de notre alimentation. Outre leur intérêt biotechnologique, elles jouent un rôle important dans notre santé car elles constituent une fraction mineure de notre flore intestinale et tapissent les muqueuses nasale, buccale et vaginale, contribuant ainsi à nous protéger contre l'invasion de germes pathogènes.

Les bactéries lactiques sont des organismes unicellulaires (procaryotes) à Gram positif, se présentant sous forme de bâtonnets ou de coques, souvent groupés en chaînes (Dellaglio *et al.*, 1994). Elles sont anaérobies aérotolérantes. Comme d'autres bactéries, elles se multiplient rapidement, avec un temps de dédoublement allant de 30 à 90 minutes dans les conditions optimales de croissance. C'est un groupe hétérogène qui a comme caractéristique commune la capacité de fermenter les glucides (lactose, glucose, pentoses, ...) en acide lactique dont le pouvoir acidifiant empêche la prolifération de bactéries indésirables et permet ainsi la conservation des aliments. Elles peuvent tolérer des conditions de pH acides proches de 4 pendant quelques semaines.

Les critères de classification et la taxonomie de ce groupe ont beaucoup évolué depuis Orla-Jensen (1919) (Schleifer *et al.*, 1985 ; Stackebrandt et Teuber, 1988 ; Schleifer et Kilpper-Bälz, 1987 ; Gasser *et al.*, 1994 ; Curk *et al.*, 1994). Depuis l'avènement des méthodes génétiques et de la classification numérique, le nombre de genres s'est beaucoup multiplié.

Deux critères sont importants du point de vue technologique : homo ou hétérofermentation des glucides et température optimale de croissance (Aguirre et Collins, 1993 ; Dellaglio *et al.*, 1994).

Le produit final principal des espèces homofermentaires est l'acide lactique (70-90%). Les bactéries hétérofermentaires produisent d'autres composés comme l'acide acétique, le CO₂ et l'éthanol, en plus de l'acide lactique (50%). Les ferments mésophiles

croissent à des températures proches de 25 à 30°C, et les thermophiles entre 40 et 44°C (Tableau 1).

Les bactéries lactiques sont des bactéries nutritionnellement exigeantes, qui nécessitent des apports en nutriments variés et complexes (Desmazeaud et de Roissart, 1994). Elles requièrent du lactose ou du glucose comme source de carbone et d'énergie pour produire l'ATP. L'azote utile à la synthèse protéique est fourni par des protéines (du lait par exemple), des peptides, des acides aminés spécifiques ou des dérivés d'acides nucléiques. Quelques vitamines, en particulier les vitamines B, sont souvent nécessaires (de Roissart et Luquet, 1994). La figure 1 montre les principales voies du métabolisme des glucides et de l'azote chez les bactéries lactiques.

1.2. *Streptococcus thermophilus*

Le genre *Streptococcus* qui renfermait toutes les coques à Gram positif homofermentaires, a été divisé en plusieurs genres distincts et phylogénétiquement éloignés : *Streptococcus* (37 espèces et sous-espèces), *Abiotrophia* (3 espèces), *Aerococcus* (2 espèces), *Dolosigranulum* (1 espèce), *Alloiococcus* (1 espèce), *Enterococcus* (19 espèces), *Facklamia* (2 espèces), *Gemella* (2 espèces), *Globicatella* (1 espèce), *Helcococcus* (1 espèce), *Lactococcus* (7 espèces et sous-espèces), *Leuconostoc* (1 espèce), *Pediococcus* (5 espèces), *Tetragenococcus* (1 espèce), *Vagococcus* (2 espèces) (Schleifer et Klipper-Bälz, 1985 ; Schleifer *et al.*, 1987 ; Schlegel et Bouvet, 1998). Actuellement, le genre *Streptococcus* représente 38 espèces d'après Holt *et al.* (1994) et 37 espèces pour Schlegel et Bouvet (1998). Les homologues génomiques, appréciés par hybridation ADN/ADN ou comparaison des séquences des ARN ribosomiaux, ont permis d'évaluer les relations phylogéniques entre les différentes espèces (Figure 2) (Schlegel et Bouvet, 1998).

Tableau 1. Caractéristiques de quelques bactéries lactiques utilisées en industrie alimentaire.

Genre	Forme	T.opt *	Espèce	Produits finals majoritaires	Produits finals Minoritaires
<i>Streptococcus</i>	coques	40-44°C	<i>Sc. thermophilus</i>	L(+) ac. lactique	Acétaldéhyde, acétone, acétoïne, diacétyl, [éthanol]
<i>Lactobacillus</i>	bâtonnets	40-44°C	<i>Lb. bulgaricus</i>	D(-) ac. lactique	Acétaldéhyde, acétone, acétoïne, diacétyl, [éthanol]
			<i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. sakei</i> <i>Lb. curvatus</i>	DL ac. lactique	
			<i>Lb. lactis</i>	D(-) ac. lactique	Acétaldéhyde, acétone, diacétyl, [éthanol]
			<i>Lb. acidophilus</i>	DL ac. lactique	Acétaldéhyde, [éthanol]
		25-30°C	<i>Lb. casei</i>	L(+) ac. lactique	Ac. acétique, [éthanol]
			<i>Lb. kefir</i>	DL ac. lactique	Ac. acétique, acétaldéhyde, éthanol, CO ₂
<i>Lactococcus</i>	coques	25-30°C	<i>Lc. lactis</i>	L(+) ac. lactique	Acétaldéhyde, acétone, diacétyl, éthanol
			<i>Lc. cremoris</i>	L(+) ac. lactique	
			<i>Lc. diacetylactis</i>	L(+) ac. lactique, acétaldéhyde, CO ₂ , diacétyl, acétoïne,	Acétone, éthanol
<i>Pediococcus</i>	coques	25-30°C	<i>Pc. acidilactici</i>	DL ac. lactique	[Acétoïne, diacétyl]
<i>Leuconostoc</i>	ovoïdes	25-30°C	<i>Ln. cremoris</i>	D(-) ac. lactique,	Ethanol
			<i>Ln. dextranicum</i>	Acétoïne, ac. acétique	
			<i>Ln. lactis</i>	Diacétyl, CO ₂	

T.opt * = température optimale de croissance.

[] produits finals à l'état de traces

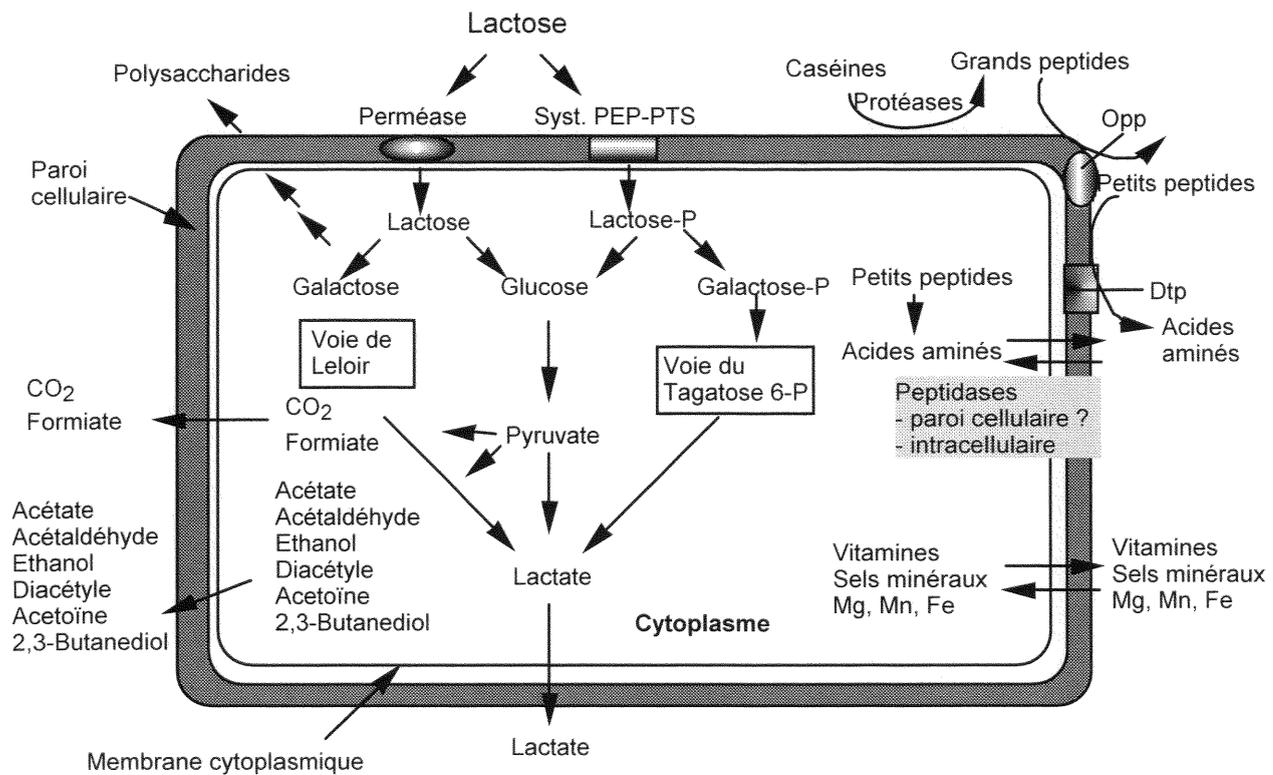


Figure 1. Voies métaboliques de la plupart des bactéries lactiques (d'après Poolman, 1993 ; Kunji *et al.*, 1996).

- Opp : Système de transport d'oligopeptides
- Dtp : Système de transport de di et tripeptides

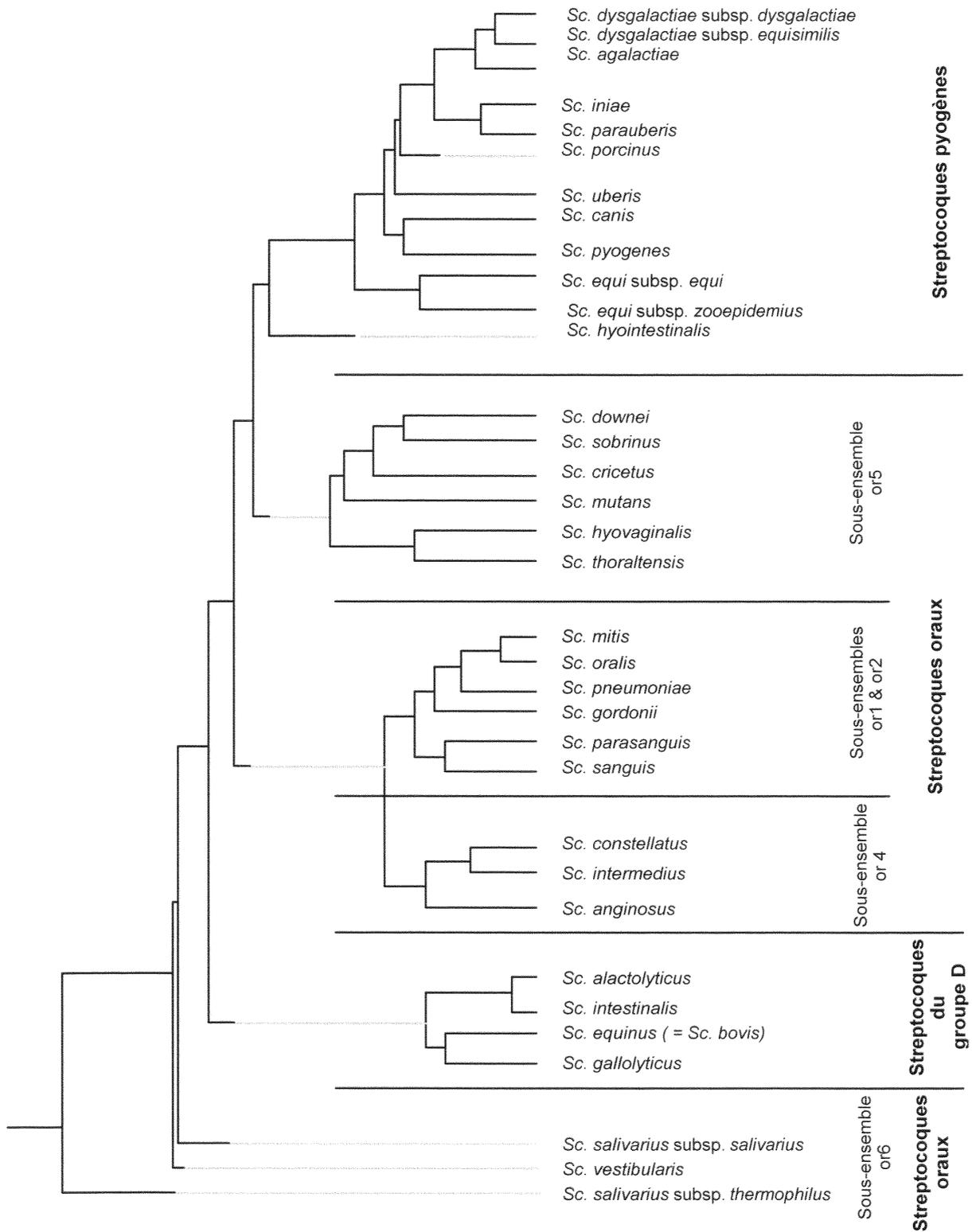


Figure 2. Dendrogramme représentant les relations phylogéniques des principales espèces de streptocoques (analyse de la séquence nucléotidique du gène de l'ARN ribosomal 16S) (Schlegel et Bouvet, 1998).

1.2.1. Présentation générale

Sc. thermophilus (Farrow et Collins, 1984 ; Hardie 1986, Schleifer *et al.*, 1991 ; Holt *et al.*, 1994) est la seule espèce du genre *Streptococcus* utilisée en industrie laitière ; elle est phylogénétiquement proche d'une espèce appartenant au groupe des streptocoques oraux : *Streptococcus salivarius* et fut un temps considérée comme une sous-espèce de cette bactérie. C'est une espèce modérément thermophile (optimum de température compris entre 37 et 44°C) entrant traditionnellement dans la fabrication des fromages à pâte pressée cuite et des laits fermentés, en particulier le yaourt. L'acide lactique produit, accumulé dans le lait, engendre une baisse de pH qui mène à la déstabilisation des micelles de caséines. En effet, les caséines précipitent au pH proche de 4,6, entraînant la coagulation du lait qui forme alors un gel. Depuis les années 1960, la production industrielle des laits fermentés connaît un développement international considérable.

D'après la législation française, la dénomination "yaourt" ou "yoghourt" est réservée au lait fermenté obtenu, selon les usages loyaux et constants, par le développement des seules bactéries lactiques thermophiles spécifiques *Lactobacillus bulgaricus* et *Sc. thermophilus*. Celles-ci doivent êtreensemencées simultanément et demeurer vivantes dans le produit fini, à raison d'au moins 10 millions de bactéries par gramme rapportées à la partie lactée (décret n°88-1203, 30 décembre 1988, art. 2, al. 1^{er}). Les industriels créent constamment de nouveaux produits, le yaourt étant perçu par le consommateur comme une image naturelle du lait, ayant des propriétés organoleptiques particulières, des qualités nutritionnelles reconnues et des effets positifs sur la santé (Mission scientifique de Syndifrais, 1997).

Les cellules de *Sc. thermophilus* sont ovoïdes, de 0,9 à 1,7 µm de diamètre, et sont groupées en chaînettes. C'est une bactérie homofermentaire, produisant de l'acide lactique L(+). *Sc. thermophilus* possède quelques propriétés physiologiques

particulières par rapport aux autres bactéries lactiques (Garvie, 1984 ; Jones, 1978 ; Lancefield, 1933 ; Schleifer *et al.*, 1985).

Cette espèce se caractérise en particulier par :

- l'absence d'antigène de Lancefield connu,
- sa température de croissance minimale de 19-21 °C,
- sa température optimale de croissance comprise entre 37 et 44°C,
- sa résistance au chauffage à 60°C pendant 30 min,
- son inaptitude à croître en présence de 4% de NaCl (parfois même à 2%),
- son inaptitude à croître à pH 9,6.

De plus, son profil fermentaire des glucides est très limité. La possibilité d'utilisation de différents composés carbonés est donnée dans le tableau 2.

1.2.2. Métabolisme du lactose

Contrairement aux lactocoques où le lactose est phosphorylé pendant sa translocation par l'intermédiaire d'un système PEP-PTS ("phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system") puis hydrolysé par une phospho- β -galactosidase, chez *Sc. thermophilus*, le transport du lactose se fait directement, selon un mode antiport, par le biais d'une perméase qui est codée par le gène *lacS* (Foucaud et Poolman, 1992). Le lactose, une fois dans la cellule va être scindé en glucose et galactose par une β -galactosidase. Le glucose va ensuite suivre la voie de Embden-Meyerhorf-Parnas (Figure 3) tandis que le galactose est excrété dans le milieu extracellulaire. Seules quelques souches de *Sc. thermophilus* peuvent fermenter le galactose, et ce une fois que la répression catabolique par le glucose est levée.

Tableau 2. Utilisation de divers composés carbonés.

L-Arginine	-
Urée	+ (en phase exponentielle de croissance)
Citrate	-
Glucose	+
Fructose	+
Lactose	+
Saccharose	+
Galactose	+/-
Mannitol, Xylitol	-
Arabinose, Ribose	-
Tréhalose, Maltose	-
Raffinose	-/+
Dextrines	-
Glycérol	-

Composé utilisé + : par plus de 90% des souches
 +/- : par plus de 50% des souches
 -/+ : par moins de 50% des souches
 - : par aucune souche

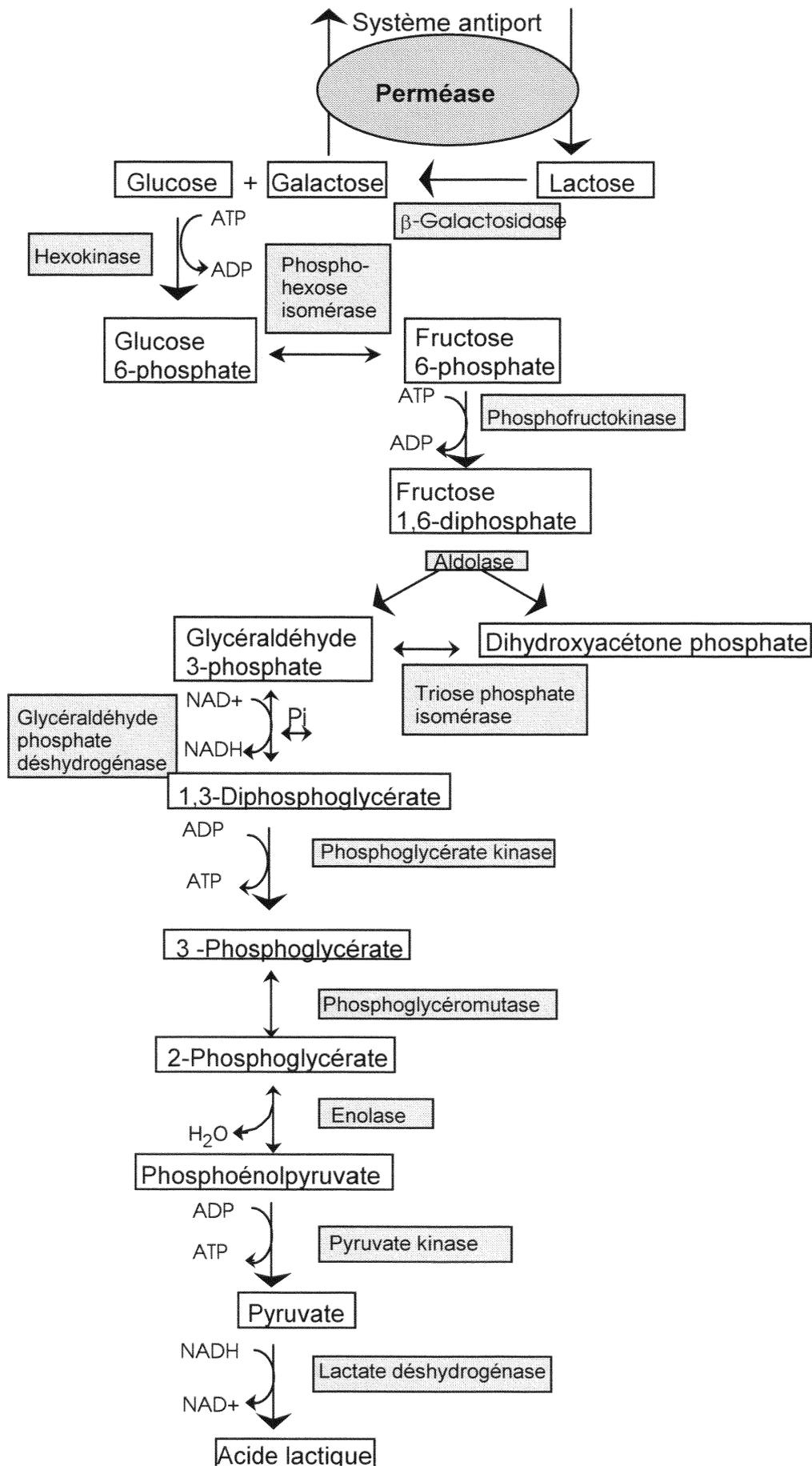


Figure 3. Schéma de la glycolyse d'après Thompson et Gentry-weeks, 1994.

2. Réponses bactériennes aux facteurs environnementaux

Le métabolisme d'une cellule vivante est l'ensemble des réactions de dégradation (catabolisme) et de synthèse (anabolisme) permettant d'établir un cycle d'échange avec le milieu environnant pour assurer sa survie, sa croissance et sa reproduction (Desmazeaud et De Roissart, 1994). La cellule bactérienne se trouve donc dans un état d'équilibre dynamique qui peut être rompu lors d'une modification physique ou chimique brutale du milieu environnant. La bactérie se trouve alors en état de stress.

Ces changements environnementaux peuvent être de diverses natures :

- température (baisse ou hausse),
- pH,
- force ionique,
- privation en nutriments, en oxygène,
- agent oxydant...

2.1. Réponse au stress chaud chez *E. coli*

La première observation de la réponse au stress chez un être vivant date de 1962. Ritossa laissa par inadvertance une préparation de glandes salivaires de drosophiles exposée à une source de chaleur. Il observa alors des boursouflures sur des chromosomes. Ces boursouflures furent ensuite expliquées par une activité transcriptionnelle inhabituelle et intense de certains gènes, amenant à la synthèse de nouvelles protéines appelées "*heat shock proteins*" ou Hsps. (Tissieres *et al.*, 1974). Ce changement de profil protéique consécutif à une hausse de température fut identifié chez d'autres espèces animales et végétales avant de l'être chez *Escherichia coli* (Lemeaux *et al.*, 1978 ; Yamamori *et al.*, 1978).

Chez les bactéries, la survie à un choc chaud sub-létal s'établit par la mise en place, quelques minutes seulement après le choc, de la synthèse de protéines de choc chaud et de dispositifs physiologiques temporaires. Ces dispositifs assurent une adaptation des voies métaboliques aux nouvelles contraintes extérieures. L'organisme augmente "naturellement" sa résistance à la chaleur. Cette amélioration phénotypique de la survie est appelée tolérance ; en condition de choc chaud, c'est la thermotolérance.

Cette réponse à l'augmentation de la température, couplant la réponse biochimique (synthèse des Hsps) et la réponse physiologique (thermotolérance), est universelle et est présente chez tous les êtres vivants. Après 1 à 2 heures, l'organisme retrouve son état de repos et est prêt à répondre à une nouvelle agression du milieu extérieur.

Les Hsps trouvées chez différents organismes sont généralement classées en familles selon leur masse moléculaire apparente déterminée par électrophorèse (Lindquist, 1986) (Tableau 3). La masse moléculaire de la protéase Lon est de 55 kDa chez *Lc. Lactis* alors qu'elle est de 87 ou 94 kDa chez *E. coli*. Même si les masses moléculaires de ces protéines sont différentes, leurs fonctions restent identiques. Les gènes codant pour ces protéines de choc présentes chez tous les organismes vivants sont donc apparus tôt dans l'évolution (Boutibonnes, 1996).

Les différentes protéines de choc thermiques assurent des fonctions similaires :

- dégradation des polypeptides anormaux par protéolyse,
- protection du dépliement des polypeptides : rôle de protéines chaperonnes,
- repliement des protéines immatures.

Tableau 3. Quelques Hsps décrites par Becker et Craig, 1994 ; Gething et Sambrook, 1992 ; Parsell et Lindquist, 1993 ; Auffray *et al.*, 1992 ; Boutibonnes, 1996).

Groupe	<i>E. coli</i>	<i>Lc. lactis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Drosophile	Mammifères	Végétaux
Hsp100	ClpB	ClpB**	Hsp104			
Hsp90	HtpG Lon (87 ou 94 kDa) ClpA (83kDa)	Lon * (55 kDa)	Hsp83 Hsc 83	Hsp 90	Hsp90 Grp94 (Re)	
Hsp70	DnaK HfIB	DnaK* HfIB ou FtsH	Ssa-4p	Hsp 68 Hsp 70 Hsc1,2,3	Hsp70 Hsc70 BiP (Re) Hsp70 (Mi)	
Hsp60	GroEL	GroEL*	Hsp60 (Mi)		Hsp60 (Mi)	RuSBP (Cl)
Hsp 27/28	DnaJ GrpE	DnaJ* GrpE* (94 kDa)				
Hsp20	ClpP	ClpP				
Hsp10	GroES	GroES	Hsp10 (Mi)		Hsp10 (Mi)	Cpn10 (Cl)

BiP : Binding protein

RuSBP : Rubisco subunit binding protein

Cpn : Chaperonine

Grp : Glucose-related protein

Hsc : heat shock cognate

Hsp100, Hsp90, Hsp70... : le chiffre fait référence à la masse moléculaire de la protéine

* protéines mises en évidence par immunodétection, interagissant avec des anticorps dirigés contre des Hsps d'*E. coli*.

** protéine mise en évidence par immunodétection, interagissant avec l'anticorps dirigé contre l'Hsp 104 de *Saccharomyces cerevisiae*.

() localisation de la protéine

non précisé : Cytosol

Re : Réticulum endoplasmique

Mi : Mitochondries

Cl : Chloroplastes

La transcription des gènes de choc thermique chez les bactéries est contrôlée par deux mécanismes, l'un étant positif, l'autre négatif. Le contrôle positif est assuré par l'utilisation de facteurs sigma alternatifs comme le facteur σ_{32} chez *E. coli*. Le contrôle négatif est quant à lui dû à des mécanismes dépendant de répresseurs protéiques qui limitent la transcription tels que les systèmes CIRCE/HrcA et CtsR chez *B. subtilis*.

2.1.1. Régulation de l'expression des gènes de heat shock d'*E. coli*

D'après Bukau (1993), cette réponse fait intervenir successivement la chaleur (stimulus), certaines protéines (détecteurs) qui se trouvent affectées par le stimulus et qui une fois dénaturées (transducteurs) entraînent la synthèse du facteur de transcription σ_{32} (codé par le gène *rpoH*) (régulateur), qui permet la transcription des gènes de "heat shock". Les promoteurs de ces gènes sont reconnus par l'holoenzyme RNA-polymérase- σ_{32} , les promoteurs "standards" sont eux reconnus par l'holoenzyme RNA-polymérase- σ_{70} .

Les Hsp synthétisées vont permettre la protection et la réparation des dommages causés aux protéines par la chaleur. De plus, une fois les réparations effectuées, certaines Hsps (Dnak, DnaJ, GrpE, et HflB) jouent un rôle de modulateur et stoppent la réponse au choc thermique en exerçant une réponse à trois niveaux : (Figure 4)

- répression de l'activité du facteur σ_{32} ,
 - répression de la traduction de l'ARN messager codant pour σ_{32} ,
- dégradation du facteur σ_{32} .

La transcription du gène *rpoH* (codant pour le facteur σ_{32}) implique 2 facteurs de transcription (σ_{70} et σ_{24}) et au moins 4 promoteurs P1, P3, P4 et P5. Trois de ces promoteurs (P1, P3, et P4) sont sous la dépendance de la température :

- à 30°C : transcription à partir de P1 et P4,

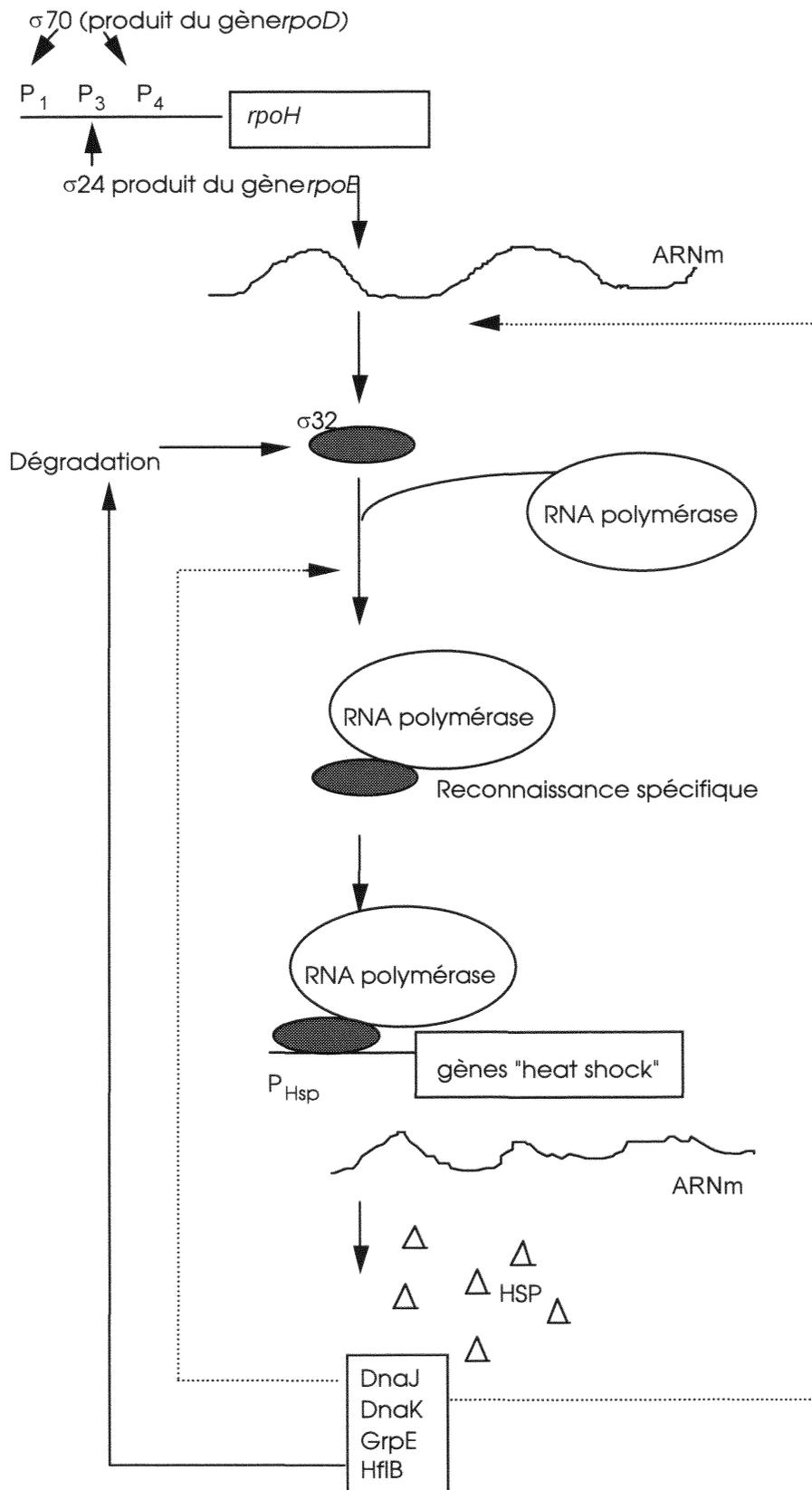


Figure 4. Modèle de régulation de l'expression des gènes de "heat shock" chez *Escherichia coli* (d'après Bukau, 1993, Yura *et al.*, 1996).
 Rétrocontrôle négatif (---), rétrocontrôle positif (—), P = Promoteurs

- à 42°C : faible transcription à partir de P1 et P4 et forte transcription à partir de P3,
- à 50°C : transcription uniquement à partir de P3.

Le gène *rpoH* est transcrit à partir de P1 et P4 par le facteur de transcription σ_{70} , et à partir de P3 par le facteur de transcription σ_{24} . Le facteur σ_{24} (protéine de 24 kDa) codé par le gène *rpoE* est seulement actif à haute température et ne reconnaît pas les promoteurs reconnus par σ_{70} et σ_{32} . La réponse à une stimulation thermique se traduit par la dégradation du facteur sigma majeur (σ_{70}) qui est remplacé par le facteur sigma alternatif (σ_{32}) stable et activé à haute température. La synthèse du facteur σ_{32} est par ailleurs amplifiée par l'effet d'un autre facteur sigma (σ_{24}) qui reconnaît en plus du promoteur P3 de *rpoH* son propre promoteur, assurant son autorégulation (Bukau, 1993 ; Yura *et al.*, 1993). Le retour à un état initial est alors sous la dépendance de 4 Hsps : DnaK, GroEL, GrpE et HflB.

2.1.2. Protéines de choc chaud chez *E. coli*

2.1.2.1. HSP60 et HSP10

GroEL (HSP60), protéine chaperonine de 57 kDa, a une activité ATPase qui augmente avec la température et qui est régulée par une autre protéine chaperonine GroES (HSP10) de 10 kDa. Le rôle majeur de GroEL est de reconnaître des protéines non repliées afin d'intervenir dans leur repliement. (Martin *et al.*, 1991). Cet état déplié du substrat protéique dit état de "molten globule" est propice aux agrégations puisqu'il expose aux solvants des surfaces hydrophobes qui normalement se trouvent à l'intérieur de la protéine native (le molten globule ou globule en fusion correspond à une structure tridimensionnelle moins compacte que la structure finale, mais qui a les mêmes structures secondaires que la protéine native). Le processus de repliement est ATP-

dépendant et peut demander plusieurs cycles d'hydrolyse d'ATP par GroEL (Hendrick et Hartl, 1993).

2.1.2.2. DnaK, DnaJ et GrpE

Ce trio protéique est impliqué dans le repliement des protéines totalement dénaturées. Contrairement aux chaperonines, il ne s'attaque pas aux protéines sous forme de "molten globule" (Martin *et al.*, 1991).

2.1.2.3. Quelques protéases.

La protéine Lon de 87 kDa est une protéase à sérine ATP-dépendante, impliquée dans la dégradation de protéines anormales (Parsell et Linqvist, 1993).

Les protéases Clp : parmi celles-ci ClpP est une protéine de 21,5 kDa ayant une activité protéolytique. La protéine ClpP seule est capable de dégrader de courts polypeptides, mais doit être associée à ClpA pour cliver des protéines dénaturées. ClpA est une protéine de 83 kDa qui n'est pas induite par le choc thermique. ClpB est indispensable à la survie de la bactérie à haute température, mais aucune fonction précise n'a pu être déterminée pour cette protéine (aucune activité protéolytique, ni interaction avec ClpP). Le rôle des protéases Clp dans l'élimination des protéines endommagées n'est pas établi et ne semble pas primordial (Parsell et Linqvist, 1993).

2.1.2.4. Le facteur σ_{32}

Cette protéine de 32 kDa codée par le gène *rpoH* est directement impliquée dans le contrôle de la réponse au choc thermique à 3 niveaux : sa synthèse, sa dégradation et son activité permettant de réguler étroitement l'expression des gènes de choc thermique. Après un passage de 30°C à 42°C, la concentration intracellulaire de σ_{32} augmente d'un facteur 20 après 5 min et décline alors vers un nouvel état stationnaire

légèrement supérieur au niveau avant le choc thermique (Straus *et al.*, 1987). Cette augmentation transitoire est suffisante pour expliquer la transcription des gènes de choc thermique. De plus sa séquence en acides aminés est proche de celle du facteur $\sigma 70$ (codé par le gène *rpoD*) qui est le facteur sigma principal d'*E. coli* servant à transcrire la majorité des gènes de cette bactérie.

2.2. Réponse au stress chaud chez *B. subtilis*

B. subtilis est une bactérie à Gram-positif dont la réponse au choc thermique fait appel à quatre classes de gènes "heat shock".

Les gènes de classe I thermorégulés (opéron *dnaK*) possèdent entre le promoteur végétatif et le cadre ouvert de lecture, une séquence CIRCE (controlling IR of chaperone expression) (Zuber et Schumann, 1994). Ce motif CIRCE est une répétition inversée donnant à l'ADN une structure tige-boucle qui serait stabilisée par la fixation d'un répresseur protéique de 39 kDa (HrcA "Heat regulation at CIRCE") empêchant la transcription. Quand le gène de ce répresseur, présent dans l'opéron *dnaK*, est délété, l'opéron *dnaK* est exprimé de façon constitutive (Schulz et Schumann, 1996). Avec l'augmentation de la température, le répresseur est altéré, le motif CIRCE est déplié, la RNA polymérase peut alors transcrire les gènes thermorégulés (Yura *et al.*, 1993 ; Zuber et Schumann, 1994) (Figure 5).

La régulation des gènes de classe II (une quarantaine de gènes de stress), fait intervenir un facteur de transcription $\sigma B = \sigma 37$ alternatif. Ce facteur $\sigma 37$, couplé à l'ARN-polymérase, se fixe à des promoteurs spécifiques (Hecker *et al.*, 1996).

La classe III regroupe les gènes *clpC*, *clpP* et *clpE* qui ont un promoteur végétatif sans séquence CIRCE et font intervenir pour leur régulation l'élément répresseur CtsR. Le premier gène codé par l'opéron *clpC* code pour un régulateur négatif de l'expression de ClpC (Derré *et al.*, 1999).

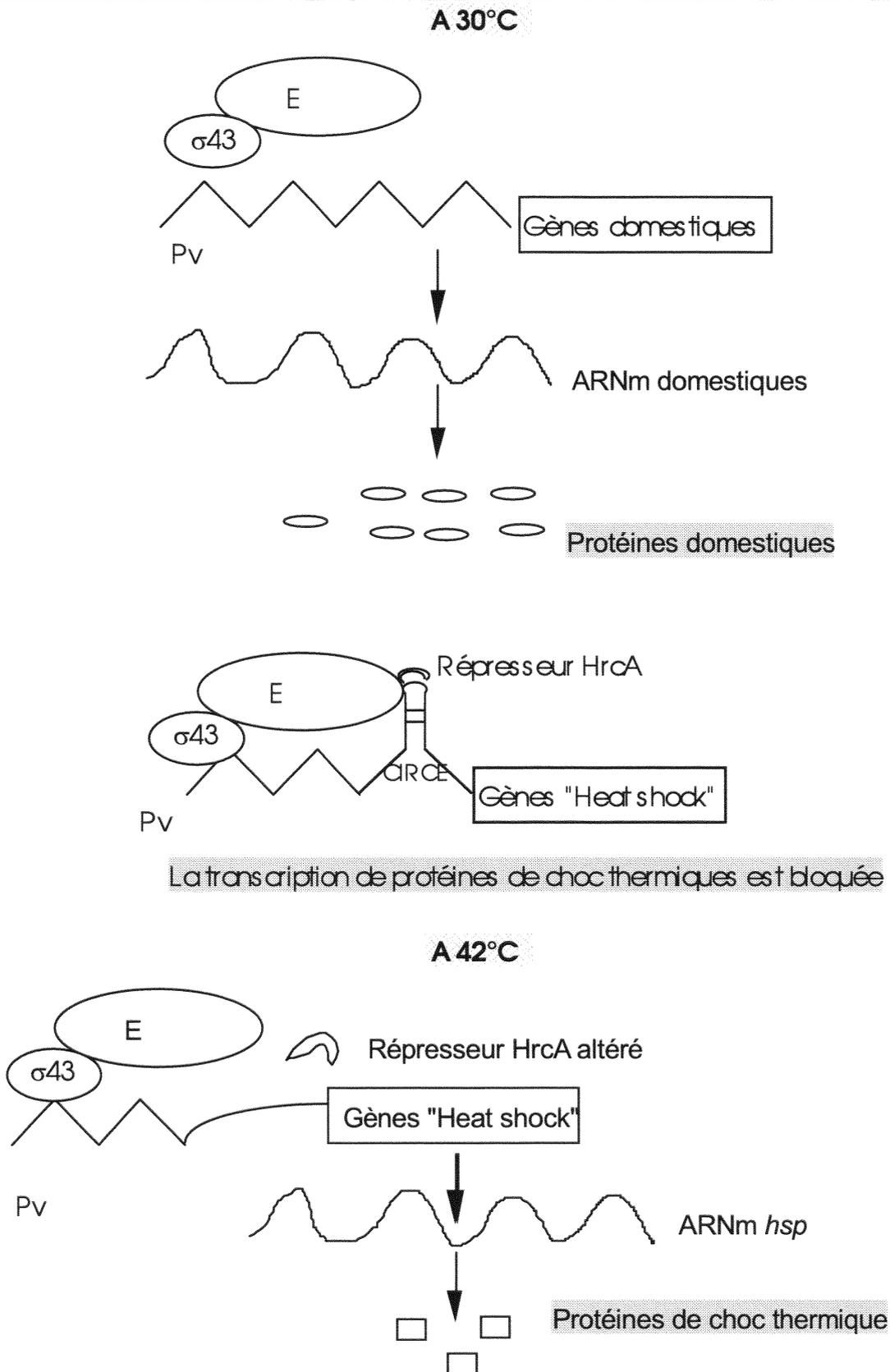


Figure 5. Schéma récapitulatif de la régulation des gènes de choc thermique de classe I chez *Bacillus subtilis* (Boutibonnes, 1996 ; Jobin *et al.*, 1998).

E : RNA polymérase

La classe IV regroupe les gènes de "heat shock" comme *trxA*, *lon*, *ftsH*, *htpG* et *ahpCF*, dont le mode de régulation n'est pas encore élucidé (Mogk *et al.*, 1998).

2.3. Réponse au stress chaud chez les ferments lactiques

Lors des procédés industriels, les bactéries lactiques sont exposées à des stress multiples, soit dus à leur croissance (notamment à l'acidification du milieu par la sécrétion d'acide lactique lors de la fermentation des glucides), soit dus à l'environnement (modification de la température, du pH, choc osmotique, lyophilisation...). L'étude des mécanismes de réponse aux stress chez les ferments lactiques pourrait permettre d'améliorer la qualité des levains lactiques utilisés en industrie. Une première exposition de *Lc. Lactis* à un choc thermique de 40°C pendant 30 min induit la thermotolérance. La capacité de survie des cellules à une exposition subséquente à une température létale (52°C pendant 25 min) est alors augmentée. Lors du saut de température de 30 à 40°C, les bactéries développent un état physiologique nouveau (thermotolérance) et surexpriment la plupart des Hsps, ces deux mécanismes ne semblent pas être étroitement liés (Boutibonnes *et al.*, 1992).

Le modèle de régulation de la réponse au choc thermique des ferments lactiques est encore peu étudié, mais il semble se rapprocher du modèle de régulation de *B. subtilis*. D'autre part, sept gènes homologues à ceux de *E. coli* ont été séquencés et identifiés chez *Lc. lactis* (Tableau 3).

2.3.1. Rôles des principales Hsp chez *Lc. lactis* :

- DnaK (Eaton *et al.*, 1993) et GroEL (Kim et Batt, 1993) sont des protéines chaperonnes qui participent au repliement des protéines en cours de synthèse et sont capables de rompre des agrégats protéiques provoqués par le stress.
- DnaJ, (Van Asseldonk *et al.*, 1993), GroES (Kim et Batt, 1993) et GrpE (Eaton *et al.*, 1993) sont des Hsps assistant les protéines chaperonnes.
- HflB (Nilsson *et al.*, 1994) est une protéase membranaire ATP-dépendante homologue de FtsH dont le rôle chez *E. coli* est de dégrader le facteur σ_{32} .
- ClpP, une protéine de 22 kDa, participe à la dégradation des protéines dépliées (Frees et Ingmer, 1999). Son expression est induite par un choc thermique ou un faible pH, et semble être régulée par un régulateur de stress homologue à celui rencontré chez *B. subtilis* (Msadek, Résultat non publié). Cet élément régulateur CtsR se fixerait sur une séquence promotrice en amont qui a été retrouvée chez *Lc. lactis*.

2.3.2. Régulation de l'expression des gènes de choc chaud de *Lc. lactis*

Les cadres ouverts de lecture de *Lc. lactis* sont précédés :

- d'un promoteur végétatif caractéristique,
- d'une IR (répétition inversée) de 9 à 12 paires de bases formant une structure tige-boucle semblable à celle d'autres bactéries à gram-positif comme *B. subtilis* décrite précédemment (Eaton *et al.*, 1993),
- d'aucun promoteur Phs pouvant être reconnu par un facteur sigma alternatif tel que σ_{32} ou σ_{24} .

2.3.3. Réponse au choc thermique d'autres ferments lactiques

2.3.3.1. Chez *Lactobacillus*

Des expériences de thermotolérance menées sur *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei* et *Lb. helveticus* ont montré qu'un choc thermique augmente la capacité de ces bactéries (en phase exponentielle de croissance) à résister à une exposition de 20 minutes à une température élevée. Après que les protéines totales des bactéries ayant subi un choc thermique aient été séparées par électrophorèse bidimensionnelle et transférées sur membrane, certaines Hsps ont pu être révélées à l'aide d'anticorps dirigés contre des Hsps d'*E. coli* et de *Lc. Lactis*. Pour les trois espèces, les protéines Hsps suivantes ont été révélées : DnaJ, DnaK, ClpB, GroEL, et GrpE (Broadbent *et al.*, 1997).

2.3.3.2. Chez *Sc. thermophilus*

Chez *Sc. thermophilus*, la résistance de bactéries en phase exponentielle de croissance à une température de 58°C pendant 30 min, a été augmentée par un prétraitement à 52°C pendant 15 ou 30 min. En parallèle, les profils protéiques bidimensionnels des bactéries cultivées à 52°C, montraient que la synthèse d'Hsps est stimulée à cette température. L'identification immunologique (à l'aide d'anticorps dirigés contre des Hsp d'*E. coli* et de *B. subtilis*) de ces Hsps homologues a mis en évidence les protéines suivantes : DnaK, GroEL, DnaJ, GrpE, La, facteur σ 43. Contrairement à *Lc. Lactis*, pour *Sc. thermophilus* la thermotolérance semble être accompagnée de l'induction d'Hsps (Auffray *et al.*, 1995).

2.3.4. Expression de smHsp chez les ferments lactiques

Parmi les Hsp étudiées chez les ferments lactiques, des smHsp ("small Hsp"), de faible masse moléculaire et faisant partie des protéines Hsp les moins conservées, ont pu être caractérisées (Jobin *et al.*, 1997). Les smHsp des bactéries lactiques présentent une homologie avec des protéines de diverses origines : smHsp végétales, smHsp d'autres bactéries. La recherche d'homologie dans les banques de données d'une smHsp (ASP1) de *Sc. thermophilus* est présentée dans le tableau 4. Le gène d'une smHsp a été mis en évidence chez *Lb. delbrueckii* (EMBL, numéro d'accèsion P94867), chez *Lactobacillus helveticus* (Timpone *et al.*, 1996) et chez *Oenococcus oeni* (Jobin *et al.*, 1997). Chez *Sc. thermophilus* PB18, une protéine de 16,4 kDa (appelée ASP1) a été purifiée et entièrement séquencée (Gonzalez-Marquez, 1997). Cette souche (PB18) est porteuse d'un plasmide, partiellement séquencé, qui porterait le gène de cette protéine ASP1 (Gonzalez-Marquez, 1997). Cette hypothèse est confortée par les travaux de Hashiba *et al.* (1993), de Somkuti *et al.* (1998) et de O'Sullivan *et al.* (1999). Chacune de ces équipes travaillant sur différents plasmides de *Sc. thermophilus* de tailles variables ont identifié une ou des séquences nucléotidiques codant pour une smHsp (Figure 6). De plus, Somkuti et Steinberg (1999) ont recherché la présence de gènes de smHsp chez différents genres de bactéries lactiques : *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*. Pour toutes les souches de *Sc. thermophilus* et la souche de *Lc. lactis* subsp *cremoris* où une réponse positive est obtenue, le gène de *smHsp* est localisé sur un plasmide. Ces auteurs suggèrent donc une origine commune de ces plasmides. Pour Gonzalez-Marquez *et al.* (1997), cette smHsp serait exprimée en condition de stress acide. En effet, l'expression de cette protéine lors de la phase stationnaire de croissance est due à l'acidité du milieu et non à une carence nutritionnelle. Chez *Lb. helveticus*, la smHsp est induite par un choc

Tableau 4. Récapitulatif partiel des résultats de la recherche de séquences homologues à la protéine de 16,4 kDa de *Sc. thermophilus* par BLAST

Numéro d'accession	Caractéristiques	
sp P80485 ASP1_STRTR	ASP1	<i>Sc. thermophilus</i>
gb AAC64908 (AF027167)	second smHsp	<i>Sc. thermophilus</i>
gb AAC64906 (AF027167)	first smHsp	<i>Sc. thermophilus</i>
p O30851 ASP2_STRTR	HSP.16.4	<i>Sc. thermophilus</i>
sp Q03928 HS18_CLOAB	HSP 18	<i>C. acetobutylicum</i>
emb CAA67831 (X99468)	hsp 18	<i>O. oeni</i>
emb CAA96463 (Z71782)	smHsp	<i>Lb. delbrueckii</i>
emb CAA06031 (AJ003817)	Hsp16	<i>S. pombe</i>
gb AAD22620.1 AF091592_7	sm Hsp	<i>B. subtilis</i>
gi 1763972 (U81385)	Hsp	<i>Oryza sativa</i>

ASP1	1	MLNKIQHRNLNTYSVTPDFD	- - - - -	FEEFS	25
2nd smHsp	1	MLNKIQHRNLNTYSVTPDFD	- - - - -	FEEFS	25
1er smHsp	1	MLNKIQHRNLNTYSVTPLDF	YSVTPLNF	FEDFS	33
ASP2	1	MLNKIQQRNSDIYSMTPFN	- - - - -	FEDFR	25
ASP1	26	RNLFNDFKPNFIKTDIHETDNEYLVEAELPGIP			58
2nd smHsp	26	RNLFNDFKPNFIKTDIHETDNEYLVEAELPGIP			58
1er smHsp	34	RS	LFNDFKPHFIKTDIHETDNEYLVEAELPGIP		66
ASP2	26	RNLFNDLKSNIKTDIHETDNEYVVEAELPGIP			58
ASP1	59	KENIQVTYENGVLTISGQQQIDAVNEDKKGKLI			91
2nd smHsp	59	KEDIQVTYENGVLTISGQQQIDAVNEDKKGKLI			91
1er smHsp	67	KEDIQVTYENGVLTISGQQQIDAVNEDKKG	NLI		99
ASP2	59	KEDIQVNYENGVLTISGQRQIDAAI	EDEKKGKLI		91
ASP1	92	RSERSLTSVQRQYLLENVKEDEIKASYSDGVLK			124
2nd smHsp	92	RSERSLTSVQRQYLLENVKEDEIKASYSDGVLK			124
1er smHsp	100	RSERNLTSVR	RQYLLENVKEDEIKASYSDGVLK		132
ASP2	92	HSERSLTSVR	RQYLLENVKEDEIKASYSDGILK		124
ASP1	125	VTLPKDSNKEIKKSSISIE			142
2nd smHsp	125	VTLPKDSNKEIKKSSISIE			142
1er smHsp	133	VTLPKDSNKEIKKSSISIE			150
ASP2	125	VTLPKDSNKEIK	T	SIP	142

Figure 6. Alignements de séquences des smHsp de *Streptococcus thermophilus* :

- ASP1 : séquence d'une protéine de *Sc. thermophilus* PB18 entièrement séquencée (Gonzalez-Marquez, 1997),
- 1er et 2nd smHsp : séquences peptidiques putatives correspondant aux gènes portés par le plasmide pCl65st de 6,5 kb de *Sc. thermophilus* NDI-6 (O'Sullivan *et al.*, 1999),
- ASP2 : séquence peptidique putative du gène porté par un plasmide pER341 (2798 bp) de *Sc. thermophilus* ST134 (Somkuti *et al.*, 1998).

thermique (Timpone *et al.*, 1996). Chez *O. oeni*, cette protéine est induite par un choc thermique mais aussi par un choc acide ou éthanolique, et le passage à la phase stationnaire de croissance (Guzzo *et al.*, 1997). La régulation des gènes qui codent pour ces protéines a été étudiée chez *O. oeni* (*hsp18*) et *Lb. helveticus* (*hsp17*). Le séquençage des régions en amont des gènes a permis de déterminer les régions promotrices qui ne sont que végétatives. Pour *Lb. helveticus*, une région CIRCE semblable aux gènes de protéines de choc chaud de *Lc. lactis* précédemment décrite a été décelée entre le promoteur et la région codante. Pour *O. oeni*, aucune région CIRCE n'étant présente, il ne faut donc pas s'attendre à trouver un mécanisme universel pour la régulation des gènes de smHsp chez les bactéries lactiques. L'expression de smHsp chez *O. oeni* serait sous le contrôle d'une régulation semblable à celles des protéines de classe III chez *B. subtilis*.

Les pourcentages d'identité entre les smHsp des bactéries lactiques sont inférieurs à 38%. La zone la plus conservée de ces smHsp se trouve dans la partie C-terminale. Ce sont des protéines de stress capables de former des complexes multimériques, qui possèdent une activité de chaperonne *in vitro*, limitent l'agrégation des protéines en conditions dénaturantes et favorisent leur renaturation en conditions normales suivant un mécanisme ATP-indépendant. La région C-terminale conservée se trouvant au centre du complexe multimérique semble être impliquée dans cette activité de chaperonne (Jobin *et al.*, 1997 ; Takemoto *et al.*, 1993).

2.4. Réponse au stress acide

Comme nous venons de le voir, les protéines smHsps ne sont pas exprimées seulement en condition de choc thermique. En réponse à différents stress, la bactérie peut synthétiser les mêmes protéines de choc.

2.4.1. Chez les bactéries lactiques

Le stress acide est important chez les ferments lactiques à intérêt industriel. En effet le pouvoir acidifiant et la survie en milieu acide sont des critères technologiques importants. La concentration en acide lactique serait-elle un signal d'induction à la réponse globale au stress? L'étude de la réponse aux stress chez les ferments lactiques a débuté il y a seulement quelques années ; la bactérie lactique la plus étudiée est *Lc. lactis*. Les gènes de la réponse au stress sont des gènes conservés, mais leur régulation ne l'est pas. Plusieurs études ont montré que *Lc. lactis* s'adapte à l'acidité au fur et à mesure de sa croissance et qu'en condition de carence en glucose, les bactéries sont plus résistantes au stress acide (Hartke *et al.*, 1996 ; Rallu *et al.*, 1996). Ces deux observations suggèrent qu'il existe au moins deux mécanismes inductibles de résistance au stress acide :

- l'un en phase exponentielle,
- l'autre provoqué par la carence en glucose (Rallu *et al.*, 1998).

De plus, une augmentation de la survie en condition de stress acide sévère (pH 3,9 pendant 30 min) est obtenue quand les cellules en phase exponentielle de croissance sont pré-exposées pendant 30 min à un choc acide modéré à pH 5,5. Durant cette adaptation au choc acide, 33 polypeptides, visualisés par électrophorèse bidimensionnelle, sont surexprimés par rapport aux cellules non-adaptées. Certaines de ces protéines sont des protéines de choc thermiques comme DnaK et GroEL, d'autres sont surexprimées en condition de choc acide mais aussi lors de l'irradiation aux UV_{254nm}, ou même lors de l'adaptation à l'H₂O₂. L'état de carence nutritionnelle induit une multirésistance chez *Lc. lactis*, incluant la résistance au faible pH. Des cellules en état de carence montrent une augmentation de la survie vis-à-vis de l'acide lactique, bien qu'elles n'aient jamais été en contact avec ce stimulus. L'acquisition de cette

résistance est établie progressivement durant la transition entre la croissance et la non-croissance. Par conséquent, la réponse à la tolérance à l'acide lactique pour des cellules en phase exponentielle adaptées à un pH intermédiaire (pH 5,5) est comparable à celle observée avec des cellules en état de carence (Hartke *et al.*, 1994, 1995, 1996, 1997).

Les mécanismes qui préservent un pH intracellulaire (pH_{int}) proche des valeurs physiologiques sont essentiels pour tout organisme qui se développe à des pH extracellulaires extrêmes.

Les valeurs extrêmes du pH extracellulaire de croissance des ferments lactiques se situent entre 3,5 et 9 unités de pH, leur pH de préférence étant plutôt compris entre 6,0 et 7,5, (Nannen et Hutkins, 1991). Parmi les bactéries lactiques les plus utilisées en industrie laitière, *Sc. thermophilus* est l'une des plus sensibles à l'acidité. Elle s'arrête de croître à pH 5,0 et n'acidifie le milieu que jusqu'à un pH de 4,5 et ce malgré la concentration non limitée en nutriments et l'absence de composés inhibiteurs (Thunell, 1988).

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, permet d'obtenir une biomasse importante. (Whitehead *et al.*, 1993). La toxicité des acides concerne surtout les acides faibles car ceux-ci à pH acides se trouvent sous la forme d'acides non dissociés, ce qui leur permet de traverser la membrane cellulaire et de rentrer à nouveau dans la cellule. Les bactéries lactiques sécrètent l'acide lactique qui a un effet bactériostatique sur des bactéries pathogènes (moins résistantes à l'acidité) avant d'être néfaste pour elles (Boot, 1985).

Lorsque la concentration en acide lactique augmente, les bactéries lactiques ralentissent leur croissance puis l'arrête au moment où le pH intracellulaire atteint une

valeur donnée, caractéristique de chaque souche (Kashket, 1987). L'effet de l'acide lactique s'explique par :

- une consommation accrue d'énergie pour maintenir la force protomotrice qui assure les échanges avec le milieu extérieur et la stabilité du pH_{int} des cellules,
- une déstabilisation membranaire et la sortie de soluté,
- une réduction de l'activité spécifique de nombreuses enzymes en particulier celles de la voie de la glycolyse (Hutkins et Nannen, 1993).

En général, toutes les bactéries maintiennent un pH interne proche de la neutralité (=homéostasie). Le pH du cytoplasme des bactéries lactiques reste légèrement plus alcalin que le milieu extracellulaire afin de maintenir un gradient de pH. Au cours de la croissance le pH_{ext} diminue de 6,8 à 5,0-5,2 tandis que le pH_{int} est préservé. A un pH_{ext} inférieur à 5,0-5,2 le pH_{int} n'est plus préservé et la viabilité cellulaire baisse.

En réponse aux variations du pH, plusieurs bactéries lactiques produisent des décarboxylases, des déaminases et/ou des déiminases. Diverses bactéries lactiques métabolisent l'arginine *via* une arginine déiminase. Cette enzyme transforme l'arginine en citrulline et rejette de l'ammoniac entraînant l'augmentation du pH (Casiano-Colon et Marquis, 1988 ; Poolman, 1993).

2.4.2. Gènes impliqués dans la réponse au choc acide

En 1995, une soixantaine de gènes liés à la réponse au choc acide étaient décrits par Hall *et al.*, parmi eux des gènes dont la fonction est inconnue et des gènes de fonction connue tels que

- ceux qui régulent l'homéostasie du pH intracellulaire,
- ceux qui codent pour les décarboxylases, désaminases et déiminases,
- ceux qui codent pour des enzymes spécifiques.

2.5. Réponse au stress froid chez les bactéries

Les premières études sur la réponse au choc froid sont relativement récentes et portent sur des bactéries diverses et variées. Dans la littérature, nous trouvons cette étude de choc froid chez les bactéries modèles comme *E. coli* (Jones *et al.*, 1987) et *B. subtilis* (Lottering *et al.*, 1995), mais aussi chez d'autres bactéries d'intérêts économiques :

- les bactéries d'altération de produits alimentaires comme :
 - les viandes réfrigérées altérées par *Pseudomonas fragi* (Hébraud *et al.*, 1994),
 - le lait cru altéré par *Pseudomonas fluorescens* (Gügi *et al.*, 1991 ; Guillou et Guespin-Michel, 1996),
- *Enterococcus faecalis* qui peut être utilisé comme indicateur de contamination fécale (Thammavongs *et al.*, 1996 ; Panoff *et al.*, 1997),
- *Listeria monocytogenes* qui peut causer des infections mortelles chez l'homme (Phan-Tham et Gormon, 1995 ; Bayles *et al.*, 1996),
- les ferments lactiques utilisés en fabrication tels que : *Lc. lactis*, *Lb. plantarum* (Panoff *et al.*, 1994 ; Kim *et al.*, 1997 et 1998 a et b, et 1999 ; Wouters *et al.*, 1998 ; Mayo *et al.*, 1997)

Des études similaires ont été menées chez d'autres bactéries d'intérêts divers telles que :

- *Salmonella typhimurium* (Craig *et al.*, 1998),
- *Thermotoga maritima* (Welker *et al.*, 1999),
- *Vibrio vulnificus* (Bryan *et al.*, 1999),
- *Arthrobacter globiformis* (Berger *et al.*, 1997)...

2.5.1. Chez des bactéries mésophiles comme *E. coli* et *B. subtilis*

La réponse à un abaissement brutal de la température (de 37 à 10°C) chez *E. coli* en phase exponentielle de croissance se traduit par :

- un temps de latence de 4 heures appelé aussi phase d'acclimatation,
- une reprise de croissance avec un temps de génération qui passe de 20 min à 37°C à 24 heures à 10°C.

Durant la phase d'acclimatation :

- le taux de synthèse des protéines domestiques est réduit, et d'autres protéines appelées "cold induced proteins" (CIPs) ont un taux de synthèse augmenté de 3 à 300 fois par rapport à 37°C (Jones *et al.*, 1987),
- la saturation des acides gras est diminuée (Sato et Murata, 1981 ; Wada et Murata, 1990). De plus, des études chez *B. subtilis*, ont montré un profil lipidique différent avec un rapport "acides gras à courtes chaînes" sur "acides gras à longues chaînes" et un rapport des "acides gras antéiso" sur "acides gras iso" supérieurs à 25°C en comparaison avec 37°C (Tsuchido *et al.*, 1995). Ces modifications permettent de fluidifier la membrane,
- la synthèse d'ARN et d'ADN est ralentie.

2.5.1.1. Protéines induites par le choc froid

Après transfert des cellules de 37 à 10°C, une vingtaine de protéines CIPs surexprimées sont visualisées par électrophorèse bidimensionnelle. Les gènes d'une quinzaine de ces protéines ont été séquencés et localisés. La fonction de la plupart de ces protéines est en relation soit avec l'ADN (réplication, réparation, et transcription), ce qui inclut le produits des gènes *recA*, *nusA*, *gyrA*, *hns* et *cspA*, soit avec la structure de

l'ARN et la traduction (les produits des gènes *infA*, *infB*, *pnp*, *deadD*, et *rbfA*) (Tableau 5).

La protéine CspA "Cold shock protein" A chez *E. coli* ou CspB (homologue de CspA) chez *B. subtilis* semble jouer un rôle crucial dans la réponse au choc froid. Cette protéine est aussi appelée protéine majeure de choc froid, du fait de son importante expression lors de la première heure de choc (13% des protéines totales synthétisées). Chez *E. coli*, CspA, fait partie d'une famille de "cold shock proteins" (CSPs) (Goldstein *et al.*, 1990) dont 9 membres ont été identifiés ces dernières années : CspB (Lee *et al.*, 1994), CspC (Lee *et al.*, 1994; Yamanaka *et al.*, 1994), CspD (Yamanaka *et al.*, 1997), CspE (Yamanaka *et al.*, 1994), CspF (Lee *et al.*, 1994), CspG (Nakashima *et al.*, 1996), CspH et CspI (Yamanaka *et al.*, 1998) (Figure 7). Parmi ces protéines seules quatre seraient induites par le froid, CspA, CspB, CspG et Csp I (Etchegaray et Inouye, 1999 ; Phadtare *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 1999). CspD serait exprimée lors de carences nutritionnelles, CspC et CspE seraient impliquées dans la régulation des étapes initiales de la transcription interagissant avec l'ARNm naissant et l'ARN polymérase, et/ou dans la condensation du chromosome (Yamanaka *et al.*, 1994 ; Hanna et Liu, 1998) ; CspF et CspH n'ont pas de fonctions connues, mais semblent jouer un rôle unique de part leur structure inhabituelle. Avec deux autres protéines CsdA (Jones *et al.*, 1996) et RbfA (Jones et Inouye, 1996), CspA, CspB et CspG appartiennent à la classe I des protéines de choc froid. La classe II des protéines de choc froid renferme RecA, H-NS, PNP, NusA, les facteurs d'initiation 2α et 2β , et la DNA gyrase (Mitta *et al.*, 1997). Les protéines de choc froid de classe I sont produites avec

Tableau 5. Protéines de choc froid (CIP) chez *E. coli*. (D'après Panoff *et al*, 1998)

Protéines	Gènes	Fonctions
CspA	<i>cspA</i>	Protéine majeure de choc froid, fonction de contrôle.
DNA gyrase (sous-unité A)	<i>gyrA</i>	Superenroulement de l'ADN
H-NS (Histone like Nucleoid Structuring)	<i>hns</i>	Compaction de l'ADN
RecA	<i>recA</i>	Recombinaison et réparation de l'ADN
NusA	<i>nusA</i>	Terminaison de la transcription
CsdA	<i>deadD</i>	Désenroulement de l'ARN
RbfA	<i>rbfA</i>	Maturation ribosomale, initiation de la traduction
Facteur d'initiation 2 α	<i>infA</i>	Fixation de l'ARNt-fMet chargé sur la sous-unité ribosomale 30S.
Facteur d'initiation 2 β	<i>infB</i>	
Polynucléotide phosphorylase (PNP)	<i>pnp</i>	Dégradation de l'ARNm
Pyruvate deshydrogénase	<i>aceE</i>	Décarboxylation du pyruvate
Dihydrolipoamide acetyltransferase	<i>aceF</i>	Décarboxylation du pyruvate
"Trigger Factor" (TF) (Facteur déclenchant)	?	Activité prolyl-isomérase et autres fonctions
CspB	<i>cspB</i>	Fonction inconnue
CspG	<i>cspG</i>	Fonction inconnue
Hsc66	<i>hscA</i>	Fonction inconnue
F84,0 ; G41,2 ; G55,0; G74,0	?	Fonctions inconnues

	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	aa	pI
CspA	MSGKMTGIVKWFNAIKGFGFI	TPDDGSKIYFVHR	SAIQNDGYKSLDEGQKVSFTIESGAKGPAAGNVTSL			70	5,53
CspB	.N...L.....	.S.V.....N.RT.F.....T.S.....A...IITD			71	7,57
CspC	A- IK.Q.....ES.....A.....GN.F.T.A...N.E.E.QD.Q.....V...AI			69	7,59
CspD	E_.....T.....NA.....	C.EG.EG.I.A.Y.....T.M...RT.KA..S.Q.DVHQ.P..NH.SVIVPVEVEAAVA			74	5,81
CspE	...IK.N.....ES.....E.....TN.F.T.A...R.E.E.TN.....S.A..IA.			69	9,36
CspF	.R.....T.DGKS.K.L.....S.RI..QL.V.....LNLDAEETTT.LR.E.CRIN.LR..S.A..YLS				70	9,91
CspG	.N...L.....T.L.SNEFRT.N.N...E.S..Q.QR.....A..VT.			70	5,59
CspH	.R.....T.DRKS.K.....I.S.R.R.E.Q.I.....FTPRDAEV.IP.LR.E.CRVN.LR..T.A..YLS				70	10,72
CspI	.N...L.....PE.....K.....SNDF.T.T.N.E.E.G..N.P.....VH.VAL			70	6,09

Figure 7. Alignements des séquences protéiques de CspA, CspB, CspC, CspD, CspE, CspF, CspG, CspH, CspI (Yamanaka *et al.*, 1998). Les résidus acides aminés identiques à ceux de la protéine CspA sont notés par un point, les manquants sont représentés par un tiret. L'endroit de chaque feuillet β est localisé par un trait. Les résidus hydrophobes formant le cœur du tonneau β de la protéine sont mentionnés avec un cercle noir. Les motifs RNP1 et RNP2 sont encadrés. Le nombre de résidus acides aminés et les pI calculés sont mentionnés.

un taux de synthèse 10 fois supérieur à celui obtenu à température optimale, les protéines de classe II sont produites quant à elles avec un taux de synthèse supérieur de 2 à 10 fois.

2.5.1.2. La protéine CspA

2.5.1.2.1. Régulation de la synthèse de CspA au niveau transcriptionnel

Pour Tanabe *et al.* (1992), le gène de la protéine CspA chez *E. coli* serait régulé positivement au niveau transcriptionnel par un facteur inconnu qui se fixerait spécifiquement en amont du gène *cspA* uniquement à faible température, ce qui expliquerait l'absence de CspA à 37°C. En fait, d'autres auteurs ont montré par la suite que le gène est constitutivement transcrit à toutes les températures (Brandi *et al.*, 1996 ; Goldenberg *et al.*, 1996 ; Fang *et al.*, 1997). A faible température, le promoteur de *cspA* est très efficace, la transcription de *cspA* a donc lieu, le taux d'ARNm de CspA augmente alors, ce qui conduit à une augmentation de la protéine CspA. De plus, si la région promotrice du gène *cspA* est remplacée par un "non cold shock" promoteur, l'induction de *cspA* a encore lieu (Fang *et al.*, 1997). L'induction de *cspA* par le choc froid n'est donc pas seulement régulée au niveau transcriptionnel mais aussi au niveau post-transcriptionnel.

2.5.1.2.2. Régulation au niveau post-transcriptionnel - Stabilité des ARNm des protéines de classe I

Les ARNm des protéines de classe I (CspA, CspB, CspG, CsdA et RbfA) ont une région non traduite en 5' inhabituellement longue (appelée "long 5' untranslated region" ou "5'-UTR"), qui semble jouer un rôle important à faible température (Jiang *et al.*, 1996 ; Etchegaray *et al.*, 1996 ; Fang *et al.*, 1998) (Figure 8). L'absence de la protéine CspA à

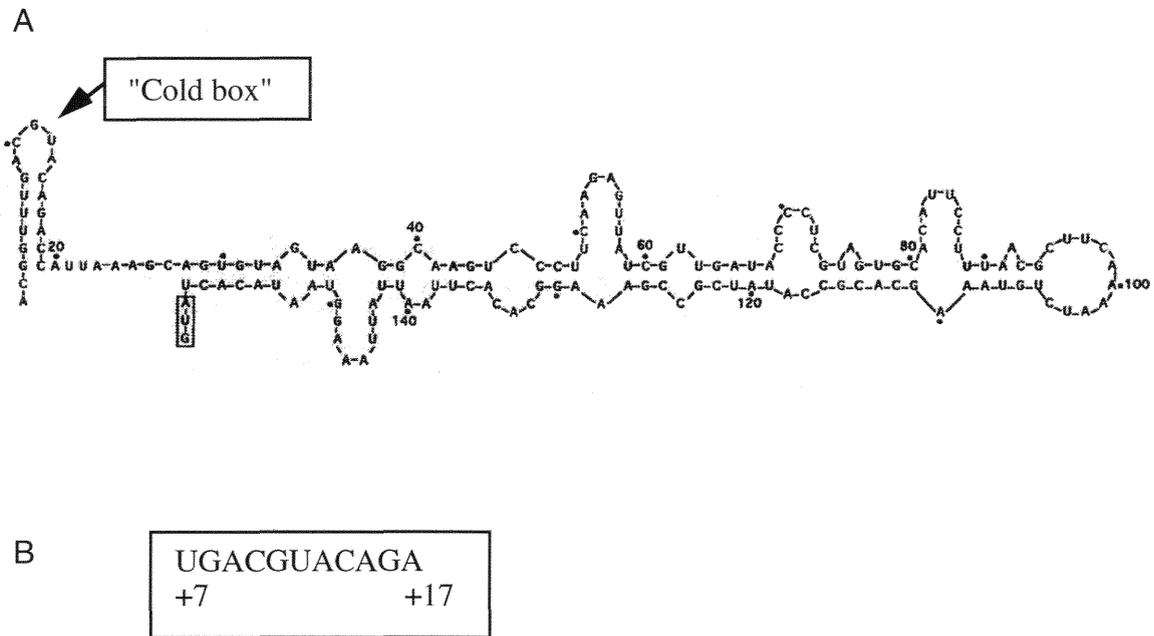


Figure 8. Structure secondaire putative de la région non traduite de l'ARNm *vspA*

A : Séquence +1 à 159 d'après Etchegaray *et al.*, 1996,

B : Séquence de la "cold box" de *vspA*.

37°C serait due à l'instabilité de l'ARNm de CspA à cette température. La région 5'UTR permet la formation de structures secondaires qui faciliteraient la traduction des ARNms ainsi stabilisés (Jiang *et al.*, 1997). Ces structures secondaires sont stables à faibles températures, mais sont instables à 37°C, ce qui entraîne une instabilité de l'ARNm. D'après Fang *et al.*, 1999, si cette région (5'-UTR) est délétée, CspA est exprimée constitutivement à 37°C. De plus, une séquence consensus de 11 nucléotides en début de la région 5'UTR, appelée "cold box" (Figure 8) est retrouvée sur les ARNms de certains gènes de choc froid *cspA*, *cspB* et *csdA*. Il est donc probable que cette séquence "cold box" soit le site de fixation d'un répresseur en fin de phase d'acclimatation afin d'inhiber la transcription ou de déstabiliser les ARNms. Ce répresseur pourrait être la protéine CspA qui autorégulerait donc sa propre synthèse (Jiang *et al.*, 1996). De plus Bae *et al.*, (1999) ont montré que dans un système de synthèse protéique *in vitro*, l'ajout de la protéine CspE inhibe la production de la protéine CspA. La protéine CspE interviendrait donc comme un régulateur de l'expression de CspA à 37°C, probablement en interagissant avec le complexe d'élongation de la transcription au niveau de la "cold-box" de *cspA*.

2.5.1.2.3. Contrôle de la réponse au choc froid au niveau traductionnel

Au niveau des ribosomes - facteurs ribosomiques

La traduction semble être l'étape la plus sensible en dessous de 8°C elle n'est plus initiée mais la phase d'élongation a lieu. La traduction est donc bloquée et empêche la croissance de la cellule. De plus le froid entraîne l'accumulation de sous-unités ribosomales et de ribosomes 70S (Friedman *et al.*, 1971 ; Broeze *et al.*, 1978).

VanBogelen et Neidhart, considèrent en 1990 que le ribosome est le senseur de la température (Figure 9).

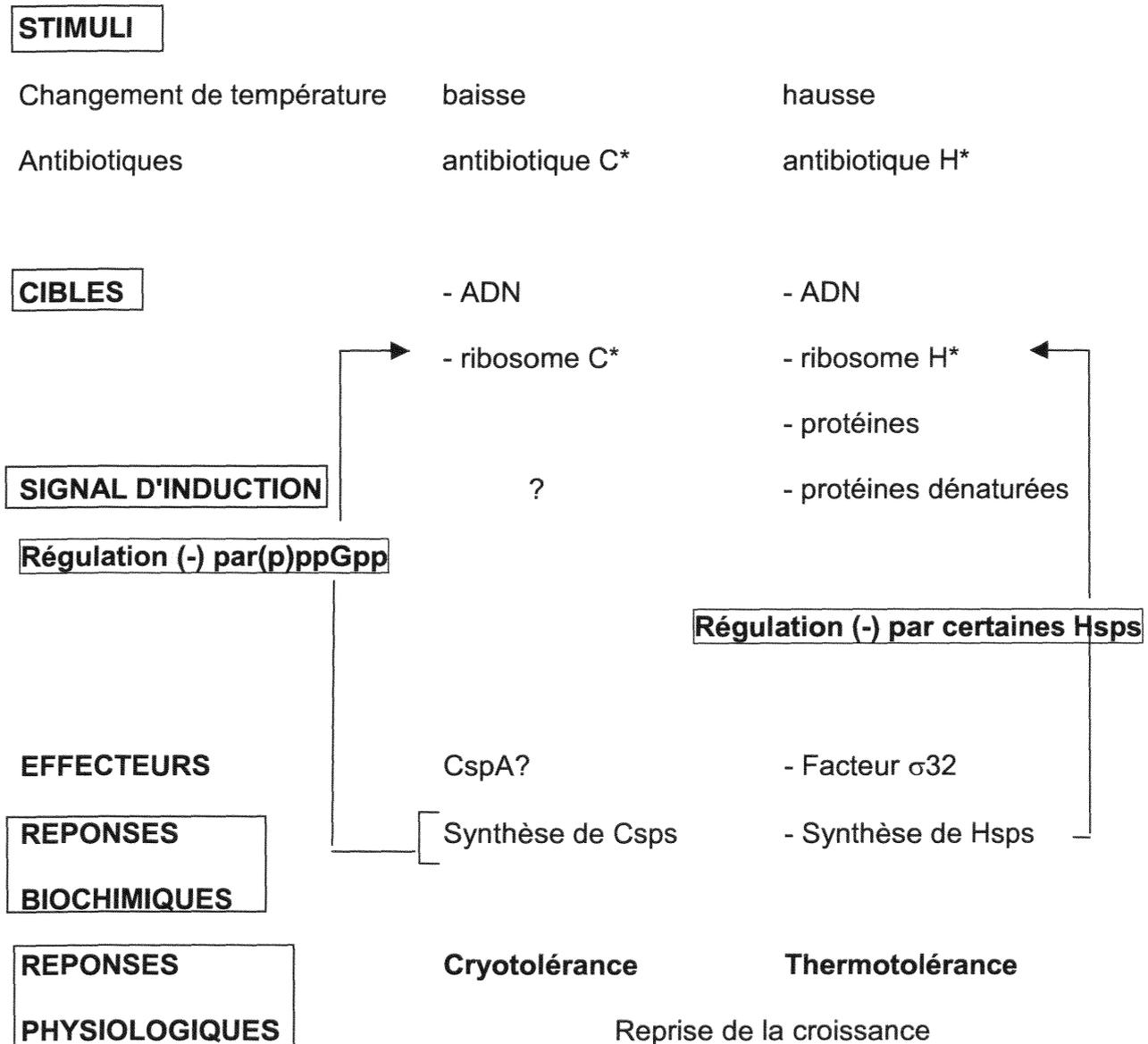
De manière similaire aux agents thermomimétiques rencontrés pour le choc chaud, des agents qui miment le froid ont été découverts. Ce sont principalement des antibiotiques dits de type C (C comme cold) (chloramphénicol, tétracycline, érythromycine, acide fusidique) qui entraînent des modifications cellulaires identiques au choc froid :

- une baisse de la capacité de la traduction,
- la stimulation de la formation des ribosomes,
- la répression des Hsps,
- l'induction des Csps (Jiang *et al.*, 1993).

Lors de ces deux phénomènes de mimétisme, ce sont les ribosomes qui se trouvent au centre de la réponse. La comparaison entre stress chaud et froid est indiquée dans la Figure 9.

Pour Brandi *et al.* (1996), des ribosomes 70S isolés à partir de cellules ayant subi un choc froid traduisent l'ARNm *cspA* de manière plus efficace que les ribosomes issus de cellules cultivées à 37°C.

Les protéines CsdA, RbfA, IF2 et PNP s'associeraient aux ribosomes non fonctionnels pour les convertir en des ribosomes fonctionnels à froid alors capables de traduire les ARNms domestiques (Jiang *et al.*, 1996 ; Jones *et al.*, 1996) (Figure 10). Les ARNms domestiques ne peuvent être traduits lors de la phase d'acclimatation. A faible température, la traduction de ces protéines domestiques requiert des facteurs ribosomaux induits par le choc froid comme CsdA (Jones *et al.*, 1996) et RbfA (Jones et Inouye *et al.*, 1996). CsdA : " Cold shock DeaD-box protein A ", produit du gène *deaD* (nommé également *csdA*), est une protéine de 70 kDa qui est rencontrée seulement en condition de température basse. Cette protéine est absente



* antibiotique C "cold" et H "heat" agissant sur des sites d'action différents du ribosome et mimant respectivement le choc froid et le choc chaud.

Figure 9. Réponse aux chocs thermiques chez *E. coli*.

D'après VanBogelen et Neidhart (1990) et Panoff *et al.*, 1995a.

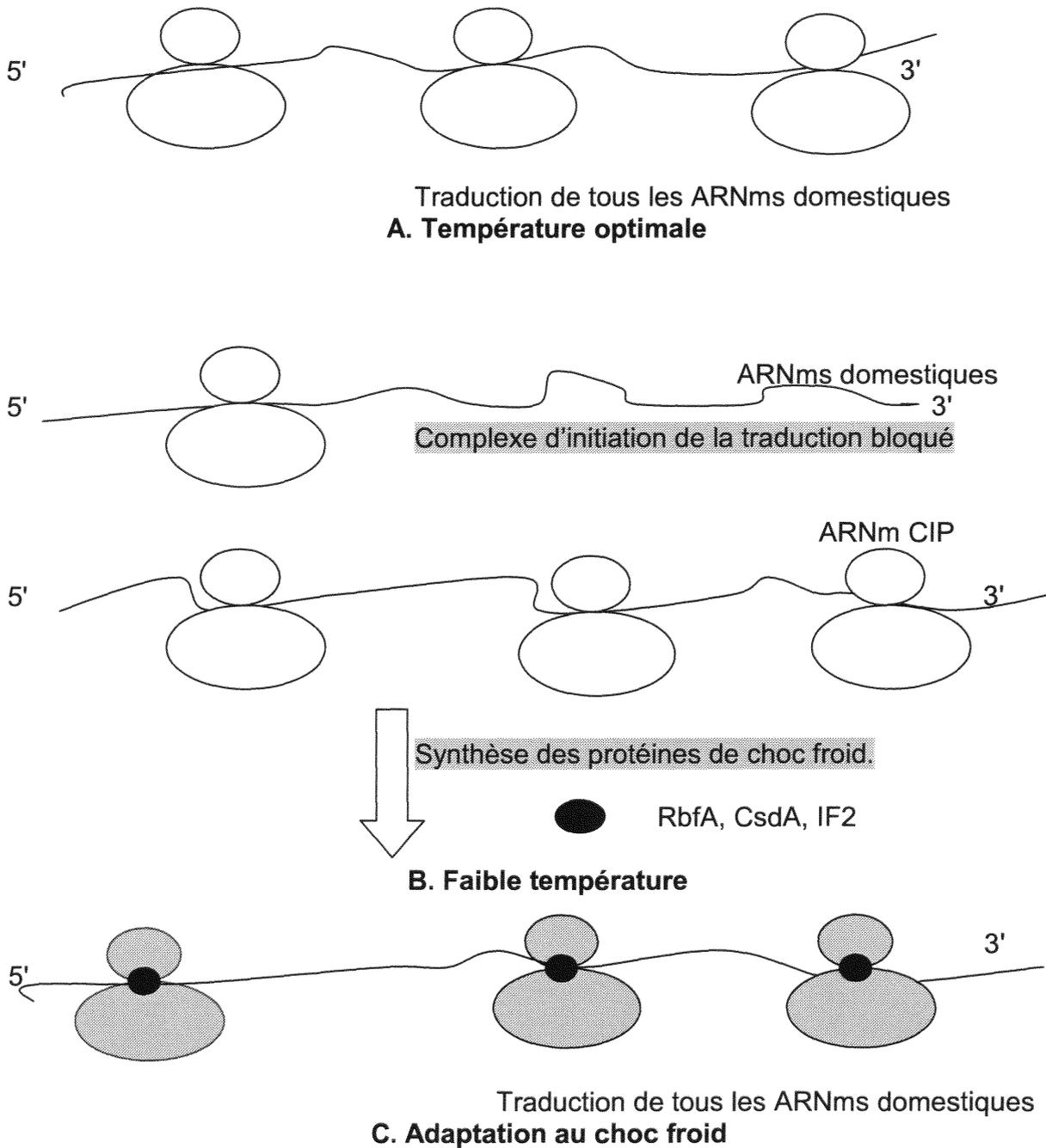


Figure 10. Modèle d'adaptation des ribosomes au choc froid.

- A. à température optimale, les ribosomes traduisent les ARNm domestiques.
- B. La baisse de température entraîne le blocage de l'initiation de la traduction, les protéines de choc froid sont tout de même synthétisées (IF2, CsdA et RbfA).
- C. Ces protéines associées aux ribosomes permettent ensuite la traduction de tous les ARNm cellulaires. (Jones et Inouye, 1996).

des ribosomes à 37°C. A 15°C, elle devient un composé majoritaire de la sous-unité ribosomale 50S, et se trouve également associée à la sous-unité 30S. De plus, cette protéine est connue pour désenrouler l'ARNm (Jones *et al.*, 1996).

La protéine RbfA "Ribosomal binding factor A", (15 kDa) est impliquée dans la maturation des ribosomes et/ou dans l'initiation de la traduction. RbfA se fixe seulement aux sous-unités ribosomales 30S libres (Dammel et Noller, 1995 ; Jones et Inouye, 1996). Quand une culture d'*E. coli* est transférée de 37 à 15°C, il en résulte transitoirement une diminution de polysomes, et une augmentation de monosomes, indiquant un blocage temporaire de l'initiation de la traduction ou/et de la maturation des ribosomes. Tout ceci induit une expression transitoire de la réponse au choc froid. L'augmentation du niveau de ribosomes non fonctionnels est un signal pour l'induction de la réponse au choc froid (Jones et Inouye, 1996). La réponse au choc froid semble donc être contrôlée aux niveaux transcriptionnel et traductionnel. La synthèse de protéines de choc froid durant la phase d'acclimatation est transitoire. A la fin de cette phase, les cellules retrouvent la capacité de croître, et la synthèse de protéines de choc froid est réduite de nouveau à un niveau basal (Goldstein *et al.*, 1990).

2.5.1.2.4. Intervention du (p)ppGpp

Pour Jones *et al.* (1992a), les alarmones, pppGpp et ppGpp, semblent intervenir comme régulateurs négatifs de l'expression des gènes de choc froid à la température optimale. Lors de la baisse de température, la traduction est ralentie, les sites accepteurs (sites A) des ribosomes sont bloqués, et les ARNt chargés s'accumulent ce qui entraîne une baisse du taux de synthèse de (p)ppGpp. Cette diminution de (p)ppGpp joue un rôle physiologique positif en augmentant la synthèse des CIPs et de certaines protéines de la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle.

2.5.1.2.5. Rôles de CspA

CspA : protéine RNA chaperonne

CspA serait une protéine RNA chaperonne prévenant la formation de structures secondaires intramoléculaires stables rendant inefficace la traduction des ARNms domestiques à faible température (Jiang *et al.*, 1997) (Figure 11). Avec une souche délétée du gène *cspA* (Bae *et al.*, 1997), ont montré que les cellules à faible température compensent cette délétion par l'expression des protéines CspB et CspG.

CspA : activateur transcriptionnel

Pour la réponse au choc froid, contrairement au choc chaud, aucun facteur sigma spécifique, n'a été mis en évidence. Cependant CspA joue un rôle majeur dans la régulation de la transcription de deux gènes, *hns* et *gyrA*. CspA se fixe en amont de ces gènes, au niveau de la séquence CCAAT, et augmente leur taux de transcription. Cette observation a été effectuée avec la protéine CspA chez *E. coli*, mais aussi chez *B. subtilis* avec la protéine CspB (Jones *et al.*, 1992b ; La Teana *et al.*, 1991 ; Brandi *et al.*, 1994 ; Graumann et Marahiel, 1994 ; Graumann *et al.*, 1997). Cette séquence CCAAT est retrouvée en amont de nombreux autres gènes codant pour des protéines de choc froid chez *E. coli* (*recA*, *nusA*, *cspA*, et *pnp*). La séquence de la protéine CspA est connue et révèle deux domaines de fixation aux acides nucléiques (motif RNP-1 et RNP-2) (Landsman, 1992). Le domaine RNP-1 a une forte homologie avec le domaine de certaines protéines humaines (DbpA - DNA-binding proteinA-, DbpB ou YB-1) qui ont pour fonction de se fixer à l'ADN par le biais de la séquence CCAAT du gène HLA de classe II (Wistow, 1990 ; Wolfe, 1994 ; Kudo *et al.*, 1995). Ces domaines de fixation aux acides nucléiques ont été mis en évidence pour six autres gènes d'*E. coli* (*cspB*, *cspC*, *cspD*, *cspE*, *cspF*, *cspG*) (Lee *et al.*, 1994 ; Nakashima *et al.*, 1996), ainsi que pour

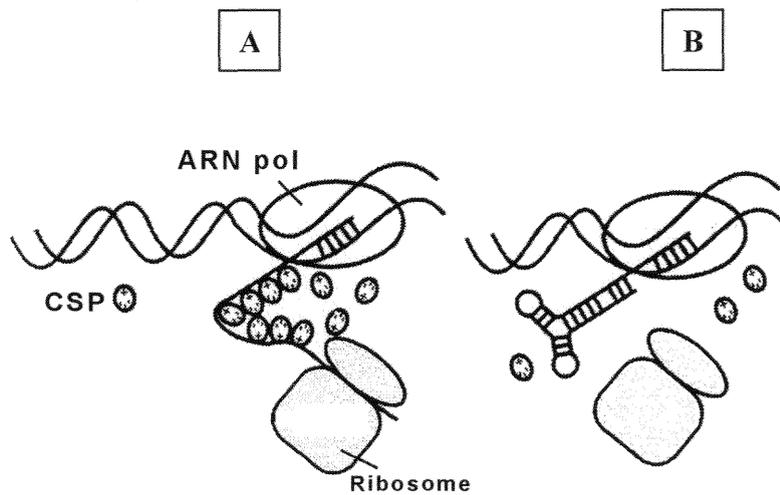


Figure 11. Modèle hypothétique de la fonction " RNA chaperone" de le protéine de choc froid Csp, couplant la transcription par l'ARN polymérase (ARN pol) et l'initiation de la traduction.

A. CSPs empêchent la formation de structure secondaire à l'extrémité 5' de l'ARNm.

B. Concentration de CSPs trop faible: les structures secondaires des ARN bloquent l'initiation de la traduction. Lors d'un choc froid : la concentration de CSPs doit augmenter pour compenser la forte stabilité des structures secondaires à faible température. (Graumann et Marahiel, 1998)

d'autres protéines Csp de différentes bactéries : *Lb. plantarum* (*cspL*, *cspP*) (Mayo *et al.*, 1997), *B. subtilis*, (*CspB*, *cspC*, *cspD*) (Willimsky *et al.*, 1992 ; Graumann, *et al.*, 1996), *Streptomyces clavuligerus* (Av-Gay, *et al.*, 1992), mais aussi chez de nombreux eucaryotes (Figure 12).

2.5.1.2.6. Régulation fine du gène *cspA*

au niveau transcriptionnel

Pour Mitta *et al.* (1997), dans la région promotrice du gène *CspA*, une région de 10 paires de bases riche en AT située juste en amont de la région -35 (appelée "UP element"), joue un rôle important dans la transcription de *cspA*. Cette séquence interagit avec l'ARN polymérase, ce qui réhausse la transcription ("transcription enhancer") (Ross *et al.*, 1993).

au niveau post- transcriptionnel

Comme nous l'avons vu précédemment, la région 5'UTR de l'ARNm *CspA* joue un rôle crucial dans l'expression du gène *cspA*, rendant instable l'ARNm à 37°C. Cette région est aussi responsable de l'expression transitoire de *CspA* durant la phase d'acclimatation.

Lors d'un choc froid, les taux de synthèses d'ARNm *cspA* et de la protéine *CspA* sont à leur maximum au milieu de la phase d'acclimatation, puis ils chutent pour retourner à leur niveau de base. Il semble qu'il existe un mécanisme de répression du gène *cspA* durant la fin de la phase d'acclimatation (Fang *et al.*, 1998). Lors de la phase d'acclimatation, quand la concentration cellulaire de *CspA* augmente, la protéine *CspA* se fixe à son propre ARNm pour déstabiliser le complexe d'élongation de l'ARN polymérase, ce qui entraîne une atténuation de la transcription (Bae *et al.*, 1997). La

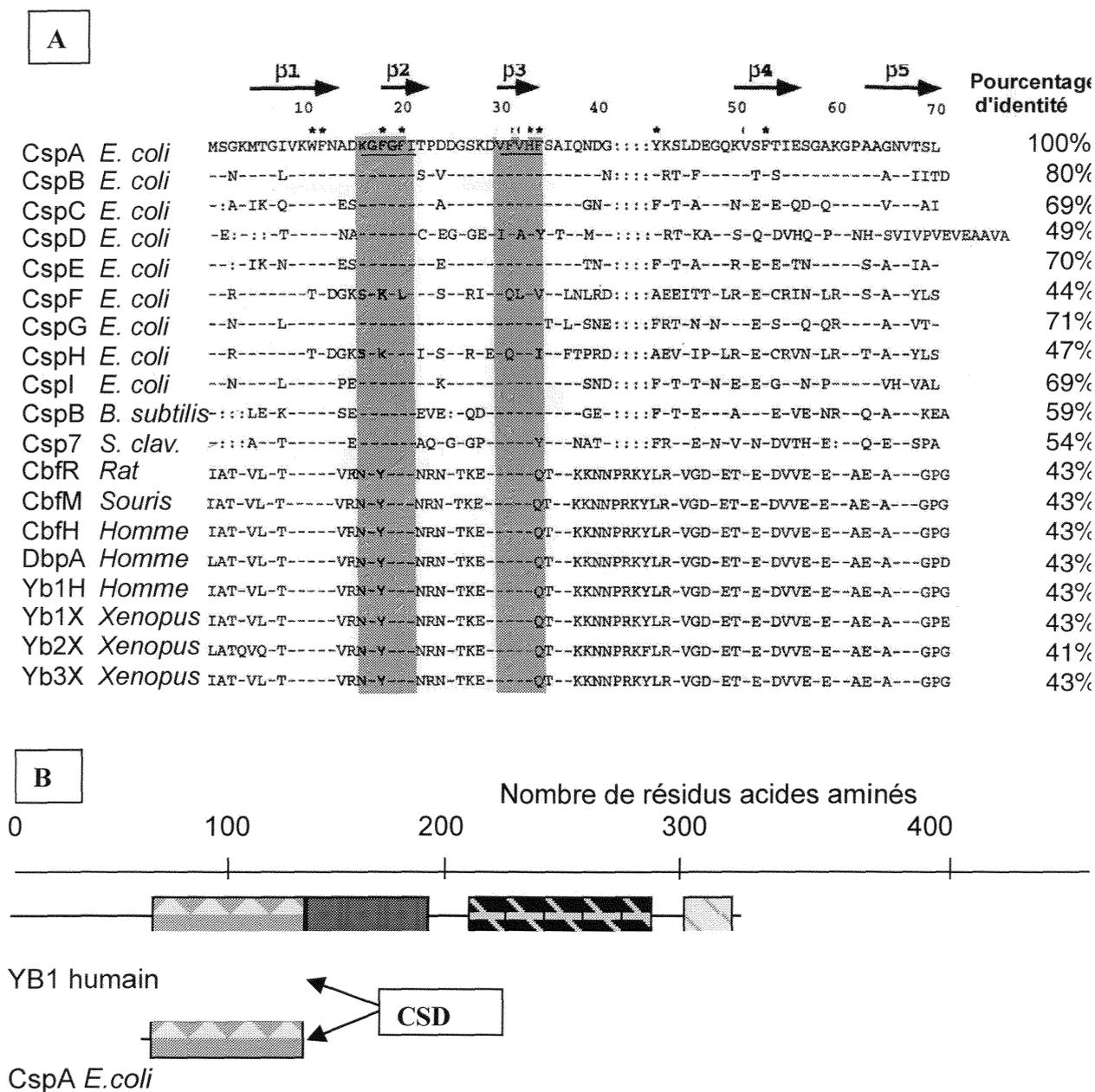


Figure 12. A. Alignements de séquences des membres de la famille CspA et des protéines eucaryotes Y-Box ayant des domaines dits de "cold shock". Les acides aminés identiques sont mentionnés par (-), les résidus manquants par (:). Les motifs RNP1 et RNP2 sont soulignés pour la séquence de la protéine CspA, les résidus correspondants sont grisés pour toutes les séquences. Les acides aminés aromatiques conservés sont mentionnés par (*). (D'après Feng *et al.*, 1998)

B. Homologie de domaine CSD ("cold shock domain") de la protéine YB1 humaine et de CspA d'*E. coli*.

protéine CspA s'autorégulerait donc en se fixant à la séquence "cold box" (Thieringer *et al.*, 1998). A la température de 15°C, le temps de demi-vie de l'ARNm *cspA* diminue au cours de la phase d'acclimatation (Fang *et al.*, 1998). Donc, la réduction de l'expression de *cspA* après la phase d'acclimatation est partiellement due à la déstabilisation de son ARNm pouvant alors être dégradé par la RnaseE (Fang *et al.*, 1997).

au niveau traductionnel

La séquence de Shine-Dalgarno (site de fixation du ribosome en amont du codon d'initiation) et le codon d'initiation ne semblent pas suffisants à faible température pour former le complexe d'initiation de la traduction pour les ARNms domestiques. En ce qui concerne les ARNms des protéines de choc froid, ils doivent former un complexe d'initiation de la traduction et ce sans les facteurs ribosomiaux (RbfA, CsdA, IF2). Les ARNms de protéines de choc froid : CspA, CspB, CspG, CsdA et RbfA (qui sont toutes des protéines de choc froid de classe I) possèdent un site supplémentaire de fixation au ribosome. L'ARNm de *cspA* contient une séquence complémentaire de l'ARN 16S (Figure 13). Cette séquence complémentaire est localisée dans la région codante, 12 bases en aval du codon d'initiation, et est appelée "Downstream box (DB)". La séquence DB est connue pour augmenter l'initiation de la traduction même en l'absence de la séquence Shine-Dalgarno (Sprengart *et al.*, 1996). Mitta *et al.* (1997) ont démontré que cette région DB est indispensable pour la traduction de l'ARNm *cspA*, lors de la phase d'acclimatation. Durant cette phase, la traduction est bloquée pour les ARNms des gènes domestiques, des facteurs ribosomiaux spécifiques au choc froid étant requis pour former un complexe d'initiation de la traduction. Il a été proposé par ces auteurs que la séquence "DB" des ARNms des gènes de choc froid permette la formation d'un complexe d'initiation stable à faible température et en l'absence des facteurs

ribosomaux. Quand un ARNm *cspA* tronqué (mais ayant conservé la séquence DB) est surexprimé, il séquestre tous les ribosomes, ce qui bloque complètement la croissance. Cet effet est appelé "low-temperature effect of truncated *cspA*" (LACE). (Jiang *et al.*, 1997). La synthèse de cet ARNm tronqué n'est pas régulée du fait de l'absence de la protéine CspA fonctionnelle.

Mitta *et al.* (1997) proposent le mécanisme suivant pour l'induction de *cspA* à faible température :

- promoteur fort de *cspA* à faible température,
- l'ARNm *cspA* très instable à 37°C, devient stable juste après la baisse de température grâce aux structures secondaires de la région 5'UTR, cet ARNm *cspA* peut être traduit par des ribosomes, durant cette phase d'acclimatation, alors que les ARNms domestiques ne le sont pas. Un schéma récapitulatif de cette régulation est proposé à la figure 14.

2.5.1.2.7. Structure de la protéine CspA et ses homologues

Chez *E. coli*, la protéine CspA renferme 70 résidus d'acides aminés, avec un point isoélectrique de 5. Au pH physiologique, elle est donc globalement chargée négativement. Cette protéine est composée de 5 feuillets β antiparallèles formant une structure en tonneau β (Goldstein *et al.*, 1990 ; Newkirk *et al.*, 1994 ; Schindelin *et al.*, 1994). Une structure homologue a été trouvée auparavant chez *B. subtilis* pour CspB (Schindelin *et al.*, 1992 ; Schindelin *et al.*, 1993 ; Schnuchel *et al.*, 1993) (Figure 15). Ce tonneau β a un cœur hydrophobe et une surface hydrophile. Les 5 feuillets sont nommés $\beta 1$ (formé par les résidus 5-13), $\beta 2$ (18-22), $\beta 3$ (30-33), $\beta 4$ (50-56), et $\beta 5$ (63-70). Au niveau des résidus Lys-10 et Asn-66 se trouvant respectivement dans les

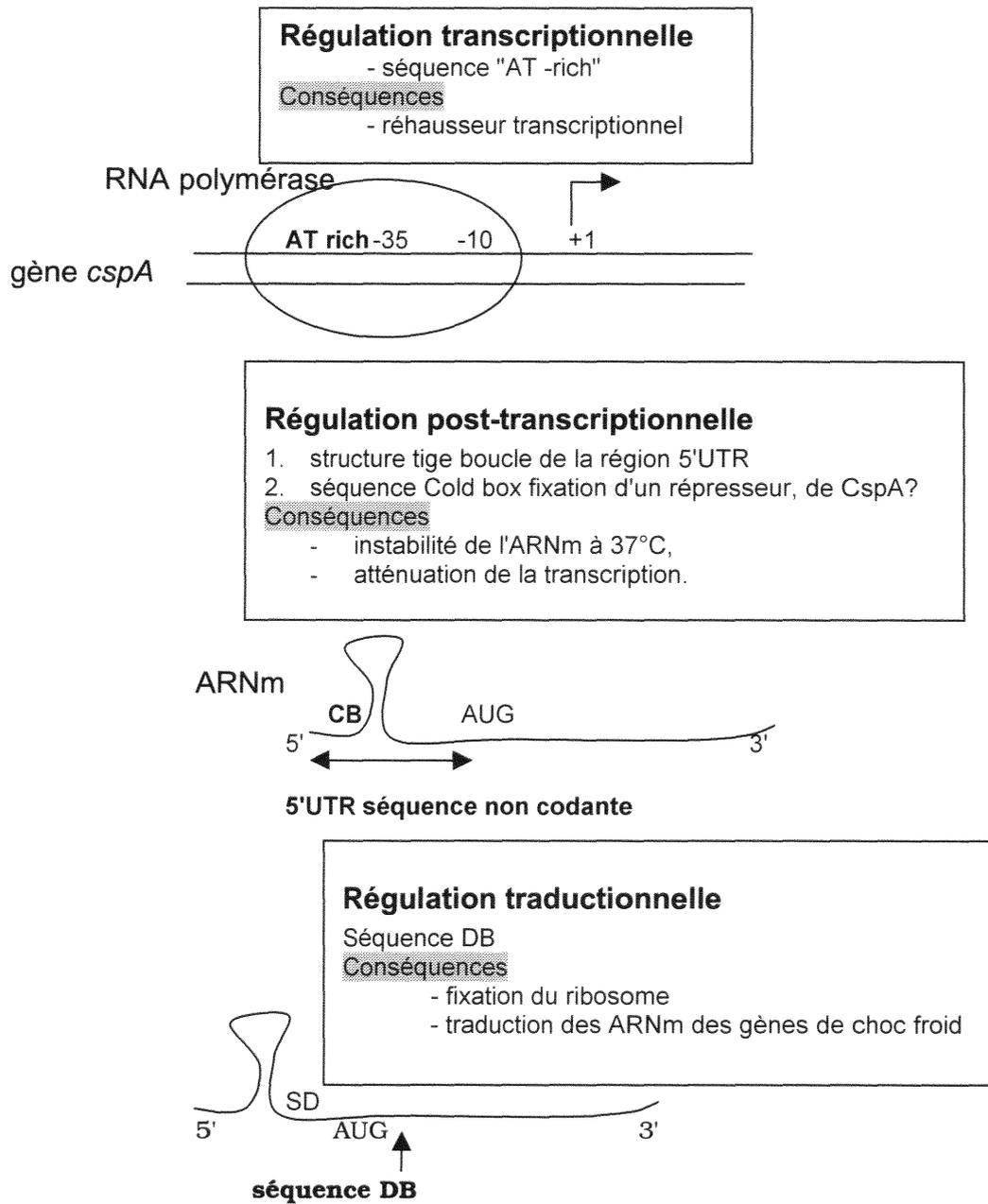


Figure 14. Schéma récapitulatif de la régulation fine de l'expression de CspA (Mitta *et al.*, 1997, Jiang *et al.*, 1997, Bae *et al.*, 1997).

AT-rich : séquence riche en AT ; 5'UTR : untranslated region ; CB : cold box ; SD : fixation du ribosome ; AUG : codon d'initiation de la traduction ; DB : Downstream box.

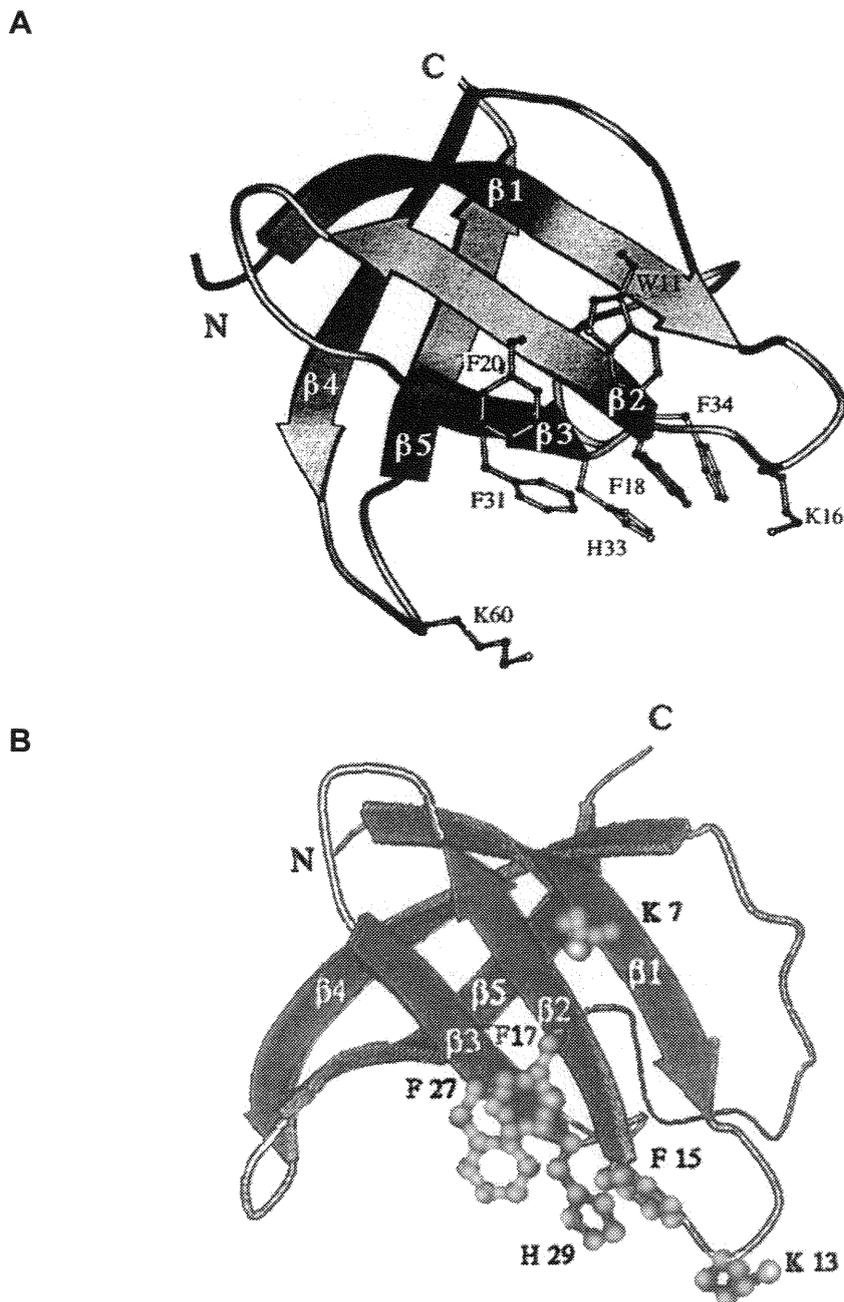


Figure 15. Structures tridimensionnelles

A. CspA d'*E. coli* d'après Reid *et al.*, 1998.

B. CspB de *B. subtilis* d'après Graumann et Marahiel, 1996a

feuillet $\beta 1$ et $\beta 5$, des renflements (dits "bulges") cassent les feuillets en deux petits morceaux $\beta'1-\beta''1$ et $\beta'5-\beta''5$ (Feng *et al.*, 1998). Les feuillets anti-parallèles sont stabilisés par des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes entre les feuillets β (Figure 16).

La séquence contient 2 sites de fixation aux ARNs : "RNA binding motifs" appelés RNP1 et RNP2, formant le "cold shock domain" (Figure 7). Ce domaine expose une surface riche en résidus d'acides aminés basiques et aromatiques, pouvant servir de sites de fixation aux acides nucléiques, au niveau de séquences nucléotidiques bien particulières comme la séquence CCAAT (La Teana *et al.*, 1991 ; Jones *et al.*, 1992a ; Jones et Inouye, 1994 ; Graumann et Mahariel, 1994 ; Schindler *et al.*, 1998). La construction de modèles simples indique qu'il est possible que la plupart des résidus d'acides aminés aromatiques s'empilent avec les bases d'ADN simple brin (ou de l'ARN). Ces acides aminés sont très conservés au cours de l'évolution, ce qui indique qu'il y a une forte pression de sélection pour la conservation des "cold- shock domains" chez différents organismes (Lee *et al.*, 1994 ; Schröder *et al.*, 1995). CspA est un membre de la famille des protéines appelées "oligonucléotide/oligosaccharide-binding protein" (OB fold protein), qui se fixent aux acides nucléiques. Parmi ces protéines qui ont des fonctions biochimiques identiques de fixation à l'ADN simple brin ou à l'ARN mais qui n'ont pas les mêmes séquences : la polyribonucléotide nucléotidyltransférase (Bycroft *et al.*, 1997), le facteur d'initiation I de la traduction d'*E. coli* (Sette, *et al.*, 1997), le facteur d'élongation G de *Thermus thermophilus*, (Aeversson *et al.*, 1994), les protéines ribosomales S17 de *Bacillus stearothermophilus* (Golden *et al.*, 1993)... Il est remarquable de voir des protéines avec des séquences aussi variées, générant des motifs tridimensionnels similaires, et ayant toutefois des fonctions homologues de fixation aux acides nucléiques simples brins (Feng *et al.*, 1998).

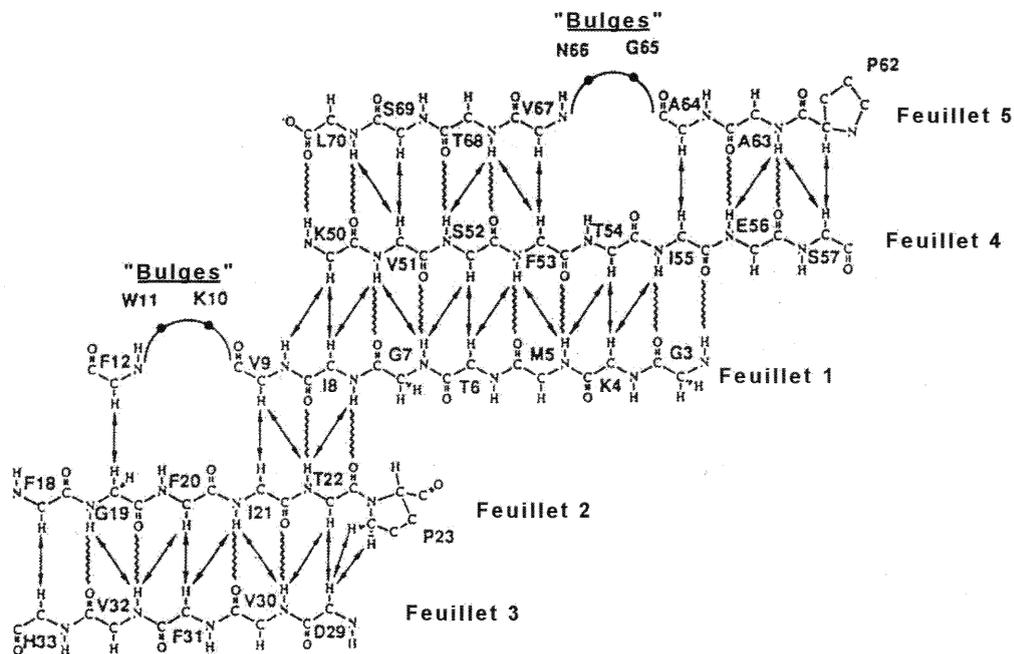


Figure 16. Schéma des 5 brins β de la protéine CspA d'*E. coli*. Représentation des liaisons hydrogènes potentielles, et des renflements dits "Bulges". D'après Newkirk *et al.*, 1994)

2.5.1.3. Superenroulement de l'ADN et régulation thermique de la synthèse des acides gras insaturés

L'état de superenroulement de l'ADN cellulaire est maintenu par une balance entre les activités de l'ADN gyrase qui introduit des supertours négatifs, et de la topoisomérase I qui les relâche (Drlica, 1994). Par conséquent, une augmentation du superenroulement négatif dans les cellules transférées de la température de 37°C à 20°C peut être le résultat de l'augmentation de l'activité ADN gyrase, ou de la diminution de l'activité de l'ADN topoisomérase I, ou des deux. Chez *E. coli*, Jones *et al.* (1992b) ont montré que l'ADN gyrase est une protéine de choc froid, surexprimée grâce à un activateur transcriptionnel qui se trouve être la protéine CspA. De plus, Qoronfleh *et al.* (1992) ont démontré que des promoteurs inductibles par le froid ne le sont pas chez une souche d'*E. coli* où le gène de l'ADN gyrase est délété, ce qui implique que le superenroulement de l'ADN joue un rôle dans la régulation du choc froid.

Chez *B. subtilis*, quand une culture à 37°C est transférée à 20°C, la synthèse d'acides gras insaturés est induite. Il existe donc un système de désaturation induit par le froid, la biosynthèse des acides gras insaturés peut être bloquée en utilisant un inhibiteur de l'ADN gyrase, la novobiocine (Grau *et al.*, 1994). Ces observations suggèrent la possibilité que la transcription des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras insaturés soit contrôlée par un promoteur qui ait une activité modulée par les changements topologiques de l'ADN. Cependant, les mécanismes moléculaires doivent être déterminés.

2.5.2. Réponse au choc froid chez les bactéries psychrophiles et psychrotrophes

Les microorganismes capables de croître à des températures proches de 0°C sont divisés en deux groupes, les psychrophiles et les psychrotrophes. Les bactéries psychrophiles ont une température optimale de croissance inférieure à 15°C alors que les bactéries psychrotrophes dites psychrotolérantes ont une température optimale de croissance supérieure à 15°C et pouvant même atteindre 40°C (Russell, 1990 ; Gounot, 1991). Les bactéries sont souvent classées en quatre groupes ayant des limites de températures de croissance variables (Tableau 6).

2.5.2.1 Synthèse de protéines d'acclimatation au froid

Comme nous l'avons vu précédemment pour une bactérie mésophile, la baisse rapide de la température induit la synthèse de protéines dites de choc froid (CIP). Pour une bactérie psychrophile ou psychrotrophe exposée à basse température pendant une longue période, des protéines d'acclimatation au froid ou CAP sont synthétisées. La synthèse protéique serait le facteur majeur permettant aux bactéries psychrophiles et psychrotrophes de croître aux températures proche de 0°C. Ces CAPs ont été mises en évidence chez diverses bactéries : *Aquaspirillum arcticum* (psychrophile), *Pseudomonas putida* (psychrotrophe), *Bacillus psychrophilus* (psychrotrophe) exposées à de faibles températures dans des environnements différents (mer froide, sol, réfrigérateur...) (Roberts et Inniss, 1992 ; Gumley et Inniss, 1996 ; Whyte et Inniss, 1992).

De plus, dans ces conditions, les protéines CIPs sont également synthétisées chez ces bactéries. Ceci suggère que ces protéines auraient un rôle important pour la survie à faible température, même si leurs fonctions chez ces "bactéries du froid" ne sont pas encore établies. Le nombre de CIPs et CAPs et leur taux de synthèse sont

Tableau 6. Classement des bactéries selon leur température de croissance
(Desmazeaud et de Roissart, 1994).

Groupes	Températures de croissance	
	Optimales	Extrêmes
thermiques		
Psychrophiles	10-15°C	0-20°C
Psychrotrophes	30-40°C	0-45°C
Mésophiles	18-35°C	5-45°C
Thermophiles	39-46°C	20-60°C

d'autant plus importants que la température du choc froid est basse ou que l'amplitude du choc est importante. (Berger *et al.*, 1996; Araki *et al.*, 1991a, Hébraud *et al.*, 1994 ; Michel *et al.*, 1997).

Panoff *et al.* (1997) ont montré qu'une bactérie mésophile *Enterococcus faecalis* peut synthétiser des protéines d'acclimatation quand le choc froid dure, afin que la croissance à faible température continue. Chez *Enterococcus faecalis*, une dizaine de protéines CAPs sont synthétisées après 4 jours à 8°C.

2.5.2.2. CspA homologue chez les bactéries psychrotrophes

Chez ces bactéries qui survivent au froid, une question se pose : la protéine CspA homologue qui semble ubiquitaire chez les bactéries est-elle constitutive lors de la croissance à basse température ou doit elle être induite par une baisse de température comme chez les mésophiles ?

Schröder *et al.* (1993) ont recherché chez différents bacilles thermophiles, mésophiles et psychrotrophes s'il existait un gène homologue à CspB de *Bacillus subtilis*. Ils ont trouvés un gène très conservé, avec un taux d'identité de 97 à 82 % chez les espèces étudiées. Cette forte conservation de CspB dans le genre *Bacillus* implique une fonction biologique commune pour cette protéine.

Berger *et al.* (1997) ont mis en évidence le gène *capA* (gène homologue à *cspA*) qui code pour une protéine d'acclimatation chez *Arthrobacter globiformis*.

Francis *et al.* (1998) ont supposé qu'il existait de subtiles différences entre la régulation et/ou la structure des protéines Csp des *Bacillus* mésophiles et psychrotrophes. Ils ont pu mettre en évidence que le gène *csp* des souches psychrotrophes se différenciait des souches mésophiles seulement par quelques bases de la région codante, sans en expliquer l'incidence sur la régulation. Néanmoins, les

auteurs suggèrent que cette seule différence pourrait servir à discriminer rapidement les souches psychrotrophes des souches mésophiles en réalisant des sondes d'hybridation très efficaces.

La recherche de la présence du gène *cspA* homologue d'*E.coli* chez de nombreuses bactéries psychrotrophes (à Gram-positif comme à Gram-négatif) a été positive à quelques exceptions près. Pour les auteurs, ce gène serait présent dans les bactéries où il ne l'ont pas décelé, mais il serait alors trop divergent pour être révélé par la sonde (Ray *et al.*, 1994). De plus, ce gène semble être exprimé constitutivement à un niveau basal, à faible température. Il faut alors un changement de température brutal pour observer une augmentation de la transcription de ce gène. La régulation du gène *cspA* homologue chez les bactéries psychrotrophes doit probablement être différente de celle des bactéries mésophiles, mais rien n'est encore proposé pour l'instant.

Hébraud *et al.* (1994) et Michel *et al.* (1997) ont mis en évidence par 2D PAGE chez le psychrotrophe *Pseudomonas fragi* la présence de 4 protéines E7,0 ; E8,0 ; C7,0 et C8,0 qui inter-réagissent avec l'anticorps anti-C8,0 (cet anticorps réagit également avec la protéine d'*E. coli* CspA). Ces quatre protéines doivent donc faire partie de la même famille des Csp. Les protéines E7,0 et E8,0 sont synthétisées à une température supérieure à la température optimale de croissance, alors que C7,0 et C8,0 sont synthétisées à des températures proches de 10°C et semblent être réprimées à haute température (Michel *et al.*, 1996).

L'identification des protéines d'acclimatation au froid et la découverte des mécanismes de régulation du gène de la protéine majeure de choc froid chez les bactéries psychrotrophes et psychrophiles aideront à comprendre comment ces bactéries peuvent se développer aux températures basses extrêmes.

2.5.3. Choc froid chez les bactéries lactiques

2.5.3.1. Réponse au choc froid chez *Lc. lactis*

Le gène *cspB* inductible au froid a été caractérisé chez *Lc. lactis*, par Chapot-Chartier *et al.* (1997) qui ont également mis en évidence une famille de gènes homologues à *cspA*.

Des cellules cultivées à 30°C sont transférées à 10°C au milieu de leur phase exponentielle de croissance. Un temps de latence de 6 à 8 h après le transfert est observé, ensuite la croissance exponentielle reprend avec un taux de croissance réduit de six fois, par comparaison à 30°C. Une famille de 5 gènes *csp*s nommés *cspA*, *cspB*, *cspC*, *cspD*, et *cspE* a été mise en évidence. Les gènes *cspA* et *cspB* tout comme *cspC* et *cspD* sont organisés en tandem, et *cspE* est trouvé comme un gène simple (Wouters *et al.*, 1998). L'analyse des 5 séquences permet aux auteurs de les regrouper en deux groupes, l'un comporte *cspA* et *cspC*, et le second les 3 autres gènes. Au sein d'un même groupe, les séquences ont au moins 80% d'identité, quant à l'identité entre les deux groupes elle n'est que de 55%. Pour les protéines CspA et CspC de *Lc. lactis*, quelques résidus sont différents de CspA d'*E. coli* et de CspB de *B. subtilis*, ce qui entraîne des valeurs de pI de CspA et CspC respectivement de 9,2 et 9,6. Ces pI sont très supérieurs à ceux observés (habituellement proches de 5,0) chez les autres CSPs. Cette différence est due à la présence en plus grand nombre de résidus basiques, donc de charges positives qui pourraient augmenter le pouvoir de fixation aux acides nucléiques chargés négativement.

2.5.3.2. Réponse au choc froid chez *Lb. plantarum*

Chez *Lb. plantarum*, le transfert des bactéries de la température de 37°C à 10°C engendre une augmentation du temps de génération d'un facteur de 28 fois (Derzelle *et al.*, 1996 ; Mayo *et al.*, 1997). Ces mêmes auteurs ont cloné et caractérisé deux gènes *cspL* et *cspP* inductibles à froid chez *Lb. plantarum*. Le gène *cspL* a été cloné à partir de l'ADN total de *Lb. plantarum* Lp80 tandis que *cspP* a été obtenu à partir de l'ADN total de *Lb. plantarum* C3.8. Les deux ORFs situées à deux loci distincts, diffèrent de 37 nucléotides sur 198, conférant ainsi une identité de 81,4% entre ces deux gènes, et de 87,8% entre ces deux protéines.

Les deux protéines CspL et CspP seraient composées de 66 résidus acides aminés avec une *Mr* respectivement de 7290 et 7250 et de *pI* 4,31 et 4,34.

La baisse de température de 37°C à 10°C résulte en une augmentation modérée (de trois à 5 fois) des ARNms *cspL* et *cspP* qui est toujours observée 1 h après le choc à 10°C.

2.5.3.2. Gène de la protéine majeure de choc froid

Kim *et al.*, (1997, 1998b), ont rencontré chez différentes espèces de bactéries lactiques la présence du gène de la protéine majeur de choc froid, homologue à celle d'*E. coli*.

2.5.3.3. Cryotolérance

Les ferments lactiques sont souvent commercialisés sous forme lyophilisée ou congelée. Ces procédés de fabrication impliquent donc des baisses de température à des niveaux extrêmes. Par conséquent, il serait industriellement utile de connaître des mécanismes cellulaires de survie lors de l'exposition et du stockage à des températures

extrêmes afin de parvenir à minimiser les détériorations cellulaires et donc d'augmenter la viabilité.

La cryotolérance est la capacité à augmenter la survie bactérienne lors de la congélation par l'adaptation à de faibles températures. Elle a été peu étudiée chez *E. coli* et *B. subtilis* (Goldstein *et al.*, 1990 ; Willimsky *et al.*, 1992). Chez *Lc. lactis*, des cellules préincubées à 8°C ont une capacité de survie à des températures de congélation (-20°C) plus grande que les cellules non adaptées (Panoff *et al.*, 1995b ; Kim et Dunn, 1997 ; Kim *et al.*, 1998a). Cette cryotolérance peut-elle être ramenée au rôle antigélif de la protéine CspB rencontrée chez *B. subtilis* (Willimsky, 1992) ? Chez *B. subtilis*, des mutants *CspB* sont beaucoup plus affectés par la congélation à -80°C que la souche sauvage.

En conclusion générale, la réponse au choc froid est la plus étudiée chez les bactéries mésophiles. La baisse de température intervient à plusieurs niveaux qui sont récapitulés à la figure 17.

2.6. Comment aborder la réponse à un choc

Dans tout environnement, les bactéries sont soumises à des stress qui compromettent la multiplication et la survie de l'espèce. Il est désormais établi que les bactéries possèdent des mécanismes inductibles de résistance aux stress qui contribuent à leur survie en conditions défavorables. La recherche des gènes qui interviennent dans la réponse à un choc peut se réaliser à partir de différentes techniques.

2.6.1. Recherche des gènes impliqués dans la réponse aux stress

2.6.1.1. Mutagénèse par transposition

L'utilisation de la mutagénèse par transposition est mise en œuvre pour découvrir des gènes assurant la régulation des mécanismes de résistance. Un plasmide thermosensible, comportant un élément d'insertion IS, et un gène apportant une

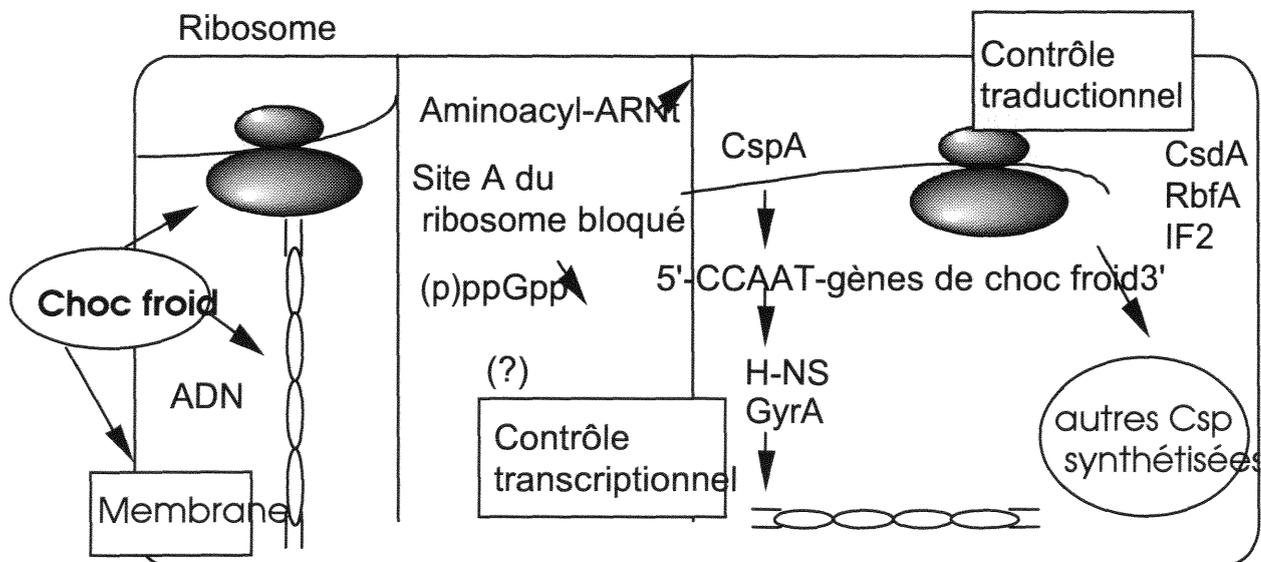


Figure 17. Schéma récapitulatif de la réponse au choc froid chez *E. coli* et d'autres bactéries mésophiles (Panoff *et al.* , 1998 ; Graumann et Marahiel, 1996b), intervenant aux niveaux :

- des ribosomes, leur site accepteur est bloqué, les aminoacyl-ARNt s'accumulent et le taux de (p)ppGpp diminue,
- du superenroulement de l'ADN,
- de la membrane qui subit des modifications biochimiques la rendant plus fluide,
- de la synthèse de protéines de choc froid, notamment la protéine CspA qui jouerait le rôle d'activateur transcriptionnel de certains gènes (*gyrA* et *hns*) en se fixant en amont du gène à une séquence CCAAT,
- de la synthèse des facteurs ribosomiaux (CdsA, RbfA, IF2) permettant la traduction des protéines domestiques.

résistance à un antibiotique est introduit dans une bactérie lactique. A température permissive, le plasmide peut se répliquer, à température plus élevée et en présence d'antibiotique la seule façon d'avoir une souche viable est due à l'intégration aléatoire du plasmide. Les clones ayant intégré le plasmide vont être mis en présence d'agent stressant. Les clones plus sensibles que le témoin vont être analysés pour trouver le ou les gène(s) qui sont interrompus.

Cette technique de mutagenèse insertionnelle peut également servir à isoler des clones qui sont plus résistants à l'agent stressant que la souche sauvage. Cette approche démontre que des mutations adéquates peuvent conduire à des mécanismes de résistance aux stress des souches plus performantes face à de brusques changements environnementaux. De telles souches pourraient améliorer le rendement et la reproductibilité des processus industriels. La connaissance des réponses bactériennes aux stress devrait permettre de sélectionner la résistance des souches en fonction des traitements technologiques envisagés et d'améliorer le rendement et la reproductibilité des processus industriels (Maguin *et al.*, 1996).

2.6.1.2. Recherche d'un gène "connu"

Pour une espèce donnée, au lieu de réaliser des mutations aléatoires et de chercher les gènes interrompus, la recherche d'un gène connu est souvent possible. En effet, dans les mêmes conditions de stress si un même gène est exprimé chez différents organismes, ce gène est dit conservé. Il est donc envisageable par la méthode PCR d'amplifier et de séquencer le gène supposé ubiquitaire chez la bactérie étudiée à l'aide de deux amorces nucléotidiques construites à partir des séquences conservées du gène correspondant découvert chez d'autres bactéries (Kim *et al.*, 1998)

2.6.2. Abondance d'ARNm

La mise en évidence d'un gène ne présage pas de son expression voire de sa surexpression dans des conditions particulières de croissance. Une mesure de la concentration des transcrits du gène en fonctions des différentes conditions de culture doit donc être réalisée. La comparaison de l'expression des ARNms en conditions normales et en conditions de choc présente de nouveaux axes de recherche appelé qui ont débouchés sur le notion de "transcriptome" (Velculescu *et al.*, 1997).

2.6.3. Abondance de certains métabolites

L'évolution de l'expression de la concentration de certains métabolites en fonctions des différentes conditions de croissance peut elle aussi être envisagée pour étudier un stress, c'est l'étude du métabolome.

2.6.4. Expression protéique

Entre le gène qui détient l'information génétique et la protéine fonctionnelle qui est l'ouvrier de la cellule, il se passe toute une série d'étapes de maturation. La protéomique prend en compte tous ces événements car elle étudie le produit fini. Elle établit ainsi le lien nécessaire entre la connaissance de la séquence du génome et le comportement cellulaire. L'analyse protéomique permet dans un système biologique donné de faire l'inventaire qualitatif et quantitatif de son contenu protéique avant et après un stimulus environnemental. Ces analyses comparatives permettent de répondre à la question : Quelles protéines sont modifiées entre deux états cellulaires?

L'électrophorèse bidimensionnelle a été utilisée pour étudier l'induction de différentes protéines de choc. Dans le cas de la réponse aux conditions de culture à températures basses de nombreux travaux à l'aide de cette technique ont été réalisés entre autre chez *Pseudomonas fragi*, (Hébraud *et al.*, 1994), *Listeria monocytogenes* (Phan-Than et Gormon, 1995), et *Arthrobacter globiformis* (Berger *et al.*, 1996). Avant de caractériser

les protéines de stress majeures dans le détail et de déterminer leur rôle, il est essentiel pour ces auteurs d'avoir une vue globale des protéines induites.

Ainsi, à l'aide d'un système d'électrophorèse bidimensionnelle optimisé, un nombre accru de protéines a pu être séparé. Les auteurs listent alors l'ensemble des spots protéiques qui ont subi un changement d'expression en fonction des conditions de croissance établissant 4 catégories de protéines : celles qui ont disparues, celles qui ont un taux d'expression diminué, celle qui un taux d'expression augmenté, et les protéines néosynthétisées. Les deux dernières catégories de protéines portent le nom de protéines de choc. Ce travail préliminaire débouche ensuite sur la caractérisation de certaines protéines de choc homologues.

3. Le Protéome

3.1 Historique

Le terme protéome a été inventé en 1994 par Marc Wilkins et Keith Williams de l'université Macquarie à Sidney en Australie. Ils ont défini ce mot comme étant l'ensemble des **PROTE**ines codées par le gén**OME** (Wilkins *et al.*, 1995). L'analyse protéomique consiste donc à étudier l'expression protéique globale des organismes vivants au niveau des cellules, des tissus, des liquides physiologiques (Anderson et Anderson, 1998). Bien que très récente, la notion de protéome prend jour avec O'Farrell (1975), qui décrit pour la première fois une technique pour séparer des protéines avec une résolution jusqu'alors jamais atteinte. Cette technique, l'électrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE), fut vite abandonnée par les progrès de la biologie moléculaire. La communauté scientifique se focalisa alors presque exclusivement sur le génome. Cependant, la connaissance du génome n'explique pas tout. Encore faut-il établir une relation entre les gènes et leurs produits (ARN et protéines) pour pouvoir

approfondir notre connaissance du fonctionnement cellulaire. L'intérêt récent pour le protéome coïncide avec l'apparition de nouvelles techniques. En effet, l'analyse protéomique nécessite l'association de différentes technologies :

- l'électrophorèse bidimensionnelle
- l'analyse et le traitement des images
- différentes techniques physiques et biochimiques d'identification de protéines.

3.2. Méthodologie de l'électrophorèse bidimensionnelle

La 2D-PAGE combine 2 séparations selon des critères complètement indépendants : la charge de la protéine et sa masse moléculaire. La 2D-PAGE permet de séparer potentiellement quelques milliers de taches (spots) protéiques. Il s'agit d'une technique de séparation quantitative, qui permet de déterminer la concentration relative des protéines exprimées de manière plus ou moins précise selon les méthodes de mise en image.

3.2.1. Méthodologies utilisées pour la première dimension

3.2.1.1. La méthode d'O'Farrell (1975)

Des molécules amphotères de pI connus (ou ampholytes) contenues dans la phase mobile du gel de première dimension forment sous l'effet d'un champ électrique un gradient de pH linéaire. Lors de la migration, chaque protéine s'immobilise dans la zone du gel où le pH est équivalent à son point isoélectrique. Pour chaque type d'échantillon, le mélange d'ampholytes doit être optimisé afin de produire le gradient de pH le plus linéaire et le plus résolutif possible. Cette technique est appelée CA-IEF "Carrier Ampholyte Isoelectric Focusing".

3.2.1.2. La méthode du gradient de pH immobilisé ou IPG (immobilized pH gradient)

Bjellqvist *et al.* en 1982, ont créé des dérivés d'acrylamide sur lesquels sont greffés des groupements carboxyliques et/ou amines avec des pKa définis. Ils ont ainsi obtenu des solutions d'acrylamide ayant des pH différents. A l'aide de deux solutions d'acrylamide de pH donné, des gradients ont pu être réalisés. Le gradient de pH est donc stable lors de la migration des protéines à leur pI . Les différences entre les deux méthodes se trouvent donc essentiellement, au niveau des ampholytes et de la forme du gel.

Les gradients de pH sont plus stables et reproductibles dans le cas des IPG, mais le manque de conductibilité de ces bandes de gels nécessite l'application d'un champ électrique élevé et donc un système réfrigéré. La bande de gel permet un dépôt d'échantillon de l'ordre de 10 fois supérieur à celui réalisé dans un capillaire (CA-IEF).

3.2.2. Méthodologie pour la deuxième dimension

La seconde dimension est une SDS-PAGE traditionnelle. Le gel d'IEF (IPG ou CA-IEF) est déposé au dessus du gel d'acrylamide de deuxième dimension, relié à la cathode. Une étape préliminaire dite d'équilibrage est cependant nécessaire, d'une part pour éliminer les ampholytes qui peuvent perturber la migration des protéines et, d'autre part, pour charger les protéines de SDS et resolubiliser les protéines afin d'améliorer leur transfert dans la deuxième dimension. Le transfert des protéines vers le gel de deuxième dimension se fait plus facilement avec le gel CA-IEF qu'à partir du gel en bande (IPG). De plus, du fait de la faible section du tube de gel la résolution est plus élevée dans le cas des CA-IEF.

3.3. Essor de l'électrophorèse bidimensionnelle

Suite à l'utilisation accrue de l'électrophorèse bidimensionnelle, les problèmes de reproductibilité entre les différentes équipes de recherche se sont vite posés. Un nombre grandissant de produits standardisés sont proposés aujourd'hui dans le commerce. Les gels de première dimension commercialisés sont des IPG. De plus, de nombreuses améliorations de la technique IPG sont en cours ou en projet, de nombreux nouveaux appareillages sont proposés avec des systèmes permettant de réaliser par exemple simultanément 100 IPG-IEF (système Isomorph, Leigh Anderson).

De nouveaux gels IPG sont proposés avec des gradients de pH basiques (pH 8-12) (Görg *et al.*, 1997), ou des gradients de pH restreints sur une ou deux unités de pH, permettant d'obtenir une résolution élevée entre 2 spots protéiques (<0,1 unité de pH) (Humphery- Smith *et al.*, 1997).

La standardisation des différentes étapes de la 2D-PAGE permet à la communauté scientifique de comparer plus facilement les profils électrophorétiques. Toutefois, il faut être conscient des limites de la 2D-PAGE : toutes les protéines exprimées dans une cellule ne sont pas repérées sur les cartes protéiques. En effet, un grand nombre de protéines ne sont pas solubles (en particulier les protéines membranaires) et la préparation de l'échantillon reste un point délicat de cette technologie. De plus, il existe le problème des protéines faiblement exprimées qui ne sont pas visibles avec les techniques de détection habituelles actuelles insuffisamment sensibles, mais qui peuvent jouer un rôle considérable dans la régulation des gènes. Des progrès dans la détection doivent être envisagés.

3.4. Intérêt de l'étude protéomique

L'étude du protéome a de nombreuses applications :

- étude d'un stress environnemental,
- étude d'une maladie, effet d'un traitement,
- différenciation d'espèces, de souches.

La 2D-PAGE est un outil pour séparer les protéines selon leur masse moléculaire et leur point isoélectrique. L'analyse d'images nous permet de comparer différents gels par le biais de l'intensité des spots, de la présence ou de l'absence de certains spots. Le but de l'étude du protéome est d'identifier chaque spot protéique et ce :

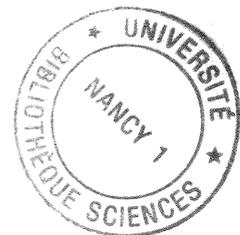
* soit à partir de la protéine intacte transférée sur membrane par :

- immunodétection
- séquençage de l'extrémité N-terminale
- composition en résidus acides aminés
- spectrométrie de masse

* soit à partir de peptides issus de digestions enzymatiques ou chimiques de la protéine *in situ* dans le gel. Après élution du gel, les fragments peptidiques sont séparés par HPLC puis analysés par :

- séquençage de l'extrémité N-terminale des peptides
- composition en résidus acides aminés
- spectrométrie de masse.

Tous les résultats, issus de ces techniques biochimiques sont couplés à une recherche dans les banques de données (mises à disposition par le réseau Internet) pour identifier les protéines. Ainsi, les paramètres tels que la masse moléculaire, le *pI* (paramètres apparents obtenus par 2D-PAGE), la composition en résidus d'acides aminés, le microséquençage de l'extrémité N-terminale, la masse des peptides obtenus



après digestion enzymatique..., sont utilisés pour les confronter aux paramètres de toutes les protéines connues des banques de données. (<http://www.expasy.ch/tools/>) (Tableau 7).

Dans un même laboratoire, toutes les techniques qui permettent d'obtenir ces différents paramètres ne peuvent pas toujours être mises en œuvre. Les choix des techniques utilisées vont dépendre des équipements préexistants et des habitudes de travail de chaque laboratoire, du type des études réalisées et de leur coût. Cette technique de 2D-PAGE qui pouvait être considérée au début comme très "artisanale" devient donc petit à petit une technique d'assemblage, de mise en œuvre de kits à haute valeur ajoutée. Le but est toujours d'obtenir des résultats répétables et reproductibles. Ainsi, les différences de méthodologies une fois gommées en choisissant des produits standardisés, de nombreuses équipes proposent sur différents sites Internet le profil protéique bidimensionnel de l'organe ou de l'organisme étudié (<http://expasy.hcuge.ch/ch2d/2d-index.html#db>) (Tableau 8) avec des spots protéiques qui ont été identifiés (Figure 18).

Il est possible de soumettre un gel de 2D-PAGE sur le réseau Internet par le site <http://expasy.nhri.org.tw/ch2d/make2ddb.html>.

Quoi qu'il en soit, le développement actuel des techniques de séparation, de détection, de cartographie et d'analyse des protéines fait de l'étude des protéomes le challenge des prochaines années.

Tableau 7. Quelques outils informatiques pour l'identification des protéines
(<http://www.expasy.ch/tools/>).

AACompIdent	Identify a protein by its amino acid composition
AACompSim	Compare the amino acid composition of a SWISS PROT entry with all other entries
MultIdent	Identify proteins with pI, Mw, amino acid composition, sequence tag and peptide mass fingerprinting data
PeptIdent	Identify proteins with peptide mass fingerprinting data, pI and Mw. Experimentally measured, user specified peptide masses are compared with the theoretical peptides calculated for all proteins in SWISS PROT, making extensive use of database annotations
TagIdent	Identify proteins with pI, Mw and sequence tag, or generate a list of proteins close to a given pI and Mw
Compute pI/Mw	Compute the theoretical pI and Mw from a SWISS PROT or TrEMBL entry or for a user sequence

Tableau 8. Quelques banques de données proposant des 2D-PAGE.

SWISS-2PAGE	Homme (Foie, plasma, globules rouges, lymphome, reins,...) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Dictyostelium discoideum</i> <i>E. coli</i>
2-DE databases	<i>Arabidopsis thaliana</i> (feuille, graine, tige...) <i>Oryza sativa</i> (feuille, graine, tige...) Souris (cerveau)
Yeast 2D-PAGE	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Maize genome database	Maïs
ECO2DBASE	<i>E. coli</i>
Sub2D	<i>Bacillus subtilis</i>
Cyano2Dbase	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803

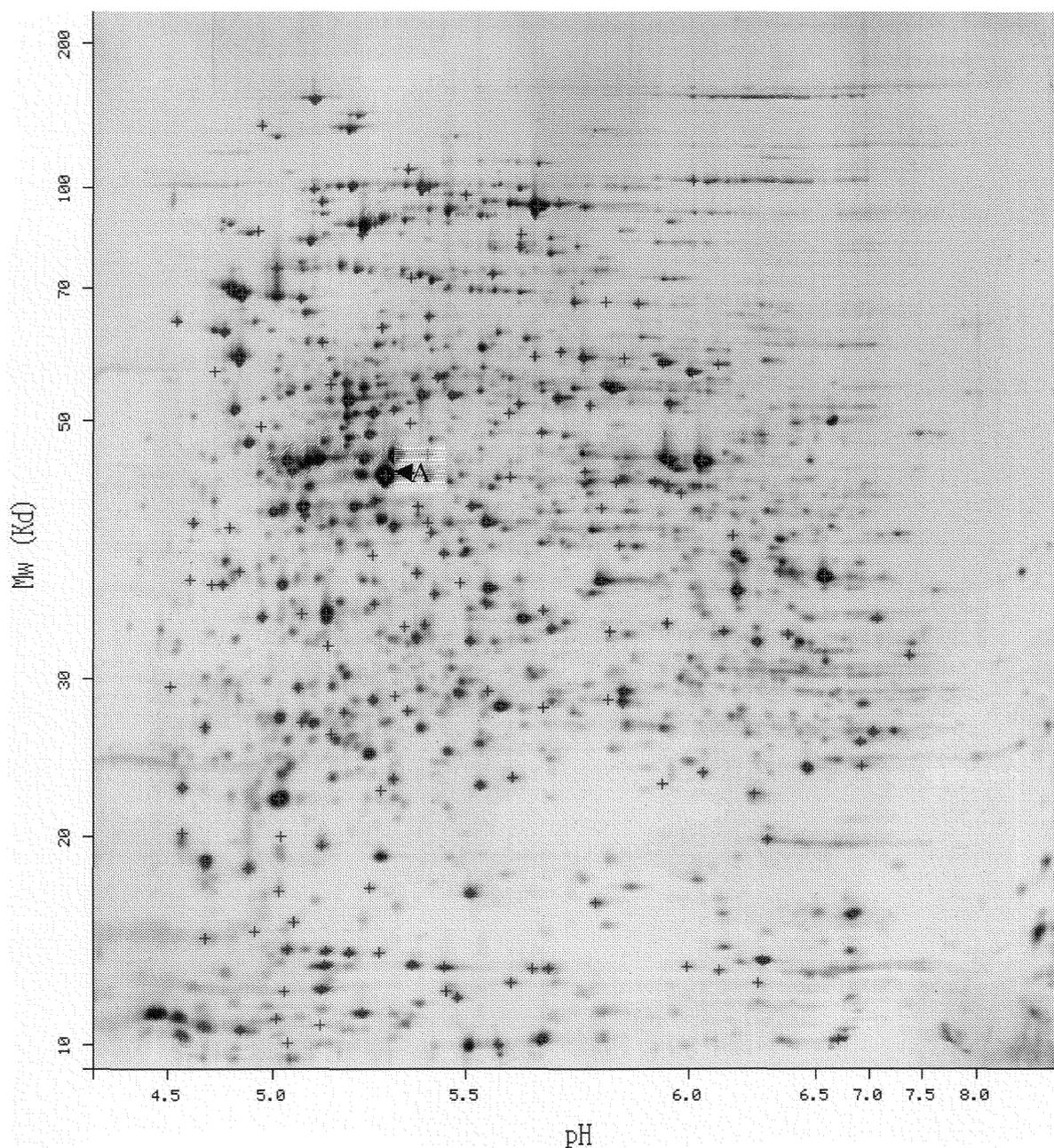


Figure 18. Cartographie bidimensionnelle d'*Escherichia coli* sur le site SWISS-2DPAGE avec certains spots identifiés (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/map3/ECOLI>)

En cliquant sur le spot A : obtention des paramètres de la protéine sélectionnée : Nom de la protéine ELONGATION FACTOR TU (EF-TU).
pI=5.32, Mw=44615 (d'après Pasquali *et al.*, 1996).

II. Objectifs du travail

Les industries agro-alimentaires consomment de grandes quantités de ferments qui sont conservés et utilisés principalement sous forme de concentrés congelés ou lyophilisés. Au cours de la technologie de fabrication de ces levains, de nombreux points critiques pour la survie des souches, et donc pour le rendement final de la préparation, existent et peuvent être situés à plusieurs niveaux :

- la fermentation
- la concentration
- la mise en suspension, avec addition de cryoprotecteurs
- la congélation et la lyophilisation.

Lors du procédé, deux chocs froids au moins existent :

- au moment de la récupération des cellules, la température va chuter
- lors de la congélation.

L'industrie du ferment s'intéresse essentiellement à la production de biomasse et à sa protection lors des phases les plus critiques telles que la congélation et la lyophilisation. Peu d'études ont porté sur l'état physiologique lors du choc froid subit au cours de la récupération des cellules et son importance dans le comportement ultérieur des ferments.

Ces bactéries peuvent-elles être préparées à répondre le mieux possible à la phase critique de congélation ou de lyophilisation ? La phase de concentration est-elle une phase de stress ? Doit-elle se faire à la température de croissance ou en abaissant déjà la température ? Cet abaissement peut-il entraîner la synthèse de protéines particulières qui pourraient avoir un effet favorable ou non, sur les phases de fabrications suivantes ?

Nous avons orienté notre recherche sur la réponse à un choc froid de *Sc. thermophilus*.

Cette étude comporte trois parties principales :

- la réponse physiologique de cellules en phase exponentielle de croissance de *Sc. thermophilus* cultivées à 42°C exposée à des basses températures de 15 et 20°C,

- la mise au point de l'électrophorèse bidimensionnelle sur minigel afin d'étudier l'expression protéique en conditions de choc froid chez *Sc. thermophilus*. Deux protéines de choc froid ont été ainsi mises en évidence,

- la purification d'une protéine de 21,5 kDa en trois étapes (précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie sur résine échangeuse d'anions et HPLC en phase inverse) ainsi que la caractérisation d'une protéine de choc froid de 7,5 kDa après deux étapes de purification (précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie sur résine échangeuse d'anions) et séquençage par dégradation d'Edman de l'extrémité N-terminale.

En parallèle des travaux réalisés sur la réponse au choc froid, l'étude de profils protéiques bidimensionnels de *Sc. thermophilus* a été réalisée afin de proposer à terme une cartographie protéomique. En effet, bien que depuis quelques années l'identification fine des souches soit réalisée par analyse génétique, aujourd'hui, une autre technique semble pouvoir être utilisée : c'est la technique de l'électrophorèse bidimensionnelle qui peut servir à l'identification des souches, mais aussi à la comparaison de l'expression protéique lors de changements d'états physiologiques d'une même souche. Ainsi nous proposons en dernière partie, une étude protéomique préliminaire réalisée sur *Sc. thermophilus*, avec la cartographie de 12 protéines caractérisées par dégradation d'Edman.

III. Matériel et Méthodes

1. Matériel et réactifs

1.1. Chromatographie

- Chromatographie en Batch :
 - DEAE Bio-gel Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, USA),
 - Phosphocellulose P11 Whatman (Whatman Biosystems, Maidstone, Kent, Royaume-Uni).
- Chromatographie basse pression, pompe péristaltique (Minipuls2 Gilson), Colonne 15 cm de hauteur et 1,5 cm de diamètre, remplie de DEAE Bio-gel A gel (Bio-Rad, Hercules, USA) ou colonne 5 cm de hauteur et 1,5 cm de diamètre, remplie de Phosphocellulose P11 Whatman (Whatman Biosystems, Maidstone, Kent, Royaume-Uni).
- HPLC
 - Unité HPLC Alliance (Waters, Milford, USA).
 - Détecteur à barrette de diodes 996 (Waters, Milford, USA).
 - L'analyse est réalisée au moyen du logiciel Millenium version 2.15.1. (Millipore, Milford, USA).
 - Colonnes Delta-Pack C4, 30 nm, 5 μ m (Waters, Milford, USA) :
 - analytique 5 x 150 mm
 - semi-préparative 7,8 x 300 mm
 - Unité HPLC Perkin Elmer (Applied Biosystems, Brownlee Foster City, CA, USA) utilisée pour la séparation de peptides issus d'hydrolyse sur une colonne C18 Narrowbore.

1.2. Electrophorèse

- Appareil pour électrophorèse mono et bidimensionnelle Mini-PROTEAN II (Bio-Rad, Hercules, USA)
- Appareil de transfert de protéines sur membrane Mini Trans-Blot Transfer (Bio-Rad, Hercules, USA)
- Logiciel BiImage version 6.01 pour l'analyse des gels d'électrophorèse (Millipore, Milford, USA)
- Membrane de transfert PVDF (Bio-Rad, Hercules, USA)

1.3. Séquençage

- Micro-séquenceur automatique model 476A (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City U.S.A.).

1.4. Matériels divers

- Boudins de dialyse Visking (10 000 Da) (Polylabo, Strasbourg, France)
- Centrifugeuse J2-21 (Beckman, Palo Alto, USA), rotors utilisés : JA-14 et JA-20
- Evaporateur Speed-Vac RC 1010 (Jouan, Saint-Herblain, France)
- Film Hyperfilm β max (Eastman Kodak company, USA)
- Lyophilisateur Hetosic (Heto Lab. Equipment a/s, Birkerod, Danemark)
- Sonicateur Vibra-cell 600W (Bioblock Scientific, Illkirch, France)
- Spectrophotomètre MPS 2000 (Shimadzu, Kyoto, Japon)
- Station Pico-Tag (Waters, Milford, MA, USA)
- Unité d'électrophorèse capillaire Quanta 4000 (Waters, Milford, USA).

1.5. Réactifs divers

- Acétonitrile (Rathburn Chemical Limited, Walkerburn, Royaume-Uni)

- Acide trifluoroacétique (TFA) (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, USA)
- Ampholytes : Bio-Lyte pH 3/10 et pH 5/8 (Bio-Rad, Hercules, USA)
- Bleu de Coomassie G250 pour réactif de Bradford et coloration des protéines transférées sur membrane (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Allemagne)
- Bleu de Coomassie R250 pour coloration des gels d'électrophorèse (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Allemagne)
- 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) liquid substrat system sigma D-7304 (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, USA)
- Dithiothreitol (DTT) (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, USA)
- DNase I (E.C. 3.1.21.1) (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, USA)
- Fixateur Kodak AL 4 (à diluer 5 fois) pour autoradiographie (Eastman Kodak Company, USA)
- "Kaleidoscope Prestained Standards" (Bio-Rad, Hercules, USA)
- L³⁵S-méthionine (18.5 MBq-10 mCi/ml), (Amersham, Buckinghamshire, Royaume-Uni)
- Nitrate d'argent (Prolabo, France)
- Pipérazine diacrylamide PDA (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, USA)
- Réactif OFM anion-BT pour électrophorèse capillaire (Waters, Milford, USA)
- Révélateur Kodak LX 24 (à diluer 5 fois) pour autoradiographie (Eastman Kodak Company, USA)
- Ribonucléase A (E.C. 3.1.26.2.) (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, USA)
- SDS-PAGE Standards, broad range et 2-D SDS-PAGE standards (Bio-Rad, Hercules, USA)

- Solution d'acrylamide et de N,N' méthylène bisacrylamide (Roth, Karlsruhe, Allemagne)
- Trypsine (E.C.3.4.21.4.) extraite de pancréas de bœuf. Purifiée par HPLC pour le séquençage de protéines (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, USA)

2. Souches et milieux de culture

2.1. Souches.

L'étude de la réponse physiologique aux conditions de culture à températures basses a été réalisée sur deux souches d'origines industrielles différentes de *Sc. thermophilus* :

- PB18 est une souche de la collection du Laboratoire des BioSciences de l'Aliment. Son origine est un levain industriel de fromages à pâte pressée cuite, fourni par la Fédération Internationale Laitière (F.I.L.).
- Y105 est une souche issue d'un ferment lyophilisé mixte de yaourt qui a été isolée et clonée pour cette étude.
- D'autres souches ont été ponctuellement utilisées.

Pour l'étude de l'expression protéique en condition de choc froid, nous avons utilisé essentiellement la souche PB18. Les souches sont conservées congelées à -65°C dans du lait reconstitué à 10% (p/v) et stérilisé à 110°C pendant 15 min. Après une courte incubation, le lait coagule, les tubes sont alors immédiatement mis au congélateur. Avant toute expérience, ces souches décongelées (0,1 mL) sontensemencées en préculture dans un tube de 10 mL de lait reconstitué à 10% (p/v). Cette préculture est incubée à 42°C pendant 16 heures.

2.2. Milieux de culture

Lors de ce travail, les milieux de culture TPPY (Bracquart, 1981) et M17 (Terzaghi & Sandine, 1975) ont été utilisés ; leur composition est mentionnée dans le tableau 9.

Tous ces milieux sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes. La source carbonée, du lactose en solution (stérilisé par filtration sur membrane), n'est ajoutée qu'après la stérilisation, afin d'éviter toute réaction de Maillard.

2.3. Conditions de culture

Toutes les cultures sontensemencées à 1% (v/v) de la préculture. Lors de cette étude, nous avons réalisé trois modes de culture différents en incubant les cultures :

- soit directement à différentes températures : 10, 15, 20, 25 ou 42°C,
- soit à 42°C, puis une fois les bactéries arrivées en phase exponentielle de croissance ($D.O._{650nm} = 0,4$), elles sont :
 - soit transférées directement à la température de 15 ou 20°C. Ce mode de culture s'appellera par la suite le **Transfert**,
 - soit centrifugées et remises en suspension dans un milieu neuf, pré-refroidi à la température de 15 ou 20°C ; ce mode de culture est alors appelé le **Choc**.

La croissance bactérienne est estimée par turbidimétrie en mesurant la densité optique à 650 nm ($D.O._{650nm}$) et par la mesure du pH du milieu de culture.

Le dénombrement sur boîtes des unités formant colonies n'a pu être pris en compte que pour les cultures à température optimale de croissance. En effet, lors des différents modes de culture à température basse, le dénombrement sur boîtes n'a pas donné de résultats interprétables.

Tableau 9. Composition et utilisation des milieux de culture.

Milieu	Composition	Utilisation	
Lait reconstitué à 10%	Poudre de lait (low heat)	100 g	Précultures à 42°C Conservation : souches à -65°C
	H ₂ O qsp	1 L	
M17 (Terzaghi et Sandine 1975)	Tryptone	2,5 g	Cultures
	Extrait de levure	2,5 g	
	Sulfate de magnésium	0,25 g	
	Acide ascorbique	0,5 g	
	Extrait de viande	3 g	
	Soyase	5 g	
	Lactose	10 g	
	Bactopeptone	2,5 g	
	βglycérophosphate de N	19 g	
H ₂ O qsp	1 L		
TPPY (Bracquart 1981)	Tryptose	7 g	Cultures
	Protéose Peptone n°3	7 g	
	Extrait de levure	2 g	
	Lactose	10 g	
H ₂ O qsp	1 L		
TPPY gélosé	TPPY + Agar à 15 g.L ⁻¹	Etalements	

Nous avons également suivi l'évolution des concentrations extracellulaires en lactose et en lactate pour certains essais.

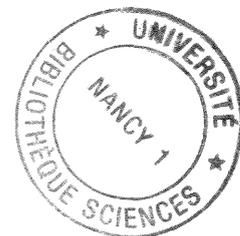
2.4. Recherche des activités enzymatiques par le système API-ZYM

Les bactéries en phase exponentielle ou en phase stationnaire de croissance sont centrifugées (5 min, 4000 x g) et lavées deux fois avec du sérum physiologique stérile. Après élimination du surnageant, les culots bactériens ont été placés dans un volume d'eau stérile de façon à les ramener à un nombre identique de cellules. Les activités enzymatiques ont été déterminées selon Humble *et al.* (1977) à l'aide des galeries API-ZYM, Biomérieux.

3. Préparation des extraits bactériens

3.1. Obtention des protéines solubles totales

Les cellules sont récupérées (culture 100 mL) par centrifugation (5 min, 4000 x g). Après deux lavages en tampon phosphate de sodium ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 50 mM pH 7,0), les cellules bactériennes (environ 0,1 g en poids humide) en suspension dans 1 mL du même tampon phosphate sont lysées par sonication pendant 3 min à une puissance de 100 W et avec un cycle actif de 50%. Afin d'éviter tout échauffement lors de la sonication, les cellules sont maintenues au froid (récipient placé dans la glace fondante). Ensuite, les débris cellulaires et les cellules non lysées sont éliminés par centrifugation pendant 10 min à 10 000 x g. La concentration protéique du surnageant renfermant les protéines solubles totales de *Sc. thermophilus* est quantifiée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) avec la sérum albumine bovine comme standard. Ce surnageant est ensuite congelé à -20°C .



3.2. Marquage des protéines

Les bactéries sontensemencées à 1% (p/v) dans 50 mL de milieu M17. Lorsque la valeur de la densité optique $D.O._{650\text{ nm}} = 1$ est atteinte, les cellules sont centrifugées et concentrées 10 fois : le culot cellulaire est resuspendu dans 5 mL du même milieu frais. Cette suspension bactérienne est alors divisée en 5 aliquots de 1 mL. Un tube est placé à 42°C et les 4 autres sont placés à 15°C. Cinq minutes après le changement de milieu, 50 μCi de [^{35}S -Met] (soit 5 μL avec une activité spécifique de 10 mCi/mL) sont ajoutés dans chacun des tubes. L'incorporation de la [^{35}S -Met] est effectuée durant 20 min à 42°C, et pendant 2 h, 4 h, 24 h ou 45 h à 15°C. Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation, lavées puis soniquées comme précédemment.

Pour les protéines solubles totales ainsi obtenues, la concentration protéique est déterminée par la méthode de Bradford (1976). Deux microlitres de chaque préparation protéique sont déposés sur des filtres papier Wattman 3MM. Les protéines sont précipitées avec du TCA 10% (v/v) pendant 30 min. La radioactivité TCA-précipitable est alors mesurée dans un compteur à scintillation liquide (Beckman).

3.3. Purification des protéines issues de choc froid

Afin de réaliser la purification de certaines protéines de choc froid, des cultures (1,5 L) de *Sc. thermophilus* ont été réalisées. Les cellules en phase exponentielle de croissance ($D.O._{650\text{ nm}} = 1$) sont récupérées par centrifugation (10 min à 4000 x g). Le culot cellulaire est remis en suspension dans 1,5 L de milieu stérile à 15°C pendant 20 heures. Les cellules sont de nouveau récupérées par centrifugation (15 min à 4 000 x g) et lavées trois fois dans du tampon phosphate 50 mM pH 7,0. Les cellules (1,5 g en poids humide) sont soniquées dans les mêmes conditions que précédemment mais durant 10 min et dans 15 mL de tampon Tris-HCl 50 mM pH7,0 contenant 0,1 mM

de DTT. Après centrifugation, les débris cellulaires et les cellules non lysées sont éliminées par centrifugation (10 min à 6000 x g).

3.3.1. Précipitations successives au sulfate d'ammonium

Les protéines solubles totales ainsi obtenues sont soumises à des précipitations successives au sulfate d'ammonium (50, 60, 70, 80 et 100% de saturation en sulfate d'ammonium) à 0°C (Tableau 10) (Dawson *et al.*, 1969). Pour réaliser cette précipitation au sulfate d'ammonium, la concentration protéique du surnageant ne doit pas excéder une valeur de 10 g.L⁻¹. Le volume de la solution protéique de départ étant de 15 mL, il faut ajouter 4,3 g de sulfate d'ammonium pour obtenir 50% de saturation en sulfate d'ammonium, (sachant qu'une solution de sulfate d'ammonium est saturée à 3,9 M à 0°C). Après 30 min d'agitation modérée, les protéines précipitant à 50% de sulfate d'ammonium sont récupérées par centrifugation (10 min à 10 000 x g) ; pour obtenir un surnageant avec une concentration de 60% de sulfate d'ammonium, 0,9 g de sulfate d'ammonium sont rajoutés à la solution protéique saturée à 50% de sulfate d'ammonium, et ainsi de suite.

A chaque étape, les protéines précipitées sont redissoutes dans de petits volumes d'eau distillée (1 à 3 mL) et sont dialysées pendant 72 h en changeant régulièrement l'eau pour éliminer la totalité du sulfate d'ammonium, la dernière dialyse est réalisée contre le tampon utilisé pour la chromatographie basse pression.

3.3.2. Chromatographie basse pression

Lors de ce travail, une résine échangeuse d'anions (DEAE cellulose) et une résine échangeuse de cations (phosphocellulose P11) ont été utilisées.

Afin d'optimiser les choix du tampon et du pH pour la chromatographie sur colonne en DEAE cellulose, des essais préliminaires en Batch ont été réalisés avec un

tampon acétate 50 mM pH 5,5, un tampon MES 50 mM pH 6,1 et un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5. La protéine de 21,5 kDa que nous recherchons à purifier se trouve être bien isolée par batch avec le tampon acétate 50 mM pH 5,5.

Pour la chromatographie avec la phosphocellulose les résultats obtenus en Batch avec le tampon acétate 50 mM, pH 5,5 furent conformes à nos attentes.

Dans les 2 cas de chromatographie sur colonne, l'éluant est apporté par le biais d'une pompe péristaltique. La chromatographie sur DEAE cellulose est réalisée en tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5 avec un gradient (de 200 mL) de 0,05 à 0,3 M de NaCl, la hauteur de gel est de 15 cm, le débit est de 16,5 mL.h⁻¹. Les fractions collectées toutes les 20 minutes sont de 5,5 mL. Avec la phosphocellulose P11 (hauteur de gel : 3 cm), la chromatographie est réalisée en tampon acétate 50 mM pH 5,5 avec un gradient de 0 à 1 M NaCl et un débit de 100 mL.h⁻¹, les fractions collectées toutes les 3 min sont de 5 mL.

Pour la cartographie de quelques protéines par électrophorèse bidimensionnelle, des fractions de purifications issues de protéines solubles totales de bactéries cultivées à 42°C en phase stationnaire de croissance ont été utilisées. Après fractionnement par précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie échangeuse d'anion (Gonzalez-Marquez, 1997), des fractions protéiques ont été testées en électrophorèse monodimensionnelle. Des électrophorèses bidimensionnelles ont été alors réalisées sur les fractions comportant des protéines très enrichies.

3.3.3. HPLC analytique en phase inverse

La purification des protéines de 21,5 kDa et de 14 kDa a été réalisée par HPLC en phase inverse (phase mobile acétonitrile, eau, TFA, propanol) sur colonne C4 (Gonzalez-Marquez, 1997).

En condition analytique, la quantité injectée est de 0,2 mg au maximum (100 μL d'une solution à 2 mg/mL de fraction). L'élution est réalisée pendant 60 min avec un débit de 1 mL.min⁻¹ par un gradient allant de 10% de B dans A à 70% de B dans A (A : eau ultrapure + 0,1% TFA + 2% Isopropanol ; B : acétonitrile + 0,1% TFA + 2% Isopropanol).

En condition semi-préparative, la quantité injectée est de 5 mg au maximum ; l'élution est réalisée pendant 60 min avec un débit de 1,4 mL.min⁻¹, le gradient allant de 30% de B dans A à 60% de B dans A.

L'analyse des hydrolysats enzymatiques de la protéine de 21,5 kDa a été réalisée par HPLC phase inverse sur une colonne C18 Narrowbore. L'élution est réalisée pendant 40 min avec un débit de 250 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Le gradient va de 2% de B dans A à 70% de B dans A. (A : eau ultrapure + 0,1% TFA; B: acétonitrile + 0,08% TFA).

Pour détecter les peptides, les longueurs d'onde 215 et 280 nm sont choisies. Pour l'analyse spectrale de certains échantillons le détecteurs à barrette de diodes 996 (Waters, Milford, USA) est utilisé.

4. Techniques électrophorétiques

4.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de S.D.S. (PAGE-SDS)

Les protocoles de préparation des échantillons pour les électrophorèses mono et bidimensionnelle sont présentés sur la figure 19.

Les protéines ainsi préparées sont chargées négativement par le SDS. Elles migrent et se séparent dans le gel de polyacrylamide (plus ou moins réticulé) en fonction de leur mobilité relative, donc en fonction de leur masse moléculaire.

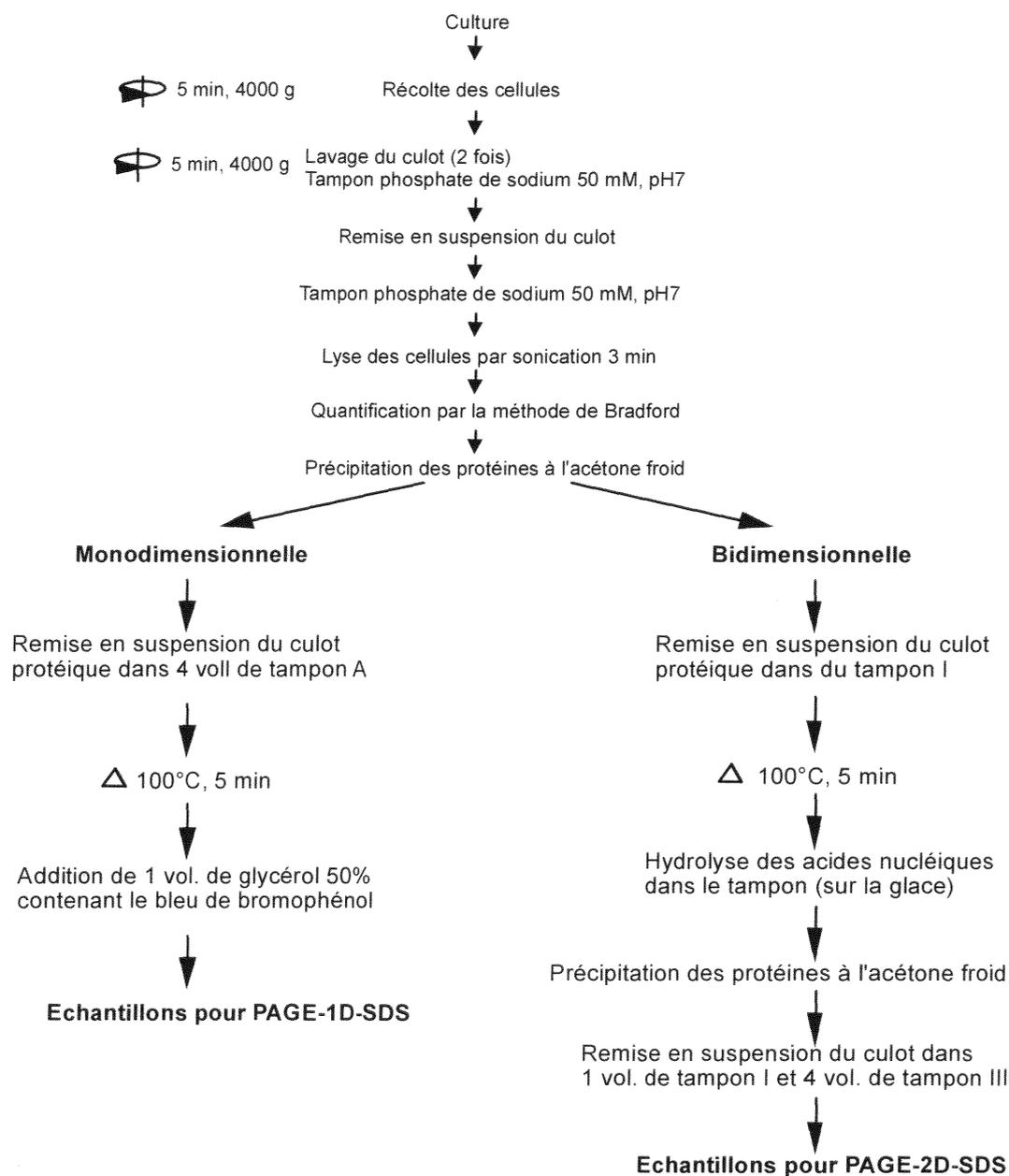


Figure 19. Obtention des protéines solubles totales pour analyse électrophorétique mono et bidimensionnelle.

Tampon A. Tris-HCl 250 mM pH 6,8 ; SDS 2% (p/v) ; β -mercaptoéthanol 5% (v/v).

Tampon I. Tris -HCl 50 mM pH 8,0 ; DTT, 200 mM ; SDS 0,3% (p/v).

Tampon II. Tris -HCl 500 mM pH 7,2 ; $MgCl_2$ 50 mM ; DnaseI 1 mg/mL ; RnaseA 0,25 mg/mL.

Tampon III. Urée 9,9 M ; Triton X-100 4%, (p/v) ; ampholytes 2,2% (v/v) ; DTT 100 mM.

La méthode de Laemmli (1970) en tampons discontinus est utilisée pour les 1D-PAGE et pour les gels de deuxième dimension de la 2D-PAGE. Le gel comporte deux parties :

- le gel de séparation réalisé à partir d'un mélange d'acrylamide et de N,N'-Méthylène-bis-acrylamide (T = 15%, C = 2,6%) dans un tampon Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8 contenant 0,1% (p/v) de sodium dodécylsulfate (SDS), qui est dégazé pendant 15 min avant d'ajouter les deux composés servant à initier la polymérisation :

- le TEMED ($3,3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$)
- et le persulfate d'ammonium ($2,2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$).

Les volumes finaux des solutions à mélanger pour réaliser deux minigels sont de 10 mL dans le cas de minigels de 0,75 mm d'épaisseur et de 15 mL pour deux gels de 1 mm d'épaisseur comme pour les 2D-PAGE.

- le gel de concentration réalisé à partir d'un mélange d'acrylamide et de N,N'-Méthylène-bis-acrylamide (T = 4%, C = 2,6%) dans un tampon Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 contenant 0,1% (p/v) de SDS, qui est dégazé pendant 15 min avant d'ajouter les deux composés servant à initier et à propager la polymérisation :

- le TEMED ($1,3 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$)
- et le persulfate d'ammonium ($2,2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$).

Le volume final à préparer pour deux minigels quelque soit l'épaisseur, est de 10 mL.

Le tampon d'électrodes est composé de Tris 25 mM ; glycine 192 mM ; SDS 0,1% (p/v), pH = 8,3. La migration est effectuée à 200 V pendant 50 min.

4.2. Electrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE)

4.2.1. Principe

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en deux dimensions (2D-PAGE) est basée sur la séparation des protéines d'un échantillon en fonction de leur charges (pI) et de leur masse moléculaire (Mr).

La qualité de la préparation des échantillons est très importante (Figure 19). Elle consiste en la dénaturation et la mise en solution des protéines, afin qu'elles puissent pénétrer dans le gel d'IEF (iso-électrofocalisation) tout en conservant leur intégrité.

La première dimension est une IEF en tube capillaire (0,5 x 50 mm). Elle consiste à faire migrer les polypeptides dans un gradient de pH continu 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 plusieurs centaines de molécules polyamino-polycarboxyliques. Ces molécules sont amphotères et possèdent des constantes de dissociation variées. L'IEF est une technique à l'équilibre : les protéines sont concentrées en bandes étroites et migrent jusqu'à une valeur de pH pour laquelle leur charge nette est nulle, c'est-à-dire jusqu'à leur point isoélectrique. Le gel d'IEF comporte également deux agents dénaturants : le Triton X100 (détergent non ionique) et l'urée (agent dissociant rompant les liaisons hydrogène). Les gels d'IEF ont été réalisés avec un mélange d'acrylamide et de pipérazine diacrylamide (PDA). Le PDA est préféré au Bis utilisé plus classiquement car ce "crosslinker" a pour propriétés de réduire les bruits de fond lors de la coloration à l'argent, d'augmenter la résolution du gel et de lui donner une plus grande résistance mécanique.

Le gel d'IEF doit être équilibré dans un tampon comportant un détergent anionique, le SDS, qui se complexe aux protéines afin d'éliminer l'urée, les ampholytes et le Triton X100. Toutefois cette étape d'équilibrage doit être de courte durée, pour éviter toute perte de protéines. La deuxième dimension est une PAGE-SDS classique avec gel de concentration. Le gel de concentration est souvent considéré comme inutile, le gel d'IEF est alors pris comme gel de concentration. Le gel d'IEF est placé à la surface du gel de deuxième dimension, sans couler de joints d'agarose entre les deux.

4.2.2. Préparation des différentes solutions pour la 2D-PAGE

4.2.2.1. Solution stock pour IEF

- Solution de polyacrylamide (T= 30%)

Acrylamide	28,38% (p/v)
Pipérazine diacrylamide	1,62% (p/v)

- Tampon 1 (conservé à – 65°C)

Urée	9,5 M
Triton X100	2% (p/v)
β -mercaptoéthanol	5% (v/v)
Ampholytes Bio-Rad 5-8	16% (v/v)
Ampholytes Bio-Rad 3-10	4% (v/v)

- Tampon 2 (conservé à – 65°C)

Urée	9 M
Bleu de bromophénol saturé	5% (v/v)
Ampholytes Bio-Rad 5-8	0,8% (v/v)

Ampholytes Bio-Rad 3-10	0,2% (v/v)
-------------------------	------------

4.2.2.2. Solution de remplissage des capillaires

Urée	9,1 M
Solution de polyacrylamide	13,2% (v/v)
Triton X100	2% (p/v)
Ampholytes Bio-Rad 5-8	2,5% (v/v)
Ampholytes Bio-Rad 3-10	2,5% (v/v)
TEMED	$1,3 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$
Persulfate d'ammonium	$8,8 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$
Volume final	5mL

4.2.2.3. Solution d'équilibrage

Tris-HCl, pH 6,8,	0,0625M
SDS	2% (p/v)
Glycérol	10% (v/v)
β -mercaptoéthanol	5% (v/v)

4.2.3. Déroulement de la 2D-PAGE

Toutes les étapes de l'électrophorèse bidimensionnelle réalisée avec le système Mini-PROTEAN II 2D de Biorad sont mentionnées à la figure 20.

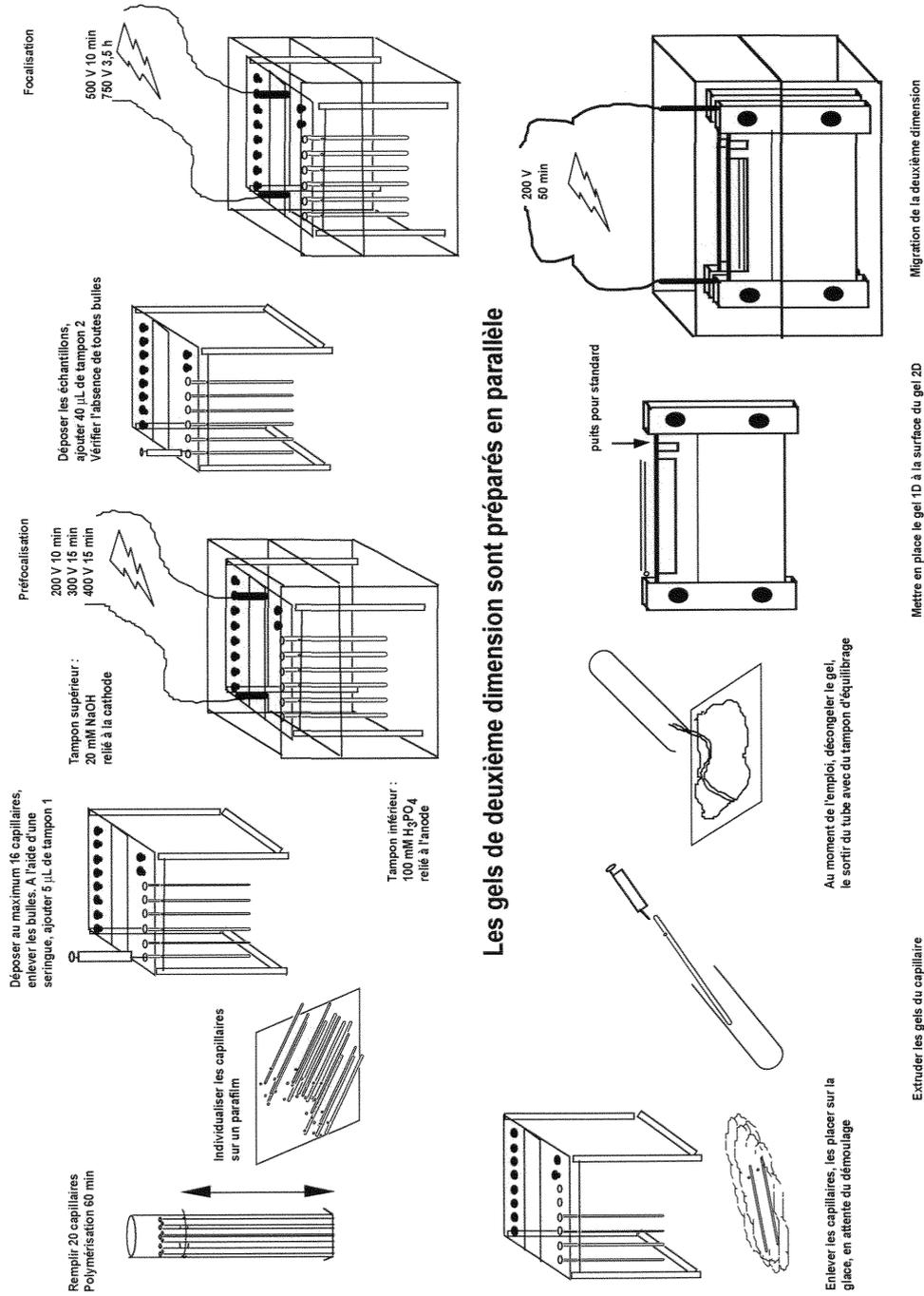


Figure 20. Principales étapes de l'électrophorèse bidimensionnelle.

4.3. Transfert des protéines sur membrane (Western blot)

Après migration électrophorétique, les protéines se trouvent incluses dans le gel de polyacrylamide. Afin d'extraire ces protéines du gel, diverses techniques ont été développées telles l'électroélution ou l'électrotransfert sur membrane (Blot). Lors de nos travaux, cette dernière technique a été utilisée :

- pour réaliser les séquençages des extrémités N-terminales de certaines protéines à partir de blots issus de 1D ou de 2D-PAGE
- pour étudier l'affinité d'un anticorps pour une protéine (immunodétection).

Dans les deux cas, le transfert des protéines est réalisé dans les mêmes conditions. Il se fait à partir d'un gel d'électrophorèse petit format à l'aide du "Mini-Transblot cell" de Bio-Rad. Le gel est placé 5 min dans un tampon modifié de Towbin (Towbin *et al.*, 1979). Le tampon de Towbin (Tris 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20% (v/v)) est dilué de moitié et additionné de 0,1% de SDS (p/v). La membrane de PVDF est trempée quelques secondes dans du méthanol absolu, rincée à l'eau fraîchement distillée puis équilibrée 3 min dans du tampon de Towbin modifié. Le montage dit " en Sandwich " est réalisé comme présenté dans la figure 21, en prenant soin de ne laisser aucune bulle d'air entre la membrane et le gel. Le transfert est réalisé pendant 3 heures à 50 Volts et 80 mA. Après transfert, la membrane de PVDF est utilisée soit pour un séquençage, soit pour une immunodétection. Dans les deux cas, la membrane est rincée 3 fois pendant 5 min à l'eau.

4.4. Standards de masses moléculaires

En fonction des méthodes électrophorétiques employées, différents standards de masses moléculaires ont été utilisés.

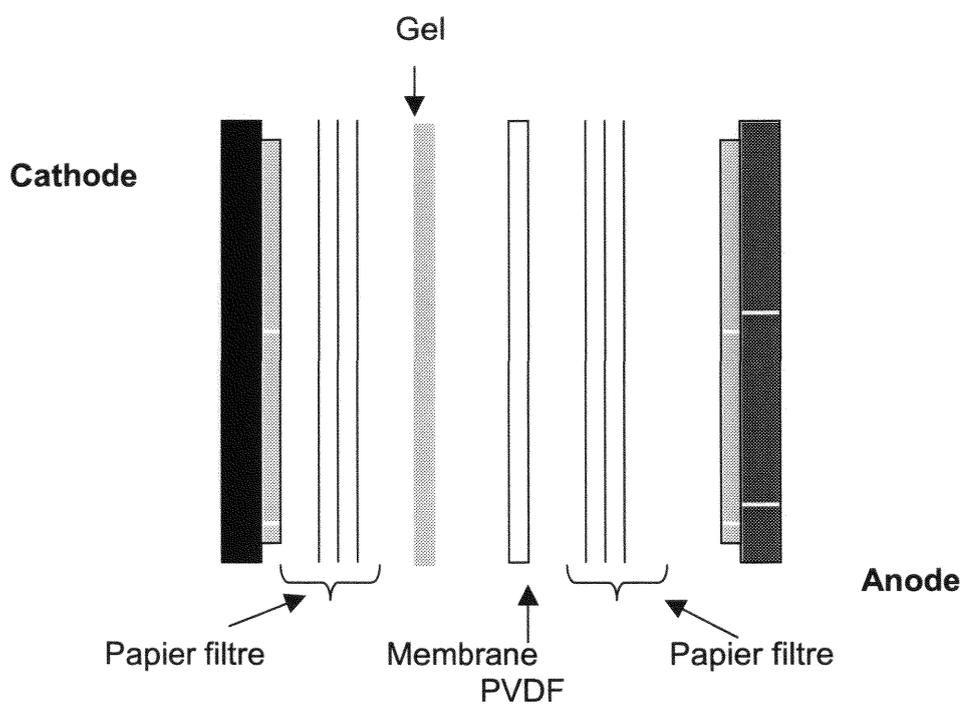


Figure 21. Electrotransfert des protéines incluses dans un gel sur une membrane PVDF.

Pour les gels classiques monodimensionnels, le mélange protéique commercial de Bio-Rad a été choisi (SDS-PAGE Standards, broad range). Il comprend : la myosine du muscle du lapin (200 000 Da), la β -galactosidase d'*E. coli* (116 250 Da), la phosphorylase B du muscle du lapin (97 400 Da), la sérum albumine bovine (66 200 Da), l'ovalbumine du blanc d'œuf de poule (45 000 Da), l'anhydrase carbonique bovine (31 000 Da), l'inhibiteur trypsique du soja (21 500 Da), le lysozyme du blanc d'œuf de poule (14 400 Da) et l'aprotinine du pancréas bovin (6 500 Da).

Pour les gels radioactifs qui ne sont pas colorés et pour les transferts sur membrane, le mélange protéique "Kaleidoscope Prestained Standards" de Bio-Rad a été choisi afin de visualiser directement les protéines étalons. Lors du transfert, ces standards précolorés sont utiles pour vérifier rapidement la qualité du transfert. En effet, ces 7 protéines standards ont chacune une couleur différente [myosine du muscle du lapin (205 000 Da) : rose ; β -galactosidase d'*E. coli* (140 000 Da) : magenta ; sérum albumine bovine (83 000 Da) : vert ; anhydrase carbonique bovine (45 000 Da) : violet ; inhibiteur trypsique du soja (32 600 Da) : orange ; lysozyme du blanc d'œuf de poule (18 000 Da) : rouge ; aprotinine du pancréas bovin (7 500 Da) : bleu]. Les colorants étant fixés de manière covalente aux protéines, la masse moléculaire des protéines est augmentée. De plus, les masses moléculaires apparentes de ces protéines varient selon les lots de préparation utilisés, il est donc important d'être vigilant lors de leur utilisation.

Pour estimer la masse moléculaire et le point isoélectrique des protéines séparées par électrophorèse bidimensionnelle, les standards 2-D SDS-PAGE de Biorad ont été utilisés. Ce mélange protéique est composé de conalbumine de blanc d'œuf de poule (pI 6,0 ; 6,3 ; 6,6 – 76 000 Da), de sérum albumine bovine (pI 5,4 ; 5,5 ; 5,6 – 66 200 Da), d'actine de muscle bovin (pI 5,0 ; 5,1 – 43 000 Da), de la glycéraldéhyde

phosphate déshydrogénase de muscle de lapin (pI 8,3 ; 8,5 – 36 000 Da), d'anhydrase carbonique bovine (pI 5,9 ; 6,0 – 31 000 Da), d'inhibiteur trypsique de soja (pI 4,5 – 21 500 Da) et de myoglobine équine (pI 7,0 – 17 500 Da). Dans nos conditions de gradient de pH lors de l'IEF, le marqueur GAPDH n'est pas visualisé.

4.5. Révélation des protéines dans un gel

Les protéines des gels ont été révélées au bleu de Coomassie R250, à l'argent ou au zinc ; sur les membranes, les protéines sont visualisées avec le bleu de Coomassie G250.

4.5.1. Coloration au bleu de Coomassie R250

Pour la coloration au bleu de Coomassie, les protéines du gel sont fixées dès la fin de la migration dans une solution d'acide trichloroacétique (TCA) à 12% (p/v) pendant 1 h, puis colorées 2 h au bleu de Coomassie R250 à 0,1% (p/v) dissout dans un mélange d'éthanol 50% (v/v) et de TCA 2% (p/v). La décoloration a lieu dans une solution d'éthanol 30% (v/v) et d'acide acétique 7,5% (v/v).

4.5.2. Révélation au nitrate d'argent

La révélation à l'argent d'après le protocole modifié de Morrissey (1981) (Patton *et al.*, 1990) se réalise en différentes étapes :

- à la fin de la migration, les protéines sont fixées dans un mélange méthanol/eau/acide acétique (50 : 40 : 10, v/v/v) pendant une nuit
- les gels sont lavés trois fois 20 min à l'eau pour enlever toutes traces d'acide acétique
- les gels sont ensuite placés successivement :
 - 30 min dans une solution aqueuse de DTT ($5 \cdot 10^{-4}\%$, p/v)
 - 30 min dans une solution de nitrate d'argent (0,2%, p/v)

- 5 min dans l'eau
- 10 min dans une solution aqueuse de carbonate de sodium (3,5%, p/v), formaldéhyde (0,05%, v/v) pour la révélation
- puis dans une solution d'acide acétique (3%, (v/v) pour arrêter la révélation.
- avant séchage, les gels sont rincés à l'eau.

La révélation à l'argent a été utilisée essentiellement pour les gels bidimensionnels. Dans certains cas, cette méthode a été employée pour révéler des bandes protéiques de faible intensité en gels monodimensionnels au cours d'étapes de purification.

4.5.3. Révélation au sulfate de zinc

La révélation au zinc est une coloration inverse : le gel prend une coloration d'un blanc laiteux et seules les protéines ne sont pas colorées. Cette coloration est réversible, la décoloration utilisée permet ensuite de réaliser différentes analyses telles que l'élution de la protéine du gel, le transfert sur membrane, la composition en acides aminés...

Nous avons utilisé le kit Bio-Rad (Zinc stain and destain kit), constitué de trois solutions à diluer 10 fois, 2 solutions pour la coloration et une pour la décoloration.

Cette révélation au zinc est rapide et ne demande que deux étapes :

- bain de 10 min dans une solution d'imidazole
- bain d'1 min dans la solution de sulfate de zinc

Afin de visualiser les bandes protéiques, il suffit de placer le gel sur un support noir. Les bandes protéiques deviennent sombres alors que le fond du gel reste opaque.

Puis, la décoloration est réalisée avec des lavages successifs de 5 min jusqu'à complète disparition du précipité blanc dans le tampon de décoloration (Tris/Glycine).

La différence entre les modes de coloration des protéines se situe surtout au niveau de la sensibilité. La révélation à l'argent est plus sensible que la coloration inverse au zinc qui est plus sensible que la coloration au bleu de Coomassie R250.

4.6. Révélation des protéines sur membrane

4.6.1. Coloration au bleu de Coomassie

Après le transfert, la membrane est lavée à l'eau et placée dans une solution de méthanol (40%, v/v) et de bleu de Coomassie G250 (0,025%, p/v). Elle est ensuite décolorée dans une solution de méthanol (50%, v/v). Pour le séquençage de l'extrémité N-terminale des protéines, les bandes ou spots protéiques intéressants sont rapidement découpés, placés dans des microtubes (de types Eppendorf®) et congelés à -65°C .

4.6.2. Immunodétection

Après le transfert,

- saturation de la membrane pendant 1 nuit à 4°C ou 4 heures à température ambiante avec de la sérum albumine bovine à 1% (p/v) dans du tampon TBS (Tris buffer saline)-Tween 20 (Tris-HCl 50 mM pH 7,4 ; NaCl 150 mM ; Tween 20 1 goutte pour 100 ml) sous agitation modérée
- lavage dans du tampon TBS-Tween 20
- l'anticorps polyclonal (produits à partir de lapin) dirigé contre la protéine CapB de *P. fragi* (Hébraud *et al.*, 1992) est dilué dans du tampon TBS-Tween 20 au 1/200 (v/v) est ajouté pendant une heure à température ambiante, sous agitation modérée
- lavage trois fois 5 min dans du tampon TBS-Tween 20

- le deuxième anticorps (couplé à la peroxydase) est ajouté dilué dans du tampon TBS-Tween 20 au 1/12 000 (v/v), pendant 1 heure à température ambiante
- lavage 2 fois 5 min dans du tampon TBS-Tween 20
- lavage 1 fois 5 min dans du tampon TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,4 ; NaCl 150 mM)
- la révélation est réalisée avec le kit de Sigma (DAB) liquid substrat system
- la réaction est stoppée après quelques minutes avec du tampon TBS.

4.7. Autoradiographie

Les protéines qui ont été marquées avec de la L³⁵S-méthionine sont mises en évidence par autoradiographie. 10 000 cpm sont déposés dans chaque puits pour les PAGE-SDS-1D, et 30 000 cpm pour les PAGE-SDS-2D.

Après la migration des protéines radioactives, le gel est placé 20 min dans une solution de TCA 12%, et est ensuite séché. Aucune coloration n'est réalisée afin de ne pas engendrer d'interférences ou " Quenching ".

Le gel sec est placé en contact avec un film Hyperfilm β max de Kodak, à l'obscurité dans une cassette à température ambiante. Après deux semaines, le film est développé :

- 5 min dans une solution révélatrice (LX 24)
- rincé à l'eau courante
- 5 à 10 min dans une solution fixatrice (AL 4)

4.8. Electrophorèse capillaire

Les dosages des glucides et des acides organiques sont effectués par électrophorèse capillaire.

4.8.1. Principe de l'électrophorèse capillaire

La séparation est basée sur la propriété qu'ont les espèces ioniques à se déplacer sous l'influence d'un champ électrique. Les 2 extrémités du capillaire sont placées dans un électrolyte.

Les paramètres influant sur la séparation des ions sont la nature, le pH et la concentration des électrolytes, la longueur et le diamètre interne du capillaire, ainsi que le voltage appliqué (Jandik *et al.*, 1992).

L'acquisition et l'exploitation des résultats sont réalisées à l'aide du logiciel Maxima 820 (Waters, Milford, MA, Etats- Unis).

4.8.1.1. Dosage des glucides

Le capillaire utilisé est en silice fondue, d'un diamètre interne de 50 μm et de 90 cm de longueur. La méthode choisie est adaptée de Vorndran *et al.* (1992) qui ont dosé différents types de glucides dans le jus d'orange. L'électrolyte est composé d'acide sorbique 7 mM dont le pH est ajusté à 12,0 à l'aide de NaOH 0,5 M. L'injection est réalisée en mode hydrostatique durant 20 secondes. Une tension de 10 kV est appliquée, et la détection se fait en " UV inverse " à 254 nm (Figure 22). Le détecteur est installé à une extrémité du capillaire. L'électrolyte utilisé absorbant fortement dans l'UV, le passage d'un ion devant la cellule du détecteur va alors entraîner une diminution de l'absorption. Le temps du cycle est de 40 min. (Guingamp *et al.*, 1999).

4.8.1.2. Dosage des acides organiques

Pour le dosage des acides organiques, le capillaire utilisé est en silice fondue d'un diamètre interne de 75 μm et de 100 cm de longueur (Saulnier *et al.*, 1996). L'électrolyte de pH = 8 est composé de chromate de sodium tétrahydraté ($\text{Na}_2\text{CrO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 4,6 mM, OFM anion-BT 0,5 mM.

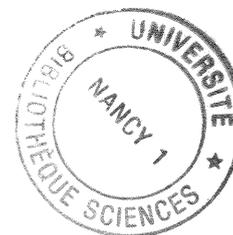
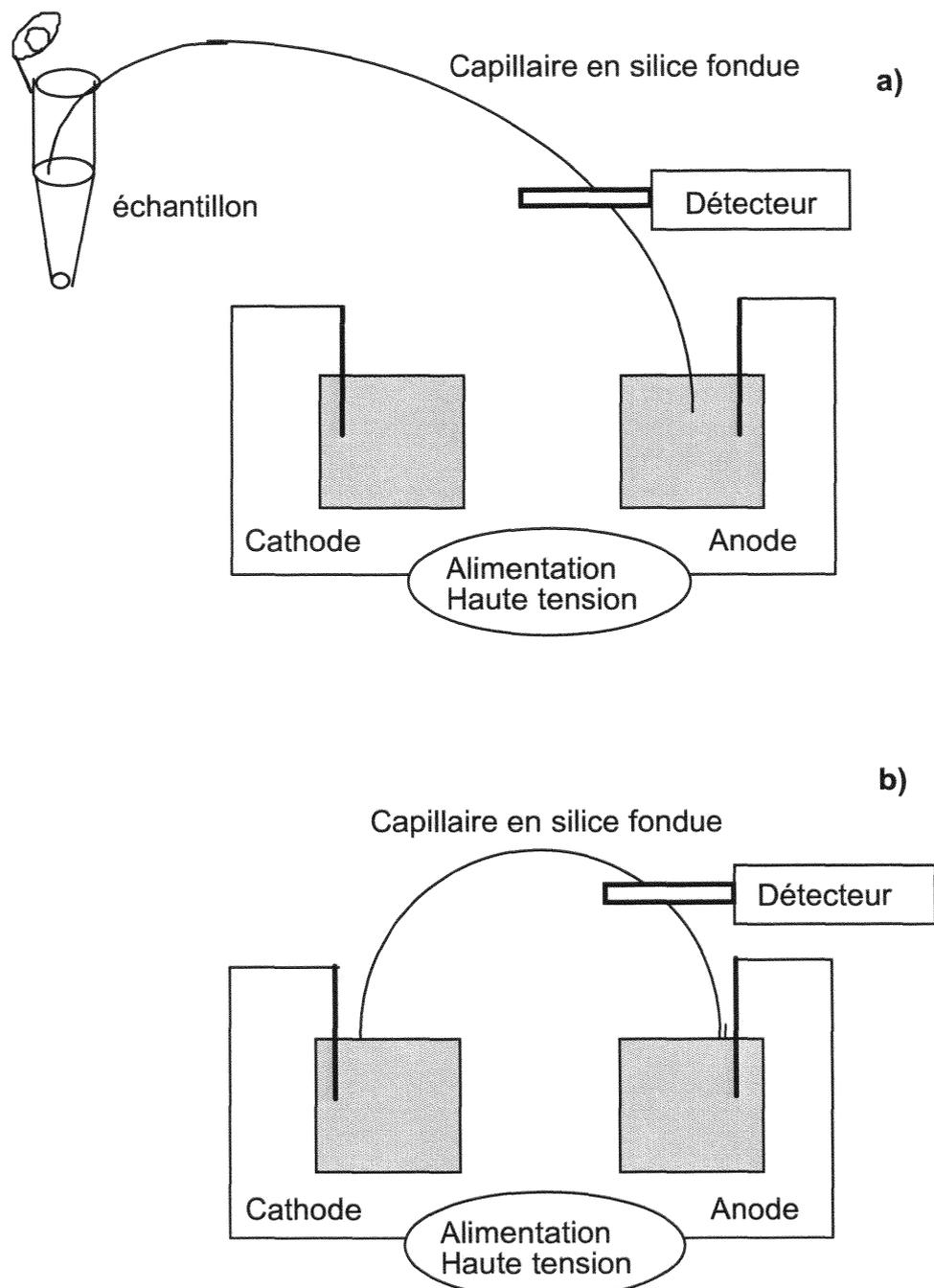


Figure 22. Schéma de l'électrophorèse capillaire

a) en mode injection hydrostatique

b) lors de la séparation

(Aldrich, Milwaukee, WI, USA). L'injection est réalisée durant 30 secondes, et la détection se fait à 254 nm. Le temps du cycle est de 10 min.

5. Séquençage de l'extrémité N-terminale par dégradation d'Edman

La méthode publiée par Edman dans les années 60 (Edman et Begg, 1967) utilise du Phénylthiocyanate (PITC). Il s'agit d'une procédure cyclique. Les acides aminés sont clivés les uns après les autres à partir de l'extrémité N-terminale et sont identifiés comme des phénylthiohydantoïne-acides aminés (PTH-AA). C'est la dégradation d'Edman modifiée par Tarr (1982) qui a été utilisée.

A chaque cycle, il existe trois étapes :

5.1. Le couplage

Le PITC réagit avec l'extrémité N-terminale du peptide pour former un phénylthiocarbamyl peptide (PTC-peptide). Cependant, si la fonction amine du résidu acide aminé en N-terminal n'est pas accessible, la première étape ne peut avoir lieu, ce qui empêche tout séquençage de la protéine. De plus, il existe des sous-produits dus aux réactions parallèles.

5.2. Le clivage

Le PTC-peptide, sous l'action d'un acide organique fort et anhydre (acide trifluoroacétique : TFA), se cyclise pour former une thioazolinone acide aminé (ATZ AA) qui se sépare de la chaîne polypeptidique.

5.3. La conversion

L'ATZ n'étant pas un dérivé stable, il doit être converti en une forme plus stable permettant son identification. En milieu acide, l'ATZ-AA se transforme en PTC-acide aminé par ouverture du cycle puis en phénylthioazolinone acide aminé (PTH-AA).

A la fin de chaque cycle, les PTH-AA sont identifiés par HPLC en phase inverse. L'identification s'effectue à l'aide d'un standard contenant tous les PTH et les sous-produits de la réaction d'Edman. Ils sont détectés à l'aide d'un détecteur U.V. à 269 nm (maximum d'absorption des PTH-AA.). L'identification du PTH-AA inconnu est réalisée par comparaison entre le PTH analysé et le standard.

Lors de notre étude, le microséquençage des protéines a été réalisé au Service Commun de Séquence des Protéines de l'Université Henri Poincaré Nancy I.

6. Composition en résidus acides aminés *in situ* dans le gel

L'échantillon (protéine insérée dans un morceau de gel de polyacrylamide) est hydrolysé sous vide à 150°C pendant une heure en présence d'HCl 6N et de phénol 1% (v/v) dans une station Pico-Tag.

L'hydrolysate est ensuite analysé à l'aide dans un analyseur automatique selon les méthodes utilisées au Service Commun de Séquence des Protéines de l'Université Nancy I.

7. Digestion trypsique

La digestion trypsique a été réalisée *in situ* dans le morceau de gel.

Avant tout, une PAGE-SDS monodimensionnelle est réalisée avec l'échantillon à hydrolyser afin d'estimer la quantité protéique de la bande révélée au bleu de Coomassie. Ensuite, le gel est numérisé et une analyse densitométrique permet d'estimer la quantité de protéine renfermée dans la bande. Pour cette analyse

densitométrique, les marqueurs de masse moléculaire sont utilisés comme référence connaissant la quantité déposée pour chaque bande. Compte-tenu de cette estimation, une électrophorèse est réalisée de manière à obtenir 2 µg de protéine à hydrolyser. Lorsque la migration est terminée, le gel est placé dans une solution colorante (Bleu de Coomassie G250, 0,2% (p/v) ; méthanol, 20% (v/v) ; acide acétique, 0,5% (v/v)) pendant 20 min. Il est ensuite décoloré dans une solution de méthanol à 30% (v/v), jusqu'à la visualisation de la bande protéique à extraire. La coloration au zinc de Bio-Rad a été également utilisée pour sa rapidité, sa facilité de réalisation et sa réversibilité.

La protéolyse *in situ* dans le gel a été réalisée selon le protocole de Rosenfeld *et al.* (1992). La bande protéique de 21,5 kDa découpée est lavée deux fois avec 150 µl d'une solution d'acétonitrile 50% (v/v) et de tampon bicarbonate d'ammonium 200 mM pH 8,9 pendant 20 min à 30°C. Ensuite, le morceau de gel est réduit en petits cubes de 1 mm³ qui sont déshydratés au Speedvac pendant 10 min. Le gel est réhydraté avec 5 µl de tampon bicarbonate d'ammonium 200 mM pH 8,9 contenant 0,02% (p/v) de Tween 20, 2 µl de solution trypsique (250 µg/ml). Des ajouts successifs de 5 µl de tampon carbonate sont réalisés afin de bien recouvrir le morceau de gel. La digestion est réalisée pendant 4 ou 16 heures à 30°C, puis est arrêtée par ajout de 1,5 µl de TFA. Pour récupérer les peptides issus de l'hydrolyse, trois extractions de 20 min sont effectuées à 30°C avec 100 µl d'une solution d'acétonitrile 60% (v/v), TFA 0,1% (v/v), Tween 20 0,02% (p/v).

Les hydrolysats peptidiques sont concentrés dans les deux cas au Speedvac et analysés par HPLC.

8. Analyseur d'image

L'exploitation des images de la 2D-PAGE a été réalisée avec le logiciel Biolmage 2D-Analyser (Millipore) sur une console SPARC.

8.1. Acquisition des images

La première condition à remplir pour l'analyse d'un protéome est l'obtention d'une série de gels de 2D-PAGE de bonne qualité, avec une grande reproductibilité.

Le gel bidimensionnel est numérisé, l'image ainsi obtenue est formée de différents points appelés "pixels". Plus les pixels seront choisis petits et plus la résolution de l'image sera élevée. Chaque pixel est transformé en une valeur numérique. L'acquisition est une étape très importante, car la fiabilité des résultats finaux repose sur la qualité de la digitalisation.

8.2. Exploitation des images

Après l'acquisition des images, le logiciel définit chaque spot. Il faut alors vérifier manuellement spot par spot si le logiciel a bien pris en compte l'ensemble de ceux-ci. Le logiciel permet ensuite d'enlever les spots "artéfacts". Une fois les spots bien définis sur les images de gels, leur comparaison peut être réalisée par une méthode de triangulation. Nous choisissons tout autour du profil bidimensionnel de nombreux spots de pI et masse moléculaire très différents, mais communs aux images à comparer. Ces spots communs sont appelés "ancres". Ensuite, en fonction des "ancres", le logiciel va appairer les spots de pI et Mr identiques à toutes les images. Nous obtenons ainsi les spots appariés appelés "matches". Sur les images sont donc définis les spots appariés (d'une couleur), et les spots non appariés (d'une autre couleur). Un même numéro de match correspond aux spots identiques.

Il est aussi souhaitable d'intégrer aux protéines à séparer, des protéines dont le point isoélectrique et la masse moléculaire sont connus. Les valeurs de point isoélectrique (pI) et de masse moléculaire relative (Mr) des protéines marqueurs sont entrées dans le logiciel qui va extrapoler ces données à tous les autres spots, ce qui va nous donner les coordonnées relatives de chaque spot pI , Mr , et intensité intégrée. Toutes ces données sont alors exportées vers un logiciel d'exploitation (Excel 4). L'exploitation permet de mettre en évidence les protéines appariées de même intensité, d'intensités différentes, les nouvelles protéines, les protéines disparues, et ce en prenant l'un des gels comme gel de référence.

9. Banques de données

Lors du séquençage N-terminal de chaque protéine, nous interrogeons les banques de données, via le réseau Internet, au fur et à mesure de l'identification des acides aminés, afin de pouvoir connaître le plus rapidement possible l'identité de la protéine. La technique de séquençage étant onéreuse, l'outil informatique nous permet alors de limiter les coûts. Ainsi le nombre de résidus trouvés pour certaines protéines n'est dû qu'à un choix économique et non à des problèmes de quantité de protéines à séquencer.

Pour interroger les banques de données, plusieurs adresses ont été utilisées notamment venant du site <http://www.expasy.ch> telle que <http://www.expasy.ch/tools/tagident.html> .

Avec l'outil TagIdent, trois paramètres sont pris en compte pour identifier la protéine étudiée :

- séquence des 6 premiers résidus acides aminés (appelée Tag sequence),
- paramètres pI et Mr apparents obtenus par l'électrophorèse bidimensionnelle.

Ces trois paramètres sont confrontés aux banques de données SWISS-PROT/TrEMBL. Quand l'outil TagIdent n'est pas satisfaisant, une recherche d'homologie de séquence est réalisée avec le logiciel Blast à l'adresse <http://blast.wustl.edu>. (Altschul *et al.*, 1997). Pour les protéines dont la séquence est entièrement issue du gène, les paramètres pI et M_r théorique sont calculés à l'aide du logiciel ProtParam à l'adresse <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>.

IV. Résultats et Discussions

Chapitre 1. Réponse physiologique à des conditions de culture à températures basses chez *Streptococcus thermophilus* PB18 et Y105.

1.1. Etude de la croissance de PB18 et Y105 à la température optimale.

1.1.1. Caractéristiques de la souche Y105

Pour cette étude, deux souches ont été essentiellement utilisées, les souches *Sc. thermophilus* PB18 et Y105. La souche Y105 a été isolée à partir d'un ferment mixte lyophilisé de yaourt comportant également *Lb. bulgaricus delbrueckii*. Le ferment mixte a été mis en culture à 42°C dans du lait reconstitué. Après isolements sur le milieu gélosé TPPY, un clone a été arbitrairement choisi. Ce clone a été remis en culture, puis divers tests ont été réalisés afin de caractériser la souche Y105 comme faisant partie de l'espèce *Sc. thermophilus* qui :

- est sensible au NaCl : la souche Y105 est inapte à croître en présence de 4% de NaCl,
- résiste à un chauffage à 60°C pendant 30 min,
- a un profil enzymatique (réalisé avec les galeries API ZYM) comparable aux autres profils obtenus avec d'autres souches *Sc. thermophilus* testées. L' α -glucosidase est détectée seulement avec la souche Y105,
- lors de la coloration GRAM, se révèle être sous forme de coques reliées en chaînette, de plus aucun *lactobacille* (en forme de bâtonnet) n'a été détecté,
- a des profils protéiques mono et bidimensionnel caractéristiques de l'espèce *Sc. thermophilus*.

Tous les tests réalisés ont confirmé que le clone sélectionné a les caractéristiques de l'espèce *Sc. thermophilus*. Des différences sont à noter néanmoins entre les souches Y105 et PB18. La souche Y105 donne après centrifugation, un culot cellulaire avec un aspect filant, et le profil enzymatique obtenu avec la galerie APIZYM montre la présence de l' α -glucosidase.

1.1.2. Caractéristiques de la souche PB18

La souche PB18 a été choisie pour cette étude car elle a été l'objet de nombreux travaux au laboratoire. Cette souche renferme un plasmide (nommé alors plasmide cryptique), qui a été partiellement séquencé (Rouper, 1991). D'après Guimont *et al.*, (1993 et 1994), la souche PB18 exprime une protéine spécifique de masse moléculaire apparente de 18 000 et de *pI* apparent 5,5 lors de la croissance en phase stationnaire et en milieu non tamponné TPPY. Cette protéine a été ensuite caractérisée et séquencée entièrement. C'est une protéine de 16,4 kDa et de *pI* de 5,1 de la famille des smHsps qui serait exprimée en condition de choc acide (Gonzalez-Marquez *et al.*, 1997). D'après Gonzalez-Marquez (1997), le séquençage complet du plasmide permettrait de confirmer l'hypothèse que le gène de cette protéine est effectivement porté par le plasmide. D'autres auteurs ont mis en évidence chez d'autres souches que ce même gène était porté par un plasmide du même type.

Le profil protéique global de différentes souches de *Sc. thermophilus* obtenu par PAGE-SDS monodimensionnel est toujours très reproductible et révèle une soixantaine de bandes, et ce, quelque soit le moment du prélèvement des protéines au cours de la croissance à 42°C. La figure 23 montre les différences de profils protéiques monodimensionnels des deux souches PB18 et Y105. Les protéines sont issues de bactéries cultivées en phase exponentielle ($D.O_{650\text{ nm}} = 1$) ou stationnaire

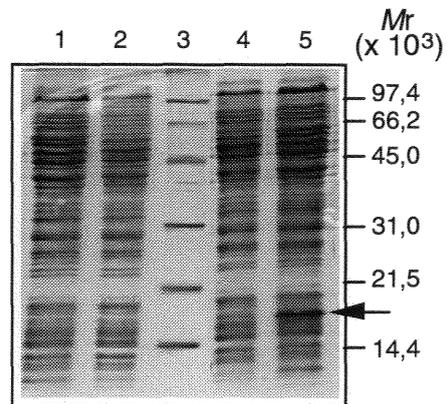


Figure 23. Electrophorèse monodimensionnelle des protéines solubles totales de *Sc. thermophilus* Y105 et PB18 cultivées à 42°C (taille réelle ; gel de 15% de polyacrylamide ; dépôt de 20 µg ; coloration au bleu de Coomassie R250)

1. Y105 phase exponentielle
2. Y105 phase stationnaire
3. Marqueurs de masse moléculaire
 - Phosphorylase B de muscle de lapin (97 400)
 - Sérum albumine bovine (66 200)
 - Ovalbumine du blanc d'œuf (45 000)
 - Anhydrase carbonique bovine (31 000)
 - Inhibiteur trypsique du soja (21 500)
 - Lysozyme du blanc d'œuf (14 400)
4. PB18 phase exponentielle
5. PB18 phase stationnaire
 - ← protéine de 16 kDa

de croissance. Les profils protéiques obtenus avec Y105 pour les deux stades de croissance et avec PB18 cultivée en phase exponentielle de croissance sont similaires. La souche PB18 en phase stationnaire de croissance présente très nettement la bande protéique de 16 kDa avec une forte intensité.

1.1.3. Caractéristiques de croissance de PB18 et Y105

La croissance de *Sc. thermophilus* est suivie essentiellement par deux paramètres : le pH et la densité optique. Des études préliminaires ont montré que la mesure de la turbidimétrie par lecture de la densité optique à 650 nm pour une souche et un milieu donné est proportionnelle au dénombrement obtenu après étalement sur milieu gélosé (U.F.C. mL⁻¹).

Les paramètres physiologiques des 2 souches PB18 et Y105 à la température de 42°C sont déterminés dans deux milieux semi-synthétiques différents : le milieu M17 et le milieu TPPY (Figure 24). Pour un même milieu, les deux souches ont des comportements physiologiques comparables mais le temps de latence est toujours plus long pour PB18 que Y105. Pour une même souche, la phase de latence est plus courte dans le milieu TPPY que dans le milieu M17 (Tableau 11). La biomasse obtenue en milieu M17 est de 2 à 2,2 fois supérieure à celle obtenue en milieu TPPY. En milieu TPPY, le pH du milieu de culture atteint rapidement (en 2,5 h) une valeur de 5,0 pour la souche Y105 et de 4,8 pour la souche PB18, les cellules entrent alors en phase stationnaire. En milieu TPPY, les vitesses d'acidification sont identiques pour les deux souches (1,8 x unité de pH par heure), et sont plus grandes que celles obtenues en milieu M17. Par contre en milieu M17, la souche PB18 acidifie plus vite que la souche Y105 et atteint un pH plus bas. La différence entre les deux milieux est liée au pouvoir tampon du β -glycérophosphate que renferme

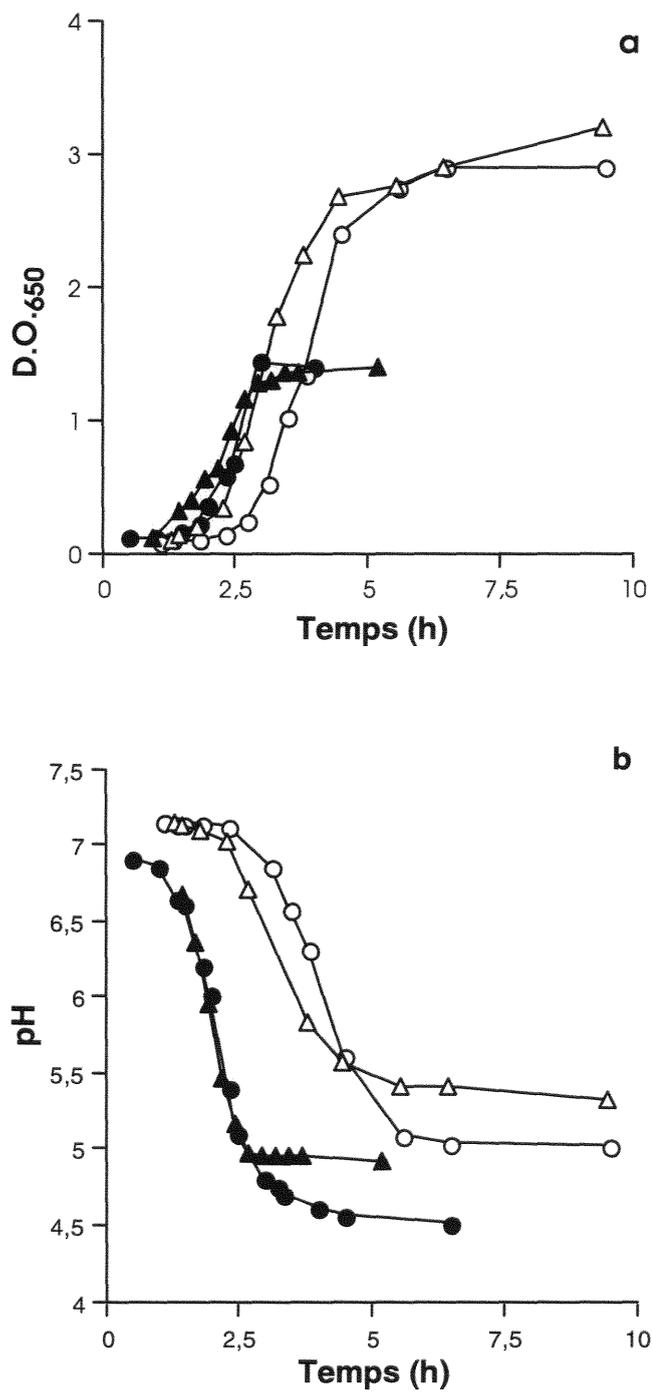


Figure 24. Courbes de croissance (a) et d'acidification (b) de *Sc. thermophilus* PB18 et Y105 à température optimale de croissance à 42°C dans le milieu :

- TPPY (PB18 ●, Y105 ▲)
- M17 (PB18 ○, Y105 ◐).

Tableau 11. Comparaison des paramètres physiologiques des souches *Sc. thermophilus* PB18 et Y105 cultivées à 42°C en milieu TPPY et M17.

Paramètres	PB18		Y105	
	TPPY	M17	TPPY	M17
Temps de latence (min)	75	115	50	85
D.O. _{650 nm} finale	1,4	2,9	1,4	3,2
pH final	4,5	5,1	4,9	5,3
Temps de génération (min) ¹	25	30	26	31
Vitesse d'acidification ² ($\Delta\text{pH} \times 10^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$)	1,8	1,0	1,8	0,8

¹: Calculés à partir de courbes de croissance semi-logarithmiques

²: Mesurées au milieu de la phase exponentielle de croissance.

massivement le milieu M17, absorbant les premières variations de pH dues à l'excrétion du lactate.

Pour la souche PB18, un autre facteur intervient au moment de la phase stationnaire en milieu TPPY, les cellules s'agrègent. Ces expériences ont été menées en parallèle avec trois autres souches de *Sc. thermophilus* (Y105, 4F44, CNRZ302), pour lesquelles aucune floculation n'a été détectée. Cette agrégation n'est pas atteinte en milieu M17, où le pH atteint en fin de croissance une valeur de 5,1 qui est supérieure à celle obtenue en milieu TPPY (pH = 4,5). Le pH de 5,1 semble insuffisant pour obtenir la floculation cellulaire.

En parallèle, le dosage du lactose au cours du temps a été réalisé par électrophorèse capillaire. L'incorporation du lactose par les bactéries s'accompagne du rejet du galactose. En milieu M17, après 5 heures de culture le lactose est épuisé, il ne reste que du galactose dans le milieu (Figure 25). Dans des conditions de concentration à 10 g.L^{-1} de lactose en milieu M17, le facteur limitant pour obtenir un pH inférieur à 5,1 est le lactose. D'après les résultats obtenus à 42°C , pour la suite des travaux, nous avons choisi le milieu tamponné M17 supplémenté de 10 g.L^{-1} de lactose, afin de ne pas superposer les chocs acide et froid.

1.2. Réponse physiologique à des conditions de températures basses

1.2.1. Etudes préliminaires

Les évolutions du pH et de la densité optique à 650 nm aux températures basses sont suivies pendant une semaine, dans trois conditions de cultures différentes pour les souches PB18 et Y105 :

- soit le milieu M17 à la température basse étudiée (10, 15, ou 20°C) a été directementensemencé avec des cellules de *Sc. thermophilus* en phase stationnaire

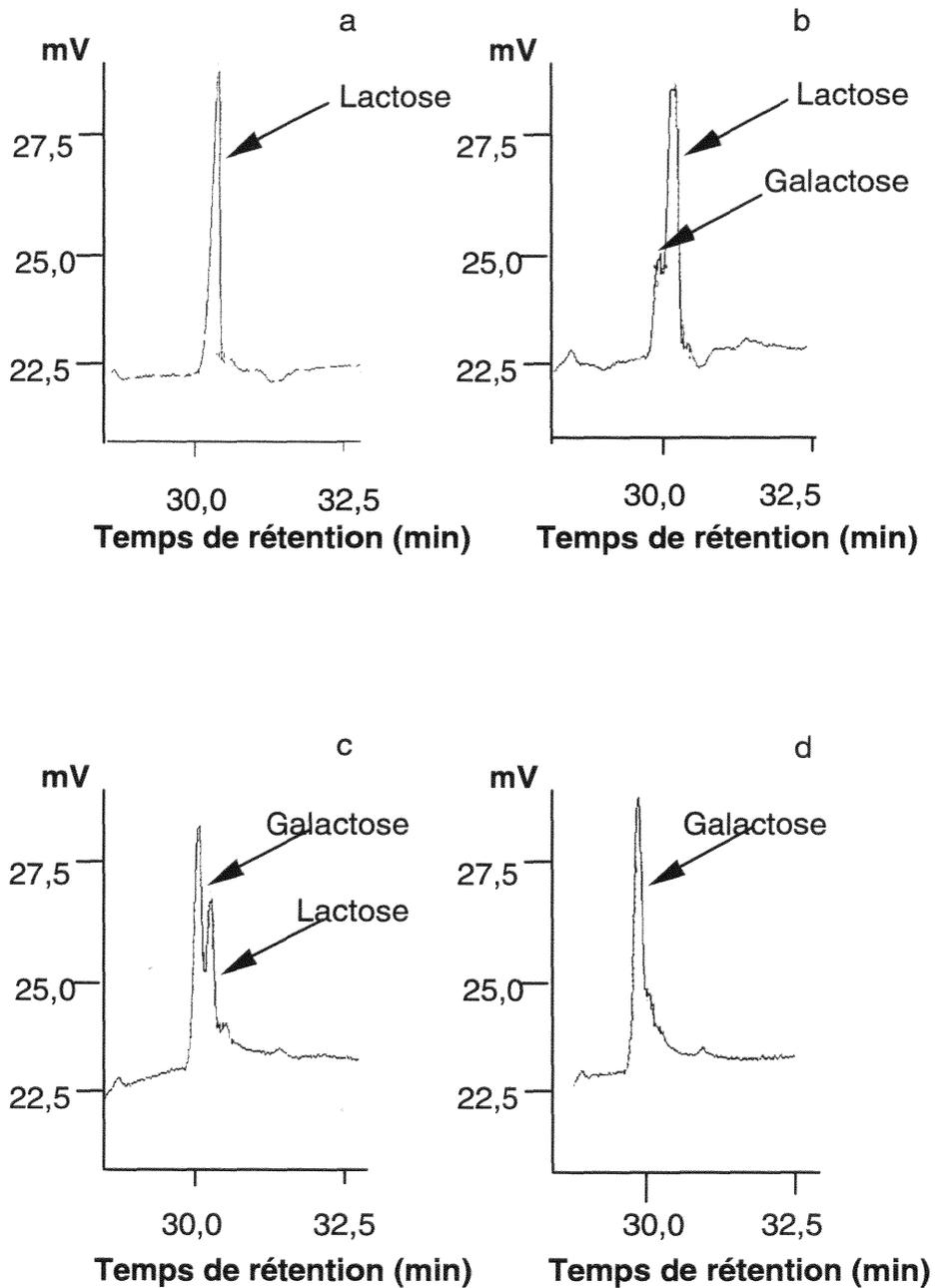


Figure 25. Profils obtenus par électrophorèse capillaire de l'évolution de la concentration du lactose et du galactose dans le milieu de culture, lors d'une croissance de *Sc. thermophilus* PB18 dans le milieu M17 à 10 g/l de lactose initial :

a. dans le milieu de culture de départ
c. après 3 h de croissance

b. après 1 h de croissance
d. après 5 h de croissance

de croissance (provenant d'une préculture en milieu lait réalisée à 42°C pendant 16 heures)

- soit les cellules de *Sc. thermophilus* cultivées à 42°C, prises en phase exponentielle de croissance sont :

- directement transférées (sans changer de milieu) à la température basse étudiée, ce mode de culture est appelé "transfert",
- récupérées par centrifugation, et remises en suspension dans un milieu frais M17 à la température basse étudiée, ce mode de culture est alors défini comme "choc".

Quelle que soit la souche, pour chaque mode de croissance et chaque température, les résultats sont similaires, la présence ou l'absence de variations d'acidification et de croissance sont indiquées dans le tableau 12.

Pour les trois modes de culture, aucune croissance, ni acidification ne sont détectées à 10°C. A 20°C, pour tous les modes de culture, le pH extracellulaire diminue et la turbidité du milieu augmente.

Par contre à 15°C, la réponse est différente en fonction du mode de culture utilisé :

- avec les cellules en phase stationnaire de croissance, rien n'est décelé
- avec le transfert, seul le pHe évolue légèrement
- avec le choc, une légère croissance et acidification sont décelées.

1.2.2. Paramètres physiologiques de *Sc. thermophilus* à 15 et 20°C en conditions de choc

Les réponses physiologiques dans les conditions de choc, pour les souches *Sc. thermophilus* PB18 et Y105 à 15 et 20°C, ont été suivies lors de trois essais différents. Les résultats obtenus pour chaque essai à une même température étant similaires pour les deux souches, pour chaque paramètre une seule courbe moyenne

Tableau 12. Croissance et acidification des souches *Sc. thermophilus* PB18 et Y105 dans différentes conditions de culture à basses températures

	10°C		15°C		20°C	
	Croissance	Acidification	Croissance	Acidification	Croissance	Acidification
1	-	-	-	-	+	+
2	-	-	-	+	+	+
3	-	-	+	+	+	+

1. Cellules en phase stationnaire de croissance

2. Cellules cultivées à 42°C en phase exponentielle de croissance transférées à une température basse

3. Cellules cultivées à 42°C en phase exponentielle de croissance soumises à un choc froid

+ présence

- absence

est proposée à la figure 26. Le tableau 13 résume les paramètres physiologiques déterminés dans ces conditions pour les deux souches PB18 et Y105. Le temps de génération est de 8 h à 20°C (soit 16 fois plus long qu'à température optimale), et de 30 h à 15°C (soit 60 fois plus long qu'à température optimale). Les valeurs de pH sont respectivement de 5,3 et de 6,8 après 45 heures de choc à 20°C et 15°C et les concentrations en lactate sont de 4,25 et 0,8 g.L⁻¹. Après 45 heures de choc à 15°C ($\Delta T = 27^\circ\text{C}$), la densité optique atteint une valeur de $D.O._{650\text{ nm}} = 0,60 \pm 0,06$ avec un temps de génération apparent de 30 heures pour les deux souches, et le pHe atteint une valeur de pH de $6,90 \pm 0,05$ (Tableau 13).

Aucune différence entre les deux souches n'est à noter, sauf que pour la souche PB18, en condition de choc à température basse, une légère floculation (nombre de cellules restreint) est observée à partir d'un pH bien supérieur à celui atteint en condition optimale de croissance (pH = 4,8-5,0). A la température de 20°C, la floculation est décelée aux alentours de pH = 5,8, et à 15°C pour un pH = 6,8.

1.2.3. Réponse physiologique à 15°C – Comparaison entre choc et transfert

Les paramètres $D.O._{650\text{ nm}}$, pHe et concentration en lactate pour *Sc. thermophilus* PB18 et Y105 sont mesurés (trois expériences séparées) pour les deux conditions de cultures, choc et transfert, pendant 45 heures après la baisse de température à 15°C. La réponse étant similaire pour les deux souches, la figure 27 présente l'évolution de chaque paramètre en fonction du temps pour les deux conditions de culture à 15°C.

Dans les conditions de choc froid à 15°C, aucun temps de latence n'est décelé. Durant les six premières heures, une faible croissance est détectée avec un temps de génération apparent 60 fois supérieur à celui obtenu dans les conditions

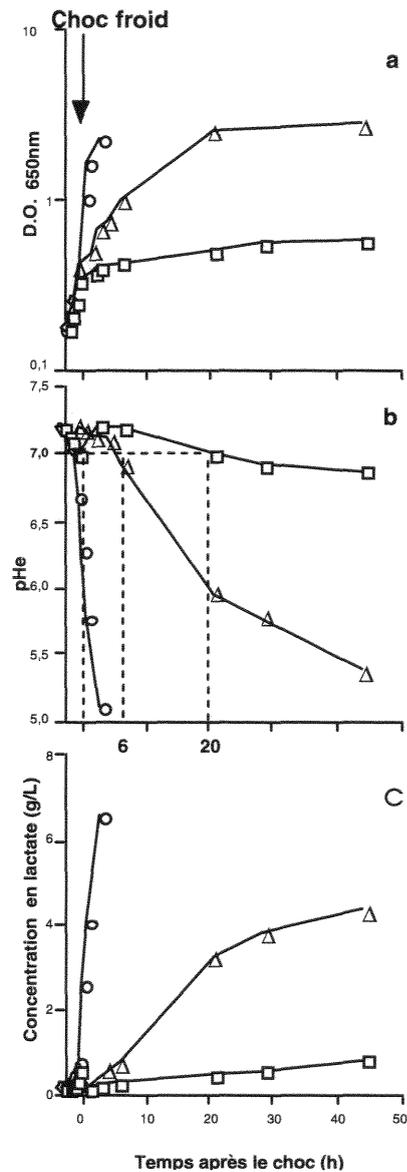


Figure 26. Réponses physiologiques de *Sc. thermophilus* à un choc froid.

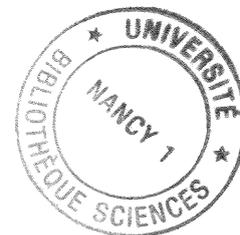
Les cellules sont cultivées en milieu M17 à 42°C (cercle) jusqu'à une valeur de D.O._{650 nm} de 0,4 (flèche) et sont récupérées par centrifugation puis remises en suspension dans un milieu M17 refroidi et cultivé à 15°C (carré) ou à 20°C (triangle)

a. D.O._{650 nm}, b. pH extracellulaire, c. Concentration du lactate extracellulaire

Tableau 13. Paramètres physiologiques des souches de *Sc. thermophilus* PB18 et Y105, après un choc à 15 et 20°C.

Température du choc	15°C	20°C
Temps de latence (h)	-	-
Temps de génération (h)	30	8
D.O. _{.650 nm} ¹	0,6	2,3
pHe final ¹	6,85	5,40

¹ : Mesurés après 45 heures de culture



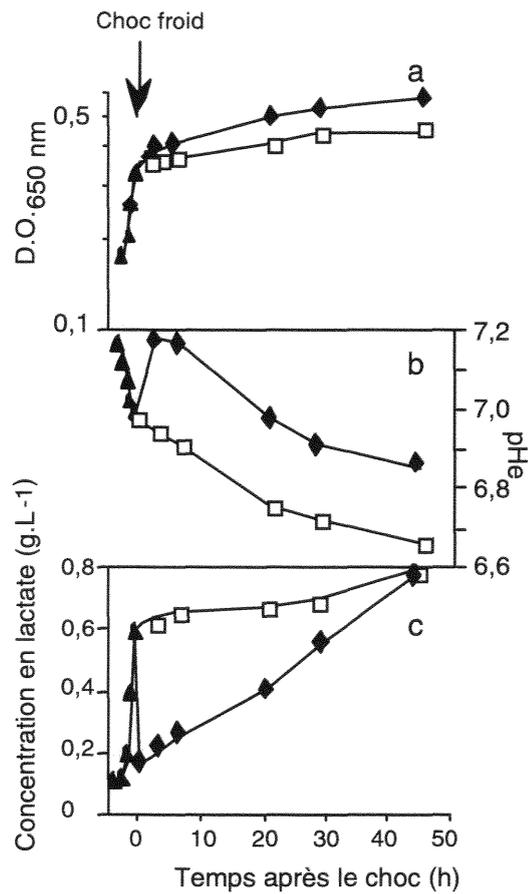


Figure 27. Réponses physiologiques de *Sc. thermophilus* à 15°C dans des conditions de choc et de transfert.

Les cellules sont cultivées en milieu M17 à 42°C (triangle) jusqu'à une valeur de D.O._{650 nm} de 0,4 (flèche) et sont soit récupérées par centrifugation et remises en suspension dans un milieu M17 refroidi, puis cultivées à 15°C (losange) soit transférées directement à 15°C (carré)

a. D.O._{650 nm}, **b.** pH extracellulaire, **c.** Concentration en lactate extracellulaire

optimales de croissance à la température de 42°C. Dans les conditions de transfert à 15°C, aucune croissance n'est détectée, même si la concentration de lactate extracellulaire et le pHe varient. Ces variations (baisse de pHe et augmentation du lactate extracellulaire) sont très faibles, mais semblent être liées entre elles. En effet, pour les deux conditions de culture, aucune variation de concentration des acides faibles acétate et citrate n'a été décelée par électrophorèse capillaire.

Durant les six premières heures de choc froid, la baisse de pHe est faible, avec une variation horaire du pHe estimée à $\Delta\text{pH}\cdot\text{h}^{-1} = 3 \times 10^{-3}$. Elle est ensuite plus forte et linéaire entre la sixième et trentième heure avec un $\Delta\text{pH}\cdot\text{h}^{-1}$ égal à 10×10^{-3} . Pendant les 45 heures de l'essai, l'excrétion en lactate est importante dans les conditions de choc ($\Delta\text{Lactate}\cdot\text{h}^{-1} = 16 \times 10^{-3}\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) en comparaison avec celle obtenue dans les conditions de transfert ($\Delta\text{Lactate}\cdot\text{h}^{-1} = 3 \times 10^{-3}\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). Dans les conditions de choc, les cellules en phase exponentielle de croissance sont récupérées par centrifugation et remises en suspension dans un milieu frais dépourvu de tout acide lactique. Le milieu M17 étant un milieu tamponné, le pHe diminue faiblement dans les 6 premières heures, période durant laquelle la faible croissance est également détectée. Dans les conditions de transfert, l'effet tampon ne semble plus être effectif et le pH diminue immédiatement. La concentration en lactate au moment du transfert à 15°C est de $0,62 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Cette concentration en lactate pourrait être largement suffisante pour empêcher toute croissance. En condition de choc froid cette valeur est atteinte après 35 heures à 15°C. La seule différence entre ces deux modes de cultures semble être la présence de lactate au moment du changement de température.

1.3. Discussion

La première partie de notre étude concerne la réponse physiologique aux basses températures de différentes souches de *Sc. thermophilus*. Les deux souches étudiées ont donc été choisies pour leur passé industriel différent, ayant été sélectionnées pour leur aptitude technologique. La souche PB18 ayant été isolée à partir d'un ferment utilisé dans la technologie des fromages à pâtes pressées cuites, et la souche Y105 isolée à partir d'un ferment yaourt.

Au préalable, les deux souches ont été comparées lors de la croissance à 42°C :

- La souche *Sc. thermophilus* Y105 issue d'un ferment yaourt a une particularité importante : lors de la centrifugation, le culot cellulaire obtenu est filant. Il est donc difficile d'éliminer le surnageant sans perdre des cellules. Les souches filantes de *Sc. thermophilus* sont choisies dans certains yaourts pour la recherche d'une texture particulière. Cet aspect filant est dû à des exopolysaccharides (EPS) (Cerning, 1994).

- Seule la souche Y105 (sur les 4 souches testées PB18, CNRZ302, 4F44 et Y105) excrète l'enzyme α -glucosidase qui a été décelée en phases exponentielle et stationnaire de croissance.

- Les profils protéiques monodimensionnels des deux souches montrent une différence majeure : l'expression d'une protéine de 16,4 kDa chez PB18 en condition de choc acide. De plus, les cellules de cette souche s'agrègent lorsque le pH atteint une valeur de 4,8-5,0 à 42°C.

- Quel est le rôle de la protéine de 16,4 kDa ? Faut-il lier la présence de la protéine de choc acide à la capacité de la cellule à s'agréger à un certain pH ? Où est-elle localisée : dans le cytoplasme, la membrane... ? Beaucoup de questions restent en suspend à propos de cette protéine et de la floculation. Afin d'obtenir un

pH proche de 4,8 pour mettre en évidence la floculation à ce pH, de l'acide lactique ou chlorhydrique ont été ajoutés à une culture de la souche PB18 en phase exponentielle de croissance à 42°C. L'agrégation cellulaire a alors pu être observée. Si le pH est ramené proche de la neutralité avec de la soude, la floculation disparaît. La floculation de la souche PB18 est donc réversible, dépendante du pH et non de l'entrée en phase stationnaire. Dans les conditions choisies (10 g.L⁻¹ de lactose) aucune floculation n'a été détectée. Il suffit d'augmenter la concentration en lactose pour obtenir une excrétion accrue d'acide lactique qui abaisse le pH, et ainsi entraîne une floculation cellulaire.

Une fois les paramètres physiologiques et particularités de chaque souche obtenus à la température optimale, la réponse aux basses températures a pu être étudiée.

Lors de l'étude préliminaire de la réponse aux températures basses, différentes températures (10, 15, et 20°C) ont été testées. A la température de 20°C quelque soit le mode de culture choisi, *Sc. thermophilus* présente une croissance, ce qui est en accord avec la littérature où la température minimale de croissance de *Sc. thermophilus* est mentionnée à 19-20°C (De Roissart et Luquet, 1994). Les souches Y105 et PB18 ont la même réponse physiologique que ce soit à 15 ou à 20°C, en condition de choc ou de transfert.

Lors de la culture en condition de choc froid, *Sc. thermophilus* ne présente aucun temps de latence. Au contraire, un temps de latence de 4 heures est observé chez *E. coli* (Jones *et al.*, 1987) (ce temps de latence est aussi appelé phase d'acclimatation chez *E. coli*). L'absence de temps de latence chez *Sc. thermophilus* est en accord avec les résultats obtenus avec *Enterococcus faecalis* (Panoff *et al.*, 1997), *Vibrio* ssp (Araki 1991) et *Salmonella enteritidis* (Jeffreys *et al.*, 1998). Le temps de génération à 15°C est 60 fois supérieur à celui obtenu dans les conditions

optimales de croissance, ce qui est proche des résultats d'*E. coli* où le temps de génération est multiplié par un facteur 72 pour un même écart de température. ($\Delta T = 42-15 = 27^{\circ}\text{C}$ pour *Sc. thermophilus* et $\Delta T = 37-10 = 27^{\circ}\text{C}$ pour *E. coli* (Jones *et al.*, 1987)).

A 15°C , *Sc. thermophilus* semble être sensible à la concentration en lactate présente au moment du transfert. Dès 1970, Friedman et Gaden ont montré l'effet inhibiteur de l'acide lactique sur la croissance à la température optimale de *Lb. delbrueckii* en utilisant des cultures dialysées en continu pour supprimer le lactate du milieu. Les bactéries lactiques sécrétant de l'acide lactique deviennent sensibles à cet acide faible à un certain pH. Sous l'effet d'une baisse de température les cellules bactériennes subissent différents changements, notamment au niveau des membranes cellulaires (Tsuchido *et al.*, 1995). A froid, les modifications membranaires pourraient entraîner des changements de perméabilité membranaire et ainsi augmenter la sensibilité à l'acide lactique. A 15°C , une culture dans des conditions de choc a été réalisée en milieu non tamponné TPPY. Les résultats étaient semblables à ceux obtenus en conditions de transfert en milieu M17. Les cellules à 15°C semblent donc être très sensibles à cette température au lactate, mais aussi, en l'absence de l'effet tampon, aux baisses du pH.

La seule différence observée entre les 2 souches concerne la floculation. La floculation de la souche PB18 est détectée à un pH de 4,8 à 5,0 à 42°C , mais dans les conditions de choc froid elle est observée pour des valeurs de pH plus élevées : 5,8 lors d'un choc à 20°C et 6,8 lors d'un choc à 15°C . La floculation cellulaire semble alors liée à un état de stress de la cellule.

Chapitre 2. Etude des profils électrophorétiques des protéines solubles totales de *Sc. thermophilus* soumis à des conditions de choc froid

Les cellules *Sc. thermophilus* en phase exponentielle de croissance, soumises à une baisse de température, ont une vitesse apparente de croissance qui diminue d'un facteur de 16 fois à 20°C et de 60 fois à 15°C comparées à celle obtenue à la température optimale de 42°C, et ce quelle que soit la souche. Nous nous proposons d'étudier les modifications de l'expression protéique lors de cette baisse de température, par le biais de l'électrophorèse monodimensionnelle (1D-PAGE) et bidimensionnelle (2D-PAGE). Les profils protéiques ont été réalisés en quasi totalité avec la souche PB18, car cette souche a fait l'objet de nombreux travaux au laboratoire. En parallèle des études physiologiques à la réponse au choc froid, nous avons réalisé un marquage des protéines de *Sc. thermophilus* à la ³⁵S-méthionine des 2 souches (PB18 et Y105), mais seuls les profils électrophorétiques obtenus avec Y105 sont interprétables, ce qui explique pourquoi les autoradiographies présentées sont réalisées à partir de Y105. Les échantillons protéiques utilisés sont issus de bactéries provenant de culture témoin (à 42°C), ou de cultures réalisées à températures basses dans les conditions de choc définies auparavant. Les protéines des cultures provenant des transferts n'ont pas été traitées.

2.1. Profils monodimensionnels pour l'étude de l'expression protéique de *Sc. thermophilus* en condition de température basse

Les protéines solubles totales de *Sc. thermophilus* PB18 obtenues en phase exponentielle de croissance et après différents temps de choc à 15 et à 20°C, sont séparées par 1D-PAGE (Figure 28).

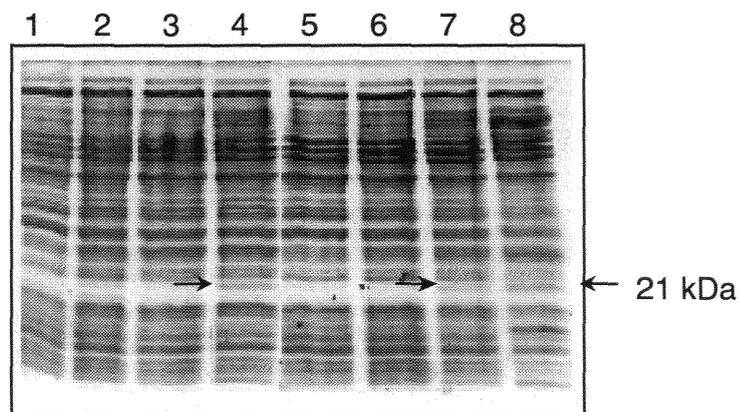


Figure 28. Electrophorèse monodimensionnelle des protéines solubles totales de la souche *Sc. thermophilus* PB18 soumise à des chocs de températures de 42°C à 15 ou 20°C (15% polyacrylamide, dépôt 20 µg de protéine, coloration au bleu de Coomassie R250).

1 et 5 : Témoins (42°C), cellules prélevées au moment du choc

2 : Choc de 2 heures à 15°C

3 : Choc de 4 heures à 15°C

4 : Choc de 20 heures à 15°C

6 : Choc de 2 heures à 20°C

7 : Choc de 4 heures à 20°C

8 : Choc de 20 heures à 20°C

L'analyse de ce gel permet seulement de mettre en évidence l'apparition d'une bande protéique de forte intensité aux alentours de 21 kDa, après 20 h de choc à 15°C et après 4 h ou 20 heures de choc à 20°C. La présence d'une protéine de faible masse moléculaire quelque soit le temps du choc, (décrite dans la littérature comme étant une protéine de choc froid ubiquitaire) n'a pu être mise en évidence. Pour améliorer la résolution au niveau des protéines de faibles masse moléculaire, nous avons réalisé un gel monodimensionnel à 15% de polyacrylamide mais de grande taille (10 x 12 cm) où le dépôt protéique de 100 µg est 5 fois supérieur à celui des minigels. Ainsi dans la figure 29, les protéines des cellules en phase exponentielle sont comparées aux protéines des cellules choquées à 15°C pendant 20 h. Pour les cellules issues d'un choc de 20 h, une faible bande correspondant à une protéine de 7,5 kDa est décelée. De plus, une protéine de 21,5 kDa est surexprimée d'un facteur 5 après le choc par rapport à 42°C. Ces gels monodimensionnels ne nous permettent pas de mettre en évidence la surexpression ou la néosynthèse d'autres protéines que celle de 21,5 et 7,5 kDa.

Afin de confirmer l'expression spécifique de ces deux protéines de 7,5 et 21,5 kDa lors d'un choc froid de 20 h à 15°C, un marquage radioactif (par incorporation de [³⁵S-Met]) des protéines synthétisées lors du choc froid a été réalisé. Les résultats obtenus à la figure 30 confirment la présence d'une protéine de 21,5 kDa, mais aucune protéine de 7,5 kDa n'est détectée. Nous avons testé la coloration à l'argent sur un profil protéique monodimensionnel (Figure 31). Même en tenant compte lors du dépôt de la sensibilité accrue de l'argent (dépôt de 4 µg) par rapport au bleu de Coomassie (dépôt de 20 µg) les profils obtenus sont très différents, car les deux colorations ne révèlent pas les protéines identiques avec la même intensité.

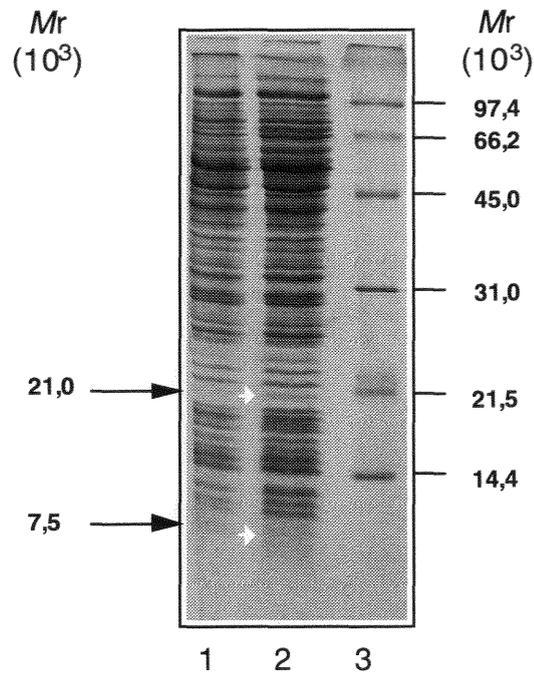


Figure 29. Electrophorèse monodimensionnelle des protéines solubles totales de *Sc. thermophilus* PB18 (gel grande dimension taille réelle ; dépôt 100 μg de protéines ; coloration au bleu de Coomassie).

1. témoin, phase exponentielle de croissance à 42°C
2. après un choc de 20 h à 15°C
3. marqueurs de masse moléculaire

Phosphorylase B de muscle de lapin (97 400)
 Sérum albumine bovine (66200)
 Ovalbumine du blanc d'œuf (45 000)
 Anhydrase carbonique bovine (31 000)
 Inhibiteur trypsique du soja (21 500)
 Lysozyme du blanc d'œuf (14 400)

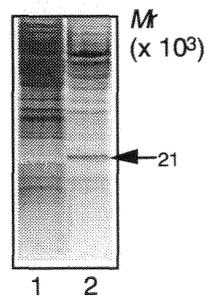


Figure 30. Autoradiographie du profil monodimensionnel des protéines solubles totales de *Sc. thermophilus* PB18 marquées à la [^{35}S -Met] (taille réelle ; gel de 15% de polyacrylamide, dépôt 10000 cpm par puits).

1. marquage à la [^{35}S -Met] pendant 20 min à 42°C.

2. marquage à la [^{35}S -Met] pendant 20 h à 15°C après un choc

La flèche noire indique la surexpression d'une protéine de 21 kDa.

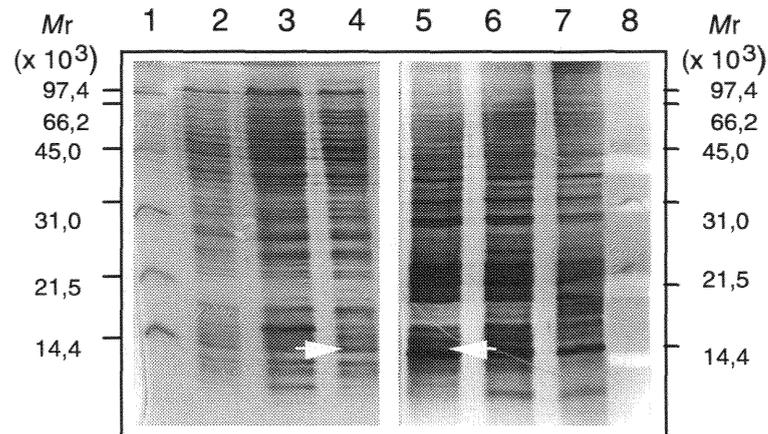


Figure 31. Electrophorèse monodimensionnelle des protéines solubles totales de PB18 colorées soit au bleu de Coomassie R250 (puits 1 à 4), soit à l'argent (puits 5 à 8) (taille réelle ; gel de 15% de polyacrylamide ; dépôt 20 μg pour la coloration au bleu de Coomassie et 4 μg pour la révélation à l'argent).

1 et 8 : Marqueurs de masse moléculaire

4 et 6: phase stationnaire

2 et 5: phase exponentielle

3 et 7: 20 h de choc froid

Les flèches blanches indiquent une protéine de 14 kDa qui présente une intensité relative différente en fonction du mode de coloration (au bleu de Coomassie ou à l'argent).

Par exemple, une bande protéique de 14 kDa (fléchée à la figure 31) semble plus importante à l'argent qu'au bleu de Coomassie. Pour les protéines de 7,5 et 21,5 kDa, cette différence de coloration est plus perceptible en électrophorèse bidimensionnelle.

2.2. Profils électrophorétiques bidimensionnels obtenus avec *Sc. thermophilus*

Les profils protéiques bidimensionnels ont été réalisés afin de mettre en évidence les changements d'expression (surexpression, répression, néosynthèse) de certaines protéines lors du choc froid comparées à celle des cellules prises en phase exponentielle.

2.2.1. Recherche des paramètres *pI* et *Mr* des protéines de *Sc. thermophilus*

Avant toute comparaison de gels bidimensionnels obtenus avec des protéines de bactéries ayant été soumises à différentes conditions de culture, il est utile de connaître le profil global de *Sc. thermophilus* et d'en déduire les paramètres de chaque protéine. Le *pI* et la masse moléculaire des protéines de *Sc. thermophilus* ont été obtenus en réalisant une co-migration avec des marqueurs protéiques externes de *pI* et de masse moléculaire déterminés. Pour chaque protéine exogène, les valeurs des paramètres (*pI* et *Mr*) sont connus (Figure 32A). Parallèlement, après avoir numérisé le gel bidimensionnel comportant les protéines de *Sc. thermophilus* additionnées des protéines marqueurs exogènes (Figure 32B), le logiciel identifie une à une les protéines en tant que spot. De plus, les paramètres *pI* et *Mr* de chaque protéine marqueur sont imposés comme référence au logiciel Bioimage qui extrapole ensuite ces paramètres à chaque spot protéique du profil bidimensionnel de *Sc. thermophilus*. En cliquant sur un spot protéique, les 3 paramètres : intensité

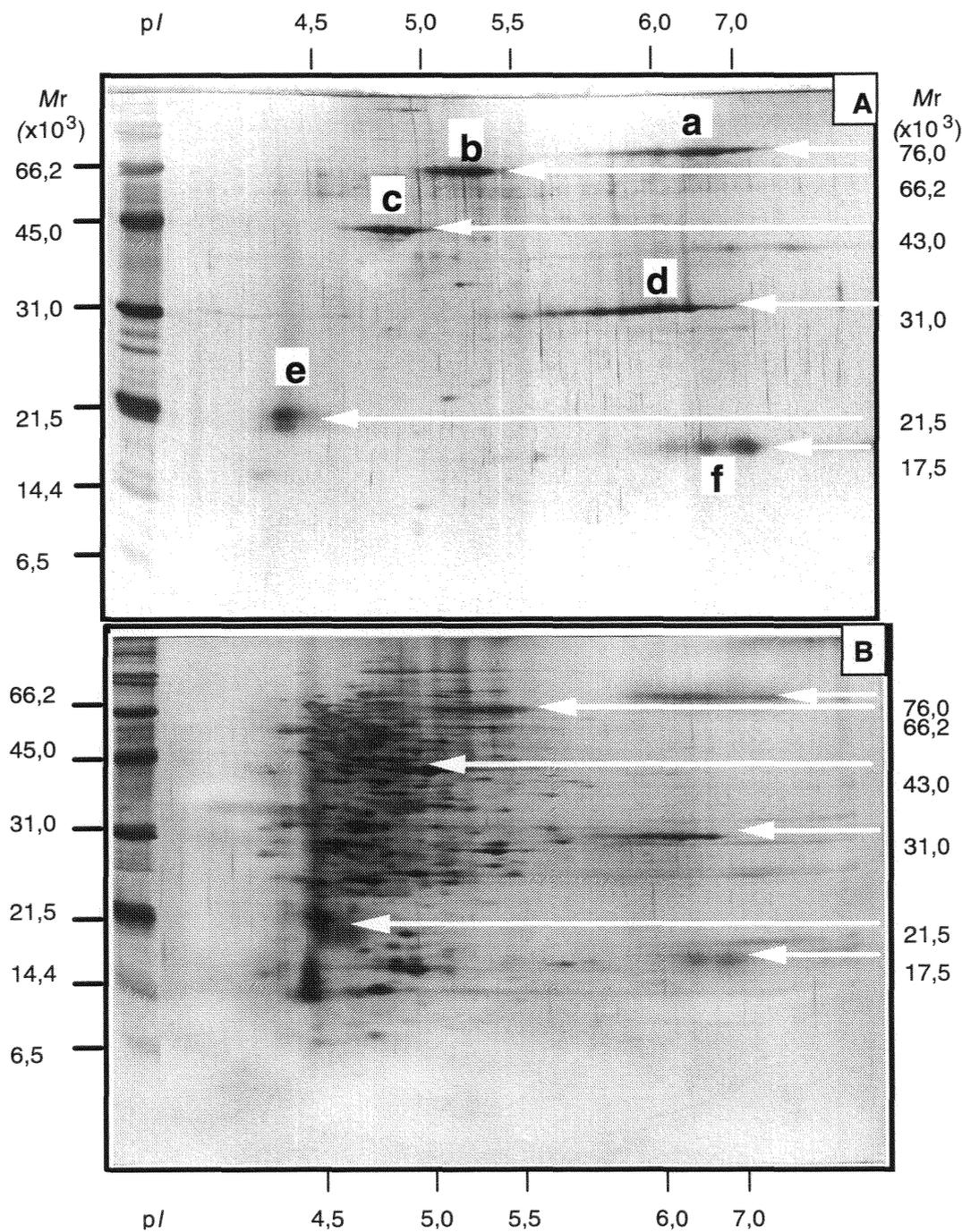


Figure 32. Profils électrophorétiques bidimensionnels

A. Standards de "2-D SDS-PAGE"

- a. Conalbumine du blanc d'œuf
- b. Sérum albumine bovine
- c. Actine de muscle bovin
- d. Anhydrase carbonique bovine
- e. Inhibiteur trypsique du soja
- f. Myoglobine équine

B. Protéines totales de *Sc. thermophilus* PB18 additionnées des standards de "2-D SDS-PAGE". (taille agrandie 1,5 fois ; gel de 15% polyacrylamide ; coloration à l'argent, dépôt de 16 µg de protéines)

relative, pI et Mr sont donnés. Les protéines solubles totales de *Sc. thermophilus* séparées sur minigel bidimensionnel présentent après coloration à l'argent 250 ± 20 spots. Une liste de tous les spots avec chaque paramètre peut alors être éditée (Annexe 1). Lors des électrophorèses suivantes, pour trouver les paramètres pI et Mr de chaque spot deux méthodes peuvent être employées. Soit des marqueurs peuvent co-migrer avec l'échantillon, soit les paramètres (pI et Mr) de certains spots protéiques obtenus précédemment sont choisis comme étant des marqueurs internes à la souche. Les spots protéiques retenus sont les spots majoritaires ayant des positions relatives permettant d'encadrer tout le profil protéique, qui se retrouvent chez toutes les souches étudiées et dans toutes les conditions de culture (phase exponentielle et stationnaire de croissance, différents états de stress). Cette deuxième méthode a été retenue pour la suite des travaux.

La figure 33 montre les protéines choisies comme marqueurs internes de *Sc. thermophilus*, au sein même du profil comportant les marqueurs externes (Figure 33A) et sur un profil quelconque (Figure 33B). Les protéines marqueurs sélectionnées correspondent à des spots de forte intensité, retrouvées dans tous les profils étudiés. Les paramètres pI et Mr de ces protéines marqueurs sont donnés dans le tableau 14. Après ces travaux préliminaires, l'analyse de l'expression protéique à la réponse au choc froid chez *Sc. thermophilus* peut être envisagée.

2.2.2. Profils protéiques en 2D-PAGE de PB18 en phase exponentielle de croissance et après un choc froid

Les protéines de *Sc. thermophilus* PB18 exprimées lors de la phase exponentielle de croissance sont comparées à celles obtenues après un choc froid par électrophorèse bidimensionnelle.

Le choix du temps du choc pour chaque température (15 ou à 20°C) a été motivé par

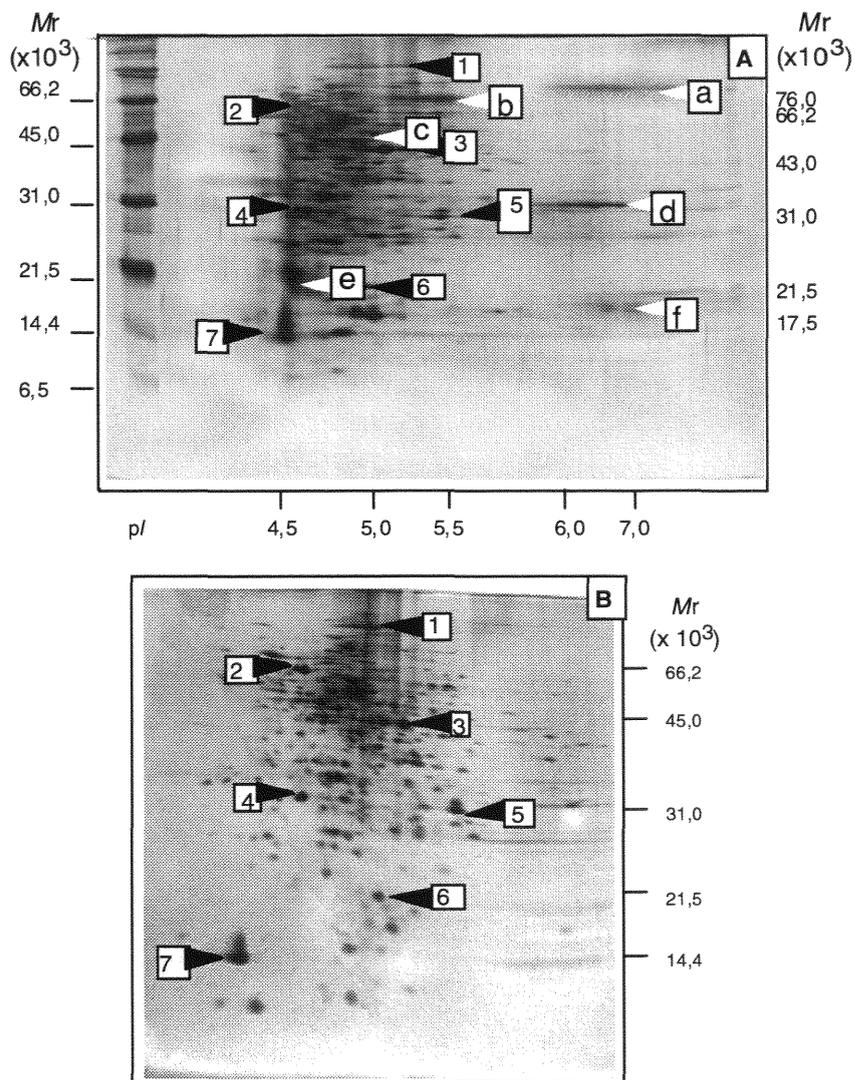


Figure 33. Cartographie des protéines choisies comme marqueurs internes de *Sc. thermophilus* PB18 (taille réelle ; gel de 15% polyacrylamide ; coloration à l'argent, dépôt de 16 μg de protéines).

A. Profil bidimensionnel des protéines solubles totales de *Sc. thermophilus* en phase exponentielle de croissance additionnées des marqueurs exogènes

B. Profil des protéines solubles totales de *Sc. thermophilus* en phase exponentielle de croissance

Marqueurs internes : flèches noires

Marqueurs exogènes déterminés à la figure 32 : flèches blanches

Tableau 14. Valeurs de *pI* et *Mr* des protéines marqueurs internes choisies.

N° du spot	<i>Mr</i> apparente (x10 ³)	<i>pI</i> apparent
1	117,0	5,2
2	59,6	4,8
3	36,4	5,2
4	30,8	4,7
5	29,5	5,5
6	20,0	5,3
7	12,7	4,3

les résultats physiologiques présentés à la figure 26 au chapitre 1. Les protéines des profils bidimensionnels présentés en figure 34 sont issues de cellules qui ont le même pH extracellulaire, c'est-à-dire 6,9-7,0. Ainsi, les cellules sont arrêtées :

- à la $D.O_{.650} = 0,4$ en phase exponentielle de croissance à 42°C,
- après avoir subit :
 - 20 h de choc à 15°C ($D.O_{.650} = 0,45$)
 - 6 h de choc à 20°C ($D.O_{.650} = 1$).

L'analyse d'image de ces trois gels nous a permis de confirmer les observations réalisées avec les profils protéiques monodimensionnels, à savoir un changement de synthèse au niveau des 2 protéines de 21,5 et de 7,5 kDa toutes deux de pI identique 4,5. En condition normale de température, *Sc. thermophilus* ne semble pas synthétiser ces deux protéines ou leur faible concentration ne permet pas de les détecter lors de la révélation à l'argent. Les spots protéiques de 21,5 kDa et 7,5 kDa sont respectivement 10 et 2 fois plus intenses après 20 h à 15°C qu'après 6h à 20°C. De plus, la protéine de 21,5 kDa présente deux spots à 15°C. La révélation à l'argent n'est pas suffisante pour bien mettre en évidence les protéines néosynthétisées, un marquage radioactif des protéines a été réalisé.

2.2.3. Analyse du changement de l'expression protéique par 2D-PAGE

Les marquages à la [^{35}S -Met] des protéines des deux souches PB18 et Y105 sont réalisés en parallèle sur des cellules en phase exponentielle de croissance à 42°C (20 min de marquage) et sur des cellules choquées pendant 4h et 20 h à 15°C. Seules les autoradiographies des 2D-PAGE des protéines marquées des cellules Y105 sont présentées à la figure 35, la qualité des autoradiographies obtenues avec la souche PB18 n'étant pas satisfaisante. Le nombre de polypeptides marqués

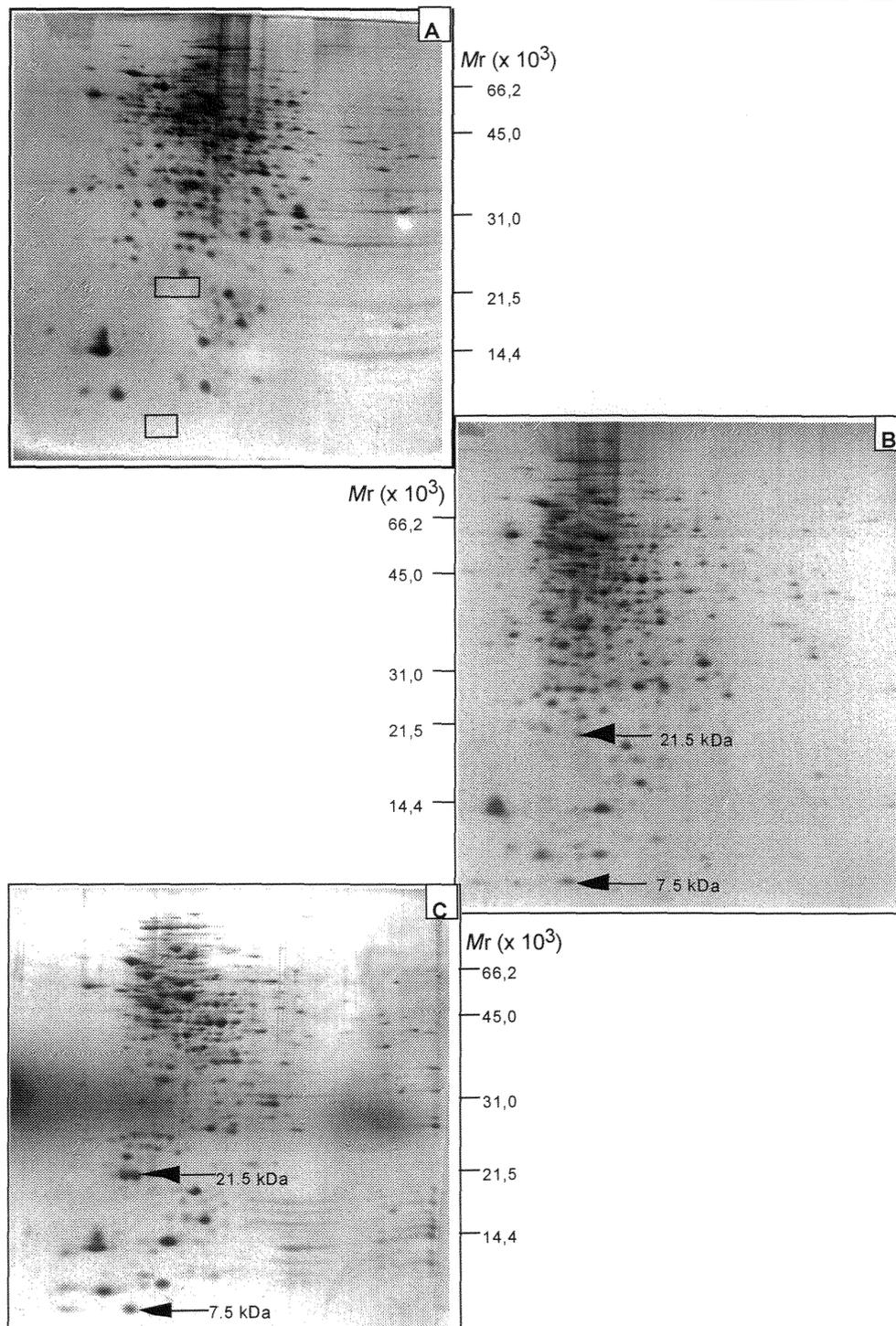


Figure 34. 2D-PAGE des protéines solubles totales de *Sc. thermophilus* PB18 cultivée en phase exponentielle de croissance et en conditions de choc froid (taille réelle ; gel de 15% polyacrylamide ; coloration à l'argent ; dépôt de 16 μg de protéine).

A. Protéines de cellules en phase exponentielle de croissance, au moment du choc, **B.** Protéines de cellules choquées pendant 6 h à 20°C et **C.** 20 h à 15°C. Les 2 rectangles de la figure A montrent la zone où devraient se situer les protéines de 21,5 et 7,5 kDa fléchées dans les figures B et C.

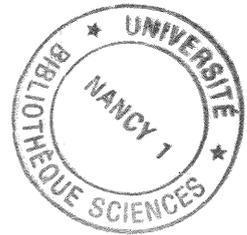
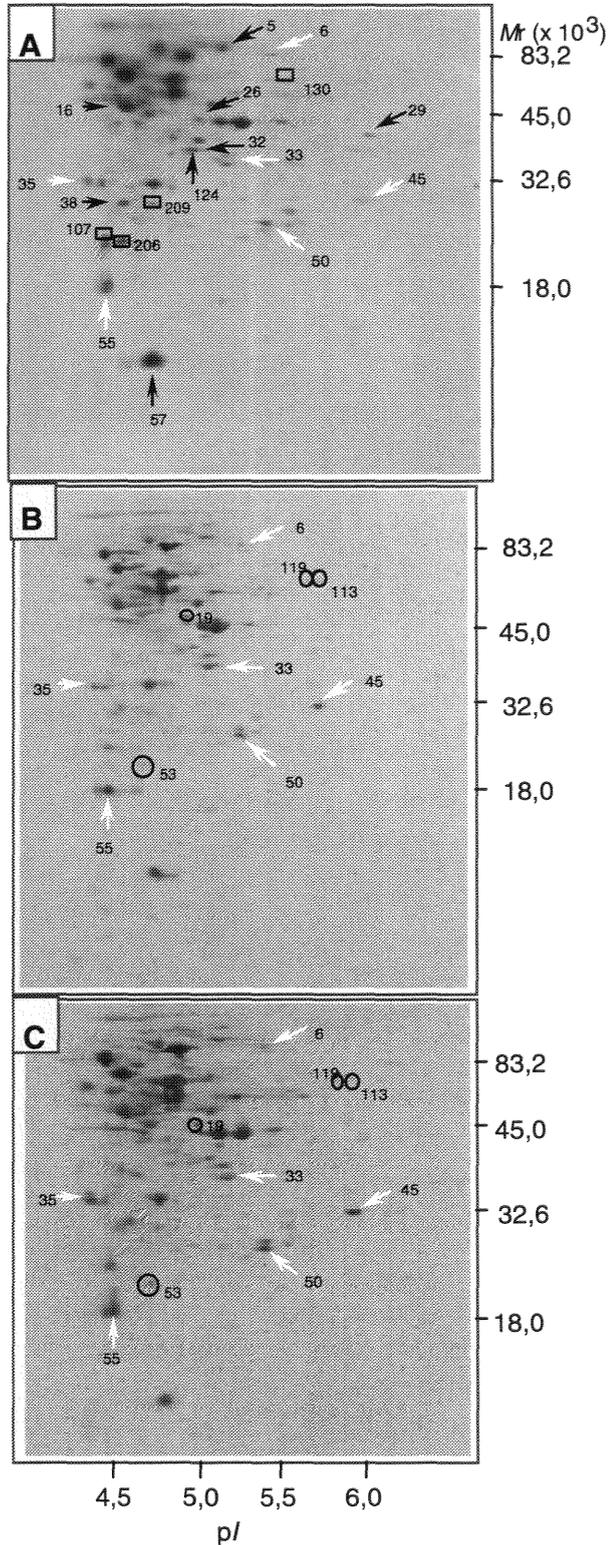


Figure 35. Autoradiographies de 2D-PAGE (taille réelle ; gel de 15% polyacrylamide ; dépôt de 30 000 cpm) des protéines de *Sc. thermophilus* Y105 marquées à la [³⁵S-Met] pendant :

A : 20 min à 42°C, **B** et **C** : 4 et 24 heures respectivement à 15°C après le choc froid. → Protéines réprimées, ↗ surexprimées, □ disparues et ○ apparues à 15°C

déTECTÉS est de 65 ± 5 spots. La synthèse de 8 protéines constitutives diminue et celle de 6 protéine augmente. De plus, 4 nouvelles protéines apparaissent et 4 protéines constitutives disparaissent à 15°C en comparaison avec 42°C. Les paramètres *pI* et *Mr* de ces protéines ont été caractérisés à l'aide du logiciel Bioimage et sont donnés au tableau 15.

Une protéine avec une masse moléculaire apparente de 21,5 kDa (spot n°55) est détectée ; dans ces conditions de marquage, la protéine de 21,5 kDa existe donc à 42°C. Son expression est augmentée d'un facteur 3 à 15°C par rapport à 42°C. Aucune protéine de faible masse moléculaire n'est détectée. Les protéines nouvellement apparues sont des spots de très faibles intensités ; par la suite, il sera donc difficile de les caractériser.

2.3. Discussion

Des travaux préliminaires de mises au point ont été nécessaires pour l'électrophorèse bidimensionnelle : quantité protéique à déposer, temps de migration pour la première dimension, recherche des paramètres de chaque protéine du profil protéique bidimensionnel de *Sc. thermophilus*. Des marqueurs protéiques exogènes de *pI* et *Mr* connus ont co-migré avec l'échantillon protéique de *Sc. thermophilus*, ce qui a permis de déduire le *pI* et *Mr* de certaines protéines majoritaires du profil protéique, ensuite sélectionnées comme protéines marqueurs internes. Cela améliore la résolution des gels, car il y a des interférences lors de la co-migration des protéines de *Sc. thermophilus* et des marqueurs, ce qui rend le profil protéique obtenu moins satisfaisant. De plus, certaines protéines marqueurs migrent au niveau des protéines de *Sc. thermophilus* ; c'est le cas notamment de l'actine de muscle bovin (*pI* = 5,0-5,1 ; *Mr* = 43 000) et de l'inhibiteur trypsique du soja (*pI* = 4,5 ; *Mr* = 21 500). Il est donc préférable de ne pas rajouter de marqueurs exogènes à tous nos

Tableau 15. M_r et pI apparents des protéines dont l'expression a changé chez *Sc. thermophilus* Y105 après le choc froid.

n° Spot	M_r	pI
Protéines constitutives		
Disparaissant après le choc froid		
107	27 100	4,5
130	55 300	5,5
206	26 100	4,6
209	28 300	4,8
Niveau d'expression augmenté de 3 à 5 fois		
6	68 900	5,5
33	38 400	5,2
35	29 300	4,4
45	28 300	5,9
50	28 600	5,4
55	21 500	4,5
Niveau d'expression diminué de 3 à 5 fois		
5	71 000	5,4
16	47 000	4,7
26	45 000	5,2
29	43 000	6,2
32	40 700	5,2
38	28 200	4,7
57	14 700	4,8
124	38 500	5,2
Protéines induites		
après un choc froid à 15°C		
19	46 000	5,2
53	23 100	4,8
113	60 300	6,0
119	60 300	5,9

échantillons, mais de se servir des paramètres de protéines marqueurs internes. Les protéines marqueurs internes sont communes à tous les profils bidimensionnels (différentes souches, différentes conditions de culture) et ont été choisies également pour leur paramètre pI et M_r , qui encadrent la majorité des protéines. Les valeurs de pI de ces marqueurs internes s'étendent entre 4,3 et 5,5, et leur masse moléculaire est comprise entre 117 000 et 12 700.

Lors d'un choc froid à 15 ou à 20°C, une protéine de 21,5 kDa a été mise en évidence par électrophorèse monodimensionnelle en coloration bleu de Coomassie, ou lors d'un marquage radioactif. L'électrophorèse bidimensionnelle a permis de confirmer la surexpression de cette protéine lors d'un choc froid, et de déterminer la valeur de pI apparent de cette protéine (égale à 4,5). Cette protéine, peu ou pas exprimée en phase exponentielle de croissance, présente deux spots bien distincts après 20 h de choc froid à 15°C. Les gels bidimensionnels réalisés avec des échantillons protéiques issus de bactéries en phase stationnaire de croissance présentent à l'endroit de cette protéine un défaut de coloration. Pour Gonzalez-Marquez *et al.* (1997), cette zone est due à des protéines dégradées. Les autoradiographies des profils bidimensionnels obtenues avec des cellules marquées à la [³⁵S-Met] en phase exponentielle de croissance cultivées à 42°C révèlent également cette protéine de 21,5 kDa, la valeur du pH obtenue au moment du prélèvement des cellules est de 5,4. En effet lors du marquage des protéines, une étape de concentration étant effectuée, le pH est déjà descendu à 5,4 après 20 min, (contrairement au pH proche de la neutralité pour les cellules prélevées en phase exponentielle pour les gels bidimensionnels colorés à l'argent). La dégradation indiquée par Gonzalez-Marquez est-elle une réelle dégradation protéique, ou alors

cette protéine de 21,5 kDa est-elle exprimée également dans les conditions de choc acide ? Dans cette hypothèse serait-elle une protéine de réponse à différents stress, notamment des stress froid et/ou acide ?

En électrophorèse monodimensionnelle, la présence d'une protéine de faible masse moléculaire n'a pu être mise en évidence qu'avec les gels de grande taille. Pour les minigels réalisés avec 15% de polyacrylamide, la concentration en polyacrylamide peut ne pas être suffisante pour détecter les protéines de faible masse moléculaire. Nous avons réalisé des gels avec des pourcentages de polyacrylamide plus élevés, 16,5% et 18%, afin de pouvoir obtenir une résolution optimale pour les bandes protéiques de faible masse moléculaire ; mais aucune nouvelle protéine de l'ordre de 7 à 8 kDa n'a été détectée. De plus, la coloration au bleu de Coomassie peut ne pas être assez sensible pour détecter cette protéine dans les minigels où la quantité protéique déposée est moindre que pour un grand gel. Après la migration électrophorétique, afin de s'assurer que les protéines de faible masse moléculaire ne diffusent pas dans le gel, nous avons effectué une fixation covalente des protéines avec l'acrylamide faisant intervenir le formaldéhyde (Steck *et al.*, 1980), au lieu de précipiter les protéines dans le gel avec du TCA 12%. Ce mode de fixation nous a permis de visualiser les bandes protéiques de faible masse moléculaire de façon légèrement plus nette, mais après séchage du gel aucune différence n'était détectable.

Soit la protéine de 7,5 kDa observée sur le grand gel peut être remise en question, soit les conditions de marquage choisies pour l'autoradiographie ne permettent pas de la détecter. Pour réaliser le marquage, une étape de concentration (d'un facteur 10) des cellules en phase exponentielle est effectuée avant de les exposer à 15°C et pourrait empêcher la synthèse de cette protéine. De plus, les temps de prélèvement

sont peut-être mal choisis, sachant que chez d'autres bactéries l'expression de cette protéine est explosive et transitoire dans les 4 premières heures qui suivent le choc. Le marquage à la [^{35}S -Met] a été choisi pour une meilleure détection des rayons émis que le marquage au ^3H ou au ^{14}C . Nous pensions également que de nombreuses protéines conservaient la méthionine en N-terminal. Le choix du marquage avec cet acide aminé semblait donc à l'époque le mieux adapté. Un mélange d'acides aminés Met et Cys marqués au [^{35}S] aurait été plus judicieux. Il est difficile de conclure si une protéine de faible masse moléculaire est exprimée ou non à faible température aux vues des résultats avec les gels monodimensionnels. Par contre, les gels bidimensionnels colorés à l'argent des protéines issues de bactéries ayant été soumises à un choc froid à 15 ou à 20°C mettent en évidence un spot protéique pouvant correspondre à la protéine de choc froid de 7,5 kDa et pI 4,5.

La révélation des protéines en 2D-PAGE se fait à l'argent car cette révélation est plus sensible que celle au bleu de Coomassie. Cette coloration a été testée sur les profils monodimensionnels des protéines solubles totales, mais n'a pas été satisfaisante. Les bandes protéiques de forte intensité débordent sur les bandes de plus faible intensité, rendant les profils peu interprétables. De plus, une protéine qui est bien révélée à l'argent n'est pas forcément bien colorée au bleu de Coomassie et réciproquement. Le bleu de Coomassie requiert un environnement acide pour exacerber les interactions ioniques qu'il développe avec les acides aminés basiques (des interactions de van der Waals et hydrophobes interviennent également). Les acides aminés aromatiques sont également impliqués dans ces interactions. La révélation à l'argent, très sensible, fait intervenir les groupements sulfhydryle ou carboxyle des acides aminés. La composition en acides aminés de chaque protéine est donc importante pour la coloration. Quant aux profils protéiques bidimensionnels,

le choix de la révélation à l'argent est dicté par l'isoélectrofocalisation. En effet, pour obtenir une bonne séparation, il faut déposer dans le capillaire de première dimension le minimum de protéines. Donc, si peu de protéines sont séparées, le choix d'une méthode sensible de coloration est nécessaire.

Pour les gels bidimensionnels réalisés avec des protéines solubles totales de *Sc. thermophilus*, des dépôts de 16 μg de protéines pour la révélation à l'argent et 40 μg pour la coloration au bleu de Coomassie ont permis de mettre en évidence respectivement, 250 spots et 50 spots. Afin de visualiser davantage de spots protéiques lors de la coloration au bleu de Coomassie, une quantité plus importante de protéine est déposée, mais l'isoélectrofocalisation se fait mal, les protéines sont mal séparées, et le profil n'est plus interprétable. La coloration au bleu de Coomassie n'est donc pas assez sensible pour visualiser un grand nombre de protéines. La coloration à l'argent nécessite le plus grand soin pour obtenir une bonne répétabilité, néanmoins un bruit de fond important est souvent obtenu.

Les autoradiographies des profils bidimensionnels de *Sc. thermophilus* proviennent seulement de la souche Y105. En effet, les profils obtenus avec la souche PB18 ne sont pas interprétables pour les protéines issues des bactéries soumises au choc froid. Dans les conditions optimales de croissance à 42°C, l'incorporation de la radioactivité est semblable pour les deux souches. Pour chaque échantillon, 30 000 cpm ont été déposés sur le gel de première dimension sans tenir compte de la concentration protéique, alors que le nombre de cpm par μg de protéines est 5 à 6 fois plus important pour la souche Y105 que pour la souche PB18 pour les cultures en conditions de choc froid. Pour des raisons actuellement inconnues, la souche PB18 a incorporé moins de radioactivité dans ses protéines que la souche Y105 dans les conditions de choc froid. La quantité de protéines déposée était donc 5 à

6 fois plus importante pour PB18 que pour Y105. Comme nous l'avons précisé précédemment, si trop de protéines sont déposées sur le gel d'IEF, l'isoélectrofocalisation se fait mal, ce qui conduit à un gel bidimensionnel non interprétable.

Les deux séries de profils bidimensionnels, gels colorés à l'argent ou autoradiographie, ont permis de montrer la surexpression d'une protéine de 21,5 kDa à froid. De nombreux auteurs (Berger *et al.*, 1996 ; Roberts et Inniss, 1992 ; Phan-Than et Gormon, 1995) ont montré qu'une protéine dont la masse moléculaire est comprise entre 20 000 et 22 000 est surexprimée, sur les profils bidimensionnels des protéines issues de bactéries soumises à des températures basses (*Arthrobacter globiformis*, *Aquaspirillum arcticum*, *Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua*). Cependant, aucune de ces protéines n'a été caractérisée, ni du point de vue séquence primaire, ni pour son rôle, ce qui nous conduit à purifier cette protéine et à la caractériser.

Durant la réponse au choc froid une protéine de 7,5 kDa est surexprimée chez de nombreuses bactéries et semble ubiquitaire (Francis et Stewart, 1997). Dans nos conditions, cette protéine ne serait visualisée qu'avec l'électrophorèse bidimensionnelle révélée à l'argent. L'absence de visualisation de cette protéine lors du marquage à la [³⁵S-Met] pourrait s'expliquer par l'absence de Met au sein de la séquence. En effet, chez d'autres bactéries lactiques comme *Lc. lactis* et *Lb. pantarum*, les gènes de cette protéine de choc froid ne comportent qu'un résidu Met positionné à l'extrémité N-terminale. Par conséquent, la protéine de 7,5 kDa, si elle existe, peut ne pas être visualisée si elle est dépourvue de méthionine à l'extrémité N-terminale.

Afin de caractériser ces deux protéines, une purification a été entreprise.

Chapitre 3. Fractionnement des protéines solubles totales de *Sc. thermophilus* cultivé en condition de choc froid - Caractérisation de deux protéines de choc froid

Les deux protéines de choc froid détectées chez *Sc. thermophilus* par 2D-PAGE, lors de conditions de croissance à basse température (choc froid), vont être enrichies, puis purifiées afin de les caractériser. Pour les deux protéines, une étape de précipitation au sulfate d'ammonium suivie d'une chromatographie échangeuse d'ions sont réalisées. Pour la protéine de 21,5 kDa, la purification a été complétée par une étape supplémentaire de chromatographie HPLC en phase inverse. Toutes ces différentes étapes sont résumées à la figure 36.

3.1. Obtention des protéines solubles

Les protéines ont été préparées en plusieurs étapes. Les cellules issues d'un litre et demi de milieu M17, inoculé avec 1% de préculture et incubé à 42°C jusqu'à obtention d'une $D.O._{650\text{ nm}} = 1$, sont récupérées par centrifugation, remises en suspension dans un milieu stérile prérefroidi à 15°C et maintenues à 15°C pendant 20 h. Ensuite les cellules (1,5 g poids humide) sont de nouveau collectées par centrifugation et lavées. Les protéines solubles totales sont libérées par sonication comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes. Après élimination des débris cellulaires par centrifugation, la concentration protéique a été déterminée à 7,5 mg.mL⁻¹. Cette solution ne nécessite pas de dilution car, pour un fractionnement optimum au sulfate d'ammonium la concentration protéique ne doit pas excéder 10 mg.mL⁻¹ (Dawson *et al.*, 1969).

3.2. Fractionnement au sulfate d'ammonium

Lors de cette étude, différents types de fractionnement ont été testés, avec de nombreuses étapes successives : 50%, 60%, 70%, 80%, 100% de saturation en

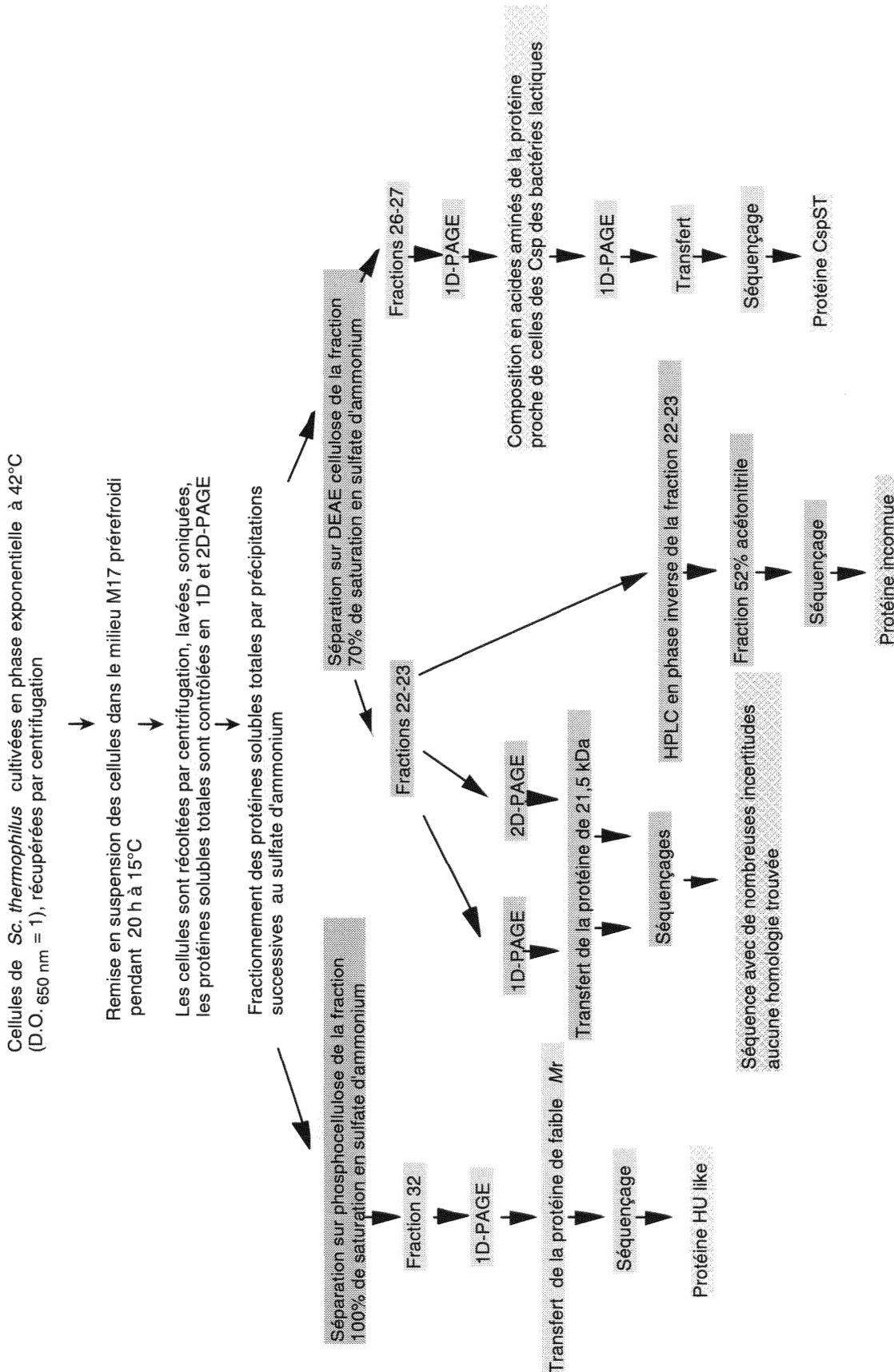


Figure 36. Différentes étapes de purification permettant l'obtention de trois protéines en vue de leur identification.

sulfate d'ammonium est le mode de fractionnement retenu. La quantité protéique de chaque fraction obtenue à partir de 120 mg de protéines solubles totales est présentée dans le tableau 16. La protéine de 21,5 kDa se trouve dans les fractions précipitées à 70 et 80% de saturation. La fraction de 100% de saturation en sulfate d'ammonium laisse envisager la présence de protéines de faible masse moléculaire comme la protéine de 7,5 kDa (Figure 37).

3.3. Purification de la protéine de 21,5 kDa

3.3.1 Mise en évidence de la protéine de 21,5 kDa après chromatographie sur DEAE cellulose

Les fractions 70 et 80 % renferment la protéine de 21,5 kDa. Comme décrit dans matériel et méthodes, des essais préliminaires ont été réalisés en "Batch" avec des tampons à différents pH. Le tampon acétate de sodium 50 mM à pH 5,5, qui a permis le meilleur enrichissement de la protéine de 21,5 kDa, a été retenu pour réaliser la chromatographie sur colonne en DEAE cellulose. La fraction à 80% de saturation en sulfate d'ammonium contenant 24 mg de protéines a été déposée après dialyse sur la colonne de DEAE cellulose équilibrée en tampon acétate de sodium 50 mM pH 5,5. Les protéines ont été éluées avec le même tampon et un gradient de NaCl entre 0,05 et 0,3 M. La concentration protéique de chacune des 40 fractions de 5 mL collectées est estimée par la méthode de dosage de Bradford. Au total, 6 mg de protéines sont récoltées dans les 40 fractions sur les 24 mg déposées (25% de récupération).

Toutes les fractions issues de cette étape ont fait l'objet d'une électrophorèse monodimensionnelle afin de détecter une bande protéique aux alentours de 21,5 kDa. Les fractions 22 et 23, correspondant aux protéines décrochées à environ 0,2M NaCl, renferment la protéine A (Figure 38) de 21,5 kDa et contiennent

Tableau 16. Distribution des protéines dans chaque fraction issue de la précipitation au sulfate d'ammonium

Echantillons	mg protéines	% des protéines de départ
Protéines totales	120	100
50%*	30	25
60%*	28	23
70%*	13	20
80%*	24	11
100%*	15	12

*% de saturation en sulfate d'ammonium

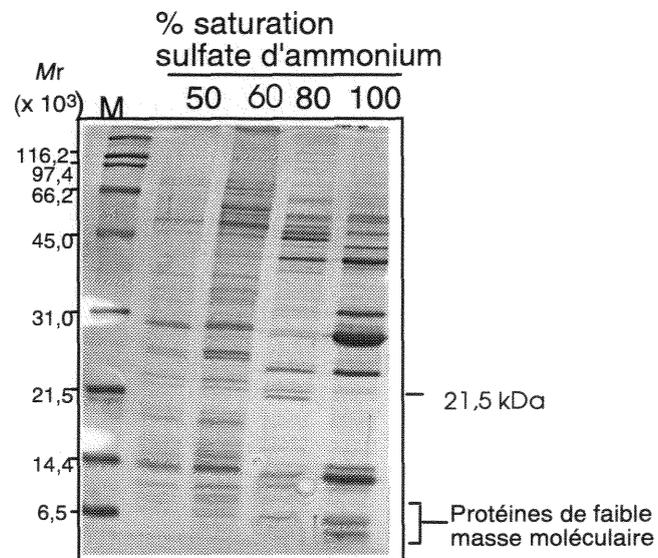


Figure 37. Profil électrophorétique monodimensionnel de certaines fractions obtenues après précipitation au sulfate d'ammonium des protéines solubles totales de *Sc. thermophilus* ayant subi un choc froid de 20 h à 15°C.

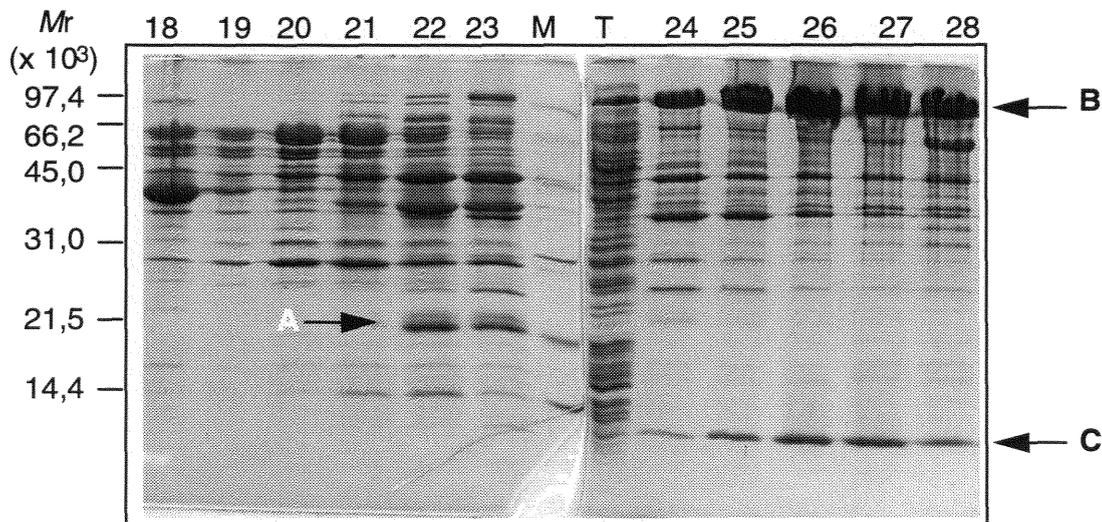


Figure 38. Profil électrophorétique monodimensionnel des fractions protéiques 18 à 28 issues de la séparation chromatographique sur DEAE cellulose, à partir de la fraction 80% de saturation en sulfate d'ammonium des protéines solubles totales de *Sc. thermophilus* ayant subi un choc froid de 20 h à 15°C. T : protéines solubles totales témoins de *Sc. thermophilus* ayant subi un choc froid de 20 h à 15°C, M : marqueurs de masse moléculaire.

- A.** Protéine estimée à 21,5 kDa
- B.** Protéine estimée à 117 kDa
- C.** Protéine estimée à 8,5 kDa

respectivement 320 et 340 μg de protéines totales. D'après l'analyse densitométrique du gel, la protéine A représente dans les deux fractions 10% des protéines totales, donc au mieux 60 μg de protéines de 21,5 kDa sont récupérées à l'issue des deux premières étapes (fraction 80% et DEAE cellulose). Afin de contrôler que cette bande protéique correspond bien à la protéine de 21,5 kDa surexprimée lors d'un choc froid, ces 2 fractions protéiques sont analysées en électrophorèse bidimensionnelle (Figure 39).

3.3.2. Séquençage de la protéine de 21,5 kDa à partir de "blots"

3.3.2.1. Transfert à partir d'un gel monodimensionnel

Après confirmation par 2D-PAGE, un premier séquençage de l'extrémité N-terminale de la protéine de 21,5 kDa a été réalisé à partir d'un transfert sur membrane PVDF des protéines des fractions 22-23 séparées par 1D-PAGE. Les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie G250 sur la membrane. Après décoloration de la membrane, la bande protéique de faible intensité (correspondant à la protéine de 21,5 kDa) est rapidement découpée (avant de ne plus pouvoir visualiser la bande qui disparaît lors du séchage de la membrane), stockée dans un microtube à -65°C . Cette protéine de 21,5 kDa n'est pas fortement colorée par le bleu de Coomassie, même dans les conditions normales de coloration des minigels ainsi que nous l'avons déjà vu au chapitre 2. La figure 40 montre la différence d'intensité des colorations au bleu de Coomassie ou à l'argent pour la protéine étudiée. La bande protéique de 21,5 kDa représente en intensité relative de 10% des protéines totales lors de la coloration au bleu de Coomassie contre 30 % à l'argent. L'estimation densitométrique pour la protéine de 21,5 kDa est donc soit sous-estimée lors de la coloration au bleu de Coomassie, soit surestimée dans le cas de la coloration à

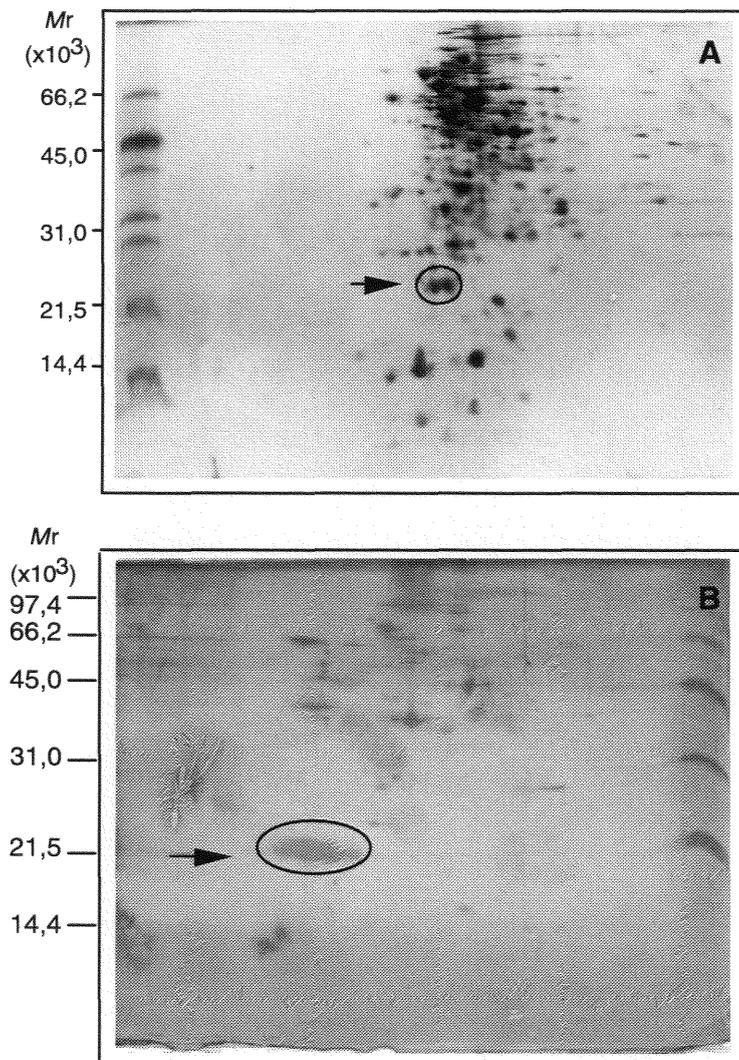


Figure 39. Profils électrophorétiques bidimensionnels des protéines solubles totales de *Sc. thermophilus* (A) et des protéines issues du mélange des fractions n°22-23 de la chromatographie sur DEAE cellulose (B). Les flèches montrent la position de la protéine de 21,5 kDa.

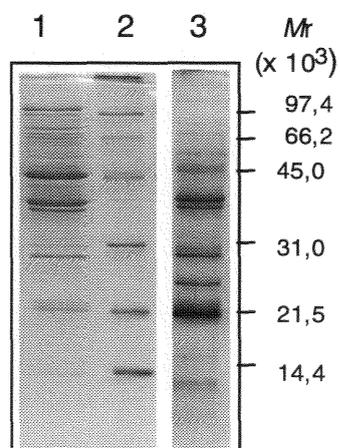


Figure 40. Profil électrophorétique monodimensionnel du mélange des fractions DEAE cellulose n°22-23.

- 1, 2. Coloration au bleu de Coomassie (dépôt de 12 µg)
- 3. Coloration à l'argent (dépôt de 3 µg)
- 1, 3. Fractions 22-23
- 2. Marqueurs de masse moléculaire.

l'argent. Les 20 premiers résidus ont été séquencés (Figure 41A), mais comportent beaucoup d'incertitudes (6 résidus non caractérisés, 4 résidus incertains); l'interrogation des banques de données ne peut pas être concluante. Le nombre important d'incertitudes, peut être dû, à de nombreux facteurs :

a- quantité protéique séquencée insuffisante

- une partie importante des extrémités N-terminales peut être bloquée, la dégradation d'Edman ne peut alors avoir lieu

- peu de protéines sont transférées sur la membrane

b- présence de résidus cystéines qui forment des ponts disulfures (les conditions réductrices lors de la préparation de l'échantillon protéique seraient insuffisante). Il faudrait envisager une réduction-alkylation des résidus cystéines

c- présence de résidus phosphorylés. L'action d'une phosphatase pourrait être envisagée

d- présence de résidus atypiques.

Les étapes de modifications biochimiques (réduction alkylation, action d'une phosphatase) demandent de grandes quantités de protéines, de l'ordre de 5 mg.

3.3.2.2. Transfert à partir d'un gel bidimensionnel

Avant toute autre étape de purification ou de modification de cette protéine, le séquençage N-terminal de la protéine de 21,5 kDa a été de nouveau réalisé à partir du même échantillon protéique mais en partant de la protéine séparée par 2D-PAGE, afin d'être sûr de ne pas séquencer une autre protéine de même masse moléculaire, par exemple une protéine basique qui n'est pas visualisée sur 2D-PAGE. La bande protéique de 21,5 kDa correspond à deux spots protéiques en 2D-PAGE. Les 2 spots protéiques transférés sur PVDF sont microséquencés ensemble. Le résultat obtenu ne présente qu'une seule séquence (Figure 41B). Ce nouveau microséquençage de

A.

(Y)-D-X-I-K-X-X-I-(K)-X-X-V-N-H-Q-A-X-W-(P)-(Y)-
1 5 10 15 20

B.

(S)-D-X-I-K-E-X-I-K-E-X-V-N-
1 5 10

C.

T-D-S-I-K-E-T-I-K-E-T-V-N-H-Q-A-E-W-P-Y-(N)-
1 5 10 15 20

Figure 41. Séquences de l'extrémité N-terminale de la protéine de 21,5 kDa.

A. à partir d'un transfert sur membrane issu d'un gel monodimensionnel du mélange des fractions 22-23

B. à partir d'un transfert sur membrane issu d'un gel bidimensionnel du mélange des fractions 22-23

C. à partir de l'étape de purification HPLC.

13 résidus permet de lever 3 incertitudes, de confirmer un résidu qui se trouvait au préalable incertain (le résidu Lys en 9^{ème} position). Par contre le 1^{er} résidu n'est toujours pas formellement déterminé, ceci étant probablement dû à la propreté de l'échantillon. De plus, une seule séquence N-terminale est détectée lors du microséquençage, ce qui indique que les 2 spots correspondent très probablement à la même protéine. La recherche d'homologie avec cette deuxième séquence dans les banques de données ne donne aucun résultat. Lors des interrogations de banques de données, les résidus non déterminés ont été remplacés par Cys, ou par les résidus qui peuvent être phosphorylés (Ser et Thr). Les nombreuses combinaisons testées n'ont pas permis de trouver une quelconque homologie.

Dans l'objectif de lever les incertitudes, nous avons alors essayé d'obtenir la protéine pure afin de pouvoir faire agir une phosphatase ou de réaliser une réduction-alkylation des résidus Cys potentiels.

3.3.3. Purification par Chromatographie HPLC en phase inverse de la protéine de 21,5 kDa

La fraction 22-23 enrichie en protéine de 21,5 kDa est soumise à une étape supplémentaire de purification par chromatographie HPLC en phase inverse.

Par manque de matériel protéique en quantité importante, seuls des essais d'HPLC analytique en phase inverse ont pu être réalisés sur cette fraction. Le profil chromatographique obtenu est présenté à la figure 42. Toutes les fractions protéiques ont été collectées et contrôlées par 1D-PAGE afin d'établir quelle fraction renferme la protéine de 21,5 kDa. La protéine est visualisée au temps de rétention 47 min (Figure 42A), ce qui correspond à un taux d'acétonitrile de 52% (= fraction 6). Cette fraction sortie d'HPLC, est testée en 1D-PAGE et en 2D-PAGE (Figures 42B et 42C). Les profils électrophorétiques obtenus montrent bien la présence de la

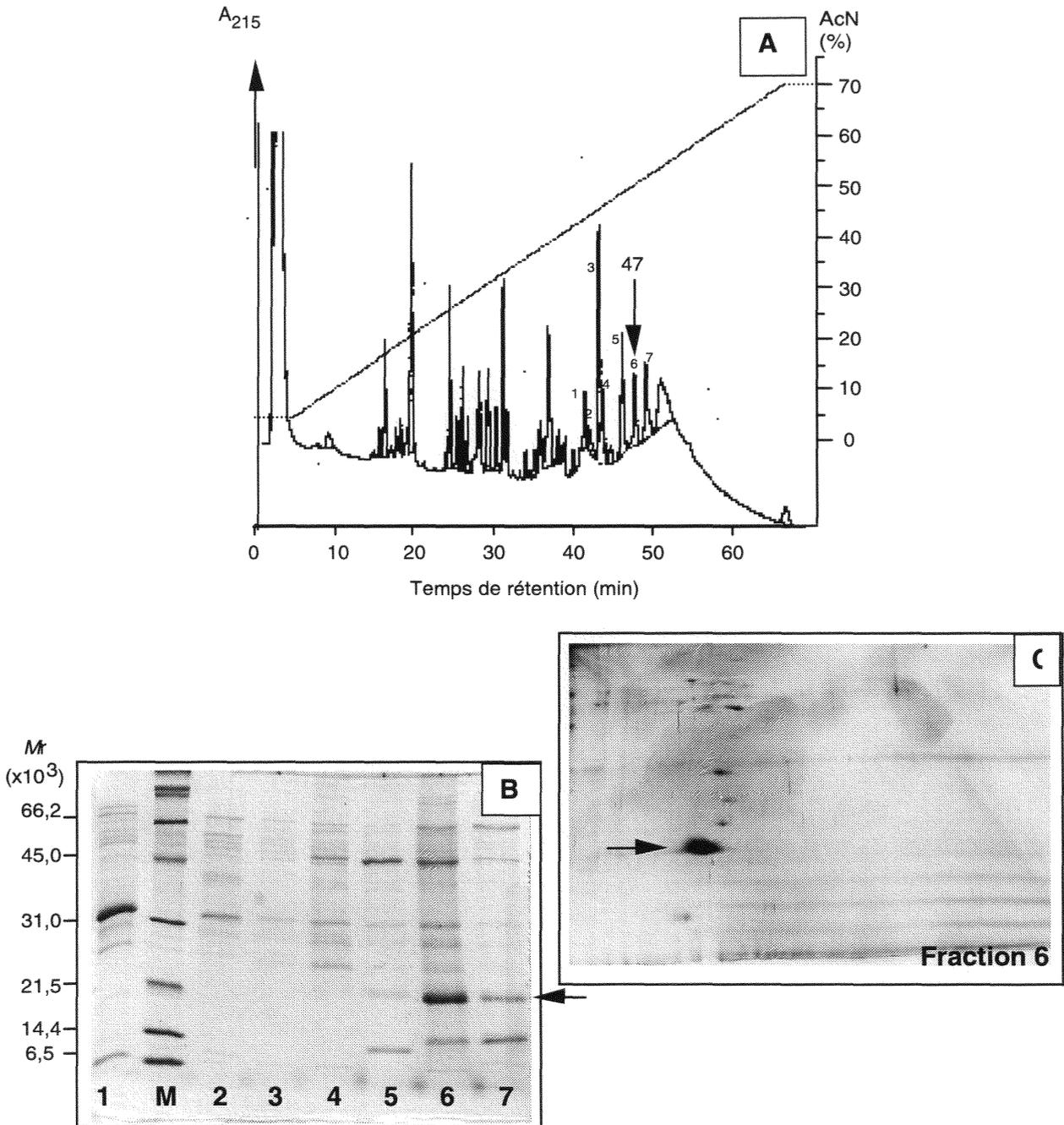


Figure 42. Séparation par HPLC en phase inverse des protéines du mélanges des fractions DEAE 22-23.

A. Chromatogramme HPLC

B. 1D-PAGE des fractions issues de l'HPLC, numérotées de 1 à 7 sur le chromatogramme.

C. 2D-PAGE de la fraction 6 issue de l'HPLC

Les flèches montrent la position de la protéine de 21,5 kDa

..... Gradient d'acétonitrile (AcN)

protéine de 21,5 kDa. D'après l'analyse densitométrique de la piste 6, avec la 1D-PAGE, la protéine de 21,5 kDa colorée au bleu de Coomassie représente 55% des protéines totales. Avec la 2D-PAGE, la protéine de 21,5 kDa colorée à l'argent représente 75% des protéines totales. Une nouvelle fois, le problème des différents modes de coloration est soulevé. Après prélèvement pour réaliser les électrophorèses mono et bidimensionnelle, le reste de cette fraction est adsorbée à la surface d'une membrane PVDF qui est déposée sur le séquenceur. La séquence de l'extrémité N-terminale (21 résidus) obtenue sur ce mélange protéique nous donne une seule séquence (Figure 41C). Les protéines mises en évidence par les gels d'électrophorèses sont en nombre assez important. La concentration relative de chaque protéine contaminante est faible par rapport à la protéine de 21,5 kDa et n'interfère donc pas lors de la détermination de la séquence de l'extrémité N-terminale de celle-ci.

Toutes les incertitudes rencontrées lors des précédents séquençages se trouvent levées, le résidu de l'extrémité N-terminale est un résidu Thr. Il devient donc inutile de vouloir réaliser des modifications biochimiques sur cette protéine. Néanmoins, lors de l'interrogation des banques de données aucune protéine homologue n'a été trouvée. Quand une séquence d'une vingtaine de résidus ne répond à aucune homologie dans les banques de données, la protéine peut être considérée comme inconnue. Il est donc intéressant d'en trouver la séquence totale.

Pour ce faire, deux voies peuvent être envisagées :

- la voie biochimique : purification en masse de la protéine à étudier, suivie de différentes hydrolyses enzymatiques (trypsique, chymotrypsique...), caractérisation des peptides par dégradation d'Edman (1967), par spectrométrie de masse et

recoupement des séquences peptidiques. Toutes ces techniques sont onéreuses et demandent du temps,

- la voie de génétique inverse : une partie de la séquence N-terminale obtenue peut être convertie en séquence nucléotidique (Figure 43). Cette séquence nucléotidique peut alors servir d'amorce pour isoler le gène de la protéine. Cette méthode implique de prévoir l'usage de multiples codons pour déterminer la séquence nucléotidique. Pour contourner cet obstacle, un mélange d'oligonucléotides dérivant de la même séquence protéique peut être utilisé. Cette étape nous confronte au problème posé par la dégénérescence du code génétique. Afin d'augmenter les chances de réussites, nous avons choisi la technique avec deux amorces utilisables dans des expériences de polymérisation en chaîne. Une amorce construite à partir de la séquence N-terminale et l'autre à partir d'une séquence interne, séquence qui restait à définir. Il fallait donc obtenir cette protéine pure pour réaliser une hydrolyse trypsique afin d'isoler au moins un peptide interne.

De nouvelles extractions protéiques ont été réalisées à partir de cellules exposées à un choc froid, précipitées au sulfate d'ammonium, passées sur la colonne de DEAE cellulose. Toutes les fractions comportant la protéine de 21,5 kDa ont été soumises à une HPLC en phase inverse semi-préparative. Au cours de la purification HPLC de cette protéine, nous observons systématiquement une surpression quelques secondes avant la sortie de la protéine de 21,5 kDa, et ce quelque soit le gradient choisi. Si le dépôt de départ est trop important, la surpression est enregistrée dès le démarrage et il y a perte de l'échantillon. Donc, même en condition semi-préparative, nous ne pouvons déposer qu'une faible quantité (2 mg d'échantillon) sous peine de perdre l'échantillon. Les pertes successives d'échantillons et les précipitations partielles de celui-ci au moment de l'ajout de l'acétonitrile nécessitant alors une

```

T-- D-- S-- I-- K-- E-- T-- I-- K-- E-- T-- V-- N-- H-- Q-- A-- E-- W-- P-- Y-- (N)
ACU GAU UCU AUU AAA GAA ACU AUU AAA GAA ACU GUU AAU CAU CAA GCU GAA UGG CCU UAU AAU
--C --C --C --C --G --G --C --C --G --G --C --C --C --C --G --C --G --C --C --C
--A --A
--G --G
AGU
--C
ACN GAY UCN AUH AAR GAR ACN AUH AAR GAR ACN GUN AAU CAY CAR GCN GAR UGG CCN UAY AAY
AGY

```

Séquence nucléotidique pouvant être retenue

Figure 43. Séquences nucléotidiques potentielles de l'extrémité N-terminale de la protéine de 21,5 kDa.

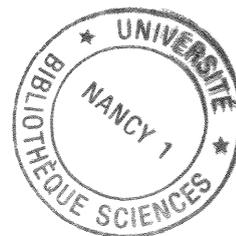
Au niveau de la séquence nucléotidique :

N correspond à U, C, A ou G

R correspond à A ou G

Y correspond à U ou C

H correspond à U, C ou A



filtration, empêchent les calculs de rendement de purification au cours de toutes ces étapes. La surpression observée peut être due à la précipitation de la protéine de 21,5 kDa elle même ou à une protéine qui serait co-purifiée avec elle dans la colonne.

Afin d'améliorer la purification par HPLC, nous aurions pu réaliser une seconde étape en condition isocratique, la composition du solvant choisie étant proche de 52%. Au vu des problèmes de surpression rencontrés lors de la première étape d'HPLC, nous avons préféré la voie de l'hydrolyse *in situ* dans le gel. Après des essais concluants d'hydrolyse *in situ* dans le gel sur la protéine de 16,4 kDa dont le profil tryptique est connu (Gonzalez-Marquez, 1997), les mêmes conditions d'hydrolyses *in situ* dans le gel sur la protéine de 21,5 kDa ont été réalisés. Les produits d'hydrolyse d'une bande protéique ont été séparés par HPLC. Certaines fractions correspondant à un pic d'élution ont été séquencées, mais en vain, les quantités obtenues étant trop faibles. Les spots ou bandes révélés au Zinc (correspondant à la protéine de 21,5 kDa issue de nombreuses étapes HPLC), d'une dizaine de gels ont été découpés et rassemblés pour effectuer une hydrolyse *in situ* dans le gel. Après 16 heures d'hydrolyse, la totalité du surnageant comportant les peptides a été séparée sur HPLC en phase inverse. Dès le début de la collecte des différents peptides, une surpression dans la colonne nous a contraint à tout arrêter, anéantissant des semaines de purification ; la caractérisation d'un peptide interne n'a donc pas encore pu être effectuée.

3.4. Recherche d'une protéine de 7,5 kDa.

3.4.1. Chromatographie en phosphocellulose

En parallèle à l'étude de la protéine de 21,5 kDa, la protéine ubiquitaire du choc froid, à savoir la protéine de 7,5 kDa a été recherchée. Comme nous l'avons vu au

chapitre 2, une protéine de 7,5 kDa est mise en évidence dans les conditions de choc froid à 15 et 20°C.

Lors des différents fractionnements au sulfate d'ammonium, seul le profil électrophorétique monodimensionnel de la fraction 100% de saturation en sulfate d'ammonium révèle des protéines de faible masse moléculaire. Chaque fraction de précipitation au sulfate d'ammonium est testée en 2D-PAGE, mais cette protéine de faible masse moléculaire n'est pas mise en évidence.

Il faut souligner que les profils bidimensionnels obtenus avec les fractions de protéines enrichies sont totalement différents du profil obtenu avec les protéines solubles totales (que ce soit après précipitation au sulfate d'ammonium, DEAE cellulose ou HPLC). Il est difficile de retrouver les protéines majoritaires et donc de retrouver les paramètres de chaque protéine. Nous avons cependant postulé que la protéine de faible masse moléculaire recherchée pouvait se trouver dans la fraction 100% (Figure 37). D'après la littérature, cette protéine de choc froid a des sites de fixation aux acides nucléiques via les domaines RNP1 et RNP2 très conservés (Landsman, 1992). Une chromatographie sur phosphocellulose, résine échangeuse de cations, de la fraction à 100% de saturation en sulfate d'ammonium a donc été réalisée. Cette résine présente des groupements phosphates qui miment grossièrement les phosphates des acides nucléiques. Elle est employée pour isoler les protéines qui se fixent aux acides nucléiques, comme les enzymes de restriction, les protéines qui interviennent dans la structure de l'ADN, dans la transcription, la traduction... Cette résine échangeuse de cations peut aussi être utilisée pour purifier des protéines basiques chargées globalement positivement au pH choisi (5,5).

Les fractions obtenues sont toutes analysées en 1D-PAGE (Figure 44). Les fractions 28 à 34 présentent une bande protéique de forte intensité correspondant à une

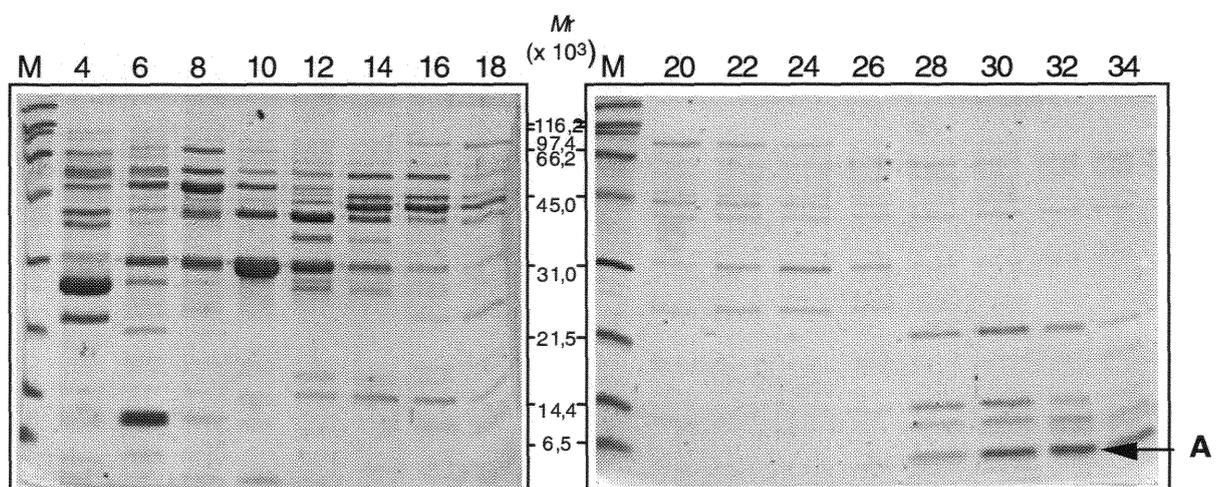


Figure 44. Profils électrophorétiques des fractions protéiques issues de la chromatographie sur phosphocellulose de la fraction 100% de saturation en sulfate d'ammonium (taille réelle, gel de 15% de polyacrylamide, coloration au bleu de Coomassie R250).

A : Protéine microséquencée de la fraction 32.

protéine de faible masse moléculaire. Cependant, aucune protéine de faible masse moléculaire à pH acide n'a été décelée par 2D-PAGE dans la fraction 32. La protéine visualisée en 1D-PAGE à tout de même été séquencée après transfert de protéines sur membrane. La séquence de l'extrémité N-terminale de la bande protéique de faible masse moléculaire indiquée à la figure 44 est donnée à la figure 45.

La séquence obtenue est : ANKQDLIAK VAEATE. Après recherche d'homologie, le logiciel Blast nous donne 100% d'identité avec une protéine appelée "DNA-binding protein HU". Le gène de cette protéine a été entièrement séquencé chez *Sc. thermophilus* (n° d'accession spP96045). Cette protéine fait partie de la famille des protéines "Histone like" procaryotiques, qui sont des protéines de fixation à l'ADN capables de le stabiliser et de prévenir sa dénaturation dans des conditions environnementales extrêmes.

Cette protéine est une protéine basique avec un pI de 9,05 et une masse moléculaire de 9 500. Ces paramètres ont été calculés à l'aide du logiciel accessible sur Internet : "Protparam" à l'adresse suivante <http://www.expasy.ch/www/tools.html>. à partir de la séquence totale du gène sans le résidu Met terminal. Le fait que la protéine soit basique explique l'absence de cette protéine sur le profil bidimensionnel de la fraction 32.

La protéine de faible masse moléculaire visualisée avec la fraction 100%, est donc la protéine HU, et non la protéine ubiquitaire de choc froid.

3.4.2. Chromatographie sur DEAE cellulose

3.4.2.1. Essai de séquençage de la protéine

Lors de la séparation chromatographique sur DEAE cellulose de la fraction 80% de saturation en sulfate d'ammonium, une protéine C de faible masse moléculaire avait été détectée aux pistes 26 et 27. Plusieurs gels bidimensionnels ont été réalisés sur

A

```
Séquence obtenue :      1  ANKQDLIAKVAEATE 15
                        XIIIIIIIIIIIIIIIIII
Séquence homologue :  1  MANKQDLIAKVAEATE 16
```

B

```
1  MANKQDLIAK VAEATELTKK DSAAAVDAVF ASIEEFLAAG EKVQLIGFGN 50
51 FEVRERAARQ GRNPQTGETI SIAASKVPAF KAGKALKDAV K 91
```

Figure 45. Séquence de la bande protéique A obtenue après 1D-PAGE de la fraction 32 sortie de la phosphocellulose

- **A.** alignement de séquence avec la protéine "Hu-like" de *Sc. thermophilus* (numéro d'accèsion dans la banque de données Swiss prot P96045)
- **B.** séquence complète de la protéine "Hu-like" de *Sc. thermophilus*.

cet échantillon. A chaque fois, la présence de cette protéine de faible masse moléculaire est difficile à définir, ceci est dû à la comigration de la protéine avec le front de migration et à la coloration des ampholytes migrés en bas du gel (Figure 46). Un transfert de ces fractions 26-27 séparées en 1D-PAGE a été réalisé sur une membrane PVDF. La quantité protéique de cette protéine de faible masse moléculaire déposée sur le gel avait été estimée à 50 picomoles. Les protéines colorées du marqueur servant de témoin de transfert sont bien retrouvées sur la membrane. Lors de la coloration au bleu de Coomassie G250, aucune bande protéique de faible masse moléculaire n'est colorée ; le découpage se fait alors par rapport au marqueur de faible masse moléculaire. Lors du séquençage, rien n'est détecté. La protéine de faible masse moléculaire n'est donc pas identifiée.

Différentes hypothèses peuvent être énoncées : soit la quantité de protéines déposée est insuffisante, soit la protéine de faible masse moléculaire est perdue lors du transfert entre le gel et la membrane, soit elle peut passer à travers la membrane le temps de transfert étant long, ou bien la totalité des extrémités N-terminales sont bloquées.

3.4.2.2. Etude à l'aide d'un anticorps dirigé contre CapB de *P. fragi*.

La mise en évidence biochimique de la protéine de 7,5 kDa devenant compromise, sa détection immunologique a été entreprise. Le Dr Hébraud nous a aimablement cédé quelques microlitres du sérum contenant les anticorps polyclonaux dont celui dirigé contre la protéine CapB de *P. fragi* (Hébraud *et al.*, 1992 ; Michel *et al.*, 1997) qui est une protéine de choc froid. Ce sérum anti-CapB a été testé sur des protéines solubles totales de *Sc. thermophilus* (soumis à des chocs à 15°C et 20°C durant différents temps) séparées par 1D-PAGE et transférées sur membrane. La figure 47 montre la révélation positive du témoin *P. fragi* cultivé dans les conditions optimales

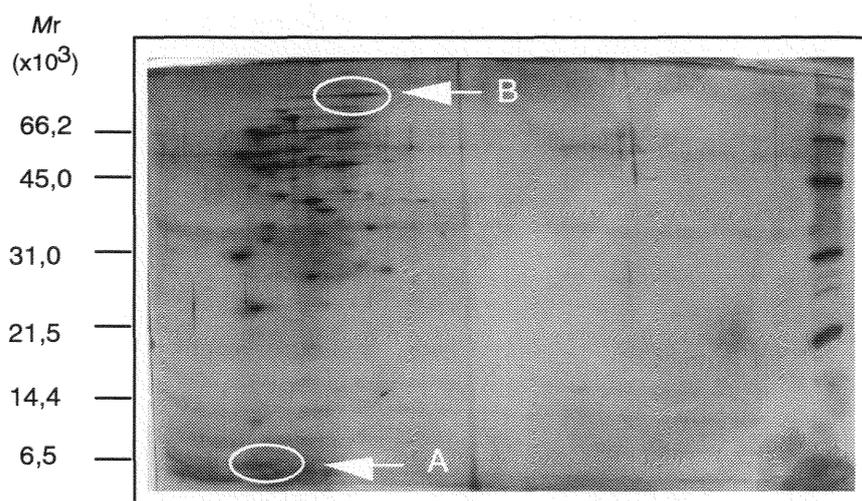


Figure 46. Profil électrophorétique bidimensionnel de la fraction 26 issue de DEAE cellulose.

A. protéine de faible masse moléculaire estimée à 7,5 kDa

B. protéine estimée à 117 kDa

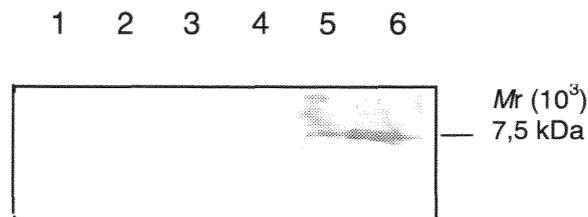


Figure 47. Révélation immunologique avec l'anticorps dirigé contre CapB de *P. fragi*. Les protéines de *Sc. thermophilus* séparées par 1D-PAGE (15% de polyacrylamide) sont transférées sur membrane PVDF et mises en présence du sérum (produit par un lapin) anti-CapB de *P. fragi*, puis d'une solution d'IgG de chèvre anti lapin couplées à la peroxydase. Le complexe antigène-anticorps est révélé avec le DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride).

1. Protéines totales de *Sc thermophilus* PB18 cultivées en condition de choc à 15°C pendant 2 h (40 µg)
2. Protéines totales de *Sc thermophilus* PB18 cultivées en condition de choc à 15°C pendant 4h (40 µg)
3. Protéines totales de *Sc thermophilus* PB18 cultivées en condition de choc à 15°C pendant 20 h (40 µg)
4. Protéines totales de *Sc thermophilus* PB18 cultivées en condition de choc à 20°C pendant 6 h (40 µg)
5. Protéines totales de *P. fragi* K1 cultivées à 4°C (20 µg)
6. Protéines totales de *P. fragi* K1 cultivées à 4°C (40 µg).

d'expression de la protéine, et l'absence de réponse avec les protéines de *Sc. thermophilus* soumises à différentes conditions de choc froid durant des temps différents. Soit la protéine de choc froid n'est pas exprimée chez *Sc. thermophilus* dans ces conditions définies ; soit la quantité protéique dans nos échantillons n'est pas suffisante ; soit l'anticorps n'est pas assez sensible, les sites antigéniques de la protéine de *Sc. thermophilus* étant si différents de la protéine de *P. fragi* que la reconnaissance est impossible.

3.4.2.3. Composition en acides aminés

Afin de s'assurer que la protéine visualisée en 2D-PAGE à la figure 34 du chapitre 2, en condition de choc froid est bien la protéine recherchée, sa composition en acides aminés a été réalisée. Une technique de détermination de la composition en acides aminés *in situ* dans le gel a été mise au point avec l'aide du Service Commun de Séquences des Protéines sur les protéines des marqueurs de masse moléculaire dont la composition en résidus acides aminés est connue, et s'est révélée assez efficace. Cette technique a ensuite été testée sur la protéine de faible masse moléculaire. Les résultats de la composition en acides aminés ne sont pas très rigoureux (Tableau 17), car certains acides aminés ne sont pas pris en compte comme le tryptophane (détruit lors de l'hydrolyse acide), la glycine et la sérine étant quant à elles sur-représentées. Cependant le logiciel "aacomp" (à l'adresse <http://www.expasy.ch/tools/aacomp/aacomp2.html>) auquel la composition en acides aminés, la masse moléculaire et le pI de la protéine sont fournis identifie la protéine comme étant homologue à une protéine de choc froid de *Lc. lactis* et *Lb. plantarum* (Tableau 17).

Tableau 17. Composition en acides aminés de la protéine de 7,5 kDa comparée à celle de *Lc. lactis* et *Lb. plantarum*.

a.a.	<i>Sc. thermophilus</i>	<i>Lc. Lactis</i>				<i>Lb. plantarum</i>			
	% ¹	nb. a.a. ²	% ²	nb. a.a. ¹	% ¹	nb. a.a. ²	% ²	nb. a.a. ¹	% ¹
Ala	7,1	4	6,1	4	7,4	4	6,1%	4	7,5
Arg	7,8	1	1,5	1	1,8	1	1,5	1	1,9
Asn	14	2	3	7	12,9	4	6,1	10	18,8
Asp		5	7,6			6	9,1		
Cys		0	0	0	0	0	0	0	0
Gln	21,4	6	9,1	10	18,5	4	6,1	4	16,9
Glu		4	6,1			5	7,6	5	
Gly	-	8	12,1	-	-	8	12,1	-	-
His	2,8	1	1,5	1	1,8	1	1,5	1	1,9
Ile	5,5	3	4,5	3	5,5	2	3	2	3,8
Leu	10,5	1	1,5	1	1,8	1	1,5	1	1,9
Lys	8,4	6	9,1	6	11,1	5	7,6	5	9,4
Met	0	1	1,5	1	1,8	1	1,5	1	1,9
Phe	5	7	10,6	7	12,9	6	9,1	6	11,3
Pro	4	2	3,0	2	3,7	1	1,5	1	1,9
Ser	-	3	4,5	-	-	3	4,5	-	-
Thr	6,3	6	9,1	6	11,1	5	7,6	5	9,4
Trp	-	1	1,5	-	-	1	1,5	-	-
Tyr	0	0	0	0	0	1	1,5	1	1,9
Val	5,8	5	7,6	5	9,2	6	9,1	6	11,3
		66	100	54	100	65	100	53	100

¹Composition en acides aminés sans prendre en compte les résidus Gly, Ser et Trp

²Composition en acides aminés en prenant en compte tous les résidus

3.4.2.4. Séquençage de la protéine de 7,5 kDa

L'échantillon 26-27 a été séparé en quantité importante (100 µg) par 1D-PAGE afin de tenter à nouveau le séquençage de l'extrémité N-terminale de cette protéine. Après transfert sur membrane de PVDF, aucune bande protéique de faible masse moléculaire colorée au bleu de Coomassie n'est détectée. Le découpage de la membrane se fait à la hauteur du marqueur de faible masse moléculaire coloré en bleu (aprotinine de pancréas bovin de 7,5 kDa). Le séquençage est réalisé et conduit à deux séquences, une majoritaire et une minoritaire :

Séquence majoritaire :

K-N-G-T-V-K-W-F-N-A-E-K-G-F- (G) - (F) - I-T-S- (E) - (D) -
 1 5 10 15 20

Séquence minoritaire :

A-Q-G-T-V-
 1 5

La confrontation de la séquence majoritaire aux banques de données par le biais du logiciel Blast montre que cette protéine est homologue à de nombreuses protéines de choc froid Csp, nous l'appellerons donc CspST. Un nombre limité d'alignement de séquences est mentionné à la figure 48. Les protéines qui ont les pourcentages d'identité les plus élevés sont des protéines de bactéries lactiques, *Lb. plantarum* et *Lc. lactis*.

La séquence minoritaire est confrontée au logiciel Tagident, en entrant la masse moléculaire, le pI et les 6 acides aminés (5 acides aminés séquencés additionnés de la méthionine N-terminale). Une homologie à 100% avec les 6 premiers résidus de la protéine CSP ARTGO (n° d'accèsion swiss prot P54584) de la bactérie *Arthrobacter globiformis* (Berger *et al.*, 1996) est trouvée.

Travail présent												Pourcentage d'identité																
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1	-	-	-	-	K	N	G	T	V	K	W	F	N	A	E	K	G	F	G	F	I	T	S	E	D	21	100%
Littérature																												
<i>Lactobacillus plantarum</i> Csp2	1	-	-	-	M	K	N	G	T	V	K	W	F	N	A	D	K	G	F	G	F	I	T	G	E	D	22	90%
<i>Lactobacillus plantarum</i> Csp1	1	-	-	-	M	K	N	G	T	V	K	W	F	N	A	D	K	G	Y	G	F	I	T	G	E	D	22	85%
<i>Lactococcus lactis</i> CSPD	1	-	-	-	M	A	N	G	T	V	K	W	F	N	A	T	K	G	F	G	F	I	T	S	E	D	22	90%
<i>Staphylococcus aureus</i> CspC	1	-	-	-	M	N	N	G	T	V	K	W	F	N	A	E	K	G	F	G	F	I	E	R	E	D	22	85%
<i>Lactococcus lactis</i> CspB	1	-	-	-	M	T	K	G	T	V	K	W	F	N	P	D	K	G	F	G	F	I	T	S	E	D	22	81%
<i>Arthrobacterium globiformis</i>	1	-	-	-	M	A	Q	G	T	V	K	W	F	N	A	E	K	G	F	G	F	I	T	P	D	D	22	81%
<i>Staphylococcus aureus</i> CspB	1	-	-	-	M	N	N	G	T	V	K	W	F	N	A	E	K	G	F	G	F	I	E	Q	E	N	22	81%
<i>Mycobacterium leprae</i>	1	-	-	-	M	P	Q	G	T	V	K	W	F	N	A	E	K	G	F	G	F	I	A	P	E	D	22	81%
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CspA	1	-	-	-	M	P	Q	G	T	V	K	W	F	N	A	E	K	G	F	G	F	I	A	P	E	D	22	81%
<i>Micrococcus luteus</i>	1	-	-	-	M	A	V	G	T	V	K	W	F	N	A	E	K	G	Y	G	F	I	A	P	E	D	22	76%
<i>Lactococcus lactis</i> cspE	1	-	-	-	M	A	Q	G	T	V	K	W	F	N	A	T	K	G	F	G	F	I	T	T	E	E	22	76%
<i>Lactococcus lactis</i> cspA	1	-	-	-	M	I	N	G	T	V	K	W	F	N	M	D	K	G	Y	G	F	I	I	T	E	D	22	71%
<i>Listeria monocytogenes</i> CspA	1	-	-	-	M	E	Q	G	T	V	K	W	F	N	A	E	K	G	F	G	F	I	E	R	E	N	22	76%
<i>Pseudomonas fragi</i> cspB	1	M	S	Q	R	Q	S	G	T	V	K	W	F	N	D	E	K	G	F	G	F	I	T	P	E	S	25	76%
<i>Bacillus subtilis</i> CspC	1	-	-	-	M	E	Q	G	T	V	K	W	F	N	A	E	K	G	F	G	F	I	E	R	E	N	22	76%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CspA	1	M	S	N	R	Q	N	G	T	V	K	W	F	N	D	A	K	G	F	G	F	I	T	P	E	S	25	76%
<i>Escherichia coli</i> CspG	1	M	S	N	K	M	T	G	L	V	K	W	F	N	A	D	K	G	F	G	F	I	T	P	D	D	25	71%
<i>Salmonella typhimurium</i> CspA	1	M	S	G	K	M	T	G	I	V	K	W	F	N	A	D	K	G	F	G	F	I	T	P	D	D	25	71%
<i>Escherichia coli</i> CspA	1	M	S	G	K	M	T	G	I	V	K	W	F	N	A	D	K	G	F	G	F	I	T	P	D	D	25	71%
<i>Streptomyces clavuligerus</i> Csp7	1	-	-	-	M	A	T	G	T	V	K	W	F	N	A	E	K	G	F	G	F	I	A	Q	D	G	22	71%
Résidus conservés	1	-	-	-	-	-	-	G	-	V	K	W	F	N	-	-	K	G	-	G	F	I	-	-	-	-	11	

Figure 48. Alignements multiples de séquences de l'extrémité N-terminale de protéines de choc froid CspS homologues à la protéine de 7,5 kDa de *Sc. thermophilus*.

3.5. Discussion

De nombreux auteurs mentionnent la présence d'une protéine de 20 à 22 kDa surexprimée chez différentes bactéries en conditions de choc froid, mais sans jamais la caractériser. C'est pourquoi nous avons cherché à la caractériser.

Les différentes étapes de purification de la protéine de 21,5 kDa méritent des améliorations. Lors de l'étape de séparation sur la DEAE cellulose, le tampon acétate de sodium 50 mM pH 5,5 a été employé car il permettait en Batch le meilleur enrichissement. Cependant le rendement de récupération des protéines n'a pas été pris en considération. Lors du dépôt de la fraction issue de la précipitation au sulfate d'ammonium sur la colonne de DEAE cellulose, une partie des protéines précipite, le choix d'un pH proche de la neutralité permettrait peut-être de récupérer une quantité plus importante de protéines. De nombreuses pertes ont été enregistrées lors de la chromatographie HPLC à cause de phénomènes de surpression. En dépit de nombreux essais de gradients d'acétonitrile différents : sans TFA, avec une concentration accrue de TFA, avec ou sans isopropanol... Les étapes d'hydrolyses demandent également à être optimisées. La technique d'électroélution pour récupérer la protéine pure a été essayée mais s'est révélée très inefficace avec un très mauvais rendement. La protéine de 21,5 kDa n'a pas été caractérisée, néanmoins de nombreux paramètres peuvent être obtenus relativement simplement à partir d'un spot bidimensionnel comme la masse moléculaire exacte par spectrométrie de masse et, à partir d'un "blot", la composition en acides aminés. La séquence N-terminale ne donnant aucune homologie avec une protéine connue, nous avons décidé d'isoler un ou des peptide(s) interne(s) à la protéine afin de réinterroger les banques de données. Si aucune homologie n'était alors trouvée,

nous avons envisagé d'isoler le gène à l'aide de deux amorces, une déduite à partir de l'extrémité N-terminale et la deuxième à partir d'une séquence interne. Cette partie du travail reste en suspend. Si, à l'avenir, l'hydrolyse de la protéine de 21,5 kDa n'est toujours pas couronnée de succès, nous pourrions essayer d'isoler le gène seulement grâce à l'amorce réalisée à partir de la séquence N-terminale.

En ce qui concerne la Csp recherchée, soit la fraction 100% de saturation en sulfate d'ammonium (qui renferme la protéine "HU-like") ne comporte pas la Csp, soit la phosphocellulose est mal choisie pour la purifier. Les séquences RNP1 et RNP2 de la protéine de choc froid reconnaissant des séquences bien particulières, telles CCAAT (Jones *et al.*, 1992b ; La Teana *et al.*, 1991 ; Brandi *et al.*, 1994 ; Graumann et Marahiel, 1994 ; Graumann *et al.*, 1997), les groupements phosphates de la résine ne suffisent peut-être pas à fixer cette protéine. Nous avons testé également une DNA cellulose simple brin qui est utilisée pour mettre en évidence les protéines qui se fixent aux acides nucléiques simple brin, mais les différents essais menés sur ce support n'ont rien donné.

La composition en acides aminés de la protéine de 7,5 kDa réalisée directement *in situ* dans le gel, est d'autant moins exacte que la bande protéique hydrolysée contient les deux protéines de même masse moléculaire de 7,5 kDa séquencées. Le fait de trouver deux protéines Csp homologues confirme les travaux réalisés chez de nombreuses bactéries pour lesquelles différents gènes de Csps ont été mis en évidence. Par exemple, chez *E. coli*, une famille de 9 Csps a été identifiée (Yamanaka *et al.*, 1998), le pourcentage d'identité de chaque protéine par rapport à la CspA est répertoriée à la figure 7 de la synthèse bibliographique. La plupart des séquences des protéines homologues Csps ont été déduites de la séquence du gène. Le clonage du gène est réalisé avec deux amorces construites à partir de deux

séquences conservées déduite des différentes séquences de Csps déjà connues (Francis *et al.*, 1997 ; 1998). Pour *Sc. thermophilus* seule une partie interne d'un gène Csp a été ainsi déterminée Kim *et al.* (1998) (Figure 49). Leur séquence et la nôtre se recoupent partiellement (10 derniers résidus de la séquence N-terminale sur les 21 déterminés), nous avons associé ces deux séquences (Figure 49). Avec la construction de ces 61 résidus acides aminés, nous avons à nouveau interrogé les banques de données et représenté les alignements de séquences dans la figure 49. Les protéines ayant le pourcentage d'identité le plus élevé sont encore les protéines de choc froid des bactéries lactiques. Cette protéine de choc froid ne peut être visualisée sur les autoradiographies, car la protéine ne conserve pas le résidu Met de l'extrémité N-terminale. Aucun résidu Met n'est présent dans le reste de la séquence, chez les autres bactéries lactiques pour lesquelles le gène a été entièrement séquencé. La protéine CspST est donc très certainement dépourvue de Met. Le fait que l'anticorps dirigé contre CapB de *P. fragi* ne soit pas spécifique à la Csp de *Sc. thermophilus*, confirme d'après M. Hébraud, les résultats négatifs obtenus sur d'autres espèces à Gram positif testées : *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lb. plantarum*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus* et *Arthrobacter* sp. Des réponses positives ont été décelées chez de nombreuses bactéries à Gram négatif (nombreux *Pseudomonas*, *E. coli* , *Yersinia enterocolitica*). En ce qui concerne les Gram + de faibles réponses positives ont été observées chez *L. monocytogenes* et *Brochothrix thermosphacta* (Hébraud *et al.*, 1993).

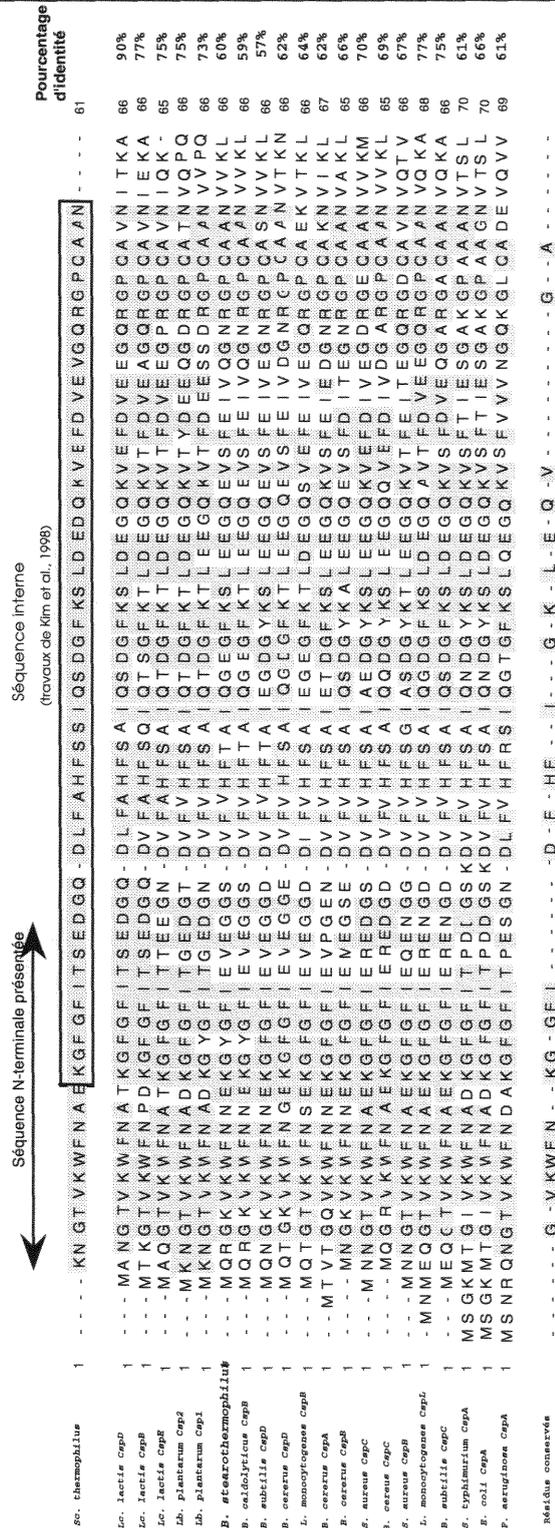


Figure 49. Alignements de la séquence de protéines de choc froid (Csps) homologues à une séquence hypothétique de 61 résidus acides aminé de la protéine de 7,5 kDa.

Cette séquence de 61 résidus est construite avec la séquence N-terminale obtenue lors de cette étude (double flèche), et avec une séquence interne de Csp de *Sc. thermophilus* déterminée par Kim *et al.* (1998).

Chapitre 4. Début de cartographie des protéines totales de *Sc. thermophilus*

Une douzaine de protéines issues de différentes conditions de purification ont été caractérisées par la dégradation d'Edman et localisées par 2D-PAGE (Figure 50). La séquence N-terminale de ces protéines et leurs paramètres pI et Mr déterminés par 2D-PAGE sont mentionnés au tableau 18. Le but de l'identification de plusieurs protéines est de délimiter le contour du profil protéique avec des protéines de Mr et pI précisément connus. Si la localisation de la protéine est intéressante, la caractérisation de celle-ci se fait par le séquençage de l'extrémité N-terminale par la dégradation d'Edman.

4.1. Caractérisation de quelques protéines localisées sur 2D-PAGE

Les fractions protéiques issues de différentes étapes de purifications réalisées lors de ces travaux ou lors de ceux d'Humberto Gonzalez-Marquez (1997) et conservées à -20°C sont testées sur 1D-PAGE, voire sur 2D-PAGE si les fractions contiennent des protéines pures ou très enrichies.

Les protéines retenues ont été soit directement séquencées à partir de la fraction chromatographique protéique, soit transférées sur membrane PVDF pour être ensuite séquencées. L'interrogation des banques de données permet de trouver les protéines homologues à celle de *Sc. thermophilus*. Le tableau 19 mentionne l'organisme pour lequel l'identité est la plus élevée, ainsi que la taille de la protéine homologue, le pourcentage d'identité sur le nombre de résidus séquencés, et le numéro d'accession provenant de différentes banques de données pour retrouver les différents renseignements sur la séquence protéique de la protéine homologue. Si le gène de la protéine homologue à celle de *Sc. thermophilus* est connu, nous utilisons le logiciel Protparam pour trouver les paramètres théoriques pI et Mr de cette

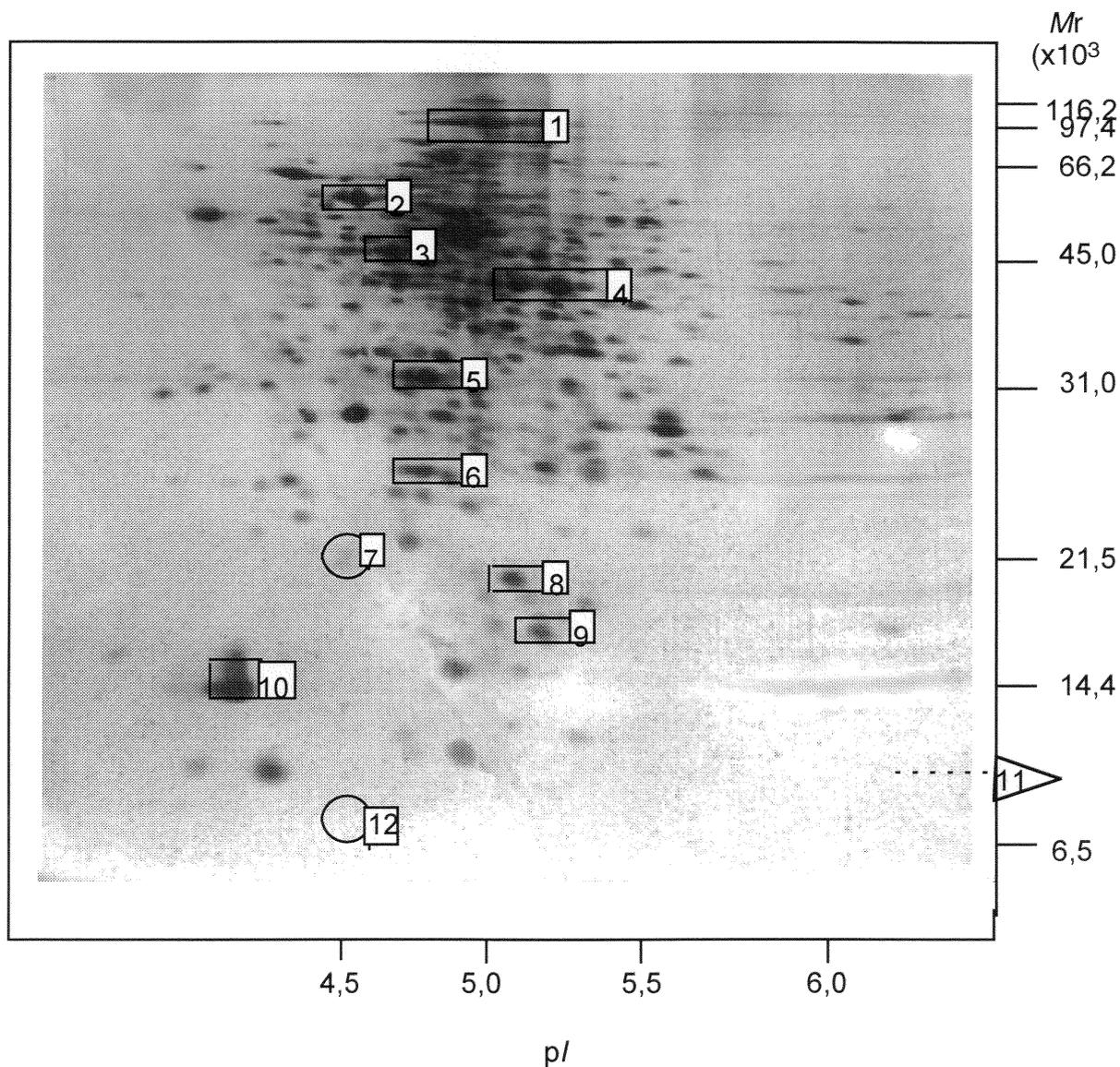


Figure 50. Profil protéique bidimensionnel des protéines solubles totales de *Sc. thermophilus* PB18 cultivées à 42°C. Les spots entourés et numérotés sont les protéines qui ont été séquencées.

Rectangle : protéines exprimées dans les conditions optimales de croissance

Cercle : protéines exprimées dans des conditions de choc froid

Triangle : protéine basique non localisée.

Tableau 18. Séquence N-terminale, et paramètres apparents (pI et Mr) des spots protéiques (1 à 12) obtenus par 2D-PAGE.

N°s ^(a)	Séquence N-terminale	Mr ($\times 10^3$)	pI
1	MNMTEKIQ	117,0	5,2
2	AKDIKFSED	59,6	4,8
3	AKLTVKDVEL KGKKVLVRVD FNVPVK	43,7	4,9
4	VVKVGI	36,4	5,2
5	AIVSAEKVQ AARDNGY	31,4	5,0
6	AILPD	24,5	4,9
7	TDSIKETIKE TVNHQAEWPY (N)	21,5	4,5
8	XEAIIAKKAE QVAIV	20,0	5,3
9	MLNKIQHRNL NTYSVTPFDF FEEFSRNLFN DF	16,8	5,2
10	ALNIENIIAE IKEASILELN DLVKAIEEEF	12,7	4,3
11	ANKQDLIAK VAEATE	8,2	?
12	KNGTVKWFNA EKGFGFITS	7,5	4,5

^(a) numéro du spot sur la figure 50

Tableau 19. Identification, caractéristiques de chaque spot protéique et comparaison des valeurs de *pI* et *Mr* apparents des spots protéiques avec ceux des protéines homologues.

SSPa)	Homologie	Source	Taille ^{b)}	Alignement ^{c)}	% Identité	N° d'accession	<i>pI</i> d)	<i>Mr</i> d)	<i>pI</i> e)	<i>Mr</i> e)
								(x 10 ³)		(x10 ³)
1	β-galactosidase	<i>Streptococcus thermophilus</i> 1026		1-8/1-8	100%	sp: P23989	4,83	117,0	5,2	117,0
2	Chaperonin GroEL	<i>Lactobacillus helveticus</i>	540	1-9/2-10	89%	AF: 031929	5,15	57,6	4,8	59,6
3	Phosphoglycérate kinase	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	403	1-26/2-27	77%	sp: O32756	5,28	42,7	4,9	43,7
4	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	<i>Streptococcus equisimilis</i>	336	1-6/2-7	100%	sp: G59906	5,38	35,8	5,2	36,4
5	Fructose biphosphate aldolase	<i>Streptococcus pneumoniae</i> 293		1-17/2-18	100%	sp: O65944	5,00	31,4	5,0	31,4
6	Superoxyde dismutase	<i>Streptococcus pyogenes</i>	200	1-6/2-7	100%	embi: CAA11227	4,86	22,6	4,9	24,5
7	Inconnue								5,3	20,0
8	Inconnue								4,5	21,5
9	Asp1	<i>Streptococcus thermophilus</i> 142		1-32/1-32	100%	sp: P80485	5,17	16,4	5,2	16,8
10	Ribosomal protein L7/L12	<i>Bacillus subtilis</i>	122	1-30/2-31	83%	pir: R5859	4,56	12,7	4,3	12,7
11	HU like protein	<i>Streptococcus thermophilus</i> 91		1-15/2-16	100%	sp: P96045	9,50	9,5		
12	"Cold shock protein 2b"	<i>plantarum</i>	66	1-21/2-22	90%	P96349	4,33	7,3	4,5	7,5

a) Numéro de spot **b)** Nombre de résidus acides aminés trouvés dans les banques de données
c) Nombre de résidus d'acides aminés séquencés de *thermophilus*/ Nombre de résidus de la protéine homologue.
d) Valeurs de *pI* et *Mr* trouvées dans les banques de données **e)** Valeurs des *pI* et *Mr* apparents estimées à partir de la 2D-PAGE.



protéine afin de les comparer avec les paramètres apparents déterminés par 2D-PAGE pour la protéine de *Sc. thermophilus* (Tableau 19).

4.1.1. Protéines issues de chromatographies réalisées durant le présent travail

La figure 51 présente un schéma récapitulatif des différents pas de purification réalisés lors de ces travaux qui ont permis d'aboutir à la séquence N-terminale de 5 protéines. L'extrémité N-terminale de trois protéines a été déterminée par séquençage (chapitre 3) :

4.1.1.1. Protéine non identifiée de 21,5 kDa

Cette protéine de *pI* apparent 4,5 est localisée au spot n° 7 de la figure 50.

4.1.1.2. La protéine "HU like"

La protéine "HU like" de 9,5 kDa et de *pI* 9,0 n'est pas cartographiée dans l'image de 2D-PAGE de la figure 50 car les protéines basiques n'y sont pas visualisées

4.1.1.3. La protéine de choc froid

La protéine "CspST" de 7,5 kDa et de *pI* apparent 4,5 correspond au spot n°12.

4.1.1.4. La protéine ribosomale L7/L12

Au cours de la purification par HPLC en phase inverse, une protéine de 12,7 kDa et de *pI* 4,3 est éluée juste avant la protéine de 21,5 kDa. Cette protéine a été cartographiée par 2D-PAGE (spot n° 10). La fraction pure de cette protéine a été directement soumise à la dégradation d'Edman qui donne les 30 premiers résidus.

Cette séquence a permis de trouver une homologie avec la protéine ribosomale

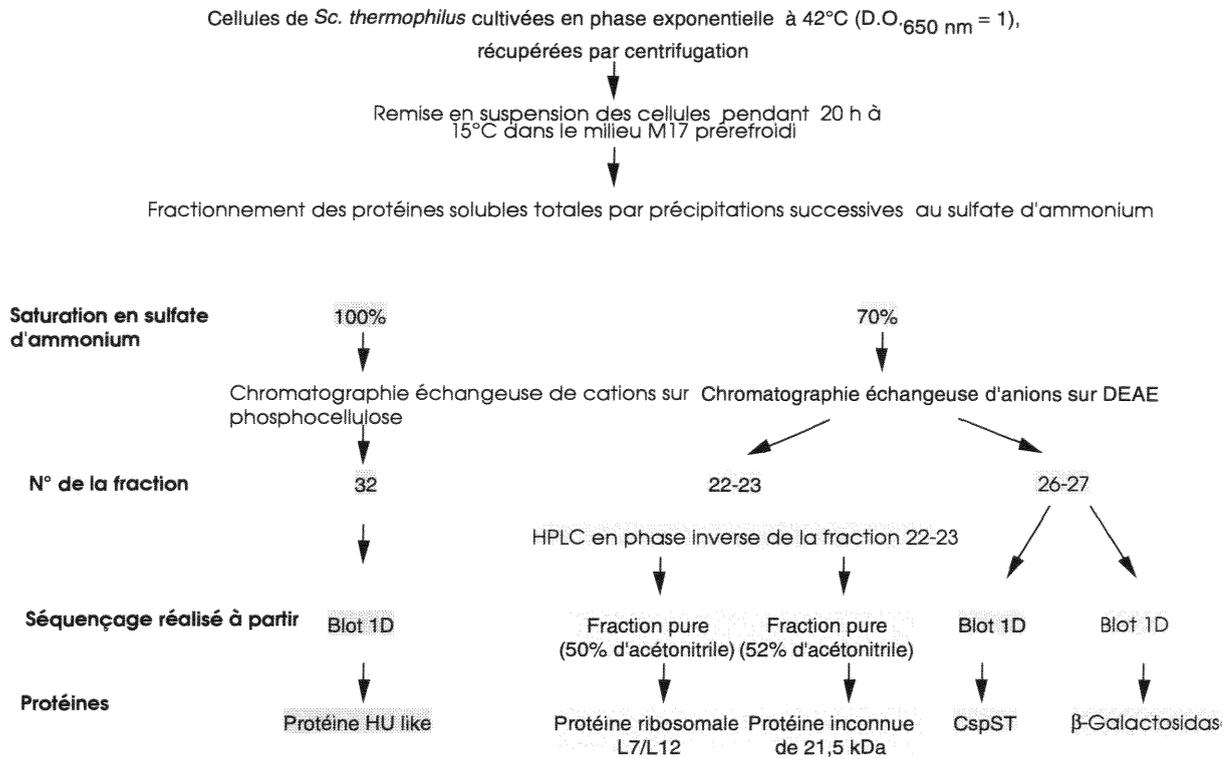


Figure 51. Récapitulatif des différentes étapes de purifications pour obtenir les protéines séquencées à partir des fractions obtenues lors de ces travaux.

L7/L12 de *B. subtilis* dont le gène a été identifié dans sa totalité (Itoh et Wittmann-Liebold, 1978). La séquence N-terminale de 30 résidus acides aminés de *Sc. thermophilus* présente 83% d'identité avec la séquence N-terminale de *B. subtilis* (Tableau 19).

```

1           9           19           30
ALNIENIIA EIKEASILEL NDLVKAIEEE F Sc. thermophilus
| | | | X | | | XX | | | XX | | | | | | | | | |
MALNIEEIIA SVKEATVLEL NDLVKAIEEE F B. subtilis
1           11           21           31

```

Dans les banques de données, une identité parfaite avec les 30 premiers résidus du fragment partiel de 42 résidus de la protéine ribosomale L7/L12 déterminé chez *Sc. pneumoniae* (Kolberg *et al.*, 1997) a été trouvée :

```

1           10           20           30
ALNIENIIAE IKEASILELN DLVKAIEEEF Sc. thermophilus
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
ALNIENIIAE IKEASILELN DLVKAIEEEF GVTAAAPVAV AA Sc. pneumoniae
1           10           20           30           40 42

```

4.1.1.5. La β -galactosidase

Au cours de la purification sur DEAE cellulose une protéine de M_r 117 000 et de pI 5,0 est enrichie dans les fractions 26-27 (Figure 38). Cette protéine a été transférée sur membrane à partir d'une électrophorèse monodimensionnelle et la séquence N-terminale déterminée. Les huit premiers résidus obtenus sont : MNMTEKIQ. La recherche d'homologie révèle une identité parfaite avec l'enzyme β -galactosidase dont le gène a été entièrement séquencé chez *Sc. thermophilus*. (Schroeder *et al.*, 1991). Le spot n°1 de la figure 50 correspond à la β -galactosidase. D'après la séquence intégrale de la protéine, la M_r et pI ont été déterminés respectivement égaux à 117 000 et 4,83.

4.1.2. Protéines isolées à partir de fractions purifiées antérieurement

Certaines fractions issues de chromatographies sur DEAE réalisées par H. Gonzalez-Marquez (1997) afin d'isoler la protéine ASP de 16,4 kDa et stockées à -20°C, ont été testées en 1D-PAGE puis en 2D-PAGE. Les fractions comportant des protéines enrichies ou pures sont sélectionnées. La figure 52 récapitule les différents pas de purifications réalisés pour obtenir le microséquençage N-terminal de 6 protéines. Le profil 1D-PAGE obtenu avec quelques fractions comportant des protéines pures ou très enrichies est présenté à la figure 53. La méthodologie choisie pour la cartographie des protéines est résumée à la figure 54. L'exemple retenu correspond à la cartographie de la fructose-1,6-diphosphate aldolase. L'échantillon est analysé seul en 2D-PAGE puis après avoir été supplémenté avec les protéines solubles totales de *Sc. thermophilus*. Ceci permet de localiser très précisément sa position au sein de la 2D-PAGE. Cette méthodologie a été appliquée à toutes les protéines décrites ci-dessous (sauf pour la protéine ASP).

4.1.2.1. "Acid shock protein"

Au cours de travaux antérieurs, Gonzalez-Marquez *et al.*, (1997) ont déterminé la séquence N-terminale de la protéine spécifique d'une souche PB18 qui est une protéine de choc acide (appelée ASP) de 16,4 kDa. Cette protéine a été ensuite purifiée et entièrement séquencée (Gonzalez-Marquez, 1997) (spot n° 9 de masse moléculaire 16400 et de pI 5,2).

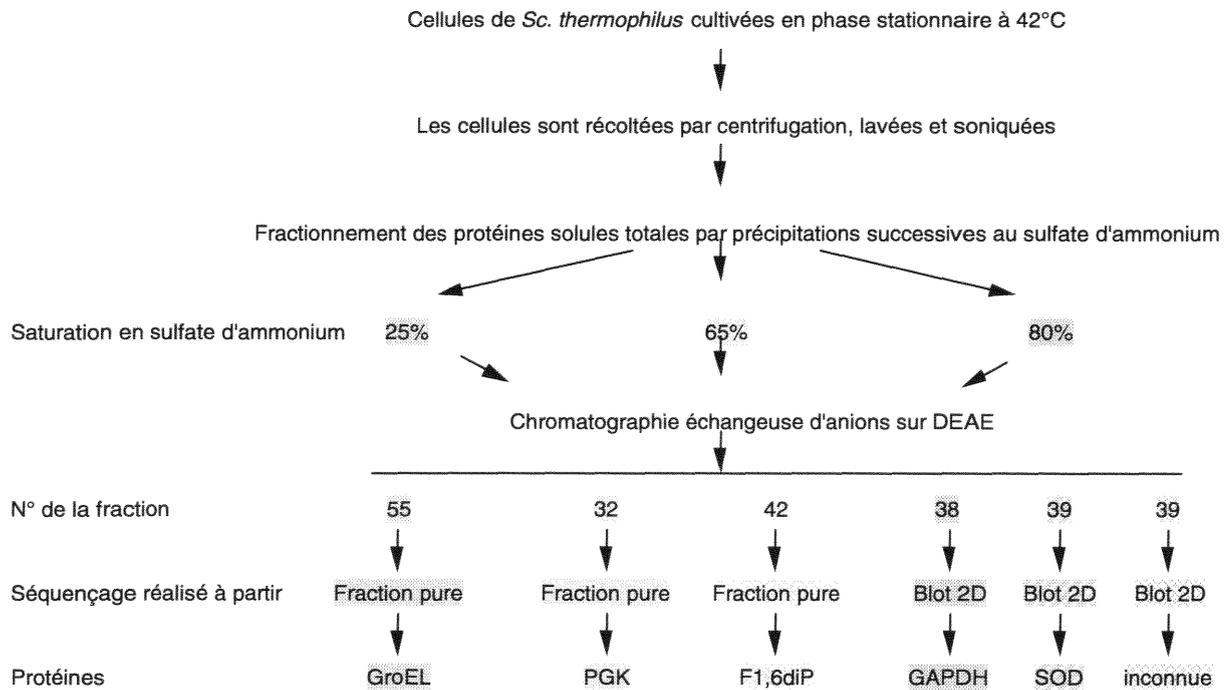


Figure 52. Récapitulatif des différents pas de purification réalisés lors d'un précédent travail (Gonzalez-Marquez, 1997) amenant au microséquençage de 6 protéines.

GroEL : Chaperonin GroEL

PGK phosphoglycérate kinase

F1,6diP : Fructose-1,6-diphosphate

GAPDH : Glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase

SOD : Superoxyde dismutase

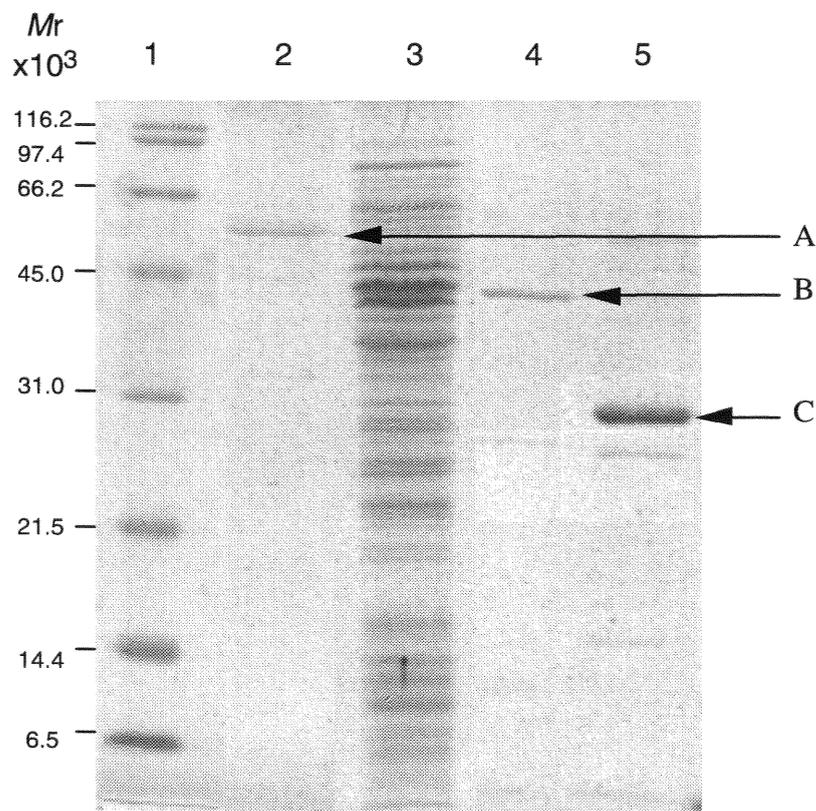


Figure 53. Profil monodimensionnel de fractions issues de chromatographie DEAE cellulose :

1 : Marqueurs de masse moléculaire

3 : Témoin, protéines solubles totales de *Sc. thermophilus* cultivées à 42°C en phase exponentielle de croissance

2, 4 et 5 : Diverses fractions sorties de chromatographie DEAE cellulose contenant une protéine enrichie de *Sc. thermophilus*.

A. Chaperonine GroEL

B. Phosphoglycérate kinase

C. Fructose-1,6-diphosphate aldolase

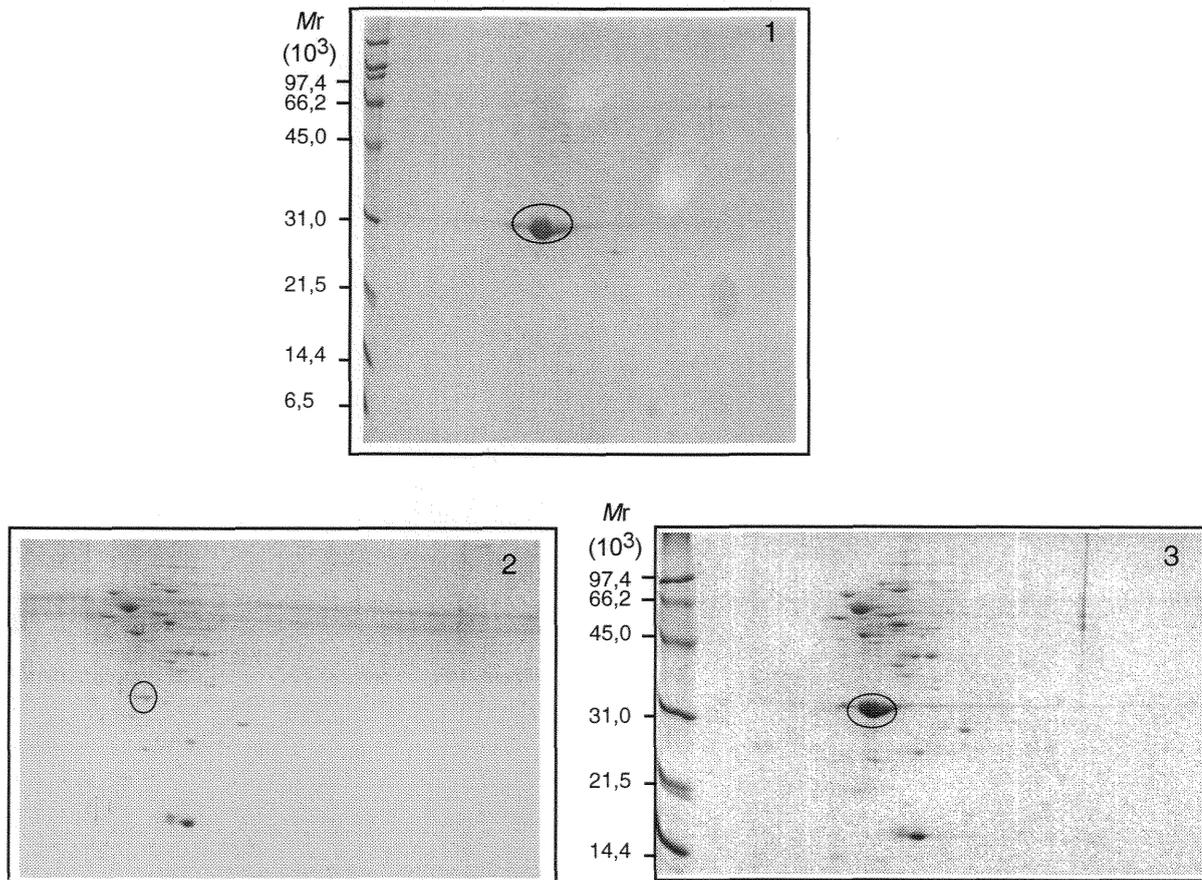


Figure 54. Cartographie de la fructose-1,6-diphosphate aldolase.

Profils électrophorétiques bidimensionnels colorés au bleu de Coomassie

1. Fraction 42 comportant la protéine pure
2. Protéines solubles totales de *Sc. thermophilus*
3. Protéines solubles totales de *Sc. thermophilus* additionnées de la protéine pure.

4.1.2.2. Chaperonine GroEL

Cette protéine de 59,6 kDa et de *pI* 4,8 localisée au spot n°2 de la figure 50 a été séquencée à partir de la fraction 55 DEAE issue de la fraction 25% de saturation en sulfate d'ammonium (Figure 6 du chapitre 2 de la thèse H. Gonzalez-Marquez). Elle a été identifiée comme étant la chaperonine GroEL homologue à 89% sur les 9 premiers résidus avec la protéine GroEL de *Lb helveticus* (Broadbent *et al.*, 1998).

```

1           9
AKDIKFSED Sc. thermophilus
| | | | | | | | X
MAKDIKFSEN Lb helveticus
1           10

```

Chez *Lb. helveticus*, le gène a été entièrement séquencé. Les paramètres *pI* (5,15) et *Mr* (57 600) ont pu être déterminés.

4.1.2.3. La phosphoglycérate kinase

Le spot protéique n°3 de la figure 50 correspond à une protéine de 43,7 kDa et de *pI* 4,9. Les 26 premiers résidus de cette protéine ont été déterminés par séquençage direct de la fraction 32 DEAE provenant de la fraction 65% de saturation en sulfate d'ammonium (Gonzalez-Marquez, 1997). Une homologie de 77% avec la phosphoglycérate kinase de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a été trouvée.

```

1           10           20           26
AKLTVKDVE LKGKKVLVRV DFNVPVK Sc. thermophilus
| | | x | x | | x | x | x | | | | | | | | | | | | | | | |
MAKLIVSDVD VKDKKVLVRV DFNVPIK Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus
1           10           20           27

```

La séquence intégrale de cette protéine est connue (par le biais du gène séquencé et soumis aux banques de données sans être publié par les auteurs Branny *et al.*, 1997. (Branny, P., Delatorre, F. et Garel, J.R. en 1997 au n° d'accession de swissprot O32756). Les paramètres *Mr* (42 700) et *pI* (5,28) ont pu être calculés.

4.1.2.4. La glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogénase

La protéine de 36,4 kDa et de pI 5,2 localisée au spot n°4 est isolée sur un blot d'un spot protéique bidimensionnel à partir de la fraction 38 DEAE issue de la fraction 80% de saturation en sulfate d'ammonium (Gonzalez-Marquez, 1997). Cette protéine est homologue à 100% à la protéine glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase de *Sc. equisimilis*, en ne tenant pas compte de la méthionine en position N-terminale.

```

1      6
VVKVGI Sc. thermophilus
| | | | |
MVVKVGI Sc. equisimilis.
1      7

```

Le gène de cette protéine a été entièrement séquencé (Gase *et al.*, 1996), permettant de déterminer les paramètres suivants $pI=5,38$ et $Mr = 35\ 800$

4.1.2.5. La fructose-1,6-diphosphate aldolase

La protéine pure de la fraction 42 DEAE issue de la fraction 65% de saturation en sulfate d'ammonium donnée comme exemple pour la cartographie de protéines à la figure 53 a été microséquencée directement. Ainsi, les 17 premiers résidus de la fructose-1,6-diphosphate aldolase de *Sc. thermophilus* obtenus sont identiques à 100% à ceux de *Sc. pneumoniae*, en ne tenant pas compte de la méthionine en N-terminale.

```

1      10      17
AIVSAEKFV QAARDNGY Sc. thermophilus
| | | | | | | | | | | | | | |
MAIVSAEKFV QAARDNGY Sc. pneumoniae
1      10      18

```

Les paramètres apparents de cette protéine obtenus par 2D-PAGE (spot n° 5, figure 50) sont de 31,4 kDa et de pI 5,0 chez *Sc. thermophilus*. Les paramètres calculés chez *Sc. pneumoniae* à partir de la séquence protéique intégrale sont de 5,00 pour le pI et de 31 400 pour la Mr . Les auteurs Jado (Jado, I., Casal, J., Fenoll, A. et Perez, A) ont directement soumis la séquence à la banque de données Swissprot au n° d'accession O65944.

4.1.2.6. La superoxyde dismutase

La protéine de 24,5 kDa et de pI 4,9 localisée au spot n°6 est isolée sur un blot d'un spot protéique bidimensionnel à partir de la fraction 39 DEAE issue de la fraction 80% de saturation en sulfate d'ammonium (Gonzalez-Marquez, 1997). Le microséquençage de cette protéine donne les 6 premiers résidus identiques (en faisant abstraction du résidu Met) à la superoxyde dismutase de *Sc. agalactiae*, (Gerlach *et al.*, 1998) qui a pour paramètres la masse moléculaire *Mr* 22 600 et le pI 4,86.

1	6	
AIILPD		<i>Sc. thermophilus</i>
MAIILPD		<i>Sc agalactiae</i>
1	7	

4.1.2.7. Protéine inconnue

La protéine de 20,0 kDa et de pI 5,3 localisée au spot n°8 qui est isolée sur un blot d'un spot protéique bidimensionnel à partir de la fraction 39 DEAE issue de la fraction 80% de saturation en sulfate d'ammonium ne montre aucune homologie avec les protéines des banques de données. Cette protéine a pour séquence N-terminale : XEAIIAKKAEQVAIV

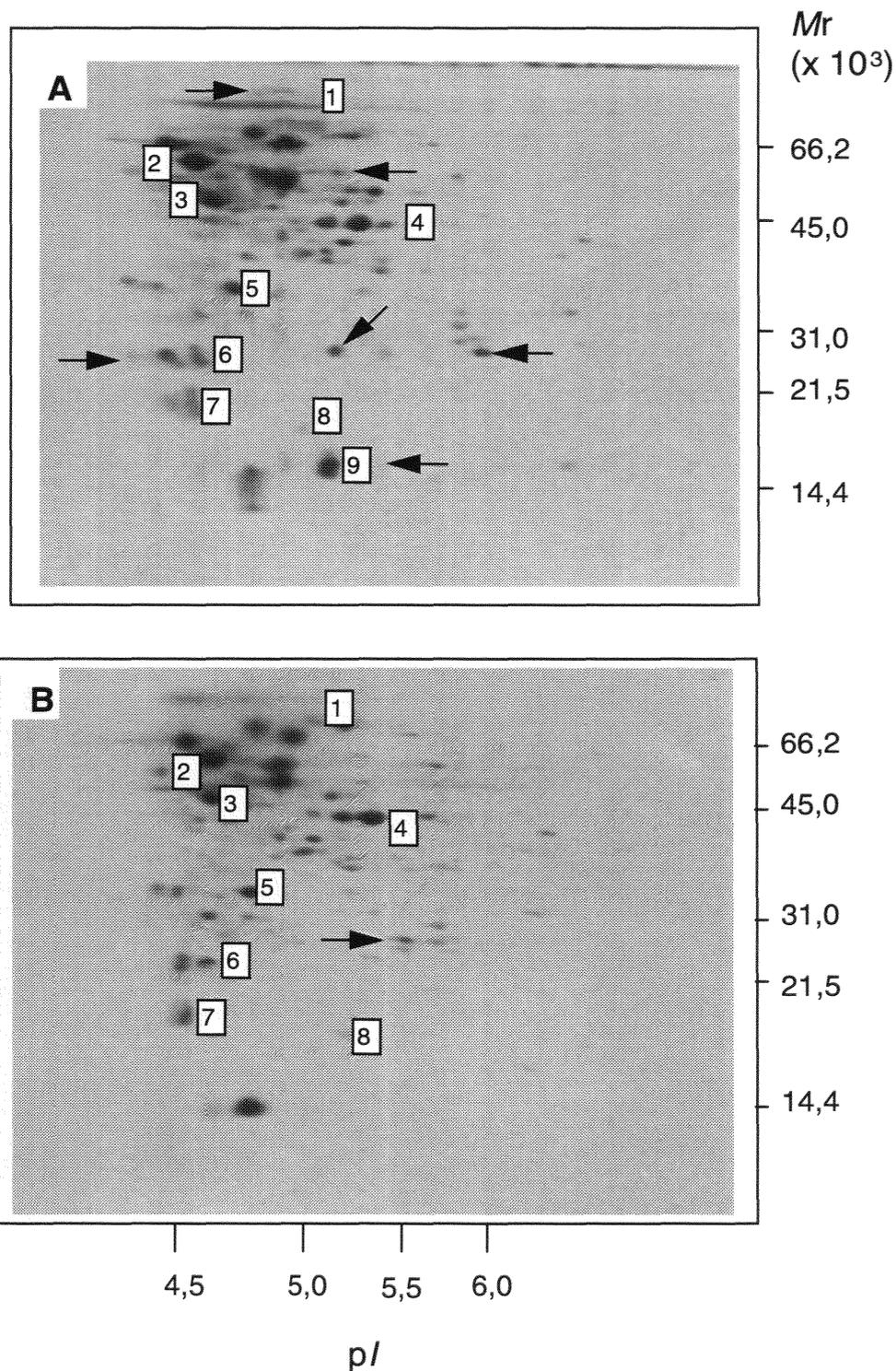
Les protéines séquencées sont des protéines majoritaires pouvant servir de marqueurs internes à l'espèce *Sc. thermophilus*. D'après le tableau 19, la comparaison des paramètres des protéines homologues aux protéines séquencées de *Sc. thermophilus* sont relativement proches des paramètres obtenus par 2D-PAGE.

4.2. Application : comparaison des autoradiographies de profils protéiques bidimensionnels de deux souches de *Sc. thermophilus* PB18 et Y105

Les protéines séquencées et caractérisées peuvent-elle être utilisées comme protéines marqueurs lors d'une autoradiographie ? Les protéines solubles totales sont préparées à partir de cellules cultivées en phase exponentielle de croissance à 42°C pendant 20 min en présence de [³⁵S]-méthionine. Les protéines majoritaires synthétisées pendant ce laps de temps par les deux souches sont analysées par 2D-PAGE. Pour l'analyse comparative des deux souches de *Sc. thermophilus* PB18 et Y105, les spots des 2 autoradiographies sont appariés deux à deux et aucune différence importante entre les souches n'est détectée. Parmi les protéines de la souche *Sc. thermophilus* PB18 séquencées et cartographiées sur les 2D-PAGE colorés à l'argent, 9 sont détectées par autoradiographie pour PB18 et 8 avec Y105. Le spot n°9 qui correspond à la protéine ASP est seulement présente chez la souche PB18. D'autres spots mineurs dont les protéines n'ont pas encore été identifiées, semblent spécifiques de l'une ou l'autre des souches (Flèches noires à la figure 55).

4.3. Discussion

Avec la technique d'électrophorèse bidimensionnelle utilisée, les valeurs du gradient de pH (4,2-6,8) dans l'étape d'IEF ne permettent pas de visualiser les protéines basiques comme la protéine HU-like. Le pourcentage d'acrylamide de 15% ne permet de séparer que les protéines comprises entre 120 et 6 kDa. Parmi les 12 protéines séquencées, 10 sont dépourvues du premier résidu méthionine, ce qui est comparable aux résultats obtenus chez *Thermus thermophilus* (Kawaguchi et Karamitsu, 1995) où seulement 4 protéines sur les 22 séquencées conservent le premier résidu Met N-terminal. Dans les banques de données, la quasi totalité des



° **Figure 55.** Comparaison d'autoradiographies (2D-PAGE) de *Sc. thermophilus* Y105 et PB18, cultivées dans les mêmes conditions (protéines marquées pendant 20 min à 42°C). Les protéines ancres sont indiquées, les flèches noires montrent les protéines spécifiques de chaque souche.

séquences protéiques est déduite du gène, donc le premier résidu Met se trouve mentionné. Seule l'identification d'un fragment partiel de l'extrémité N-terminale permet de savoir si le premier résidu est présent ou non. Le pI d'une protéine est inchangé en présence ou en absence de la méthionine, seule sa masse moléculaire est modifiée.

Parmi les 12 protéines séquencées, il y a 5 enzymes (β -galactosidase, phosphoglycérate kinase, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, superoxyde dismutase, fructose-1,6-diphosphate aldolase), 3 protéines de stress (chaperonine GroEL, "Acid shock protein", "Cold shock protein"), une protéine de structure (HU-like protein) et une protéine ribosomale (protéine ribosomale L7/L12). Toutes ces protéines jouent un rôle majeur et doivent être assez conservées au cours de l'évolution. Lors de la recherche d'homologie, la plupart des séquences protéiques de *Sc. thermophilus* présente la plus forte identité avec des séquences protéiques de bactéries lactiques.

Sur les 10 protéines caractérisées, les séquences N-terminales de 9 protéines sont homologues à des protéines de bactéries lactiques dont la séquence complète est connue :

- 6 protéines sont issues de *Streptocoques*

- *Sc. thermophilus* pour 3 d'entre elles (β -galactosidase, Asp, protéine "Hu like")
- *Sc. equisimilis* pour la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
- *Sc. pneumoniae* pour la fructose-1,6-diphosphate aldolase
- *Sc. pyogenes* pour la superoxyde dismutase

- 3 sont issues des *Lactobacilles*

- la chaperonine GroEL de *Lb. helveticus*
- la phosphoglycérate kinase de *Lb. delbrueckii*

- la Csp2 de *Lb. plantarum*

La protéine ribosomale L7/L12 de *Sc. thermophilus* est la seule protéine qui n'a pas d'homologie avec une protéine de bactérie lactique dont la séquence est entièrement connue. Néanmoins une séquence partielle de cette protéine chez *Sc. pneumoniae* a été trouvée dans les banques de données mais ne permet pas d'obtenir le *pI* et *Mr* théorique. Ces paramètres ont été calculés avec la séquence complète de la protéine L7/L12 de *B. subtilis*. Les protéines ribosomales sont des protéines très conservées au cours de l'évolution, ce qui peut expliquer que les paramètres obtenus pour la protéine L7/L12 de *B. subtilis* soient proches des paramètres apparents de *Sc. thermophilus*.

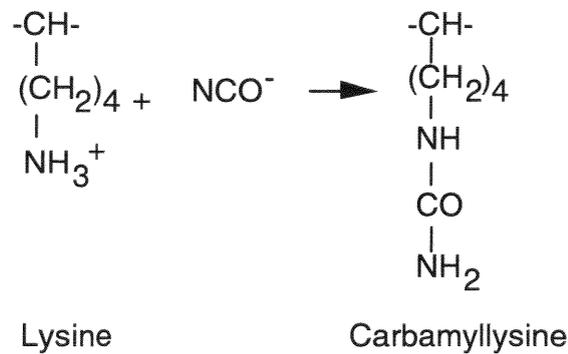
Les différences enregistrées entre les *pI* apparents et les *pI* théoriques, sont dues :

- à des divergences de séquence (un acide aminé basique remplacé par un acide aminé acide engendre des modifications de *pI*, sans trop modifier la masse moléculaire). Ce n'est pas le cas pour la β -galactosidase dont la séquence est connue chez *Sc. thermophilus*,
- à des modifications post-traductionnelles telle que la phosphorylation,
- à la préparation de l'échantillon protéique. Lorsque de l'urée est utilisée, la solution contient toujours des ions cyanates produits spontanément selon la réaction :



Les ions cyanates sont susceptibles de réagir avec les groupements NH_2 libres des protéines (lysine, arginine et NH_2 de l'extrémité N-terminale) ainsi qu'avec les groupements $-\text{SH}$ au niveau des résidus cystéyles (plus faiblement) (Stark *et al.*, 1960). Le bilan de ces réactions est une carbamylation de ces groupements $-\text{SH}$ ou

NH₂ libres entraînant un changement de la charge des protéines donc des valeurs de *pI*. Ces modifications peuvent également empêcher la dégradation d'Edman en bloquant l'extrémité N-terminale.



Pour minimiser ces réactions, les solutions doivent être fraîchement préparées, conservées au froid, et lors de la focalisation la température doit rester basse (elle ne doit pas excéder 37°C).

Parmi les protéines qui ont été séquencées, les protéines basiques sont sous-représentées, car les conditions de purifications avec la chromatographie échangeuse d'anions (DEAE) privilégie la mise en évidence de protéines acides. Les fractions issues de la phosphocellulose (chromatographie échangeuse de cations) pourrait permettre de localiser d'autres protéines basiques que la protéine "Hu-like". Les protéines choisies sont néanmoins les protéines majoritaires retrouvées pour la plupart en coloration au bleu de Coomassie et en autoradiographie.

La protéine HU-like qui ne peut pas être utilisée pour la cartographie dans nos conditions de gradient d'ampholytes, peut devenir un marqueur intéressant lors de futures analyses de 2D-PAGE des protéines basiques de *Sc. thermophilus*.

Les protéines caractérisées et exprimées dans des conditions variées (spots n°1, 2, 3, 4, 5, 6, 10) peuvent être utilisées comme marqueurs internes de *pI* et *Mr* pour

l'analyse de 2D-PAGE. Après appariement des spots protéiques des autoradiographies, 87% de ces spots sont communs aux deux souches. Parmi les spots visualisés, 6 protéines caractérisées (spots n°1, 2, 3, 4, 5, 6) sont communes aux deux souches et peuvent être utilisées comme marqueurs internes de *pI* et *Mr* dans les études de marquage avec [³⁵S]-Met pour l'espèce *Sc. thermophilus*.

La protéine ASP a été rencontrée seulement chez PB18. Les profils monodimensionnels d'autres souches : CNRZ 404, CNRZ 455, CNRZ 21, CNRZ 160, ATCC 19258, CNRZ 445, CNRZ 7, CNRZ 391 et 4F44 ne révèlent pas la présence de cette protéine. D'autres équipes (Somkuti et Steinberg, 1999 ; O'Sullivan *et al.*, 1999) ont montré la présence du gène ASP porté par un plasmide chez d'autres souches de *Sc. thermophilus* mais nous ignorons si cette protéine est exprimée.

La protéine L7/L12 (spot n°10) n'est pas visualisée dans nos conditions de marquage radioactif. La séquence entière de *B. subtilis* ne comporte qu'un résidu Met en N-terminal. Chez *Sc. thermophilus*, l'extrémité N-terminale est dépourvue du premier résidu Met. Le reste de la protéine peut ne pas contenir de Met comme chez *B. subtilis*, et donc ne pas être visualisable dans ces conditions de marquage.

Les autoradiographies réalisées à partir de protéines marquées dans des conditions de choc froid (Figure 35) ne révélaient pas la protéine de choc froid CspST. Cette protéine ne contient pas de résidus Met dans la construction des 61 résidus (Figure 12). De plus, la totalité de la séquence de la protéine Csp2 de *Lb. plantarum* (Mayo *et al.*, 1997) ne contenant qu'un seul résidu Met en position N-terminale, il est possible que cette protéine de 7,5 kDa ne puisse pas être visualisée dans nos conditions de marquage. De nombreuses protéines sont donc dépourvues de méthionine en position N-terminale, alors que nous avons choisi le marquage au

[³⁵S-Met] en pensant que les protéines conservaient majoritairement ce résidu. Les autres types de marquage au ¹⁴C et ³H peuvent être utilisés, mais demandant des temps d'expositions des gels beaucoup plus importants, le double marquage [³⁵S-Met] et [³⁵S-Cys] semblerait donc le plus approprié.

V. Conclusions et Perspectives

L'étude de la réponse au choc froid, relativement récente chez *E. coli* (Jones *et al.*, 1987), a aussi été menée depuis quelques années chez diverses bactéries. Le changement de l'expression des gènes en réponse à une diminution de température semble universel. Une protéine de faible masse moléculaire appelée "cold shock protein" ou "Csp" a été notamment mise en évidence chez de nombreuses bactéries aussi bien à Gram positif qu'à Gram négatif (Francis et Kim, 1997). Cette protéine est surexprimée lors du choc froid, mais pour certaines bactéries comme *E. coli* c'est toute une famille de Csp qui a été détectée. Toutes les protéines membres de cette famille ne sont pas cependant exprimées en conditions de choc froid (Phadtare, 1999).

Notre étude a porté sur la réponse au choc froid de deux souches de *Sc. thermophilus*, au niveau physiologique et biochimique. La réponse physiologique met en évidence une réponse identique des deux souches avec absence d'un temps de latence après un choc froid. Dans notre cas, le choc froid est réalisé par un passage de la température de 42°C à la température basse de 15 ou 20°C (20°C étant la limite de développement de cette bactérie, de Roissart et Luquet, 1994).

Sc. thermophilus est une bactérie lactique qui excrète de l'acide lactique avec baisse du pH. Il semble d'après cette étude préliminaire qu'à température basse, l'acidité a une incidence sur la croissance. En effet, à 15°C une faible croissance est décelée (temps de génération de 30 h) à condition que les cellules se trouvent dans un milieu dépourvu de toute acidité. Des suivis de croissance à pH régulé pour maintenir un pH proche de la neutralité peuvent être envisagés. Pour éliminer le lactate au cours de la croissance, le milieu de culture peut subir une dialyse en continu. Des cultures en condition de températures basses effectuées à pH régulé ou non, et/ou en éliminant le lactate, permettraient de réaliser une étude physiologique sur l'incidence

de stress multiples combinant l'acidité et le froid. Lorsque, la température est abaissée à 20°C, le temps de génération est de 8h, et à cette température, contrairement à 15°C, l'acidité ne semble pas avoir d'incidence sur la croissance. La très faible croissance mesurée à 15°C par turbidimétrie du milieu de culture n'a pu être corrélée avec des numérations sur boîte. Il serait nécessaire de vérifier si l'augmentation de la turbidité est réellement due à la division cellulaire, et non pas à un autre phénomène comme le gonflement des cellules.

En parallèle de l'étude physiologique, l'expression protéique de *Sc. thermophilus* à faible température a été étudiée par gels d'électrophorèses monodimensionnels et bidimensionnels. Parmi les protéines exprimées dans les conditions de choc froid, deux protéines ont été étudiées. L'extrémité N-terminale de 21 résidus acides aminés d'une protéine de 21,5 kDa n'a aucune homologie avec les protéines et gènes répertoriés dans les banques de données ; cette protéine n'a donc pu être identifiée. La purification de cette protéine en trois étapes (fractionnement par précipitation au sulfate d'ammonium, séparation sur résine échangeuse d'anion (DEAE cellulose), et une étape d'HPLC en phase inverse nous a permis de l'obtenir à un degré de pureté proche de 75%. Les différentes étapes ayant un faible rendement, afin de ne pas rajouter d'étape de purification supplémentaire, une hydrolyse de cette protéine *in situ* dans le gel a été tentée. Un incident technique lors de la séparation HPLC des peptides n'a pas permis d'isoler un fragment interne de la protéine recherchée en vue de réaliser un clonage du gène de cette protéine par la méthode des doubles amorces. Toute cette partie du travail, qui n'a pu être menée à bien, reste donc en suspend. La connaissance du gène s'avèrerait très intéressante car elle permettrait d'une part d'identifier la protéine (si une homologie est trouvée dans les banques de

données) et d'autre part d'étudier la régulation fine de son expression. Les profils protéiques bidimensionnels des protéines solubles totales des bactéries qui auraient subi les chocs croisés (froid et acide avec élimination ou pas du lactate) pourront être comparés à ceux des profils obtenus à partir de protéines de cellules cultivées dans des conditions optimales de croissance. Ainsi cette étude permettrait de confirmer si la protéine de 21,5 kDa est une protéine de réponse uniquement de choc froid ou commune au choc acide et froid. Souvent les protéines de choc sont des protéines qui entrent dans des cascades de régulations et peuvent être donc synthétisées au moment de stress environnementaux différents. De plus, les cartes bidimensionnelles protéiques offrent l'opportunité d'étudier les modifications post-traductionnelles. Ainsi une même protéine peut présenter plusieurs spots dus à une microhétérogénéité de structure due à d'éventuelles modifications post-traductionnelles. Durant ce travail, une révélation spécifique des phosphoprotéines au vert de méthyle a été testée (Cutting, 1984). Néanmoins, cette technique s'est montrée peu sensible dans notre étude. La phosphorylation des protéines de *Sc. thermophilus* pourra être étudiée en mettant en jeu un marquage au ^{32}P ou ^{33}P , ou en utilisant des anticorps anti-phosphosérine ou anti-phosphothréonine. La protéine de 21,5 kDa présente deux spots protéiques dans les gels d'électrophorèses bidimensionnelles, et si ces spots protéiques s'avèrent être deux variants de phosphorylation, l'intérêt de l'identification de cette protéine serait renforcé car bien souvent les phosphoprotéines entrent en jeu dans des régulations cellulaires. Pour connaître cette protéine, il faut donc envisager le clonage du gène. Si la méthode des doubles amorces est la méthode la plus recommandée, il reste à réaliser à nouveau l'hydrolyse trypsique sur la protéine pure pour obtenir la séquence d'un fragment interne. Il faudra améliorer chaque pas de purification, afin

d'augmenter les rendements. La première étape de fractionnement au sulfate d'ammonium ne doit pas être remise en cause car elle engendre peu de pertes ; la protéine de 21,5 kDa se retrouve enrichie dans la fraction à 70-80% de saturation en sulfate d'ammonium. Le choix du tampon acétate 50 mM pH5,5 lors de la chromatographie sur résine échangeuse d'anions permet d'obtenir le meilleur enrichissement par comparaison aux autres tampons testés en " Batch" : Tris-HCl pH7,5 et MES pH6,1 ; cependant le rendement est faible. Les autres tampons pourraient être testés sur colonne afin de contrôler les résultats obtenus en Batch.

Lors de l'HPLC phase inverse, une surpression est observée juste avant que la protéine de 21,5 kDa ne sorte ce qui entraîne bien souvent la perte de l'échantillon. Il serait nécessaire de tester d'autres gradients, voire d'autres phases organiques ou d'autres phases inverses pour éluer cette protéine.

L'autre protéine mise en évidence est une protéine de 7,5 kDa dont l'extrémité N-terminale présente une forte homologie avec les Csps exprimées dans des conditions de basses températures chez de nombreuses bactéries. Chez *Sc. thermophilus*, cette protéine qui est exprimée à 15 et à 20°C a été nommée CspST. La séquence totale de cette protéine reste à être déterminée, tout comme la régulation fine du gène. Lors du marquage radioactif à la [³⁵S-Met] cette protéine n'a pas été révélée. La protéine semble donc être dépourvue de tout résidu méthionine. Pour mettre en évidence l'expression de cette protéine à l'aide d'acides aminés radio-marqués, le choix du radioélément sera donc primordial. Il est à noter que sur 12 séquences N-terminales déterminées lors de nos travaux, 10 protéines ne possèdent plus le résidu acide aminé Met en N-terminal, alors que le choix de la [³⁵S-Met] comme acide aminé marqué reposait au départ sur l'hypothèse que la bactérie conservait ce résidu.

Lors de la détermination de la séquence N-terminale de cette protéine, une autre protéine de même masse moléculaire de 7,5 kDa a été séquencée. La séquence correspond à une protéine homologue à la Csp d'*Arthrobacter globiformis*, ce qui nous permet d'envisager la présence d'une famille de Csp comme décrite chez de nombreuses bactéries. Une analyse plus approfondie est donc nécessaire pour savoir s'il existe plusieurs Csp chez *Sc. thermophilus* et ensuite, savoir si ces gènes *csp* sont tous induits par le froid.

Au sein de l'équipe, dans un premier temps, la cartographie de quelques souches de *Sc. thermophilus* a été réalisée et un profil type de *Sc. thermophilus* a été proposé. La connaissance de la totalité du génome de *Sc. thermophilus* nous ayant été annoncée comme faisant partie des ambitions actuelles de certaines équipes, le projet du protéome de *Sc. thermophilus* a été initialisé. En effet, nous comptons nous appuyer sur ces données génomiques et sur les travaux réalisés sur la levure (Maillet *et al.*, 1996) pour identifier rapidement un maximum de protéines séparées par électrophorèse bidimensionnelle chez *Sc. thermophilus*. L'équipe de Maillet *et al.* (1996) qui travaille sur la levure dont la totalité du génome est connue, a mis en place une stratégie de double marquage radioactif des protéines en choisissant deux isotopes différents (^3H et ^{14}C ou ^{35}S). Pour commencer, ils ont testé leur méthode sur des spots protéiques identifiés par microséquençage, en comparant pour ces protéines les deux rapports d'acides aminés :

- le rapport théorique des acides aminés (dédduit de la séquence du gène)
- et le rapport d'acides aminés marqués $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ ou $^{35}\text{S}/^3\text{H}$ obtenus expérimentalement (par comptage des deux isotopes dans le spot). Les résultats obtenus étant satisfaisants avec les protéines connues, cette technique a été appliquée ensuite à des spots protéiques non encore caractérisés. Avec les valeurs de pI , de M_r et le

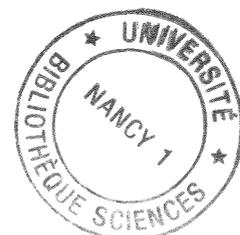
rapport en acides aminés marqués du spot protéique, une recherche à travers les banques de données est effectuée et comme dans le cas de la levure tous les gènes sont connus, l'identification de la protéine est directement obtenue. Dans notre cas, dans un premier temps, ce travail va pouvoir être réalisé sur les protéines dont la séquence est entièrement connue comme la protéine Asp1 et la β -galactosidase qui peuvent servir de standards. Néanmoins de nombreuses embûches doivent être contournées : le choix des acides aminés marqués, le choix du milieu qui doit être chimiquement défini, sachant que *Sc. thermophilus* est une bactérie exigeante en de nombreux facteurs (acides aminés, vitamines...), ce qui complique l'utilisation d'un milieu minimum où seraient ajoutés un à un les acides aminés voulus. Devant ces quelques difficultés à mettre en œuvre cette technique, et afin d'utiliser au mieux le matériel biologique dont nous disposons, obtenus au cours de différentes purifications de protéines spécifiques, un début de cartographie bidimensionnelle de *Sc. thermophilus* a été effectué. Ainsi, une douzaine de protéines ont été caractérisées par leur masse moléculaire, leur pI et la séquence de leur extrémité N-terminale. Effectivement, chaque spot protéique du profil bidimensionnel peut subir la dégradation d'Edman, néanmoins cette technique est coûteuse. L'ensemble des protéines que nous avons choisies de séquencer est retrouvé dans les profils des différentes souches, à l'exception bien sûr de la protéine de 16,4 kDa qui est spécifique à la souche PB18 et de la protéine basique HU-like. Les conditions actuelles retenues pour l'électrophorèse bidimensionnelle ne permettent pas de cartographier l'ensemble des protéines : les protéines de pI basiques, de hautes masses moléculaires ou membranaires échappent à l'analyse. D'autres gradients d'ampholytes, et/ou d'autres concentrations de polyacrylamide devront être envisagés. Mais tous ces premiers travaux sur la protéomique de *Sc. thermophilus*

vont être complétés. La comparaison de profils protéiques bidimensionnels de nombreuses souches ayant des propriétés et des passés technologiques différents est en cours de réalisation. L'emploi de la génétique permet d'identifier l'espèce voire les souches, mais ici en plus de la classification et de l'identification de la souche ou de l'espèce, l'analyse de profils protéiques permettrait de révéler une ou des protéines responsables de la ou des spécificités de la souche.

Les recherches actuelles dans le domaine des bactéries lactiques devraient permettre de créer des souches :

- plus résistantes
 - aux phages,
 - aux changements thermiques,
 - à la congélation,
- productrice de nouvelles molécules (à effets santé par exemple)
- modifiées pour leur métabolisme (croissance, production de métabolites, résistances aux stress).....

La recherche sur la génétique permet de construire des outils performants pour modifier le métabolisme des bactéries lactiques par des techniques de transformation, conjugaison qui sont maintenant disponibles pour de nombreuses espèces, les constructions obtenues sont stables et peu transférables à d'autres organismes. L'électrophorèse bidimensionnelle peut être complémentaire des améliorations génétiques, en permettant la mise en évidence de protéines, d'enzymes réprimées ou surexprimées après des modifications moléculaire.



VI. Références Bibliographiques

1. **Aeversson, A., Brazhnikov, E., Garber, M., Zheltonosova, J., Chirgadze, Y., Al-Karadghi, S., Svensson, A. & Liljas, A. (1994).** Three-dimensional structure of the ribosomal translocase: elongation factor G from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.* **13**, 3669-3677.
2. **Aguirre, M. & Collins, M. (1993).** Lactic acid bacteria and human clinical infection : a review. *J. Appl. Bact.* **75**, 95-107.
3. **Altschul, S.F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
4. **Anderson, N.L. & Anderson, N.G. (1998).** Proteome and proteomics: New technologies, new concept, and new words. *Electrophoresis* **19**, 1853-1861.
5. **Araki, T. (1991a).** The effect of temperature shifts on protein synthesis by the psychrophilic bacterium *Vibrio* sp. strain ANT-300. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 817-826.
6. **Araki, T. (1991b).** Changes in rates of synthesis of individual proteins in a psychrophilic bacterium after a shift in temperature. *Can. J. Microbiol.* **37**, 840-847.
7. **Auffray, Y., Gansel, X., Thammavongs, B. & Boutibonnes, P. (1992).** Heat shock-induced protein synthesis in *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *Curr. Microbiol.* **24**, 281-284.
8. **Auffray, Y., Lecesne, E., Hartke, A. & Boutibonnes, P. (1995).** Basic feature of the *Streptococcus thermophilus* heat shock response. *Curr. Microbiol.* **30**, 87-91.
9. **Av-Gay, Y., Aharonowitz, Y. & Cohen, G. (1992).** *Streptomyces* contain a 7.0 kDa cold shock like protein. *Nucl. Acids. Res.* **20**, 5478.
10. **Bae, W., Jones, P.G. & Inouye, M. (1997).** CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*, negatively regulates its own gene expression. *J. Bacteriol.* **179**, 7081-7088.
11. **Bae, W., Phadtare, S., Severinov, K. & Inouye, M. (1999).** Characterization of *Escherichia coli* cspE, whose product negatively regulates transcription of cspA, the gene for the major cold shock protein. *Mol. Microbiol.* **31**, 1429-1441.

12. **Bayles, D.O., Annous, B.A. & Wilkinson, B.J. (1996).** Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1116-1119.
13. **Becker, J. & Craig, A. (1994).** Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Biochem.* **219**, 11-23.
14. **Berger, F., Morellet, N., Menu, F. & Potier, P. (1996).** Cold shock and acclimation proteins in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globiformis* SI55. *J. Bacteriol.* **178**, 2999-3007.
15. **Berger, F., Normand, P. & Potier, P. (1997).** *capA*, a *cspA*-like gene that encodes a cold acclimation protein in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globiformis* SI55. *J. Bacteriol.* **179**, 5670-5676.
16. **Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G., Gianazza, E., Gorg, A., Westermeier, R. & Postel, W. (1982).** Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **6**, 37-339.
17. **Boot, I.R. (1985).** Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* **49**, 359-378.
18. **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.
19. **Boutibonnes, P. (1996).** Les protéines de choc thermique chez *Lactococcus lactis* : synthèse et régulation ; thermotolérance. *Lait.* **73**, 111-128.
20. **Bracquart, P. (1981).** An agar medium for the differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in yoghurt. *J. Appl. Bacteriol.* **51**, 303-305.
21. **Bradford, M.M. (1976).** A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
22. **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**, 1090-1098.
23. **Brandi, A., Pietroni, P., Gualerzi, C.O. & Pon, C.L. (1996).** Post-transcriptional regulation of CspA expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **19**, 231-240.

24. **Broadbent, J.R., Oberg, C.J., Wang, H. & Wei, L. (1997).** Attributes of the heat shock response in three species of dairy *Lactobacillus*. *System. Appl. Microbiol.* **20**, 12-19.
25. **Broadbent, J.R., Oberg, C.J. & Wei, L. (1998).** Characterization of the *Lactobacillus helveticus* groESL operon. *Res. Microbiol.* **149**, 247-253
26. **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.
27. **Bryan, P.J., Steffan, R.J., DePaola, A., Foster, J.W. & Bej, A.K. (1999).** Adaptive response to cold temperatures in *Vibrio vulnificus*. *Curr. Microbiol.* **38**, 168-175.
28. **Bukau, B. (1993).** Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol. Microbiol.* **9**, 671-680.
29. **Bycroft, M., Hubbard, T.J., Proctor, M., Freund, S.M. & Murzin, A.G. (1997).** The solution structure of the S1 RNA binding domain : a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell* **88**, 235-242.
30. **Casiano-Colòn, A. & Marquis, R.E. (1991).** Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1318-1324.
31. **Cerning, J.** Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques. in "Bactéries Lactiques. Aspects Fondamentaux et Technologiques.", 309-329 pp. Ed. de Roissart, H. & Luquet, F.M. Uriage. Lorica.
32. **Chapot-Chartier, M.-P., Shouler, C., Lepeuple, A.-S., Gripon, J.-C. & Chopin, M.-C. (1997).** Characterisation of *cspB*, a cold-shock-inducible gene from *Lactococcus lactis*, and evidence for a family of genes homologous to the *Escherichia coli cspA* major cold shock gene. *J. Bacteriol.* **179**, 5589-5593.
33. **Curk, M.C., Boeufgras, J.M., Decaris, B., Gavini, F., Kersters, K., Larpent, J.P., Le Bourgeois, P., Renault, P., de Roissart, H. & Rouvier, C. (1994).** Méthodes d'identification des bactéries lactiques. in "Bactéries Lactiques. Aspects Fondamentaux et Technologiques.", 141-168 pp. Ed. de Roissart, H. & Luquet, F.M. Uriage. Lorica.
34. **Cutting, J.A. (1984).** Enzyme purification and related techniques. *Meth. Enzymol.* **104**, 451-453.

35. **Craig, J.E., Boyle, D., Francis, K.P. & Gallagher, M.P. (1998).** Expression of the cold-shock gene *cspB* in *Salmonella typhimurium* occurs below a threshold temperature. *Microbiology*. **144** 697-704
36. **Dammel, C.S. & Noller, H.F. (1995).** A cold-sensitive mutation in 16S rRNA by overproduction of a novel ribosome-binding factor, RbfA. *Genes Dev.* **9**, 626-637.
37. **Dawson, R., M., C., Elliot, D., C., Elliot, W., H., & Jones, K., M. (1969).** Data for Biochemical Research. 2nd Ed. Oxford Univ. Press, London.
38. **De Roissart, H. & Luquet, F.M. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. in "Bactéries Lactiques. Aspects Fondamentaux et Technologiques.", 25-253 pp. Ed. de Roissart, H. & Luquet, F.M. Uriage. Loriga.
39. **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. & Luquet, F.M. Uriage. Loriga.
40. **Derré, I., Rapoport, G., Msadek, R. (1999).** CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **31**, 117-131.
41. **Derzelle S., Hols, P., Ferain, T., Delplace, B. & Delcour J. (1996).** Regulation analysis of a cold shock gene from *Lactobacillus plantarum*. in "Fifth symposium on Lactic Acid Bacteria, Genetics, Metabolism and Application. Veldhoven The Netherlands." FEMS Foundation antaonie van Leeuwenhoek.
42. **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. Loriga.
43. **Drlica, K. (1994).** Biology of bacterial deoxyribonucleic acid topoisomerases. *Microbiol. Rev.* **48**, 273-289.
44. **Eaton, T., Shearman, C. & Gasson, M. (1993).** Cloning and sequence analysis of *dnaK* gene region of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 3253-3264.
45. **Edman, P. & Begg, G. (1967).** A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* **1**, 80-91.
46. **Etchegaray, J.P., Jones, P.G. & Inouye, M. (1996).** Differential thermoregulation of two highly homologous cold-shock genes, *cspA* and *cspB*, of *Escherichia coli*. *Genes Cells.* **1**, 171-178.

47. **Etchegaray J.P. & Inouye M. (1999).** CspA, CspB, and CspG, major cold shock proteins of *Escherichia coli*, are induced at low temperature under conditions that completely block protein synthesis. *J. Bacteriol.* **181**, 1827-30
48. **Fang, L., Jiang, W., Bae, W. & Inouye, M. (1997).** Promoter-independent cold-shock induction of *cspA* and its derepression at 37°C by mRNA stabilization. *Mol. Microbiol.* **23**, 355-364.
49. **Fang, L., Hou, Y. & Inouye, M. (1998).** Role of the cold-box region in the 5' untranslated region of the *cspA* mRNA in its transient expression at low temperature in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 90-95.
50. **Fang, L., Xia, B. & Inouye, M. (1999).** Transcription of *cspA*, the gene for the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is negatively regulated at 37 degrees C by the 5'-untranslated region of its mRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **176**, 39-43.
51. **Farrow, O.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.
52. **Feng, W., Tejero, R., Zimmerman, D.E., Inouye, M. & Montelione, G.T. (1998).** Solution NMR structure and backbone dynamics of the major cold-shock protein (CspA) from *Escherichia coli* : evidence for conformation dynamics in the single-stranded RNA-binding site. *Biochem.* **37**, 10881-10896.
53. **Foucaud, C. & Poolman, B. (1992).** Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus* : functional reconstitution of the protein and characterization of the kinetic mechanism of transport. *J. Biol. Chem.* **267**, 22087-22094.
54. **Francis, K.P. & Stewart, G.S.A. (1997).** Detection and speciation of bacteria through PCR using universal major cold shock protein primer oligomers. *J. Ind. Microbiol & Biotechnol.* **19**, 286-293.
55. **Francis, K.P., Mayr, R., Von Stetten, F., Stewart, G.S.A.B. & Scherer, S. (1998).** Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3525-3529.
56. **Frees, D., Ingmer, H. (1999).** ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* **31**, 79-87.
57. **Friedman, H., Lu, P. & Rich, A. (1971).** Temperature control of initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **61**, 105-121.

58. **Friedman, M.R. & Gaden, E.L. (1970).** Growth and lactic acid fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* in a dialysis culture system. *Biotechnol. Bioeng.* **12**, 961-974.
59. **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.e.L., B.A. London. Elsevier Applied Science Publisher.
60. **Gasser, F., Montel, M.C., Talon, R. & Champomier, M. (1994).** Taxonomie moléculaire appliquée à la classification des bactéries lactiques. *in* "Bactéries Lactiques. Aspects Fondamentaux et Technologiques.", 117-139 pp. Ed. de Roissart, H. & Luquet, F.M. Uriage. Lorica.
61. **Gase, K., Gase, A., Schirmer, H. & Malke, H. (1996).** Cloning, sequencing and functional overexpression of the *Streptococcus equisimilis* H46A *gapC* gene encoding a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase that also functions as a plasmin(ogen)-binding protein. Purification and biochemical characterization of the protein. *Eur. J. Biochem.* **239**, 42-51.
62. **Gerlach, D., Reichardt, W. & Vettermann, S. (1998).** Extracellular superoxide dismutase from *Streptococcus pyogenes* type 12 strain is manganese-dependent. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**, 217-224.
63. **Gething, M.J. & Sambrook, J. (1992).** Protein folding in the cell. *Nature* **355**, 33-45.
64. **Golden, B.L., Hoffman, D.W., Ramakrishnan, V. & White, S.W. (1993).** Ribosomal protein S17: characterization of the three-dimensional structure by 1H and 15N NMR. *Biochem.* **32**, 12812-12820.
65. **Goldenberg, D., Azar, I. & Oppenheim, A.B. (1996).** Differential mRNA stability of the *cspA* gene in the cold-shock response of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **19**, 241-248.
66. **Goldstein, J., Pollitt, N.S. & Inouye, M. (1990).** Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 283-287.
67. **Gonzalez-Marquez, H. (1997).** Réponse au stress acide chez *Streptococcus thermophilus*. Purification, identification et caractérisation d'une protéine surexprimée. Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy I en Biochimie.

68. **Gonzalez-Marquez, H., Perrin, C., Bracquart, P., Guimont, C. & Linden, G. (1997).** A 16 kDa protein family overexpressed by *Streptococcus thermophilus* PB18 in acid environments. *Microbiology*. **143**, 1587-1594.
69. **Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Csordas, A., Diaz, J.J. & Majdar, J.J. (1997).** Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. *Electrophoresis* **18**, 328-337.
70. **Gounot, A.-M. (1991).** Bacterial life at low temperature : physiological aspects and biotechnological implications. *J. Appl. Bacteriol.* **71**, 386-397.
71. **Grau, R., Gardiol, D., Gilkin, G.C. & de Mendoza, D. (1994).** DNA supercoiling and thermal regulation of unsaturated fatty acid synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **11**, 933-941.
72. **Graumann, P. & Marahiel, M.A. (1994).** The major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB binds with high affinity to the ATTGG- and CCAAT sequences in single stranded oligonucleotides. *FEBS Lett.* **338**, 157-160.
73. **Graumann, P. & Marahiel, M., A. (1996a).** A case of convergent evolution of nucleic acid binding modules. *Bio. Essays* **18**, 309-315.
74. **Graumann, P. & Marahiel, M.A. (1996b).** Some like it cold : response of microorganisms to cold shock. *Arch. Microbiol.* **166**, 293-300.
75. **Graumann, P., Schröder, K., Schmid, R. & Marahiel, M.A. (1996).** Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**, 4611-4619.
76. **Graumann, P. & Marahiel, M.A. (1997).** Effects of heterologous expression of CspB, the major cold shock protein of *Bacillus subtilis*, on protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **253**, 745-752.
77. **Graumann, P., Wendrich, T.M., Weber, M.H.W., Schröder, K. & Marahiel, M.A. (1997).** A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperature. *Mol. Microbiol.* **25**, 741-756.
78. **Graumann, P.L. & Marahiel, M.A. (1998).** A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 286-290.
79. **Gügi, B., Orange, N., Hellio, F., Burini, J.F., Guillou, C., Leriche, F. & Guespin-Michel, J.F. (1991).** Effect of growth temperature on several exported enzyme activities in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* **173**, 3814-3820.

80. **Guillou, C. & Guespin-Michel, J.F. (1996).** Evidence for two domains of growth temperature for the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens* MFO. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3319-3324.
81. **Guimont, C., Bracquart, P. & Linden, G. (1993).** A 18 kDa protein is specifically expressed in different growth conditions by *Streptococcus thermophilus* PB18. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 45.
82. **Guimont, C., Clary, D. & Bracquart, P. (1994).** Analysis of whole-cell proteins of *Streptococcus thermophilus* by 2 electrophoretic methods. *Lait.* **74**, 13-21.
83. **Guingamp, M.-F., Humbert, G., Midon, P., Nicolas, M. & Linden, G. (1999).** Screening procedure evaluating heat load in commercial milks. *Lait.* **79**, 457-463.
84. **Gumley, A.W. & Inniss, W.E. (1996).** Cold shock proteins and cold acclimation proteins in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas putida* Q5 and its transconjugant. *Can. J. Microbiol.* **42**, 798-803.
85. **Guzzo, J., Delmas, F., Pierre, F., Jobin, M.-P., Samyn, B., Van Beeumen, J., Cavin, J.-F. & Diviès, C. (1997).** A small heat shock protein from *Leuconostoc oenos* induced by multiple stresses and during stationary growth phase. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**.
86. **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.
87. **Hanna, M.M. & Liu, K. (1998).** Nascent RNA in transcription complexes interacts with CspE, a small protein in *Escherichia coli* implicated in chromatin condensation. *J. Mol. Biol.* **282**, 227-239.
88. **Hardie, J.M. (1986).** Genus *Streptococcus* Rosenbach 1884. in "Bergey's manual of Systematic Bacteriology-Vol. 2", 1043-1065 pp. .
89. **Hartke, A., Bouché, S., Gansel, X., Boutibonnes, P. & Auffray, Y. (1994).** Starvation-induced stress resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Appl. Environ. Microbiol.* **30**, 87-91.
90. **Hartke, A., Bouché, S., Laplace, J.-M., Benachour, A., Boutibonnes, P. & Auffray, Y. (1995).** UV-induced cross-protection against acid, ethanol, H₂O₂ or heat treatments in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Arch. Microbiol.* **163**, 329-336.
91. **Hartke, A., Bouché, S., Giard, J.C., Benachour, A., Boutibonnes, P. & Auffray, Y. (1996).** The Lactic Acid Stress Response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr. Microbiol.* **33**, 194-199.

92. Hartke, A., Frère, J., Boutibonnes, P. & Auffray, Y. (1997). Differential induction of the chaperonin GroEL and co-chaperonin GroES by heat, acid, and UV-Irradiation in *Lactococcus lactis* susp. *lactis*. *Curr. Microbiol.* **34**, 23-26.
93. Hashiba, H., Takiguchi, R., Joho, K., Aoyama, K. & Hirota, T. (1993). Identification of the replication region of *Streptococcus thermophilus* N°29 plasmid pST1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 1646-1649.
94. Hébraud, M., Dubois, E., Garry, P. & Labadie, J. (1992). Low molecular weight proteins from psychrotroph *Pseudomonas* are overexpressed at low temperature. In "Proceeding of the 38th International Congress of Meat Science and Technology" 23-28 Août 1992 Clermont-Ferrand. 651-654.
95. Hébraud, M., & Labadie, J. (1993). Communauté antigénique entre des protéines surexprimées à basse température chez des bactéries pathogènes et d'altération des aliments. Flash sur les microorganismes pathogènes dans les aliments- e" Colloque des 28 et 29 avril 1993, Institut Pasteur Paris. In "Société Française de Microbiologie". 265-273.
96. Hébraud, M., Dubois, E., Potier, P. & Labadie, J. (1994). Effect of growth temperatures on the protein levels in a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas fragi*. *J. Bacteriol.* **176**, 4017-4024.
97. Hecker, M., Schumann, W. & Völker, U. (1996). Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **19**, 417-428.
98. Hendrick, J.P. & Hartl, F.U. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 349-384.
99. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. & Williams, S.T. (1994). Gram positive cocci. in "Bergey's manual of determinative bacteriology-9e ed.", 527-558 pp. Ed. Wilkins, W.e. New York.
100. Humble, M.W., King, A. & Phillips, I. (1977). APIZYM : a simple rapid system for the detection of bacterial enzyme. *J. Clin. Pathol.* **30**, 275-277.
101. Humphrey-Smith, I., Cordwell, S.J. & Blackstock, W.P. (1997). Proteome research: complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. *Electrophoresis.* **18**, 1217-1242.
102. Hutkins, R. W. & Nannen, N. L. (1993). pH homeostasis in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **76**, 2354-2365.

103. **Itoh, T. & Wittmann-Liebold, B. (1978).** The primary structure of *Bacillus subtilis* acidic ribosomal protein B-L9 its comparison with *Escherichia coli* proteins L7/L12. *FEBS Lett.* **96**, 392-394
104. **Jandik, P., Jones, W.R., Weston, A. & Brown, P.R. (1992).** Electrophoretic capillary ion analysis : origins, principles and applications. *LC-GC Int.* **5**, 20-27.
105. **Jeffreys, A., G., Hak, K., M., Steffan, R., J., Foster, J., W. & Bef, A., K. (1998).** Growth, survival and characterization of *cspA* in *Salmonella enteritidis* following cold shock. *Curr. Microbiol.* **36**, 29-35.
106. **Jiang, W., Jones, P. & Inouye, M. (1993).** Chloramphenicol induces the transcription of the major cold shock gene of *Escherichia coli*, *cspA*. *J. Bacteriol.* **175**, 5824-5828.
107. **Jiang, W., Fang, L. & Inouye, M. (1996).** The role of the 5'-end untranslated region of the mRNA for CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli* , in cold-shock adaptation. *J. Bacteriol.* **178**, 4919-4925.
108. **Jiang, W., Hou, Y. & Inouye, M. (1997).** CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli* , is an RNA chaperone. *J. Biol. Chem.* **272**, 196-202.
109. **Jobin, M.-P., Delmas, 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.
110. **Jobin, M.-P., Delmas, F., Garmyn, D., Divies, C. & Guzzo, J. (1998).** Caractérisation des protéines de choc thermique de faible poids moléculaire chez les bactéries lactiques. *Lait.* **78**, 165-171.
111. **Jones, D. (1978).** Composition and differentiation of the genus *Streptococcus*. in "Streptococci", 1-49 pp. Ed. Skinner, F.A. & Guesnel, L.B. London. Academic Press.
112. **Jones, P.G., Van Bogelen, R.A. & Neidhardt, F.C. (1987).** Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli* . *J. Bacteriol.* **169**, 2092-2095.
113. **Jones, P.G., Cashel, M., Glaser, G. & Neidhardt, F.C. (1992a).** Function of a relaxed-like state following temperature downshifts in *Escherichia coli* . *J. Bacteriol.* **174**, 3903-3914.

114. Jones, P.G., Krah, R., Tafuri, S.R. & Wolff, A.P. (1992b). DNA gyrase, CS7.4, and the cold shock response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 5798-5802.
115. Jones, P.G. & Inouye, M. (1994). The cold-shock response - a hot topic. *Mol. Microbiol.* **11**, 811-818.
116. Jones, P.G. & Inouye, M. (1996). RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response. *Mol. Microbiol.* **21**, 1207-1218.
117. Jones, P.G., Mitta, M., Kim, Y., Jiang, W. & Inouye, M. (1996). Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 76-80.
118. Kashket, E.R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria : cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Reviews.* **46**, 233-244.
119. Kawaguchi, S. & Kuramitsu, S. (1995). Separation of heat-stable proteins from *Thermus thermophilus* HB8 by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* **16**, 1060-1066.
120. Kim, S.G. & Batt, C.A. (1993). Cloning and sequencing of the *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* groESL operon. *Gene* **127**, 121-126.
121. Kim, W.S. & Dunn, N.W. (1997). Identification of a cold shock gene in lactic acid bacteria and the effect of cold shock on cryotolerance. *Curr. Microbiol.* **35**, 59-63.
122. Kim, W.S., Khunajakr, N. & Dunn, N.W. (1998a). Effect of cold shock on protein synthesis and on cryotolerance of cells frozen for long periods in *Lactococcus lactis*. *Cryobiology.* **37**, 86-91.
123. Kim, W.S., Khunajakr, N., Ren, J. & Dunn, N.W. (1998b). Conservation of the major cold shock protein in lactic acid bacteria. *Curr. Microbiol.* **37**, 333-336.
124. Kim, W.S., Ren, J. & Dunn, N.W. (1999). Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiol. Lett.* **171**, 57-65.
125. Kolberg, J., Hoiby, E.A., Lopez, R. & Sletten, K. (1997). Monoclonal antibodies against *Streptococcus pneumoniae* detect epitopes on eubacterial ribosomal proteins L7/L12 and on streptococcal elongation factor Ts *Microbiology* **143**, 55-61.

126. **Kudo, S., Mattei, M.G. & Fukuda, M. (1995).** Characterization of the gene for *dbpA*, a family member of the nucleic-acid-binding proteins containing a cold-shock domain. *Eur. J. Biochem.* **231**, 72-82.
127. **Kunji, E.R.S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. & Konings, W.N. (1996).** The proteolytic system of lactic acid bacteria. in "Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications." 187-221 pp. Ed. Leeuwenhoek, A.v. Kluwer Academic Publisher.
128. **La Teana, A., Brandi, A., Falconi, M., Spurio, R., Pon, C.L. & Gualerzi, C.O. (1991).** Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 10907-10911.
129. **Laemmli, U.K. & Favre, M. (1973).** Maturation of the head of bacteriophage T4.I DNA packaging events. *J. Mol. Biol.* **80**, 575-599.
130. **Lancefield, R.C. (1933).** A serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* **57**, 571-595.
131. **Landsman, D. (1992).** RNP-1, an RNA-binding motif is conserved in the DNA-binding cold shock domain. *Nucl. Acids. Res.* **20**, 2861-2864.
132. **Lee, S.J., Xie, A., Jiang, W., Etchegaray, J.P., Jones, P.G. & Inouye, M. (1994).** Family of the major cold-shock protein, CspA (CS7.4), of *Escherichia coli*, whose members show a high sequence similarity with the eukaryotic Y-box binding proteins. *Mol. Microbiol.* **11**, 833-839.
133. **Lemeaux, P.G., Herendeen, S.L., Bloch, P.L. & Neidhart, F.C. (1978).** Transient rate of synthesis of individual polypeptides in *Escherichia coli* following temperature shifts. *Cell.* **13**, 427-434.
134. **Linquist, S.L. (1986).** The heat shock response. *ANNU. Rev. Biochem.* **55**, 1151-1191.
135. **Lottering, E.A. & Streips, U.N. (1995).** Induction of cold shock proteins in *Bacillus subtilis*. *Curr. Microbiol.* **30**, 193-199.
136. **Maguin E., Prevost H. Ehrlich S.D., Gruss A. (1996).** Efficient insertionnal mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **178**,931-935.

137. **Maillet I., Lagniel G., Perrot M., Boucherie H. & Labarre J. (1996).** Rapid identification of yeast proteins on two-dimensional gels. *J. of Biol. Chem.* **271**, 10263-10270.
138. **Martin, J., Langer, T., Boteva, R., Schramel, A., Horwich, A.L. & Hartl, F.H. (1991).** Chaperonin-mediated protein folding at the surface of GroEL through a "molten-globule"- like intermediate. *Nature.* **352**, 36-42.
139. **Mayo, B., Derzelle, S., Fernandez, M., Léonard, C., Ferain, T., Hos, P., Suarez, J.E. & Delcour, J. (1997).** Cloning and characterization of *cspL* and *cspP*, two cold-inducible genes from *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **179**, 3039-3042.
140. **Michel, V., Labadie, J. & Hébraud, M. (1996).** Effect of different temperature upshifts on protein synthesis by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fragi*. *Curr. Microbiol.* **33**, 16-25.
141. **Michel, V., Lehoux, I., Depret, G., Anglade, P., Labadie, J. & Hébraud, M. (1997).** The cold shock response of the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fragi* involves four low molecular mass nucleic acid-binding proteins. *J. Bacteriol* **179**, 7331-7342.
142. **Mission scientifique de Syndifrais. (1997)** Yaourt, laits fermentés. *Lait* **77**, 321-358.
143. **Mitta, M., Fang, L. & Inouye, M. (1997).** Deletion analysis of *CspA* of *Escherichia coli*: requirement of the AT-rich UP element for *CspA* transcription and the down stream box in the coding region for its cold shock induction. *Mol. Microbiol.* **26**, 321-335.
144. **Mogk, A., Völker, A., Engelmann, S., Hecker, M., Schumann, W., Völker, U. (1998).** Nonnative proteins induce expression of the *Bacillus subtilis* CIRCE regulon. *J. Bacteriol.* **180**, 2895-2900.
145. **Morrissey, J.H. (1981).** Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced sensitivity. *Anal. Biochem.* **117**, 307-310.
146. **Nakashima, K., Kanamaru, K., Mizuno, T. & Horikoshi, K. (1996).** A novel member of the *cspA* family of genes that is induced by cold shock in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**, 2994-2997.
147. **Nannen, N.L. & Hutkins, R.W. (1991).** Intracellular pH effects in Lactic Acid Bacteria. *J. Dairy Sci.* **74**, 741-746.

148. **Newkirk, K., Feng, W., Jiang, W., Tejero, R., Emerson, S.D., Inouye, M. & Montelione, G.T. (1994).** Solution NMR structure of the major cold shock protein (CspA) from *Escherichia coli*: Identification of a binding epitope for DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 5114-5118.
149. **Nilsson, D., Lauridsen, A.A., Tomoyasu, T. & Ogura, T. (1994).** A *Lactococcus lactis* gene encodes a membrane protein with putative ATP-ase activity that is homologous to the essential *Escherichia coli ftsH* gene product. *Microbiology.* **140**, 2601-2610.
150. **O'Farrel, P.H. (1975).** High resolution two dimensional-electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.
151. **O'Sullivan, T., van Sinderen, D. & Fitzgerald, G. (1999).** Structural and functional analysis of pCI65st, a 6.5 kb plasmid from *Streptococcus thermophilus* NDI-6. *Microbiology.* **145**, 127-134.
152. **Orla Jensen, S. (1919).** The Lactic Acid Bacteria. *Copenhagen. Host & Son.*
153. **Panoff, J.M., Legrand, S., Thammavongs, B. & Boutibonnes, P. (1994).** The cold shock response in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr. Microbiol.* **29**, 213-216.
154. **Panoff, J.-M., Thammavongs, B., Auffray, Y. & Boutibonnes, P. (1995a).** La réponse au stress hypothermique chez les bactéries mésophiles. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **10**, 7-11.
155. **Panoff, J.-M., Thammavongs, B., Laplace, J.-M., Hartke, A., Boutibonnes, P. & Auffray, Y. (1995b).** Cryotolerance and cold adaptation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Cryobiology.* **35**, 516-520.
156. **Panoff, J.-M., Coroller, D., Thammavongs, B. & Boutibonnes, P. (1997).** Differentiation between cold shock proteins and cold acclimation proteins in a mesophilic Gram-positive bacterium, *Enterococcus faecalis* JH2-2. *J. Bacteriol.* **179**, 4451-4454.
157. **Panoff, J., Thammavongs, B., Gueguen, M. & Boutibonnes, P. (1998).** Cold stress responses in mesophilic bacteria. *Cryobiology.* **36**, 75-83.
158. **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.

159. Pasquali, C., Frutiger, S., Wilkins, M.R., Hughes, G.J., Appel, R.D., Bairoch, A., Schaller, D., Sanchez, J.-C. & Hochstrasser, D.F. (1996). Two-dimensional gel electrophoresis of *Escherichia coli* homogenates: the *Escherichia coli* SWISS-2DPAGE database. *Electrophoresis*. **17**, 547-555.
160. Patton, Z.F., Pluskal, M.G., Skeq, W.M., Buecker, J.L., Lopez, M.L., Zimmermann, R., Belanger, L.M. & Hatch, P. (1990). Development of a dedicated two-dimensional gel electrophoresis system that provides optimal pattern reproducibility and polypeptide resolution. *Biotechniques*. **8**, 518-527.
161. Phadtare, S., Alsina, J. & Inouye, M. (1999). Cold-shock response and cold-shock proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 175-180.
162. Phan-Thanh, L. & Gormon, T. (1995). Analysis of heat and cold shock proteins in *Listeria* by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*. **16**, 444-450.
163. Poolman, B. (1993). Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 125-148.
164. Qoronfleh, M.W., Debouck, C. & Keller, J. (1992). Identification and characterisation of novel low-temperature-inducible promoters of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 7902-7909.
165. Rallu, F., Gruss, A. & Maguin, E. (1996). *Lactococcus lactis* and stress. *Antonie van Leeuwenhoek*. **70**, 243-251.
166. Rallu, F., Gruss, A. & Maguin, E. (1998). Mutants de *Lactococcus lactis* résistants à l'acidité. *Lait*. **78**, 157-163.
167. Ray, M.K., Sitaramamma, T., Ghandhi, S. & Shivaji, S. (1994). Occurrence and expression of *cspA*, a cold shock gene, in Antarctic psychrotrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **116**, 55-60.
168. Reid, K.L., Rodriguez, H.M., Hillier, B.J. & Gregoret, L.M. (1998). Stability and folding properties of a model beta-sheet protein, *Escherichia coli* CspA. *Protein Sci.* **7**, 470-479.
169. Ritossa, R. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Chromosoma*. **15**, 571-573.
170. Roberts, M.A. & Inniss, W.E. (1992). The synthesis of cold shock proteins and cold acclimation proteins in the psychrotrophic bacterium *Aquaspirillum arcticum*. *Curr. Microbiol.* **25**, 275-278.

171. **Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J.C. & Ferrara, P. (1992).** In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **203**, 173-179.
172. **Ross, W., Gosink, K.K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, K., Severinov, K. & Gourse, R.L. (1993).** A third recognition element in bacterial promoters : DNA binding by the α subunit of RNA polymerase. *Science.* **262**, 1407-1413.
173. **Roupert, G., (1991)** Caractérisation d'un plasmide cryptique de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Essais de séquençage simple et double brin, Université de Nancy I. DEA de Microbiologie-Enzymologie, Nutrition, Mémoire de DEA.
174. **Russel, N.J. (1990).** Cold adaptation of microorganisms. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **326**, 595-611.
175. **Sato, N. & Murata, N. (1981).** Studies on the temperature shift-induced desaturation of fatty acids in monogalactosyl diacylglycerol in the blue-green alga (cyanobacterium), *Anabena variabilis*. *Plant cell. Physiol.* **22**, 1043-1050.
176. **Saulnier, F., Calco, M., Humbert, G. & Linden, G. (1996).** Organic and mineral composition of different industrial acid wheys analysed by capillary electrophoresis. *Lait.* **76**, 423-432.
177. **Schindelin, H., Herrler, M., Willimsky, G., Marahiel, M.A. & Heinemann, U. (1992).** Overproduction, crystallization, and preliminary X-Ray diffraction studies of the major cold shock protein from *Bacillus subtilis*, CspB. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **14**, 120-124.
178. **Schindelin, H., Marahiel, M.A. & Heinemann, U. (1993).** Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *Bacillus subtilis* major cold-shock protein. *Nature.* **364**, 164-168.
179. **Schindelin, H., Jiang, W., Inouye, M. & Heinemann, U. (1994).** Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 5119-5123.
180. **Schindler, T., Perl, D., Graumann, P., Sieber, V., Marahiel, M.A. & Schmid, F.X. (1998).** Surface-exposed phenylalanines in the RNP1/RNP2 motif stabilize the cold-shock protein CspB from *Bacillus subtilis*. *Proteins.* **30**, 401-406.

181. **Schlegel, L. & Bouvet, A. (1998).** Streptocoques et genres apparentés : abiotrophes et entérocoques. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **13**, 7-17.
182. **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.
183. **Schleifer, K.H. & Killper-Bälz, R. (1987).** Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci : a review. *System. Appl. Microbiol.* **10**, 1-19.
184. **Schleifer, K.H., Ehrmann, M., Krusch, U. & Neve, H. (1991).** Revival of the species *Streptococcus thermophilus* (ex Orla-Jensen, 1919) nom. rev. *System. Appl. Microbiol.* **14**, 386-388.
185. **Schnuchel, A., Wiltscheck, R., Czisch, M., Herrler, M., Willimsky, G., Graumann, P., Marahiel, M.A. & Holak, T.A. (1993).** Structure in solution of the major cold-shock protein from *Bacillus subtilis*. *Nature.* **364**, 169-171.
186. **Schröder, K., Zuber, P., Willimsky, G., Wagner, B. & Marahiel, M.A. (1993).** Mapping of the *Bacillus subtilis* *cspB* gene and cloning of its homologs in thermophilic, mesophilic and psychrotrophic bacilli. *Gene.* **136**, 277-280.
187. **Schröder, K., Graumann, P., Schnuchel, A., Holak, T.A. & Marahiel, M.A. (1995).** Mutational analysis of the putative nucleic acid-binding surface of the cold-shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of single-stranded DNA containing the Y-box motif. *Mol. Microbiol.* **16**, 699-708.
188. **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* beta-galactosidase sequences. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 369-380.
189. **Schulz, A. & Schumann, W. (1996).** *hrcA*, the first gene of the *Bacillus subtilis* *dnaK* operon encodes a negative regulator of class I heat shock genes. *J. Bacteriol.* **178**, 1088-93
190. **Sette, M., van Tilborg, P., Spurio, R., Kaptein, R., Paci, M., Gualerzi, C.O. & Boelens, R. (1997).** The structure of the translational initiation factor IF1 from *Escherichia coli* contains an oligomer-binding motif. *EMBO J.* **16**, 1436-1443.

191. **Somkuti, G.A., Solaiman, D.K. & Steinberg, D.H. (1998).** Structural and functional properties of the hsp16.4-bearing plasmid pER341 in *Streptococcus thermophilus*. *Plasmid*. **40**, 61-72.
192. **Somkuti, G.A. & Steinberg, D.H. (1999).** Distribution of plasmid-borne stress protein genes in *Streptococcus thermophilus* and other lactic acid bacteria. *Curr. Microbiol.* **38**, 43-47.
193. **Sprengart, M.L., Fuchs, E. & Porter, A.G. (1996).** The downstream box : an efficient and independent translation initiation signal in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **15**, 665-674.
194. **Stark, G.R, Stein, W.H., & Moore, S. (1960).** Reactions of the cyanates present of urea in aqueous urea with amino-acids and proteins. *J. Biol.Chem.* **235**, 3177-3181.
195. **Stackebrandt, E. & Teuber, M. (1988).** Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie.* **70**, 317-324.
196. **Steck, G., Lenthard, P. & Bürk, R.R. (1980).** Detection of basic proteins and low molecular weight peptides in polyacrylamide gels by formaldehyde fixation. *Anal. Biochem.* **107**, 21-24.
197. **Straus, D.B., Walter, W.A. & Gross, C.A. (1987).** The heat shock response of *Escherichia coli* is regulated by changes in the concentration of σ_{32} . *Nature.* **329**.
198. **Takemoto, L., Emmons, T. & Horwitz, J. (1993).** C-terminal of α -crystallin: involvement in protection against heat-induced denaturation. *Biochem. J.* **294**, 435-438.
199. **Tanabe, H., Goldstein, J., Yang, M. & Inouye, M. (1992).** Identification of the promoter region of the *Escherichia coli* major cold shock gene, *cspA*. *J. Bacteriol.* **174**, 3867-3873.
200. **Tarr, G.E. (1982).** Microquantitative Edman manual sequencing partitioning method for small peptides. in "Methods in protein sequence analysis.", 233-239 pp. Ed. Elzinga. Humana Press.
201. **Terzaghi, B.E. & Sandine, W.E. (1975).** Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* **29**, 807-813.
202. **Thammavongs, B., Corroler, D., Panoff, J.M., Auffray, Y. & Boutibonnes, P. (1996).** Physiological response of *Enterococcus faecalis* JH2-2 to cold shock:

- growth at low temperatures and freezing/thawing challenge. *Lett. Appl. Microbiol.* **23**, 398-402.
203. **Thieringer, H.A., Jones, P.G. & Inouye, M. (1998).** Cold shock and adaptation. *Bioessays* **20**, 49-57.
204. **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.
205. **Thunell, R.K. (1988).** pH-Controlled starter : a decade reviewed. *Cult. Dairy Prod. J.*, 10-15.
206. **Timpone, D.E., Fenster, K.M., Wei, L., Broadbent, J.R. & Steele, J.L. (1996).** A small heat shock protein from *Lactobacillus helveticus*. in "Abstract of the fifth symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and application." Ed. Venema, G. & Huis in't Veld, J.H.J. Veldhoven.
207. **Tissieres, A., Mitchell, H.K. & Tracy, U.M. (1974).** Protein in salivary glands of *Drosophila melanogaster* relation to chromosome puffs. *J. Molec. Biol.* **84**, 121-128.
208. **Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 4350-4354.
209. **Tsuchido, T., Nishino, T., Kato, Y. & Takano, M. (1995).** Involvement of membrane lipids in cold shock-induced autolysis of *Bacillus subtilis* cells. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1636-1640.
210. **Van Asseldonk, A., Simmons, A., Visser, H., de Vos, W.M. & Simmons, G. (1993).** Cloning, nucleotide sequence and regulatory analysis of the *Lactococcus lactis dnaJ* gene. *Gene Dev.* **1**, 525-531.
211. **Van Bogelen, R.A. & Neidhardt, F.C. (1990).** Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 5589-5593.
212. **Vorndran, A.E., Oefner, P.J., Scherz, H. & Bonn, G.K. (1992).** Indirect UV detection of carbohydrates in capillary zone electrophoresis. *Chromatographia.* **33**, 163-168.
213. **Wang, N., Yamanaka, K. & Inouye, M. (1999).** CspI, the ninth member of the CspA family of *Escherichia coli*, is induced upon cold shock. *J. Bacteriol.* **181**, 1603-1609.

214. **Wada, H. & Murata, N. (1990).** Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. *Plant. Physiol.* **92**, 1062-1069.
215. **Welker, C., Bohm, G., Schurig, H. & Jaenicke, R. (1999).** Cloning, overexpression, purification, and physicochemical characterization of a cold shock protein homolog from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Protein Sci.* **8**, 394-403
216. **Whitehead, W.E., Ayers, J.W. & Sandine, W.E. (1993).** A review of starter media for cheese making. *J. Dairy Sci.* **76**, 2344-2353.
217. **Whyte, L. G. & Inniss, W.E. (1992).** Cold shock proteins and cold acclimation proteins in a psychrotrophic bacterium. *Can. J. Microbiol.* **38**, 1281-1285.
218. **Wilkins, M.R., Sanchez, J.-C., Gooley, A.A., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F. & Williams, K.L. (1995).** *Biotechnol. Genetic. Eng. Rev.* **13**, 19-50.
219. **Willmsky, G., Bang, H., Fischer, G. & Marahiel, M.A. (1992).** Characterization of *cspB*, a *Bacillus subtilis* inducible cold shock gene affecting cell viability at low temperatures. *J. Bacteriol.* **174**, 6326-6335.
220. **Wistow, G. (1990).** Cold shock and DNA binding. *Nature.* **344**, 823-824.
221. **Wolfe, A.P. (1994).** Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *BioEssays.* **16**, 245-251.
222. **Wouters, J.A., Sanders, J.W., Kok, J., de Vos, W.M., Kuipers, O.P. & Abee, T. (1998).** Clustered organization and transcriptional analysis of a family of five *csp* genes of *Lactococcus lactis* MG1363. *Microbiology.* **144**, 2885-2893.
223. **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.
224. **Yamanaka, K., Mitani, T., Ogura, T., Niki, H. & Hiraga, S. (1994).** Cloning, sequencing and characterization of multicopy suppressors of a *mukB* mutation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **13**, 301-312.
225. **Yamanaka, K. & Inouye, M. (1997).** Growth-phase-dependent expression of *cspD*, encoding a member of the CspA family in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 5126-5130.
226. **Yamanaka, K., Fang, L. & Inouye, M. (1998).** The CspA family in *Escherichia coli* : multiple gene duplication for stress adaptation. *Mol. Microbiol.* **27**, 247-255.

227. **Yura, T., Nakahigashi & Kanemori, M. (1996).** Transcriptional regulation of stress-inducible genes in procaryotes. *in* " Stress-inducible cellular response." Ed. Feige, U., Morimoto, R.I
228. **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.

VII. Annexe

Annexe 1. Paramètres *Mr*, *pI* et Intensité Intégrée des protéines solubles totales de *Sc. thermophilus* séparées sur électrophorèse bidimensionnelle.

N° du spot	<i>Mr</i> (x10 ³)	<i>pI</i>	II	N° du spot	<i>Mr</i> (x10 ³)	<i>pI</i>	II
1	81,1	4,9	0,32	53	50,6	5,2	0,33
2	66,2	4,6	0,22	54	51,7	5,3	0,51
3	58,6	4,6	0,35	55	51	5,4	0,28
4	65,7	4,9	0,32	56	54,1	5,4	0,43
5	117,0	5,2	0,81	57	56,9	5,6	0,2
6	82,3	5,4	0,59	58	50,8	5,5	0,26
7	54,6	4,5	0,14	59	50,5	5,6	0,19
8	59,6	4,8	1,28	60	56,6	5,8	0,19
9	53,4	4,6	2,42	61	51,3	5,8	0,1
10	53,3	4,5	0,19	62	69,5	6,6	0,1
11	63,9	4,9	1,08	63	35,9	4,3	0,07
12	60,1	4,8	0,38	64	35,6	4,5	0,21
13	57,1	4,8	0,50	65	36,8	4,5	0,27
14	55,3	4,8	0,49	66	36,3	4,7	0,28
15	62,3	5,0	1,43	67	37,8	4,7	0,64
16	69,5	5,2	0,27	68	37,2	4,8	0,52
17	73,5	5,4	0,41	69	36,6	4,8	0,59
18	70,2	5,3	0,39	70	37,3	4,9	0,24
19	69,7	5,4	0,17	71	38,7	4,8	0,64
20	82,1	5,8	0,08	72	38,7	5,0	1,17
21	44,5	4,5	0,91	73	40,1	4,9	0,69
22	45,3	4,6	1,23	74	37,3	5,0	0,17
23	50,8	4,7	3,98	75	41,1	5,1	1,42
24	45,9	4,7	0,79	76	40,8	5,1	0,56
25	50,9	4,9	1,63	77	38,9	5,1	0,66
26	55,4	5,2	0,41	78	40,6	5,2	0,57
27	61,2	5,3	0,32	79	43,4	5,3	2,14
28	62,5	5,4	0,34	80	45,3	5,3	0,96
29	59,3	5,4	0,37	81	43,2	5,4	0,41
30	57,5	5,3	0,26	82	48,6	5,6	0,34
31	55,1	5,4	0,06	83	49,7	5,5	0,25
32	61,2	5,5	0,57	84	51,3	5,8	0,16
33	66,2	5,6	0,8	85	44,9	5,5	0,08
34	64,7	5,9	0,14	86	53,9	5,9	0,12
35	72,8	6,0	0,30	87	59,5	6,2	0,24
36	40,3	4,6	0,65	88	48,7	5,7	0,18
37	43,1	4,7	0,66	89	58,1	6,0	0,18
38	39,9	4,7	0,23	90	60,2	6,2	0,18
39	38,4	4,8	0,81	91	81,5	6,9	0,22
40	42,4	4,8	1,31	92	34,8	4,7	0,33
41	42,1	4,7	1,59	93	34,1	4,8	0,23
42	40,5	4,9	1,28	94	33,4	4,9	0,75
43	39,8	4,8	1,07	95	34,8	4,8	0,19
44	46,4	5,1	0,48	96	35,5	4,9	0,3
45	43,1	5,1	0,60	97	32,6	4,8	0,48
46	48,1	5,0	1,05	98	36,4	4,9	0,11
47	44,3	5,1	0,23	99	35,5	5,0	0,38
48	43,7	4,9	1,37	100	37,6	5,1	0,62
49	49,6	5,3	0,76	101	36,3	5,0	0,31
50	47,7	5,2	0,88	102	36,4	5,2	1,63
51	52,6	5,4	0,28	103	34,8	5,1	1,24
52	48,8	5,3	0,18	104	35,1	5,2	0,60

N° du spot	Mr (x10 ³)	p/	II	N° du spot	Mr (x10 ³)	p/	II
105	34,7	5,0	0,86	158	24,3	4,7	0,33
106	34,7	5,4	0,35	159	25,4	4,8	0,26
107	41,6	5,5	0,35	160	26,6	5,0	0,74
108	42,2	5,5	0,23	161	25,9	4,8	0,56
109	41,3	5,5	0,31	162	24,5	4,9	1,22
110	38,1	5,2	0,69	163	27,5	5,2	0,78
111	35,6	5,2	0,86	164	26,8	5,1	0,41
112	37,4	5,3	0,81	165	25,9	5,2	0,53
113	38,6	5,4	0,66	166	26,5	5,1	0,35
114	41,9	5,4	0,59	167	26,1	5,0	0,41
115	48,7	5,7	0,17	168	29,5	5,5	1,09
116	44,3	5,7	0,29	169	29,2	5,5	0,97
117	45,5	5,6	0,06	170	26,6	5,3	1,83
118	52,4	6,0	0,26	171	25,7	5,7	0,89
119	29,3	4,7	0,62	172	35,8	5,9	0,31
120	30,8	4,7	0,77	173	33,2	5,8	0,59
121	31,2	4,7	0,88	174	33,9	5,9	0,61
122	28,2	4,6	0,95	175	22,1	4,6	0,25
123	33,1	5,0	0,67	176	22,3	4,6	0,35
124	30,9	4,9	3,58	177	22,6	4,7	0,63
125	29,5	4,8	0,67	178	24,8	4,5	0,78
126	31,7	4,8	0,43	179	23,5	4,4	0,63
127	29,6	4,8	0,24	180	23,1	4,5	0,45
128	32,6	4,9	0,3	181	24,6	4,7	1,01
129	30,1	4,9	0,53	182	23,4	4,9	0,49
130	31,4	5,0	1,36	183	23,9	4,8	0,35
131	30,4	5,0	0,22	184	24,8	4,8	1,21
132	35,2	5,4	0,47	185	23,7	5,2	0,21
133	33,2	5,3	0,36	186	23,4	5,1	0,35
134	39,4	5,6	0,16	187	24,9	5,0	1,7,0
135	37,3	5,6	0,28	188	26,1	5,4	0,47
136	44,4	6,1	0,53	189	23,8	5,6	0,17
137	70,6	7,3	0,2	190	25,5	5,8	0,22
138	26,7	4,5	0,61	191	21,1	4,6	0,77
139	27,6	4,8	0,55	192	21,7	4,9	0,59
140	26,9	4,8	0,58	193	20,8	4,8	1,91
141	26,2	4,7	0,67	194	20	5,3	1,11
142	28,0	4,9	1,71	195	23,1	5,5	0,13
143	28,0	5,0	1,07	196	22,9	6,0	0,11
144	27,0	4,8	0,26	197	19,5	4,9	0,94
145	29,0	5,1	0,61	198	19,6	4,7	1,09
146	30,1	5,1	0,32	199	19,8	5,3	1,10
147	28,1	5,1	0,81	200	18,6	5,4	0,42
148	29,6	5,0	0,46	201	17,9	5,0	0,34
149	31,3	5,3	0,26	202	18,5	5,2	0,62
150	31,8	5,4	0,23	203	17,6	5,4	0,97
151	32,8	5,5	0,49	204	17,2	5,1	0,28
152	29,4	5,3	0,58	205	17,3	5,3	1,64
153	37,6	5,8	0,98	206	18,5	5,7	0,27
154	35,9	5,8	1,80	207	17,9	5,7	0,35
155	38,6	6,0	0,26	208	17,8	6,3	0,27
156	43,8	6,2	0,55	209	17,3	6,9	0,68
157	23,8	4,5	0,69	210	16,1	4,2	0,45

N° du spot	Mr (x10 ³)	p/	II	N° du spot	Mr (x10 ³)	p/	II
211	16,1	4,3	0,34	243	55,6	5,3	0,11
212	14,9	4,5	3,35	244	40,5	4,6	0,71
213	16,6	4,9	0,21	245	39,4	4,6	0,56
214	16,6	5,1	0,40	246	42,6	5,0	0,9
215	16,7	5,3	1,15	247	39,4	5,0	0,61
216	16,8	5,8	0,86	248	80,9	7,0	0,29
217	16,8	5,2	3,59	249	31,6	4,8	0,51
218	16,3	6,4	0,15	250	33,9	5,1	0,5
219	16,1	8,1	0,27	251	29,7	4,8	0,89
220	14,7	3,9	0,05	252	40,3	5,8	0,33
221	12,7	4,3	0,75	253	52,6	6,9	0,94
222	14,6	4,9	1,60	254	51,8	6,8	1,18
223	14,8	5,2	2,16	255	26,8	4,8	0,55
224	14,1	5,6	0,13	256	27,9	4,8	0,44
225	12,9	4,6	0,18	257	27,1	4,9	0,45
226	12,5	5,1	0,28	258	26,1	4,9	0,33
227	12,9	5,5	0,10	259	30,3	5,2	0,29
228	12,8	5,8	0,17	260	24,6	4,6	0,46
229	11,8	4,5	0,70	261	25,2	4,9	0,3
230	11,8	4,7	0,28	262	23,1	4,7	0,71
231	11,6	5,1	0,15	263	23,7	4,6	0,57
232	12,0	5,2	0,8	264	23,6	4,8	0,51
233	81,9	5,2	0,23	265	21,5	4,5	0,27
234	72,9	5,2	0,34	266	20,8	4,9	0,38
235	76,3	5,2	0,17	267	21,1	4,7	1,45
236	100,2	6,5	0,29	268	19,1	4,4	0,20
237	104,1	6,7	0,51	269	19,4	5,0	1,84
238	107,2	6,9	0,43	270	17,1	3,9	0,17
239	55,8	4,8	0,45	271	16,7	4,3	0,26
240	68,5	5,5	1,38	272	13,3	5,1	0,25
241	68,1	5,5	0,8	273	12,8	4,5	0,26
242	43,2	4,6	0,96	274	12,1	5,1	0,67

VIII. Liste des Publications et Communications

Publication parue :

"A 16 kDa protein family overexpressed by *Streptococcus thermophilus* PB18 in acid environments."

H. Gonzalez-Marquez, **C. Perrin**, P. Bracquart, C. Guimont and G. Linden.

Microbiology (1997), 143, 1587-1594.

"Expression of a new cold shock protein of 21,5 kDa and of the major cold shock protein by *Streptococcus thermophilus* after cold shock."

C. Perrin, C. Guimont, P. Bracquart and J.-L. Gaillard.

Current Microbiology (1999), 39, 342-347.

Publications sous presse :

"Etablissement de l'empreinte protéique de base de *Streptococcus thermophilus* par 2D-PAGE."

C. Perrin, P. Bracquart, J.-L. Gaillard et C. Guimont.

Sciences des Aliments (sous presse).

"Reference map of soluble proteins from *Streptococcus thermophilus* by two-dimensional electrophoresis." **C. Perrin**, H. Gonzalez-Marquez, J.-L. Gaillard, P. Bracquart and C. Guimont. Electrophoresis (sous presse).

Publication soumise :

"*Streptococcus thermophilus*: physiological and biochemical responses to cold shock."

C. Perrin, C. Guimont, J.-L. Gaillard and P. Bracquart.

Soumise à "Le Lait"

Communications affichées :

"A global analysis of 2D protein patterns of *Streptococcus thermophilus* ."

Troisième Congrès Nutrition Franco-Britannique, Nancy 30 septembre/2 Octobre 1998

C. Perrin, P. Bracquart, J.-L. Gaillard and C. Guimont.

"Cold shock response of *Streptococcus thermophilus*."

Neuvième colloque des bactéries lactiques, Bourg en Bresse Octobre 1998.

C. Perrin, C. Guimont, J.-L. Gaillard and P. Bracquart.

"Two dimensional global protein expression profile of *Streptococcus thermophilus*."

Neuvième colloque des bactéries lactiques, Bourg en Bresse Octobre 1998.

C. Perrin, P. Bracquart, J.-L. Gaillard and C. Guimont.

"Purification, identification et caractérisation d'une protéine de 16 kDa surexprimée par *Streptococcus thermophilus* PB18."

Huitième colloque des bactéries lactiques, Dijon 28/30 mai 1997.

H. Gonzalez-Marquez, **C. Perrin**, P. Bracquart et C. Guimont.

"Réponses aux températures basses de *Streptococcus thermophilus* : paramètres physiologiques."

Huitième colloque des bactéries lactiques, Dijon 28/30 mai 1997.

C. Perrin, H. Gonzalez-Marquez, P. Bracquart et C. Guimont.

"Proteins in adaptation to low temperature and acidic conditions in an industrial strain of *Streptococcus thermophilus*."

Fifth Symposium on Lactic Acid Bacteria : genetics, metabolism and applications. veldhoven, The Netherlands, 1996 September 8/12.

C. Perrin, H. Gonzalez-Marquez, P. Bracquart and C. Guimont.

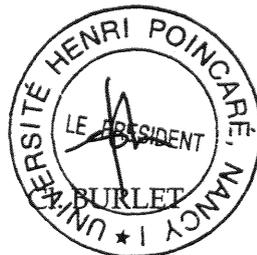
Mademoiselle PERRIN Clarisse

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY-I
en BIOCHIMIE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 15 novembre 1999 n° 305

Le Président de l'Université



Résumé

Streptococcus thermophilus est une bactérie lactique entrant dans la fabrication de certains produits laitiers. Lors de la technologie de fabrication, les levains sont soumis à différents stress comme les montées et descentes en températures.

La réponse au choc froid chez *Sc. thermophilus* a été étudiée aux niveaux physiologiques et synthèse protéique.

Les cellules en phase exponentielle de croissance cultivées à 42°C, exposée à 15 ou à 20°C ont leur temps de génération multipliés respectivement par 60 et 16 fois.

L'électrophorèse bidimensionnelle sur minigel a été mise au point afin d'étudier l'expression protéique en condition de choc froid. Deux protéines de choc froid ont été mises en évidence :

- Une protéine de 21,5 kDa a été purifiée en trois étapes (fractionnement par précipitation au sulfate d'ammonium, chromatographie échangeuse d'anions, et HPLC en phase inverse). L'extrémité N-terminale de 21 résidus acides aminés déterminée par dégradation d'Edman ne présente aucune homologie avec les séquences actuellement connues dans les banques de données,
- Une protéine de 7,5 kDa, dont le microséquençage de l'extrémité N-terminale a permis de caractériser cette protéine comme étant homologue à la protéine de choc froid ubiquitaire CspA d'*E. coli*.

En parallèle des travaux réalisés sur la réponse au choc froid, l'étude des profils protéiques obtenus par électrophorèses bidimensionnelles de *Sc. thermophilus* a été réalisée afin de proposer une cartographie protéomique préliminaire, avec le positionnement de 12 protéines caractérisées par dégradation d'Edman.

Mots clés :

Streptococcus thermophilus / Choc froid / "Cold Shock Protein" / Csp / Cartographie / Protéomique.