



50376  
1999  
333

# THESE

Présentée à

## L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Pour obtenir le titre de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Spécialité : Génie Enzymatique Bioconversion et Microbiologie



par

**Nour Eddine CHIHIB**

**Réponse physiologique aux stress thermiques et à l'addition de nisine  
de *Pectinatus frisingensis* bactérie anaérobie d'altération de la bière,  
Etude de la résistance à la nisine**

Soutenue le 07 Mai 1999 devant la Commission d'Examen :

- Président** Pr. J.P. HORNEZ (Université des Sciences et Technologies de Lille)
- Rapporteurs** Pr. J.P. LARPENT (Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand)  
Dr. A. PAUSS (Université de Technologie de Compiègne)
- Examineurs** Dr. M. FEDERIGHI (Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes)  
Pr. N. ORANGE (Institut Universitaire de Technologie de Biologie Appliquée d'Evreux)  
Dr. J.L. THOLOZAN (Institut National de la Recherche Agronomique Villeneuve d'Ascq)

## Remerciements

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Génie des Procédés et Technologie Alimentaires de l'institut National de la Recherche Agronomique de Villeneuve d'Ascq.*

*Je remercie tout d'abord Monsieur J.F MAINGONNAT, Directeur du Laboratoire de Génie des Procédés et Technologie Alimentaire (L.G.P.T.A.), pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.*

*Ma gratitude s'adresse tout particulièrement à Monsieur J.L. THOLOZAN chargé de recherche au LGPTA pour m'avoir accueilli dans son équipe, pour les conseils et le soutien prodigués tout au long de ce travail et pour la confiance et la sympathie qu'il m'a témoignés.*

*Je remercie l'ensemble du jury de la thèse :*

*Monsieur J.P. HORNEZ Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille qui a bien voulu assurer la présidence.*

*Messieurs J.P. LARPENT Professeur à l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand et A. PAUSS Maître de Conférence à l'Université de Technologie de Compiègne d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.*

*Madame N. ORANGE Professeur à l'IUT de Biologie Appliquée d'Evreux, et Monsieur J.M. FEDERIGHI Maître de conférence à l'École Vétérinaire de Nantes d'avoir accepté d'être examinateurs de ce travail.*

*J'adresse également mes remerciements à Mademoiselle J.M. MEMBRE pour les analyses statistiques, à Madame V. LEBRET pour son aide lors des électrophorèses.*

*Je remercie également tous les stagiaires qui ont contribué à l'avancement de ce travail.*

*Je tiens à remercier Monsieur G. DELATTRE pour le concours précieux apporté à la réalisation de certaines expériences et pour ses conseils et pour toute sa disponibilité.*

*Je remercie Mr J.P. HORNEZ de m'avoir permis de réaliser les analyses des acides gras membranaires en GC/MS au sein de son Laboratoire.*

*Je remercie Mlle F. GAVINI pour sa gentillesse et sa disponibilité.*

*Je remercie Mlle C. FAILLE de m'avoir permis de réaliser les électrophorèses au sein de son laboratoire.*

*Je remercie également Mr J. VASSEUR de m'avoir permis d'utiliser le densitomètre pour les gels d'électrophorèse.*

*Je présente mes remerciements à Mme M. MEYER, Mme A. RONSE, Mr D. CILLIER et Mr J. JACQUEMONT et A. FOURMENT pour leur sympathie.*

*Je remercie enfin chaleureusement le personnel du L.G.P.T.A., qui par sa sympathie et sa disponibilité a permis le déroulement de cette thèse dans les meilleures conditions.*

*Je dédie ce travail  
à mon Père et ma Mère  
à mes frères et soeurs  
à mes beaux-frères  
à ma belle sœur  
à mes neveux et nièces  
à toute ma famille  
particulièrement à ma femme*

*et je leur dis*

*"Mon coeur deviendra-t-il un arbre lourdement chargé de fruits que je pourrai cueillir  
et Vous donner ?"*

*Khalil GIBRAN*

# Réponse physiologique aux stress thermiques et à l'addition de nisine de *Pectinatus frisingensis* bactérie anaérobie d'altération de la bière, Etude de la résistance à la nisine

## RESUME

*Pectinatus frisingensis* est une bactérie anaérobie stricte de la flore d'altération brassicole. Le volume cellulaire, la charge adénylique, le pH intracellulaire et les teneurs intracellulaires en ions potassium sont mesurés dans des suspensions cellulaires préparées à partir de culture en fin de phase exponentielle, dans différentes conditions physiologiques, afin d'évaluer la capacité de la bactérie à maintenir son homéostasie cellulaire. Les conditions optimales (croissance) sont la présence de glucose (30 mM) et un pH de 6,2, les conditions hostiles (croissance) sont un pH de 4,5, l'absence de glucose et un choc froid (2°C). Les cellules sont capables de maintenir un pH intracellulaire supérieur à celui du milieu extracellulaire quelles que soient les conditions testées. Une faible sortie d'ions potassium est toujours mesurée dans les cellules en privation nutritionnelle. Par contre l'addition de glucose conduit à une nette accumulation des ions potassium. Le traitement au froid conduit à une sortie rapide des ions K<sup>+</sup>, une diminution du pH intracellulaire chez les cellules métabolisant le glucose. Ainsi, le traitement froid perturbe l'homéostasie de *P. frisingensis*. Toutefois, les bactéries sont capables de restaurer leur homéostasie en présence de glucose et sous des conditions de température favorables.

*P. frisingensis*, bactérie à Gram négatif est sensible à la nisine. Une augmentation de la concentration en nisine (0 à 1100 IU/ml) dans le milieu de culture prolonge le temps de latence et diminue le taux de croissance. De plus, l'addition de faibles concentrations de nisine aux cellules de *P. frisingensis* conduit à une sortie immédiate de K<sup>+</sup> intracellulaire. Les sorties des ions potassium ont été mesurées dans des suspensions cellulaires de *P. frisingensis* exposées à l'effet combiné de la nisine (100 à 500 IU/ml), un choc thermique de 10 min, traitement thermique modéré (50°C) ou choc froid (2°C), à pH 4,0 ou 6,2. Les sorties des ions K<sup>+</sup> à la fois des cellules en privation nutritionnelle et de celles métabolisant le glucose, sont plus importantes à pH 6,2, quelles que soit la température du traitement thermique et la concentration de nisine ajoutée. La réincubation des suspensions cellulaires de *P. frisingensis* métabolisant le glucose exposées aux stress combinés, montre que les cellules exposées à un choc froid réaccumulent plus de K<sup>+</sup> que les cellules exposées à un traitement thermique chaud quelles que soient les conditions de pH.

Une souche de *P. frisingensis* (Nis-5000) résistante à une concentration élevée de nisine (5000 UI/ml) a été isolée et l'implication de l'enveloppe cellulaire dans la résistance à la nisine a été étudiée. Le phénotype de résistance de la souche Nis-5000 est stable après 5 repiquages sur milieu sans nisine. Par contre, la souche Nis-5000 perd sa capacité à se multiplier en présence de nisine (5000 UI/ml) après 10 repiquages sur milieu sans nisine. Les cellules de la souche parentale traitées ou non à l'EDTA (10 mM) sont affectées par la nisine (1000 UI/ml), alors que les cellules de la souche Nis-5000 traitées ou non ne sont pas affectées, suggérant que les lipopolysaccharides ne sont pas impliqués dans la résistance à la bactériocine de la souche Nis-5000. Les modifications de la composition des acides gras membranaires de la souche Nis-5000 mise en culture en présence ou en absence de nisine (5000 UI/ml) affectent principalement les acides gras C17:1 (P < 0.05) et C18:cyclo (P < 0.05), ce qui conduit à une diminution du degré d'insaturation de la membrane de la souche Nis-5000. La diminution de la fluidité membranaire doit probablement protéger la souche Nis-5000 de l'action de la nisine.

**Mots clés :** *Pectinatus frisingensis*, potassium, Gram négatif, homéostasie, résistance, nisine, acides gras membranaires.

**Physiological response to temperature stress and nisin addition of *Pectinatus frisingensis*, a beer spoilage anaerobic bacterium,  
Study of nisin resistance**

**SUMMARY**

*Pectinatus frisingensis* is a strictly anaerobic mesophilic bacterium involved in beer spoilage. Cellular volume, adenylate energy charge, intracellular pH and intracellular potassium concentration measurements were performed in late exponential-phase cell suspensions placed in different physiological conditions, to evaluate the capability of this bacterium to maintain cellular homeostasis. Optimum physiological conditions were the presence of a carbon source and a pH of 6.2, hostile conditions were a pH 4.5, absence of a carbon source, and rapid cooling treatment. The cell was able to maintain a higher intracellular pH than the external pH under all conditions. A low net potassium efflux rate was routinely measured in starving cells, while glucose addition promoted immediate net potassium uptake from the medium. Cooling treatment resulted in a sudden net potassium efflux from the cell, and a decrease of the intracellular pH. A cold treatment perturbs *P. frisingensis* homeostasis, but the bacteria were able to restore their homeostasis in the presence of a carbon source, and under warm conditions.

*P. frisingensis*, a Gram-negative bacterium is sensitive to nisin. An increase in nisin concentration (0 to 1100 IU/ml) added to the culture medium prolonged the lag phase, and decreased the growth rate of the bacterium. In addition, late exponential cells of *P. frisingensis* exposed to low concentrations of nisin lost immediately a part of their intracellular  $K^+$ . Presence of  $Mg^{2+}$  up to 15 mM did not protect *P. frisingensis* from nisin-induced loss of viability and  $K^+$  efflux. Potassium leaks were also measured in *P. frisingensis* late exponential phase cells exposed to combined effects of nisin addition (100 to 500 IU/ml), 10-min mild heat-treatment (50°C) or rapid cooling (2°C), and pH (4.0 and 6.2). Net  $K^+$  efflux from both starving and glucose-metabolizing cells, was more important at pH 6.2, whatever temperature treatment and nisin addition. Reincubation at 30°C of *P. frisingensis* glucose-metabolizing cells exposed to a preliminary combination of nisin addition and mild heat or cooling down treatment, showed that cells exposed to rapid cooling reaccumulated more  $K^+$  than heat-treated cells whatever pH conditions.

A resistant strain of *P. frisingensis* (Nis-5000) to high nisin concentration (5000 IU/ml) was isolated and the involvement of cell envelope in nisin resistance was investigated. The nisin resistance of Nis-5000 strain was stable after 5 passages through nisin free medium. However, Nis-5000 lost its capability to grow in the presence of nisin (5000 IU/ml) after 10 passages through nisin free medium. Both control and 10 mM EDTA treated cells of the wild type strain were affected by nisin (1000 IU/ml). By contrast, control and 10 mM EDTA treated cells of Nis-5000 strain were not affected by nisin, suggesting that the lipopolysaccharides were not involved in nisin resistance of Nis-5000 strain. Changes of membrane fatty acid composition in Nis-5000 strain grown in the presence or absence of nisin (5000 IU/ml) occurred mainly in C17:1 ( $P < 0.05$ ) and C18:cyclo ( $P < 0.05$ ) and lead to a decrease of the unsaturation degree of the membrane suggesting that the fundamental changes occurred in membrane fluidity which probably protect Nis-5000 strain from nisin effect.

**Key words :** *Pectinatus frisingensis*, Gram negative, homeostasis, nisin resistance, potassium membrane fatty acids.

**LISTES DES PUBLICATIONS SE  
RAPPORTANT A CE TRAVAIL**

**Articles dans les journaux scientifiques**

**CHIHIB, N.E., THOLOZAN, JL.** (1998). Effect of rapid cooling and acidic pH on cellular homeostasis of *Pectinatus frisingensis*, a strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. Int. J. Food Microbiol. (Sous presse). Ref. No. MS 2026/99.

**CHIHIB, N.E., MONNERAT, L., MEMBRÉ, JM., THOLOZAN, JL.** (1999). Nisin, temperature and pH modification effects on growth and viability of *Pectinatus frisingensis*, a Gram-negative, strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. J. Appl. Microbiol. (Sous presse). Ref. No. 7051/1/99.

**CHIHIB, N.E., CREPIN T., DELATTRE, G., THOLOZAN, JL.** (1999). Involvement of cell envelope in nisin resistance of *Pectinatus frisingensis*, a Gram-negative, strictly anaerobic beer-spoilage bacterium naturally sensitive to nisin. FEMS Microbiol. lett. (Sous presse). Ref. No. TN 99/06.

**Communications présentées dans les congrès**

**CHIHIB N.E., THOLOZAN, JL.** (1998). Physiological response of *Pectinatus frisingensis* a beer spoilage bacterium, exposed to rapid cooling. Symposium Hygiène, qualité et sécurité dans la chaîne du froid et le conditionnement d'air. Société d'exploitation de la cité des congrès, Nantes. (sous presse).

**THOLOZAN, JL., FEDERIGHI, M., CAPPELIER, J.M., JUGIAN, F., CHIHIB N.E., DELATTRE, G.** (1998). Physiological response of food spoilage or pathogenic microorganisms to a cold treatment or to combined stabilisation treatments including rapid cooling. Symposium Hygiène, qualité et sécurité dans la chaîne du froid et le conditionnement d'air. Société d'exploitation de la cité des congrès, Nantes. (sous presse).

**CHIHIB, N.E., CREPIN, T., DELATTRE, G., THOLOZAN, JL.** (1998). Nisin resistance of *Pectinatus frisingensis* a Gram negative and beer spoilage bacterium. XII<sup>th</sup> Forum for Applied Biotechnology, 24-25 September, Brugge, Belgium. In Med Fac landbouww Univ Gent 62/4b : 2239-2242.

- CHIHIB N.E., THOLOZAN, JL.** (1998). Mécanisme d'action de la nisine sur *Pectinatus frisingensis*, bactérie à Gram négatif: les événements précoces. V<sup>ème</sup> Congrès de la Société Française de Microbiologie 27, 28, 29 avril 1998, Lille. pp 174.
- CHIHIB, N.E., MONNERAT, L., THOLOZAN, JL.** (1997). Effet de la nisine et de la nisine combinée à un choc froid sur *Pectinatus frisingensis*, bactérie contaminant la bière. Dans : Microorganismes Anaérobies. Société Française de Microbiologie, Paris. pp 25-31.
- THOLOZAN, JL., DECAUDIN, M., GUERLAVA, P., CHIHIB N.E., JACQUEMONT, J.** (1997). Réponse bactérienne aux traitements minimaux de stabilisation des aliments. AGORAL 97. La conservation des aliments. IX<sup>ème</sup> rencontres scientifiques et technologiques des industries alimentaires, 2-3 avril 1997, Nancy, France, Lavoisier Technique & Documentation, Paris. pp : 381-386.
- CHIHIB N.E., THOLOZAN, JL.** (1997) The effect of cold shock on *Pectinatus frisingensis*, a beer spoilage bacterium. X<sup>th</sup> Forum for Applied Biotechnology, 26-27 September, Brugge, Belgium. In Med Fac landbouww Univ Gent 61/4a : 2219-2222.
- CHIHIB, N.E., THOLOZAN, JL.** (1996). Potassium and sodium movements in *Pectinatus frisingensis* resting cells during a cold shock. XXIII<sup>th</sup> Forum of the Young Researchers of the French Society of Biochemistry and Molecular Biology. 2-5 July 1996. pp : 104. Poitiers (France).

### **Stagiaires encadrés**

- DHENNIN Patrice.** (1996). Etude de l'effet d'un choc froid sur une bactérie contaminant la bière *Pectinatus frisingensis*. IUT Biologie appliquée, Université de Lille I.
- MONNERAT Laurent.** (1997). Effet de la nisine combinée ou non à des chocs thermiques sur *Pectinatus frisingensis* (DSM 20467), bactérie anaérobie stricte contaminant la bière. DEA. Sciences de la vie et de la santé, Universités Lille I et Lille II.
- CREPIN Thibaut.** (1998). Etude des stratégies de résistance de *Pectinatus frisingensis* DSM 20467 à la nisine. DEA Microbiologie fondamentale et appliquée, Universités de Caen (I.B.B.A), de Rennes et de Bretagne occidentale, Brest-Quimper (Faculté des Sciences).

# ***TABLE DES MATIERES***

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

## BIBLIOGRAPHIE

<b>I. GÉNÉRALITÉS SUR LA PRODUCTION ET LA FLORE D'ALTÉRATION DE LA BIÈRE .....</b>	<b>6</b>
I.1 PROCÉDÉ BRASSICOLE .....	7
<i>I.1.1 Le maltage</i> .....	7
<i>I.1.2 Le brassage</i> .....	7
<i>I.1.3 La fermentation primaire</i> .....	8
<i>I.1.4 La fermentation secondaire</i> .....	9
<i>I.1.5 La filtration, stabilisation et conditionnement</i> .....	9
<i>I.1.6 Importance de la température dans l'industrie brassicole</i> .....	10
I.2 GÉNÉRALITÉS SUR LES FLORES D'ALTÉRATION EN BRASSERIE .....	11
<i>I.2.1 Les sources de contamination en brasserie</i> .....	11
<i>I.2.2 Les contaminants d'origine bactérienne</i> .....	13
I.2.2.1 Les bactéries à Gram positif .....	13
I.2.2.1.1 <i>Lactobacillus</i> .....	13
I.2.2.1.2 <i>Pediococcus</i> .....	14
I.2.2.1.3 <i>Les Kocuria et les Staphylococcus</i> .....	15
I.2.2.2 Les bactéries à Gram négatif.....	15
I.2.2.2.1 <i>Les bactéries acétiques</i> .....	16
I.2.2.2.2 <i>Enterobacteriaceae</i> .....	17
I.2.2.2.3 <i>Zymomonas</i> .....	18
I.3 LES BACTÉRIES ANAÉROBIES STRICTES .....	18
<i>I.3.1 Le genre Pectinatus</i> .....	19
<i>I.3.2 Pectinatus frisingensis</i> .....	20
I.3.2.1 Caractéristiques morphologiques.....	20
I.3.2.2 Croissance de <i>P. frisingensis</i> .....	21
I.3.2.3 Métabolisme de <i>P. frisingensis</i> .....	21
I.3.2.4 Caractéristiques de l'enveloppe cellulaire de <i>P. frisingensis</i> .....	22
I.3.2.5 Thermorésistance de <i>P. frisingensis</i> .....	23
I.4 CONCLUSION .....	23
<b>II. TRAITEMENTS DE STABILISATION DE LA BIÈRE .....</b>	<b>25</b>
II.1 TRAITEMENTS CLASSIQUES DE STABILISATION .....	26
II.2 LES TRAITEMENTS DE STABILISATION ALTERNATIFS .....	27
<i>II.2.1 Filtration tangentielle</i> .....	28
<i>II.2.2 Les bactériocines comme moyen de stabilisation</i> .....	29
II.3 THÉORIE DES BARRIÈRES.....	29
II.4 CONCLUSION.....	31
<b>III. HOMÉOSTASIE ET RÉPONSES CELLULAIRES AUX CONDITIONS HOSTILES .....</b>	<b>32</b>

III.1 IMPLICATION DES PROTONS, DU SODIUM ET DU POTASSIUM DANS L'HOMÉOSTASIE CELLULAIRE.....	32
<b>III.1.1 Les protons et la force proton-motrice</b> .....	32
<b>III.1.2 Les ions sodium</b> .....	33
III.1.2.1 Les ions sodium et la régulation du pH intracellulaire.....	34
III.1.2.2 Les ions Na <sup>+</sup> et le cotransport de substrats.....	35
III.1.2.3 Les ions Na <sup>+</sup> et la bioénergétique.....	35
<b>III.1.3 Les ions potassium</b> .....	36
III.1.3.1 Systèmes de transport du potassium.....	36
<b>III.1.3.1.1 Systèmes d'entrée des ions potassium</b> .....	37
<b>III.1.3.1.2 Les systèmes de sorties des ions potassium</b> .....	38
III.1.3.2 Les ions potassium et la régulation du pH intracellulaire.....	39
<b>III.1.3.2.1 Les ions potassium et la régulation de la pression de turgescence cellulaire</b> .....	40
<b>III.1.3.2.2 Le potassium comme marqueur cellulaire de stress</b> .....	40
III.2 RÉPONSE BACTÉRIENNE AUX STRESS.....	41
<b>III.2.1 Stress froid</b> .....	42
<b>III.2.2 Stress chaud</b> .....	43
<b>III.2.3 Homéostasie cellulaire de <i>P. frisingensis</i> exposé à un choc thermique positif</b> ... 44	
III.3 CONCLUSION.....	45
IV. LA NISINE.....	47
IV.1 CLASSIFICATION DES BACTÉRIOCINES DES BACTÉRIES LACTIQUES.....	48
<b>IV.1.1 Les Lantibiotiques</b> .....	48
<b>IV.1.2 Les non-lantibiotiques à faible poids moléculaire</b> .....	48
<b>IV.1.3 Les non-lantibiotiques à haut poids moléculaire</b> .....	49
<b>IV.1.4 Les complexes lipo-ou glyco-protéiques</b> .....	49
IV.2 LA NISINE.....	49
<b>IV.2.1 Biosynthèse</b> .....	50
<b>IV.2.2 Mécanismes d'action</b> .....	51
IV.2.2.1 Spectre d'action.....	51
IV.2.2.2 Formation des pores.....	51
<b>IV.2.3 Conséquences de l'action de la nisine sur l'homéostasie cellulaire</b> .....	52
<b>IV.2.4 Facteurs influençant l'activité bactéricide de la nisine</b> .....	53
<b>IV.2.5 Rôle physiologique de la nisine pour la souche productrice</b> .....	54
<b>IV.2.6 Unités de l'activité de la nisine</b> .....	55
<b>IV.2.7 Propriétés physico-chimiques de la nisine</b> .....	55
<b>IV.2.8 Toxicité</b> .....	56
<b>IV.2.9 Utilisation de la nisine en industrie agro-alimentaire</b> .....	57
IV.3 LE PHÉNOMÈNE DE RÉSISTANCE.....	58
<b>IV.3.1 Résistance par inactivation enzymatique de la nisine</b> .....	59
<b>IV.3.2 Résistance par des modifications de l'enveloppe cellulaire</b> .....	60
IV.3.2.1 Résistance par des modifications de la paroi.....	60
IV.3.2.2 Résistance par des modifications de la membrane cytoplasmique.....	60
IV.4 CONCLUSION.....	61

# MATERIELS ET METHODES

<b>I. TECHNIQUES BIOLOGIQUES.....</b>	<b>65</b>
I.1 MILIEU DE CULTURE ET SOUCHE BACTÉRIENNE .....	65
I.1.1 <i>Souche bactérienne</i> .....	65
I.1.2 <i>Composition du milieu de culture</i> .....	65
I.1.3 <i>Préparation</i> .....	65
I.2 PRÉPARATION DES SUSPENSIONS CELLULAIRES CONCENTRÉES .....	66
I.3 DÉNOMBREMENT DES CELLULES.....	67
I.4 APPLICATION DE STRESS AUX BACTÉRIES .....	67
I.4.1 <i>Choc froid</i> .....	67
I.4.2 <i>Choc chaud</i> .....	68
I.4.3 <i>Addition de nisine</i> .....	68
I.4.4 <i>Addition d'ionophores</i> .....	69
I.5 TRAITEMENT À L'EDTA.....	69
<b>II. PLANIFICATION EXPÉRIMENTALE.....</b>	<b>70</b>
<b>III. TECHNIQUES ANALYTIQUES.....</b>	<b>73</b>
III.1 SUIVIS DE CROISSANCE .....	73
III.2 DOSAGE DU GLUCOSE .....	73
III.3 DOSAGE DES PROTÉINES.....	74
III.4 DOSAGE DES NUCLÉOTIDES ADÉNYLIQUES .....	74
III.5 MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE.....	76
III.6 DOSAGES DES CONCENTRATIONS INTRA ET EXTRACELLULAIRES EN IONS $\text{Na}^+$ ET $\text{K}^+$ .....	76
III.6.1 <i>Préparation des échantillons</i> .....	77
III.7 MÉTHODE D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DES ACIDES GRAS .....	78
III.7.1 <i>Préparation des réactifs</i> .....	78
III.7.2 <i>Extraction des acides gras membranaires</i> .....	79
III.7.3 <i>Chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse</i> .....	80
III.8 EXTRACTION ET SÉPARATION DES PROTÉINES MAJORITAIRES DE LA MEMBRANE EXTERNE.....	81
III.8.1 <i>Extraction</i> .....	81
III.8.2 <i>Séparation et identification des protéines de la membrane externe</i> .....	82
III.8.3 <i>Coloration et révélation des protéines</i> .....	83
III.8.3.1 Coloration au bleu de Coomassie.....	83
III.8.3.2 Coloration au nitrate d'argent .....	83
III.8.4 <i>Analyse informatique des gels</i> .....	84
III.9 MESURES DES VOLUMES, PH ET LE POTENTIEL DE MEMBRANE DES CELLULES.....	84
III.9.1 <i>Le volume cellulaire</i> .....	85
III.9.2 <i>Le pH intracellulaire</i> .....	85
III.9.3 <i>Le potentiel de membrane</i> .....	86
III.9.4 <i>Préparation des échantillons</i> .....	86
III.9.5 <i>Comptage de la radioactivité des échantillons</i> .....	87

# RESULTATS ET DISCUSSIONS

INTRODUCTION RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	87
--	----

## CHAPITRE I

### I. EFFET DU PH SUR L'HOMÉOSTASIE CELLULAIRE DE *P. FRISINGENSIS* ..... 89

I.1 MOUVEMENTS DES IONS POTASSIUM EN PRÉSENCE ET EN ABSENCE DE GLUCOSE.....	89
I.2 CARACTÉRISATION DES MOUVEMENTS DES IONS $K^+$ CHEZ <i>P. FRISINGENSIS</i> .....	90
<i>I.2.1 Mouvements des ions <math>K^+</math> en présence du 2-déoxyglucose</i> .....	91
<i>I.2.2 Effet du CCCP et du DCCD sur les entrées des ions <math>K^+</math></i> .....	91
I.3 PH INTRACELLULAIRE ET VOLUME CELLULAIRE.....	92
I.4 CHARGE ADÉNYLIQUE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES .....	93

### II. DISCUSSION ET CONCLUSION ..... 93

### III. EFFET D'UN CHOC FROID SUR L'HOMÉOSTASIE CELLULAIRE DE *P. FRISINGENSIS* À PH 4,5 OU À PH 6,2 ..... 96

III.1 MOUVEMENTS DES IONS POTASSIUM CHEZ <i>P. FRISINGENSIS</i> EN ABSENCE ET EN PRÉSENCE DE GLUCOSE.....	96
<i>III.1.1 Réversibilité des mouvements de <math>K^+</math> lors d'une réincubation à 30°C des cellules traitées au froid (2°C)</i> .....	97
<i>III.1.2 Nature des sorties des ions <math>K^+</math> provoquées par un choc froid chez <i>P. frisingensis</i></i> .....	98
III.2 EFFET DU TRAITEMENT FROID SUR LE PH INTRACELLULAIRE ET LE VOLUME CELLULAIRE.....	98
III.3 MODIFICATIONS DE LA CHARGE ADÉNYLIQUE APRÈS UN CHOC FROID .....	99

### IV. DISCUSSION ET CONCLUSION ..... 99

## CHAPITRE II

### I. Effet de la nisine sur *Pectinatus frisingensis* ..... 104

I.1 EFFET DE LA NISINE SUR LA CROISSANCE DE <i>P. FRISINGENSIS</i> .....	104
<i>I.1.1 Effet de la nisine sur Escherichia coli ATCC 10536</i> .....	105
I.2 EFFET DE LA NISINE SUR L'HOMÉOSTASIE CELLULAIRE DE <i>P. FRISINGENSIS</i> .....	106
<i>I.2.1 Effet d'ajout croissant de nisine sur les cellules de <i>P. frisingensis</i></i> .....	106
<i>I.2.2 Cinétiques d'efflux de potassium cellulaire en présence de nisine et influence sur la viabilité cellulaire</i> .....	106
<i>I.2.3 Effet de la nisine sur le volume cellulaire, le pH intracellulaire et le potentiel de membrane</i> .....	108

### II. Discussion et conclusion ..... 108

### III. Effet combiné de la nisine, du pH et de la température sur la perméabilité cellulaire de *P. frisingensis* ..... 111

III.1 QUANTIFICATION DE L'EFFET COMBINÉ DES DIFFÉRENTS TRAITEMENTS SUR LA PERMÉABILITÉ CELLULAIRE : ILLUSTRATION À L'AIDE D'UN EXEMPLE.....	111
---	-----

III.2 RÉSULTATS DES PLANS D'EXPÉRIENCES .....	113
III.2.1 Sorties nettes d'ions $K^+$ des cellules de <i>P. frisingensis</i> en privation nutritionnelle	113
III.2.2 Sorties nettes d'ions $K^+$ des cellules de <i>P. frisingensis</i> en présence de glucose...	114
III.2.3 Réaccumulation nette d'ions $K^+$ par les cellules de <i>P. frisingensis</i> après les stress combinés.....	116
IV. Discussion et conclusion.....	117

## CHAPITRE III

<b>I. ETUDE DE LA RÉSISTANCE À LA NISINE CHEZ <i>PECTINATUS FRISINGENSIS</i></b>	<b>121</b>
I.1 ISOLEMENT D'UNE SOUCHE DE <i>P. FRISINGENSIS</i> RÉSISTANTE À LA NISINE .....	121
I.2 COMPARAISON DES CINÉTIQUES DE CROISSANCE ET DE VIABILITÉ CELLULAIRE DE LA SOUCHE RÉSISTANTE ET LA SOUCHE PARENTALE EN PRÉSENCE DE NISINE (5000 UI/ML).....	122
I.3 CARACTÉRISTIQUES DE LA SOUCHE RÉSISTANTE À DE FORTES CONCENTRATIONS EN NISINE	123
I.3.1 <i>Stabilité de la résistance</i> .....	123
I.4 CARACTÉRISTIQUES PHYSIOLOGIQUES DE LA SOUCHE RÉSISTANTE.....	124
I.5 RÉSISTANCE CROISÉE .....	124
<b>II. DISCUSSION ET CONCLUSION</b> .....	<b>125</b>
<b>III. IMPLICATION DE L'ENVELOPPE CELLULAIRE DE <i>P. FRISINGENSIS</i> DANS LA RÉSISTANCE À LA NISINE</b> .....	<b>128</b>
III.1.1 <i>Implication des lipopolysaccharides dans la résistance</i> .....	128
III.1.2 <i>Implication des acides gras membranaires dans la résistance.</i> .....	129
III.1.3 <i>Les protéines majoritaires de la membrane externe</i> .....	130
<b>IV. DISCUSSION ET CONCLUSION</b> .....	<b>132</b>
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	134
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	138
ANNEXES.....	165

# ***LISTES DES ILLUSTRATIONS***

## LISTES DES FIGURES

	Page
Figure 1 : <i>Modèle en bois montrant une servante Egyptienne brassant la maische.</i>	4
Figure 2 : <i>Procédé brassicole. Les principales étapes de la fabrication de la bière</i>	5
Figure 3 : <i>Exemples de combinaison de traitement de stabilisation dans la cadre de la théorie de barrières.</i>	28
Figure 4 : <i>Modèle présentant l'implication de la KdpD et de la KdpE dans la régulation de l'expression de l'opéron kdpABC</i>	36
Figure 5 : <i>Séquence d'acides aminés de la molécule pré-nisine juste après la traduction</i>	48
Figure 6 : <i>Structure de la nisine A</i>	48
Figure 7 : <i>Modèles proposés de formation de pores par la nisine</i>	50
Figure 8 : <i>Effet de la nisine (60UI/ml) sur les composante de la force proton-motrice chez Listeria monocytogenes</i>	51
Figure 9 : <i>Cinétique des traitements thermiques froid et chaud</i>	67
Figure 10 : <i>Réaction mises en jeux pour le dosage du glucose</i>	72
Figure 11 : <i>Protocole d'analyse des teneurs intra et extracellulaires des ions sodium et potassium</i>	76
Figure 12 : <i>Protocole d'extraction des acides gras</i>	78
Figure 13 : <i>Préparation des échantillons pour les mesures du volume cellulaire, du pH interne et du potentiel de membrane chez P. frisingensis</i>	85
Figure 14 : <i>Evolution des concentrations intracellulaires des ions K<sup>+</sup> dans les suspensions cellulaires concentrées de P. frisingensis</i>	89
Figure 15 : <i>Mouvements des ions K<sup>+</sup> chez P. frisingensis en présence de 2 déoxyglucose et de DCCD (500 μM) ou du CCCP (500 μM)</i>	91
Figure 16 : <i>Photographie en microscopie électronique à balayage réalisée avec une suspension cellulaire de P. frisingensis incubée à 30°C à pH 6,2 en présence de glucose 30 mM.</i>	92
Figure 17 : <i>Photographie en microscopie électronique à balayage réalisée avec une suspension cellulaire de P. frisingensis incubée à 30°C à pH 4,5 en présence de glucose 30 mM.</i>	92

Figure 18 :	<i>L'effet du traitement froid sur les concentrations intracellulaires en ions potassium chez P. frisingensis en état de privation nutritionnelle</i>	96
Figure 19 :	<i>Effet du choc froid sur les concentrations intracellulaires en ions potassium dans des suspensions cellulaires de P. frisingensis métabolisant le glucose</i>	96
Figure 20 :	<i>Effet de la réincubation à 30°C sur les concentrations intracellulaires en ions K<sup>+</sup> chez P. frisingensis métabolisant le glucose après le choc froid de 10 minutes</i>	97
Figure 21 :	<i>Effet de l'ajout du Gd<sup>3+</sup> (300 µM of GdCl<sub>3</sub>) sur les sorties des ions K<sup>+</sup> chez des cellules métabolisant le glucose à la fois à pH 4,5 et à pH 6,2</i>	98
Figure 22 :	<i>Effet de la nisine (100-1100 UI/ml) sur le taux de croissance et le temps de latence de P. frisingensis</i>	103
Figure 23 :	<i>Croissance d'Escherichia coli dans le BCYT en condition d'anaérobiose en présence ou en absence de nisine (1000 ou 2000 UI/ml).</i>	104
Figure 24 :	<i>Effet de la nisine (300 et 1000 UI/ml) sur les mouvements intracellulaires des ions potassium chez P. frisingensis</i>	106
Figure 25 :	<i>Photographie en microscopie électronique à balayage réalisée avec une suspension cellulaire de P. frisingensis incubée à 30°C à pH 6,2 en présence de glucose 30 mM et exposée à 1000 UI/ml de nisine.</i>	107
Figure 26 :	<i>Cinétiques des mouvements du potassium de la suspension cellulaire de P. frisingensis préparée à un pH initiale de 6,2, illustrées par l'évolution des concentrations des ions potassium dans le surnageant (dans le milieu de suspension</i>	111
Figure 27 :	<i>Effet couplé de la nisine pH et température sur les sorties des ions potassium chez P. frisingensis en absence de glucose</i>	113
Figure 28 :	<i>Effet couplé de la nisine, pH et de la température sur les sorties des ions potassium chez P. frisingensis en présence de glucose (30 mM)</i>	114
Figure 29 :	<i>Réaccumulation des ions potassium après les différents traitements</i>	115
Figure 30 :	<i>Stratégie mise en oeuvre pour la sélection d'une souche de P. frisingensis résistante à 5000 UI/ml de nisine</i>	120
Figure 31 :	<i>Diminution du temps de latence de P. frisingensis au fur et à mesure des repiquages en présence de nisine à 5000 UI/ml</i>	121
Figure 32 :	<i>Comparaison des cinétiques de croissance et de survie de la souche parentale et de la souche Nis-5000 de P. frisingensis</i>	121

<b>Figure 33 :</b>	<i>Effet de la nisine 5000 UI/ml sur la croissance de la souche Nis-5000 au fur et à mesure des repiquages sur BCYT sans nisine</i>	<b>122</b>
<b>Figure 35 :</b>	<i>Effet de la nisine à 1000 UI/ml sur les teneurs intracellulaires des ions <math>K^+</math> chez la souche parentale et la souche Nis-5000 de <i>P. frisingensis</i> préalablement traitées ou non à l'EDTA 10 mM</i>	<b>127</b>
<b>Figure 35 :</b>	<i>Visualisation des protéines majoritaires de la membrane externe de <i>P. frisingensis</i> par une coloration au nitrate d'argent après une électrophorèse unidimensionnelle sur gel de polyacrylamide</i>	<b>130</b>
<b>Figure 37 :</b>	<i>Profils densitométriques des protéines majoritaires de la membranes externe de la souche parentale et la souche Nis-5000 des gels présentés dans la figure 36</i>	<b>130</b>

## LISTES DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1 : <i>Conséquences des contaminations microbiennes sur la bière</i>	10
Tableau 2 : <i>Bactéries à Gram positif de la flore d'altération brassicole capables de se multiplier dans la bière</i>	11
Tableau 3 : <i>Bactéries à Gram négatif de la flore d'altération brassicole capables de se multiplier dans la bière</i>	13
Tableau 4 : <i>Composition en acides gras membranaires de <i>Pectinatus frisingensis</i> et <i>P. cerevisiophilus</i></i>	20
Tableau 5 : <i>Exigences du consommateur et leur impact sur le développement des techniques de conservation des aliments</i>	23
Tableau 6 : <i>Propriétés des bactériocines produites par les bactéries lactiques</i>	47
Tableau 7 : <i>Sensibilité de bactériocines aux lipases et aux amylases</i>	48
Tableau 8 : <i>Propriétés de quelques lantibiotiques liés à leur mode d'action</i>	50
Tableau 9 : <i>Pays autorisant l'utilisation de la nisine pour la conservation des aliments</i>	55
Tableau 10 : <i>Plan d'expérience factoriel complet mis en place pour l'étude de l'effet de la nisine, du pH et de la température sur l'homéostasie cellulaire de <i>P. frisingensis</i></i>	70
Tableau 11 : <i>Mesures du pH intracellulaire et du volume cellulaire de <i>P. frisingensis</i> à pH 6,2 et à pH 4,5 en état de privation nutritionnelle et en présence de glucose (30 mM)</i>	92
Tableau 12 : <i>Mesures de la concentrations intracellulaires de l'ATP, l'ADP et de l'AMP dans des suspensions cellulaires concentrés de <i>P. frisingensis</i> en absence et en présence de glucose (30 mM).</i>	93
Tableau 13 : <i>Effet du choc froid sur le pH et le volume cellulaire à pH 4,5 et à pH 6,2 en absence et en présence de glucose (30 mM).</i>	98
Tableau 14 : <i>Effet d'un choc froid sur les concentrations intracellulaires en ATP, ADP et AMP chez <i>P. frisingensis</i> à pH 4,5 et à pH 6,2, en présence de glucose (30 mM)</i>	99
Tableau 15 : <i>Dénombrement des cellules survivantes de <i>P. frisingensis</i> et d'<i>E. coli</i> après addition de nisine à 300 et 1000 UI/ml</i>	104

Tableau 16 :	<i>Effet de la nisine (100, 200 et 500 UI/ml) sur les teneurs intracellulaires des ions K<sup>+</sup> chez des suspensions cellulaires de P. frisingensis en présence et en absence de glucose (30 mM)</i>	105
Tableau 17 :	<i>Dénombrement des cellules survivantes de P. frisingensis après addition de nisine à 300 et 1000 UI/ml potassium dans des suspensions cellulaires de P. frisingensis métabolisant le glucose</i>	106
Tableau 18 :	<i>Effet de la nisine (100, 200 et 500 UI/ml) sur le volume cellulaire, pH interne et potentiel de membrane chez des suspensions cellulaire concentrées de P. frisingensis préparée en absence de glucose</i>	107
Tableau 19 :	<i>Résultat de l'analyse de variance appliqué à l'effet de pH, de la température et de la nisine sur [C<sub>1</sub>] en absence de glucose (R<sup>2</sup> = 0,98)</i>	112
Tableau 20 :	<i>Résultat de l'analyse de variance appliqué à l'effet de pH, de la température et de la nisine sur [C<sub>1</sub>] en présence de glucose (R<sup>2</sup> = 0,96)</i>	114
Tableau 21 :	<i>Résultat de l'analyse de variance appliqué à l'effet de pH, de la température et de la nisine sur [C<sub>2</sub>] en présence de glucose (R<sup>2</sup> = 0,91)</i>	115
Tableau 22 :	<i>Comparaison du pH interne, du volume cellulaire, du potentiel de membrane et de la force proton motrice de la souche parentale et de la souche Nis-5000 de P. frisingensis préparée après 10 min de consommation de glucose (30 mM)</i>	123
Tableau 23 :	<i>Temps de latence de le souche parentale et de la souche Nis-5000 UI/ml de P. frisingensis en présence de polymyxine B 0, 2, 5 et 10 µg/ml. Les cellules ont étéensemencées à raison de 10<sup>7</sup> bactéries /ml</i>	123
Tableau 24 :	<i>Dénombrement cellulaire de la souche parentale et la souche Nis-5000 de P. frisingensis traitées ou pas à l'EDTA (10 mM) et exposées à l'addition de nisine à une concentration de 1000 UI/ml.</i>	128
Tableau 25 :	<i>Composition d'acides gras membranaire de la souche parentale de Pectinatus frisingensis et celle de la souche Nis-5000 cultivée en absence et en présence de nisine 5000 UI/ml</i>	129

# ***INTRODUCTION***

## INTRODUCTION

L'un des axes de recherche du laboratoire est l'étude des flores d'altération des aliments en général et en particulier les bactéries de la flore d'altération de la bière. Le thème principal est l'étude de la réponse physiologique des bactéries à des stress rencontrés lors des traitements de stabilisation des produits alimentaires (variations de température, addition de nisine, modification de pH). Les exigences du consommateur sont en perpétuelle évolution, le consommateur exige de plus en plus des produits alimentaires ayant une durée de vie assez longue et de qualité microbiologique irréprochable. Ce type de produits agro-alimentaires représentent alors des environnements propices pour le développement des micro-organismes. Cependant, les traitements de stabilisation empêchent le développement des contaminants et garantissent la stabilité biologique de l'aliment. Le grand pouvoir d'adaptation des micro-organismes leur permet toutefois de franchir les différentes barrières de stabilisation et de conquérir de nouveaux environnements.

L'utilisation de nouvelles technologies dans l'industrie brassicole, notamment les nouvelles techniques de soutirage et de conditionnement, ont permis la diminution de la quantité d'oxygène dissous dans la bière, favorisant la création de nouvelles niches écologiques qui ont entraîné le développement de bactéries anaérobies strictes. Ainsi, aux U.S.A., en 1978 Lee *et al.* ont décrit *P. cerevisiophilus*, bactérie anaérobie stricte et à Gram négatif, qui depuis a été mise en cause dans de nombreux cas de contamination de la bière notamment en France (Soberka *et al.*, 1988). En 1990, Schleifer *et al.* isolèrent une nouvelle espèce appartenant au genre *Pectinatus* : *P. frisingensis*. Comparée à *P. cerevisiophilus*,

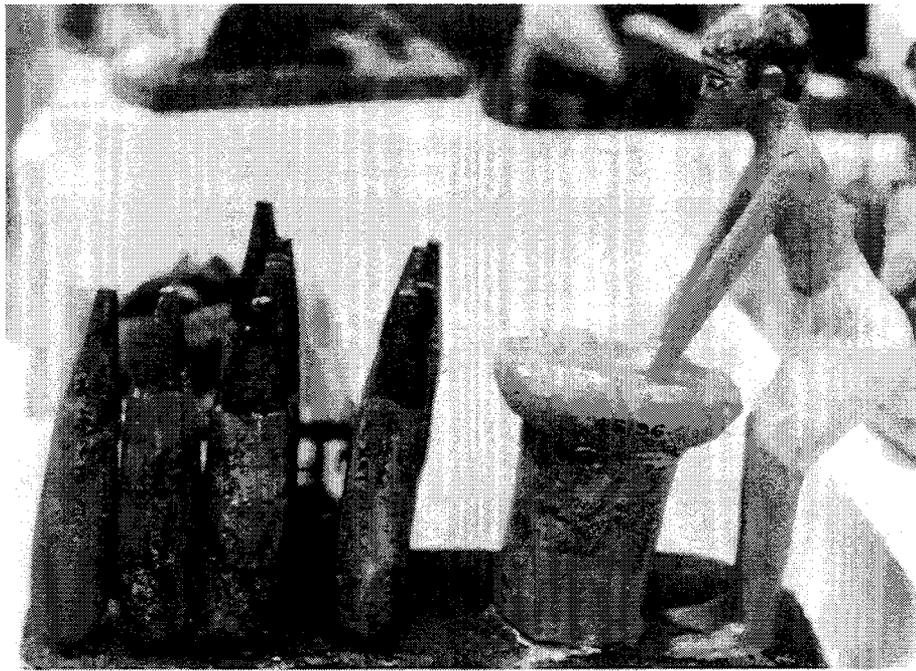
*P. frisingensis* présente des différences au niveau de la composition des peptidoglycanes et dans la séquence des ARN 16S ribosomiaux. De plus, elle est capable de fermenter le cellobiose et le N-acetyl-glucosamine (Schleifer *et al.*, 1990). La contamination de la bière par *Pectinatus* se manifeste par une forte altération de la flaveur due à la production d'acides propionique et acétique et par une perte de la brillance due au développement important de la bactérie (Lee *et al.*, 1980).

L'augmentation de la consommation des bières sans alcool, des bières légères (light) et des bières biologiques représente un indice fort du changement des habitudes du consommateur. La satisfaction de ces exigences passe par une qualité sanitaire accrue du produit incluant l'amélioration et l'adaptation des techniques de stabilisation habituellement utilisées (les traitements thermiques dans le cas de la bière) en industrie agro-alimentaire sans perturber les caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques des aliments. Ceci suscite aussi le développement et la mise au point de nouvelles techniques de stabilisation (filtration sur membrane), soit en combinant les techniques existantes en diminuant leur niveau d'action (théorie des barrières), soit en examinant la possibilité d'utiliser des inhibiteurs naturels d'origine animale, végétale, ou microbienne (nisine). Ainsi, il est nécessaire de caractériser la réponse cellulaire de la bactérie aux différentes conditions hostiles résultant des traitements de stabilisation (physique, chimique ou biologique) et des caractéristiques intrinsèques de l'aliment. Ces connaissances permettraient de déterminer les cibles cellulaires des traitements de stabilisation et d'optimiser leur action.

L'objectif de ce travail est de caractériser la réponse homéostatique de *P. frisingensis* sous différentes conditions hostiles pour la bactérie. Ceci va nous permettre d'une part de comprendre les mécanismes mis en jeu par *P. frisingensis* pour maintenir, réguler et restaurer

son homéostasie cellulaire sous des conditions hostiles, et d'autre part de mettre en évidence les paramètres physiologiques de la bactérie les plus touchés par les traitements de stabilisation classiques (traitement thermique) ou alternatifs (nisine) dans le but ultérieur d'optimiser leur action sur *P. frisingensis*. Enfin, l'étude de la résistance potentielle à la nisine chez *P. frisingensis* permettra de mettre en place des données essentielles pour une utilisation rigoureuse de la nisine en industrie brassicole. Le travail réalisé concerne l'étude de l'effet de stress rencontrés dans l'industrie brassicole (traitements thermiques froid et chaud, pH acide) et l'effet de l'addition de nisine ainsi que son usage répété sur *P. frisingensis*. Nous allons tout d'abord présenter une synthèse bibliographique sur l'état des connaissances concernant *P. frisingensis* et les traitements de stabilisation de la bière, puis les effets de ces traitements sur la physiologie cellulaire. Les principales techniques utilisées seront exposées : techniques de la microbiologie classique des anaérobies strictes, et techniques d'observation (microscopie électronique) ou d'analyse (spectrophotométrie d'absorption atomique, spectromètre de masse couplé à un chromatographe en phase gazeuse (SM/CG), chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et électrophorèse). Ces différents outils seront utilisés pour étudier l'effet des différents facteurs de stabilisation pris isolément ou combinés (modification de température, de pH, présence ou absence de glucose et l'addition de nisine) sur l'homéostasie cellulaire de *P. frisingensis* DSM 20467 en milieu modèle. L'étude se terminera par une évaluation des potentialités d'adaptation de *P. frisingensis* à l'utilisation de nisine comme moyen alternatif de stabilisation de la bière.

# ***BIBLIOGRAPHIE***



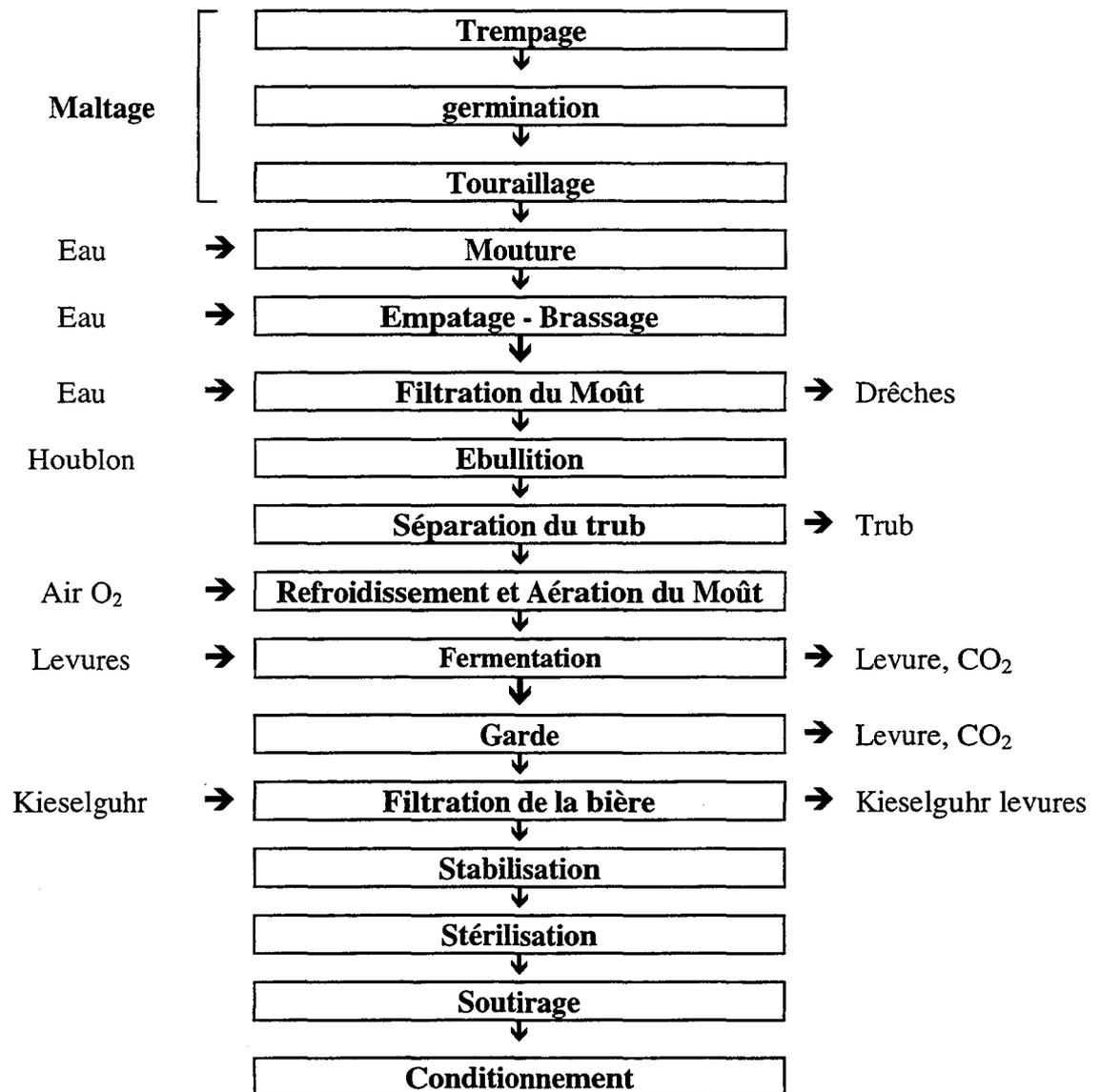
*Figure 1 : Modèle en bois montrant une servante Egyptienne brassant la maische. Les récipients de bière se trouvent à gauche. Asyut. 1900 av. J.C. (British Museum, Londres) (D'après Moll, 1991).*

## **I. Généralités sur la production et la flore d'altération de la bière**

C'est en Mésopotamie, dans les sables de Sumer, puis en Chaldée et en Assyrie que des chercheurs ont découvert les premiers documents archéologiques sur les fermentations à base de grains. La bière fut ensuite adoptée en Egypte, et y devint une boisson nationale consacrée à Osiris, Dieu du soleil. Les brasseurs égyptiens (Figure 1) macéraient une mouture d'orge, additionnée de mie de pain fermentée et aromatisée par une infusion de lupin (Moll, 1991).

La Grèce puis Rome, connurent à leur tour la bière. Elle apparaît en Gaule un siècle avant Jésus-Christ. Les Celtes l'appelaient Cervoise, nom dérivé de Cérès déesse des moissons. Les chinois fabriquaient une bière de riz cinq mille ans avant notre ère. Les peuples africains consomment, depuis la nuit des temps des boissons fermentées à base de manioc et de mil. En débarquant aux Caraïbes, Christophe Colomb s'étonna de la consommation d'un breuvage de maïs par les indigènes.

Les Britanniques, les Allemands et les Belges, grâce à la qualité de leurs bières sont perçus comme les meilleurs brasseurs du monde et leur réputation se perpétue encore aujourd'hui. Au milieu du XIXe siècle, l'industrie brassicole a connu l'avènement des nouvelles technologies, la réfrigération, le maltage industriel, la filtration et surtout la pasteurisation découverte en France. On attribue à Louis Pasteur l'explication du rôle de la levure dans la fermentation. Il énonça de nouveaux principes de fabrication et établit la base de la brasserie moderne.



*Figure 2 : Procédé brassicole. Les principales étapes de la fabrication de la bière (D'après Moll, 1991).*

## **I.1 Procédé brassicole**

### **I.1.1 Le maltage**

L'orge a toujours été la matière de base dans la fabrication de la bière. Le maltage (Figure 2) a pour but à la fois de dégrader l'endosperme et de mobiliser des enzymes du grain (Moll, 1991). La première opération au cours du maltage consiste en une suite de trempages d'environ 40 à 50 heures dans de l'eau maintenue à basse température de 10 à 15 °C (Lewis et Young, 1996), entrecoupés d'aération. Le but de cette opération est de fournir à l'orge toute l'eau et l'oxygène nécessaires à la germination. L'orge trempée est ensuite transférée des cuves de trempage vers les cases de germination. La germination est conduite sous courant d'air conditionné à des températures de 10 à 20 °C pendant 3 à 5 jours (Moll, 1991). Pendant la germination il y a production de différents types d'enzymes, les radicelles et le germe commencent à se développer au détriment de l'amidon contenu dans le grain.

L'étape suivante est le touraillage dont le but est d'arrêter la germination. Les grains sont mis dans la touraille afin de réduire leur teneur en eau à 3-5% bloquant ainsi l'activité enzymatique et empêchant la dégradation du malt (Moll, 1991 ; Lewis et Young, 1996). La température au cours du touraillage varie entre 80°C et 120°C en fonction de type de malt souhaité. Les malts pâles sont utilisés en quantité importante dans toutes les bières. Les malts colorés (ambrés, caramels) sont utilisés en faible quantité (2-15%) (Moll, 1991).

### **I.1.2 Le brassage**

Le brassage permet l'extraction des sucres fermentescibles contenus dans le grain. Le but est donc d'obtenir du malt un moût sucré et aromatisé (Moll, 1991). Dans un premier temps les grains de malt sont concassés. L'extraction des sucres, des protéines et de la plupart

des autres substances contenues dans le malt se fait par l'eau à des températures élevées. En effet, le brasseur porte le brassin à différentes températures pendant des temps déterminés afin de favoriser l'activité des enzymes assurant tour à tour la destruction des protéines (peptidases) qui ont une influence sur la clarté de la bière et la production de sucres ( $\alpha$ -glucosidase et gluconases) fermentescibles ou non. Le brassin est ensuite porté à une température de 78°C ce qui entraîne la destruction des enzymes (Hough *et al.*, 1982a). Le moût obtenu après filtration est soumis à une ébullition de 1 heure 30 minutes. Outre la stérilisation du moût, cette opération permet d'infuser le houblon qui apporte à la bière son amertume mais aussi beaucoup d'arômes. Le moût est ensuite refroidi jusqu'à la température de fermentation.

### I.1.3 La fermentation primaire

Le moût refroidi et aéré est transféré dans une cuve de fermentation ; les levures sont ajoutées pour initier la fermentation (Figure 2). Il existe deux types de fermentation du moût. La fermentation haute qui utilise des levures de type *Saccharomyces cerevisiae* et la fermentation basse utilisant des levures de type *Saccharomyces uvarum* (Young, 1996). Le niveau de l'inoculum ( $1,5 \cdot 10^7$  à  $3 \cdot 10^7$  cellules/ml) de levures utilisé lors de l'ensemencement du moût dépend de la qualité de bière produite. L'apport initial d'oxygène et les conditions initiales dans la cuve de fermentation favorisent la multiplication de la levure qui utilise les acides aminés du moût comme principale source d'azote. Le glucose, le fructose, le saccharose, le maltose du moût sont utilisés comme source de carbone. Dans une deuxième étape, l'oxygène étant consommé, les levures synthétisent de l'éthanol et du dioxyde de carbone en quantité importante. En effet, au cours de la fermentation anaérobie, il y a

transformation de 80% des sucres en alcool et en dioxyde de carbone. Vers la fin de cette étape, les levures sont généralement récupérées pour ensemencher un autre brassin (Lewis et Young, 1996).

#### **I.1.4 La fermentation secondaire**

La fermentation secondaire a pour but la maturation de la bière. Au cours de cette opération la bière est maintenue à basses températures de -1 à 4°C pendant 7 à 10 jours, ceci en condition d'anaérobiose pour éviter qu'une oxydation de la bière n'entraîne une modification désagréable du goût. La maturation permet, d'une part l'élimination de l'excès de composés à odeur déplaisante tels le diacétyle, l'acétaldehyde et des composés soufrés et d'autre part, la saturation de la bière en dioxyde de carbone, la précipitation des particules colloïdales en suspension (trouble au froid) et la consommation des sucres résiduels (Moll, 1991 ; Lewis et Young, 1996).

#### **I.1.5 La filtration, stabilisation et conditionnement**

La filtration est l'étape qui termine la fabrication de la bière (Figure 2). Le but de la filtration est l'élimination des micro-organismes et des particules colloïdales en suspension qui se trouvent dans la bière de garde, garantissant ainsi au produit fini une brillance stable. La filtration a lieu à basse température entre -2 à 2 °C, avec un taux d'oxygène dissout inférieur à 0,1 mg/l (Posada, 1987). La filtration ne permet pas d'éliminer tous les micro-organismes (Back *et al.*, 1992). Ainsi la pasteurisation et la flash pasteurisation restent les moyens les plus sûrs de garantir la stabilité biologique de la bière. La bière filtrée passe dans un échangeur à plaques pour être soit pasteurisée soit flash pasteurisée. Elle est alors portée à 60 °C pendant

15 minutes pour la pasteurisation, et à 70-72 °C pendant 30 secondes pour la flash pasteurisation (Moll, 1991).

La bière peut être soutirée en fûts, en boîtes métalliques ou en bouteilles. Dans le cas d'un soutirage en bouteilles, les bouteilles sont lavées, remplies après évacuation de l'air et mises sous pression de CO<sub>2</sub>, capsulées et pasteurisées pour garantir la stabilité biologique de la bière (Lewis et Young, 1996).

### **I.1.6 Importance de la température dans l'industrie brassicole**

La température représente un facteur important en industrie brassicole. En effet, les traitements thermiques chauds (40 à 100°C) sont nécessaires pour l'extraction des sucres fermentescibles, l'activation et l'inactivation des enzymes, la stérilisation du moût lors du brassage et la pasteurisation du produit fini. Les traitements à basse température sont aussi d'une importance capitale lors de la fermentation basse (12 à 15°C), mais également au cours de la maturation (-1 à 2°C), de la filtration et du conditionnement (-2 à 2°C). La bière est également soumise à des températures basses lors du stockage et de la consommation. En Europe, la température de stockage et de livraison de la bière n'est pas réglementée. Cependant, aux U.S.A., la température de stockage et de livraison de la boisson doit être maintenue entre 4 et 6°C. Enfin, la bière est consommée à des températures allant de 4 à 12°C (Moll, 1991). Ces différents changements de température rencontrés lors de la fabrication de la bière auront un effet certain sur le comportement des micro-organismes de la flore d'altération de la boisson. Si la pasteurisation ou la flash pasteurisation permettent de garantir la stabilité biologique de la bière, les traitements à basse température améliorent sa qualité et augmentent sa durée de vie.

## I.2 Généralités sur les flores d'altération en brasserie

### I.2.1 Les sources de contamination en brasserie

En 1876, Louis Pasteur publia "Etudes sur la bière"; dans cet ouvrage il démontra clairement l'implication des bactéries dans la contamination de la bière. Il insista sur la nécessité de contrôler ces micro-organismes à travers la notion d'asepsie au cours du processus de production de la bière. Afin de garantir la stabilité biologique de la bière, le brasseur doit contrôler la présence de micro-organismes indésirables tout au long du processus de fabrication (Lewis et Young, 1996). En brasserie, un contaminant spécifique pourrait être défini comme étant tout micro-organisme qui n'a pas été introduit d'une manière délibérée et qui pourrait survivre et croître dans le moût, dans le moût en cours de fermentation, après filtration ou encore dans la bière mise en bouteille (Jespersen et Jakobsen, 1996).

Si toutes les matières premières utilisées en brasserie, telles que l'eau, le malt, les céréales, le sucre ou le houblon peuvent apparaître comme des sources possibles de contaminants, l'ensemencement de la levure et sa réutilisation, constitue la source majeure des contaminations (Lewis et Young, 1996). En début de fermentation, le moût représente un milieu nutritionnel riche et oxygéné avec un pH de 5,5 ; il favorise la prolifération de micro-organismes à croissance rapide non affectés par les extraits du houblon (Lewis et Young, 1996). Par contre, la bière représente un milieu pauvre, anaérobie, de pH acide (3,8 à 4,7), contenant de l'éthanol (0 à 8% p/p), des extraits de houblon (approximativement 17 à 55 mg iso- $\alpha$  acides/l), du CO<sub>2</sub> (approximativement 0,5% p/v), du SO<sub>2</sub> (approximativement 5 à 30 mg/l), des acides organiques et de l'acétaldéhyde. De plus la bière est généralement stockée à basse température (Hough *et al.*, 1982b).

Effets des contaminations microbiennes sur la bière	
<u>Sécurité alimentaire</u>	Apparition de composés nitrés Mycotoxines/ Aflatoxines Alcool
<u>Changements de flaveur</u>	Acides (lactique, acétique) Diméthyle Sulfure/H <sub>2</sub> S Acétaldéhyde Phénols Diacétyle
<u>Changements physiques</u>	Trouble Sédimentation de particules Aspect visqueux Giclage (mousse importante)

**Tableau 1 : Conséquences des contaminations microbiennes sur la bière (D'après Simpson, 1991).**

L'avènement des nouvelles technologies en brasserie, a modifié l'importance et la place de divers contaminants. Ainsi, des contaminants bien connus comme les bactéries aérobies acétiques comme *Acetobacter sp.* et *Gluconobacter oxydans* semblent ne plus représenter un problème en brasserie (Jespersen et Jakobsen, 1996). L'évolution des technologies utilisées en industrie brassicole, notamment les nouvelles techniques de soutirage et de conditionnement, ont conduit à une diminution significative de la quantité d'oxygène dissout soit au cours de la fabrication soit au cours de la mise en bouteille de la bière. Ceci a permis la création de nouvelles niches écologiques permettant la croissance de micro-organismes anaérobies stricts. Ainsi, au cours des dernières années, des bactéries anaérobies strictes comme *Pectinatus spp.* et *Megasphera cerevisiae* sont de plus en plus mises en cause dans de nombreux cas de contamination de la bière en bouteille (Lee, 1994).

Les contaminants microbiens en brasserie ne sont pas pathogènes pour l'homme (Simpson, 1991) et sont principalement constitués de bactéries ou de levures. Les contaminations de la bière par les bactéries représentent 80% du total des contaminations observées, alors que celles dues aux levures sauvages représentent les 20% restant. La contamination de la bière se manifeste par des altérations de la flaveur, principalement des modifications de l'aspect de la bière, accompagnée d'une forte altération des qualités organoleptiques et de la stabilité biologique de la bière, la rendant impropre à la consommation (Tableau 1).

---

**Bactéries à Gram positif capables de se multiplier dans la bière**

---

*Lactobacillus spp.*

*L. brevis*

*L. lindneri*

*L. curvatus*

*L. casei*

*L. buchneri*

*L. coryneformis*

*L. plantarum*

*L. brevisimilis*

*L. malefermentans*

*L. parabuchneri*

*Pediococcus spp*

*P. damnosus*

*P. dextrinicus<sup>a</sup>*

*P. inopinatus<sup>a</sup>*

*Kocuria sp.*

*K. kristinae<sup>a</sup>*

---

**Tableau 2 : Bactéries à Gram positif de la flore d'altération brassicole capables de se multiplier dans la bière (D'après Jespersen et Jakobsen, 1996).**

**<sup>a</sup> Inhibés par des concentrations élevées en éthanol et les extraits de houblon**

## I.2.2 Les contaminants d'origine bactérienne

### I.2.2.1 Les bactéries à Gram positif

Les bactéries lactiques, et plus particulièrement celles appartenant aux genres *Lactococcus* et *Pediococcus*, constituent la source majeure des contaminations en industrie brassicole. Cependant, d'autres bactéries appartenant aux genres *Kocuria* et *Staphylococcus* font parti des bactéries à Gram positif de la flore d'altération en brasserie (Tableau 2) (Priest, 1996). Les contaminations dues aux bactéries lactiques semblent dépendre de la composition de la bière produite et semblent être plus dangereuses durant le conditionnement de la bière en bouteille. Le potentiel de contamination des bactéries lactiques dépend de leur capacité à résister aux extraits du houblon comme la trans-isohumulone (Priest, 1996).

#### I.2.2.1.1 *Lactobacillus*

Ce sont des bactéries de forme bacillaire, de 1,0  $\mu\text{m}$  de diamètre et 2 à 120  $\mu\text{m}$  de longueur. Elles sont acido-tolérantes et aérotoles. Leur croissance est activée sous atmosphère anaérobie et plus particulièrement en présence de  $\text{CO}_2$ . Elles peuvent être soit homofermentaires en produisant principalement de l'acide lactique comme produit final de fermentation, soit hétérofermentaires en produisant principalement de l'acide lactique et de l'acide acétique comme produits finaux de fermentation. Elles sont capables d'utiliser comme source de carbone le glucose, le fructose, le maltose et le ribose. La contamination de la bière par les *Lactobacillus* semble être plus dangereuse durant le conditionnement de la boisson et après la mise en bouteille. Elle se manifeste par l'acidification de la boisson, l'apparition d'un trouble dû au développement de la bactérie et une altération du goût qui devient aigre en raison de la production de diacétyle (Lewis et Young, 1996). *Lactobacillus brevis* semble être

le contaminant le plus communément décrit en brasserie. *L. brevis* manifeste un métabolisme hétérofermentaire obligatoire, une tolérance vis à vis des extraits de houblon, sa température optimale de croissance est de 30°C et son pH de 4 à 5 (Priest, 1996). Le pouvoir de contamination de la bière par des lactobacilles semble dépendre du type de bière. En effet, Priest (1996) a rapporté que la croissance de 13 lactobacilles a été testée dans 31 bières différentes et que les bactéries pouvaient se multiplier uniquement dans 3 des 31 bières testées. Toutefois, aucune corrélation entre l'aptitude des lactobacilles à se multiplier et des paramètres physico-chimiques intrinsèques de la bière n'a été trouvée.

#### I.2.2.1.2 *Pediococcus*

Les *Pediococcus* se présentent sous forme sphérique, ce sont les seules bactéries lactiques qui se divisent alternativement dans deux directions perpendiculaires pour former des tétrades. Elles sont aéro-anaérobies facultatives avec un métabolisme homofermentaire, capables de fermenter plusieurs oses notamment l'arabinose, le xylose, le fructose, le mannose et le glucose. Le produit majoritaire de fermentation est l'acide lactique (Priest, 1996). Les bactéries appartenant au genre *Pediococcus* sont des contaminants ubiquitaires en brasserie. Ainsi *P. acidilactici* et *P. pentosaceus* ont été isolées du malt et sont capables de se développer durant le début de la production du moût où la température est voisine de 50°C, et le houblon n'a pas encore été ajouté. Cependant, seules deux espèces, *P. damnosus* et *P. inopinatus*, sont capables de se développer dans la bière (Simpson et Taguchi, 1995). Elles peuvent aussi se développer durant la fermentation et peuvent être récupérées avec la levure. Les facteurs limitants pour le développement de *Pediococcus* dans la bière sont les extraits de houblon (Simpson et Taguchi, 1995). *P. damnosus* reste le pédiocoque le plus rencontré dans les cas de contamination de la bière (Solberg et Claussen, 1973 ; Lawrence et Priest, 1981), et

---

**Bactéries à Gram négatif capables de se multiplier dans la bière**

---

*Pectinatus* spp.  
*P. cerevisiophilus*  
*P. frisingensis*

*Selenomonas* sp.  
*S. lactificex*

*Zymophilus* sp  
*Z. raffinovorans*

*Megasphaera* sp  
*M. cerevisiae*<sup>a</sup>

*Zymomonas* sp.  
*Z. mobilis*<sup>b</sup>

---

**Tableau 3 : Bactéries à Gram négatif de la flore d'altération brassicole capables de se multiplier dans la bière (D'après Jespersen et Jakobsen, 1996).**

<sup>a</sup> *Se multiplie uniquement dans les bières à faible taux d'alcool*

<sup>b</sup> *Se multiplie uniquement dans les bières supplémentées en glucose*

n'est citée que dans des cas de contamination de la bière ce qui peut sous-entendre que ce micro-organisme s'est bien adapté à la bière. La contamination de la bière par les pédiocoques est caractérisée par l'accumulation d'acide organique (acide lactique, acétoïne) et de diacétyle.

### **I.2.2.1.3 Les *Kocuria* et les *Staphylococcus***

Pendant longtemps les bactéries appartenant à ces deux genres ont été considérées comme des sources mineures de contamination en brasserie. Cependant, des études récentes ont montré qu'elles sont largement rencontrées en brasserie et que dans certains cas elles ont été décrites comme responsables de contamination de la bière. Une étude taxonomique portant sur 96 *cocci* isolés de l'air ambiant des brasseries a montré que des bactéries commensales de la peau comme *Staphylococcus saprophyticus*, *S. epidermidis* et *Kocuria varians* sont des bactéries communes contaminant la bière et isolées en brasserie (Lawrence et Priest, 1981). Cependant, ces bactéries se développent difficilement ou pas à un pH de 4,5 ou en dessous et sont sensibles aux extraits de houblon. *K. kristinae* est acidophile et résiste aux extraits de houblon ; elle a été mise en cause dans des cas de contamination de la bière (Back, 1981 ; Lawrence et Priest, 1981).

### **I.2.2.2 Les bactéries à Gram négatif**

Les bactéries à Gram négatif de la flore d'altération de la bière incluent un nombre d'espèces appartenant à différents genres (Tableau 3). Les bactéries acétiques, certaines entérobactéries, les bactéries appartenant aux genres *Pectinatus* et *Zymomonas*, sont capables de contaminer la bière. La présence de ces contaminants au cours des différents stades de fabrication et dans le produit fini affecte la concentration de certains produits volatils, entraînant une modification des qualités organoleptiques de la boisson.

### I.2.2.2.1 Les bactéries acétiques

Les bactéries acétiques constituent une source de contamination d'un certain nombre d'aliments, de boissons non alcoolisées et de boissons alcoolisées comme la bière, le vin et le cidre. Cependant, du fait de leur caractère aérobic strict, elles ne sont plus considérées comme une source majeure de contamination dans l'industrie brassicole (Jespersen et Jakobsen, 1996). Les bactéries acétiques sont subdivisées en deux genres, le genre *Acetobacter* et *Gluconobacter* (Van Vuuren, 1996). Les bactéries acétiques peuvent être isolées sur milieu contenant de l'éthanol comme seule source de carbone (Lewis et Young, 1996).

#### I.2.2.2.1.1 *Acetobacter* et *Gluconobacter*

Les bactéries appartenant aux genres *Acetobacter* et *Gluconobacter* sont aérobies strictes et se présentent seules, en paires ou en chaînes. Leur morphologie est variable, leur taille varie entre 0,6 à 0,8  $\mu\text{m}$  de diamètre et 1,0 à 4,0  $\mu\text{m}$  de longueur et peuvent être mobiles ou non (Lewis et Young, 1996). A la différence des *Gluconobacter*, les *Acetobacter* sont capables d'oxyder l'éthanol en acide acétique et l'acide acétique en  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ . Elles ont une réaction positive au test de la catalase, négative au test de l'oxydase et sont capables de métaboliser un certain nombre d'alcools et d'oses notamment le glucose, le fructose, le glycérol, le sorbitol. Plusieurs espèces sont capables de croître en utilisant respectivement les ions  $\text{NH}_4^+$  et l'éthanol comme seule source d'azote et de carbone (Van Vuuren, 1996). Les *Acetobacter* se développent dans des niches plus riches en alcool, alors que les *Gluconobacter* se développent dans des niches plus riches en sucre (Van Vuuren, 1996). La contamination de la bière par les *Acetobacter* et les *Gluconobacter* comme *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus* et *Gluconobacter oxydans* entraîne une modification significative du goût en lui donnant un

goût de vinaigre (Lawerence, 1988 ; Jespersen et Jakobsen, 1996). Les souches appartenant aux deux genres isolés de la bière semblent n'exiger que de faibles taux d'oxygène pour leur croissance (Lewis et Young, 1996).

#### I.2.2.2.2 *Enterobacteriaceae*

Cette famille comprend un grand nombre d'espèces isolées de différentes niches écologiques. Leur taille varie entre 0,3 et 1,0  $\mu\text{m}$  de diamètre et de 1,0 à 6,0  $\mu\text{m}$  de longueur, ce sont des anaérobies facultatives (Lewis et Young, 1996 ; Van Vuuren, 1996). Leur croissance est fortement affectée par le pH du milieu, aucune croissance n'est détectée au dessous d'un pH de 4,3 (Lewis et Young, 1996). Ainsi, elles sont considérées principalement comme des agents de contamination du moût où elles se développent rapidement (Lawerence, 1988 ; Lewis et Young, 1996 ; Van Vuuren, 1996). Quand elles contaminent le moût, elles libèrent de nombreux produits métaboliques dont le diméthyl-sulfure qui donne à la bière un goût de céleri (Russel *et al.*, 1954). D'autres entérobactéries sont capables de transformer les nitrates en nitrites provoquant ainsi l'augmentation du taux de la nitrosamine dans la bière (Lewis et Young, 1996). *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia protea* et *Obesumbacterium proteus* sont parmi les entérobactéries les plus citées dans les cas de contamination en industrie brassicole (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1990 ; Jespersen et Jakobsen, 1996 ; Lewis et Young, 1996 ; Van Vuuren, 1996). *O. proteus* est considérée comme un contaminant qui est souvent introduit lors de l'ensemencement de la levure à hauteur de 1% (Priest *et al.*, 1974 ; Lewis et Young, 1996).

### I.2.2.2.3 *Zymomonas*

Les bactéries appartenant au genre *Zymomonas* se présentent sous forme de gros bâtonnet dont la taille varie entre 1,0-1,5 µm de diamètre et de 2,5-6,5 µm de long. Elles fermentent le glucose et le fructose en éthanol et en CO<sub>2</sub>. Elles sont incapables de fermenter le maltose et présentent une réaction négative à l'oxydase. Elles sont anaérobies mais tolérantes vis à vis de l'oxygène (Van Vuuren, 1996). Certaines souches appartenant au genre *Zymomonas* représentent les contaminants les plus redoutés dans les industries de boissons alcoolisées à cause de leur capacité à croître en présence de fortes teneurs en alcool (Van Vuuren, 1996). En effet, *Zymomonas mobilis* résiste aux extraits de houblon, peut croître au dessus d'un pH de 3,4 et en présence d'éthanol jusqu'à 10% (p/v). Ainsi *Z. mobilis* représente le contaminant majeur des bières enrichies en sucre (Jespersen et Jakobsen, 1996). La contamination de la bière par *Z. mobilis* se manifeste par une perte de goût à cause de la production par la bactérie d'acétaldehyde et de sulfure d'hydrogène (Jespersen et Jakobsen, 1996 ; Lewis et Young, 1996 ; Van Vuren, 1996).

## I.3 Les bactéries anaérobies strictes

Les spécialistes en microbiologie de la bière s'accordaient à dire que les contaminants de la bière étaient limités aux bactéries aérobies et certaines bactéries anaérobies facultatives (Van Vuren, 1996). Cependant, l'utilisation de nouvelles technologies dans l'industrie brassicole, notamment la diminution de la quantité d'oxygène dissous dans les bières en bouteille, a favorisé la création de nouvelles niches écologiques qui ont permis le développement de bactéries anaérobies strictes. Ainsi, en 1978 Lee *et al.* ont décrit *Pectinatus cerevisiiphilus*, bactérie anaérobie stricte. En 1979 Weiss *et al.* ont décrit *Megasphaera cerevisiae* et en 1990 Schleifer *et al.* ont isolé *P. frisingensis*, *Selenomonas lacticifex*,

*Zymophilus raffinovorans*, bactéries anaérobies strictes à Gram négatif. Ces micro-organismes sont de plus en plus souvent mis en cause dans les cas de contamination de la bière dans de nombreux pays (Watier, 1994).

### I.3.1 Le genre *Pectinatus*

Le genre *Pectinatus* (*Pectinatus* : bactérie sous forme de peigne) a été décrit pour la première fois en 1978 par (Lee *et al.*, 1978). *Pectinatus cerevisiophilus* a été isolée à partir d'une bière stockée à 30°C pendant 30 jours (Lee *et al.*, 1978). Il s'agit d'une bactérie à Gram négatif, anaérobie stricte et mésophile, appartenant à la famille des *Bacteroidaceae* (Lee *et al.*, 1978). Le mode de contamination par *Pectinatus* reste encore inconnu (Lee *et al.*, 1980). Cependant, elle est surtout mise en cause dans les contaminations qui s'opèrent après remplissage des bouteilles et peut être parfois introduite lors de l'ensemencement de la levure (Back *et al.*, 1992).

Depuis son isolement en 1978 aux U.S.A., *P. cerevisiophilus* a été mise en cause dans de nombreux cas de contamination de la bière, notamment en France (Soberka *et al.*, 1988), au Japon (Takahashi, 1983) en Finlande (Haikara *et al.*, 1981) et en Allemagne (Back *et al.*, 1979). En 1990, Schleifer *et al.* isolèrent une nouvelle espèce appartenant au genre *Pectinatus* : *P. frisingensis*. Comparée à *P. cerevisiophilus*, l'espèce *P. frisingensis* présente des différences au niveau de la composition des peptidoglycanes et dans la séquence de l'ARN ribosomale 16S. De plus, elle est capable de fermenter le cellobiose et le N-acetylglucosamine (Schleifer *et al.*, 1990). Malgré son caractère anaérobie strict, *P. cerevisiophilus* a été retrouvée dans l'air des salles de remplissage (Henriksson et Haikara, 1991), elle a été aussi isolée à partir d'huile de lubrification mélangée à la bière et à l'eau, des canalisations

d'eau, des machines de remplissage et de l'eau de trempage avant la mouture du malt (Lee *et al.*, 1980 ; Back *et al.*, 1992 ). La contamination de la bière par *Pectinatus* se manifeste par une perte de la saveur due à la production d'acide propionique et acétique, accompagnée d'une accumulation de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S), et l'important développement de la bactérie entraîne une perte notable de la brillance de la bière (Lee *et al.*, 1980).

### **I.3.2 *Pectinatus frisingensis***

#### **I.3.2.1 Caractéristiques morphologiques**

*Pectinatus frisingensis* (Fri-sin. gen'sis. L. adj. frisingensis, de frisinga, nom latin de Freising, une ville d'Allemagne). C'est une bactérie anaérobie stricte, souvent mobile, non sporulée et à Gram négatif. Les cellules sont sous forme de bâtonnet légèrement courbé, aux extrémités arrondies. Elles se présentent souvent seules, quelquefois en paires et rarement en chaînettes. La taille de *P. frisingensis* varie entre 0,7 et 0,9 µm de diamètre et de 3 à 20 µm de longueur. La morphologie, ainsi que la mobilité de *P. frisingensis* dépendent de l'âge de la bactérie et des conditions de culture. Ainsi, les cellules jeunes sont très actives dans leurs déplacements par des mouvements serpentaires, présentant un aspect en X à l'observation en microscopie optique. Cependant, en phase stationnaire la mobilité des cellules décroît et les cellules s'allongent et se présentent sous forme hélicoïdale. Comme pour *P. cerevisiophilus*, la mobilité de *P. frisingensis* est assurée par des flagelles qui sont disposés unilatéralement et répartis sur le côté concave de la bactérie (Schleifer *et al.*, 1990).

### I.3.2.2 Croissance de *P. frisingensis*

*P. frisingensis* est une bactérie anaérobie stricte. Les cinétiques de croissance ne semblent pas être affectées par une modification du ciel gazeux des flacons de culture. Tholozan *et al.* (1997) n'ont en effet pas observé de différence de croissance de la bactérie sous des atmosphères anaérobies composées de : N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (85 :15%) et de H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (85 :15%) sur deux milieux synthétiques : milieu MRS (Man-Rogosa-Sharp) ou BCYT (Basal Carbonate Yeast Trypticase). Les colonies obtenues sur milieu MRS après trois jours à 30°C sont d'un aspect brillant et légèrement jaunâtre, opaque et d'une forme circulaire de 1 à 2 mm de diamètre. La température optimale de croissance est de 30°C (Schleifer *et al.*, 1990). *P. frisingensis* est acidophile, et montre une bonne croissance à des valeurs de pH comprises entre 4,5 et 6,2 (Tholozan *et al.*, 1996). La croissance de la bactérie est inhibée par des concentrations élevées en éthanol. Ainsi aucune croissance n'est observée en présence éthanol à 8% (p/v) (Tholozan *et al.*, 1997).

### I.3.2.3 Métabolisme de *P. frisingensis*

*P. frisingensis* et *P. cervesiophilus* sont capables de fermenter un grand nombre de substrats carbonés. Cependant, *P. frisingensis* peut être distinguée phénotypiquement de *P. cervesiophilus* : en effet, cette dernière ne peut pas métaboliser le xylose, le cellobiose, le mélibiose et le N-acétyl glucosamine (Schleifer *et al.*, 1990). Les produits majeurs de fermentation sont l'acide acétique et l'acide propionique (Schleifer *et al.*, 1990 ; Tholozan *et al.*, 1994). La fermentation du glucose par *P. frisingensis* produit de l'acide acétique, de l'acide propionique, de l'acétoïne et de l'acide succinique (Schleifer *et al.*, 1990 ; Tholozan *et al.*, 1994). *P. frisingensis* est capable de croître en utilisant le lactate, le pyruvate et le glycérol comme source de carbone. En 1994, Tholozan *et al.* ont montré que la voie métabolique de

Composés	<i>Pectinatus cerevisiophilus</i> ATCC 29359	<i>Pectinatus frisingensis</i> ATCC 33332
<b>Acides gras saturés</b>		
C11 : 0	10,1	9,7
C12 : 0	0,3	0,5
C13 : 0	3,0	4,1
C14 : 0	1,1	0,6
C15 : 0	16,8	11,0
C16 : 0	1,1	0,8
C17 : 0	2,9	2,4
C18 : 0	0,6	1,0
<b>Acides gras hydroxylés</b>		
C13 : 0 (3OH)	24,9	26,1
<b>Acides gras insaturés</b>		
C15 : 1*	3,5	2,6
C16 : 1 $\omega$ 7trans	0,3	0,5
C17 : 1*	6,8	4,0
C18 : 1 $\omega$ 9cis	2,6	0,8
C18 : 1 $\omega$ 9trans	0,7	0,4
<b>Acides gras cyclopropanes</b>		
C18 : cyclo	8,1	10,5

Tableau 4 : Composition en acides gras membranaires de *Pectinatus frisingensis* et *P. cerevisiophilus* (D'après Helander et Haikara, 1995).

\* forme isométrique non déterminée

synthèse du propionate chez *P. frisingensis* correspond à celle du succinate, avec le pyruvate, l'oxaloacétate, le malate, le fumarate, le succinate, le succinyl CoA et le méthylmalonyl-CoA et propionyl-CoA comme intermédiaires. Cette voie métabolique a été décrite chez de nombreuses bactéries notamment chez *Propionibacterium spp.* (Allen *et al.*, 1964) et *Bacteroides fragilis* (Macy *et al.*, 1978). Chez *P. frisingensis*, la voie du succinate est l'unique voie de formation du propionate (Tholozan *et al.*, 1994), à la différence d'*Escherichia coli* qui possède à la fois la voie du succinate et celle de l'acrylate, utilisées simultanément pour produire le propionate (Evans *et al.*, 1993).

#### I.3.2.4 Caractéristiques de l'enveloppe cellulaire de *P. frisingensis*

*P. frisingensis* présente des particularités au niveau de sa composition en acides gras membranaires. Ainsi *P. frisingensis*, comme *P. cerevisiophilus*, possède une proportion importante de plasmalogènes (phospholipides à liaison de type alkényl-éthers) qui sont typiquement retrouvés chez certaines bactéries anaérobies strictes. *P. frisingensis* manifeste une prédominance d'acides gras membranaires et de chaînes alk-1ényl à nombre impair d'atomes de carbone comme décrit chez *Veillonella alcalescens* et *V. parvula*. Parmi les acides gras saturés, le C11:0 et le C15:0 sont les plus abondants, pour les acides gras insaturés le C17:1 est le plus abondant (Tableau 4) (Helander et Haikara, 1995). Au niveau des lipopolysaccharides (LPS) et plus particulièrement au niveau du core du lipide A de *P. frisingensis*, le C13:0 (3OH) est le principal acide gras. Cet acide gras est rarement trouvé dans les LPS (Helander *et al.*, 1994).

### I.3.2.5 Thermorésistance de *P. frisingensis*

Des études comparatives (Watier, 1994 ; Watier *et al.*, 1995) de la thermorésistance de trois souches appartenant aux trois espèces du genre *Pectinatus* : *Pectinatus cerevisiophilus*, *Pectinatus frisingensis* et *Pectinatus.sp* dans le moût (pH 5,2) et le milieu MRS (pH de 6,0), montrent que *P. frisingensis* semble être la souche qui résiste le mieux à des traitements thermiques de 60°C dans le moût avec une  $D_{60}$  de 1,69. Cependant, dans le milieu MRS, *P. frisingensis* semble être plus affectée que *P. cerevisiophilus* par un traitement à 60°C avec des  $D_{60}$  respectives de 1,87 et de 3,22. Des traitements thermiques à 50°C montrent que *P. frisingensis* possède des  $D_{50}$  qui sont élevées à la fois dans le moût et le milieu MRS, mais *P. cerevisiophilus* reste l'espèce la plus résistante à des traitements à 50°C (Watier *et al.*, 1995). Ces études de thermorésistance montrent que les bactéries appartenant au genre *Pectinatus* ne peuvent pas croître dans le moût quand il est chauffé avant la fermentation ce qui est en accord avec Back *et al.* (1992) qui classe *Pectinatus* dans la catégorie des contaminants de la bière en bouteille. En d'autres termes, *Pectinatus* est plus impliquée dans les contaminations après remplissage des bouteilles, juste après la fermentation principale.

## I.4 Conclusion

L'industrie brassicole est le type d'industrie agro-alimentaire qui est le résultat de plusieurs siècles d'expérience. En effet, de nombreuses pratiques brassicoles ont été établies il y a fort longtemps. L'évolution des technologies utilisées en industrie brassicole a permis d'une part l'augmentation et l'amélioration de la production et d'autre part l'amélioration des qualités sanitaires et organoleptiques du produit. Cependant, elles ont aussi favorisé la création de nouvelles niches écologiques qui ont permis l'émergence de nouveaux contaminants à côté des contaminants classiques. Ainsi, les flores d'altération des produits

alimentaires continueront toujours à représenter un vrai problème pour les qualités sanitaires des aliments à cause de leur capacité à s'adapter et à conquérir de nouveaux environnements. Ceci montre donc l'intérêt que doivent porter les industriels et les microbiologistes à l'étude des flores d'altération des aliments en général et à celles de la bière en particulier. Une meilleure compréhension des mécanismes de contamination et de résistance des micro-organismes aux différents traitements rencontrés lors de la fabrication des produits alimentaires rendra possible l'optimisation des méthodes de stabilisation.

Grâce à cet apport scientifique continu, l'industrie brassicole a toujours su s'adapter aux exigences de son temps et garantir aux consommateurs un produit stable d'un point de vue biologique et sans danger pour sa santé. Ainsi, à côté des traitements thermiques de stabilisation de la bière (pasteurisation ou flash pasteurisation), assiste-t-on à l'avènement de nouvelles techniques de stabilisation de la boisson (tout au moins au stade de recherche) notamment l'utilisation de la filtration sur membrane et l'utilisation de bactériocines (nisine).

---

## **Les exigences majeures du consommateur**

---

### **Aspect pratique**

- ⇒ stockage facile
- ⇒ une durée de vie satisfaisante

### **Qualité**

- ⇒ meilleure flaveur, texture et apparence

### **Fraîcheur**

- ⇒ plus naturel
- ⇒ bénéfique d'un point de vue nutritionnel
- ⇒ sans risque pour la santé

### **Moyen de fabrication**

- ⇒ des procédés moins sévères
  - exposition minimale à des traitements à hautes températures*
  - peu de dommages suite à la congélation*
- ⇒ peu d'additifs synthétiques
- ⇒ utilisation fréquente d'agent de conservation naturel
- ⇒ un niveau bas de sel, de sucre et de matières grasses
- ⇒ élimination des micro-organismes pathogènes des aliments et des matières premières

---

***Tableau 5 : Exigences du consommateur et leur impact sur le développement des techniques de conservation des aliments (D'après Gould, 1994).***

## **II. Traitements de stabilisation de la bière**

Les exigences du consommateur sont en perpétuelle évolution. En effet, le Tableau 5 montre que le consommateur exige de plus en plus des produits alimentaires avec une durée de vie assez longue, des produits qui se rapprochent le plus des produits naturels et sans risque pour sa santé à la date limite de vente (Gould, 1995). L'augmentation de la consommation des bières sans alcool, des bières légères et des bières biologiques représente un indice fort du changement des habitudes du consommateur. Ainsi, la satisfaction de ces exigences passe par une qualité sanitaire accrue du produit incluant l'amélioration et l'adaptation des techniques de stabilisation habituellement utilisées (les traitements thermiques dans le cas de la bière) en industrie agro-alimentaire, sans fragiliser la stabilité biologique des aliments. Ceci suscite le développement et la mise au point de nouvelles techniques de stabilisation telle que la filtration sur membrane, ou des combinaisons de techniques existantes permettant de diminuer le niveau d'utilisation de chaque facteur pris isolément (théorie des barrières) (Leistner, 1995). Une autre voie consiste à examiner la possibilité d'utiliser des inhibiteurs naturels d'origine animale, végétale, ou microbienne.

Par ailleurs, des études de marketing récentes (notamment françaises et anglaises) sur les grandes tendances de la consommation de bière à court et à moyen terme, indiquent que les consommateurs se tournent vers des produits plus typés (bières spéciales ou de spécialité). En effet, ces produits véhiculent des images marketing fortes, faisant référence à une marque industrielle ou à une tradition brassicole de spécialité définie. La renaissance des microbrasseries et le taux de pénétration croissant de leurs produits dans les petites et

moyennes surfaces est un signe révélateur de ces changements (Fillaudeau, 1998). C'est ainsi qu'un certain nombre de bières présentant des caractéristiques intrinsèques particulières ne sont ni filtrées ni pasteurisées, la bière blanche par exemple. Dans ce cadre, Ogden et Tubb (1985) ont proposé l'utilisation de la nisine (la seule bactériocine dont l'emploi est autorisé par l'Organisation Mondiale de la Santé) pour garantir la stabilité biologique et augmenter la durée de vie de ces bières. En effet, Ogden et Tubb (1985) se sont basés sur le fait que la nisine est active contre la plupart des bactéries à Gram positif contaminant la bière et que la nisine reste sans effet sur les arômes de la bière, ainsi que sur la levure et son pouvoir de fermentation.

## **II.1 Traitements classiques de stabilisation**

Un pH acide, la présence d'éthanol, les extraits de houblon et la déficience en substances nutritives de la bière finie sont autant de facteurs qui limitent la croissance des micro-organismes. Cependant, afin d'assurer sa stabilité biologique et d'augmenter sa durée de vie, la bière est soumise soit à la pasteurisation soit à la flash pasteurisation suivies par un stockage au froid avant conditionnement.

Le but des traitements thermiques (pasteurisation ou flash pasteurisation) est de garantir la stabilité biologique de la bière. Leurs effets dépendent de plusieurs facteurs notamment du type de bière, du nombre et du type de micro-organismes et du niveau du traitement thermique de pasteurisation. Une unité de pasteurisation correspond à 1 minute à 60°C ou son équivalent basé sur le taux de destruction des micro-organismes rencontrés dans la bière (Back *et al.*, 1992). Après la filtration, qui se déroule à des températures de l'ordre de -1 à -2°C, la bière arrive dans le circuit de soutirage où elle est maintenue à des températures

basses (-1 à 2°C). Ensuite, elle est soit pasteurisée à 60 °C pendant 15 minutes soit flash pasteurisée dans un échangeur à plaques à 70-72 °C pendant 30 secondes suivi d'une diminution instantanée de la température à 2°C (Moll, 1991). Elle est ensuite conservée au froid avant conditionnement. L'avantage de la pasteurisation et de la flash pasteurisation est la destruction des contaminants indépendamment du type de micro-organisme, de sa morphologie, des conditions physiologiques et du taux de contamination initial. De plus, le traitement thermique améliore les bières susceptibles d'avoir une mousse importante (giclage) lorsqu'elles sont décapsulées et celles qui sont inadaptées à la filtration, enfin il entraîne la désactivation de certaines protéinases produites par la levure et assure une meilleure stabilité de la mousse de la bière (Back *et al.*, 1992).

Dans certains cas, les traitements thermiques (pasteurisation ou flash pasteurisation) peuvent induire une altération de la saveur de certaines bières. On l'observe souvent pour les bières blondes de type Pils. Les traitements thermiques entraînent des réactions chimiques (réaction de Maillard). Le 2-furfural, la  $\gamma$ -nonalactone et l'acide nicotinique sont les indicateurs typiques de cette altération. Certains types de bières flash pasteurisées sont totalement impropres à la consommation 3 à 4 mois après leur mise sur le marché (Back *et al.*, 1992).

## **II.2 Les traitements de stabilisation alternatifs**

La pasteurisation et la flash pasteurisation sont les deux procédés utilisés pour assurer la stabilisation de la bière. L'utilisation de la filtration tangentielle et de la nisine comme moyen alternatif de stabilisation est encore au stade expérimental. Cependant toutes les

données disponibles jusqu'alors sur ces deux techniques et leur utilisation potentielle dans l'industrie brassicole, les présentent comme deux techniques très prometteuses.

### II.2.1 Filtration tangentielle

Il existe plusieurs types de filtration : la filtration clarifiante vise à retenir les particules les plus volumineuses (levures, macro-colloïdes). La filtration fine permet la rétention de 90 à 100% de levure, alors que le degré de rétention des bactéries est significativement plus faible. La filtration ultrafine permet l'élimination totale des levures et une réduction importante des bactéries. Enfin, la filtration stérilisante permet l'élimination totale des levures et des bactéries (Back *et al.*, 1992). Actuellement la filtration stérilisante sur membrane est présentée comme une alternative au traitement thermique (pasteurisation et flash pasteurisation). Selon les industriels, la filtration permet d'avoir une bière stable d'un point de vue biologique tout en évitant les altérations organoleptiques dues au traitement thermique. Cette étape est le plus souvent précédée d'une préfiltration qui permet d'éliminer les particules susceptibles de colmater la membrane. Les filtrations clarifiante et stérilisante semblent être une alternative technologique à la filtration frontale sur Kieselguhr et au traitement thermique de la bière, dans la mesure où les membranes utilisées sont régénérables et où le procédé n'altère pas le goût de la bière. Cependant, l'inconvénient majeur de la filtration sur membrane est que certaines bactéries de petite taille comme *Lactobacillus lindneri*, *L. casei*, *L. coryneformis* et *L. brevisimilis* ne sont pas totalement éliminées (Back *et al.*, 1992). La réduction du diamètre des pores des membranes qui conduirait au colmatage rapide de celles-ci est de ce fait difficilement envisageable. L'opération nécessiterait aussi l'utilisation d'une combinaison de filtres régénérables avec des pores de diamètres différents, ce qui impliquerait un surcoût en comparaison avec la flash pasteurisation (Back *et al.*, 1992).

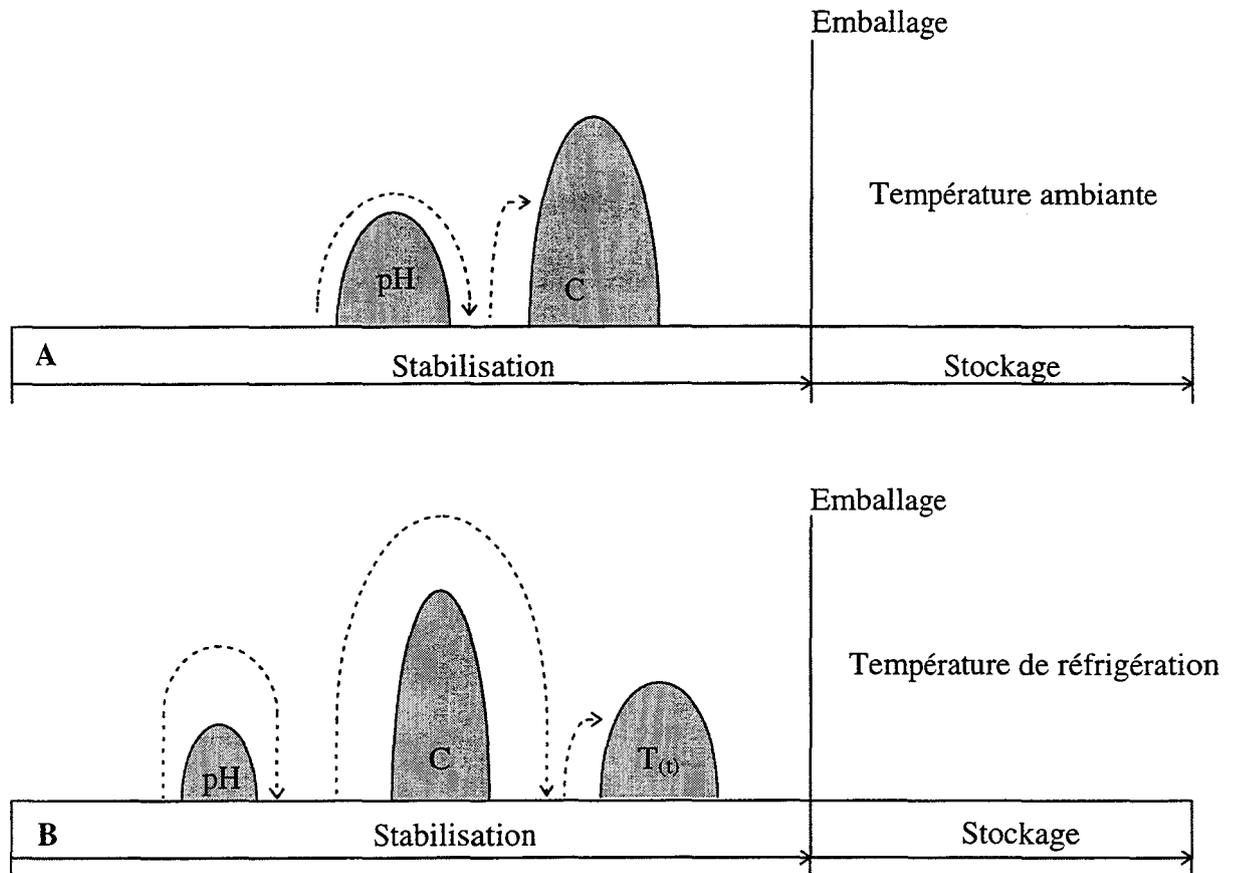
## II.2.2 Les bactériocines comme moyen de stabilisation

Les bactéries produisent un certain nombre de composés qui peuvent inhiber la croissance de contaminants potentiels ou de micro-organismes pathogènes. Parmi ces composés, on peut citer les produits finaux de fermentation comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et les bactériocines.

Malgré le nombre important de bactériocines découvertes récemment (Jack *et al.*, 1995), la nisine produite par *Lactococcus lactis* est la seule substance bactérienne dont l'emploi comme agent de conservation est autorisé. Elle est utilisée comme agent de stabilisation dans les fromages, les produits laitiers et les conserves de légumes (Delves-Broughton, 1990). Son utilisation dans d'autres produits alimentaires comme les viandes, la bière est envisagée mais reste au stade expérimental (Ogden et Tubb, 1985). Les caractéristiques et les potentialités d'utilisation de ce type de composé dans les industries agro-alimentaires en général, et dans la bière en particulier, seront présentées plus longuement dans le chapitre IV.

## II.3 Théorie des barrières

La théorie des barrières consiste en la combinaison de techniques de stabilisation classiques et nouvelles afin de mettre en place une série de facteurs (barrières) de stabilisation qui seront infranchissables par tout micro-organisme susceptible de se développer dans l'aliment (Leistner, 1995). Les barrières peuvent être la température, le pH, la présence d'alcool ou de bactériocines. Pour qu'un micro-organisme soit capable de se développer, il doit résister à chaque facteur (passer chaque barrière) : plus la barrière est haute, plus l'effort requis sera grand, et plus les dommages cellulaires seront importants et le micro-organisme



**Figure 3 : Exemples de combinaison de traitement de stabilisation dans la cadre de la théorie de barrières. pH, Conservateurs (C) et un traitement thermique positif modéré ( $T_{(t)}$ ) dans le cas d'une boisson type jus de fruit (D'après Tapia de Daza et al., 1996).**

sera fragilisé (Figure 3). La combinaison des facteurs de stabilisation selon le concept de la théorie des barrières, permet à la fois de garantir la stabilité biologique et une haute qualité nutritive de l'aliment, dans la mesure où la théorie des barrières permet d'abaisser le niveau de chaque traitement (facteur) à un seuil minimal mais suffisant, du moins en combinaison avec les autres barrières, pour empêcher le développement des micro-organismes et pour permettre de conserver les qualités organoleptiques de l'aliment (Leistner, 1995 ; Tapia de Daza *et al.*, 1996). La conservation des aliments a donc pour objectif d'empêcher ou de retarder la croissance des micro-organismes (pathogènes ou non) par l'intermédiaire de facteurs physiques, chimiques ou biologiques qui affectent la croissance et la survie de ces micro-organismes. La plupart des agents de conservation (traitements thermiques chauds ou froids, présence de bactériocines) agissent sur les mécanismes homéostatiques de la cellule végétative voire de la spore. La stabilité de la composition du cytoplasme est essentielle pour la survie et la croissance de la bactérie. Cette stabilité est maintenue grâce à différents mécanismes physiologiques qui permettent d'une manière permanente de réguler et de stabiliser les différentes variations de la composition du cytosol bactérien (Tapia de Daza *et al.*, 1996). Dans cette optique, il est nécessaire de connaître l'impact de la combinaison de traitements de conservation sur les micro-organismes et de comprendre comment ils affectent l'homéostasie bactérienne, de manière temporaire ou permanente. En effet, si l'homéostasie, c'est à dire l'équilibre de composition interne des bactéries est perturbée, celles-ci ne se multiplieront pas et resteront en phase de latence ou seront détruites. Il est également fondamental de déterminer la cible des traitements de conservation (membrane cellulaire, ADN, système enzymatique, pH interne, perméabilité cellulaire), afin d'optimiser leur choix et d'obtenir des effets synergiques, en affaiblissant différents compartiments physiologiques bactériens.

## II.4 Conclusion

Les traitements thermiques, la pasteurisation et la flash pasteurisation, restent parmi les méthodes de stabilisation les plus utilisées. Cependant, les nouvelles exigences du consommateur incitent le brasseur à chercher de nouveaux procédés de stabilisation. Ceci passe donc soit par la combinaison de différents procédés de stabilisation comme dans le cas de la théorie des barrières, soit par la recherche de nouveaux procédés comme c'est le cas pour l'utilisation de bactériocines notamment la nisine.

Dans le cadre général de la théorie des barrières, notre objectif est d'acquérir des connaissances physiologiques sur la réponse de *P. frisingensis* à différents stress et d'étudier comment la bactérie, dans certaines conditions hostiles, parvient à restaurer son homéostasie cellulaire. On utilisera à cet effet le potassium intracellulaire comme marqueur physiologique de stress. Nous nous intéresserons plus particulièrement au cours de cette étude à l'effet, soit isolé soit combiné, d'un traitement thermique chaud, d'un traitement à basse température, d'addition de nisine, de variations de pH et de présence ou d'absence de glucose sur l'homéostasie cellulaire de *P. frisingensis*.

### **III. Homéostasie et réponses cellulaires aux conditions hostiles**

La cellule bactérienne survit dans son environnement en maintenant un pH intracellulaire relativement neutre et un environnement ionique cellulaire favorable à l'activité enzymatique. Ce phénomène est appelé homéostasie (Lewis et Young, 1996). La cellule bactérienne, comme les autres cellules vivantes animales et végétales, accumule des concentrations élevées en  $K^+$  et peu élevées en  $Na^+$  (Bakker et Harold, 1980), deux ions qui jouent un rôle central dans la physiologie bactérienne. Ils interviennent dans la régulation du pH intracellulaire, dans la bioénergétique cellulaire, et sont activateurs de certaines enzymes. Ainsi, toute perturbation des équilibres ioniques de part et d'autre de la membrane cellulaire doit être au plus vite réparée par la cellule pour assurer sa survie. Nous présenterons donc tout d'abord l'implication des ions  $H^+$ ,  $Na^+$  et  $K^+$  dans la régulation de l'homéostasie cellulaire avant de nous intéresser plus spécifiquement à la réponse cellulaire bactérienne aux stress.

#### **III.1 Implication des protons, du sodium et du potassium dans l'homéostasie cellulaire**

##### **III.1.1 Les protons et la force proton-motrice**

Le gradient électrochimique de protons ou force proton-motrice joue un rôle central dans la bioénergétique des cellules eucaryotes et procaryotes. Le gradient électrochimique de protons consiste en deux composantes : le gradient de protons ( $\Delta pH$ ) et le potentiel de membrane ( $\Delta\Psi$ ).

Ainsi la force proton-motrice peut être exprimée de la façon suivante :

$$\Delta p = F \Delta \Psi - Z \Delta pH$$

$$\text{Avec } Z = 2.3 RT/nF = 59 \text{ mV à } 25 \text{ }^\circ\text{C}$$

$R$  représente la constante des gaz parfaits,  $F$  la constante de Faraday,

$n$  le nombre de charges portées par l'ion considéré

Outre son implication dans la synthèse de l'ATP, la force proton-motrice ( $\Delta p$ ) est aussi à l'origine d'une multitude de réactions vitales pour la cellule bactérienne. En effet, la force proton-motrice intervient dans le transport des substances nutritives, dans la régulation du pH intracellulaire, dans le maintien et la régulation du volume cellulaire et dans la mobilité cellulaire (Futai et Tsuchiya, 1987). Par conséquent, les protons jouent un rôle important dans la bioénergétique de la plupart des bactéries. Cependant, certaines bactéries utilisent d'autres ions, notamment les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ , pour synthétiser de l'ATP via des ATPases  $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$  dépendantes comme chez *Enterococcus hirae*, *Propionigenum modestum* et *E. coli* (Heefner et Harold, 1982 ; Hilper *et al.*, 1984 ; Walderhaug *et al.*, 1987). Ainsi les ATPases, responsables soit de l'hydrolyse soit de la synthèse d'ATP, couplent l'hydrolyse de l'ATP au transport des ions contre leur gradient de concentration.

A côté des ions  $\text{H}^+$ , les ions  $\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+$  sont également impliqués dans la bioénergétique chez les bactéries. De plus, ces deux cations assurent également d'autres fonctions dans la cellule et entrent notamment en jeu dans de nombreux autres mécanismes de régulation.

### III.1.2 Les ions sodium

Les bactéries, comme les autres cellules vivantes, établissent et maintiennent des concentrations cytoplasmiques en ions  $\text{Na}^+$  inférieures à celles du milieu dans lequel elles

vivent (Padan et Schuldiner, 1993). Cependant, malgré des concentrations plus faibles comparées à celles d'autres ions comme le  $K^+$ , le rôle des ions sodium est d'une grande importance pour la vie de la cellule.

### III.1.2.1 Les ions sodium et la régulation du pH intracellulaire

Une caractéristique commune à toutes les bactéries est le maintien d'un pH intracellulaire proche de la neutralité afin d'assurer un bon fonctionnement enzymatique et ceci quel que soit leur mode de vie et l'environnement dans lequel elles se trouvent. Ainsi, les bactéries neutrophiles maintiennent un pH intracellulaire entre 7,6 à 7,8, alors que les acidophiles et les alcalophiles maintiennent un pH intracellulaire autour d'une valeur de 6,5 et 8,2 respectivement (Schuldiner et Padan, 1993a). Par conséquent, quelle que soit la valeur du pH du milieu extracellulaire, le taux de sortie de protons, assuré par une pompe à protons, doit être compensé par un taux approprié d'entrée de protons, afin de maintenir la stabilité du pH intracellulaire. L'implication des ions  $Na^+$  dans la régulation du pH intracellulaire chez *E. coli* par le biais de l'antiport  $Na^+/H^+$  a été proposée par Schuldiner et Padan (1993a). Cette suggestion semble être démontrée à la fois chez les bactéries alcalophiles pour lesquelles les ions  $Na^+$  sont nécessaires à l'acidification du pH intracellulaire (Schuldiner et Padan, 1993b), et chez *E. coli* cultivée à pH 8,5 (Schuldiner et Padan, 1993a). De plus, *Bacillus firmus*, cultivée à pH 10,5, n'est capable de réguler et de maintenir son pH intracellulaire proche de la neutralité qu'en présence d'ions  $Na^+$ . Cependant, en absence de sodium, le gradient de pH entre le milieu intra et extracellulaire s'annule (Kitada *et al.*, 1982).

### III.1.2.2 Les ions Na<sup>+</sup> et le cotransport de substrats

Les transporteurs sodium-dépendants sont le plus souvent décrits chez les bactéries halophiles et les bactéries marines où ils sont responsables du transport vers la cellule de plusieurs types de substrats (Tokuda et Unemoto, 1982). Chez les bactéries alcalophiles comme *Bacillus alcalophilus*, le transport de certains acides aminés, montré à l'aide d'un analogue d'acide aminé l'acide  $\alpha$ -aminoglucoside, et le transport du L-malate sont dépendants du sodium (Guffanti *et al.*, 1981). Chez *Vibrio alginolyticus*, bactérie marine, le transport des acides aminés est également dépendant du sodium (Tokuda *et al.*, 1982). Chez *E. coli* des symports Na<sup>+</sup>/substrat (transfert simultané et dans le même sens de deux composés différents) ont été décrits pour le mélibiose (Stock et Roseman, 1971 ; Tsuchiya *et al.*, 1977). Chez *Klebsiella pneumoniae*, les ions Na<sup>+</sup> sont nécessaires pour le transport de citrate en conditions anaérobies (Dimroth et Thomer, 1986).

### III.1.2.3 Les ions Na<sup>+</sup> et la bioénergétique

Plusieurs bactéries notamment *Klebsiella pneumoniae* (Dimroth, 1980), *Veillonella alcalescens* (Hilpert et Dimroth, 1983) et *Propionigenum modestum* (Hilpert *et al.*, 1984) possèdent des décarboxylases membranaires fonctionnant comme des pompes à sodium. En effet, l'énergie issue des décarboxylations est utilisée pour transporter les ions Na<sup>+</sup> vers l'extérieur de la cellule. Le gradient de sodium ainsi établi de part et d'autre de la membrane cytoplasmique représente une source d'énergie qui sera utilisée par la cellule pour accomplir un certain nombre de réactions.

*P. modestum*, bactérie anaérobie stricte, conserve de l'énergie sous forme d'un gradient de Na<sup>+</sup> (Hilpert *et al.*, 1984). Au cours de la fermentation du succinate, la bactérie couple la

décarboxylation exergonique du méthylmalonyl-CoA au transport d'ions  $\text{Na}^+$  vers l'extérieur. Le gradient d'ions  $\text{Na}^+$  ainsi établi de part et d'autre de la membrane est utilisé pour synthétiser de l'ATP via une ATPase membranaire sodium-dépendante (Hilpert *et al.*, 1984 ; Dimroth, 1987). Des bactéries marines comme *Bacillus firmus* (Kitada *et al.*, 1982) et *Vibrio alginolyticus* (Dibrov *et al.*, 1986) utilisent le gradient d'ions  $\text{Na}^+$  pour leurs mouvements flagellaires.

### III.1.3 Les ions potassium

Les micro-organismes procaryotes, et de façon générale toutes les cellules vivantes, contiennent des concentrations relativement élevées en ions potassium ( $\text{K}^+$ ) pouvant atteindre des teneurs de 1 M chez de nombreuses bactéries (Richey *et al.*, 1987). En effet, toutes les cellules vivantes rejettent à l'extérieur les ions  $\text{Na}^+$  et accumulent les ions  $\text{K}^+$  (Bakker, 1993a). Le gradient élevé en ions potassium de part et d'autre de la membrane cytoplasmique des bactéries est établi grâce à de multiples systèmes d'influx et de sorties localisés dans la membrane cytoplasmique. Les ions  $\text{K}^+$  sont impliqués dans la régulation du pH intracellulaire de plusieurs bactéries (Bakker, 1993a) ; ils sont activateurs de certaines enzymes (Svelter, 1970), et interviennent dans la régulation de la pression de turgescence chez les procaryotes (Epstein, 1986).

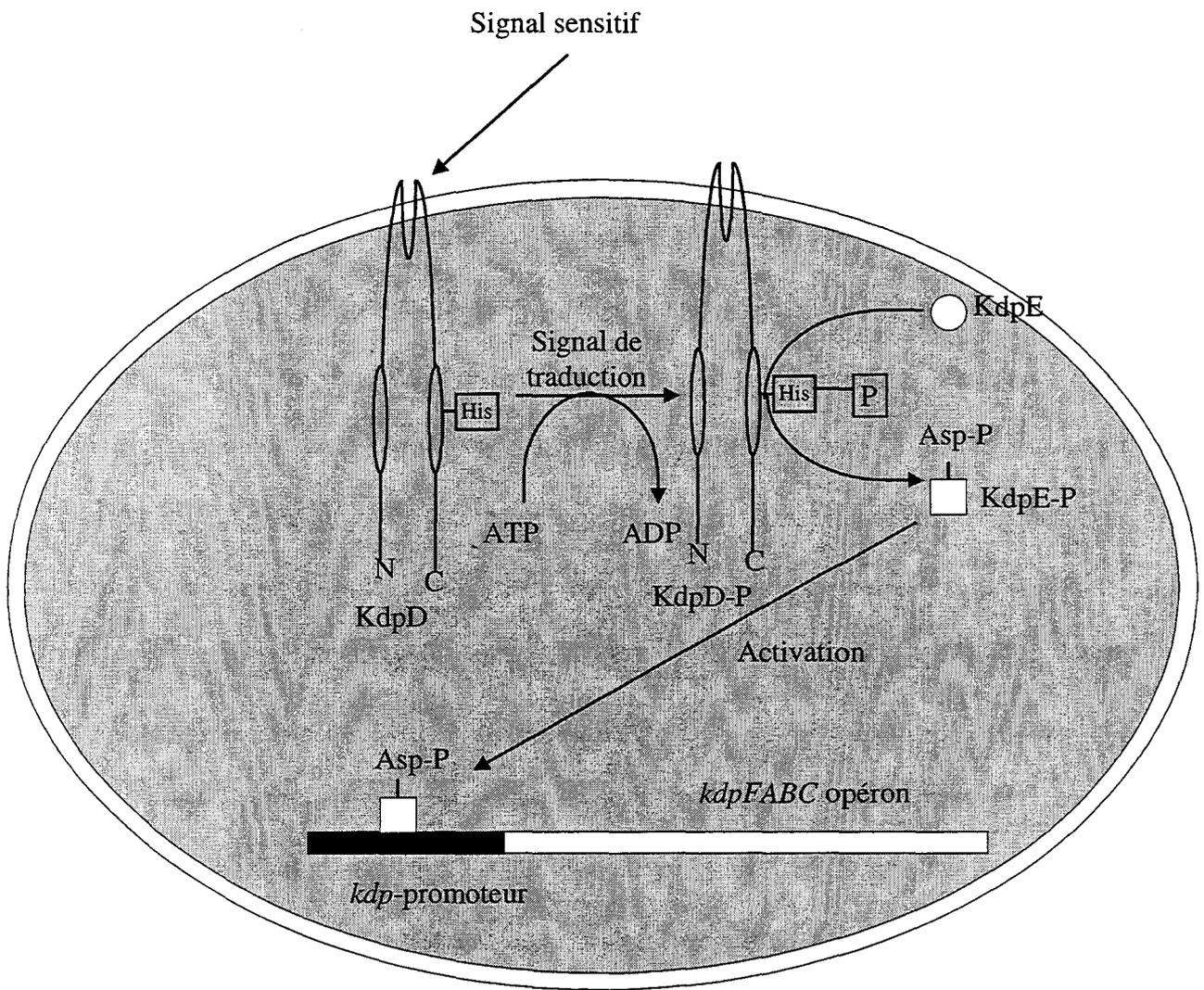
#### III.1.3.1 Systèmes de transport du potassium

Le gradient élevé en ions potassium de part et d'autre de la membrane cytoplasmique est établi grâce à de multiples systèmes de transport membranaire. La plupart des systèmes d'entrées et de sorties des ions  $\text{K}^+$  ont été décrits chez *E. coli*. Ces systèmes sont complexes et peuvent être constitutifs ou inductibles en fonction des conditions environnementales.

### III.1.3.1.1 Systèmes d'entrée des ions potassium

Les systèmes qui assurent l'entrée des ions potassium décrits chez *E. coli* et chez d'autres bactéries à Gram négatif et à Gram positif sont complexes. Ainsi, chez *E. coli* l'entrée des ions potassium est soit assurée par les systèmes constitutifs TrkH, TrkG et le système Kup, soit par le système inductible Kdp (Bakker, 1993a), en fonction de la concentration extracellulaire en ions  $K^+$ . Les systèmes constitutifs de transport de potassium TrkH, TrkG et le système Kup ne sont fonctionnels que lorsque la concentration en ions  $K^+$  dans le milieu est au moins égale à 1mM (Bakker, 1993b). Ce sont des systèmes à faible affinité pour le  $K^+$  ( $K_m = 0,2$  à 2 mM) et le transport de ce cation à travers ces transporteurs semble nécessiter à la fois un niveau d'ATP intracellulaire élevé et une force proton-motrice importante (Rhoads et Epstein, 1977). L'osmolarité du milieu semble également jouer un rôle important dans la régulation de l'activité des systèmes TrkH et TrkG. En effet, après un choc hyperosmotique l'entrée du potassium via les systèmes TrkH et TrkG est activée (Dinnbier *et al.*, 1988).

Quand la concentration en ions  $K^+$  est faible dans le milieu externe, le transport de ce cation dans la cellule est assuré par le système inductible Kdp, système à haute affinité pour l'accumulation du potassium. Ce système a été qualifié de système de secours dans la mesure où il possède un  $K_m$  de 2  $\mu$ M et peut détecter des concentrations extracellulaires en ions  $K^+$  de l'ordre de 50 nM. Ce transporteur a été décrit pour la première fois chez *E. coli* (Epstein et Davies, 1970) et depuis chez de nombreuses bactéries à Gram négatif et positif notamment chez *Bacillus acidocaldarius* (Bakker *et al.*, 1987). Le système Kdp est composé de trois protéines membranaires : KdpA, KdpB et KdpC. Chez des bactéries possédant le système Kdp déréprimé, une activité ATPasique a été associée aux entrées des ions  $K^+$ . Ceci a permis de classer le système Kdp comme une ATPase de type P (Epstein *et al.*, 1978).



**Figure 4 :** Modèle présentant l'implication des protéines KdpD et KdpE dans la régulation de l'expression de l'opéron *kdpABC* (D'après Stumpe et al., 1996).

Le complexe ATPasique Kdp est codé par des gènes organisés sous forme d'un opéron *kdpABC* (Siebers et Altendorf, 1993). L'expression de cet opéron est sous le contrôle des produits des gènes de l'opéron *kdpDE* (Siebers et Altendorf, 1993). Le produit du gène *kdpD* est une protéine membranaire KdpD, composée de trois domaines : deux domaines cytoplasmiques à caractère hydrophile (le côté N terminal et C terminal de la protéine) et un domaine hydrophobe ancré dans la membrane (Figure 4). Le produit du gène *kdpE* est une protéine cytoplasmique KdpE. Une chute dans la pression de turgescence conduit à l'autophosphorylation de la protéine KdpD. La KdpD phosphorylée transfère son groupe phosphate (phosphotransphérase) à la protéine KdpE qui va se lier au promoteur de l'opéron *kdpABC* de manière à permettre la transcription du gène codant pour l'ATPase Kdp (Perez-Martin *et al.*, 1994) (Figure 4).

### III.1.3.1.2 Les systèmes de sorties des ions potassium

Les systèmes de sortie des ions potassium semblent être plus répandus chez les bactéries à Gram négatif que chez les bactéries à Gram positif (Booth *et al.*, 1993). Les systèmes de sortie d'ions  $K^+$  ont été associés à deux fonctions principales : la régulation de la pression de turgescence et la régulation du pH intracellulaire (Booth *et al.*, 1993).

Chez *E. coli* il existe au moins deux systèmes qui sont bien caractérisés : le système KefB et KefC dont l'activité est régulée par le glutathion (Booth *et al.*, 1993). En présence de ce peptide, les sorties des ions potassium sont inhibées alors qu'en présence de composé comme le *N*-éthylmaléimide (NEM) (composé réagissant sur les groupements thiols), les sorties des ions  $K^+$  à travers les systèmes KefB et KefC sont activées. Les sorties des ions potassium via les systèmes KefB et KefC sont accompagnées par l'entrée de protons d'une

manière électroneutre, ce qui a permis de les classer comme des antiports  $K^+/H^+$  (Bakker et Mangerich, 1982). De plus, chez *E. coli* un antiport permettant l'échange entre les ions  $K^+$  intracellulaires et des ions  $NH_4^+$  extracellulaires ( $K^+/NH_4^+$ ) a été décrit (Jayakumar *et al.*, 1985).

A coté de ces systèmes de sortie des ions  $K^+$ , il existe un autre type de transporteur appelé canaux mécanosensitifs. En effet, après un choc hypo-osmotique les cellules perdent un certain nombre de molécules cytoplasmiques, et également une large partie des ions  $K^+$  intracellulaires. Pendant longtemps on a crû que ces sorties de molécules étaient le résultat de la lyse cellulaire. Cependant, des études récentes ont montré que les sorties massives des ions  $K^+$  observées lors d'un choc hypo-osmotique s'opèrent via des canaux mécanosensitifs afin de diminuer la pression de turgescence de la cellule et d'éviter la lyse des membranes (Bakker, 1993a).

### **III.1.3.2 Les ions potassium et la régulation du pH intracellulaire**

Les bactéries neutrophiles, acidophiles et alcalophiles essayent toujours de maintenir leur pH intracellulaire proche de la neutralité (Booth, 1985). Comme les ions  $Na^+$ , les ions  $K^+$  sont aussi impliqués dans la régulation du pH intracellulaire des bactéries (Bakker, 1993a). En effet, Kroll et Booth (1981) ont montré que l'entrée des ions  $K^+$  chez *E. coli* est accompagnée par la sortie de protons ce qui permet l'alcalinisation du pH intracellulaire.

Une situation extrême est rencontrée chez les bactéries acidophiles. Quand le pH du milieu extérieur est autour de pH 2, l'entrée électrogénique du potassium est tellement active que les cellules développent un potentiel de membrane inversé (intérieur positif). Dans ces

conditions d'acidité, les cellules sont obligées d'activer l'entrée des ions potassium pour maintenir leur pH intracellulaire autour d'un pH de 6 (Booth, 1985).

### **III.1.3.2.1 Les ions potassium et la régulation de la pression de turgescence cellulaire**

La pression de turgescence d'une cellule est définie comme étant la différence entre la pression osmotique du milieu extracellulaire et celle du cytoplasme. Les bactéries essaient toujours d'être dans un état turgescent, état considéré comme indispensable pour assurer la croissance cellulaire (Bakker, 1993a). L'implication du potassium dans la régulation de la pression de turgescence chez les bactéries est basée sur le fait que la teneur en ions potassium de la cellule varie en fonction de la pression osmotique du milieu extracellulaire (Bakker, 1993a ; Stumpe *et al.*, 1996). Ainsi, chez *E. coli* cultivée à des osmolarités faibles, 44% du potassium (190 mM) intracellulaire est libre dans le cytoplasme. Avec l'augmentation de la pression osmotique, la quantité de potassium libre dans la cellule augmente pour atteindre des concentrations de l'ordre de 600 mM (McLaggan *et al.*, 1994).

### **III.1.3.2.2 Le potassium comme marqueur cellulaire de stress**

Il est nécessaire que les bactéries aient une membrane cytoplasmique intacte pour garantir à la fois leur survie et leur croissance. Chez les bactéries, la membrane cytoplasmique accomplit des fonctions vitales pour la cellule notamment le maintien de la force proton-motrice, le transport de nutriments ou la séparation du cytoplasme du milieu extracellulaire (Russel *et al.*, 1995). Ainsi, la perte de molécules cytoplasmiques est toujours synonyme d'une perturbation de la perméabilité cellulaire et donc d'endommagement de la membrane

cytoplasmique (Withe *et al.*, 1992). Le caractère hydrophobe de la bicouche lipidique rend la membrane cytoplasmique pratiquement imperméable aux ions inorganiques comme le  $K^+$  et le  $Na^+$ . Le potassium représente l'ion majoritaire dans la cellule. Toute perturbation des concentrations du  $K^+$  se traduit par une perturbation de la perméabilité de la membrane cytoplasmique et donc de l'homéostasie cellulaire. Ainsi, de nombreux chercheurs (Withe *et al.*, 1992 ; Ray, 1993 ; Matsuzaki *et al.*, 1997) considèrent que l'ion  $K^+$  est un bon marqueur d'endommagements ou de perturbations de la perméabilité de la membrane cytoplasmique. L'étude des modifications de l'homéostasie cellulaire dans des conditions de stress représente ainsi une approche complémentaire à celles des protéines de stress parce qu'elle permettra de mettre en évidence la relation entre l'expression de certaines protéines particulières et la composition du cytoplasme de la bactérie.

### **III.2 Réponse bactérienne aux stress**

Les traitements bactéricides, physiques ou chimiques, sont souvent utilisés en industrie agro-alimentaire pour maîtriser la qualité sanitaire des produits ou des installations. Ces traitements, appliqués à des doses aussi faibles que possible par souci d'économie ou pour préserver les qualités organoleptiques des aliments, peuvent conduire à une destruction incomplète des micro-organismes (Brissonnet *et al.*, 1993). Les bactéries survivantes après un stress physique ou chimique doivent réparer les dommages subis pour assurer leur croissance. L'étude et la caractérisation physiologique des stress pourraient permettre de cibler les points fragiles de la cellule et permettre ainsi une meilleure lutte contre les contaminants alimentaires.

Un stress est l'état physiologique dans lequel se trouve une bactérie soumise à un traitement sublétal ou à un environnement défavorable. L'expression du stress se traduit par la perte au moins temporaire de la capacité à former une colonie visible sur milieu minimum ou sur milieu sélectif solide. Tout traitement destructeur, physique ou chimique peut engendrer un stress s'il est appliqué à un niveau sublétal (Brissonnet *et al.*, 1993). La réponse au stress est un phénomène universel : il s'agit de la capacité que possèdent les organismes à "s'adapter" à différents changements environnementaux (Mager et Kruijff, 1995 ; Panoff *et al.*, 1995).

La réponse aux stress thermiques à basse température, ou encore appelé stress froid, bien que moins connue, est depuis peu analysée chez diverses bactéries. La réponse aux stress thermiques à haute température reste parmi les réponses les mieux caractérisées, de la production des protéines de stress à la régulation moléculaire de ce phénomène (Mager et Kruijff, 1995). Toutefois, la production des protéines de stress reste la réponse la mieux étudiée en réponse aux stress thermiques à haute ou basse température, alors que les autres aspects de l'homéostasie cellulaire sont peu ou pas étudiés.

### **III.2.1 Stress froid**

La réponse aux stress thermiques froids se traduit, comme dans la plupart des autres stress, par l'arrêt ou la baisse de la production de protéines "domestiques", suivie par la synthèse de protéines spécifiques (C.S.P. pour Cold Shock Protein). Ces protéines vont assumer différentes fonctions dans la cellule (Panoff *et al.*, 1995). Chez *E. coli*, la diminution de la température de 37 à 10°C entraîne un arrêt de la croissance pendant 4 à 5 heures (Jones *et al.*, 1987). Pendant cette durée il y a une diminution du taux global de synthèse protéique, alors qu'en même temps la synthèse préférentielle d'un petit groupe de protéines augmente.

McGoven et Oliver (1995), en étudiant les protéines de stress chez *Vibrio vulnificus* suite à un choc froid de 23 à 13 °C, ont classé les C.S.P. en trois groupes. Le premier groupe renferme les protéines dont le taux relatif de synthèse augmente d'une manière rapide et transitoire. Le second groupe contient les protéines dont le taux relatif de synthèse augmente fortement puis diminue et se stabilise à un taux supérieur au taux initial. Le troisième et dernier groupe renferme les protéines dont la synthèse est induite tardivement après le choc. Les protéines synthétisées en réponse à un stress thermique négatif remplissent un certain nombre de fonctions dans la cellule. Ainsi, la protéine RecA intervient dans la recombinaison de l'ADN en favorisant la reconnaissance des molécules d'ADN dont les séquences sont homologues et l'échange des brins appariés (Watson, 1990).

### **III.2.2 Stress chaud**

Un choc thermique chaud correspond à une élévation rapide de la température par rapport à la température de croissance du micro-organisme. Les conséquences d'un choc thermique chaud sur la physiologie de la cellule ont été étudiées à différents niveaux. L'évolution de la croissance et des profils protéiques font partie des aspects les plus souvent décrits.

Un choc thermique positif dont la température finale n'excède pas ou peu la température maximale de croissance entraîne une augmentation transitoire du taux global de synthèse protéique (Allan *et al.*, 1988). Ainsi, chez *Pseudomonas aeruginosa*, le taux global de synthèse protéique est augmenté en réponse à un choc de 30 à 45 °C. Sa variation est maximale 5 minutes après le choc puis diminue pour se stabiliser à un niveau supérieur à celui mesuré à 30°C (Allan *et al.*, 1988). Cependant, lorsque la température finale du choc thermique est supérieure à la température maximale de croissance du micro-organisme, le taux

global de synthèse protéique diminue. Il chute de 50% chez *Bacillus subtilis* à la suite d'un choc de 37 à 50°C. Si la température finale du choc atteint 55°C, aucune synthèse protéique n'est observée (Arnosti *et al.*, 1986).

Les protéines dont le taux relatif de synthèse augmente d'une manière transitoire en réponse à un stress thermique positif sont appelées protéines de choc chaud ou "heat-shock protein" (H.S.P.). La production de ces protéines semble universelle, car elle est rencontrée chez des micro-organismes eucaryotes et procaryotes (Mager et Kruijff, 1995). Chez les bactéries, de nombreuses études ont montré des similarités entre la réponse aux chocs thermiques positifs chez *E. coli* et d'autres bactéries notamment *B. subtilis* (Arnosti *et al.*, 1986) et *P. aeruginosa* (Allan *et al.*, 1988). Watson (1990) a réparti les protéines de choc thermique positif en trois groupes selon leur masse moléculaire : les protéines HSP90 dont la masse moléculaire varie entre 85 et 1000 kDa, les HSP70 dont la masse moléculaire varie entre 60-80 kDa et les protéines de poids moléculaire inférieur à 50 kDa.

Parmi les HSP chez *E. coli*, il y a la DnaK (69.6 kDa) exprimée d'une manière constitutive dans la cellule mais son niveau de synthèse augmente fortement après un choc thermique positif (Neidhardt et VanBogelen, 1987). C'est une protéine capable de s'autophosphoryler (Shermann et Goldberg, 1993). A haute température, la DnaK limite l'aggrégation des protéines entre elles et participe à leur renaturation (Gragerov *et al.*, 1992).

### **III.2.3 Homéostasie cellulaire de *P. frisingensis* exposé à un choc thermique positif**

Une étude préliminaire réalisée au laboratoire sur l'effet de traitements thermiques chauds sur *P. frisingensis* (Tholozan et Jacquemont, 1999) montre des modifications significatives de l'homéostasie cellulaire de la bactérie. En effet, quand *P. frisingensis*, en état

de privation nutritionnelle, est exposée à des traitements thermiques de 45 °C et 50°C, elle perd respectivement 30% et 50 % de son potassium intracellulaire. Les mesures de viabilité cellulaire avant et après ces chocs thermiques montrent que les sorties d'ions potassium ne sont pas accompagnées de mortalité cellulaire. Cependant, les sorties d'ions potassium (90% du potassium interne) mesurées après un traitement thermique de 60°C sont accompagnées par une perte de 40% de viabilité cellulaire. De plus, un traitement thermique modéré à 50°C des cellules de *P. frisingensis* métabolisant le glucose induit des perturbations transitoires du gradient de potassium sans perte de viabilité cellulaire.

Le pH intracellulaire est affecté par le traitement thermique modéré à 50°C à la fois chez les cellules en privation nutritionnelle et en présence de glucose. Une diminution moyenne du pH intracellulaire de 0,1 unité de pH est mesurée dans les deux cas après le traitement thermique (50°C). Cependant, le traitement thermique modéré (50°C) semble n'avoir aucun effet significatif sur la concentration intracellulaire en ions sodium et le volume cellulaire, à la fois chez les cellules en privation nutritionnelle et chez les cellules métabolisant le glucose (Tholozan et Jacquemont, 1999).

### III.3 Conclusion

Pour assurer leur survie, les bactéries essayent toujours de maintenir et de réguler la composition de leur cytoplasme : en d'autres termes, elles tendent à maintenir les équilibres ioniques et plus particulièrement le gradient d'ions potassium, entre le milieu intra et extracellulaire, et à maintenir leur pH autour de la neutralité pour assurer leur activité enzymatique. Ainsi, l'incapacité des bactéries à maintenir leur homéostasie cellulaire se traduirait certainement par l'endommagement des fonctions vitales de la cellule conduisant, à

terme, à la mort cellulaire. La réponse aux stress chez les micro-organismes représente un phénomène universel. Elle constitue la cascade d'événements entrepris par la cellule pour assurer sa survie. En effet, la synthèse des protéines spécifiques en réponse aux stress thermiques et les flux d'ions potassium de part et d'autre de la membrane cellulaire en réponse aux chocs thermiques chauds, représentent la manière selon laquelle la bactérie essaie de maintenir son homéostasie.

Dans l'industrie agro-alimentaire, la stabilisation des aliments est assurée soit par des traitements physiques comme les traitements thermiques ou plus récemment les traitements à haute pression, soit par des traitements chimiques comme l'addition de sels et la diminution de pH, soit enfin par des traitements biologiques comme l'addition de bactériocines. L'étude des réponses cellulaires des contaminants alimentaires à ces différents stress utilisés de manière isolée ou combinée permettrait de mettre en évidence les points fragiles des bactéries, d'optimiser les traitements de stabilisation, de maîtriser l'hygiène des produits alimentaires et d'améliorer les qualités nutritives des aliments.

#### IV. La nisine

La découverte des bactériocines date de 1925, quand Gratia observa l'inhibition de certaines souches d'*Escherichia coli* par d'autres souches de la même espèce. Les substances antibactériennes produites par *E. coli* ont été nommées colicines. Des substances "colicin-like" ont aussi été découvertes chez les bactéries à Gram positif. Le terme bactériocine a été proposé pour la première fois par Jacob *et al.* (1953) pour regrouper les substances produites par des bactéries ayant une activité antibactérienne contre des bactéries de la même espèce. Les colicines produites par *E. coli* sont caractérisées par leur nature protéique et leur spectre d'action étroit. En effet, elles ne sont généralement actives que contre d'autres *Enterobacteriaceae*. Cependant, les bactériocines produites par les bactéries à Gram positif ont un spectre d'action plus large contre différents types de bactéries, même contre des bactéries à Gram négatif (Ogden et Tubb, 1985).

Les bactériocines sont différentes des antibiotiques. En effet, les antibiotiques sont définis comme des substances produites par un organisme (procaryotes ou eucaryotes) et qui sont actives à faible dose contre d'autres organismes (procaryotes ou eucaryotes) (De Vuyst, 1994 ; Jack *et al.*, 1995). La définition des bactériocines est plus restreinte. Elles sont définies comme des substances antibactériennes qui sont produites par différentes espèces bactériennes. Elles sont de nature protéique et ont un spectre bactéricide étroit à l'exception des lantibiotiques. Parmi les bactéries à Gram positif, les bactéries lactiques produisent un nombre important de substances antibactériennes incluant les bactériocines.

Bactériocines	Bactéries productrices	Spectre d'inhibition	pH optimal d'action	Nombre d'acides aminés
<b>Lantibiotiques</b>				
Nisine A	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454,6F3,	bactéries à Gram positif	2	34
Nisine Z	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NIZO 22186			
Lacticine 481	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> CNRZ 481	bactéries lactiques <i>Clostridium tyrobutyricum</i> <i>Staphylococcus carnosus</i>	7	27
Lactocine S	<i>Lactobacillus sake</i> L45	Carnobactéries Lactobacilles Pédiocoques Lactocoques	< 5,5	
<b>Les non-lantibiotiques à faible poids moléculaire</b>				
Diplococcine	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 346	Lactocoques	5,0-11,0	51
Lactacine B	<i>lactobacillus acidophilus</i> N2	Lactobacilles	5,0	ND
Pediocine AcH	<i>Pediococcus acidlactici</i>	Pédiocoques Lactobacilles Leuconostocs Listeria Clostridium Staphylocoques	2,5-9,0	44
<b>Les non-lantibiotiques à haut poids moléculaire</b>				
Helveticin J	<i>Lactobacillus helveticus</i> 481	Lactobacilles	ND	333
Caseicine 80	<i>Lactobacillus casei</i> B80	<i>Lactobacillus casei</i> B 109	< 5,2	ND

**Tableau 6 : Propriétés des bactériocines produites par les bactéries lactiques (D'après De Vuyst et Vandamme, 1994).**

ND : non déterminé

Avec le nombre croissant de bactériocines isolées et l'hétérogénéité de leurs caractéristiques, la classification des bactériocines produites par les bactéries à Gram positif s'est révélée nécessaire. Ainsi, plusieurs auteurs ont essayé de regrouper les bactériocines en groupes partageant les mêmes caractéristiques. La classification actuelle comporte trois groupes (Tableau 6) (Abee *et al.*, 1994 ; De Vuyst et Vandamme, 1994 ; Jack *et al.*, 1995). Cependant, Klaenhammer (1993) proposa un quatrième groupe qui rassemble les bactériocines sensibles aux lipases et aux amylases.

## **IV.1 Classification des bactériocines des bactéries lactiques**

### **IV.1.1 Les Lantibiotiques**

Ce sont des petits peptides (19-37 acides aminés) thermostables (nisine, lacticine 481, lactocine, scarnocine U149) (De Vuyst et Vandamme, 1994). Ils sont de nature cationique et renferment des acides aminés inhabituels notamment la déhydroalanine (Dha), la déhydrobutyrine (Dhb), la lanthionine (Lan) et la  $\beta$ -méthyllanthionine (MeLan) résultant de modifications post traductionnelles des résidus sérine et thréonine et entraînant la formation de cinq ponts thioester intrachaîne. A la différence des antibiotiques, le peptide traduit au niveau des ribosomes n'est pas actif. Ce sont les modifications post traductionnelles notamment les modifications des acides aminés ainsi que le clivage enzymatique du pré-peptide qui confèrent au peptide mature son activité biologique.

### **IV.1.2 Les non-lantibiotiques à faible poids moléculaire**

Ce sont des peptides de faible poids moléculaire (<15 kDa), ils sont thermostables (>30 min à 100°C jusqu'à 15 min à 121°C) (De Vuyst et Vandamme, 1994). A la différence

Bactériocines	Lipasés	Amylases
Lactocine 27	-	+
Plantaricine B	+	+
Leuconocine S	-	+
Caséine LHS	-	+
Plantaricine S	+	+

*Tableau 7 : Sensibilité de certaines bactériocines aux lipases et aux amylases (D'après Mathot et al., 1996).*

*+ : sensible*

*- : non sensible*

des lantibiotiques, ils ne contiennent pas d'acides aminés inhabituels. Le peptide traduit au niveau des ribosomes est activé par le clivage d'une séquence "leader" du côté N-terminal. L'activité bactéricide ainsi que le spectre d'action des bactériocines non-lantibiotiques semblent dépendre à la fois de la longueur du peptide et du nombre de cystéine dans la séquence du peptide. En effet, la pédiocine AcH peptide à séquence courte semble plus active que la lactacine F à séquence plus longue (Jack *et al.*, 1995).

#### **IV.1.3 Les non-lantibiotiques à haut poids moléculaire**

Ce sont des peptides de poids moléculaire supérieur à 15 kDa. Ils sont thermosensibles et inactivés par des températures comprises entre 60 et 100°C pour des chauffages de 10 à 15 minutes (De Vuyst et Vandamme, 1994). Comparées aux bactériocines du premier et du deuxième groupe, elles ont un spectre d'action limité aux souches phylogénétiquement proches (Mathot *et al.*, 1996) (Tableau 6).

#### **IV.1.4 Les complexes lipo-ou glyco-protéiques**

Certaines bactériocines en plus de la séquence peptidique renferment des séquences glucidiques ou lipidiques essentielles pour leur action bactéricide. Ainsi, l'activité bactéricide de la caséine LSH et la lactocine 27 sont inhibées par des amylases, et celle de la plantaricine B est inhibée à la fois par des lipases et des amylases (Klaenhammer, 1993 ; Mathot *et al.*, 1996) (Tableau 7).

### **IV.2 La nisine**

Les premières souches productrices de nisine ont été détectées dans le lait par Rogers (1928) et Mattich et Hirsch (1944). Ce sont Mattich et Hirsch (1944) qui ont constaté pour la



première fois l'action inhibitrice de la nisine sur des bactéries pathogènes. Ils l'ont alors classée parmi les antibiotiques. Le nom de **nisine** a été proposé pour la première fois par Mattich et Hirsch (1947). En effet, le mot nisine dérive de la phrase "Groupe N Inhibitory Substance" la terminaison "**ine**" vient du fait que les antibiotiques produits par les streptocoques de groupes sérologiques N de Lancefield ou streptocoques lactiques (nom actuel *Lactococcus Schleifer et al.*, 1985) se terminent par la terminaison "**ine**" (De Vuyst et Vandamme, 1994).

#### IV.2.1 Biosynthèse

La nisine est codée par un gène de 147-pb *nisA* entouré en amont par les gènes *nisB*, *nisT* et *nisC* et en aval par les gènes *nisI*, *nisP* et *nisR* qui sont impliqués dans la synthèse, la régulation et l'immunité (Kuipers *et al.*, 1993). Le gène *nisA* code pour un ARN messager qui donne naissance juste après la traduction au précurseur de la nisine. Le peptide pré-nisine est constitué par une séquence de 57 acides aminés qui ne renferme ni acides aminés inhabituels ni structures secondaires. La molécule pré-nisine est formée après clivage de la séquence leader de 23 acides aminés (Figure 5). La maturation de la nisine passe par un certain nombre d'étapes de déshydratation conduisant à la transformation de la sérine et de la thréonine en déhydroalanine et déhydrobutyrine, respectivement. La formation des ponts disulfures entre les acides aminés modifiés et la cystéine conduit à la formation de la lanthionine et de quatre  $\beta$ -méthyllanthionine (Rauch *et al.*, 1994) (Figure 6). Le gène *nisI* code pour une lipoprotéine qui semble être impliquée dans l'immunité de la souche productrice de la nisine. En effet, quand le gène *nisI* est exprimé chez des souches productrices de nisine, les bactéries sont plus résistantes à l'ajout de nisine. De plus, chez des mutants de *L. lactis* renfermant un gène *nisA*

tronqué, l'expression du gène *nisl* n'immunise pas les bactéries vis à vis de la nisine ajoutée. Ceci suggère que le développement de l'immunité dépend à la fois de l'expression des gènes *nisA* et *nisl* (Jack *et al.*, 1995).

## IV.2.2 Mécanismes d'action

### IV.2.2.1 Spectre d'action

La nisine a un effet bactéricide et sporocide contre la plupart des bactéries à Gram positif, notamment contre *Listeria monocytogenes* (Abee *et al.*, 1994 ; Maisnier-Patin *et al.*, 1995 ; Thomas et Wimpenny, 1996), et *Clostridium botulinum* (Rogers et Montville, 1994). Cependant, la nisine est inactive contre les bactéries à Gram négatif (Kalchayamand *et al.*, 1992 ; Stevens *et al.*, 1992). En effet, les lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif empêchent la nisine d'atteindre la membrane cytoplasmique (Kalchayamand *et al.*, 1992), évitant ainsi la lyse cellulaire. Toutefois, l'action bactéricide de la nisine peut être élargie aux bactéries à Gram négatif et aux bactéries à Gram positif résistantes à la bactériocine, à condition de les fragiliser par des traitements physiques ou chimiques. En effet, l'action bactéricide de la nisine est plus efficace quand elle est combinée soit avec des traitements thermiques chauds (Maisnier-Patin *et al.*, 1995), soit avec des traitements froids (Kalchayamand *et al.*, 1992), soit avec l'EDTA (Stevens *et al.*, 1991).

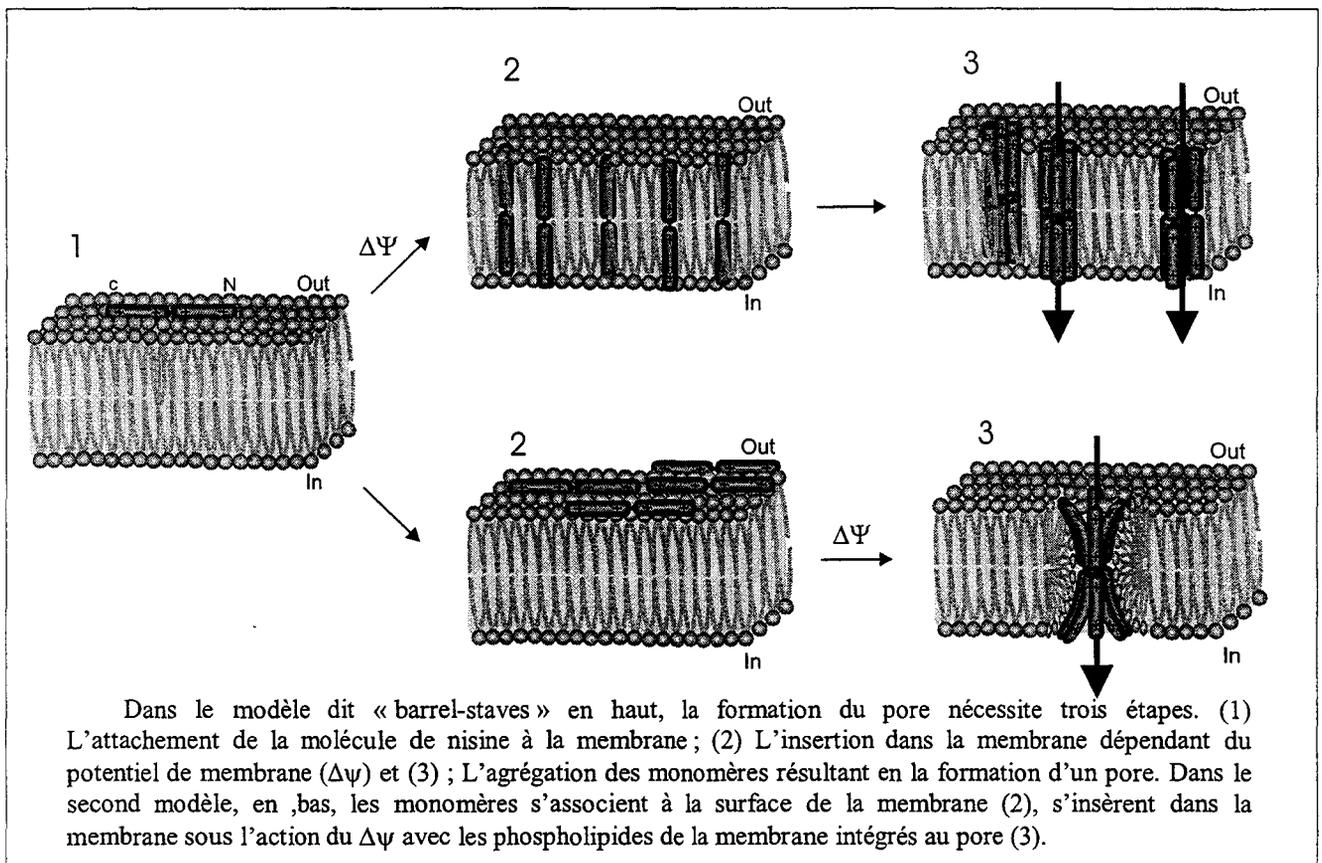
### IV.2.2.2 Formation des pores

La membrane cytoplasmique constitue la cible principale de la nisine. Il a été montré que la bactériocine s'associe avec des liposomes non énergisés et s'associe fortement avec les phospholipides chargés négativement. Ceci montre que l'association initiale de la nisine se ferait en partie par le biais d'interactions électrostatiques entre le peptide cationique et la

Lantibiotiques	Nisine A	Pep 5	Subtiline
Nombre d'acides aminés	34	34	32
Nombre de résidus chargés positivement	4	8	4
Nombre de résidus chargés positivement	1	1	2
Charges nettes	3 +	7 +	2 +
Diamètre des pores (nm)	0,2 - 1,2	0,2 - 1,2	1 - 2
Durée de vie des pores	quelques ms*	quelques ms*	jusqu'à 100 ms*

**Tableau 8 : Propriétés de quelques lantibiotiques liées à leur mode d'action (D'après De Vuyst et Vandamme, 1994).**

\* *milli-secondes*

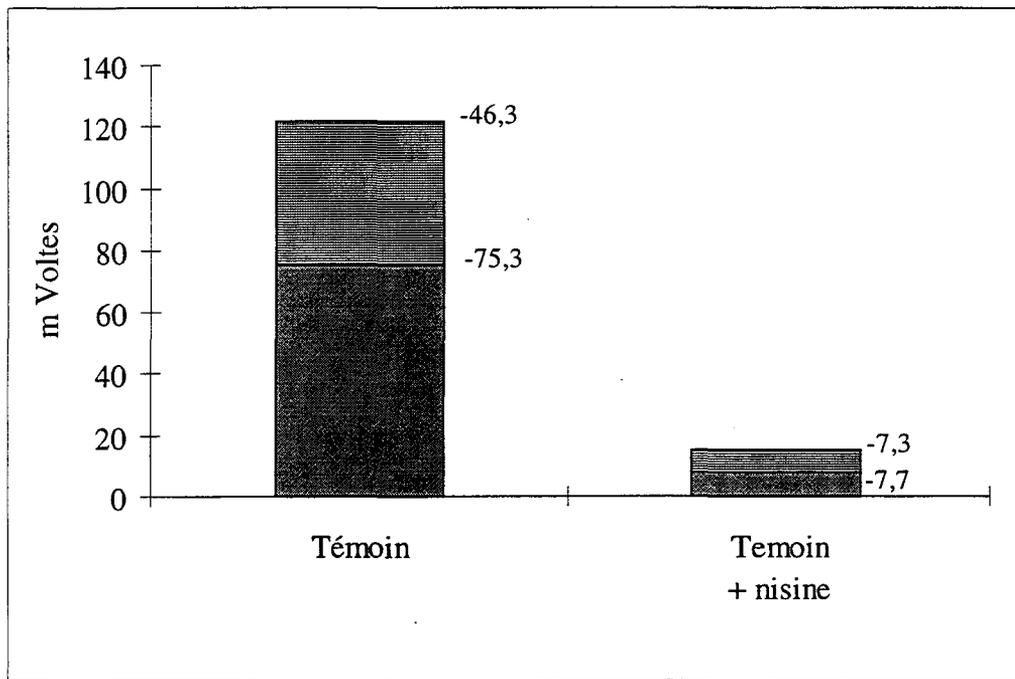


**Figure 7 : Modèles proposés de formation de pores par la nisine ( D'après Abee, 1995).**

membrane cytoplasmique (Ruhr et Sahl, 1985 ; Driessen *et al.*, 1995). La nisine agit sur les bactéries en formant des pores transitoires et multistases de diamètre allant de 0,2 à 1,2 nm (Tableau 8). Parmi les modèles avancés pour expliquer le mode d'action de la nisine, il y a celui dit du "barrel-staves" (Ojcius et Young, 1991). Selon ce modèle les molécules de nisine s'adsorbent sur la membrane par des interactions électrostatiques et hydrophobes. L'insertion dans la membrane est favorisée par le potentiel de membrane (électronégatif à l'intérieur). Cependant, Moll *et al.* (1997) ont montré que l'insertion de la nisine dans la membrane ne nécessite pas obligatoirement l'existence d'un potentiel de membrane (intérieur négatif), mais que le gradient de pH ( $\Delta\text{pH}$ ) est suffisant. Selon le modèle "barrel-staves" (Figure 7), les molécules de nisine (monomères) s'agrègent, les résidus hydrophobes orientés perpendiculairement à la paroi et les résidus hydrophiles tournés vers la lumière du canal. Les répulsions électrostatiques entre les charges positives des monomères entraînent la formation de pores (Jack *et al.*, 1995). Cependant, le nombre de molécules de nisine suffisant pour la formation d'un pore ainsi que les conditions d'agrégation des peptides restent encore non élucidés (Jack *et al.*, 1995).

#### **IV.2.3 Conséquences de l'action de la nisine sur l'homéostasie cellulaire**

La nisine est caractérisée par son action bactéricide assez forte et assez rapide vis à vis des souches sensibles. En effet, Ogden et Waites (1986) ont rapporté que les souches sensibles de *Lactobacillus* sont tuées en moins d'une minute après le traitement à la nisine. L'étude des événements précoces suite à l'addition de la bactériocine montrent que la cible principale de la nisine est la membrane cytoplasmique (Ruhr et Sahl, 1985). L'addition de la nisine provoque



**Figure 8 : Effet de la nisine (60 UI/ml) sur les composantes de la force proton-motrice (potentiel de membrane  $\Delta\Psi$  et le gradient de protons  $\Delta pH$ ) chez *Listeria monocytogenes* (D'après Crandall et Montville, 1998).**

$\Delta\Psi$   ;  $\Delta pH$  

dans les secondes qui suivent des fuites rapides de petites molécules dont la masse moléculaire est inférieure ou égale à 0,5 kDa (Abee *et al.*, 1995), notamment des acides aminés, de l'ATP et des cations comme le potassium (Ruhr et Sahl, 1985 ; White *et al.*, 1992 ; Abee *et al.*, 1994). La présence d'une source d'énergie renforce l'action de la nisine (Ruhr et Sahl, 1985 ; Moll *et al.*, 1997). Ainsi, la nisine entraîne une dissipation rapide à la fois du potentiel de membrane et du gradient de pH dans des cellules (Figure 8) en présence d'une source d'énergie (Ruhr et Sahl, 1985 ; Abee *et al.* 1994 ; Crandall et Montville, 1998), alors que, dans des cellules en privation nutritionnelle, la nisine n'entraîne qu'une diminution de moitié du potentiel de membrane (Ruhr et Sahl, 1985). La conséquence directe de ces perturbations cellulaires est la mort des bactéries comme cela a été décrit pour *Listeria monocytogenes* et *Clostridium botulinum* (Abee *et al.*, 1994 ; Rogers et Montville, 1994).

#### IV.2.4 Facteurs influençant l'activité bactéricide de la nisine

La plupart des travaux réalisés sur les applications potentielles de la nisine en industrie agro-alimentaire ont pour objectif d'étudier l'influence des ingrédients alimentaires (le sel, les nitrates) et des traitements physico-chimiques des aliments (la température, le pH, la haute pression) sur l'activité de la nisine. L'activité bactéricide de la nisine est considérablement influencée par les caractéristiques physico-chimiques et bactériennes de l'environnement dans lequel elle se trouve, comme la composition du milieu de culture, l'âge et la taille de l'inoculum bactérien, la température d'incubation et le pH. Le pH de la solution mère (avant son addition dans le milieu) et du milieu auquel la nisine est ajoutée influencent également le potentiel bactéricide de la bactériocine (Scott et Taylor, 1981 ; Abee *et al.*, 1994). Thomas et Wimpenny (1996) ont montré que la combinaison d'une faible température avec de fortes concentrations en NaCl augmentent l'efficacité de la nisine contre les staphylocoques. Des

traitements thermiques modérés renforcent l'effet bactéricide de la nisine contre *Listeria monocytogenes* (Maisnier-Patin *et al.*, 1995). Cependant, Abee *et al.* (1994) ont montré que l'activité de la nisine est diminuée à basse température (18°C).

#### IV.2.5 Rôle physiologique de la nisine pour la souche productrice

Le rôle spécifique des souches productrices de la nisine dans les écosystèmes naturels reste encore non élucidé. Toutefois, la production de la nisine pourrait conférer aux souches productrices des avantages par rapport aux autres lactocoques (Gross, 1977). De nombreuses questions subsistent quant à l'habitat naturel des *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. En 1952, Hirsch a postulé que les lactocoques avaient adopté le lait comme niche écologique suite à la domestication des animaux laitiers. Cette hypothèse est confortée par le fait que ces bactéries possèdent des plasmides codant pour des protéinases et pour des caractères tels que la capacité à fermenter le lactose et le citrate (McKay, 1983). La nisine semble jouer un rôle dans la régulation du cycle de croissance des souches productrices (*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*). Elle peut soit activer la croissance ou l'arrêter (De Vuyst et Vandamme, 1994). En effet, il a été montré que l'addition de nisine au milieu de culture avant l'inoculation des bactéries réduisait la durée de la phase de latence et reste sans effet sur le taux de croissance et la biomasse finale atteinte (Hurst et Kruse, 1972). De plus, Hurst et Kruse (1972) ont montré que l'addition de nisine à des souches productrices provoquait la lyse cellulaire avant l'initiation de la production de nisine. Ceci montre donc que le caractère qui confère l'immunité à la bactérie n'est pas exprimé de manière constitutive (De Vuyst et Vandamme, 1994).

#### IV.2.6 Unités de l'activité de la nisine

La quantité la plus faible de nisine nécessaire pour inhiber la bactérie test *Streptococcus agalactiae* représentait ce qu'on appelait "Reading unit" (RU). Ce terme a été choisi parce que les premiers travaux ont été réalisés à l'université de Reading en Grande Bretagne. En 1968, un comité d'experts de l'harmonisation biologique nommé par l'O.M.S. a mis au point une préparation de référence internationale au laboratoire central vétérinaire du ministère de l'agriculture du Royaume-Uni (Weybridge, Surrey, Grande Bretagne) (De Vuyst et Vandamme, 1994). Ainsi, 1 unité internationale a été alors définie comme étant l'activité contenue dans 1 µg de la préparation commerciale de nisine, la nisapline. La nisapline est commercialisée par la firme britannique Aplin and Barrett Ltd. 1 g de nisapline a une activité de  $10^6$  UI alors que 1g de nisine pure renferme une activité de  $40 \cdot 10^6$  UI. Ainsi une activité biologique de 40 UI correspond à 1 µg de nisine pure (De Vuyst et Vandamme, 1994).

#### IV.2.7 Propriétés physico-chimiques de la nisine

La nisine est un peptide de 34 acides aminés. La bactériocine renferme des acides aminés inhabituels notamment la déhydrobutyrine, la déhydroalanine, la lanthionine et la β-méthyllanthionine. Le coté N-terminal du peptide contient un nombre élevé d'acides aminés à caractère hydrophile. Le peptide possède un caractère cationique grâce aux résidus lysine et histidine. Le résidu déhydroalanine est fortement impliqué dans la solubilité et la stabilité de la bactériocine. En effet, la modification du résidu déhydroalanine en position 5 réduit considérablement l'activité biologique de la nisine. La solubilité de la nisine dépend du pH (Liu et Hansen, 1990 ; Rollema *et al.*, 1995). Ainsi, à pH 2 la solubilité de la nisine peut

atteindre 57 mg/ml alors qu'elle n'est que de 1,5 mg/ml à pH 6 et de 0,25 mg/ml à pH 8,5 (Liu et Hansen, 1990). Hurst (1981) indique que, lorsque la nisine est en solution à pH 2, elle supporte un niveau de température élevé sans perdre son activité biologique. Le stockage de la nisine en solution à pH 2 semble être un bon moyen pour empêcher la perte de l'activité bactéricide de la nisine (Huot *et al.*, 1996).

#### IV.2.8 Toxicité

En 1968, deux comités d'experts des additifs alimentaires de l'O.M.S. et du F.A.O. ont statué sur le fait que  $3,3 \cdot 10^6$  UI/kg de poids du corps ne présentent pas d'effets indésirables. Ainsi la nisine a été reconnue comme un produit légal et inoffensif (FAO/WHO, 1969). Dans la Communauté Européenne, le Comité Scientifique des Aliments a décidé d'allouer une dose journalière autorisée (DJA) de 0.13 mg/kg de poids du corps (1 mg représente 40 000 UI) (CEC 1992) (De Vuyst et Vandamme, 1994).

Le fait que la nisine soit produite par des souches de *Lactococcus lactis* qui sont naturellement présentes dans le lait cru et dans le fromage est une indication sur sa nature inoffensive. En effet, elle a été consommée pendant des années par les humains et les animaux sans qu'aucun effet nuisible pour la santé ne soit détectable. La  $DL_{50}$  de la nisine est similaire à celle du sel de table, elle est de 7 g/kg de poids du corps. La consommation de produits contenant de la nisine n'altère pas la flore intestinale (Barber *et al.*, 1952) dans la mesure où la bactériocine est inactivée par les enzymes du tractus gastro-intestinal (Heinemann et Williams, 1966 ; Jarvis et Mahony, 1969 ; Tiemann et Belitz, 1969). De plus, la nisine n'est pas détectée dans la salive humaine 10 min après la consommation du chocolat au lait contenant 200 UI/ml de nisine (Claypool *et al.*, 1966). Gowans *et al.* (1952) ont montré que la nisine n'a pas d'effet

Pays	Aliments dans lesquels la nisine est autorisée	Quantité maximale autorisée (UI/g de produit)	Pays	Aliments dans lesquels la nisine est autorisée	Quantité maximale autorisée (UI/g de produit)
Abu Dhabi	Lait pasteurisé lait aromatisé Lait longue conservation	Illimitées	Jordanie	Fromages pasteurisés	500
Afrique du Sud	Fromages pasteurisés Autres produits frais Conserves de légumes Certains produits fromagers pasteurisés	500	Koweït	Fromages pasteurisés	4000
Arabie Saoudite	Certains fromages	Illimitées	Malaisie	Conserves de fromages	Illimitées
Argentine	Certains aliments et produits frais	500	Malte		Illimitées
Australie	Fromages pasteurisés Fromages Conserves de tomates Soupes en conserve	Illimitées	Mexique	Additif autorisé	500
Bahrain	Lait pasteurisé lait aromatisé Lait longue conservation Fromages pasteurisés Conserves de légumes	Illimitées	Nouvelle Zélande	Fromages pasteurisés	500
Belgique	Fromages	100	Pays Bas	Fromages industriels Fromages pasteurisés Poudre de fromage	500
Bolivie	Utilisation non interdite dans les aliments	Illimitées	Pérou	Additif autorisé	800 Illimitées
Bulgarie	Fromages Glace de stockage de poisson	200 mg/kg	Philippines	Fromages pasteurisés	4000
Chili	Aliments	40000	Pologne	Fromages fermentés Fromages pasteurisés	4000
Colombie	Aliments	500	Portugal	Fromages pasteurisés	500
Costa Rica	Produits fromagers	Illimitées	Qatar	Lait, produits laitiers	Illimitées
Chypre	Fromages Crème fraîche Conserves de légumes	Illimitées	Royaume-Uni	Fromages, Conserves Crème fraîche	Illimitées
Dubai	Lait pasteurisé lait aromatisé Lait longue conservation Fromages pasteurisés Conserves de légumes	Illimitées	Singapour	Fromages conserves	Illimitées
Egypte	Fromages pasteurisés	500	Suède	Fromages Fromages pasteurisés	500
Eire	Fromages pasteurisés	500	Taiwan	Fromages	1000
Espagne	Fromages pasteurisés	500	Tchécoslovaquie	Matières premières de boulangerie Mayonnaise Fromages pasteurisés Aliments préparés Aliments semi-préparés Conserves de légumes Aliments pour bébés	500
Finlande	Fromages pasteurisés	480	Thaïlande	Fromages pasteurisés	4000
France	Fromages pasteurisés	Illimitées	Trinidad	Conserves Fromages	Illimitées
Gibraltar	Idem Royaume-Uni	Illimitées	Turquie	Divers fromages	4000
Hong Kong	Idem Royaume-Uni	Illimitées	USA	Certains fromages pasteurisés à tartiner	10000
Inde	Fromages Fromages pasteurisés	1000	Uruguay	Fromages pasteurisés	4000
Italie	Fromages Fromages pasteurisés Conserves de légumes Crèmes pâtisseries	500	URSS	Fromages pasteurisés Conserves de Légumes	8000 4000

**Tableau 9 : Pays autorisant l'utilisation de la nisine pour la conservation des aliments (D'après Deves-Broughton, 1990).**

thérapeutique et qu'elle cause des irritations locales dues en partie à sa faible solubilité au pH physiologique du sang.

#### IV.2.9 Utilisation de la nisine en industrie agro-alimentaire

L'utilisation de la nisine comme bioconservateur en industrie agro-alimentaire semble très prometteuse. L'industrie laitière est le secteur qui a le plus exploité l'utilisation de la nisine comme moyen de stabilisation (Tableau 9). Dans les fromages, la nisine est utilisée afin de contrôler le développement de *Clostridium butyricum* et *C. tyrobutyricum* (Delves-Broughton, 1990 ; De Vuyst et Vandamme, 1994) responsables de la transformation de l'acide lactique en acide butyrique et provoquant ainsi une perte de goût des fromages (De Vuyst et Vandamme, 1994). Dans les pays à climat chaud, notamment au Moyen Orient, elle est utilisée pour augmenter la durée de vie du lait et des boissons à base de lait. En effet, la nisine permet d'éliminer les spores qui ont survécu aux traitements thermiques (Delves-Broughton, 1990 ; De Vuyst et Vandamme, 1994). La nisine a aussi été utilisée pour améliorer la qualité et augmenter la durée de vie des produits alimentaires mis en conserve. Dans le cas du lait en poudre, l'emploi de la nisine (100 UI/g) a permis d'améliorer sa qualité nutritive et d'inhiber les contaminations par des bactéries dont les spores sont thermorésistantes (De Vuyst et Vandamme, 1994).

L'emploi de la nisine dans l'industrie brassicole a été proposée pour la première fois en 1985 par Ogden et Tubb. En effet, la nisine permet soit d'empêcher soit de réduire les contaminations par les bactéries lactiques (*Lactobacillus* et *Pediococcus*) (jusqu'à  $10^5$  cellules/ml) et d'autres bactéries à Gram positif. De plus, la nisine n'affecte ni les caractéristiques gustatives de la bière ni la viabilité et les performances de fermentation de la levure (Ogden, 1986 ; 1987 ; Ogden *et al.*, 1988). Ogden et Waites (1986) ont montré que

l'activité de la nisine résiste aux différents traitements au cours de la fabrication de la bière, notamment les traitements thermiques comme la pasteurisation. La nisine pourrait être ajoutée soit au moût stocké avant ébullition pour éviter des contaminations bactériennes, soit aux bières non pasteurisées pour augmenter leur durée de vie (Ogden *et al.*, 1988). La nisine pourrait aussi être utilisée pour laver les levures récupérées après la fermentation, au lieu du lavage avec des solutions acides qui altèrent la viabilité cellulaire (Ogden, 1987). Enfin, L'addition de nisine dans la bière avant la pasteurisation ou la flash pasteurisation pourrait amener à une diminution du temps et du niveau de température du traitement thermique entraînant ainsi une diminution du coût énergétique et une amélioration des qualités gustatives de la bière (Ogden *et al.*, 1988). Ogden et Tubb (1985) sont allés jusqu'à proposer la transformation des levures par les gènes impliqués dans la synthèse de la nisine, dans le but de réduire le coût de l'utilisation de la nisine dans la bière et ainsi d'assurer une présence permanente de la bactériocine dans les différentes étapes de fermentation, afin d'éviter la contamination des levures par les bactéries à Gram positif.

### **IV.3 Le phénomène de résistance**

Actuellement la nisine est utilisée dans plus de 40 pays, et de nombreuses études sont menées pour étendre son emploi à d'autres produits alimentaires (Delves-Broughton, 1990). Cependant, l'émergence de souches résistantes à la nisine pourrait compromettre son utilisation comme agent de stabilisation biologique des aliments. Les micro-organismes sont généralement en mesure de résister à l'action inhibitrice des antibiotiques et des agents de stabilisation (Verheul *et al.*, 1997). L'emploi de plus en plus fréquent de la nisine en industrie agro-alimentaire augmente la fréquence d'exposition des contaminants alimentaires à la

bactériocine, favorisant ainsi la sélection de souches résistantes. En effet, des cas de résistance ont été rapportés pour deux redoutables contaminants pathogènes : *Listeria monocytogenes* et *Clostridium botulinum* (Ming et Daeschel, 1993 ; Mazzotta *et al.*, 1997 ; Verheul *et al.*, 1997). Toutefois, il faut distinguer la résistance naturelle de la résistance acquise par les bactéries vis-à-vis de la nisine. La résistance acquise à la nisine est celle des souches qui sont à l'origine sensibles à la bactériocine, elle peut se manifester soit par des modifications de la paroi qui deviendrait infranchissable par la nisine, soit par des modifications de la cible (membrane cytoplasmique) soit par la production par la bactérie d'une enzyme qui inactive la nisine. Cependant, la résistance naturelle est la résistance des souches productrices de nisine (*Lactococcus lactis* subsp *lactis*) qui possèdent une protéine d'immunité, ou la résistance des bactéries qui possèdent une enzyme préexistante qui inactive la nisine, soit la résistance des bactéries à Gram négatif chez qui les lipopolysaccharides (LPS) empêchent la nisine d'atteindre la membrane cytoplasmique (Stevens *et al.*, 1991 ; 1992).

#### IV.3.1 Résistance par inactivation enzymatique de la nisine

La résistance à la nisine par clivage enzymatique de la bactériocine a été rapportée par plusieurs auteurs notamment Jarvis (1967). Il a décrit l'activité nisinase chez de nombreuses espèces de *Bacillus* à la fois au niveau des spores et des cellules végétatives. Les spores ayant une germination enzymatique (groupe L) possèdent une enzyme qui clive la nisine, la rendant inactive. Cette activité nisinase n'a pas été détectée dans les spores qui ont une germination de type "mécanique" (groupe M) Jarvis (1967). Cependant, les cellules végétatives du groupe L et M possèdent une activité nisinase. En 1971, Jarvis et Farr ont décrit une nisinase chez *Bacillus cereus* qui réduit la déhydroalanine du côté C terminal rendant ainsi la bactériocine inactive (Jarvis et Farr, 1971).

### IV.3.2 Résistance par des modifications de l'enveloppe cellulaire

Etant donné que la membrane cytoplasmique représente la cible cellulaire de la nisine, plusieurs chercheurs se sont intéressés aux modifications qui s'opéraient au niveau de l'enveloppe cellulaire pour expliquer le phénomène de résistance à la nisine, en particulier au niveau de la paroi et de la membrane cytoplasmique.

#### IV.3.2.1 Résistance par des modifications de la paroi

La paroi des bactéries à Gram positif représente la première barrière à franchir par la nisine pour agir sur la membrane cytoplasmique ; des modifications de la structure ou de la composition de la paroi pourraient induire la résistance à la nisine. L'implication de la paroi dans la résistance à la nisine a été montrée chez *Listeria monocytogenes*. En effet, des protoplastes de la souche résistante et de la souche témoin manifestaient la même sensibilité vis à vis de la nisine alors que les cellules intègres de la souche résistante n'étaient pas affectées par la nisine (Davies *et al.*, 1996). Chez *Listeria innocua*, la résistance à la nisine a été associée à un épaissement de la paroi de la bactérie attribué à la fois à une activation de la synthèse de la muréine et à une inactivation partielle de l'autolysine (Maisnier-Patin et Richard, 1996). De plus, comme dans le cas de *Listeria monocytogenes* (Crandal et Montville, 1998), Maisnier-Patin et Richard (1996) ont montré que la souche résistante de *Listeria innocua* à la nisine résistait aussi bien à des enzymes qui dégradent la paroi (lysozyme) qu'à des antibiotiques qui inhibent la synthèse de la muréine.

#### IV.3.2.2 Résistance par des modifications de la membrane cytoplasmique

L'altération de la composition de la membrane cytoplasmique chez une souche de *Listeria monocytogenes* résistante à la nisine a été rapportée pour la première fois par Ming et

Daeschel (1993). Ils ont montré que la composition en acides gras membranaires de la souche résistante à la nisine était différente de celle de la souche parentale (sensible à la nisine). La résistance à la nisine a été associée à un pourcentage plus faible d'acides gras ramifiés (C15:0 iso et antéiso, C17:0 iso et antéiso) et un pourcentage plus important d'acides gras à chaîne droite (Ming et Daeschel, 1993). Ces mêmes auteurs ont montré (Ming et Daeschel, 1994) que chez une souche de *Listeria monocytogenes*, la résistance à la nisine était associée à une diminution de phospholipides. Des changements similaires ont été rapportés par Mazotta et Montville (1997) qui ont observé, chez une souche résistante de *Listeria monocytogenes*, une diminution des acides gras à courte chaîne, une augmentation des acides gras à longue chaîne, et une diminution du rapport C15/C17. Les chercheurs qui ont mené ces travaux ont conclu que la résistance à la nisine s'accompagnait d'une diminution de la fluidité de la membrane cytoplasmique qui deviendrait plus rigide et empêcherait la nisine de s'insérer dans la membrane. Crandal et Montville (1998) ont associé la résistance à la nisine d'une souche de *Listeria monocytogenes* au fait que la souche résistante à la nisine contient plus de phosphatidylglycérol et plus de cardiolipines que la souche parentale. La diminution nette de charges négatives de la bicouche lipidique pourrait gêner l'adsorption de la nisine et donc son insertion dans la membrane cytoplasmique.

#### **IV.4 Conclusion**

L'utilisation de la nisine comme bioconservateur dans les produits ayant subi des traitements de stabilisation modérés est de plus en plus envisageable (Delves-Broughton, 1990). Plusieurs chercheurs s'accordent sur le fait que l'utilisation de la nisine permettrait de réduire la quantité de sel, de nitrites, de diminuer l'intensité et le temps des traitements

thermiques, mais surtout d'assurer la stabilité biologique et d'améliorer les qualités organoleptiques et nutritives des aliments (Delves-Broughton, 1990 ; De Vuyst et Vandamme, 1994 ). Dans la bière, l'utilisation de la nisine pourrait être le moyen d'augmenter la durée de vie des bières non pasteurisées. Son utilisation, combinée aux traitements thermiques, pourrait conduire à la diminution du niveau des traitements thermiques et d'éviter des réactions indésirables suite à ces derniers. Ainsi, la connaissance de l'influence des ingrédients alimentaires sur l'activité bactéricide de la nisine aiderait à mieux connaître les aliments les plus adaptés à son utilisation (Rogers et Montville, 1994). Cependant, l'émergence de bactéries résistantes à la nisine pourrait compromettre son utilisation comme bioconservateur. Les résultats disponibles jusqu'alors, qui se limitent aux études sur *L. monocytogenes* et *C. botulinum*, montrent à la fois la complexité du phénomène de résistance et surtout la nécessité d'étudier ce phénomène chez d'autres bactéries qui contaminent d'autres aliments, pour comprendre ce mécanisme et pouvoir mieux le contrecarrer. La caractérisation des mécanismes physiologiques mis en jeu par la bactérie lorsqu'elle est exposée à tel ou tel traitement de stabilisation permettra de comprendre comment celle-ci maintient et régule son homéostasie cellulaire dans des conditions hostiles pour assurer sa survie. Dans ce cadre, nous allons étudier l'effet de la nisine seule ou combinée avec d'autres stress (pH, traitement froid et chaud-froid, absence ou présence de glucose) sur l'homéostasie cellulaire de *P. frisingensis*. Puis, dans une seconde étape, nous nous intéresserons au phénomène de résistance de la bactérie à la nisine.

## V. Conclusion de l'étude bibliographique

Avec l'avènement des nouvelles technologies en brasserie, l'importance et la place occupées par divers contaminants ont changé. Ainsi, des contaminants bien connus comme les bactéries aérobies acétiques comme *Acetobacter sp.* et *Gluconobacter oxydans* semblent ne plus représenter un problème en brasserie (Jespersen et Jakobsen, 1996) ; alors que les bactéries anaérobies strictes comme *Pectinatus spp.* sont de plus en plus mises en cause dans de nombreux cas de contamination de la bière en bouteille (Lee, 1994). Le mode de contamination de la bière par *Pectinatus* reste encore mal connu et la fréquence de contamination de cette boisson par la bactérie est en nette progression depuis son isolement (Jespersen et Jakobsen, 1996). *Pectinatus* a été isolé de l'air des salles de remplissage (Henriksson et Haikara, 1991), de l'huile de lubrification mélangée à la bière et à l'eau, des canalisations d'eau, des machines de remplissage et de l'eau de trempage avant la mouture du malt (Lee *et al.*, 1980 ; Soberka *et al.*, 1988 ; Back *et al.*, 1992). Les données disponibles sur *P. frisingensis* sont limitées à des études concernant le métabolisme (Tholozan *et al.*, 1994), la croissance et la thermorésistance (Watier *et al.*, 1995). Cependant, l'homéostasie cellulaire de la bactérie reste peu ou pas documentée.

La stabilisation de la bière est assurée par les traitements thermiques (pasteurisation ou flash pasteurisation), l'usage des traitements de stabilisation alternatifs comme la filtration sur membrane ou l'utilisation de la nisine est encore au stade expérimental. Les travaux d'Ogden et ses collaborateurs concernant la nisine ont été principalement focalisés sur l'effet bactéricide de la nisine sur les bactéries lactiques de la flore d'altération de la bière. Les

études concernant l'effet de la nisine sur les bactéries à Gram négatif de la flore d'altération de la bière et le phénomène de résistance généré par l'exposition répétée de ces micro-organismes à la nisine ne sont pas décrits dans la littérature.

La survie d'un contaminant dans un aliment dépend en grande partie de sa capacité à maintenir et à réguler son homéostasie cellulaire malgré les différents traitements physico-chimiques ou biologiques subis lors de la fabrication du produit. Ainsi, l'étude de l'homéostasie cellulaire des contaminants dans des conditions de stress permettra de connaître les points fragiles de la cellule et de mettre en évidence comment la bactérie arrive à réguler et maintenir l'équilibre de la composition de son cytosol pour assurer sa survie. La compréhension de ces phénomènes cellulaires permettrait une meilleure utilisation des traitements de stabilisation, dans la mesure où leur optimisation doit conduire à une amélioration de la qualité organoleptique et sanitaire de l'aliment.

Le potassium représente l'ion majoritaire de la bactérie, il est impliqué dans de nombreux mécanismes de régulation de l'homéostasie cellulaire. La concentration interne en potassium résulte de l'équilibre entre les systèmes de transport permettant les entrées et les sorties du potassium. Ces systèmes de transport sont localisés dans la membrane cellulaire et ont été caractérisés principalement chez *E. coli*. Les mouvements des ions potassium de part et d'autre de la membrane cellulaire seront utilisés au cours de cette étude comme marqueur des modifications de l'homéostasie et de la perméabilité cellulaires. Ces mesures seront couplées à d'autres indicateurs cellulaires permettant d'évaluer la réponse cellulaire aux traitements de stabilisation.

Le travail réalisé porte sur l'étude de la réponse homéostatique de *P. frisingensis* dans des conditions physiologiques optimales de croissance (pH 6,2, 30°C et en présence de

glucose 30 mM), dans des conditions de contraintes technologiques rencontrées en industrie brassicole (traitements à basse température ou la présence éventuelle de nisine), et dans les conditions rencontrées dans la bière notamment un pH acide de 4 à 4,5. Notre objectif est de caractériser l'effet de basse température (2°C), rencontré lors de la fabrication de la bière (lors de la maturation, de la filtration, après la flash pasteurisation et lors du stockage), sur l'homéostasie cellulaire de *P. frisingensis*. Dans cette optique, nous allons étudier l'effet de traitement thermique froid isolé ou combiné à des modifications de pH, en présence ou en absence de glucose sur les teneurs intracellulaires en ions potassium, le pH intracellulaire, le volume cellulaire et la charge adénylique de la bactérie. Ceci permettra d'une part de déterminer l'effet d'un choc froid sur l'homéostasie cellulaire, d'autre part de déterminer les conditions dans lesquelles la bactérie est capable de restaurer son homéostasie cellulaire qui assurera sa survie et donc sa capacité à se multiplier et/ou à contaminer la bière en cours de production, de conditionnement et de stockage.

L'usage de la nisine en industrie brassicole nécessite des études préalables notamment sur l'effet de la bactériocine sur les micro-organismes de la flore d'altération de la bière. Notre objectif est d'étudier l'effet de la nisine, seule ou combinée à des modifications de températures et de pH en présence ou en absence de glucose, sur *P. frisingensis* pour déterminer dans quelles conditions la nisine pourrait empêcher les contaminations dues à *Pectinatus*. Enfin, nous allons étudier l'effet de l'exposition répétée de *P. frisingensis* à la nisine, dans le but de contribuer à l'établissement de bases rigoureuses pour l'utilisation éventuelle de la nisine en industrie brassicole.

# ***MATERIELS ET METHODES***

## I. Techniques biologiques

### I.1 Milieu de culture et souche bactérienne

#### I.1.1 Souche bactérienne

La souche utilisée est *Pectinatus frisingensis*. Elle provient de la collection Allemande internationale des souches (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), elle est répertoriée sous la référence DSM 20467.

#### I.1.2 Composition du milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour la croissance de la bactérie est celui de Zeikus et Wolfe (1972) modifié par Samain *et al.* (1982), le "Basal Carbon Yeast Trypticase" (BCYT). C'est un milieu carboné, tamponné par du PIPES (acide piperazine-N, N'-bis-[2-ethanesulfonique]), le pH est ajusté à 6,2 par du NH<sub>4</sub>OH (1 M). Le substrat de croissance utilisé est le glucose (30 mM) annexe 1.

#### I.1.3 Préparation

La préparation du milieu de culture est réalisée selon la technique de Hungate modifiée par Miller et Wolin (1974). Après ajout de tous les éléments constitutifs du milieu au volume approprié d'eau distillée, le mélange est porté à ébullition pendant 5 minutes et refroidi sous courant d'azote. A 25°C le pH est ajusté à 6,2 avec du NH<sub>4</sub>OH 1 M. Le milieu est ensuite réparti sous courant d'azote dans des flacons (10 ml à 1,2 l) préalablement gazés (N<sub>2</sub>). Les flacons sont fermés par des bouchons butyle et sertis, puis stérilisés en autoclave pendant 30

minutes à 120°C. Avant utilisation, le milieu est réduit par 2% (v/v) d'une solution réductrice (cystéine-HCl 1,25%, Na<sub>2</sub>S 1,25%). L'ensemencement est réalisé à 2% (v/v) à partir d'une préculture sur le même milieu. Les bactéries sont incubées à 30°C. Tout ajout, prélèvement ou ensemencement est effectué stérilement par piqûre à travers le bouchon butyle du flacon, à l'aide de seringues.

## I.2 Préparation des suspensions cellulaires concentrées

Les suspensions cellulaires concentrées sont préparées à partir de culture de 1,2 l. Les bactéries sont récoltées en fin de phase exponentielle et début de phase stationnaire. La culture est répartie dans des pots à centrifuger en acier inoxydable, préalablement gazés sous azote. Après une première centrifugation de 20 min à 10000 g à 20°C, les culots sont repris dans 50 ml de tampon MOPS 50 mM [acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique] à pH 6,2. Après une seconde centrifugation identique à la première, le culot ainsi lavé est repris dans du milieu de reprise (M.R. annexe 1) contenant de faibles concentrations en ions K<sup>+</sup> (0,09 g/l) et Na<sup>+</sup> (0,23 g/l) et dont le pH est ajusté soit à pH 4,0, 4,5 ou à pH 6,2. La concentration en protéines dans la suspension cellulaire concentrée est en moyenne de 4 à 6 mg de protéines/ml.

Les suspensions cellulaires sont préparées dans des ampoules en verre gazées sous azote. Elles sont utilisées soit pour les mesures de flux ioniques de part et d'autre de la membrane cellulaire de *P. frisingensis* soit pour les mesures du volume cellulaire, du potentiel de membrane et du pH intracellulaire. Les cellules sont incubées à 30°C en présence de glucose 30 m pour augmenter le niveau d'ATP disponible.

### I.3 Dénombrement des cellules

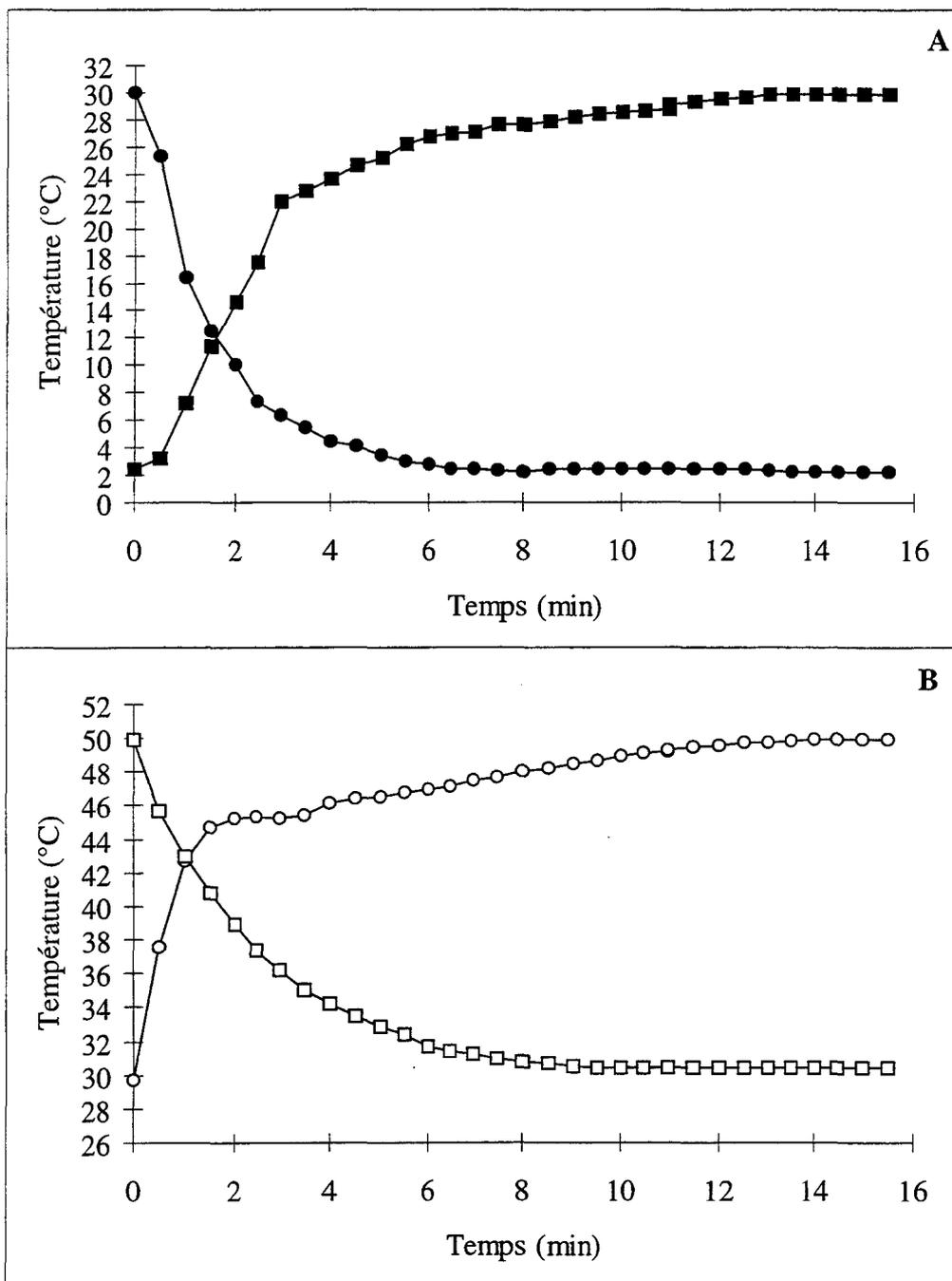
Le dénombrement des bactéries survivantes est réalisé en tubes de Félix 8 × 160 mm, contenant 4,5 ml de milieu MRS ou BCYT solide (12 g/l d'agar et 16 mM de Na<sub>2</sub>S) (Chowdhury *et al.*, 1995). Les tubes de Félix contenant le milieu solide sont portés à 100 °C. Après fusion de la gélose ils sont maintenus à 45°C dans un bain-marie thermostaté. Un volume de 0,5 ml de la suspension bactérienne est prélevé par l'intermédiaire d'une seringue et introduit dans un tube de Félix. Des dilutions successives au 1/10<sup>ème</sup> (jusqu'à un facteur 10<sup>-10</sup>) sont effectuées par prélèvement, et ensemencement successif de 0,5 ml de chaque tube de Félix. Juste après le prélèvement la gélose est homogénéisée et le tube est plongé dans un bain d'eau froide. Les tubes sont incubés à 30°C pendant cinq à six jours avant le dénombrement des bactéries.

### I.4 Application de stress aux bactéries

Les stress étudiés sont réalisés sur des suspensions cellulaires concentrées préparées sous N<sub>2</sub> dans des ampoules en verre fermées par des bouchons butyle. Tout ajout ou prélèvement est effectué par piqûre à travers le bouchon butyle de l'ampoule, à l'aide de seringues dans le but de préserver les conditions d'anaérobiose de la suspension cellulaire.

#### I.4.1 Choc froid

Les suspensions cellulaires préparées comme décrit précédemment sont plongées dans un bain-marie contenant de la glace fondante, ce qui permet de diminuer la température de la suspension bactérienne de 30°C à 2°C en 6 minutes (Figure 9). Les suspensions cellulaires



**Figure 9 : Cinétiques des traitements thermiques froid et chaud.**

**A :** Cinétique de descente de température (●) au sein d'une suspension cellulaire concentrée de *P. frisingensis* de 30°C à 2°C et de remontée en température (■) de 2°C à 30°C après 10 minutes de traitement thermique à 2°C de la suspension.

**B :** Cinétique de montée de température (○) au sein d'une suspension cellulaire concentrée de *P. frisingensis* de 30°C à 50°C et de descente en température (□) de 50°C à 30°C après 10 minutes de traitement thermique à 50°C de la suspension.

concentrées sont soit maintenues dans la glace fondante, soit réincubées à 30°C après 10 minutes de choc froid (Figure 9) pour mesurer l'effet physiologique d'un retour à la température optimale.

#### **I.4.2 Choc chaud**

Les suspensions cellulaires préparées comme décrit auparavant sont plongées dans un bain-marie thermostaté à 50°C. La température de la suspension bactérienne passe de 30°C à 50°C en 6 minutes (Figure 9). Les suspensions cellulaires concentrées sont soit maintenues à 50°C, soit réincubées à 30°C après 10 minutes de choc chaud (Figure 9) pour étudier l'effet d'un passage temporaire à température sub-létale.

#### **I.4.3 Addition de nisine**

La nisine utilisée est une préparation commerciale de la firme Sigma dosée à  $10^6$  UI/g, contenant 2,5% de nisine pure, 70 à 75 % de NaCl et 23 à 28% de protéines de lait. Une solution de  $1 \times 10^4$  UI/ml est préparée en dissolvant 100 mg de produit dans 10 ml de HCl  $10^{-2}$  M. La préparation est ensuite introduite stérilement grâce à un filtre 0,22  $\mu$ m dans un flacon serti, préalablement stérilisé en autoclave pendant 30 minutes à 120°C. La solution est ainsi préparée avant chaque utilisation. L'addition de nisine aux suspensions cellulaires est réalisée par piqûre à travers les bouchons butyle des flacons à l'aide de seringues pour préserver les conditions d'anaérobiose dans les suspensions cellulaires. Lors de l'addition de la bactériocine un même volume d'HCl  $10^{-2}$  M est ajouté à la suspension cellulaire témoin.

#### **I.4.4 Addition d'ionophores**

Les ionophores sont des molécules hydrophobes qui s'insèrent au niveau de la membrane cytoplasmique et perturbent la perméabilité cellulaire. Ils sont généralement solubles dans des solvants organiques comme l'éthanol. Ainsi, ils sont utilisés sous forme de solution éthanolique. Les ionophores utilisés dans cette étude sont le protonophore carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) (Sigma), l'inhibiteur des ATPases protons-dépendante le N, N'-dicyclohexyl-carbodiimide (DCCD) (Sigma). L'addition des ionophores sous forme de solution éthanolique aux suspensions cellulaires est réalisée par piqûre à travers les bouchons butyle des flacons à l'aide de seringues, permettant de préserver les conditions d'anaérobiose dans les suspensions cellulaires. Le même volume d'éthanol est ajouté à la suspension cellulaire témoin quand les ionophores sont ajoutés aux suspensions cellulaires.

#### **I.5 Traitement à l'EDTA**

Le traitement des bactéries à Gram négatif par des agents chélateurs tels que l'acide d'éthylène diaminetetraacétique (EDTA) permet de piéger les cations divalents comme le  $Mg^{2+}$  et le  $Ca^{2+}$ , ce qui entraîne la déstabilisation des lipopolysaccharides et augmente ainsi la perméabilité cellulaire à certaines molécules comme la nisine. Le traitement à l'EDTA 5, 10, 20 mM est effectué sur des suspensions cellulaires concentrées issues de culture en fin de phase exponentielle de croissance. Après une première centrifugation à 10000 g pendant 20 minutes, les culots sont lavés dans le tampon MOPS 50 mM à pH 6,2. Après une seconde centrifugation identique à la première, les bactéries sont reprises dans un tampon Tris-HCl à pH 7,2 (50 mM Tris-HCl, 1 mM  $MgSO_4$ , 4 mM  $CaCl_2$ , 0,1 M NaCl) (Stevens *et al.*, 1991).

Les suspensions cellulaires sont pré-incubées 5 minutes à 30°C, l'EDTA est ajouté à partir d'une solution mère de façon à obtenir des concentrations finales de 5, 10 et 20 mM. Le traitement dure 10 minutes à 30 °C. Les cellules sont centrifugées à 4000 g pendant 20 minutes. Les cellules sont ensuite lavées dans du tampon Tris-HCl à pH 7,2 et centrifugées comme précédemment. Les culots sont enfin repris dans le milieu M.R. réduit. Les suspensions cellulaires ainsi préparées sont utilisées pour étudier les paramètres physiologiques de la bactérie.

## **II. Planification expérimentale**

Deux plans d'expériences ont été mis en oeuvre dans le but d'étudier l'effet simultané de la nisine, du pH et de la température sur la perméabilité cellulaire de *P. frisingensis*. Le premier aborde l'étude de *P. frisingensis* en état de privation nutritionnelle, le second l'étude de *P. frisingensis* en état énergisé (présence de 30 mM de glucose). Comme l'étude est centrée sur l'effet de la bactériocine sur la bactérie, le facteur nisine est étudié à 4 niveaux, les facteurs pH et température à 2 niveaux. Les 2 plans d'expérience mis en oeuvre sont des plans factoriels complets à 3 facteurs (pH, température, nisine). Le nombre de combinaisons des trois facteurs est  $4 \times 2 \times 2$ , ce qui fait 16 expériences. Les plans sont complétés par 4 répétitions tirées au sort parmi les 16 traitements précités. Les 20 essais sont détaillés dans le Tableau 10. Pour les facteurs pH et température étudiés à 2 niveaux, on attribue la valeur -1 et +1 à chacun des 2 niveaux des facteurs. La température 50°C est codée (+1), 2°C (-1), le pH 6,2 est codé (+1), pH 4 (-1). La nisine est étudiée aux 4 niveaux 100, 300, 412, et 500 UI/ml, avec utilisation de pseudo facteurs Nis 1 et Nis 2 aux niveaux (-1, -1) pour 100 UI/ml de

Codage des facteurs				Niveaux réels des facteurs		
pH	Température	Nisine		pH	Température (°C)	Nisine (UI/ml)
		Nis 1	Nis 2			
+1	+1	+1	+1	6,2	50	500
+1	+1	+1	-1	6,2	50	412
+1	+1	-1	+1	6,2	50	300
+1	+1	-1	-1	6,2	50	100
+1	-1	+1	+1	6,2	2	500
+1	-1	+1	-1	6,2	2	412
+1	-1	-1	+1	6,2	2	300
+1	-1	-1	-1	6,2	2	100
-1	+1	+1	+1	4,0	50	500
-1	+1	+1	-1	4,0	50	412
-1	+1	-1	-1	4,0	50	300
-1	+1	-1	+1	4,0	50	100
-1	-1	+1	-1	4,0	2	500
-1	-1	+1	+1	4,0	2	412
-1	-1	-1	-1	4,0	2	300
-1	-1	-1	+1	4,0	2	100

**Tableau 10 : Plan d'expérience factoriel complet mis en place pour l'étude de l'effet de la nisine, du pH et de la température sur l'homéostasie cellulaire de *P. frisingensis*, en présence et en absence de glucose (30 mM). Codage et niveaux réels des 3 facteurs étudiés (nisine, pH et température).**

nisine, (-1,+ 1) pour 300 UI/ml, (+1, -1) pour 412 UI/ml et (+1, +1) pour 500 UI/ml (Tableau 10).

Le choix des facteurs et de leurs niveaux ont été déterminés par des expériences préliminaires et à partir de la bibliographie. Le pH 6,2 représente le pH optimal de croissance de la bactérie, le pH 4,0 est le pH de la plupart des bières (Moll, 1991). La nisine variant de 100 à 500 UI/ml a été choisie pour étudier l'effet de la nisine à des concentrations faibles ( $\leq 500$  UI/ml), d'où la transformation de variable à  $\sqrt{1} \times 100$ ,  $\sqrt{9} \times 100$ ,  $\sqrt{17} \times 100$ , and  $\sqrt{25} \times 100$  correspondant à la nisine 100, 300, 412, et 500 UI/ml respectivement. Les températures (2°C) et (50°C) ont été choisies comme étant les températures de stockage et de pasteurisation. Ces différents facteurs sont centrés et réduits selon l'équation  $(X-\text{moyenne})/\sqrt{\text{variance}}$  pour s'affranchir des unités de mesures et pouvoir comparer les coefficients du modèle entre eux. Le choix du modèle décrivant les résultats est un polynôme de degré 2 d'équation:

$$Y = Y' + \varepsilon \quad Y' = b_0 + \sum_i b_i X_i + \sum_{i,j} b_{ij} X_i X_j \quad \textbf{(Equation 1)}$$

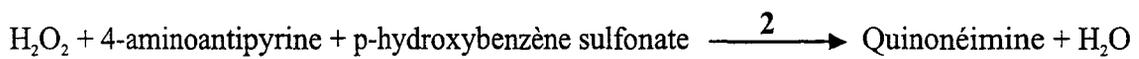
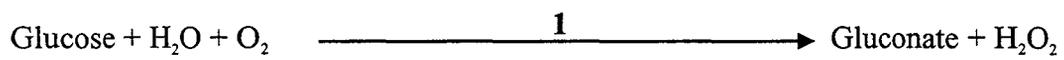
Y = Réponse des effets avec  $b_0$  = moyenne des effets  $X$  = facteurs de l'expérience

$b_i$  = Pente linéaire de  $X_i$   $b_{ij}$  = effet interactif entre  $X_i$  et  $X_j$  pour  $i \neq j$ ,

$b_{ii}$  = effet quadratique de  $X_i$

Les suspensions cellulaires concentrées sont préparées à partir de culture de même âge physiologique (fin de phase exponentielle de croissance). Les milieux de cultures utilisés pour la préparation des suspensions cellulaires concentrés font partie du même lot. Toutes les expériences sont effectuées selon le même protocole expérimental afin de diminuer la variabilité qui pourrait être due à des facteurs non contrôlés lors des différentes expériences. Les suspensions cellulaires préparées à pH 4,0 ou 6,2 sont incubées à 30°C à  $t = 0$  min, en

présence ou en absence de glucose (30 mM). A t = 20 min les suspensions cellulaires (6 mg [protéine]/ml) sont exposées à l'addition de nisine (100, 200, 412 et 500 UI/ml) et au traitement thermique (2°C et 50°C) qui dure 10 min. Les suspensions cellulaires sont ensuite réincubées à 30°C. Le long de la cinétique, des prélèvements d'échantillons de 0,5 ml de la suspension cellulaire sont réalisés pour le dosage des ions potassium extracellulaire dans le surnageant de la suspension. Les modifications de la concentration des ions potassium dans le milieu des suspensions cellulaires de *P. frisingensis* sont utilisées comme marqueurs cellulaires pour l'investigation des effets et des interactions entre les différents facteurs (nisine, pH et température) sur la perméabilité cellulaire de la bactérie. Les analyses statistiques (estimation des coefficients de régression et analyse de variance) ont été réalisées par la procédure GLM de "Statistical Analysis System" (SAS Institute Inc., Cary, N.C. U.S.A).



**Figure 10 : Réactions mises en jeux pour le dosage du glucose dans le surnageant des suspensions cellulaires concentrées chez *P. frisingensis*. La réaction 1 est catalysée par la glucose oxydase, la réaction 2 est catalysée par une peroxydase.**

### **III. Techniques analytiques**

#### **III.1 Suivis de croissance**

La croissance bactérienne est suivie par mesure de l'absorbance du milieu (prélèvements de 1 ml) dans des cuves à 660 nm, ou par lecture directe de l'absorbance des tubes (8 × 160 mm) à 550 nm. Le spectrophotomètre utilisé pour la lecture des absorbances à travers les cuves est un Uvikon 810 de marque Kontron et celui pour la lecture directe des tubes un spectrophotomètre 320 RD (Prolabo).

#### **III.2 Dosage du glucose**

Le glucose est déterminé à l'aide d'un kit de diagnostic Sigma. Le dosage est réalisé sur des prélèvements de 10 µl de surnageant après centrifugation d'un échantillon de 0,5 ml (5 minutes à 13000 g) de l'échantillon à analyser. Le principe de l'analyse repose sur le fait que le glucose présent dans l'échantillon de la suspension cellulaire est tout d'abord oxydé en gluconate et en eau oxygénée. L'eau oxygénée réagit en présence de peroxydase avec la 4-aminoantipyrine et la *parahydrobenzène* sulfonate pour donner une quinonéimine (Figure 10). Les concentrations en glucose sont déterminées par comparaison avec une gamme entre 0 et 30 mM. L'absorbance du milieu réactionnel est lue à 505 nm, longueur d'onde pour laquelle l'absorbance de la quinoneimine est maximale.

### III.3 Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué sur des culots cellulaires issus de prélèvements de 1 ml, soit de cultures, soit de suspensions cellulaires concentrées. Les cellules sont lysées à haute température (100 °C) en présence de SDS (2,5%)/NaOH (0,2 M) (1:1 v/v). Les échantillons ainsi lysés sont dilués dans du NaOH (0,2 M)/SDS (2,5%) et le dosage est réalisé par la méthode de Lowry *et al.* (1951). Les concentrations en protéines sont déterminées par comparaison avec une gamme de sérum albumine bovine entre 0 et 1 g/l. L'absorbance du milieu réactionnel est lue à 750 nm Le protocole de dosage est décrit en annexe 2.

### III.4 Dosage des nucléotides adényliques

Les nucléotides sont extraits par l'acide perchlorique (Walker-Simmons et Atkinson 1977) dont l'utilisation présente l'avantage de lyser les cellules, de précipiter les protéines et d'inhiber les activités enzymatiques à l'origine de la dégradation des composés recherchés sans les hydrolyser. L'analyse des nucléotides est réalisée par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) (Crescentini et Stocchi, 1984) en phase inverse sur colonne Hypersil ODS (Shandon) de 5 µm de dimension 4,6 × 250 mm, protégée par une colonne de garde. La chaîne analytique se compose d'une pompe quaternaire Waters 616, d'un injecteur automatique à membrane Waters 717 plus et d'un détecteur UV-visible Waters 486. Elle est pilotée par le logiciel Millennium 2010 qui permet l'acquisition et l'intégration des données. L'intérêt de la CLHP réside dans le fait qu'il est possible de quantifier l'ATP, l'ADP et l'AMP en une seule analyse.

La concentration intracellulaire en nucléotides est calculée comme étant la différence entre la concentration totale et la concentration extracellulaire. La concentration totale des

nucléotides (présents à la fois dans le surnageant et dans les cellules) est mesurée sur des prélèvements de 1 ml de la suspension cellulaire qui sont rapidement introduits dans un tube Eppendorf contenant 0,2 ml d'HClO<sub>4</sub> froid ; le tout est mélangé au vortex pendant 5 secondes. Les tubes sont maintenus dans la glace pendant 20 minutes. La concentration extracellulaire des nucléotides est dosée dans 1 ml de surnageant issu de la centrifugation (13000 g pendant 5 minutes) d'échantillons de 1,2 ml de la suspension cellulaire. Le surnageant prélevé est introduit dans un tube Eppendorf contenant 0,2 ml d'HClO<sub>4</sub> froid.

L'extrait est ensuite neutralisé à un pH d'environ 6 par une solution de KOH/KHCO<sub>3</sub>, entraînant la formation d'un précipité de KClO<sub>4</sub> insoluble à froid. Le dosage est réalisé sur les surnageants. Le protocole est détaillé en annexe 3.

La séparation des nucléotides est réalisée par l'utilisation d'un gradient de solvants (A et B) (Crescentini et Stocchi, 1984). Le solvant A consiste en du KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M ajusté à pH 6 par du KOH et le solvant B correspond au solvant A contenant 15% de méthanol. Une étape initiale isocratique de 9 minutes avec 100% du solvant A est suivie d'un gradient linéaire pendant 5 minutes jusqu'à 100% du solvant B, celui-ci est maintenu alors pendant 9 minutes. Le retour aux conditions initiales est réalisé en 2 minutes, la colonne est équilibrée avec le solvant A pendant 15 minutes avant l'analyse de l'échantillon suivant. Les nucléotides détectés à 260 nm sont reconnus par comparaison des temps de rétention des solutions standards et dosés par rapport à une gamme étalon. Les nucléotides sont dosés pour chaque échantillon. Les concentrations intracellulaire en [ATP], [ADP] et [AMP] ont été utilisées pour calculer la charge adénylique (AEC) des cellules selon Atkinson (1968) :

$$AEC = \frac{[ATP] + \frac{1}{2}[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

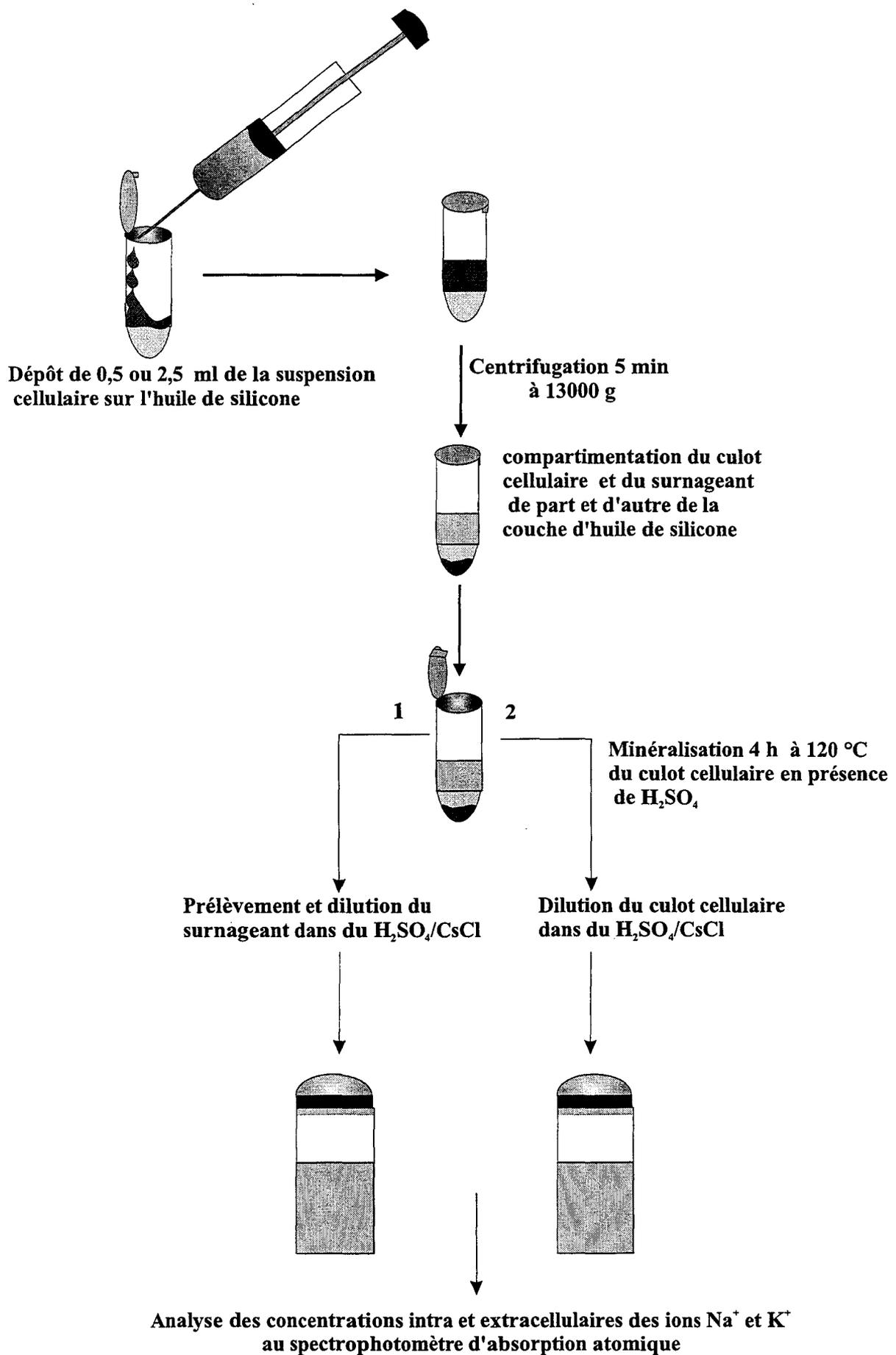
### **III.5 Microscopie électronique à balayage**

Des prélèvements de suspensions cellulaires concentrées sont fixés par un tampon à 0,1% de cacodylate de sodium à 0,1 M contenant 1,25% de glutaraldéhyde. Ils sont ensuite filtrés sur une membrane Anodisc (Whatman) de 25 mm de diamètre et de porosité 0,2  $\mu\text{m}$ . Le filtre est rincé avec du tampon cacodylate 0,1 M puis placé dans un cristalliseur contenant 1 ml de ce tampon et 1 ml de tétraoxyde d'osmium à 2% dans le tampon cacodylate. La préparation est laissée ainsi pendant une nuit sous hôte ventilée. Le tétraoxyde d'osmium est ensuite ôté et remplacé par de l'eau ultrapure. L'échantillon est ensuite déshydraté à l'aide d'une série de bains d'éthanol à concentration croissante (50, 70, 95, 100%) ; après la déshydratation les échantillons sont immergés dans l'acétate d'isopentyle. Le temps de contact est de 10 minutes pour chaque bain. Le séchage final est effectué par la méthode du point critique en milieu  $\text{CO}_2$  avec un appareil Emscop CPD 750. La membrane Anodisc (filtre) est ensuite fixée sur un support en aluminium et l'échantillon est rendu conducteur par pulvérisation cathodique d'une cible or-palladium, dans un métalliseur Polaron E5100. L'observation peut alors être effectuée par un microscope électronique à balayage, JEOL JSM35CF, à la tension de 10 kV.

### **III.6 Dosages des concentrations intra et extracellulaires en ions**

#### **$\text{Na}^+$ et $\text{K}^+$**

Les concentrations intra et extracellulaires en ions sodium et potassium sont analysées par spectrophotométrie d'absorption atomique. L'étape la plus importante lors de la préparation des échantillons réside dans la séparation des cellules du milieu dans lequel elles baignent, dans le but d'éviter tout échange entre la cellule et le milieu ambiant et d'avoir une



**Figure 11 : Protocole d'analyse des teneurs intra et extracellulaires des ions sodium et potassium chez *P. frisingensis*.**

idée plus précise des concentrations de ces deux cations à un instant donné. L'utilisation de la technique de centrifugation sur huile de silicone constitue une des meilleures méthodes permettant la séparation de ces deux compartiments (Bakker, 1993a) (Figure 11).

### **III.6.1 Préparation des échantillons**

Pour le dosage des teneurs intra et extracellulaires en ions, des échantillons de 2,5 ml de suspensions cellulaires concentrées sont centrifugés sur huile de silicone de densité 1,03 (Rhodorsil 508V70) pendant 20 minutes à 15000 g à 20°C (Figure 11). Les surnageants sont prélevés pour le dosage des concentrations extracellulaires en ions. Les culots sont repris dans du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,4 M et minéralisés pendant 4 heures à 120°C (Bakker *et al.*, 1987). Les culots minéralisés sont repris dans 25 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M)/CsCl (1,1g/l). Après centrifugation (10000 g 20 min) les concentrations des ions K<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup> sont dosées dans le surnageant.

Les concentrations intracellulaires en ions Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> sont aussi calculées comme étant la différence entre la concentration totale (milieu et cellules) et la concentration extracellulaire (surnageant uniquement). Dans ce cas, les concentrations extracellulaires sont mesurées dans le surnageant provenant de la centrifugation (13000 g 5 min) d'échantillons de 0,5 ml de la suspension cellulaire dans des Eppendorfs contenant 300 µl d'huile de silicone. La concentration totale est mesurée sur un échantillon de 0,5 ml de la suspension cellulaire minéralisé comme décrit auparavant. Après une dilution adéquate des échantillons dans une solution H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M)/CsCl (1,1g/l) les ions sont dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique par comparaison à des gammes de 0 à 6 ppm en K<sup>+</sup> et en Na<sup>+</sup>. L'appareil utilisé est un PYE UNICAM SP9 (Philips). La flamme résulte de la combustion d'un mélange d'air (40

ml/minute) et d'acétylène (20 ml/minute), sa température est approximativement de 2300°C. Le sodium est dosé à 589 nm et le potassium à 766,5 nm.

Les deux techniques utilisées sont basées sur la séparation des cellules du milieu en utilisant la technique de centrifugation sur huile de silicone. Elles donnent les mêmes résultats. Cependant la deuxième technique qui repose sur le dosage indirect des teneurs intracellulaires en ions  $K^+$  et  $Na^+$  permet de faire beaucoup plus de prélèvements très rapprochés dans le temps par rapport à la première technique basée sur le dosage direct des concentrations ioniques dans le culot cellulaire.

### **III.7 Méthode d'extraction et d'analyse des acides gras**

La préparation des échantillons pour l'analyse des acides gras membranaires consiste à libérer les acides gras totaux sous forme de méthyl-esters d'acides gras afin de les rendre volatils (Miller et Berger, 1985). L'extraction des acides gras membranaires nécessite la préparation de quatre réactifs.

#### **III.7.1 Préparation des réactifs**

##### **- Réactif 1 = réactif de saponification**

NaOH..... 45 g  
Méthanol..... 150 ml  
Eau U.H.Q..... 150 ml

##### **- Réactif 2 = réactif de méthylation**

HCl "6M"..... 325 ml  
Méthanol..... 275 ml

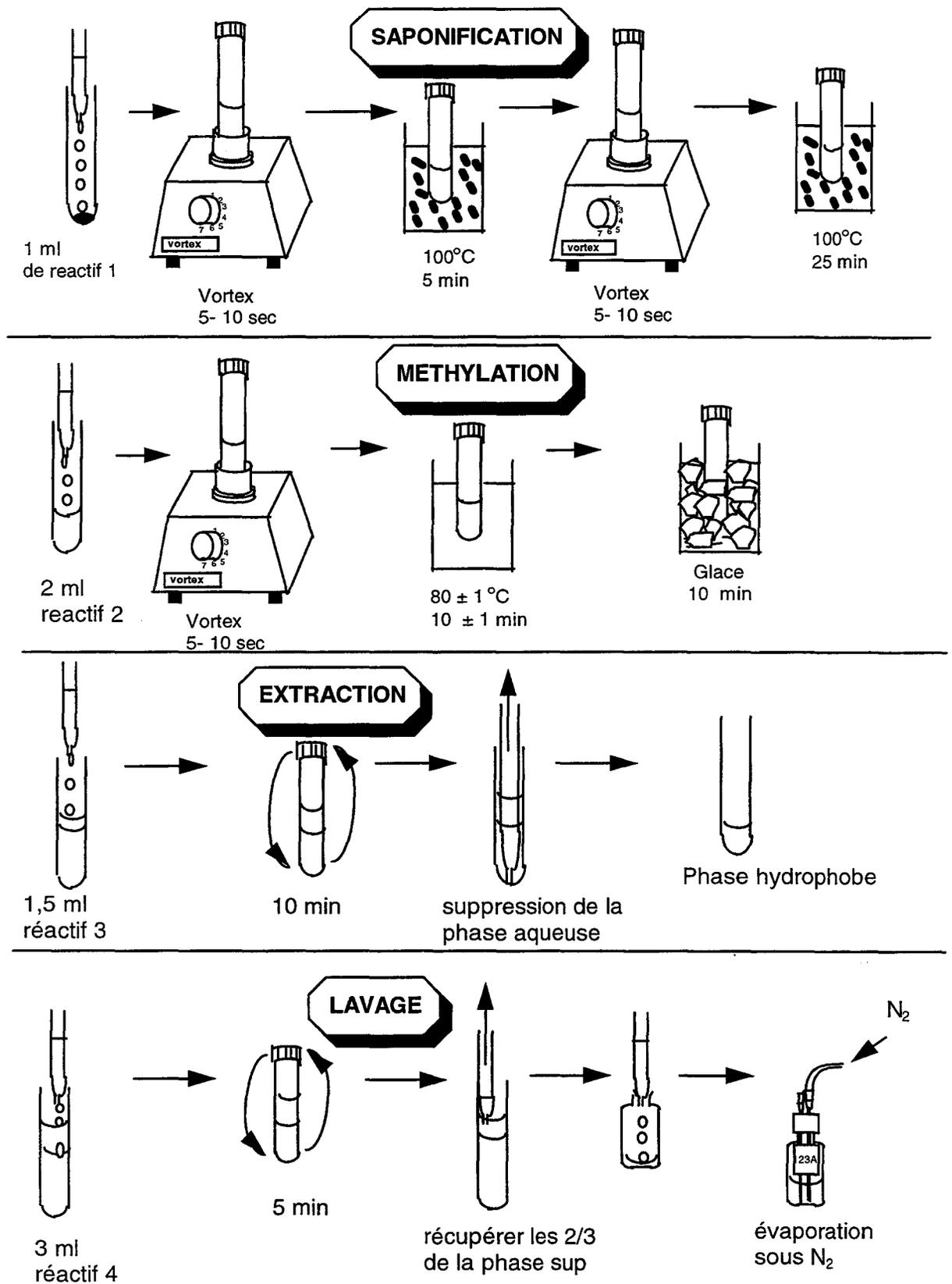


Figure 12 : Protocole d'extraction des acides gras

**- Réactif 3 = solvant d'extraction: Hexane/ Méthyle-tert Butyle Ether (M.T.B.E.)**

Hexane ..... 200 ml

M.T.B.E. .... 200 ml

**- Réactif 4 = Solution de lavage**

NaOH..... 10,8 g

Eau U.H.Q..... 900 ml

**III.7.2 Extraction des acides gras membranaires**

L'extraction des acides gras membranaires (Figure 12) est réalisée sur des cultures de *P. frisingensis* en fin de phase exponentielle de croissance. Une culture de 100 ml est centrifugée pendant 20 minutes à 10000 g et les culots sont lavés dans du tampon MOPS 50 mM à pH 6,2. Après une seconde centrifugation identique à la première, les bactéries sont reprises dans 10 ml d'eau distillée et centrifugées pendant 15 minutes à 4000 g.

La saponification représente la première étape, elle consiste en une hydrolyse alcaline permettant la libération des acides gras des structures membranaires. Chaque culot bactérien est repris dans 1 ml de NaOH/méthanol (réactif 1) et mis dans un tube Pyrex (16 × 100 mm). Le tube est mis dans un bain-marie à 100°C pendant 5 minutes, il est ensuite homogénéisé au vortex pendant 5 secondes puis remis dans le bain-marie (100°C) pendant 25 minutes.

La méthylation représente la deuxième étape. Elle permet de transformer les sels d'acides gras sous forme d'esters méthyliques. 2 ml d'HCl/méthanol (réactif 2) sont ajoutés aux tubes contenant l'échantillon saponifié et préalablement refroidi. Le tout est homogénéisé au vortex (5 secondes), et les tubes sont placés à 80°C pendant 10 minutes avant d'être plongés dans la glace.

La troisième étape, représentant l'extraction proprement dite permet de séparer les esters méthyliques de la phase aqueuse en les récupérant par une phase hydrophobe. Ainsi, au mélange précédent, 1,5 ml d'héxane/méthyle-tert butyle ether (1:1 v/v) (réactif 3) sont ajoutés et les tubes sont placés dans un appareil rotatif permettant le mélange des deux phases à température ambiante pendant 10 min. La dernière étape permet de laver les acides gras des résidus organiques et des acides gras libres. La phase aqueuse est éliminée et 3 ml de NaOH (réactif 4), sont ajoutés. Les deux phases sont mélangées pendant 10 minutes et les deux tiers de la phase lipidiques sont récupérés. La fraction héxane: éther éthylique est introduite dans un flacon à chromatographie. Les solvants sont évaporés sous azote et les échantillons sont placés à -80°C dans l'attente de leur passage en chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse.

### III.7.3 Chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse

La chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse est utilisée pour la détermination de la composition en acides gras de la membrane de la souche parentale et la souche résistante à la nisine de *P. frisingensis*. Les échantillons sont décongelés et repris dans 500 µl d'hexane puis les analyses sont effectuées par chromatographie en phase gazeuse GC 17A couplé à un spectromètre de masse QP 5000 (Shimadzu). Une aliquote de 1 µl est introduit dans un injecteur Split/Splitless (rapport de Split: 1/30) et les séparations sont réalisées sur un colonne capillaire (BPX70 (SGE); 30 m × 0,22 mm de diamètre interne, épaisseur de phase 0,25 µm).

La température de la colonne est programmée de 40 à 220°C. La température est maintenue à 40°C pendant 10 minutes, puis augmente jusqu'à 160°C à raison de 5°C/minute.

A partir de 160°C, la température continue à augmenter jusqu'à 220°C à raison de 3°C/minute. Après le retour aux conditions initiales, l'injection de l'échantillon suivant s'effectue après 2 minutes de stabilisation à 40°C.

Le spectromètre de masse est utilisé en impact électronique à 70 eV. Les spectres sont enregistrés toutes les 0,5 secondes. Les esters méthyliques sont identifiés et quantifiés par comparaison avec une base de données présente dans l'ordinateur. Les expériences ont été répétées trois fois et dans chaque expérience les analyses ont été réalisées sur trois échantillons issues de trois cultures différentes. Le test de Scheffe a été utilisé comme test de comparaison des moyennes afin d'examiner la différence entre le profil d'acides gras membranaires de la souche parentale et de la souche résistante à la nisine (Nis-5000) cultivées en présence ou en absence de la bactériocine (5000 UI/ml). Le seuil significatif a été fixé à un niveau de 5% ( $\alpha = 0.05$ ) (GLM de "Statistical Analysis System" (SAS) Institute Inc., Cary, N.C. U.S.A).

### **III.8 Extraction et séparation des protéines majoritaires de la membrane externe**

#### **III.8.1 Extraction.**

L'extraction des protéines majoritaires de la membrane externe de *P. frisingensis* est réalisée selon la méthode décrite par Achouak *et al.* (1998). Des cultures de *P. frisingensis* (400 ml) en fin de phase exponentielle de croissance sont centrifugées pendant 20 minutes à 10000 g, les culots sont lavés dans le tampon MOPS 50 mM à pH 6,2. Après une seconde centrifugation de 20 minutes à 4000 g, les cellules sont resuspendues dans de l'eau distillée à

raison de 1 g de cellules pour 5 ml d'eau. Les bactéries sont ensuite soniquées trois fois 1 minute (100 W) à 4°C. Une centrifugation de 10 minutes à 5000 g permet d'éliminer les débris cellulaires et les cellules intactes des échantillons soniqués. Les membranes cellulaires sont récupérées après centrifugation des surnageants pendant 60 minutes à 48000 g à 4°C. L'extraction des protéines est réalisée par le N-lauroyl sarcosinate (détergent non ionique) à une concentration finale de 1% dans du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,5 pendant 30 minutes à 28°C. Après une centrifugation de 60 minutes à 48000 g à 4°C, les culots membranaires sont resuspendus dans de l'eau distillée à raison de 1 g d'échantillon par 1 ml d'eau et stockés à -80°C.

### **III.8.2 Séparation et identification des protéines de la membrane**

#### **externe.**

La séparation des protéines est réalisée par une électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE). Les concentrations protéiques des échantillons à séparer sont dosées et ensuite diluées au demi dans un tampon de reprise à pH 6,8 (0,5 M Tris-HCl, 20% Glycérol, 4% SDS, 10% mercaptoéthanol, 0,2 % Bleu de Bromophénol). Ils sont ensuite chauffés pendant 5 min à 100°C ; après une centrifugation de 5min à 13000 g des volumes appropriés sont prélevés, de façon à obtenir les mêmes quantités de protéines, et déposés dans les puits de migration du gel à l'aide d'une seringue Hamilton. Le gel se compose d'un gel de concentration [3,90% (p/v) Acrylamide, 0,10% bis Acrylamide (p/v), 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% (p/v) SDS] superposé à un gel de séparation [11,69% (p/v) Acrylamide, 0,31% (p/v) bis Acrylamide, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% (p/v) SDS]. La migration s'effectue dans un tampon de migration à pH 8,65 (25 mM Tris-HCl, 0,192 M Glycine, 0,1% SDS) pendant 12 heures sous un courant de 8 mA. La masse moléculaire des

protéines est déterminée grâce à des témoins de masse moléculaire déposés sur le gel en même temps que les échantillons. Les témoins correspondent à des protéines de masse moléculaire égale à 14,2 ; 20,1 ; 24 ; 29 ; 36 ; 45 ; 66 ; 97,4 ; 116 et 205 kDa.

### **III.8.3 Coloration et révélation des protéines**

#### **III.8.3.1 Coloration au bleu de Coomassie**

La révélation et la coloration des protéines au bleu de Coomassie sont réalisées en deux étapes. La première étape consiste en la fixation et la coloration des protéines. Le gel est immergé pendant 2 heures dans une solution contenant: bleu de Coomassie R250 0,1%, méthanol 50%, acide acétique glacial 10%. La deuxième étape correspond à l'étape de décoloration du fond du gel de migration, elle se fait par des bains successifs avec une solution de méthanol 30% et d'acide acétique glacial 10%. Les gels sont abondamment rincés à l'eau avant d'être séchés. (See et Jackowski, 1989).

#### **III.8.3.2 Coloration au nitrate d'argent**

La coloration des protéines au nitrate d'argent s'effectue selon la méthode de Morrissey (1981). Les protéines sont fixées par des bains successifs de 30 minutes dans une solution de méthanol 50% et d'acide acétique 10%, puis dans une solution de méthanol 5% et d'acide acétique 7%, et dans une solution de glutaraldéhyde 10%. Les gels sont ensuite rincés pendant 2 heures à l'eau ultrapure. Un bain de 30 minutes avec 5 µg/ml de dithiothréitol précède la coloration des protéines au nitrate d'argent 0,1% pendant 30 minutes à l'obscurité. Après deux rinçages rapides à l'eau, les gels sont révélés dans le tampon de révélation (100 µl de formaldéhyde 37%, Na<sub>2</sub>CO 3%, qsp 200 ml d'eau) avec 2 fois 50 ml rapidement puis 100

ml. La coloration est stoppée par ajout de 5 ml d'acide citrique 2,3 M pendant 15 min (le temps nécessaire d'avoir une coloration suffisante) et les gels sont abondamment rincés à l'eau avant d'être séchés.

### **III.8.4 Analyse informatique des gels**

L'analyse et la comparaison des gels révélés au bleu de Coomassie et au nitrate d'argent sont réalisées à partir d'une station de travail Sun Sparcstation 20. Grâce à un scanner (Sharp JX 330), les images sont numérisées et analysées avec le logiciel 2-D Analyzer (BioImageR). Le profil densitométrique a été réalisé pour chaque piste et a permis de comparer les profils électrophorétiques des protéines majoritaires de la membrane externe de la souche parentale et la souche résistante à la nisine de *P. frisingensis*.

## **III.9 Mesures des volumes, pH et le potentiel de membrane des cellules**

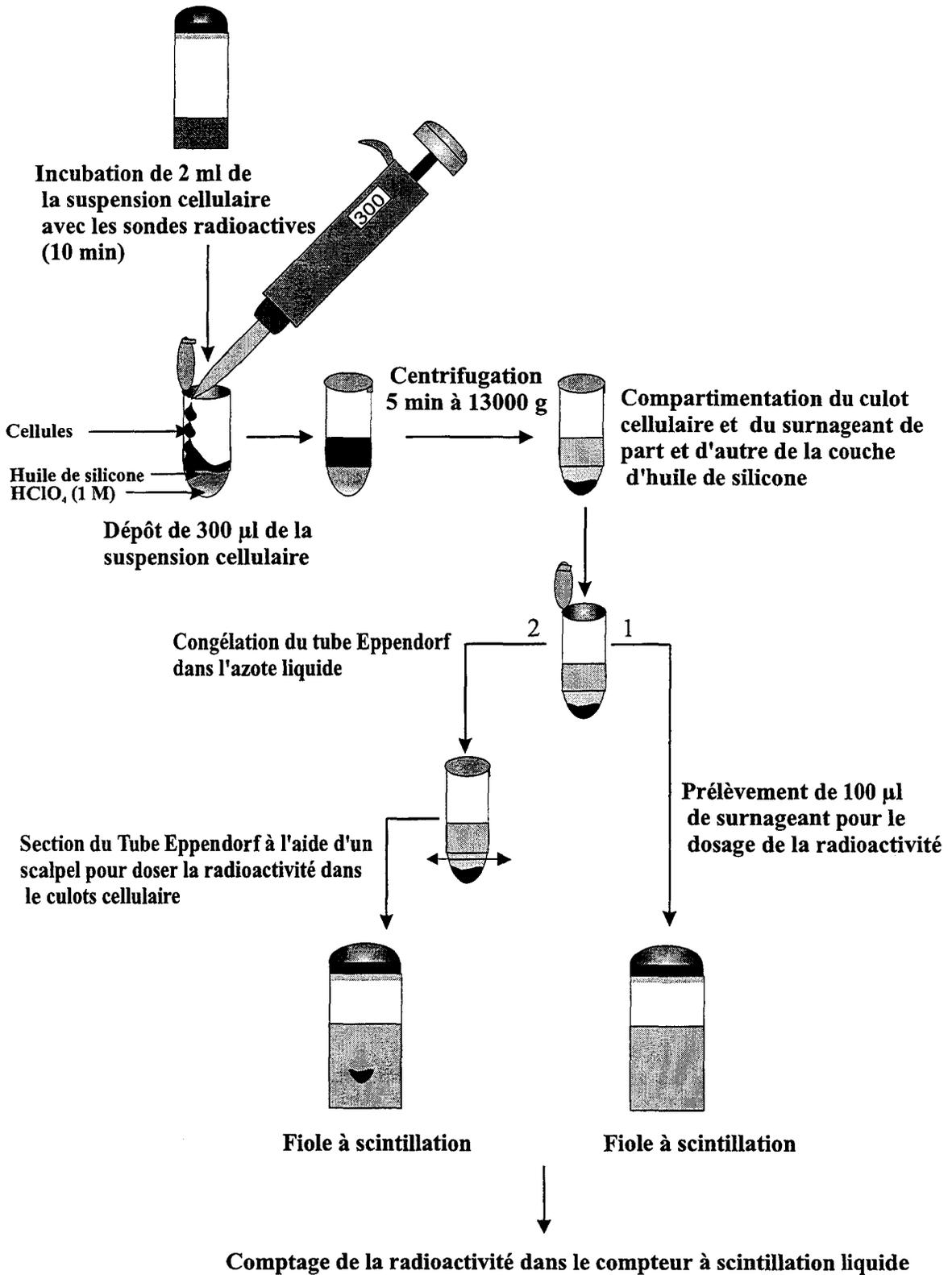
Le volume cellulaire, le pH intracellulaire et le potentiel de membrane de *P. frisingensis* sont mesurés à l'aide de sondes radioactives marquées soit au carbone 14, soit au tritium. Le volume et le pH cellulaire sont mesurés à l'aide d'un double marquage par deux sondes différentes marquées soit au carbone 14, soit au tritium, alors que le potentiel de membrane est mesuré par une seule sonde marquée au tritium. Les mesures du niveau de radioactivité, pour chaque composé à l'intérieur et à l'extérieur des cellules, permet de remonter aux valeurs de volume cellulaire, de pH intracellulaire et le potentiel de membrane selon les calculs montrés en annexe 4.

### III.9.1 Le volume cellulaire

Le volume intracellulaire est calculé par la différence entre le volume total et le volume extracellulaire dans le culot des suspensions cellulaires. Le volume total est mesuré par une sonde qui diffuse librement de part et d'autre de l'enveloppe cellulaire généralement  $^3\text{H}_2\text{O}$ . Le volume extracellulaire est mesuré par une sonde marquée de taille importante, non fermentescible, et qui ne franchit pas les structures externes de l'enveloppe cellulaire, comme le [carboxyl- $^{14}\text{C}$ ]dextran (Rottenberg, 1979 ; Kashket, 1985). La détermination du volume cellulaire permet de suivre son évolution en réponse aux différents traitements. Elle est aussi primordiale pour la mesure du pH intracellulaire, du potentiel de membrane, les concentrations intracellulaires en ions et d'autres composés cytoplasmiques( annexe 4).

### III.9.2 Le pH intracellulaire

La mesure du pH intracellulaire est réalisée par l'utilisation d'acides faibles marqués au carbone 14. L'emploi d'acides faibles est basé sur le fait que la forme non dissociée (R-COOH) de l'acide diffuse de part et d'autre de la membrane, contrairement à la forme chargée (R-COO $^-$ ) qui ne diffuse pas à travers l'enveloppe cellulaire de la bactérie (Booth *et al.*, 1979). L'acide faible utilisé est l'acide [Carboxyl- $^{14}\text{C}$ ]benzoïque. L'inuline marquée au tritium ne pénètre pas dans les cellules et sert ainsi à mesurer la fraction du volume extracellulaire dans le culot bactérien (Booth *et al.*, 1979 ; Rottenberg, 1979 ). (annexe 4).



*Figure 13 : Préparation des échantillons pour les mesures du volume cellulaire, du pH interne et du potentiel de membrane chez P. frisingensis .*

### **III.9.3 Le potentiel de membrane**

La sonde utilisée pour la mesure du potentiel de membrane est le cation lipophile tétraphényl phosphonium ( $\text{TPP}^+$ ). Il diffuse librement à travers la membrane plasmique et se répartit entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule selon la valeur du potentiel de membrane (l'intérieur de la cellule présente un excès de charges négatives) (Kashket, 1985). En tenant compte du volume intracellulaire, le rapport des concentrations intracellulaires et extracellulaires en  $^3\text{H}[\text{TPP}^+]$  permet de calculer le potentiel de membrane (annexe 4).

### **III.9.4 Préparation des échantillons**

Des prélèvements de 2 ml de suspensions cellulaires concentrées (6 mg/ml de protéines cellulaires) sont incubés pendant 10 minutes dans un pilulier préalablement gazé sous azote avec la(es) sonde(s) radioactive(s) (Figure 13).

- 100  $\mu\text{l}$  de  $^{14}\text{C}$ -[carboxyl dextran] (36 kBq) et 20  $\mu\text{l}$  d'eau tritiée (74 kBq) pour la mesure du volume cellulaire.
- 100  $\mu\text{l}$  de  $^{14}\text{C}$ -[benzoate] (3,6 kBq) et 30  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -[Inuline] (210 kBq) pour la mesure du pH intracellulaire.
- 95  $\mu\text{l}$  de  $^3\text{H}$ -[ $\text{TPP}^+$ ] (180 kBq) pour la mesure du potentiel de membrane.

Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, 3 fois 300  $\mu\text{l}$  sont prélevés dans chaque pilulier et déposés dans des tubes Eppendorf contenant 300  $\mu\text{l}$  d'huile de silicone de densité 1,03 (Rhodorsil 508V70), elle-même déposée sur 100  $\mu\text{l}$  d' $\text{HClO}_4$  1 M. Les tubes Eppendorf sont centrifugés pendant 5 minutes à 13000 g. A l'issue de la centrifugation, 100  $\mu\text{l}$  de surnageant sont prélevés et mis dans des fioles à scintillation. Après congélation dans

l'azote liquide, le fond du tube Eppendorf est découpé à l'aide d'un scalpel et le culot est placé dans la fiole à scintillation (Figure 13). Pour s'affranchir d'éventuels problèmes de quenching les mêmes quantité d'acide perchlorique (100  $\mu$ l) et de tampon (100  $\mu$ l) sont ajoutées dans toutes les fioles à scintillation, puis 17 ml de liquide scintillant sont additionnés au total.

### **III.9.5 Comptage de la radioactivité des échantillons**

La radioactivité en  $^3\text{H}$  et en  $^{14}\text{C}$  est évaluée par comptage dans deux canaux de mesure couvrant des bandes énergétiques différentes. Le canal de 0 à 6 keV prend en compte le tritium et une partie de  $^{14}\text{C}$ , le canal 20 à 156 keV donne une fraction du  $^{14}\text{C}$ . L'efficacité des deux canaux vis-à-vis de chaque élément est déterminée par le biais de gammes, comptées à la fois dans les canaux de mesures précédents et dans des canaux permettant le comptage de la totalité de la radioactivité contenue dans les échantillons (0-18 keV pour le tritium et 0-156 keV pour le  $^{14}\text{C}$ ). Le compteur à scintillation utilisé est un Betamatik II de marque Kontron.

## ***RESULTATS ET DISCUSSIONS***

Dans cette partie nous présentons et discutons les principaux résultats de notre travail personnel portant sur la physiologie de *Pectinatus frisingensis*. Nous avons divisé les travaux en trois parties :

- étude de l'effet d'une basse température (2°C) combinée au pH et à la présence ou l'absence d'une source d'énergie
- étude de l'effet d'une addition de nisine seule ou combinée avec des traitements thermiques, modifications de pH, et la présence ou l'absence de substrat
- l'étude de la résistance potentielle à la nisine de *P. frisingensis*

Ces différentes parties ont pour objectif la connaissance du comportement de *P. frisingensis* en décrivant la réponse physiologique de la bactérie en conditions de stress, correspondant à des conditions physico-chimiques de la bière, ou à un traitement de stabilisation classique (traitement thermique) ou alternatif (nisine). Ceci permettra de comprendre comment ces traitements peuvent empêcher ou retarder le développement de la bactérie dans la bière.

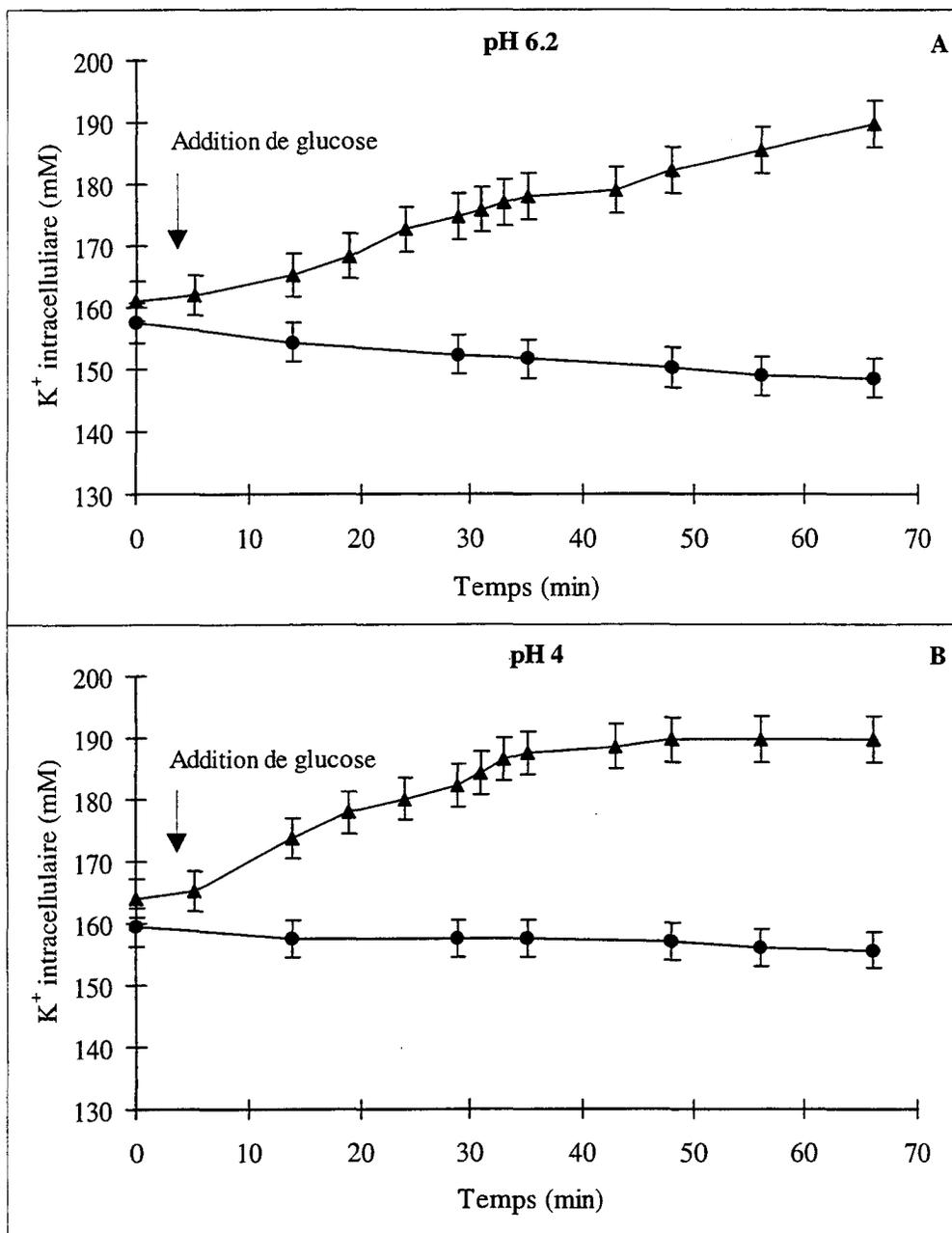
Le premier chapitre va nous permettre dans un premier temps de caractériser l'homéostasie cellulaire de *P. frisingensis* dans des conditions de référence : à 30°C, en présence ou absence d'une source d'énergie et à pH optimum de croissance (pH 6,2) ou à un pH acide de 4,5 ; dans un deuxième temps d'étudier l'effet d'un traitement froid sur l'homéostasie cellulaire afin de comprendre dans quelles conditions la bactérie est capable de restaurer son homéostasie et donc son pouvoir de se multiplier ou de contaminer la bière.

Dans le deuxième chapitre nous allons étudier l'effet de la nisine sur *P. frisingensis* seule ou combinée avec le pH et la température, en présence ou en absence d'une source d'énergie, pour déterminer les conditions d'utilisation de la nisine contre le développement de contaminations dues à *P. frisingensis*.

Dans le dernier chapitre nous allons étudier l'effet de l'exposition répétée de *P. frisingensis* à de fortes concentrations de nisine. Ceci nous permettra d'établir les potentialités de résistance de la bactérie à la nisine et de proposer des solutions pour une meilleure utilisation de la bactériocine comme agent de stabilisation de la bière.

## **Chapitre I Résultats et discussions**

**Effet d'un traitement froid et d'un pH acide sur  
l'homéostasie cellulaire de *Pectinatus frisingensis***



**Figure 14 : Evolution des concentrations intracellulaires des ions  $K^+$  dans les suspensions cellulaires concentrées de *P. frisingensis* (6 mg[protéine]/ml). Le glucose 30 mM est ajouté à  $T = 3$  min. (▲)  $K^+$  intracellulaire chez les cellules métabolisant le glucose incubées à  $30^\circ\text{C}$ . (●)  $K^+$  intracellulaire chez les cellules en privation nutritionnelle maintenues à température ambiante ( $25^\circ\text{C}$ ). Les mesures ont été réalisées en 3 fois dans 5 expériences indépendantes.**

## I. Effet du pH sur l'homéostasie cellulaire de *P. frisingensis*

L'ion potassium représente le cation majoritaire chez les bactéries. Il joue un rôle important dans la physiologie de la cellule. L'étude réalisée au cours de ce travail est centrée tout particulièrement sur les mouvements des ions  $K^+$  chez *P. frisingensis*. Il était donc nécessaire de caractériser auparavant, dans les conditions de référence utilisées dans cette étude, les mouvements de ce cation de part et d'autre de la membrane cellulaire de la bactérie ainsi que les autres paramètres physiologiques (pH, volume cellulaire et charge adénylique). Les conditions de référence sont : une température de 30°C, un pH 4,5 ou de 6,2 et la présence ou l'absence de glucose (état de privation nutritionnelle).

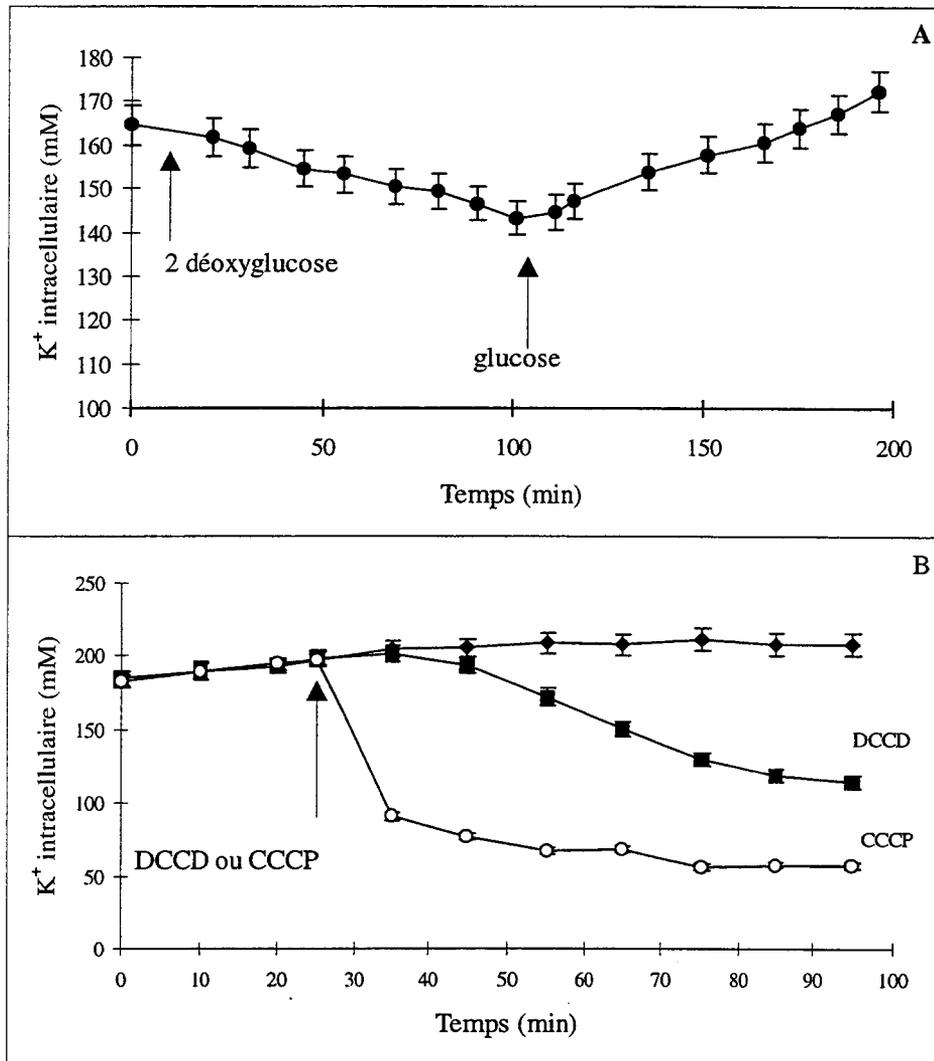
### I.1 Mouvements des ions potassium en présence et en absence de glucose

Dans les suspensions cellulaires concentrées de *P. frisingensis* maintenues sans glucose à température ambiante (25°C) ou à 30°C, une diminution faible mais significative de la teneur intracellulaire en  $K^+$  est mesurée au cours du temps à pH 4,5 et à pH 6,2. La teneur intracellulaire de potassium diminue à une vitesse moyenne de 0,70 nmol/[mg protéine]/min (Figure 14A) à pH 6,2. A pH 4,5, la diminution de la teneur intracellulaire en ions  $K^+$  se fait avec une vitesse moyenne de 0,35 nmol/[mg protéine]/min, soit deux fois moins que le taux mesuré à pH 6,2 (Figure 14B). Le dénombrement des bactéries de la suspension au début de l'expérience et 2 h après donne le même nombre de cellules :  $2,3 \times 10^{10}$  cellules/ml. La concentration intracellulaire en ions sodium (600  $\mu$ M) reste constante au cours de la cinétique.

L'addition de glucose à une concentration finale de 30 mM (Figure 14) aux suspensions cellulaires a pour effet une augmentation immédiate de la concentration intracellulaire en ions potassium à la fois à pH 4,5 et à pH 6,2. Le glucose est consommé avec un taux moyen de 30 nmol/[mg protéine]/min à pH 6,2. L'accumulation des ions  $K^+$  par *P. frisingensis* démarre avec le début de la consommation du glucose par les cellules. La teneur intracellulaire nette moyenne en ions  $K^+$  passe de 160 mM à 178 mM 30 min après l'addition de glucose, avec une vitesse initiale de 1,9 nmol/[mg protéine]/min (Figure 14A). A pH 4,5, la consommation du glucose par les cellules est réalisée avec un taux de 70 nmol/[mg protéine]/min, un taux deux fois plus important qu'à pH 6,2. Le taux initial d'entrée des ions potassium est de 2,7 nmol/[mg protéine]/min. La concentration intracellulaire en ions potassium passe ainsi de 160 mM à 190 mM en 30 min (Figure 14B).

## I.2 Caractérisation des mouvements des ions $K^+$ chez *P. frisingensis*

La présence de glucose dans le milieu semble être nécessaire pour l'entrée des ions potassium dans les cellules de *P. frisingensis*. Pour interpréter ces résultats, nous avons émis deux hypothèses. Le potassium peut être cotransporté avec le glucose dans les cellules via un système de type symport, ou les entrées des ions  $K^+$  sont le résultat d'un transport actif dépendant à la fois de l'hydrolyse d'ATP et du gradient de protons. Pour vérifier la première hypothèse nous avons utilisé un analogue de glucose, le 2-déoxyglucose. Pour mettre en évidence la relation entre les entrées des ions potassium, l'hydrolyse d'ATP et le gradient de protons de part et d'autre de la membrane cellulaire de *P. frisingensis*. Deux ionophores ont été utilisés : le N,-N'-dicyclohexyl-carbodiimide, (DCCD) inhibiteur des ATPases proton-dépendantes, et le carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP), un protonophore qui dissipe le gradient de protons de part et d'autre de la membrane cytoplasmique.



**Figure 15 : Mouvements des ions K<sup>+</sup> chez *P. frisingensis* en présence de 2 déoxyglucose et de DCCD (500 μM) ou du CCCP (500 μM).**

**A. K<sup>+</sup> (●) intracellulaire après addition du 2 déoxyglucose (5 g/l) à T = 5 min et après addition de 30 mM de glucose à T = 100 min.**

**B. K<sup>+</sup> (◆) intracellulaire dans les suspension cellulaire témoin en présence de glucose. K<sup>+</sup> (■) intracellulaire dans les cellules métabolisant le glucose en présence de 500 μM de DCCD. K<sup>+</sup> (○) intracellulaire dans les cellules métabolisant le glucose en présence de 500 μM de CCCP. Les deux ionophores sont ajoutés aux suspensions cellulaires à partir d'une solution mère éthanolique et la même quantité d'éthanol est ajoutée dans la suspension cellulaire témoin. Les bactéries sont chargées en ions potassium en les incubant à 30°C avec du glucose (30 mM) ceci explique les concentrations intracellulaires initiales élevées des ions K<sup>+</sup>. L'addition des ionophores est effectuée à T = 25 min (flèche). Les mesures ont été effectuées en 3 fois dans 5 expériences indépendantes.**

### I.2.1 Mouvements des ions $K^+$ en présence du 2-déoxyglucose

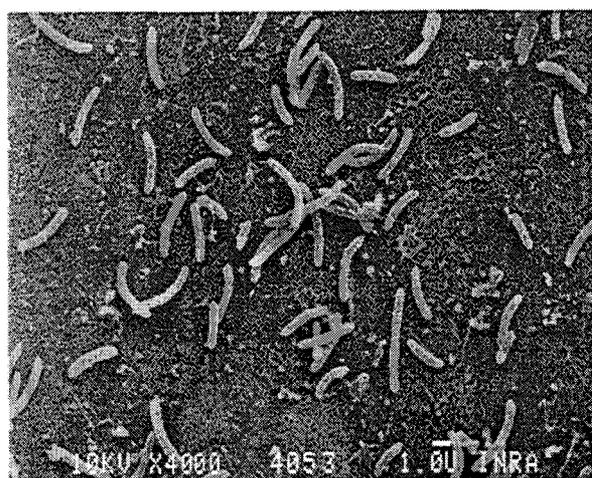
L'addition du 2-déoxyglucose (5 g/l) à la suspension cellulaire concentrée de *P. frisingensis* n'induit pas l'accumulation d'ions potassium par les cellules. La Figure 15A montre qu'en présence du 2-déoxyglucose les cellules perdent une partie de leur potassium intracellulaire comme les cellules maintenues à température ambiante et sans glucose. La concentration intracellulaire en ion  $K^+$  diminue de 160 mM à 140 mM en 100 min. Cependant, l'addition de 30 mM de glucose à la suspension cellulaire à  $t = 110$  min provoque l'accumulation du potassium par les cellules conduisant à une augmentation de la concentration intracellulaire de potassium de 30 mM en 90 min. Ceci montre la nécessité de la présence de glucose pour que les cellules puissent accumuler des ions potassium (Figure 15A).

### I.2.2 Effet du CCCP et du DCCD sur les entrées des ions $K^+$

L'addition de 500  $\mu$ M de DCCD ou de 500  $\mu$ M de CCCP aux cellules métabolisant le glucose provoque une sortie immédiate de potassium intracellulaire perturbant ainsi le gradient de potassium de part et d'autre de la membrane de *P. frisingensis*. De plus, aucune entrée nette de potassium n'est mesurée après l'addition du DCCD ou du CCCP (Figure 15B). L'addition du DCCD provoque une diminution progressive de la teneur intracellulaire en ions  $K^+$ . La concentration intracellulaire diminue jusqu'à 100 mM, 54 min après l'addition du découplant. L'addition du CCCP conduit à une sortie immédiate de potassium. La concentration intracellulaire diminue ainsi jusqu'à 60 mM dans les 20 min qui suivent l'addition du protonophore (Figure 15B).

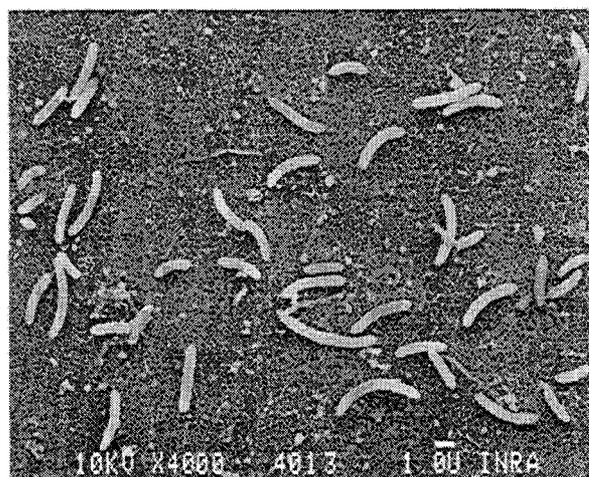
	Volume intracellulaire ( $\mu\text{l}/[\text{mg protéine}]$ )		pH			
	privation nutritionnelle	présence de glucose	privation nutritionnelle		présence de glucose	
			$\text{pH}_{\text{ext}}$	$\text{pH}_{\text{in}}$	$\text{pH}_{\text{ext}}$	$\text{pH}_{\text{in}}$
pH 6,2	4,1	4,4	6,3	7,1	5,7	6,9
pH 4,5	2,5	3,4	4,6	6,4	4,6	6,0

**Tableau 11 : Mesures du pH intracellulaire et du volume cellulaire de *P. frisingensis* à pH 6,2 et à pH 4,5 en état de privation nutritionnelle et en présence de glucose (30 mM). Les mesures sont effectuées au bout de 15 min de consommation de glucose.**



**Figure 16**

**Figure 16 : Photographie en microscopie électronique à balayage réalisée avec une suspension cellulaire concentrée de *P. frisingensis* incubée à 30°C à pH 6,2 en présence de glucose 30 mM.**



**Figure 17**

**Figure 17 : Photographie en microscopie électronique à balayage réalisée avec une suspension cellulaire concentrée de *P. frisingensis* incubée à 30°C à pH 4,5 en présence de glucose 30 mM.**

### I.3 pH intracellulaire et volume cellulaire

Les mesures du pH intracellulaire chez *P. frisingensis* montrent que celui-ci est toujours supérieur au pH du milieu de suspension. A pH 6,2 (pH optimal de croissance) *P. frisingensis* montre un pH intracellulaire moyen de 7,0 (Tableau 11). A pH 4,5 les cellules ont un pH interne plus acide (pH moyen de 6,2). A pH 4,5, les cellules sont capables de maintenir un gradient de pH allant de 1,4 à 1,8 unités de pH. En présence de substrat carboné, les bactéries produisent des acides gras à chaîne courte, ce qui conduit à une acidification du pH du milieu de la suspension aussi bien à pH 4,5 qu'à pH 6,2. Le pH intracellulaire diminue alors de 0,2 à 0,4 unités à pH 4,5 et à pH 6,2 respectivement (Tableau 11).

La présence de glucose n'entraîne pas de modifications du volume cellulaire à pH 6,2 (approximativement 4,2  $\mu\text{l}/[\text{mg protéine}]$ ). A pH 4,5, les cellules en présence ou en absence de glucose montrent un volume cellulaire plus petit, de l'ordre de 2,4 à 3,3  $\mu\text{l}/[\text{mg protéine}]$  respectivement (Tableau 11). Les photographies de microscopie électronique n'ont pas montré de différences significatives du volume cellulaire entre les suspensions cellulaires préparées à pH 6,2 et à pH 4,5 (Figures 16-17) comme cela a été montré par les mesures utilisant les sondes radioactives.

### I.4 Charge adénylique des suspensions cellulaires

En absence de glucose, les suspensions cellulaires à pH 6,2 montrent une faible concentration interne en ATP (en moyenne de 0,70 nmol/[mg protéine]), et une concentration trois fois plus importante en ADP et en AMP. Il en résulte une charge adénylique de 0,3 à 0,4. Cependant, à pH 4,5 les cellules montrent une concentration relativement élevée en ATP (2,2 nmol/[mg protéine]), en ADP et en AMP, respectivement de 1,6 et 1,0 nmol/[mg protéine] (Tableau 12). La charge adénylique correspondante est alors de 0,6 à 0,7. Les ATP aident à excréter les protons chez *Pectinatus* pour lutter contre le gradient plus élevé de

	Nucléotides adényliques (nmol/[mg protéine])		
	ATP	ADP	AMP
<b>pH 6,2</b>			
- glucose	0,7 ±0,1	2,4 ±0,1	3,7 ±0,2
+ glucose <sup>a</sup>	4,9 ±0,2	1,1 ±0,1	0,7 ±0,1
<b>pH 4,5</b>			
- glucose	2,2 ±0,1	1,6 ±0,1	1,0 ±0,1
+ glucose <sup>a</sup>	3,8 ±0,2	0,6 ±0,1	0,6 ±0,1

**Tableau 12 : Mesures des concentrations intracellulaires de l'ATP, l'ADP et de l'AMP dans des suspensions cellulaires concentrées de *P. frisingensis* en absence et en présence de glucose (30 mM) à pH 4,5 et 6,2..**

<sup>a</sup> Les nucléotides sont analysés au bout 15 min de consommation de glucose.

protons imposé par le pH acide, il est donc très vraisemblable que la cellule ait une production supérieure en ATP, traduite en mesure de concentration instantanée par une concentration moyenne plus faible en ADP et AMP.

L'addition de glucose (30 mM) aux suspensions cellulaires induit une augmentation rapide de la concentration intracellulaire en ATP et une diminution de la teneur intracellulaire en ADP et en AMP à pH 6,2 et à pH 4,5 (Tableau 12). La charge adénylique correspondante est de 0,80 à 0,85.

## II. Discussion et conclusion

Les études précédentes réalisées sur la nouvelle espèce du genre *Pectinatus* récemment décrite, *P. frisingensis* (Schleifer *et al.*, 1990), ont été focalisées sur les voies métaboliques (Tholozan *et al.*, 1994), sur la thermorésistance (Watier *et al.*, 1995) et sur la composition des acides gras membranaires (Helander et Haikara, 1995). Nos résultats sont parmi les premières données portant sur l'homéostasie cellulaire de *P. frisingensis*. Plusieurs études physiologiques portant sur les bactéries neutrophiles fermentatives montrent que ces bactéries accumulent des acides gras à chaîne courte durant la fermentation du glucose. Ceci conduit à un pH intracellulaire pouvant atteindre 5,5 (Baronofsky *et al.*, 1984 ; Hsu et Yet, 1991). Les cellules de *P. frisingensis* préparées et maintenues à un pH de 4,5 correspondant au pH moyen des bières, sont capables de maintenir un pH intracellulaire supérieur à pH 5,5, et ceci même après traitement des cellules au froid. Ces résultats sont en bon accord avec ceux rapportés par Tholozan *et al.* (1996, 1997) qui montrent que *P. frisingensis* manifeste à des pH plus acides (pH 4,0-4,5) un potentiel de croissance plus important que *P. cerevisiiphilus*, l'espèce type du genre *Pectinatus*. De plus, la capacité de *P. frisingensis* à maintenir un pH intracellulaire relativement élevé quand le pH du milieu est acide (4,5) confirme et explique les résultats de

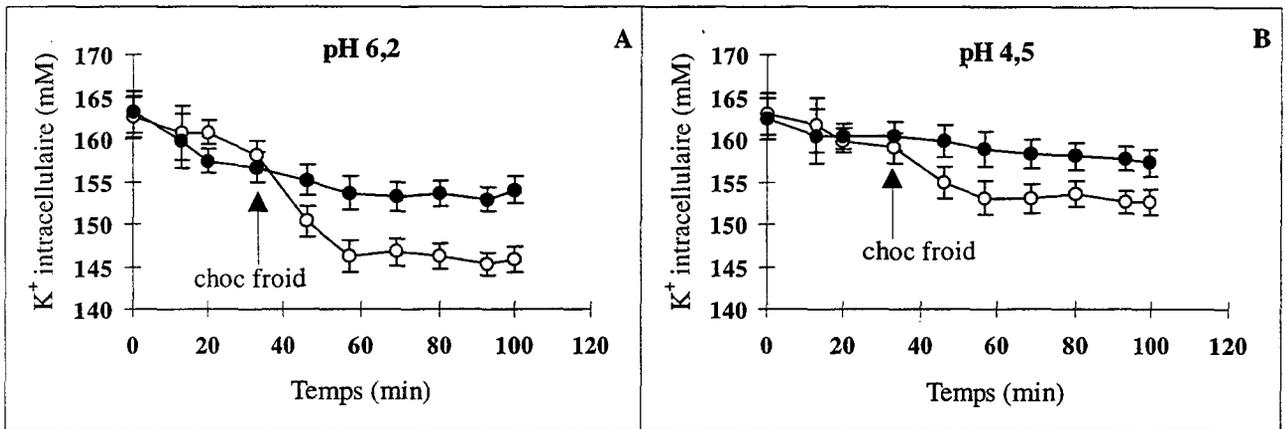
Jespersen et Jakobsen (1996) qui ont montré que les bactéries appartenant au genre *Pectinatus* sont capables de croître dans la bière à des pH supérieurs à pH 4,3-4,6.

L'effet du pH du milieu de suspension sur le volume cellulaire a été rapporté chez les cellules eucaryotes (Lang *et al.*, 1995). Cependant, les changements du volume cellulaire des cellules procaryotes sont le plus souvent associés aux changements de la teneur intracellulaire en ions potassium durant les chocs hypo ou hyper-osmotiques (Bakker, 1993a ; Schleyer *et al.*, 1993). Nos résultats montrent que le volume intracellulaire de *P. frisingensis* préparée et maintenue à pH 4,5 est deux fois moins important qu'à pH 6,2, bien que, leurs concentrations intracellulaires en ions potassium soient similaires dans les deux cas. Les photographies prises en microscopie électronique n'ont pourtant pas montré de différences significatives de volume cellulaire entre les cellules préparées à pH 4,5 ou à pH 6,2. Au cours de notre travail nous avons utilisé le  $^{14}\text{C}$ dextran pour mesurer le volume cellulaire. Le  $^{14}\text{C}$ dextran est une molécule qui ne franchit pas la membrane externe et permet donc une estimation à la fois du volume périplasmique et du volume cytoplasmique. Une des hypothèses que nous avons émise pour essayer de trouver une explication à la différence de volume entre les cellules à pH 4,5 et 6,2 est que la membrane externe des bactéries mises en suspension à pH 4,5 laisse passer le  $^{14}\text{C}$ dextran qui est arrêté au niveau de la membrane plasmique ce qui conduit à une sous estimation du volume cellulaire. L'utilisation de sondes comme la  $^{14}\text{C}$ taurine, molécule qui franchit la membrane externe et qui est arrêtée par la membrane cytoplasmique, permettra de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

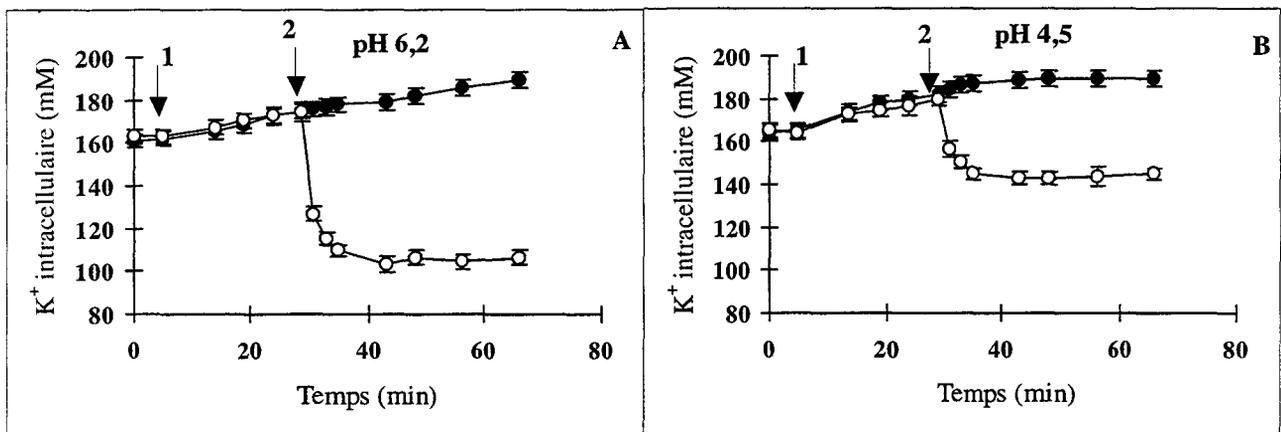
Les résultats présentés montrent de faibles fuites de potassium chez les cellules maintenues sans glucose (en privation nutritionnelle) à la fois à pH 4,5 et à pH 6,2. Le même phénomène a été rapporté pour *Escherichia coli* (Kroll et Booth, 1981). Les dénombrements cellulaires chez *P. frisingensis* n'ont pas montré de mortalité cellulaire à la différence de ce

qui a été décrit pour *Listeria monocytogenes* (Maisnier-Patin *et al.*, 1995). Ainsi, les fuites de potassium chez *P. frisingensis* en état de privation nutritionnelle ne sont pas le résultat d'une lyse cellulaire. Par ailleurs, la présence d'une source d'énergie est nécessaire pour permettre l'entrée des ions potassium dans les cellules de *P. frisingensis*, comme c'est le cas chez *E. coli* (Kroll et Booth, 1981) ou chez *Enterococcus hirae* (Bakker et Harold, 1980).

L'addition de DCCD, inhibiteur des ATPases proton-dépendantes, ou du protonophore CCCP provoque des sorties d'ions potassium des cellules et empêche toute accumulation nette de ce cation par la bactérie. Klugbauer *et al.* (1992) ont montré que *P. frisingensis* possède une ATPase membranaire de type  $F_1F_0$  qui pourrait fonctionner uniquement comme une ATP phosphohydrolase translocatrice de protons. Ceci suggère que la circulation transmembranaire des protons et le transport du potassium dans les cellules sont liés chez *P. frisingensis*. De plus, l'entrée des ions potassium dans les cellules de *P. frisingensis* nécessite l'hydrolyse d'ATP comme cela a été rapporté pour *Pediococcus* sp. (White *et al.*, 1992). A pH 4,5, les cellules en présence de glucose accumulent les ions  $K^+$  avec un taux plus élevé qu'à pH 6,2. Le  $K^+$  est probablement impliqué dans la régulation du pH intracellulaire chez *P. frisingensis* comme cela a été rapporté chez les bactéries acidophiles (Bakker, 1993a).



**Figure 18 :** L'effet du traitement froid sur les concentrations intracellulaires en ions potassium chez *P. frisingensis* (6 mg [protéine]/ml) en état de privation nutritionnelle. (●)  $K^+$  des cellules témoins maintenues à température ambiante. (○)  $K^+$  des cellules exposées au froid à  $T = 30$  min. Les mesures sont réalisées en trois fois dans 4 expériences indépendantes.



**Figure 19 :** Effet du choc froid sur les concentrations intracellulaires en ions potassium dans des suspensions cellulaires de *P. frisingensis* métabolisant le glucose. Les suspensions cellulaires (6 mg [protéine]/ml) sont incubées à  $30^{\circ}\text{C}$ . Le glucose (30 mM) est ajouté à  $T = 3$  min (flèche 1). La suspension cellulaire témoin n'est pas exposée au choc froid. Le traitement froid de l'autre suspension cellulaire est réalisé à  $T = 25$  min (flèche 2) en immergeant l'ampoule contenant la suspension cellulaire dans un bain-marie de glace fondante sous agitation. (●)  $K^+$  intracellulaire dans les cellules témoins sans choc froid. (○)  $K^+$  intracellulaire dans les cellules exposées au choc froid (flèche 2) après 25 min de consommation de glucose à pH 4,5 et à pH 6,2.

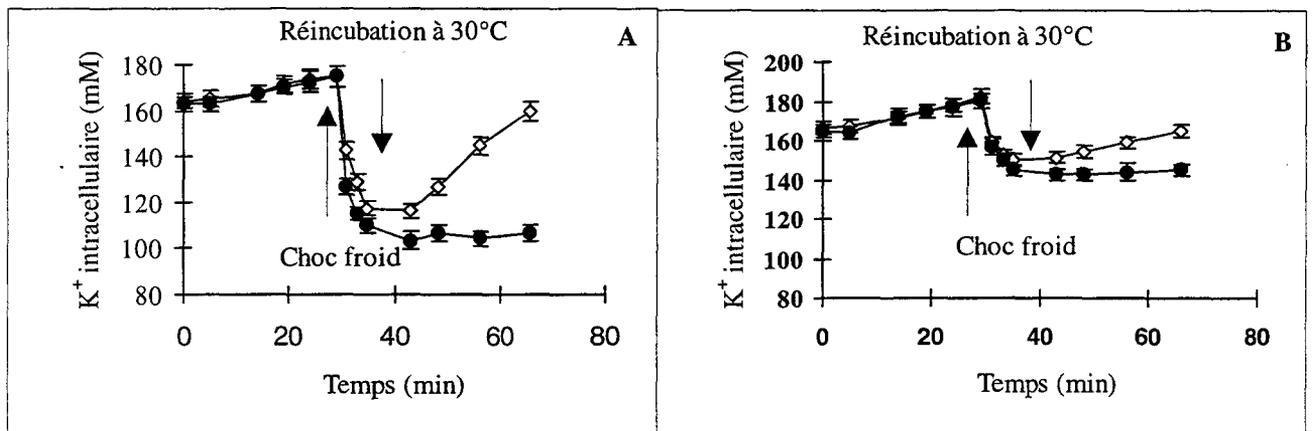
### III. Effet d'un choc froid sur l'homéostasie cellulaire de *P. frisingensis* à pH 4,5 ou à pH 6,2

Les mouvements des ions potassium, le pH, le volume cellulaire et la charge adénylique de *P. frisingensis* ont été caractérisés dans les conditions de référence. Les travaux ci-dessous permettent de préciser l'effet d'un choc froid (2°C) sur ces mêmes paramètres à pH 6,2 ou 4,5 en absence ou en présence de glucose.

#### III.1 Mouvements des ions potassium chez *P. frisingensis* en absence et en présence de glucose

Quand les suspensions cellulaires de *P. frisingensis* sont exposées à un traitement froid, elles perdent une partie de leur potassium intracellulaire, ceci en présence ou en absence de glucose 30 mM (Figure 18). A pH 6,2 les cellules stressées au froid perdent du potassium intracellulaire avec une vitesse moyenne de 2,8 nmol/[mg protéine]/min (Figure 18A). A pH 4,5, la vitesse de sortie des ions potassium n'est que de 1,3 nmol/[mg protéine]/min, un taux deux fois moins important qu'à pH 6,2 (Figure 18B).

Le traitement froid des suspensions cellulaires métabolisant le glucose provoque une diminution rapide de la teneur intracellulaire en ions potassium, dans les minutes qui suivent le traitement thermique froid (Figure 19), ceci à la fois à pH 6,2 et à pH 4,5. A pH 6,2, la concentration intracellulaire nette diminue de 170 mM à 100 mM dans les 15 min qui suivent le traitement froid, avec un taux de sortie de 21,6 nmol/[mg protéine]/min (Figure 19A). A pH 4,5, les sorties d'ions potassium consécutives au stress thermique froid sont plus faibles qu'à pH 6,2. De plus, la concentration intracellulaire en ions potassium diminue seulement de 180



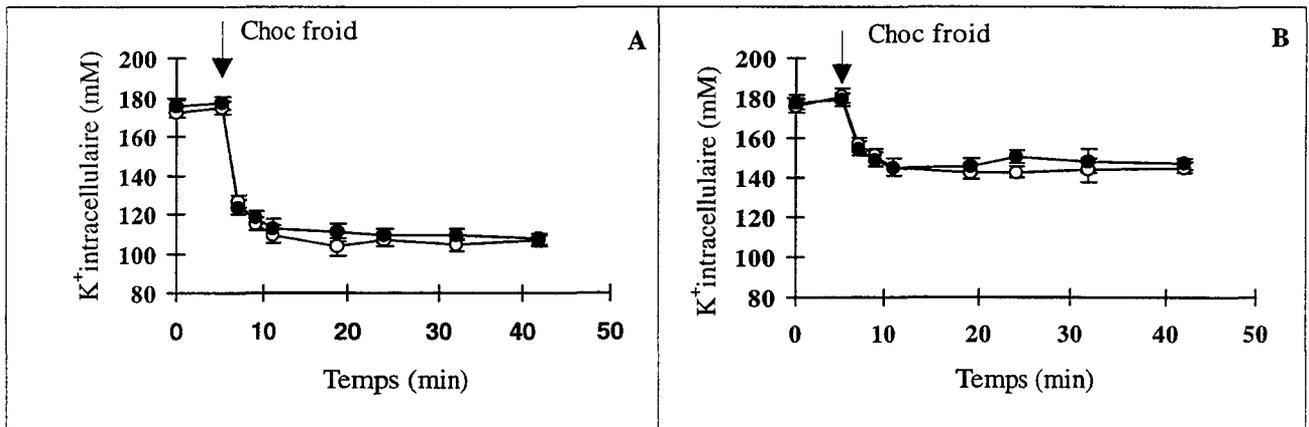
**Figure 20 : Effet de la réincubation à 30°C sur les concentrations intracellulaires en ions K<sup>+</sup> chez *P. frisingensis* métabolisant le glucose après le choc froid de 10 minutes.** A. Suspensions cellulaires à pH 6,2. B. Suspensions cellulaires à pH 4,5. Les suspensions cellulaires (6 mg [protein]/ml) sont incubées à 30°C. Le glucose (30 mM) est ajouté à T = 3 min. Les suspensions cellulaires sont exposées au choc froid à T = 25 min. Une suspension cellulaire dans chaque condition de pH (6,2 ou 4,5) est réincubée à 30°C (T = 35 min) 10 min après le traitement froid. (●) K<sup>+</sup> intracellulaire des cellules exposées au choc froid et maintenues au froid. (○) K<sup>+</sup> intracellulaire dans les cellules exposées au froid pendant 10 min et réincubées à 30°C.

mM à 150 mM dans les 15 min qui suivent le choc froid (Figure 19B) à une vitesse moyenne de 9,6 nmol/[mg protéine]/min).

La concentration intracellulaire des ions sodium (600  $\mu$ M) reste constante après le choc froid, à la fois à pH 4,5 et à pH 6,2. Le dénombrement des cellules avant et après le traitement thermique négatif des suspensions cellulaires de *P. frisingensis* en état de privation nutritionnelle ou en présence de glucose montre un nombre constant de cellules :  $2,9 \times 10^{10}$  cellules /ml.

### III.1.1 Réversibilité des mouvements de $K^+$ lors d'une réincubation à 30°C des cellules traitées au froid (2°C)

La consommation de glucose est arrêtée quand les cellules sont exposées au traitement froid, mais elle reprend aussitôt que les cellules sont réincubées à 30°C. Pour mettre en évidence la reconstitution du gradient de potassium après le choc froid, les suspensions cellulaires métabolisant le glucose exposées au traitement thermique froid (2°C) pendant 10 min sont réincubées à 30°C. La Figure 20 montre que la réincubation à 30°C des cellules métabolisant le glucose permet la réaccumulation de potassium par les bactéries 10 min après le traitement thermique négatif. A pH 6,2 les cellules réaccumulent le potassium à une vitesse de 2,2 nmol/[mg protéine]/min (Figure 20A), un taux 2,5 fois plus important qu'à pH 4,5 (0,8 nmol/[mg protéine]/min) (Figure 20B). Il en résulte une augmentation de la teneur intracellulaire en potassium jusqu'à une valeur moyenne de 170 mM à la fois à pH 6,2 et à pH 4,5 durant les 30 min d'incubation à 30°C après le choc froid (Figure 20).



**Figure 21 :** Effet de l'ajout du  $Gd^{3+}$  ( $300 \mu M$  de  $GdCl_3$ ) sur les sorties des ions  $K^+$  chez des cellules métabolisant le glucose à la fois à pH 4,5 et à pH 6,2. A. Suspensions cellulaires à pH 6,2. B. suspensions cellulaires à pH 4,5. A  $T = 5$  min les suspensions cellulaires sont exposées au choc froid. Les cellules sont préalablement chargées en ions potassium en incubant les cellules à  $30^\circ C$  en présence de glucose ( $30 mM$ ). (O)  $K^+$  intracellulaire des cellules exposées au choc froid. (●)  $K^+$  intracellulaire des cellules exposées au choc froid en présence de  $300 \mu M$  de  $Gd^{3+}$ .

	Volume intracellulaire ( $\mu l/[mg \text{ protéine}]$ )		pH			
	privation nutritionnelle	présence de glucose <sup>a</sup>	privation nutritionnelle		présence de glucose <sup>a</sup>	
			pH <sub>ext</sub>	pH <sub>in</sub>	pH <sub>ext</sub>	pH <sub>in</sub>
Choc froid						
pH 6,2	4,0	4,4	6,3	6,5	5,7	5,9
pH 4,5	2,7	2,9	4,6	6,3	4,5	5,6

**Tableau 13 :** Effet du choc froid ( $2^\circ C$ ) sur le pH et le volume cellulaire à pH 4,5 et à pH 6,2 en absence et en présence de glucose ( $30 mM$ ).

<sup>a</sup>Les mesures sont réalisées au bout de 15 min de consommation de glucose.

### III.1.2 Nature des sorties des ions $K^+$ provoquées par un choc froid chez *P. frisingensis*

Les sorties d'ions potassium après le choc froid chez *P. frisingensis* sont rapides, massives (Figure 21) et non accompagnées par une mortalité cellulaire. Les canaux mécanosensitifs sont impliqués dans des sorties des ions potassium comparables à celles mesurées dans nos résultats. Pour mettre en évidence la sortie des ions potassium à travers des canaux mécanosensitifs, les sorties d'ions potassium après le choc froid ont été mesurées en présence et en absence de 300  $\mu\text{M}$  du cation trivalent gadolinium ( $\text{Gd}^{3+}$ ), ce cation étant connu comme agent inhibant ou affaiblissant l'activité de ce type de canaux. La Figure 21, montre que le  $\text{Gd}^{3+}$  ne semble pas affecter les sorties des ions potassium chez *P. frisingensis* ni à pH 6,2 (Figure 21A), ni à pH 4,5 (Figure 21B). A pH 4,5, les cellules perdent en moyenne 30 mM de  $K^+$  intracellulaire à une vitesse de 10 nmol/[mg de protéine]/min en présence et en absence de gadolinium (300  $\mu\text{M}$ ). A pH 6,2 les bactéries perdent en moyenne 70 mM de  $K^+$  intracellulaire avec une vitesse de 22 nmol/[mg de protéine]/min en présence et en absence de gadolinium (300  $\mu\text{M}$ ). Les mêmes résultats ont été obtenues avec 600  $\mu\text{M}$  de  $\text{Gd}^{3+}$ .

### III.2 Effet du traitement froid sur le pH intracellulaire et le volume cellulaire

A pH 4,5, les cellules exposées au choc froid maintiennent un  $\Delta\text{pH}$  de 1,7 et de 1,1 en absence ou en présence de glucose, respectivement. A pH 6,2, les cellules exposées au choc froid maintiennent un  $\Delta\text{pH}$  de 0,2, à la fois en absence et en présence de glucose (Tableau 13). Ainsi, le traitement thermique froid des cellules de *P. frisingensis* provoque une diminution plus importante du pH intracellulaire à pH 6,2 qu'à 4,5, en absence ou en présence de glucose.

	Nucléotides adényliques (nmol/[mg protein])		
	ATP	ADP	AMP
<hr/>			
pH 6,2			
+ glucose <sup>a</sup>	4,9 ±0,2	1,1 ±0,1	0,7 ±0,1
Choc froid <sup>b</sup>	3,2 ±0,2	1,4 ±0,1	0,4 ±0,1
<hr/>			
pH 4,5			
+ glucose <sup>a</sup>	3,8 ±0,2	0,6 ±0,1	0,6 ±0,1
Choc froid <sup>b</sup>	2,8 ±0,1	1,6 ±0,1	0,5 ±0,1
<hr/>			

**Tableau 14 : Effet du choc froid (2°C) sur les concentrations intracellulaires en ATP, ADP et AMP chez *P. frisingensis* à pH 4,5 et à pH 6,2, en présence de glucose (30 mM).**

<sup>a</sup> Les nucléotides sont dosés au bout de 15 min de consommation de glucose.

<sup>b</sup> Les cellules métabolisant le glucose sont exposées au choc froid 15 min après l'addition du glucose.

Par contre, le volume intracellulaire ne semble pas être affecté par le traitement des cellules au froid ni à pH 6,2 ni à pH 4,5 (Tableau 13).



### III.3 Modifications de la charge adénylique après un choc froid

Le traitement au froid des cellules métabolisant le glucose conduit à une diminution rapide de la teneur intracellulaire en ATP de 1,7 nmol/[mg protéine] à pH 6,2, et de 1,0 nmol/[mg protéine] à pH 4,5 (Tableau 14). Une diminution parallèle de la concentration intracellulaire en AMP est mesurée. Elle passe de 0,7 à 0,4 et de 0,6 à 0,5 nmol/[mg protéine] à pH 6,2 et à pH 4,5, respectivement. Par contre, la concentration intracellulaire en ADP augmente de 1,1 à 1,4 nmol/[mg protéine] à pH 6,2 et de 0,6 à 1,6 nmol/[mg protéine] à pH 4,5 (Tableau 14). Ces variations de concentrations moyennes en nucléotides phosphorylés conduisent à une charge adénylique qui diminue de 0,80-0,85 à 0,73 et reste constante même après deux heures à 2°C aussi bien à pH 4,5 qu'à pH 6,2.

## IV. Discussion et conclusion

Les données présentées ci-dessus montrent que les concentrations intracellulaires en ions potassium et le pH intracellulaire sont peu affectés par le traitement au froid lorsque les cellules sont en état de privation nutritionnelle. Par contre, en présence de glucose, les sorties des ions potassium sont plus importantes et le pH intracellulaire est plus affecté à pH 6,2 qu'à pH 4,5. L'effet des traitements par le froid est plus important pour les cellules de *P. frisingensis* à pH 6,2. La réincubation des cellules à 30°C montre cependant que ces altérations de l'homéostasie cellulaire de la bactérie sont transitoires, dans la mesure où la

bactérie est capable de restaurer son homéostasie en présence de glucose et sous des conditions de température permettant la glycolyse. Les sorties d'ions potassium après le choc froid chez *P. frisingensis* sont rapides, massives et non accompagnées par une mortalité cellulaire. Le même phénomène a été rapporté chez de nombreuses bactéries exposées à des chocs hypo-osmotiques modérés. En effet, il a été montré que les sorties d'ions potassium lors des chocs hypo-osmotiques s'opèrent via des canaux mécano-sensitifs (Berrier *et al.*, 1992 ; Schleyer *et al.*, 1993). Durant les stress hypo-osmotiques, les canaux mécano-sensitifs (stretch activated channels) permettent des sorties rapides d'ions potassium et d'autres petites molécules cytoplasmiques, sans altérer la viabilité cellulaire (Berrier *et al.*, 1992 ; Schleyer *et al.*, 1993). L'emploi du gadolinium ( $Gd^{3+}$ ), cation trivalent lanthanide, inhibe ou affaiblit les sorties de petites molécules cytoplasmiques comme le lactose et le potassium à travers les canaux mécano-sensitifs quand les cellules d'*E. coli* sont exposées à un choc hypo-osmotique (Berrier *et al.*, 1992). Dans nos expériences le  $Gd^{3+}$  n'inhibe pas les sorties des ions potassium chez *P. frisingensis*, et ne modifie pas la vitesse de sortie de ce cation quand les cellules sont exposées au traitement froid. Ainsi, il est fort peu probable que des canaux mécano-sensitifs soient impliqués dans les sorties de potassium durant le traitement froid des cellules de *P. frisingensis*. De plus, les sorties d'ions potassium sont accompagnées par une acidification du pH intracellulaire comme dans le cas d'*E. coli* exposée à un choc hypo-osmotique (Bakker et Harold, 1980 ; Schleyer *et al.*, 1993). Ceci suggère que les sorties des ions potassium sont en partie équilibrées électriquement par des entrées de  $H^+$ . Il est possible que la bactérie possède un antiport  $H^+/K^+$  dont l'activité devient plus faible quand les cellules sont exposées au stress froid : l'expulsion des protons de la cellule serait alors ralentie par le déficit interne en  $K^+$ .

La plupart des bactéries maintiennent un pH intracellulaire relativement constant et des concentrations intracellulaires en ions nécessaires pour favoriser une meilleure activité

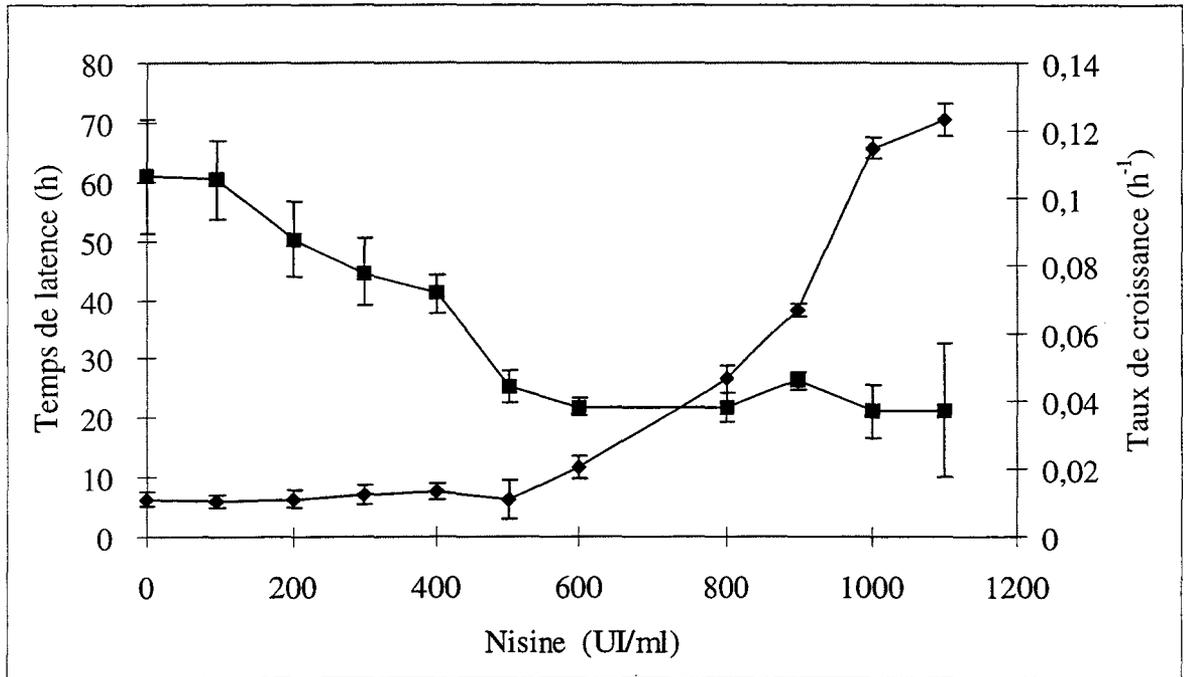
enzymatique ; ce processus est appelé homéostasie cellulaire (Lewis et Young, 1996). Nous avons montré que les entrées d'ions potassium chez *P. frisingensis* dépendent à la fois de l'hydrolyse d'ATP et du gradient de protons, et que les sorties des ions  $K^+$  sont accompagnées par une entrée de protons lorsque les cellules sont exposées à un choc froid. De plus, nous avons aussi démontré que le traitement froid des cellules provoque des changements notables de l'homéostasie cellulaire de *P. frisingensis*, sans induire une perte de viabilité cellulaire. La présence d'une source de carbone et des conditions de température permettant une activité métabolique sont nécessaires pour que la bactérie restaure les altérations de son homéostasie après un traitement à basse température. Les bières non pasteurisées et les bières en bouteilles pasteurisées avant conditionnement permettraient donc de rencontrer des conditions favorables au développement de *P. frisingensis*. En effet, la concentration moyenne de sucres fermentescibles dans la bière (de type Pils) est approximativement de 7 g/l (Moll, 1991). De plus, les conditions de température de stockage des bières après distribution en Europe sont non réglementées, et la température dans les dépôts de stockage est donc variable et peut atteindre plus de 15°C en été. Ces conditions pourraient permettre à *P. frisingensis* de restaurer son homéostasie cellulaire et sa capacité de se multiplier, et donc de se développer dans la bière.

Ogden et Tubb (1985) ont proposé l'emploi de la nisine comme traitement de stabilisation alternatif de la bière. Après avoir étudié l'effet du traitement froid sur l'homéostasie cellulaire de *P. frisingensis*, nous allons maintenant étudier l'effet de la nisine sur la bactérie. L'effet de la bactériocine sera étudié seul ou en combinaison avec le pH, la température, en présence ou en absence de glucose. Ceci pour répondre aux questions sur l'effet de la nisine sur *P. frisingensis*, sur l'effet de la nisine sur l'homéostasie cellulaire, utilisée seule ou en combinaison avec d'autres paramètres physico-chimiques. Ceci permettra

d'étudier les potentialités d'emploi de la nisine, comme traitement de stabilisation alternatif de la bière (Ogden et Tubb, 1985), ainsi que les conditions de son efficacité contre *P. frisingensis*.

## **Chapitre II Résultats et discussions**

**Les effets de la nisine seule ou combinée à des traitements thermiques et au pH en présence ou en absence de glucose sur *Pectinatus frisingensis***



**Figure 22 : Effet de la nisine (100-1100 UI/ml) sur le taux de croissance et le temps de latence de *P. frisingensis*ensemencée à  $10^7$  cellules/ml. (◆) temps de latence en h ; (■) taux de croissance en  $h^{-1}$ .**

## I. Effet de la nisine sur *Pectinatus frisingensis*

La nisine est la seule bactériocine dont l'emploi est autorisé en industrie agro-alimentaire. Cependant, son spectre d'action est limité aux bactéries à Gram positif. Ainsi, depuis quelques années certains chercheurs essayent d'élargir l'effet bactéricide de la nisine aux bactéries à Gram négatif notamment en associant la nisine à des agents chélateurs, à des chocs osmotiques, thermiques (Stevens *et al.*, 1991 ; Kalchayamand *et al.*, 1992). L'utilisation de la nisine dans les bières non pasteurisées a été proposée par Ogden et Tubb, en 1985. Nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet de la nisine sur *P. frisingensis*, bactérie à Gram négatif, en particulier sur la croissance et sur l'homéostasie cellulaire de la bactérie.

### I.1 Effet de la nisine sur la croissance de *P. frisingensis*

L'étude de l'effet de la nisine sur la croissance de *P. frisingensis* a été réalisée en cultivant la bactérie en milieu BCYT liquide, en présence de concentrations croissantes de nisine allant de 0 à 1100 UI/ml. Les tubes (18 × 150 mm) ont étéensemencés à  $10^7$  cellules/ml et la croissance a été suivie par lecture directe de l'absorbance à 550 nm. Les résultats de la Figure 22 montrent que dans les conditions de référence (0 UI/ml), *P. frisingensis* se multiplie avec un taux de croissance de  $0,15 \text{ h}^{-1}$ , après une phase de latence de 6,3 heures. De 100 à 500 UI/ml, la bactériocine ne semble pas avoir d'effet significatif sur la croissance de *P. frisingensis*. A partir de 500 UI/ml, le temps de latence augmente avec l'augmentation de la concentration en nisine, et le taux de croissance diminue. A des

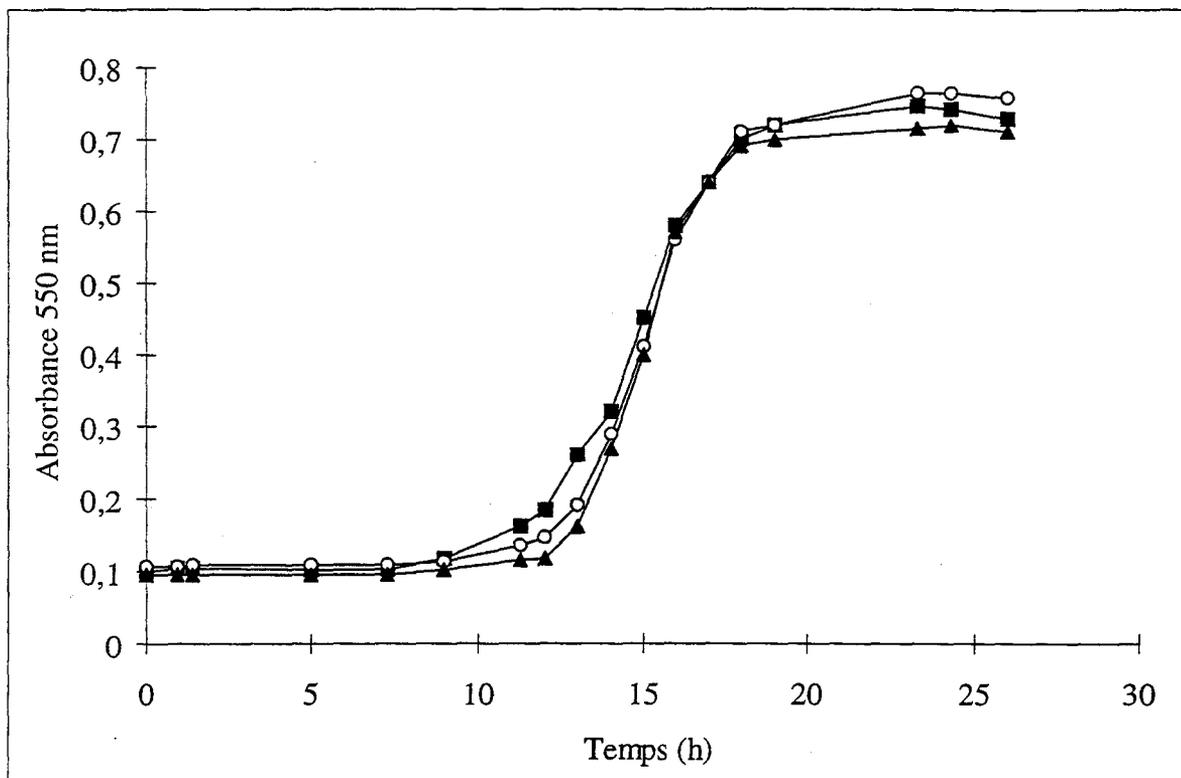


Figure 23 : Croissance d'*E. coli* dans le BCYT en condition d'anaérobiose en présence ou en absence de nisine (1000 ou 2000 UI/ml). (■) *E. coli* cultivée en absence de nisine. (○) *E. coli* cultivée en présence de 1000 UI/ml de nisine. (▲) *E. coli* cultivée en présence de 2000 UI/ml de nisine.

Nisine UI/ml	Cellules survivantes de <i>P. frisingensis</i> (cfu/ml)		Cellules survivantes d' <i>E. coli</i> (cfu/ml)	
	0	1000	0	1000
T0*	$2,5 \times 10^{11}$	$2,8 \times 10^{11}$	$8,7 \times 10^{10}$	$8,5 \times 10^{10}$
T1*	$2,5 \times 10^{11}$	$3,8 \times 10^9$	$8,7 \times 10^{10}$	$8,5 \times 10^{10}$

Tableau 15 : Dénombrement des cellules survivantes de *P. frisingensis* et d'*E. coli* après addition de nisine à 300 et 1000 UI/ml.

\* La numération à la fois des cellules de *P. frisingensis* et d'*E. coli* a été réalisée avant l'addition de la nisine à T0 et 40 min (T1) après addition de la bactériocine.

concentrations de nisine de 1000 et 1100 UI/ml, aucune croissance n'est observée après 70 heures de suivi de croissance. Ainsi, *P. frisingensis*, contrairement à la plupart des bactéries à Gram négatif, s'est révélé sensible à la nisine. Pour une charge bactérienne de  $10^7$  cellules/ml, la nisine affecte donc la croissance de la bactérie à partir de 500 UI/ml (Figure 22).

### I.1.1 Effet de la nisine sur *Escherichia coli* ATCC 10536

Dans la mesure où *P. frisingensis* est une bactérie à Gram négatif, la sensibilité de la bactérie à la nisine représente un résultat surprenant. Pour étudier l'effet des conditions expérimentales et du milieu de culture sur la sensibilité de *P. frisingensis* à la nisine, *E. coli* ATCC 10536 a été cultivée en présence de nisine (1000 et 2000 UI/ml) dans les mêmes conditions et sur le même milieu de culture que *P. frisingensis*. Les résultats (Figure 23) montrent que *E. coli* ATCC 10536 cultivée en présence ou en absence de nisine (1000 et 2000 UI/ml) présente les mêmes caractéristiques de croissance que dans les conditions témoins (0 UI/ml). L'effet des conditions de préparation des suspensions cellulaires concentrées a été également étudié en préparant *E. coli* ATCC 10536 dans les mêmes conditions que *P. frisingensis* (cf. Matériels et Méthodes page 65). Les résultats du Tableau 15 montrent que l'addition de nisine à une concentration de 1000 UI/ml aux suspensions cellulaires concentrées d'*E. coli* ATCC 10536 n'a aucun effet sur la viabilité cellulaire. Par contre, l'addition de la nisine à 1000 UI/ml aux suspensions cellulaires concentrées de *P. frisingensis* entraîne une diminution de 90% de la population bactérienne.

<b>Potassium intracellulaire mM</b>			
	Cellules en absence de glucose	Cellules en présence de glucose <sup>a</sup>	Cellules Témoin en présence de glucose et sans nisine <sup>b</sup>
<b>Nisine UI/ml</b>			
0	154 ± 8	168 ± 8	154 ± 8
100	140 ± 7	153 ± 8	168 ± 8
200	137 ± 7	151 ± 7	170 ± 8
500	128 ± 6	118 ± 6	193 ± 9

**Tableau 16 : Effet de la nisine (100, 200 et 500 UI/ml) sur les teneurs intracellulaires des ions  $K^+$  chez des suspensions cellulaires de *P. frisingensis* en présence ou en absence de glucose (30 mM).**

<sup>a</sup> les cellules sont préalablement incubées à 30°C pour les charger en  $K^+$  la nisine (100, 200 et 500 UI/ml) est ajouté 15 min après l'addition de glucose (30 mM). A ces concentrations de nisine aucune perte de viabilité n'est mesurée.

<sup>b</sup> les cellules témoin sont incubées à 30°C en présence de glucose (30 mM).

## **I.2 Effet de la nisine sur l'homéostasie cellulaire de *P. frisingensis***

Dans le but de comprendre l'action de la nisine sur *P. frisingensis*, nous nous sommes intéressés à l'effet de la bactériocine sur l'homéostasie et la viabilité de la bactérie pour comprendre la sensibilité de *P. frisingensis* à la nisine.

### **I.2.1 Effet d'ajout croissant de nisine sur les cellules de *P. frisingensis***

L'addition de nisine à des concentrations de 100, 200 et 500 UI/ml à des suspensions cellulaires concentrées de *P. frisingensis* en absence et en présence de glucose (30 mM) conduit à une perte immédiate de potassium intracellulaire. Le Tableau 16 montre que l'addition de 100 ou 200 UI/ml de nisine aux suspensions cellulaires en présence ou en absence de glucose résulte en une perte moyenne de 9 % de potassium intracellulaire. Cependant, en présence de 500 UI/ml les cellules perdent 17 % de leur potassium intracellulaire en absence de glucose, et 30% de potassium intracellulaire en présence de glucose (30 mM). Les mesures de viabilité cellulaire avant et après addition de la nisine ne montrent pas de mortalité cellulaire due à l'ajout de la bactériocine.

### **I.2.2 Cinétiques d'efflux de potassium cellulaire en présence de nisine et influence sur la viabilité cellulaire**

L'addition de nisine à des suspensions cellulaires concentrées en présence ou en absence de glucose provoque des sorties d'ions potassium. Le suivi des teneurs intracellulaires en présence de nisine montre (Figure 24) que l'addition de 300 UI/ml de nisine provoque une sortie rapide de  $K^+$ , entraînant une diminution de la concentration intracellulaire du  $K^+$  de 13% chez les bactéries métabolisant le glucose. Cependant,

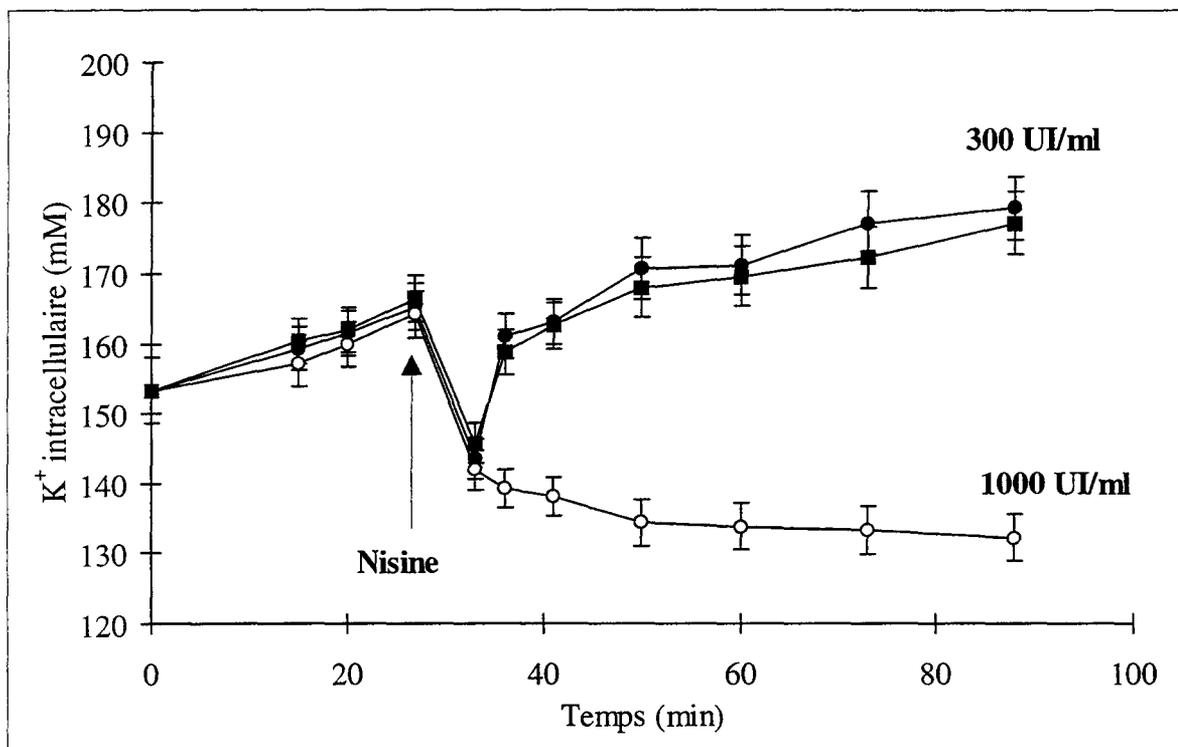


Figure 24 : Effet de la nisine (300 et 1000 UI/ml) sur les mouvements intracellulaires des ions potassium chez *P. frisingensis*. (●) K<sup>+</sup> chez *P. frisingensis* exposée à 300 UI/ml de nisine. (○) K<sup>+</sup> chez *P. frisingensis* exposée à 300 UI/ml de nisine en présence de 10 mM de Mg<sup>2+</sup>. (■) K<sup>+</sup> chez *P. frisingensis* exposée à 1000 UI/ml de nisine. Les suspensions cellulaires sont incubées à 30°C en présence de glucose 30 mM, la nisine 300 et 1000 UI/ml est ajoutée à T = 25 min.

Cellules survivantes de <i>P. frisingensis</i> (cfu/ml)			
Nisine UI/ml	0	300	1000
T0*	$2,5 \times 10^{11}$	$2,4 \times 10^{11}$	$2,8 \times 10^{11}$
T1*	$2,5 \times 10^{11}$	$2,4 \times 10^{11}$	$3,8 \times 10^9$

Tableau 17 : Dénombrement des cellules survivantes de *P. frisingensis* après addition de nisine à 300 et 1000 UI/ml. Des résultats similaires ont été obtenus en présence de 15 mM de Mg<sup>2+</sup>.

\* La numération des cellules de *P. frisingensis* a été réalisée avant l'addition de la nisine à T0 et 40 min (T1) après l'addition de la bactériocine.

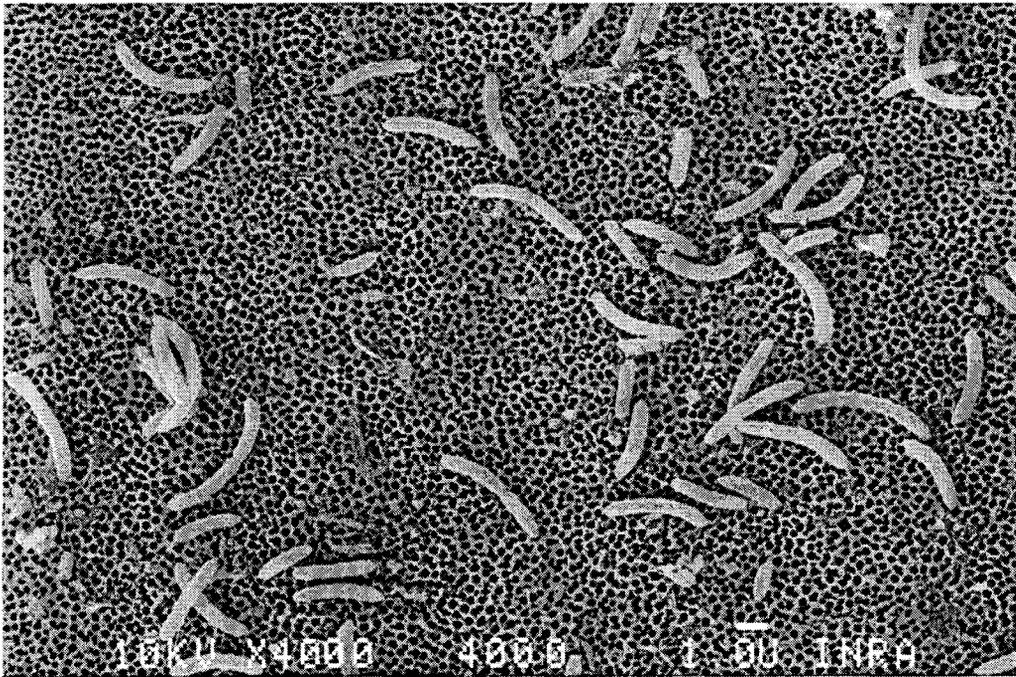
---

6 minutes après l'addition de la bactériocine, les bactéries rétablissent leur gradient de  $K^+$ , et réaccumulent le  $K^+$  jusqu'à une concentration de 180 mM (Figure 24).

Chez les bactéries à Gram négatif la couche des lipopolysaccharides (LPS) représente une barrière contre les substances hydrophobes. Les LPS sont liés entre eux d'une manière électrostatique par des cations divalents. Les cations divalents comme le  $Mg^{2+}$  rendent la couche des LPS plus stable et plus compacte, et permettent de protéger la bactérie contre l'action de certaines molécules comme les antibiotiques et les bactériocines. La présence de 10 mM de  $Mg^{2+}$  dans la suspension cellulaire, n'inhibe ni ne modifie la vitesse de sortie des ions potassium après addition de nisine à 300 UI/ml (Figure 24). Les mesures de la viabilité cellulaire avant et après addition de nisine à 300 UI/ml montrent qu'il n'y a pas de mortalité cellulaire consécutive à l'addition de la bactériocine.

Cependant, quand les bactéries sont exposées à une addition de nisine de 1000 UI/ml, elles perdent une partie de leur potassium intracellulaire (30%) et sont incapables de rétablir leur gradient de potassium de part et d'autre de la membrane. Aucune entrée nette de potassium n'est mesurée après l'addition de 1000 UI/ml de nisine. La numération des bactéries avant et après addition de nisine montre une perte de viabilité cellulaire de l'ordre de 90% (Tableau 17). La nisine agit donc sur *P. frisingensis* en perméabilisant la membrane cytoplasmique, et en provoquant des sorties de  $K^+$ . A des concentrations de 100 à 500 UI/ml, la bactériocine ne semble induire que des modifications transitoires de l'homéostasie cellulaire alors qu'à des concentrations élevées de 1000 UI/ml la nisine a un effet bactéricide.

Les photographies prises en microscopie électronique n'ont pas montré de cellules endommagées ou de débris cellulaires après addition de la nisine à 1000 UI/ml (Figures 25).



*Figure 25 : Photographie en microscopie électronique à balayage réalisée avec une suspension cellulaire concentrée de P. frisingensis incubée à 30°C à pH 6,2 en présence de glucose 30 mM et exposée à 1000 UI/ml de nisine. Les échantillons ont été préparés pour la microscopie électronique à balayage 20 min après l'addition de la nisine.*

	Volume cellulaire ( $\mu\text{l}/\text{mg}$ protéine)	pH intracellulaire	Potentiel de membrane (mV)
<u>Nisine UI/ml</u>			
0	$3,7 \pm 0,5$	$7,1 \pm 0,1$	$-86 \pm 5$
100	$3,8 \pm 0,6$	$6,7 \pm 0,3$	$-92 \pm 10$
200	$3,7 \pm 0,7$	$6,5 \pm 0,2$	$-86 \pm 5$
500	$3,3 \pm 0,3$	$6,6 \pm 0,2$	$-87 \pm 3$

*Tableau 18 : Effet de la nisine (100, 200 et 500 UI/ml) sur le volume cellulaire, pH interne et potentiel de membrane chez des suspensions cellulaire concentrées de P. frisingensis préparée en absence de glucose.*

### **I.2.3 Effet de la nisine sur le volume cellulaire, le pH intracellulaire et le potentiel de membrane**

L'addition de nisine à des concentrations de 100, 200, et 500 UI/ml aux suspensions cellulaires concentrées n'induit pas de modifications du volume cellulaire dont la taille reste stable (en moyenne de 3,6  $\mu$ l/mg de protéine). Le potentiel de membrane, avec une valeur moyenne de  $-88$  mV, n'est pas non plus affecté par l'addition de la nisine (Tableau 18). Cependant, le pH intracellulaire de la bactérie diminue légèrement à 100 UI/ml (0,4 unité de pH), alors que l'addition de 200 et 500 UI/ml de nisine aux bactéries induit une diminution moyenne du pH de 0,6 unité de pH.

## **II. Discussion et conclusion**

Les résultats présentés montrent que *P. frisingensis*, bactérie à Gram négatif, est sensible à la nisine. Ainsi, une augmentation de la concentration en nisine induit une augmentation du temps de latence et une diminution du taux de croissance comme cela a été décrit chez des bactéries à Gram positif, *Listeria monocytogenes* notamment (Mazzota et Montville, 1997). Chez les bactéries à Gram positif, la nisine perméabilise la membrane cytoplasmique. L'association avec la membrane est due en partie aux résidus hydrophobes exposés sur une face de la molécule (Jack *et al.*, 1995), et en partie à l'association initiale de la molécule avec les charges négatives des phospholipides (Abee *et al.*, 1995). Cependant, la plupart des bactéries à Gram négatif sont résistantes à la nisine (Spelhaug *et al.*, 1989). La couche des lipopolysaccharides (LPS) couvrant la membrane externe agit comme une barrière contre les substances hydrophobes : les LPS sont liés entre eux d'une

---

manière électrostatique par des cations divalents (Vaara, 1992). Ceci explique l'utilisation d'agents chélateurs comme l'EDTA pour favoriser l'action de molécules cationiques comme la nisine contre les bactéries à Gram négatif (Stevens *et al.*, 1992). Helander *et al.* (1994) ont montré que les LPS de *P. frisingensis* présentent une prédominance de charges positives dues à la présence de 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (Ara4N) dans le lipide A. De plus, il a été montré que la résistance à certaines substances antimicrobiennes est associée à la présence de quantités importantes d'Ara4N dans le lipide A, notamment dans le cas de la polymyxine B, composé cationique (Vaara *et al.*, 1981 ; Helander *et al.*, 1993). La présence de quantités importantes du Ara4N dans les LPS de *P. frisingensis* devrait rendre la bactérie plus résistante aux substances antimicrobiennes de nature cationique (la polymyxine B) (Varra, 1992). Malgré le surplus de charges positives dans le lipide A et dans le core des LPS de *P. frisingensis* et de *P. cerevisiiphilus*, les deux micro-organismes montrent une sensibilité particulière aux substances cationiques comme la polymyxine B et la vancomycine (Helander *et al.*, 1994). Helander *et al.* (1994) ont rapporté que l'enveloppe cellulaire des bactéries appartenant au genre *Pectinatus* présente des défauts de structures (cracks) dans la membrane externe, et que ces cassures sont probablement responsables de la pénétration de substances cationiques de type polymyxine B. Ceci semble conforter nos résultats qui montrent que *P. frisingensis* est sensible à la nisine. Les résultats de croissance d'*E. coli* ATCC 10536 en présence de nisine et les mesures de viabilité des suspensions bactériennes cultivées et préparées dans les mêmes conditions que *P. frisingensis* montrent qu'*E. coli* n'est pas affectée par la nisine, comme cela a été montré par Stevens *et al.* (1991). Ces résultats excluent une quelconque influence du milieu de culture et des conditions employées sur la sensibilité de *P. frisingensis* à la nisine.

---

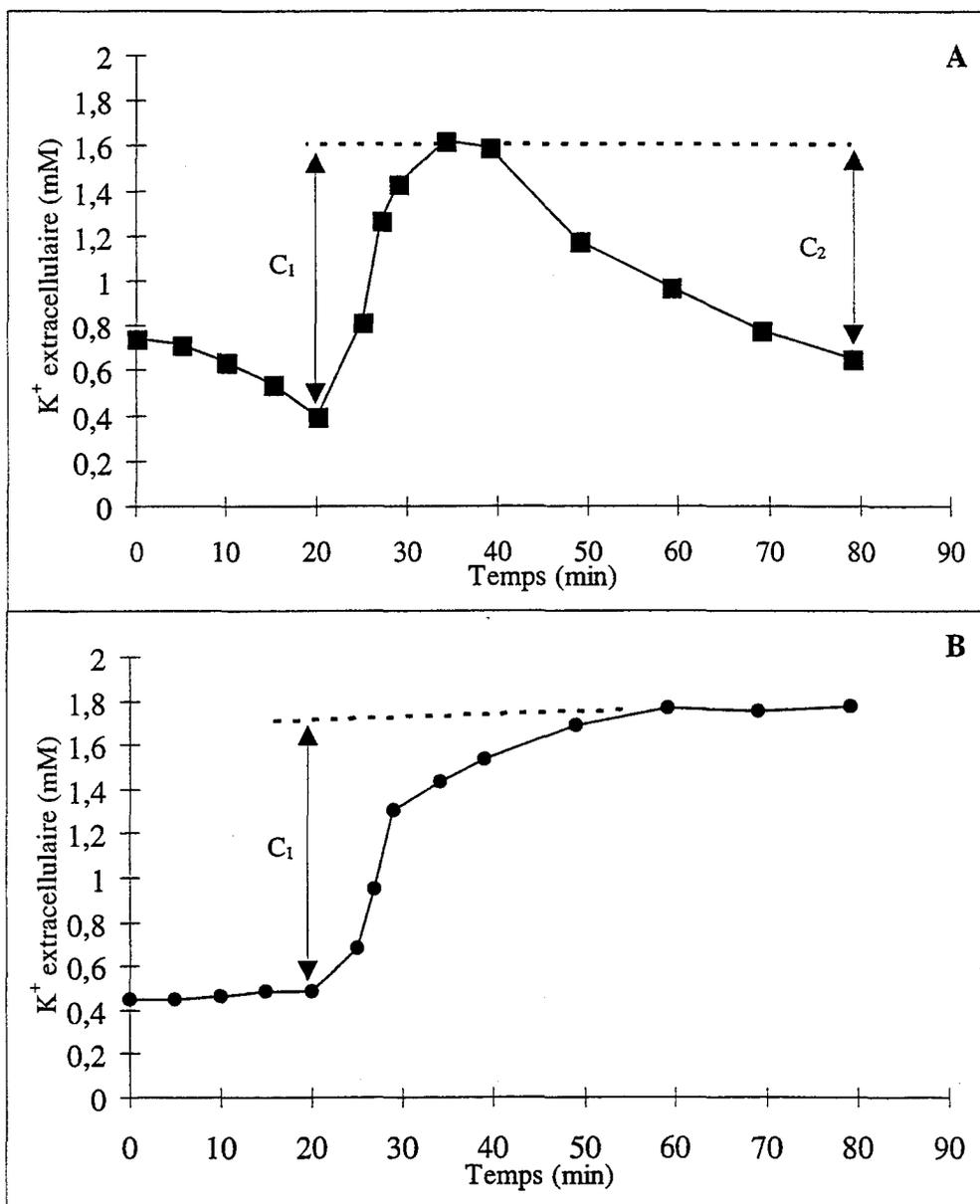
Nos résultats ont également montré que les cellules de *P. frisingensis* exposées à l'addition de faibles concentrations de nisine ( $\leq 500$  UI/ml), perdent une partie de leur potassium intracellulaire, comme cela a été décrit pour des cellules à Gram positif (Abee *et al.*, 1994). Cependant, à la différence de ce qui a été rapporté pour *L. monocytogenes*, les numérations bactériennes ne démontrent aucune perte de viabilité (Abee *et al.*, 1994). Ainsi, la nisine agit sur *P. frisingensis* en perméabilisant la membrane cytoplasmique comme cela a été décrit pour les bactéries à Gram positif comme *L. monocytogenes* (Mazzota et Montville, 1997 ; Abee *et al.*, 1994), *Staphylococcus cohnii*, et *Bacillus subtilis* (Ruhr et Sahl, 1985). Les sorties d'ions potassium et la perte de viabilité cellulaire provoquées par la nisine (300 et 1000 UI/ml) ne sont pas inhibées par les ions  $Mg^{2+}$  à la différence de ce qui a été rapporté pour *E. coli* en présence de la maganine 2 (Matsuzaki *et al.*, 1997). Ceci suggère que la nisine passe à travers la membrane externe et agit en perméabilisant la membrane cytoplasmique de *P. frisingensis* comme décrit chez les bactéries à Gram positif (Mazzota et Montville, 1997 ; Abee *et al.*, 1994 ; Ruhr et Sahl, 1985). La présence de 15 mM d'ions  $Mg^{2+}$  ne permettait pas de protéger *P. frisingensis* contre l'action de la nisine. Après avoir mis en évidence la sensibilité de *P. frisingensis* à la nisine utilisée isolément et les effets de la bactériocine sur la bactérie, nous allons étudier l'effet combiné de la bactériocine, de la température (2 et 50°C) et du pH (4,0 et 6,2), sur les bactéries placées en présence ou en absence de glucose.

### **III. Effet combiné de la nisine, du pH et de la température sur la perméabilité cellulaire de *P. frisingensis***

La première partie des résultats a montré l'influence de la nisine sur *P. frisingensis*. Une utilisation potentielle de cette bactériocine nécessite une étude de son effet dans des conditions physiologiques plus proches de celles rencontrées en brasserie. L'étude de l'effet combiné de la nisine (100, 200, 412 et 500 UI/ml), du pH (4,0 et 6,2) et de la température (2°C et 50°C) sur *P. frisingensis* en présence de glucose ou en état de privation nutritionnelle a nécessité la mise en place de deux plans d'expériences, un avec glucose et l'autre sans glucose (cf. Matériels et Méthodes page 70). Le but est de mettre en évidence les effets de chaque facteur, seul ou en combinaison, sur la perméabilité membranaire de *P. frisingensis*.

#### **III.1 Quantification de l'effet combiné des différents traitements sur la perméabilité cellulaire : illustration à l'aide d'un exemple**

Dans ce paragraphe nous présenterons deux expériences pour illustrer la façon dont ont été conduits les deux plans d'expériences avec ou sans glucose. Sur la Figure 26 sont représentées deux expériences obtenues dans les conditions opératoires correspondant à nisine 500 UI/ml, température 2°C et à pH 6,2 avec glucose (Figure 26A) et sans glucose (Figure 26B). La Figure 26A montre que l'addition de glucose (30 mM) aux suspensions cellulaires concentrées conduit à une augmentation de la teneur intracellulaire en ions K<sup>+</sup>. Ceci se traduit par une diminution de la concentration de ce cation dans le milieu



**Figure 26 :** Exemples de deux essais des deux plans d'expériences. A. Essais du plan d'expérience avec glucose; (■) K<sup>+</sup> extracellulaire dans les suspensions cellulaires (pH 6,2) métabolisant le glucose exposées à T = 20 min à l'addition de nisine (500 UI/ml) et un traitement thermique froid (2°C) de 10 min (glucose 30 mM est ajouté à T = 0 min). B. Essais du plan d'expérience sans glucose; (●) K<sup>+</sup> extracellulaire dans les suspensions cellulaires en privation nutritionnelle (pH 6,2) exposées à T = 20 min à l'addition de nisine (500 UI/ml) et un choc froid (2°C) pendant 10 min. A T = 30 min les suspensions cellulaires sont réincubées à 30°C. C<sub>1</sub> représente la concentration de K<sup>+</sup> perdue par les cellules après le traitement combiné. C<sub>2</sub> représente la concentration en potassium reaccumulée par les cellules métabolisant le glucose après le stress combiné.

---

extracellulaire. Par contre, la Figure 26B montre que les cellules de *P. frisingensis* maintenues en privation nutritionnelle perdent une partie de leur potassium intracellulaire, ce qui se traduit par une augmentation légère de la concentration extracellulaire en ions potassium (Figure 26B). Après 20 min d'incubation à 30°C en présence ou en absence de glucose, les suspensions cellulaires sont exposées à l'addition de nisine (500 UI/ml) et à un traitement thermique froid (2°C) durant 10 min.

La Figure 26A montre que dans les minutes qui suivent le stress, les bactéries perdent une partie de leur potassium intracellulaire, ce qui conduit à une augmentation de la concentration en ions potassium dans le milieu extracellulaire. La réincubation des suspensions cellulaires de *P. frisingensis* à 30°C 10 min après le traitement froid permet l'entrée des ions potassium dans les cellules métabolisant le glucose, et entraîne ainsi une diminution de la concentration extracellulaire de ce cation (Figure 26A). Pour les cellules en état de privation nutritionnelle, aucune diminution nette de potassium n'est mesurée dans le milieu de suspension des cellules, y compris lors de leur réincubation à 30°C (Figure 26B). Le dénombrement des cellules après les différents traitements n'a pas révélé de mortalité cellulaire.

Les cinétiques des mouvements d'ions potassium ont le même profil quelles que soient les combinaisons de stress appliquées aux cellules en présence ou en absence de glucose. L'augmentation de la concentration extracellulaire en ions potassium, correspondant à la diminution de la concentration intracellulaire de *P. frisingensis* en présence ou en absence de glucose après le traitement combiné nisine-traitement thermique froid, est appelée  $C_1$  (Figure 26A et 26B). Ce paramètre sera utilisé pour quantifier l'impact des différents traitements sur la perméabilisation de la membrane cellulaire de

*P. frisingensis*. La diminution de la concentration extracellulaire en ions potassium après la réincubation à 30°C des cellules en présence de glucose après le stress combiné est appelée  $C_2$  (Figure 26A). Ce paramètre sera utilisé pour quantifier l'impact des différents traitements sur la capacité de la bactérie à restaurer son gradient de  $K^+$  et à maîtriser sa perméabilité. L'analyse de variance appliquée à  $C_1$  et  $C_2$  comme réponse a permis de déterminer les coefficients ( $b_0$ ,  $b_i$  et  $b_{ij}$ ) des fonctions polynomiales (Equation 1, cf. Matériels et Méthodes page 71), d'en déduire les courbes d'ajustement aux données et de déterminer les effets significatifs de chaque facteur (risque  $\alpha$  de 0,05).

### III.2 Résultats des plans d'expériences

#### III.2.1 Sorties nettes d'ions $K^+$ des cellules de *P. frisingensis* en privation nutritionnelle

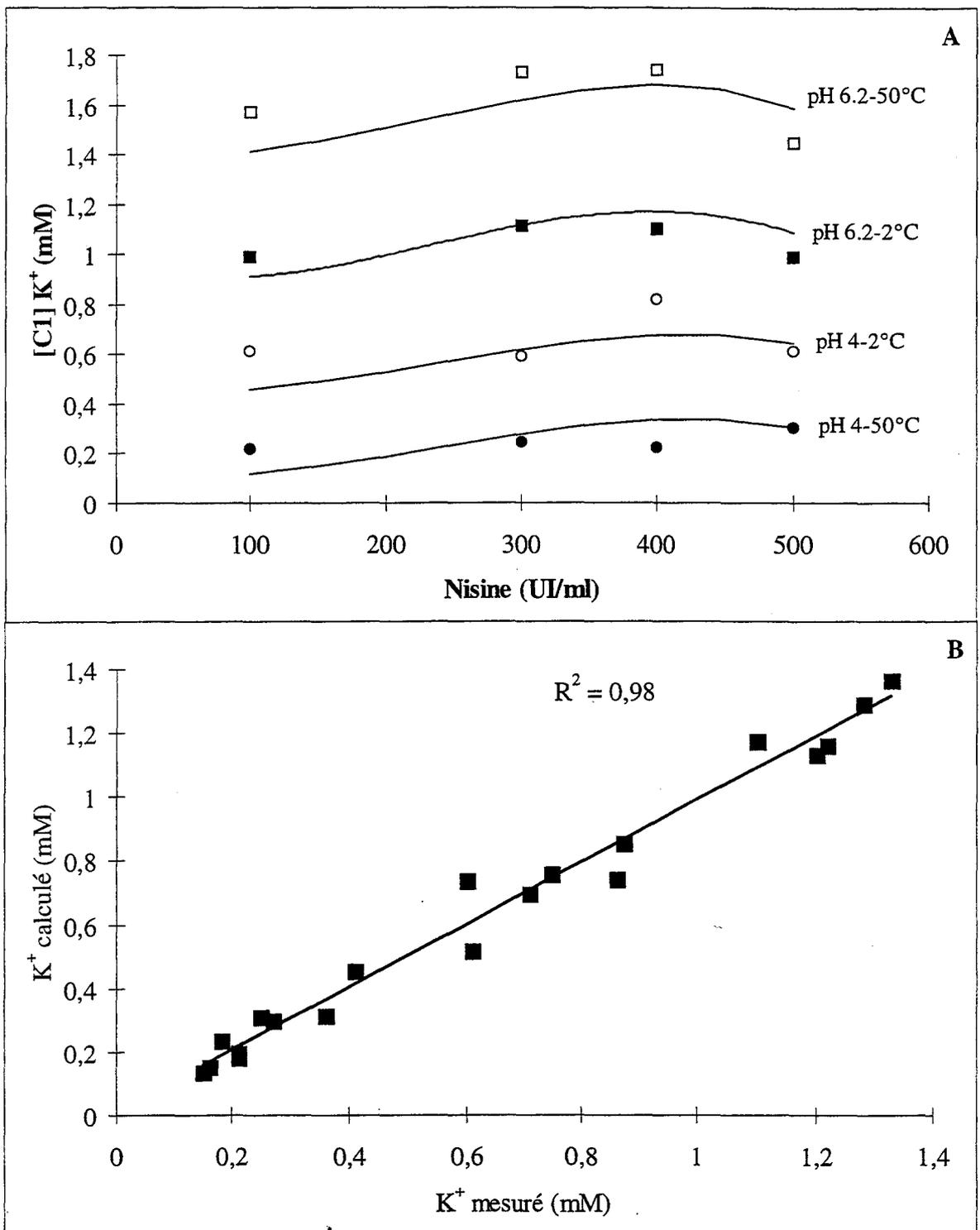
Les résultats de l'analyse de variance (Tableau 19) montrent que la nisine a un effet significatif sur les sorties nettes des ions potassium des cellules de *P. frisingensis* en privation nutritionnelle ( $P < 0,05$ ).

Source	ddl	Somme des carrés	Ficher	p* sous $H_0$ *
Modèle	6	4,80461530	65,19	0,0001
Erreur	13	0,22301690		
[pH]	1	2,41687311	140,88	0,0001
[Température]	1	0,02967131	1,73	0,2112
[pH] × [Température]	1	0,84532293	49,28	0,0001
[Nisine]	1	0,12333012	7,19	0,0189
[pH] × [Nisine]	1	0,02694597	1,57	0,2322
[pH] × [Nisine] <sup>2</sup>	1	0,07932945	4,62	0,0509

**Tableau 19 : Résultat de l'analyse de variance appliqué à l'effet du pH, de la température et de la nisine sur  $[C_1]$  en absence de glucose ( $R^2 = 0,98$ ).**

\*p la probabilité de rejeter à tort  $H_0$

\* $H_0$  c'est hypothèse nulle : pas d'effet du facteur



**Figure 27 :** Effet couplé de la nisine, du pH et de la température sur les sorties des ions potassium chez *P. frisingensis* en absence de glucose. A. Modèle de régression représentant l'effet de la nisine (100, 300, 412 et 500 UI/ml), choc froid (2°C) ou traitement thermique chaud modéré (50°C) et le pH (4,0 ou 6,2) de la suspension sur les sorties des ions potassium [C<sub>1</sub>] des cellules de *P. frisingensis* en privation nutritionnelle (6 mg [protéine]/ml). B. Comparaison des sorties d'ion potassium mesurées et ceux calculées à partir du model. Les résultats sont issus de l'analyse de variance ( $R^2 = 0,98$ ).

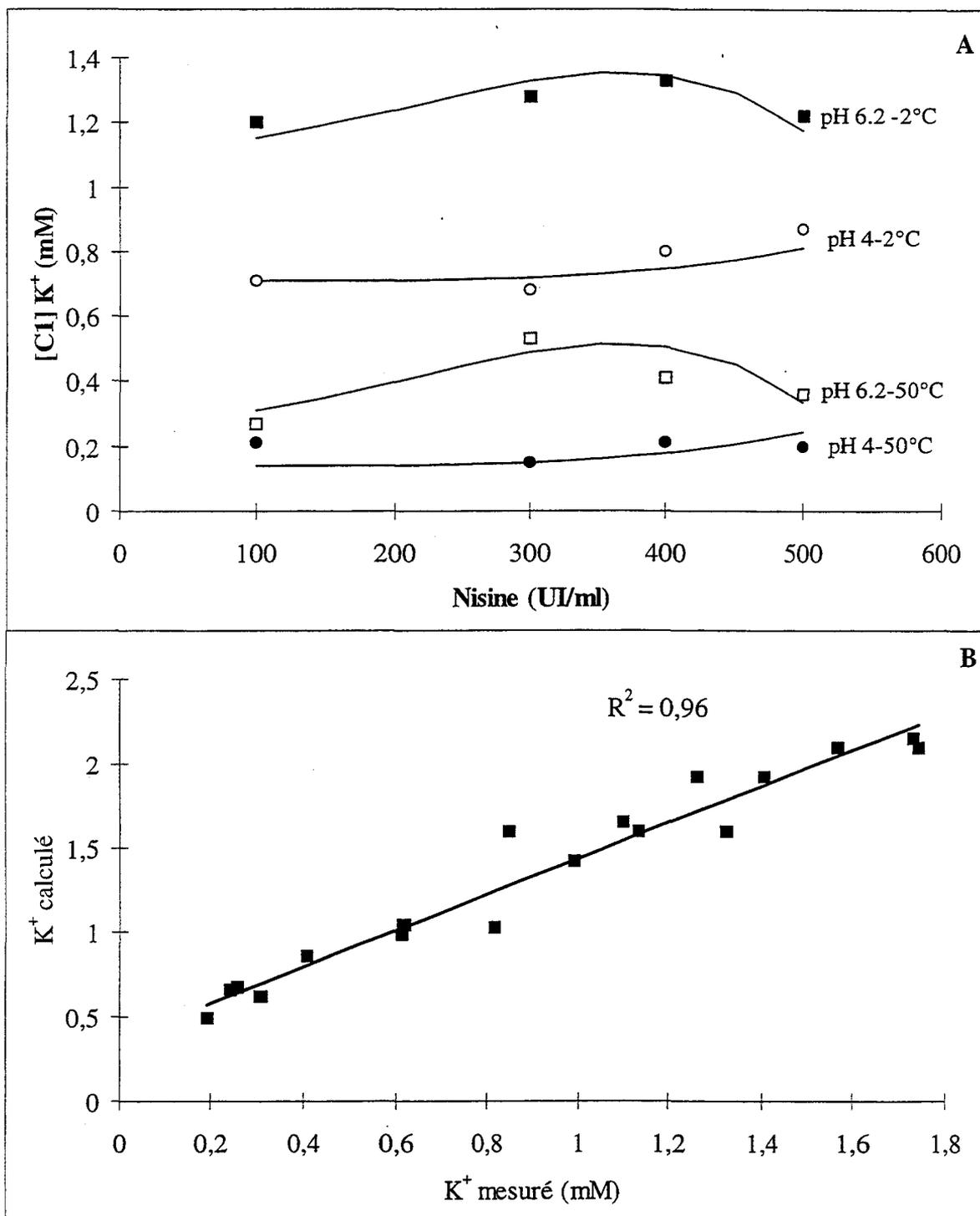
Le modèle de régression (Figure 27A) des sorties nettes des ions  $K^+$  ( $C_1$ ) montre que quel que soit le niveau des traitements de température (2 et 50°C) et celui du pH (4,0 et 6,2), la nisine a un effet positif sur les sorties d'ions potassium avec un effet maximal à une concentration de nisine de 400 UI/ml. De plus, quels que soient la température et le niveau de nisine, le passage de pH 4,0 à 6,2 se traduit par une augmentation de la quantité de potassium perdu ( $C_1$ ) par les cellules de *P. frisingensis* en privation nutritionnelle ( $p < 0,05$ ).

Le pH et la température ont également un effet positif sur les sorties des ions potassium ( $p < 0,05$ ). En effet, la quantité la plus élevée perdue par les cellules en privation nutritionnelle est mesurée à un pH de 6,2 et à une température de 50°C, quel que soit le niveau de nisine ajouté. La comparaison des concentrations de potassium  $C_1$  mesurées et celles calculées par le modèle (Figure 27B) montre que ce dernier décrit bien le phénomène étudié.

### **III.2.2 Sorties nettes d'ions $K^+$ des cellules de *P. frisingensis* en présence de glucose**

Le modèle de régression (Figure 28A) et le Tableau d'analyse de variance (Tableau 20) des sorties d'ions potassium suite aux différents traitements des cellules de *P. frisingensis* en présence de glucose montrent d'une part que la nisine a un effet significatif ( $P < 0,05$ ) et d'autre part que le pH et la nisine ont un effet synergique ( $p < 0,05$ ) sur les sorties des ions potassium dans les cellules métabolisant le glucose.

A pH 6,2, la nisine a un effet positif sur les sorties des ions  $K^+$  avec une activité optimale de la bactériocine à une concentration de 400 UI/ml. Par contre, à pH 4,0 les sorties d'ions potassium augmentent régulièrement avec l'augmentation de la concentration en nisine entre 100 et 500 UI/ml (Figure 28A).

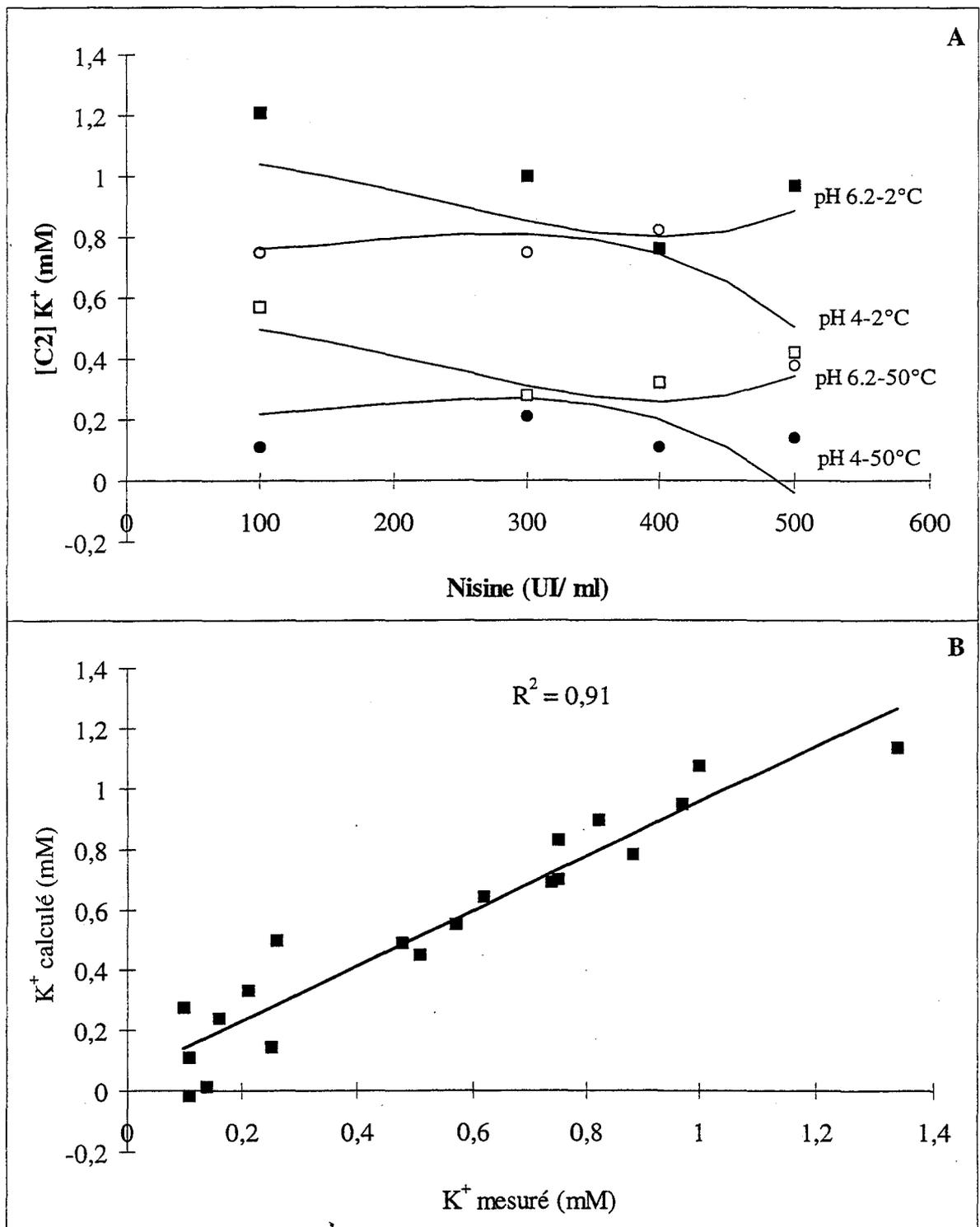


**Figure 28** : Effet couplé de la nisine, pH et de la température sur les sorties des ions potassium chez *P. frisingensis* en présence de glucose (30 mM). A. Modèle de régression représentant l'effet de la nisine (100, 300, 412, et 500 UI/ml), choc froid rapide (2°C) ou un choc thermique chaud modéré (50°C) et le pH (4,0 ou pH 6,2) sur les mouvements des ions potassium [C<sub>1</sub>] des cellules de *P. frisingensis* métabolisants le glucose. B. Comparaison des sorties d'ions potassium mesurées et celles calculées à partir du modèle de régression. Les résultats sont issus de l'analyse de variance ( $R^2 = 0,96$ ).

Source	ddl	Somme des carrées	Ficher	p sous H0
Modèle	8	3,27105702	65,19	0,0001
Erreur	11	0,06899798		
[pH]	1	0,16355305	26,07	0,0003
[Température]	1	2,39461076	381,76	0,0001
[pH] × [température]	1	0,09001057	14,35	0,0030
[Nisine]	1	0,03235504	5,16	0,0442
[Nisine] <sup>2</sup>	1	0,02985691	4,76	0,0517
[pH] × [nisine]	1	0,03461747	5,52	0,0385

**Tableau 20 : Résultat de l'analyse de variance appliqué à l'effet du pH, de la température et de la nisine sur  $[C_1]$  en présence de glucose ( $R^2 = 0,96$ ).**

L'augmentation du pH de traitement de pH 4,0 à pH 6,2, à un même niveau du traitement thermique (2 ou 50°C), conduit à une augmentation de la quantité d'ions potassium perdue par les cellules, quelle que soit la concentration de nisine ajoutée à la suspension cellulaire. La température a aussi un effet significatif ( $P < 0,05$ ) (Tableau 20) sur les sorties des ions potassium des cellules de *P. frisingensis* métabolisant le glucose. Le traitement thermique froid (2°C) provoque une sortie d'ions potassium plus importante que le traitement thermique modéré chaud (50°C), quel que soit le niveau de nisine (Figure 28A). L'effet favorisant les sorties d'ions potassium du traitement thermique froid est plus prononcé à pH 6,2 qu'à pH 4,0, il y a donc interaction entre le facteur pH et le facteur température ( $p < 0,05$ ) (Tableau 20). Les sorties les plus importantes en ions potassium sont mesurées quand *P. frisingensis* est exposée à une addition de nisine à une concentration de 400 UI/ml, au traitement thermique froid (2°C) et à pH de 6,2. La comparaison des concentrations de potassium  $C_1$  mesurées et celles calculées par le modèle (Figure 28B) montre une très bonne concordance entre les concentrations calculées et mesurées ( $R^2 = 0,96$ ).



**Figure 29 : Réaccumulation des ions potassium après les différents traitements.** A. Modèle de régression représentant les entrées des ions potassium dans les cellules de *P. frisingensis* [C<sub>2</sub>] métabolisants le glucose incubées à 30°C, après un traitement combiné de nisine (100, 300, 412, et 500 UI/ml), et 10 min de traitement froid (2°C) ou de traitement chaud (50°C) à pH 4,0 ou à pH 6,2. B. Comparaison des concentrations, mesurées et calculées, des ions potassium réaccumulées par les cellules de *P. frisingensis*. Les résultats sont issus de l'analyse de variance ( $R^2 = 0,91$ ).

### III.2.3 Réaccumulation nette d'ions $K^+$ par les cellules de *P. frisingensis* après les stress combinés

Les cellules de *P. frisingensis* métabolisant le glucose et exposées à un traitement thermique de 10 min à 2°C ou à 50°C combiné avec l'addition de nisine à un pH de 4,0 ou de pH 6,2 sont capables de réaccumuler les ions  $K^+$  (concentration  $C_2$ ) quand elles sont réincubées à 30°C (Figure 29A). L'étude de la réaccumulation des ions potassium par les cellules de *P. frisingensis* en présence de glucose va nous permettre de mettre en évidence l'effet des différents traitements sur la capacité de la bactérie à restaurer sa perméabilité cellulaire après les différents stress.

Source	ddl	Somme des carrées	Ficher	p sous H0
Modèle	7	2.27880950	65,19	0,0001
Erreur	12	0,23084550		
[pH]	1	0,03247382	1,69	0,2183
[Température]	1	1.41553933	73,58	0,0001
[Nisine]	1	0,26822923	0,40	0,5388
[Nisine] <sup>2</sup>	1	0,000770170	4,19	0,0633
[pH] × [nisine]	1	0,08054590	3,50	0,0860
[pH] × [nisine] <sup>2</sup>	1	0,08461489	4,40	0,0578

**Tableau 21 : Résultat de l'analyse de variance appliqué à l'effet du pH, de la température et de la nisine sur  $[C_2]$  en présence de glucose ( $R^2 = 0,91$ ).**

Le modèle de régression illustré dans la Figure 29A et les résultats de l'analyse de variance (Tableau 21) montrent que la température est le facteur qui a l'effet le plus significatif ( $p < 0,05$ ) sur la réaccumulation du potassium. Les cellules de *P. frisingensis* exposées au traitement thermique froid réaccumulent plus de  $K^+$  que les cellules exposées à un traitement thermique modéré de 50°C, quel que soit le pH de la suspension cellulaire.

---

L'incidence de la nisine, bien que difficile à mettre en évidence ( $p > 0,05$ ), ne doit pas être négligée (Tableau 21). La part de variabilité non expliquée par le modèle est ici plus importante qu'avec la réponse  $C_1$  (cf. paragraphe II.2.2 page 113-114) et entraîne donc une plus grande difficulté d'interprétation des effets des facteurs.

A pH 6,2, les entrées des ions potassium sont importantes quand la nisine est de 100 UI/ml, alors qu'elles sont moins importantes quand *P. frisingensis* est exposée à l'addition de nisine de 400 UI/ml, aussi bien à 2°C qu'à 50°C. Cependant, à pH 4,0, la réaccumulation nette des ions potassium est plus importante quand les cellules sont exposées à une addition de nisine de 300 UI/ml, et est moins importante quand la nisine est de 500 UI/ml, à la fois à 2°C et à 50°C (Figure 29A). De plus, quand *P. frisingensis* est exposée à la nisine 500 UI/ml combinée à un traitement thermique chaud (50°C), les entrées nettes en ions potassium sont négligeables. La comparaison des concentrations de potassium  $C_2$  mesurées et celles calculées par le modèle (Figure 29B) montre une bonne corrélation lors de la réincubation des cellules après les traitements combinés, même si la réponse  $C_2$  semble être plus bruitée que la réponse  $C_1$  (respectivement  $R^2 = 0,91$  et  $0,98-0,96$ )

#### IV. Discussion et conclusion

Les résultats présentés montrent que les sorties nettes d'ions potassium des cellules de *P. frisingensis* dépendent à la fois de la combinaison des stress appliqués aux bactéries (nisine, pH et température), et de la présence ou de l'absence de glucose. Plusieurs travaux ont décrit une modulation de l'activité de la nisine par le pH du milieu dans lequel elle se trouve (Huot *et al.*, 1996 ; Thomas et Wimpenny, 1996). Les sorties des ions potassium

chez *P. frisingensis* maintenue en privation nutritionnelle ou en présence de glucose, sont plus importantes à 6,2 qu'à pH 4,0. Ceci est vérifié à 2°C et à 50°C, quelle que soit la concentration de nisine ajoutée. Ces résultats sur l'activité de la nisine à pH 6,2 concordent avec ce qui a déjà été décrit pour *L. monocytogenes* (Abee *et al.*, 1994) et pour *Clostridium botulinum* ; une diminution du pH du milieu de 7 à 6 augmente l'effet bactéricide de la nisine (Rogers et Montville, 1994). Ceci a été également confirmé chez *Staphylococcus aureus* pour laquelle le maximum d'activité bactéricide de la nisine a été mesuré à pH 6,2 (Thomas et Wimpenny, 1996). Pour les cellules de *P. frisingensis* en état de privation nutritionnelle, l'effet combiné du pH et de la température conduit à des sorties importantes d'ions K<sup>+</sup> quand le pH est de 6,2 et la température est de 50°C quel que soit le niveau de nisine ajouté. Ceci est en accord avec ce qui a été rapporté par Maisnier-Patin *et al.* (1995) qui ont montré que la combinaison d'un traitement thermique chaud et de la nisine pourrait soit activer l'action bactéricide de la bactériocine, soit augmenter la sensibilité des bactéries à la nisine. De plus, il a été montré que la combinaison de la nisine avec des traitements thermiques chauds était plus efficace que la nisine seule contre les spores de *Clostridium botulinum* (Scott et Taylor, 1981).

La température a un effet significatif sur les sorties d'ions potassium dans le cas des cellules métabolisant le glucose. Ainsi, une diminution de la température de 50°C à 2°C induit une augmentation des sorties d'ions potassium de la bactérie, quels que soient le pH de la suspension cellulaire et la concentration de la nisine ajoutée. Les sorties les plus importantes d'ions potassium sont mesurées à pH 6,2 et à une température de 2°C quelle que soit la concentration de nisine ajoutée. Ces résultats sont en complet accord avec des études précédentes sur l'action de la nisine, qui ont montré une diminution significative de

la concentration minimale inhibitrice de nisine chez *L. monocytogenes* quand la température diminue de 30°C à 10°C (Buncic *et al.*, 1995 ; Mazzota et Montville, 1997). Chez *Clostridium botulinum* également, une diminution de 90% du seuil de la concentration inhibitrice de nisine a été rapportée quand la température est réduite de 35 à 15°C (Scott et Taylor, 1981). Par contre, Abee *et al.* (1994) démontrent chez *L. monocytogenes* que l'activité de la nisine diminue avec la diminution de la température. Ainsi un temps de latence est mesuré avant les sorties d'ions potassium quand la température est de 18 °C et aucune sortie de potassium n'est mesurée quand la température est de 7°C.

Chez *P. frisingensis* en présence de glucose, l'addition de nisine provoque une sortie immédiate de K<sup>+</sup>, suivie par une réaccumulation de ce cation par les cellules lors des réincubations à 30°C en présence de glucose dans le milieu de suspension des cellules. Différents niveaux d'endommagements cellulaires ont été rapportés chez une population bactérienne exposée à différents types de stress. *Salmonella typhimurium* préalablement traitée à des températures inférieures à 0 est plus sensible à la nisine qu'à la pédiocine et *Yersinia enterocolitica* est plus sensible aux deux bactériocines après un traitement thermique chaud (Kalchayanand *et al.*, 1992). La quantité d'ions potassium réaccumulés par les cellules de *P. frisingensis* dépend probablement du niveau de l'altération de la perméabilité cellulaire (Ray, 1989). En effet, il est nécessaire que les bactéries aient une membrane cytoplasmique intacte pour garantir le maintien et la régulation de leur homéostasie. Chez les bactéries, la membrane cytoplasmique accomplit des fonctions vitales pour la cellule notamment le maintien de la force proton-motrice, le transport de nutriments ou la séparation du cytoplasme du milieu extracellulaire (Russel *et al.*, 1995). Dans nos expériences, les cinétiques de réaccumulation d'ions potassium et la quantité finale d'ions

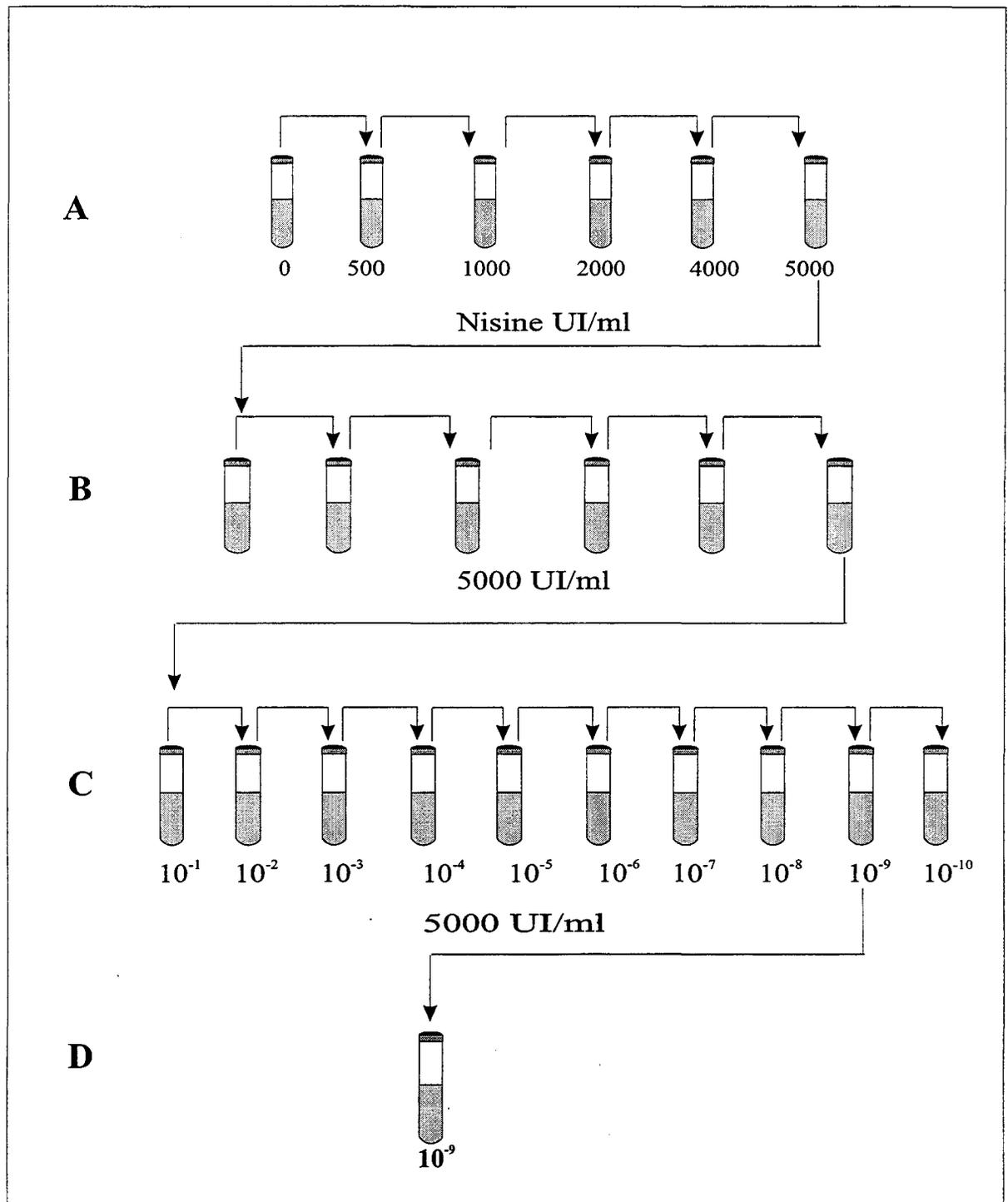
$K^+$  mesurée dans le milieu des suspensions cellulaires en présence de glucose montrent des altérations transitoires de la perméabilité de la membrane sans perte de viabilité cellulaire. Des effets similaires ont aussi été rapportés par Sahl *et al.* (1987) chez *Streptococcus cohnii* avec la formation transitoire de pores membranaires après l'addition de nisine.

Ces résultats montrent que *P. frisingensis* bactérie à Gram négatif est sensible à la nisine. Pour une charge bactérienne de  $10^7$  cellules/ml, la nisine est active à partir de 500 UI/ml. De plus un traitement thermique modéré de 50°C couplé à une concentration de nisine de 400 UI/ml et à un pH de 4,0 sont nécessaires pour empêcher la restauration de l'homéostasie cellulaire dans les cellules métabolisant le glucose. Ainsi, l'utilisation de la nisine pour augmenter la durée de vie des bières non pasteurisées pourrait être envisageable. Des études complémentaires couplant de faibles charges en contaminants et une concentration de 100 UI/ml de nisine proposée par Ogden et Tubb (1985) devraient ainsi permettre de déterminer si l'on peut prévenir le développement des contaminations par *P. frisingensis*. Dans le cas des bières pasteurisées, l'utilisation de la nisine pourrait aussi conduire à la diminution de l'intensité du traitement thermique et donc augmenter les qualités organoleptiques de la boisson.

Après avoir mis en évidence la sensibilité de *P. frisingensis* à la nisine et le potentiel que représente cette dernière pour lutter contre les contaminations dues à la bactérie, nous allons nous intéresser dans le chapitre suivant aux conséquences de l'exposition répétée de la bactérie à la nisine.

## **Chapitre III Résultats et discussions**

**Isolement d'une souche de *Pectinatus frisingensis*  
résistante à une haute concentration de nisine et l'étude  
de l'implication de l'enveloppe cellulaire dans la  
résistance à la bactériocine**



**Figure 30 : Stratégie mise en oeuvre pour la sélection d'une souche de *P. frisingensis* résistante à 5000 UI/ml de nisine.**

**A: Mise en culture de *P. frisingensis* en présence de concentrations croissantes de nisine.**

**B: Repicage de *P. frisingensis* obtenue en présence de 5000 UI/ml de nisine sur la même concentration.**

**C: Sélection d'une population homogène de *P. frisingensis* par dilutions successives sur milieu en présence de 5000 UI/ml de nisine.**

**D: Les bactéries qui se sont multipliées à la dilution la plus forte ont été considérées comme une population homogène et ont été appelées souche Nis-5000.**

## I. Etude de la résistance à la nisine chez *Pectinatus frisingensis*

L'utilisation de la nisine dans les industries agro-alimentaires risque de favoriser l'émergence de souches résistantes, dans la mesure où la fréquence d'exposition des souches sensibles dans les ateliers de travail à la bactériocine augmente. Cependant les études disponibles jusqu'à ce jour sont peu nombreuses et focalisées sur l'étude de la résistance de *Listeria monocytogenes* et *Clostridium botulinum*. L'étude du (des) mécanisme(s) de résistance chez les bactéries sensibles à la nisine pourrait apporter des données utiles pour une utilisation raisonnée de la bactériocine comme agent de stabilisation. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à la sélection d'une souche de *P. frisingensis* résistante à 5000 UI/ml de nisine et à l'étude de son mécanisme de résistance.

### I.1 Isolement d'une souche de *P. frisingensis* résistante à la nisine

L'isolement d'une souche de *P. frisingensis* résistante à de fortes concentrations de nisine quel que soit son mécanisme de résistance a été réalisé par repiquages successifs de la bactérie en présence de concentrations croissantes de nisine allant de 1000 à 5000 UI/ml. Le caractère anaérobie strict de *P. frisingensis* ainsi que le temps assez important que met la bactérie pour former des colonies sur milieu solide, nous a conduit à opter pour la sélection en milieu liquide de la souche résistante à la nisine, au lieu d'employer la technique de sélection sur milieu solide (boîte de Pétri). Dans une première étape, les bactéries sont cultivées progressivement en présence de 1000, 2000, 4000 et 5000 UI/ml de nisine sur milieu BCYT (Figure 30). Les bactéries obtenues sur milieu BCYT contenant 5000 UI/ml de nisine (BCYT-5000) sont repiquées sur BCYT-5000 jusqu'à l'obtention d'une population bactérienne

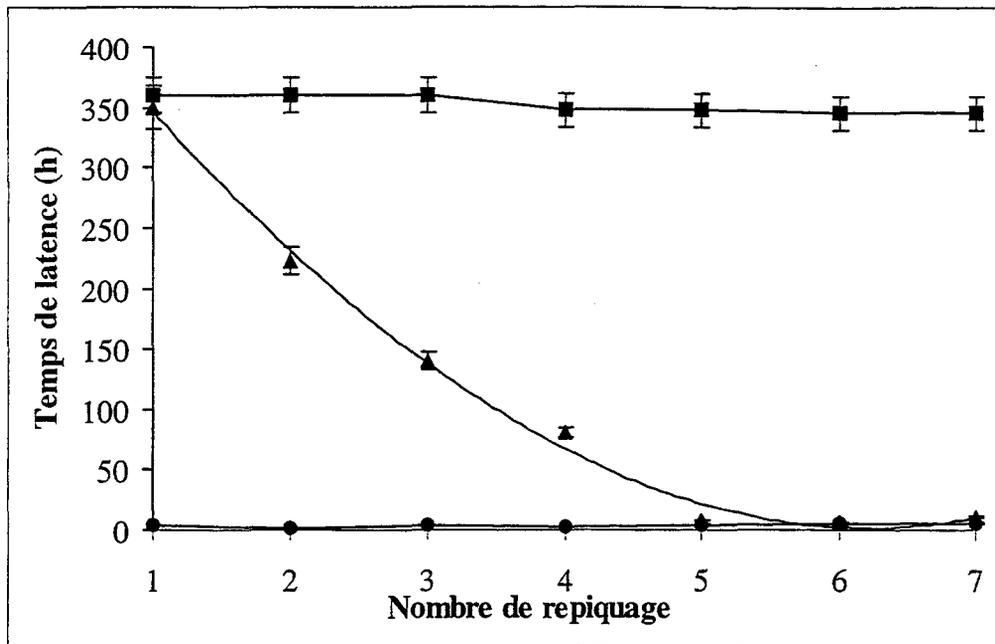


Figure 31 : Diminution du temps de latence de *P. frisingensis* au fur et à mesure des repiquages en présence de nisine à 5000 UI/ml.

(●) Temps de latence de *P. frisingensis* cultivée en absence de nisine. (▲) Temps de latence de *P. frisingensis* cultivée constamment en présence de nisine à 5000 UI/ml. (■) Temps de latence de *P. frisingensis* cultivée pour la première fois en présence de 5000 UI/ml nisine.

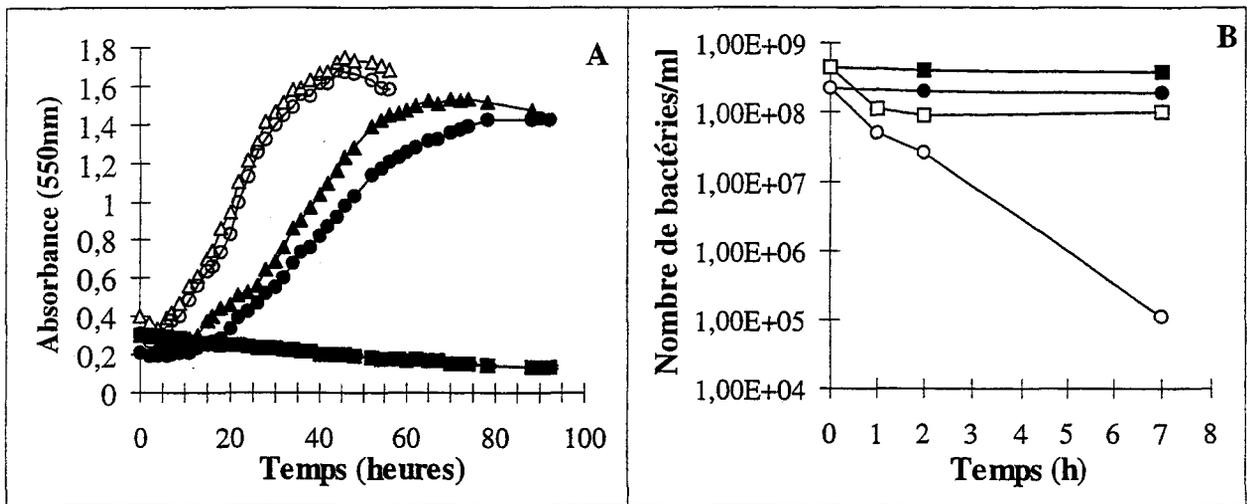


Figure 32 : Comparaison des cinétiques de croissance et de survie de la souche parentale et de la souche Nis-5000 de *P. frisingensis*. A. Cinétique de croissance de la souche parentale en absence (Δ) ou en présence de nisine 5000 UI/ml (■). Cinétique de croissance de la souche parentale (○) en présence de 64 mM de Na<sup>+</sup>. Croissance de la souche Nis-5000 en présence de nisine 5000 UI/ml (●) ou en absence de nisine (▲). B. Effet de la nisine sur la viabilité cellulaire de la souche parentale et la souche Nis-5000 durant les premières heures de croissance. Cellules survivantes de la souche parentale en absence (■) ou en présence (□) de nisine 5000 UI/ml. Cellules survivantes de la souche Nis-5000 en absence (●) ou en présence (○) de nisine 5000 UI/ml.

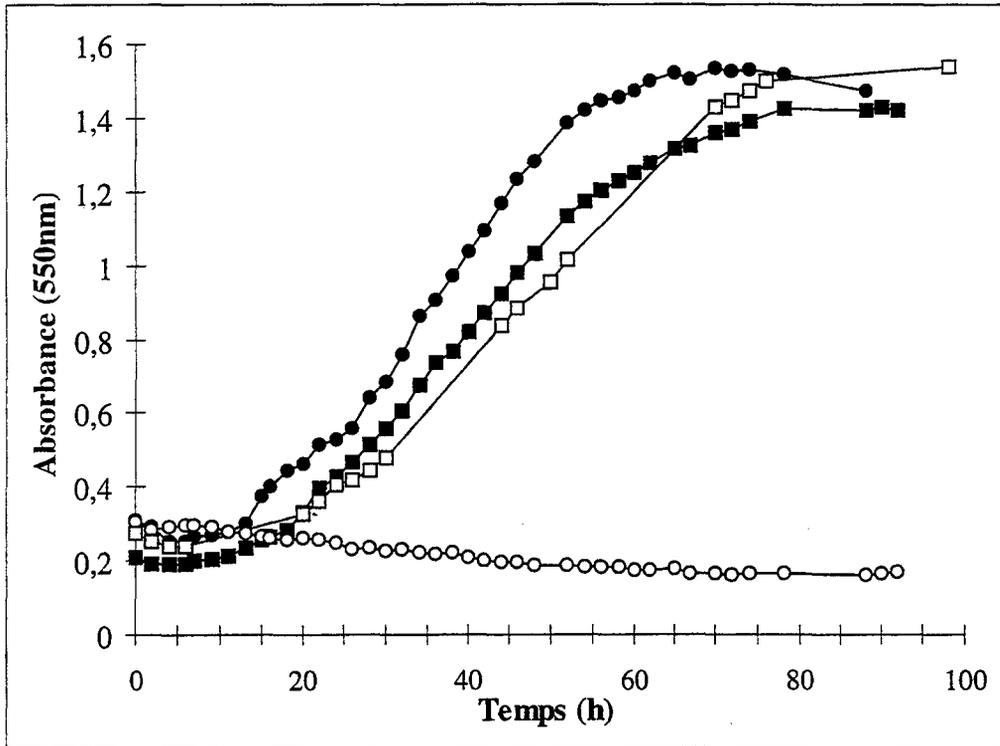
présentant une cinétique de croissance proche de celle de la souche parentale. La Figure 31 montre qu'au fur et à mesure des repiquages dans le BCYT-5000, le temps de latence diminue. Il passe ainsi de 350 heures au bout du premier repiquage à 10 heures au bout du sixième repiquage. Cependant, la souche parentale mise en culture pour la première fois en présence de nisine 5000 UI/ml présente toujours un temps de latence de 350 heures.

La sélection d'une population homogène de bactéries résistantes à 5000 UI/ml de nisine (Nis-5000) a été mise en oeuvre par dilutions successives au  $1/10^{\text{ème}}$  jusqu'à  $10^{-10}$  dans du BCYT en présence de nisine (5000 UI/ml). Les bactéries issues de la dilution la plus importante ( $10^{-9}$ ) ont été considérées comme une population homogène (Figure 30). Toutes les expériences ultérieures ont été réalisées à partir de ces dernières cultures.

## **I.2 Comparaison des cinétiques de croissance et de viabilité cellulaire de la souche résistante et la souche parentale en présence de nisine (5000 UI/ml)**

La Figure 32A montre que la souche résistante Nis-5000 présente les mêmes cinétiques de croissance en absence et en présence de nisine (5000 UI/ml) avec un temps de latence et un taux de croissance, respectifs de 10,2 h et de  $0,052 \text{ h}^{-1}$ . Cependant, au bout de 93 h de cinétique, aucune croissance n'est observée pour la souche parentale en présence de nisine 5000 UI/ml. La comparaison des cinétiques de croissance de la souche parentale et de la souche résistante Nis-5000 en absence et en présence de nisine (5000 UI/ml) montre que la souche résistante Nis-5000 présente un taux de croissance plus faible (- 32%) et un temps de latence deux fois plus long que la souche parentale.

Les mesures de viabilité cellulaire au cours des premières heures de ces cinétiques de croissance (Figure 32B) montrent qu'après 7 heures de cinétique, la nisine (5000 UI/ml) entraîne respectivement une réduction de population de 3,5 log (99,95 %) (Figure 32B) pour la souche parentale et de 0,7 log (70%) pour la souche résistante Nis-5000.



**Figure 33 : Effet de la nisine 5000 UI/ml sur la croissance de la souche Nis-5000 au fur et à mesure des repiquages sur BCYT sans nisine.**  
 (●) Croissance en présence de nisine 5000 UI/ml de la souche Nis-5000 après 1 repiquage sur BCYT sans nisine. (□) Croissance en présence de nisine 5000 UI/ml après 2 repiquages sur milieu sans nisine. (■) Croissance en présence de nisine 5000 UI/ml après 5 repiquages sur milieu sans nisine. (○) Croissance en présence de nisine 5000 UI/ml après 10 repiquages sur milieu sans nisine.

L'addition de la nisine à une concentration de 5000 UI/ml dans le milieu de culture correspond à une augmentation de la concentration en Na<sup>+</sup> dans le milieu de croissance de 64 mM, la préparation commerciale de la nisine contenant 75% en poids de NaCl. La Figure 32A montre que l'addition de 64 mM de Na<sup>+</sup> dans le BCYT n'entraîne pas de modification de la croissance de *P. frisingensis* par rapport à celle de la souche parentale cultivée sur BCYT non supplémenté par 64 mM de Na<sup>+</sup> (Figure 32A).

### **I.3 Caractéristiques de la souche résistante à de fortes concentrations en nisine**

#### **I.3.1 Stabilité de la résistance**

La stabilité du caractère de résistance de la souche Nis-5000 a été étudiée par repiquage de la souche sur milieu BCYT sans nisine puis en repiquant de nouveau la souche sur BCYT en présence de la bactériocine 5000 UI/ml. La Figure 33 montre que la souche Nis-5000 mise en culture sur BCYT avec une concentration en nisine de 5000 UI/ml et après cinq repiquages sur milieu sans nisine, présente la même cinétique de croissance que la souche continuellement exposée à la bactériocine. Cependant, après dix repiquages sur milieu sans nisine, la souche résistante perd son caractère de résistance. En effet, aucune croissance n'est détectée après 93 heures de cinétique. Ainsi, ces résultats montrent que le caractère de résistance à la nisine chez *P. frisingensis* est instable, dans la mesure où *P. frisingensis* Nis-5000 perd son caractère de résistance quand la bactérie est cultivée sans pression de sélection (nisine à 5000 UI/ml). Par conséquent, nous avons pris la décision de cultiver continuellement la souche Nis-5000 en présence de nisine (5000 UI/ml) dans la suite des travaux.

	Volume ( $\mu\text{l}/\text{mg}$ protéine)	pH interne	$\Delta\Psi$ (mV)	FPM* (mV)
Souche parentale	$3,3 \pm 0,3$	$7,43 \pm 0,3$	$-81 \pm 8$	$-152 \pm 15$
Souche Nis-5000	$1,8 \pm 0,2$	$7,35 \pm 0,3$	$-82 \pm 8$	$-147 \pm 14$

**Tableau 22 : Comparaison du pH interne, du volume cellulaire, du potentiel de membrane et de la force proton-motrice de la souche parentale et de la souche Nis-5000 de *P. frisingensis* préparées après 10 min de consommation de glucose (30 mM).**

$$*FPM = \Delta p = F \Delta\Psi - Z \Delta pH$$

Avec  $Z = 2.3 RT/nF = 59 \text{ mV}$  à  $25^\circ\text{C}$  (Rottenberg, 1979).

Polymyxine B $\mu\text{g}/\text{l}$	Temps de latence (h)			
	0	2	5	10
Souche parentale	$6 \pm 1$	$63 \pm 7$	$\geq 72$	–
Souche Nis-5000	$10 \pm 2$	$\geq 72$	–	–

**Tableau 23 : Temps de latence de la souche parentale et de la souche Nis-5000 de *P. frisingensis* en présence de polymyxine B 0, 2, 5 et 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Les cellules ont étéensemencées à raison de  $10^7$  bactéries /ml.**

– Aucune croissance n'a été mesurée.

#### I.4 Caractéristiques physiologiques de la souche résistante

Les paramètres physiologiques (pH interne, volume cellulaire et potentiel de membrane) de la souche parentale de *P. frisingensis* et de la souche résistante à la nisine ont été étudiés afin de déterminer d'éventuelles modifications de ces paramètres chez la souche résistante. Le Tableau 22 indique que la souche parentale et la souche Nis-5000 ont d'une part, des pH internes comparables, proches de la neutralité, et d'autre part un  $\Delta\text{pH}$  ( $\text{pH}_i - \text{pH}_e$ ) de 1,2 pour un pH externe de 6,2. Le potentiel de membrane ( $\Delta\Psi$ ) et la force proton-motrice (FPM) des deux souches sont proches. Cependant, la souche résistante présente un volume deux fois moins important que la souche parentale.

#### I.5 Résistance croisée

La résistance à un antibiotique ou à une bactériocine chez une bactérie pourrait induire la résistance croisée vis à vis d'autres bactériocines et/ou d'autres antibiotiques. Dans ce cadre, nous avons testé la résistance de la souche Nis-5000 à la polymyxine B. Cet antibiotique est de nature cationique et son siège d'action est la membrane cytoplasmique, comme la nisine. De plus, *P. cerevisiophilus*, la souche type du genre *Pectinatus*, est sensible à la polymyxine B. Le phénomène de résistance croisée entre la nisine et la polymyxine B, a donc été étudié par la mise en culture de la souche parentale et de la souche Nis-5000 de *P. frisingensis* en présence de polymyxine B (2, 5 et 10  $\mu\text{g/ml}$ ). Le Tableau 23 montre qu'en présence de la polymyxine B, le temps de latence des deux souches augmente. Il passe ainsi de 6 à 63 heures lorsque la souche parentale est exposée à 2  $\mu\text{g/ml}$  de polymyxine B et de 10 heures à une valeur supérieure à 72 heures pour la souche résistante mise en culture dans les mêmes conditions. Cependant, aucune croissance bactérienne n'est détectée pour la souche résistante mise en culture à de plus fortes concentrations en polymyxine B (5 et 10  $\mu\text{g/ml}$ )

alors que la souche parentale, mise en présence de 5 µg/ml de polymyxine B présente une croissance avec un temps de latence supérieur à 72 heures.

## II. Discussion et conclusion

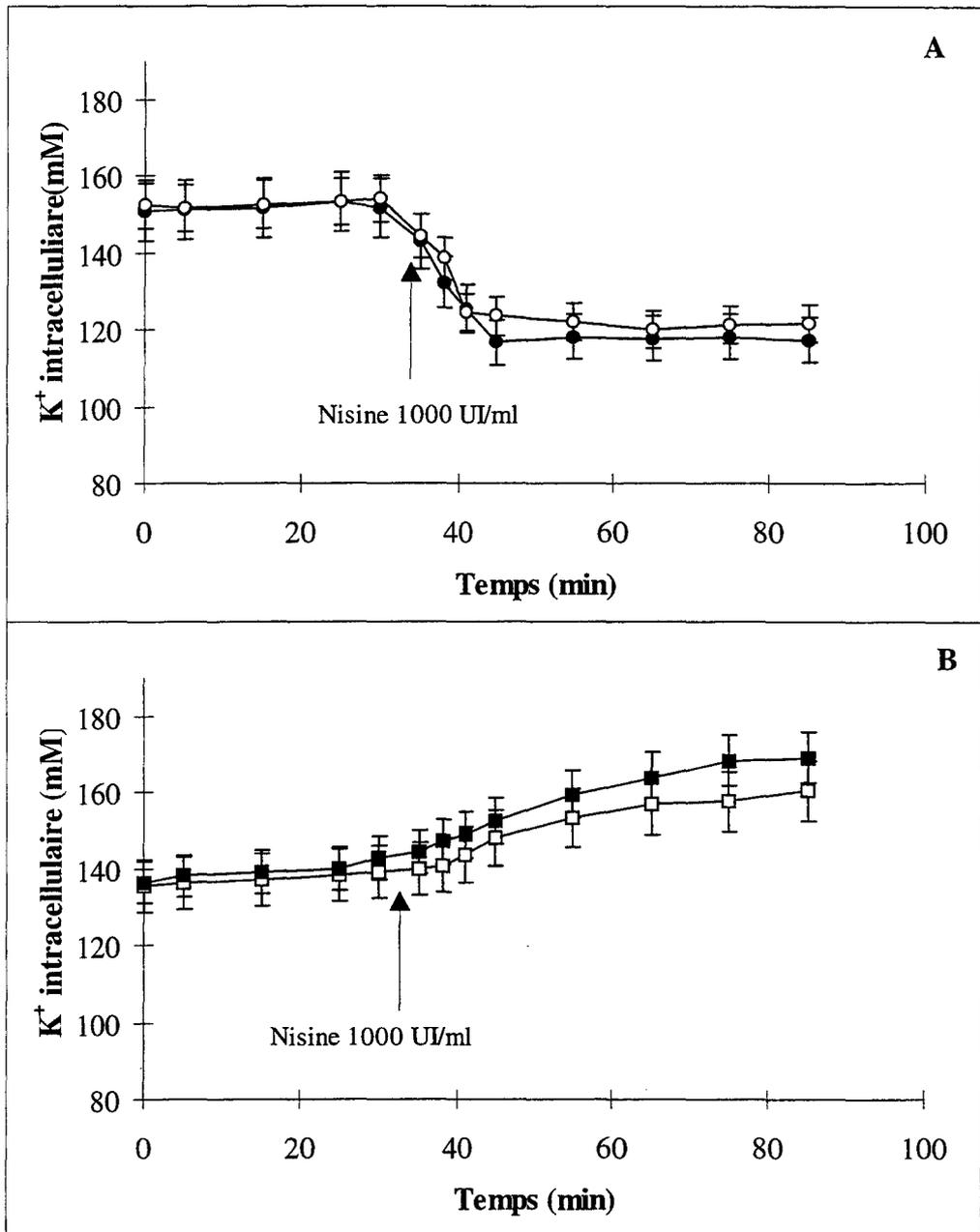
Les résultats présentés montrent que le phénotype de résistance à la nisine de la souche *P. frisingensis* Nis-5000 est stable après 5 repiquages dans un milieu sans nisine. Cependant, après 10 repiquages sur milieu sans nisine, la bactérie perd la capacité de se multiplier dans un milieu en présence de nisine (5000 UI/ml). Ces résultats sont en accord avec ce qui a été décrit par Ming et Daeschel (1993) qui ont montré qu'une souche résistante de *L. monocytogenes* était incapable de se multiplier en présence de nisine (2000 UI/ml) après 3 repiquages dans un milieu sans la bactériocine. La souche Nis-5000 présente un taux de croissance plus faible et un temps de latence plus long que la souche parentale comme cela a été rapporté pour une souche de *L. monocytogenes* (Mazzota et Montville, 1997). Cependant, Verheul *et al.* (1997) ont observé que la souche parentale et qu'une souche résistante à la nisine de *L. monocytogenes* présentaient les mêmes cinétiques de croissance. De plus, la souche Nis-5000 et la souche parentale présentaient un potentiel de membrane et un pH intracellulaire similaires, comme cela a été rapporté pour une souche de *L. monocytogenes* (Crandall et Montville, 1998) pour qui la souche résistante à la nisine et la souche parentale présentaient la même force proton-motrice, montrant que la résistance à la nisine n'est pas accompagnée par des modifications de la bioénergétique de la souche Nis-5000.

Toutes les données qui traitent de la résistance à la nisine sont limitées à la résistance de quelques bactéries à Gram positif comme *L. monocytogenes* et *Clostridium botulinum* (Mazzota et Montville, 1997 ; Mazzota *et al.*, 1997). Les données présentées dans ce travail

sont les premiers résultats décrivant la résistance d'une bactérie à Gram négatif naturellement sensible à la nisine. Chez les bactéries à Gram négatif, les lipopolysaccharides (LPS) jouent un rôle de barrière contre les substances antibactériennes. Les LPS constituent une barrière de nature anionique due aux nombreuses charges négatives du lipide A et du core. Les LPS constituent aussi une barrière compacte dans la mesure où les molécules des LPS sont liées entre elles de manière électrostatique par des cations divalents comme le  $Mg^{2+}$  et le  $Ca^{2+}$  (Vaara, 1992). Les lipopolysaccharides des bactéries appartenant au genre *Pectinatus* ont été complètement caractérisés par Helander *et al.* (1992, 1994). En effet, ils présentent à la fois une prédominance d'acides gras hydroxylés, en particulier, le C13:0 3(OH) et une prédominance de charges positives dues à la présence de 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (Ara4N) dans le lipide A. La résistance à certaines substances antimicrobiennes a été associée à la présence de quantités importantes de Ara4N dans le lipide A (Vaara *et al.*, 1981 ; Helander *et al.*, 1994). Cependant, *P. cerevisiophilus* (Helander *et al.*, 1994) et *P. frisingensis* (nos résultats) sont sensibles à la polymyxine B, probablement à cause de la présence de fractures "cracks" dans la membrane externe qui faciliterait la pénétration de molécules antibactériennes de nature cationique (la polymyxine B) sans qu'elles soient gênées par les lipopolysaccharides (Helander *et al.*, 1994).

Nos travaux ont montré que la résistance à la nisine n'entraînait pas une résistance croisée vis à vis de la polymyxine B contrairement à Crandall et Montville (1997) qui ont montré qu'une souche résistante de *L. monocytogenes* à la nisine était aussi résistante à la gramycidine et la gentamycine. Ceci suggère que la polymyxine B passe à travers la membrane externe, à la fois de la souche parentale et de la souche Nis-5000, et agit sur la membrane cytoplasmique. Ainsi, il est probable que la membrane externe, et en particulier les LPS, n'ont pas été le siège de modifications chez la souche Nis-5000, du fait du rôle

important que jouent ces molécules (LPS) dans les interactions avec la polymyxine B (Vara, 1992). Après avoir isolé la souche résistante à la nisine de *P. frisingensis* (Nis-5000) et étudié la stabilité du phénotype de résistance, nous allons nous intéresser à l'étude des mécanismes de résistance à la nisine chez la souche Nis-5000, à l'implication des lipopolysaccharides et des acides gras membranaires dans ce phénomène.



**Figure 34 :** Effet de l'addition de nisine à 1000 UI/ml sur les teneurs intracellulaires des ions  $K^+$  chez la souche parentale et la souche Nis-5000 de *P. frisingensis* préalablement traitées ou non à l'EDTA 10 mM. A. (●)  $K^+$  chez la souche parentale non traitée à l'EDTA et exposée à 1000 UI/ml de nisine, (○)  $K^+$  chez la souche parentale traitée à l'EDTA et exposée à 1000 UI/ml de nisine. B. (■)  $K^+$  chez la souche Nis-5000 non traitée à l'EDTA et exposée à 1000 UI/ml de nisine, (□)  $K^+$  chez la souche Nis-5000 traitée à l'EDTA et exposée à 1000 UI/ml de nisine.

### III. Implication de l'enveloppe cellulaire de *P. frisingensis* dans la résistance à la nisine

#### III.1.1 Implication des lipopolysaccharides dans la résistance

Les lipopolysaccharides (LPS) sont les premières structures cellulaires en contact avec le milieu extérieur et sont donc des structures que la bactérie peut modifier pour se prémunir contre des substances antibactériennes (Stevens *et al.*, 1992). L'implication des LPS dans le phénomène de résistance à la nisine chez *P. frisingensis* a été étudiée en faisant subir aux bactéries un traitement à l'EDTA (5, 10 et 20 mM). Cet agent chélateur permet la déstabilisation des LPS par piégeage des cations divalents ( $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ) associés à ceux-ci. Afin de mettre en évidence la relation entre la perméabilité de la membrane cytoplasmique et la mort cellulaire occasionnée par la nisine, les flux nets d'ions  $K^+$  intracellulaires ainsi que la viabilité cellulaire ont été mesurés avant et après l'addition de nisine (1000 UI/ml) aux cellules préalablement traitées à l'EDTA (0 et 10 mM). La Figure 34 montre que les bactéries, mises en présence de glucose (30 mM), accumulent du  $K^+$ . Elle montre également que l'addition de la nisine (1000 UI/ml) aux suspensions cellulaires induit une perte immédiate (en moyenne 30 %) de potassium intracellulaire chez la souche parentale, traitée ou non à l'EDTA (Figure 34A). Par contre, l'ajout de nisine à la souche Nis-5000 n'affecte pas les teneurs intracellulaires en ions  $K^+$  (Figure 34B). En effet, les bactéries continuent à accumuler des ions  $K^+$  (+ 50 %) et aucune perte nette de potassium n'est mesurée, que les bactéries aient été, ou non, traitées à l'EDTA (10 mM). Les mêmes résultats ont été obtenus avec 5 et 20 mM d'EDTA.

EDTA mM	Souche parentale (cfu/ml)		Souche Nis-5000 (cfu/ml)	
	0	10	0	10
T0*	$2,5 \times 10^{11}$	$2,8 \times 10^{11}$	$2,4 \times 10^{11}$	$2,7 \times 10^{11}$
T1*	$1,8 \times 10^{10}$	$3,8 \times 10^9$	$2,4 \times 10^{11}$	$2,7 \times 10^{11}$

**Tableau 24 : Dénombrement cellulaire de la souche parentale et la souche Nis-5000 de *P. frisingensis* traitées ou pas à l'EDTA (10 mM) et exposées à l'addition de nisine à une concentration de 1000 UI/ml.**

*\*T0 correspond au dénombrement avant l'addition de nisine 1000 UI/ml.*

*\*T1 correspond au du dénombrement réalisé 20 min après l'addition de la nisine à 1000 UI/ml.*

Le traitement à l'EDTA ne fragilise donc pas les bactéries résistantes. Ces résultats ont été confirmés par des mesures de viabilité cellulaire avant et après addition de nisine (1000 UI/ml). Le Tableau 24 montre qu'après addition de nisine, une réduction de la population de 93 % est obtenue pour la souche parentale et que cette valeur atteint 98,6 % lorsque les bactéries sont traitées à l'EDTA (10 mM). Par contre, aucune réduction de population n'est observée pour la souche résistante après l'addition de la nisine à 1000 UI/ml, que les bactéries aient été, ou non, traitées à l'EDTA (10 mM).

### **III.1.2 Implication des acides gras membranaires dans la résistance.**

La modification de la composition en acides gras membranaires (AGMs) constitue pour les bactéries un moyen de changer leur fluidité membranaire en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent. Plusieurs auteurs ont associé la résistance à des antibiotiques ou à des bactériocines à des changements de la composition en AGMs. Ainsi, l'implication des AGMs dans le phénomène de résistance a été étudiée en déterminant la composition relative en acides gras de la souche parentale et de la souche Nis-5000 cultivée en présence et en absence de nisine (5000 UI/ml). Le test de Scheffe a été utilisé comme test de comparaison des moyennes afin d'examiner la différence entre le profil d'AGMs de la souche parentale et celui de la souche résistante à la nisine (Nis-5000) cultivées en présence ou en absence de la bactériocine (5000 UI/ml). Le seuil significatif a été fixé à un niveau de 5% ( $\alpha = 0.05$ ).

Le Tableau 25 montre que le profil en AGMs de la souche résistante, cultivée en présence ou en absence de nisine (5000 UI/ml) est significativement différent de celui de la souche parentale. Les résultats du test de Scheffe ([annexe 5](#)) montrent que les différences sont

Acides gras <sup>a</sup>	Cellules cultivées sans nisine		Cellules cultivées en présence de nisine
	souche parentale	Nis-5000	Nis-5000
C11:0	11,82 ± 0,40	11,02 ± 0,52	11,53 ± 0,70
C12:0	0,21 ± 0,12	0,24 ± 0,16	0,18 ± 0,17
C13:0	4,83 ± 0,28	5,59 ± 0,32	5,42 ± 0,14
C14:0	0,40 ± 0,07	0,45 ± 0,10	0,55 ± 0,08
C15:0	18,71 ± 0,92	18,18 ± 0,86	21,8 ± 1,02
C16:0	0,19 ± 0,11	0,11 ± 0,16	0,38 ± 0,04
C17:0	2,80 ± 0,13	3,21 ± 0,23	1,83 ± 0,21
C15:1	2,14 ± 0,11	1,37 ± 0,07	1,50 ± 0,31
C16:1	0,80 ± 0,08	1,22 ± 0,15	1,58 ± 0,30
C17:1	11,45 ± 0,98	3,99 ± 0,55	3,89 ± 0,77
C18:cycl	10,53 ± 0,39	20,45 ± 0,88	17,94 ± 1,42
C17:1 DMA <sup>b</sup>	7,20 ± 0,98	1,55 ± 0,27	1,84 ± 0,53
C18:cycl DMA	5,75 ± 1,55	10,3 ± 0,68	10,94 ± 1,53
Autres DMAs	3,28 ± 0,28	3,37 ± 0,19	2,76 ± 0,25
C13:0 (3OH)	1,17 ± 0,08	0,83 ± 0,33	0,77 ± 0,32
Autres	18,71 ± 0,52	18,57 ± 1,15	17,79 ± 1,42
Σ AGMs Saturés <sup>c</sup>	38,96	38,8	41,69
DIS <sup>d</sup>	0,14	0,06	0,07
C17:1 + C18:cycl	21,98	24,44	21,83

**Tableau 25 : Composition d'acides gras membranaires de la souche parentale de *Pectinatus frisigensis* et celle de la souche Nis-5000 cultivée en absence et en présence de nisine 5000 UI/ml**

<sup>a</sup> Chaque valeur est la moyenne de 4 expériences différentes.

<sup>b</sup> DMA est utilisé pour le diméthyle acétal formé par l'hydrolyse de chaîne l'alk-1-enyl des plasmalogènes durant la saponification.

<sup>c</sup> Somme des acides gras saturés (AGMs)

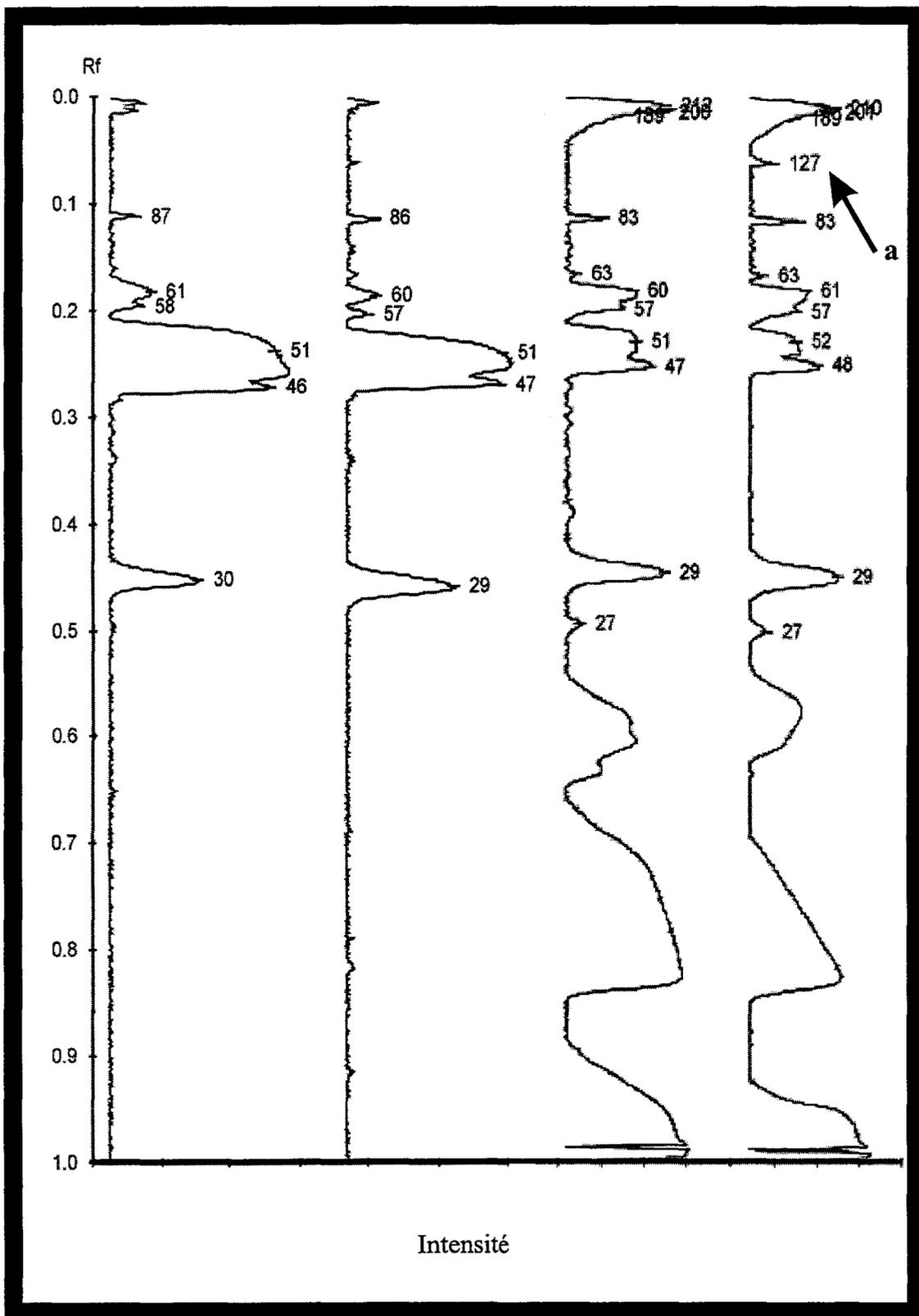
<sup>d</sup> Degré d'insaturation calculé comme  $[\Sigma \text{AGMs insaturés} // 100]$

significatives pour les acides gras suivants : C13:0 ( $P = 0,0007$ ), C15:0 ( $P = 0,0002$ ), C15:1 ( $P = 0,0001$ ), C16:1 ( $P = 0,0001$ ), C17:1 Diméthyle acétal (DMA) ( $P = 0,0001$ ), C17:0 ( $P = 0,0001$ ), C17:1 ( $P = 0,001$ ), C18:cyclopropane DMA ( $P = 0,0001$ ) et C18:cyclopropane ( $P = 0,0001$ ). Ces résultats indiquent que les modifications les plus importantes sont obtenues pour les acides gras à longue chaîne ( $\geq C14$ ) et surtout au niveau du C17:1, du C18:cyclo et des acides gras aldéhydiques (C18:cyclo DMA et C17:1 DMA) (Tableau 25).

La comparaison des degrés d'insaturation des deux souches (Tableau 25) indique que la souche résistante présente un degré d'insaturation deux fois moins important que la souche parentale. Alors que la proportion C17:1 + C18:cyclo est comparable (valeur moyenne de 22,7) pour la souche Nis-5000 cultivée en absence ou en présence de nisine et la souche parentale, le Tableau 25 montre une diminution de 65 % de la proportion de C17:1 et une augmentation de 40% de celle du C18:cyclo pour la souche résistante (Tableau 25).

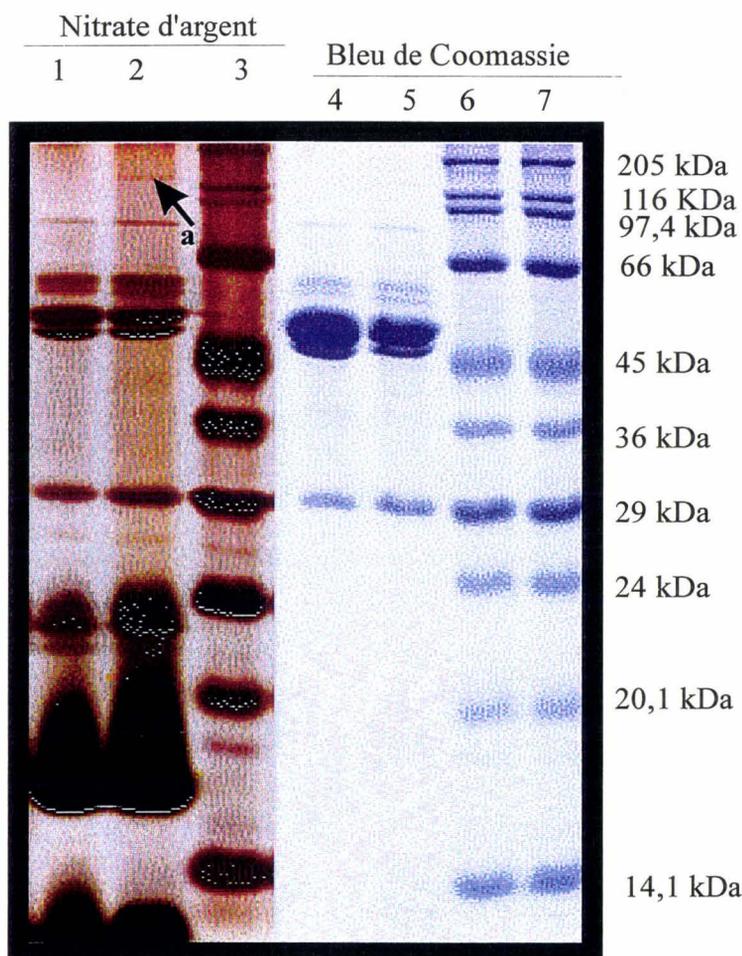
### **III.1.3 Les protéines majoritaires de la membrane externe**

Les protéines jouent un rôle essentiel dans la structure, le transport et la stabilité de la membrane externe. La comparaison des cinétiques de croissance de la souche témoin et de la souche résistante Nis-5000 montre que cette dernière présente un taux de croissance plus faible que la souche parentale. Ainsi, l'implication éventuelle des protéines de la membrane externe dans la résistance à la nisine a été étudiée. Les protéines majoritaires de la membrane externe ont été extraites et séparées par électrophorèse SDS-PAGE. La Figure 35 montre que la majorité des protéines présente des masses moléculaires comprises entre 30 et 100 kDa et que les protéines les plus représentées ont respectivement une masse moléculaire de 51, 46 et 30 kDa. La comparaison des profils électrophorétiques de la souche parentale et de la souche Nis-5000 montre que la souche Nis-5000 ne présente pas la bande correspondant à la protéine



**Figure 36 : Profils densitométriques des protéines majoritaires de la membranes externe de la souche parentale et la souche Nis-5000 des gels présentés dans la figure 35.  
a : protéine de 127 kDa.**

de 127 kDa. La comparaison des profils densitométriques des gels de la souche parentale et de la souche Nis-5000 montre, qu'à part la protéine de 127 kDa, toutes les autres protéines sont représentées de la même manière chez les deux souches (Figure 36).



*Figure 35 : Visualisation des protéines majoritaires de la membrane externe de *P. frisingensis* par une coloration au nitrate d'argent et au bleu de coomassie après une électrophorèse unidimensionnelle sur gel de polyacrylamide. 1 et 4 correspondent à la souche résistante à la nisine. 2 et 5 correspondent à la souche témoin (10  $\mu$ g de protéines déposées sur le gel). 3, 6 et 7 correspondent aux marqueurs de poids moléculaire.*

#### IV. Discussion et conclusion

La sensibilité de la souche Nis-5000 à la polymyxine B suggère qu'il est probable que la membrane externe et en particulier les LPS n'ont pas été le siège de modifications chez la souche Nis-5000. Ainsi, l'implication des LPS dans la résistance à la nisine a été étudiée chez des cellules traitées à l'EDTA. Les résultats montrent que la souche parentale traitée ou non à l'EDTA manifeste une perte de viabilité cellulaire accompagnée d'une sortie d'ions potassium quand les cellules sont exposées à l'addition de nisine. Cependant, ni perte de viabilité ni sortie d'ions potassium ne sont mesurées quand les cellules de la souche Nis-5000 sont exposées à la nisine. Par conséquent, les LPS ne sont probablement pas impliqués dans la résistance à la nisine chez la souche *P. frisingensis* Nis-5000. Ceci suggère que le phénotype de résistance à la nisine pourrait être associé à des modifications de la membrane cellulaire de *P. frisingensis*.

Des travaux précédents ont montré l'implication des modifications de l'enveloppe cellulaire dans la résistance à la nisine de *L. monocytogenes*, et plus particulièrement, des modifications de la composition des acides gras membranaires (Ming et Daeschel, 1993 ; Mazzotta et Montville, 1997). La composition des acides gras membranaires de la souche parentale de *P. frisingensis* en fin de phase exponentielle est comparable à celle décrite par Helander et Haikara (1995). Les différences observées dans les proportions d'acides gras membranaires sont principalement dues à l'utilisation d'un milieu de culture et une méthode d'extraction des acides gras membranaires différents de ceux employés par ces auteurs. L'utilisation de la saponification et la méthanolyse pour l'extraction des acides gras membranaires par Helander et Haikara (1995) est à l'origine des différences entre les proportions de C13:0(3OH) qui représente 26% des acides gras totaux alors que, dans nos

travaux, il ne présente que 1%. En effet, il est reconnu qu'une partie des acides gras hydroxylés sont reliés par des liaisons amide au lipide A des bactéries à Gram négatif (Zähringer *et al.*, 1994). La rupture de ce type de liaisons nécessite des conditions plus drastiques (comme la méthanolyse) que la saponification que nous avons utilisée.

La comparaison du profil d'acides gras de la souche parentale et de la souche Nis-5000 de *P. frisingensis* cultivée en présence ou en absence de nisine (5000 UI/ml) montre que la souche Nis-5000 présente un degré d'insaturation deux fois moins important que la souche parentale, dépendant principalement de la diminution de la proportion du C17:1. Cette diminution du C17:1 est accompagnée par une augmentation de la proportion de C18:cyclopropane provenant vraisemblablement de l'acide gras monoinsaturé (C17:1) par l'addition au niveau de la double liaison d'un groupe méthyle à partir de la S-adenosyl-L-méthionine (Gronan et Cronan, 1997). La diminution de la proportion des acides gras insaturés chez la souche résistante de *P. frisingensis* Nis-5000 a probablement comme effet l'augmentation de la rigidité membranaire comme c'est le cas chez la plupart des bactéries à Gram négatif qui modifient leur fluidité membranaire en ajustant le degré d'insaturation de leurs acides gras membranaires (Russell, 1984 ; Suutari et Laakso, 1994). De même, l'augmentation de la proportion de C18:cyclopropane chez la souche résistante Nis-5000 entraîne aussi l'augmentation de la rigidité membranaire. En effet, l'augmentation de la proportion d'acides gras cyclopropane dans la membrane cellulaire des bactéries est souvent associée à une augmentation de la stabilité de la membrane cellulaire et à l'augmentation de la rigidité, donc à une diminution de la fluidité membranaire, comme cela a été rapporté chez *E. coli* (Dufourc, 1984 ; Dunkley *et al.*, 1991). L'implication de la fluidité membranaire dans la résistance à la nisine a été rapportée pour la première fois par Ming et Daeschel (1993). Ils ont montré que la composition en AGMs de la souche résistante à la nisine était différente de celle

de la souche parentale (sensible à la nisine). La résistance à la nisine a été associée à un pourcentage plus faible d'AGMs ramifiés (C15:0 iso et antéiso, C17:0 iso et antéiso) et un pourcentage d'AGMs à chaîne droite plus important. Des changements similaires ont été rapportés par Mazotta et Montville (1997) qui ont observé, chez une souche résistante de *L. monocytogenes*, une diminution des acides gras à courte chaîne, une augmentation des acides gras à longue chaîne et une diminution du rapport C15/C17.

Pour répondre à une interrogation de Ming et Daeschel (1993) concernant les changements de la composition en acides gras membranaires observés chez les souches résistantes de *L. monocytogenes* en réponse à une adaptation générale aux conditions défavorables de croissance en présence de nisine ou à l'existence d'une réponse spécifique à la nisine, nos résultats, montrent que le changement de la fluidité membranaire constitue une modification phénotypique de réponse à la nisine. Cependant, chaque bactérie en fonction de son métabolisme et de son patrimoine génétique, fait appel à l'un ou l'autre acide gras pour rendre sa membrane plus rigide et mieux résister à la nisine. Ainsi on peut avancer que parmi les mécanismes de résistance à la nisine, le changement de la fluidité membranaire constitue l'un des mécanismes de résistance à la nisine, représentant plus un mécanisme d'adaptation générale aux conditions défavorables qu'un mécanisme spécifique de réponse à la nisine.

La comparaison des profils protéiques de la souche résistante et de la souche Nis-5000 montre des différences qualitatives. Cependant, ces résultats restent des résultats préliminaires. L'utilisation d'une autre méthode d'extraction permettra de vérifier ces résultats. La purification de la protéine de 127 kDa, ainsi que l'étude de sa fonction permettra de comprendre la relation entre la résistance à la nisine et d'éventuelles modifications des protéines de la membrane externe.

## ***CONCLUSION ET PERSPECTIVES***

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Ces vingt dernières années les bactéries anaérobies strictes de contamination ont fait leur apparition dans l'industrie brassicole. L'observation simultanée dans différents pays de bières contaminées par les bactéries appartenant au genre *Pectinatus* peut être expliquée par les nouvelles techniques brassicoles qui ont permis la diminution de la quantité d'oxygène dissous dans la bière. Bien que les cas de contamination de la bière en bouteille par *Pectinatus spp.* soient en nette progression (Lee, 1994), son mode de contamination de la boisson est encore mal connu (Jespersen et Jackobsen, 1996).

L'étude réalisée au cours de ce travail a permis d'établir un certain nombre de connaissances concernant la réponse physiologique de *Pectinatus frisingensis* exposée à différentes conditions hostiles. Notre objectif était de caractériser l'effet :

- de traitement thermique froid sur l'homéostasie cellulaire, effet peu ou pas décrit dans la littérature
- de la nisine seule ou combinée avec d'autres facteurs sur *P. frisingensis*
- de l'addition répétée de nisine sur la sélection d'une souche résistante et de caractériser le mécanisme de résistance à la bactériocine

Les ions potassium sont impliqués dans certaines fonctions vitales de la cellule, et ce cation a donc été choisi comme marqueur cellulaire pour l'étude de la réponse homéostatique de *P. frisingensis* en conditions de stress. Cette approche constitue une méthode complémentaire à celle classiquement utilisée de recherche des protéines de stress, dans la mesure où elle permet de comprendre la relation entre l'environnement cytoplasmique de la bactérie et l'expression de protéines de stress. Ainsi, nous avons tout d'abord caractérisé les

mouvements des ions  $K^+$  chez les cellules de *P. frisingensis*. Les cellules de *P. frisingensis* maintenues en état de privation nutritionnelle perdent une partie de leur potassium intracellulaire, alors que l'addition de glucose permet à la bactérie d'accumuler du potassium. L'utilisation du découplant DCCD et le protonophore CCCP a montré que les entrées des ions potassium chez *P. frisingensis* nécessitent une source d'énergie, l'hydrolyse d'ATP et le maintien du gradient de protons de part et d'autre de la membrane cellulaire de la bactérie. Ce système de transport de potassium présente des caractéristiques communes avec le système KtrI décrit chez *Enterococcus hirae* (Kakinuma, 1993). En effet, le système KtrI d'entrée des ions potassium nécessite à la fois la présence d'une source d'énergie et un gradient de proton de part et d'autre de la membrane d'*Enterococcus hirae*.

Les sorties d'ions potassium mesurées après un traitement froid des cellules sont accompagnées par une entrée de protons. Le même phénomène a été décrit chez *Esherichia coli* après un choc hypo-osmotique (Berrier *et al.*, 1992 ; Schleyer *et al.*, 1994). Ces sorties d'ions potassium se font plus probablement à travers un système de type symport qu'à travers des canaux mécono-sensitifs, dans la mesure où les ions gadolinium décrits comme étant des cations qui inhibent ou affaiblissent l'activité de ce type de canaux, n'ont aucun effet sur les sorties des ions  $K^+$  mesurées après un stress froid. La réincubation à 30°C des bactéries métabolisant le glucose après un stress froid, permet aux cellules de rétablir le gradient d'ions potassium. Par contre, les cellules en privation nutritionnelle perdent une partie de leur potassium intracellulaire et sont incapables de rétablir leur gradient de potassium quelle que soit la température d'incubations des suspensions cellulaires.

*P. frisingensis*, contrairement à la plus part des autres bactéries à Gram négatif, est sensible à la nisine. La croissance de la bactérie est perturbée par la présence de la

bactériocine à partir de 500 UI/ml pour une charge bactérienne de  $10^7$  cellules/ml. L'utilisation de la souche d'*Escherichia coli* ATCC 10536 nous a permis de confirmer la sensibilité surprenante de *P. frisingensis* à la nisine. Aux mêmes concentrations bactériennes, les ajouts de nisine allant de 100 à 500 UI/ml perturbent la perméabilité de la membrane cytoplasmique sans mortalité cellulaire, ce qui entraîne des sorties d'ions potassium. Cependant, l'addition aux cellules de *P. frisingensis* des concentrations de nisine relativement élevées (1000 UI/ml) provoque des sorties d'ions potassium accompagnées par une mortalité cellulaire. Ainsi, à des concentrations relativement faibles la nisine provoque des perturbations transitoires de l'homéostasie cellulaire alors qu'à des concentrations élevées la nisine provoque des perturbations de l'homéostasie cellulaire qui sont accompagnées par une mortalité cellulaire. L'étude de l'effet combiné de la nisine et des traitements thermiques froid (2°C) ou chaud (50°C) à pH 6,2 ou 4,0 en présence de glucose montre qu'une concentration de nisine de 500 UI/ml combinée à un traitement thermique modéré de 50°C et un pH de 4,0 est nécessaire pour empêcher la bactérie de restaurer son homéostasie cellulaire. Ce résultat s'inscrit dans le cadre de la théorie des barrières. Ainsi, l'utilisation de nisine comme moyen de stabilisation dans la bière permettrait une diminution de la durée ou de l'intensité du traitement thermique, ce qui augmenterait les qualités organoleptiques du produit : certains effets secondaires de la pasteurisation ou de la flash pasteurisation comme la réaction de Maillard seraient évités, tout en garantissant la stabilité biologique de la bière.

Enfin nous avons isolé une souche résistante de *P. frisingensis* (Nis-5000) à une concentration élevée de nisine (5000 UI/ml). Le phénotype de résistance de la souche Nis-5000 est stable pendant 5 repiquages sur un milieu sans nisine. Cependant la bactérie perd son caractère de résistance après 10 repiquages sur milieu sans nisine. La souche Nis-5000

présente un potentiel de membrane et un pH intracellulaire comparable à celui de la souche parentale. Cependant, elle présente un volume cellulaire deux fois moins important que la souche parentale. L'étude de la résistance de la souche Nis-5000 à la nisine a montré que les lipopolysachharides ne sont vraisemblablement pas impliqués dans ce phénomène, et que la modification de la fluidité membranaire semble être le mécanisme principal impliqué dans la résistance de la souche Nis-5000 de *P. frisingensis*. Cependant, l'utilisation régulière de la nisine comme agent de stabilisation de la bière pourrait aussi présenter l'inconvénient de sélectionner des souches résistantes, ce qui pourrait remettre en cause l'utilisation de la bactériocine en industrie brassicole. La sensibilité de *P. frisingensis* à la nisine conforte l'idée de Ogden et Tubb suggérant l'utilisation de la nisine dans la stabilisation des bières non pasteurisées. Cependant, la sélection de souches résistantes à la nisine impose une utilisation rigoureuse de ce produit et une combinaison à d'autres facteurs de stabilisation comme les traitements thermiques utilisés à plus faible intensité.

Dans ce travail tous les résultats ont été obtenus sur un milieu modèle (milieu synthétique). Ainsi nous avons certainement sous-estimé l'effet de certains facteurs ou surestimé l'effet d'autres conditions. Une approche identique sur la bière pourrait compléter ces résultats et conforter ou non l'idée de l'utilisation de la nisine dans la stabilisation de la bière. La présence d'autres substances antibactériennes (les extraits de houblon et la présence d'éthanol) dans la bière pourrait également avoir un effet synergique avec celui de la nisine. Enfin, l'étude de la structure membranaire (lipopolysachharides, lipides, protéines) de *P. frisingensis* permettrait une meilleure compréhension de la sensibilité de la bactérie à la nisine.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Abee, T., Rombouts, F.M., Hugenholtz, J., Guihard, G. et Letellier, L. (1994). Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 1962-1968.
- Abee, T. (1995). Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **129** : 1-10.
- Abee, T., Krockel, L. et Hill, C. (1995). Bacteriocins : modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* **28** : 169-185.
- Achouak, W., Pages, J.M., De Mot, R., Molle, G. et Heulin, T. (1998). A major outer membrane protein of *Rahnella aquatilis* functions as a porin and root adhesin. *J. Bacteriol.* **180** : 909-913.
- Allan, B., Linseman, M., MacDonald, L., Lam, J. et Kropinski, A. (1988). Heat-shock response of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **170** : 3668-3674.
- Allen, S.G.H., Kellermeyer, R.W., Stjernholm, R.L. et Wood, H.G. (1964). Purification and properties of enzymes involved in the propionic acid fermentation. *J. Bacteriol.* **87** : 171-187.
- Arnosti, D., Singer, V. et Chamberlin, M. (1986). Characterization of heat shock in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **168** : 1243-1249.
- Atkinson, D.E. (1968). The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry.* **7** : 4030-4034.

- Back, W., Weiss, N. et Seidel, H.** (1979). Isolierung und systematische Zuordnung bierschädlicher gramnegativer Bakterien. II: Gramnegative anaerobe Stäbchen/Anhang: Aus Bier isolierte gramnegative fakultativ Stäbchen. *Brauwissenschaft*. **32** : 233-238.
- Back, W.** (1981). Bedeutung der Mikrokokken als Bierschaedling. *Brauwissenschaft*. **34** : 109-114.
- Back, W., Leibhard, M. et Bohak, I.** (1992). Flash pasteurization-membrane filtration comparative biological safety. *Brauwelt. Int.* **1** : 42-49.
- Bakker, E.P. et Harold, F.M.** (1980). Energy coupling to potassium transport in *Streptococcus faecalis* interplay of ATP and the proton motive force. *J. Biol. Chem.* **255** : 433-440.
- Bakker, E.P. et Mangerich, W.E.** (1982). N-ethylmaleimide induces  $K^+$ - $H^+$  antiport activity in *Escherichia coli* K-12. *FEBS Lett.* **140** :177-180.
- Bakker, E.P., Borchard, A., Michels, M., Altendorf, K. et Siebers, A.** (1987). High-affinity potassium uptake system in *Bacillus acidocaldarius* showing immunological cross-reactivity with the Kdp system from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169** : 4342-4348.
- Bakker, E. P.** (1993a). Cell  $K^+$  and  $K^+$  transport systems in prokaryotes. Dans : *Alkali Cation Transport Systems in Prokaryotes*. Bakker E. P. (ed). CRC Press, Boca Raton. pp. 205-224.

- Bakker, E.P.** (1993b). Low-affinity K<sup>+</sup> uptake systems. *Dans : Alkali Cation Transport Systems in Prokaryotes*. Bakker E. P. (ed). CRC Press, Boca Raton. pp. 253-276.
- Barber, R.S., Braude, R. et Hirsch, A.** (1952). Growth of pigs given skim milk soured with nisin-producing *streptococci*. *Nature*. **169** : 200.
- Baronofsky, J.J., Schreurs, W.J.A. et Kashket, E.R.** (1984). Uncoupling by acetic acid limits growth and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48** : 1134-1139.
- Berrier, C., Coulombe, A., Szabo, I., Zoratti, M. et Ghazi, A.** (1992). Gadolinium ion inhibits loss of metabolites induced by osmotic shock and large stretch-activated channels in bacteria. *Eur. J. Biochem.* **206** : 559-565.
- Booth, I.R., Mitchell, W.J. et Hamilton, W.A.** (1979). Quantitative analysis of proton-linked transport systems the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **182** : 687-696.
- Booth, I.R.** (1985). Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* **49** : 359-378.
- Booth, I.R., Douglas, R.M., Ferguson, .G.P., Lamb, A.J., Munro, A.W. et Ritchie, G.Y.** (1993). K<sup>+</sup> efflux systems. *Dans : Alkali Cations Transport Systems in Prokaryotes*. Bakker E.P. (ed). CRC Press, Boca Raton. pp. 291-308.
- Brissonnet, F., Bouix, M., Loiseau, G., Russel, A. et Leveau, J.Y.** (1993). Le stress bactérien et ses conséquences en génie de l'hygiène. *Ind. Agro. Alim.* **111** : 106-114.

- Buncic, S., Fitzgerald, C. M., Bell, R. G. et Hudson, J. A.** (1995). Individual and combined listericidal effects of sodium lactate, potassium sorbate, nisin and curing salts at refrigeration temperature. *J. Food Safety*. **15** : 247-264.
- Buurman, Ed. T., Joost Teixeira de Mattos, M. et Neijssel, O.M.** (1993). Futile cycling of  $K^+$  and  $NH_4^+$  ions in *Escherichia coli*. Dans : *Alkali Cations Transport Systems in Prokaryotes*. Bakker, E.P. (ed). CRC Press, Boca Raton. pp. 411-426.
- Claypool, L., Heinemann, B., Voris, L. et Stumbo, C.R.** (1966). Residence time of nisin in the oral cavity following consumption of chocolate milk containing nisin. *J. Dairy Sci.* **49** : 314-316.
- Crandall, A. D. et Montville, T.J.** (1998). Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 231-237.
- Chowdhury, I., Watier, D. et Hornez, J.P.** (1995). Variability in survival of *Pectinatus cerevisiiphilus*, strictly anaerobic bacterium, under different oxygen conditions. *Anaerobe.* **1** : 151-156.
- Crescentini, G. et Stocchi, V.** (1984). Fast reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of nucleotides in red blood cells. *J. Chromato.* **290** : 393-399.
- Davies, E. A., Falahee, M.B. et Adams, M.R.** (1996). Involvement in the cell envelope of *Listeria monocytogenes* in the acquisition of nisin resistance. *J. Appl. Bacteriol.* **81** : 139-146.

- Delves-Broughton, J.** (1990). Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* **44** : 100-113.
- De Vuyst, L.** (1994). Bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. Dans : *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. De Vuyst, L. et Vandamme, E.J. (eds). Balackie Academic and Professional, Glasgow. pp. 143-149.
- De Vuyst, L. et Vandamme, E.J.** (1994). Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. Dans : *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. De Vuyst, L. et Vandamme, E.J. (eds). Balackie Academic and Professional, Glasgow. pp. 151-221.
- Dibrov, P.A., Lazarova, R.L., Skulachev, V.P. et Verkhovskaya, M.L.** (1986). The sodium cycle. II. Na<sup>+</sup>-coupled oxidative phosphorylation in *Vibrio alginolyticus* cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **850** : 458-465.
- Dimroth, P. et Thomer, A.** (1986). Citrate transport in *Klebsiella pneumoniae*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* **367** : 813-23
- Dimroth, P.** (1987). Sodium ion transport decarboxylases and other aspects of sodium ion cycling in bacteria. *Microbiol. Rev.* **51** : 320-340.
- Dimroth, P.** (1980). A new sodium transport system energized by decarboxylation of oxaloacetate. *FEBS Lett.* **122** : 234-236.
- Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R. et Bakker, E.P.** (1988). Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of

growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations.

*Arch. Microbiol.* **150** : 348-357.

**Driessen, A.J., van den Hooven, H.W., Kuiper, W., van de Kamp, M., Sahl, H.G.,**

**Konings, R.N. et Konings, W.N.** (1995). Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry.* **34** : 1606-1614.

**Dufourc, E.J., Smith, I.C.P. et Jarrell, H.** (1984). Role of cyclopropane moieties in the

lipid properties of biological membranes : a <sup>2</sup>H NMR structural and dynamical approach. *Biochemistry.* **23** : 2300-2309.

**Dunkley, E.A., Guffanti, A.A., Clejan, S. et Krulwich, T.A.** (1991). Facultative

alkaliphiles lack fatty acid desaturase activity and lose the ability to grow at near-neutral pH when supplemented an unsaturated fatty acid. *J. Bacteriol.* **173** : 6896-6902.

**Epstein, W. et Davies, M.** (1970). Potassium-dependant mutants of *Escherichia coli* K-12.

*J. Bacteriol.* **101** : 836-843.

**Epstein, W. et Kim, B.S.** (1971). Potassium transport loci in *Escherichia coli* K-12. *J.*

*Bacteriol.* **108** : 639-643.

**Epstein, W., Whitelaw, V. et Hesse, J.** (1978). A K<sup>+</sup> transport ATPase in *Escherichia*

*coli.* *J. Biol. Chem.* **253** : 6666-6668.

**Epstein, W.** (1986). Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli.* *FEMS.*

*Microbiol. Rev.* **39** : 73-78.

- Evans, C.T., Sumegi, B., Srere, P.A., Sherry, A.D. et Malloy, C.R. (1993). [<sup>13</sup>C]Propionate oxidation in wild-type and citrate synthase mutant *Escherichia coli* : evidence for multiple pathway of propionate utilization. *Biochem. J.* **291** : 927-932.
- Fillaudeau, L. (1998). Microfiltration tangentielle de la bière de garde sur des membranes ceramiques multicanaux. Thèse de doctorat. Université de Technologie de Compiègne. France.
- Frazier, W.C. et Westhoff, D. C. (1978). Food fermentation. *Dans : Food microbiology.* Vastyan, J.E., Bradley, J.W. (eds). McGraw-Hill Book Company, New York. pp. 341-397.
- Futai, M. et Tsuchiya, T. (1987). Proton transport and proton-motive force in prokaryotic cells. *Dans : Ion transport in prokaryotes*, (eds) Rosen, B.P. et Silver, S. Academic Press, San Diego. pp. 3-83.
- Gratia, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre souches de colibacille. *C. R. Soc. Biol.* **93** : 1040-1041.
- Gould, G.W. (1995). Overview. *Dans : New methods of food preservation.* Gould G.W. (ed). Capman & Hall, London. pp. xiv-xix.
- Gowans, J.L. Smith, N. et Florey, H.W. (1952). Some properties of nisin. *Brit. J. Pharmacol. Chemother.* **7** : 438-449.
- Gragerov, A., Nudler, E., Komissarova, N., Gaitanaris, G.A., Gottesman, M.E. et Nikiforov, V. (1992). Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock

- proteins in preventing protein misfolding in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89** : 10341-10344.
- Grogan, D.W. et Cronan Jr, J.E.** (1997). Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61** : 429-441.
- Gross, E.** (1977).  $\alpha$ ,  $\beta$ -Unsaturated and related amino acids in peptides and proteins. Dans : *Protein Cross-Linking*. Friedmann, F. (ed). Plenum Press, New York. pp. 131-153.
- Guffanti, A.A., Cohn, D.E., Kaback, H.R. et Krulwich, T.A.** (1981). Relationship between the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter and  $\text{Na}^+$ /substrate symport in *Bacillus alcalophilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **78** : 1481-1484.
- Haikara, A., Enari, T.M. et Lounatmaa, K.** (1981). The genus *Pectinatus*, a new group of anaerobic beer spoilage bacteria. *Eur. Brewery Conv. Proc. Int. Congr.* **24** : 229-240.
- Heefner, D.L. et Harold, F.M.** (1982). ATP-driven sodium pump in *Streptococcus faecalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **79** : 470-478.
- Heinemann, B. et Williams, R.** (1966). The inactivation of nisin by pancreatin. *J. Dairy Sci.* **49** : 312-313.
- Helander, I.M., Hurme, R., Haikara, A. et Moran, A.P.** (1992). Separation and characterisation of two chemically distinct lipopolysaccharides in two *Pectinatus* species. *J. Bacteriol.* **174** : 3348-3354.

- Helander, I.M., Kilpelainen, I., Vaara, M., Moran, A.P., Lindner, B. et Seydel, U.** (1994). Chemical structure of the lipid A component of lipopolysaccharides of the genus *Pectinatus*. *Eur. J. Biochem.* **224** : 63-70.
- Helander, I.M. et Haikara, A.** (1995). Cellular fatty acyl and alkenyl residues in *Megasphaera* and *Pectinatus* species : contrasting profiles and detection of beer spoilage. *Microbiol.* **141** : 1131-1137.
- Henriksson, E. et Haikara, A.** (1991). Airborne microorganisms in brewery filling area and their effect on microbiological stability of beer. *Monatsschr. für Brauwissens.* **1** : 4-8.
- Hill, C.** (1995). Bacteriocins : natural antimicrobials from microorganisms. *Dans : New methods of food preservation.* Gould G.W. (ed). Chapman & Hall, London. pp. 22-39.
- Hilpert, W. et Dimroth, P.** (1983). Purification and characterization of a new sodium-transport decarboxylase. Methylmalonyl-CoA decarboxylase from *Veillonella alcalescens*. *Eur. J. Biochem.* **132** : 579-587.
- Hilpert, W., Schink B. et Dimroth, P.** (1984). Life by a new decarboxylation-dependant energy conservation mechanism with Na<sup>+</sup> as coupling ion. *EMBO J.* **3** : 1665-1670.
- Hough, J.S., Briggs, D.E., Stevens, R. et Young, T.W.** (1982a). Hops. *Dans : Malting and brewing Science.* Vol.2 Hopped Wort and Beer. Hough, J.S., Briggs, D.E., Stevens, R. et Young, T.W. (eds). Chapman and Hall, London. pp. 389-420.

- Hough, J.S., Briggs, D.E., Stevens, R. et Young, T.W.** (1982b). Beer treatment. Dans : *Malting and brewing Science*. Vol.2 Hopped Wort and Beer. (eds) Hough, J.S., Briggs, D.E., Stevens, R. et Young, T.W. Chapman and Hall, London. pp : 687-739.
- Hsu, S.T. et Yet, S.T.** (1991). Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidipropionici* : effects of pH. *Biotechnol. Bioeng.* **38** : 571-578.
- Huot, E., Barrena-Gonzalez, C. et Petitdemange, H.** (1996). Comparative effectiveness of nisin and bacteriocin J46 at different pH values. *Lett. Appl. Microbiol.* **22** : 76-79.
- Hurst, A. et Kruse, H.** (1972). Effect of secondary metabolites on the organisms producing them : effect of nisin on *Streptococcus lactis* and enterotoxin B on *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1** : 277-279.
- Hurst, A.** (1981). Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.* **27** : 85-123.
- Jack, R. W., Tagg, J. R. et Ray, B.** (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59** : 171-200.
- Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, A. et Wollman, E.** (1953). Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Annales Instit. Pasteur, Paris.* **84** : 222-224.
- Jarvis, B.** (1967). Resistance to nisin and production of nisin-inactivating enzymes by several *Bacillus* species. *J. Gen. Microbiol.* **47** : 33-48.
- Jarvis, B. et Mahoney, R.R.** (1969). Inactivation of nisin by alpha-chymotrypsin. *J. Dairy Sci.* **52** :1448-1450.

- Jarvis, B. et J. Farr.** (1971). Partial purification, specificity and mechanism of the nisin-inactivating enzyme from *Bacillus cereus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **227** : 232-240.
- Jayakumar, A., Epstein, W. et Barnes, E.M.** (1985). Characterization of ammonium (methylammonium) potassium antiport in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **260** :7528-7532.
- Jespersen, L. et Jakobsen, M.** (1996). Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int. J. Food Microbiol.* **33** : 139-155.
- Jones, P.G., VanBogelen, R.A. et Neidhardt, F.C.** (1987). Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169** : 2092-2095
- Kakinuma, Y.** (1993). K<sup>+</sup> transport in *Enterococcus hirae*. Dans : *Alkali Cation Transport Systems in Prokaryotes*. Bakker E. P. (ed). CRC Press, Boca Raton. pp. 278-290.
- Kalchayanand, N., Hanlin, M. B. et Ray, B.** (1992). Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.* **15** : 219-243.
- Kashket, E.R.** (1985). The proton motive force in bacteria : assessment of methods. *Ann. Rev. Microbiol.* **39** : 819-242.
- Kitada, M., Guffani, A.A. et Krulwich T.A.** (1982) Bioenergetic properties and viability of alkalophilic *Bacillus firmus* as a function of pH and Na<sup>+</sup> contents of the incubation medium. *J. Bacteriol.* **152** : 1096-1104.

- Klaenhammer, T.R.** (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12** : 39-85.
- Klugbauer, N., Ludwig, W., Bäuerlein, E. et Schleifer, K.H.** (1992). Subunit  $\beta$  of adenosine triphosphate synthase of *Pectinatus frisingensis* and *Lactobacillus casei*. *System. Appl. Microbiol.* **15** : 323-330.
- Kroll, R. G., et Both. I. R.** (1981). The role of potassium transport in the generation of a pH gradient in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **198** : 691-698.
- Krulwich, T.A. et Guffanti, A.A.** (1983). Physiology of acidophilic and alkalophilic bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* **24** : 173-214.
- Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., Siezen, R.J. et De Vos, W.M.** (1993). Characterization of the nisin gene cluster nisABTCIPR of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the nisA and nisI genes for development of immunity. *Eur. J. Biochem.* **216** : 281-91.
- Lang, F., Busch, G.L., Völkl, H. et Häussinger, D.** (1995). Cell volume : a second message in regulation of cellular function. *Int. Union Physiol. Sci.* **10** : 18-22.
- Larpent, J.P. et Larpent-Gourgaud, M.** (1990). Microorganismes utiles. Dans : *Mémento technique de microbiologie*. Larpent, J.P. et Larpent -Gourgaud, M. (eds). Technique & Documentation-Lavoisier, Paris. pp. 309-368.
- Lawrence, D.R. et Priest, F. G.** (1981). Identification of brewery cocci. *Proc. Eur. Brew. Conv.* 217-227.

- Lawrence, D.R.** (1988). Spoilage organisms in beer. *Dans : Developments in food microbiology*. Robinson, R.K. (ed). Elsevier, London. pp. 1-48.
- Lee, S.Y., Mabee, M.S. et Jangaard, N.O.** (1978). *Pectinatus*, a new genus of the family *Bacteroidaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28** : 582-594.
- Lee, S.Y. Mabee, M.S. et Jangaard, N.O. et Horiuchi, E.K.** (1980). *Pectinatus*, a new genus of bacteria capable of growth in hopped beer. *J. Inst. Brew.* **86** : 28-30.
- Lee, S.Y.** (1994). SMMP-A medium for selective isolation of *Megasphaera* and *Pectinatus* from the brewery. *Am. Soc. Brew. Chem. J.* **52** : 15-119.
- Lewis, M.J. et Young, T.W.** (1996). Microbiology and microbial contaminants of brewing. *Dans : Brewing*. Lewis, M.J. et Young, T.W. (eds). Chapman and Hall, London. pp. 191-210.
- Leistner, L.** (1995) Principles and applications of hurdle technology. *Dans : New methods of food preservation*. Gould G.W. (ed). Chapman & Hall, London. pp. 1-21.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. et Randal. R.J.** (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **163** : 265-275.
- Lindquist, S. et Craig, E.A.** (1988). The heat shock response. *Ann. rev. Genet.* **22** : 631-677.
- Liu, W. et Hansen, J.** (1990). Some chemicals and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** : 2551-2558.

- Macy, J.M., Ljungdahl L.G. et Gottschlk, G.** (1978). Pathway of succinate and propionate formation in *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* **134** : 84-91.
- Mager, W.H. et De Kruijff, A.J.J.** (1995). Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol. Rev.* **59** : 506-531.
- Maisnier-Patin, S., Tatini, S.R. et Richard, J.** (1995). Combined effect of nisin and moderate heat on destruction of *Listeria monocytogenes* in milk. *Lait.* **75** : 81-91.
- Maisnier-Patin, S. et J. Richard.** 1996. Cell wall changes in nisin-resistant variants of *Listeria innocua* grown in the presence of high nisin concentration. *FEMS Microbiol. Lett.* **140** : 29-35.
- Mathot, A.G., Beliard, E. et Thuault, D.** (1996). Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques. *Dans : Microbiologie alimentaire* Vol2. Bourgeois, C.M., Larpent, J.P. (eds). Lavoisier, Paris. pp. 432-447.
- Matsuzaki, M., Sugishita K. I. Harada, M. Fujii, N. et Miyajima, K.** (1997). Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer et inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1327** : 119-130.
- Mattick, A.T.R. et Hirsch, A.** (1944). A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. *Nature.* **154** : 551.
- Mattick, A.T.R. et Hirsch, A.** (1947). Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet.* **2** : 5-7.

- Mazzota, A.S. et Montville, T.J.** (1997). Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin resistant strains at 10°C and 30°C. *J. Appl. Microbiol.* **82** : 23-28.
- Mazzotta, A.S., Crandall A. D. et Montville, T. J.** (1997). Nisin resistance in *Clostridium botulinum* spores and vegetative cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 2654-2659.
- McGovern , V. et Oliver, J.** (1995). Induction of cold-responsive proteins in *Vibrio vulnificus*. *J. Bacteriol.* **177** : 4131-4133.
- McKay, L.L.** (1983). Functional properties of plasmids in lactic *streptococci*. *Anton. Leeuwen.* **49** : 259-274.
- McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman, E.T. et Epstein, W.** (1994). Interdependence of K<sup>+</sup> and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269** : 1911-1917.
- Miller, T.L. et Wolin, M.J.** (1974). A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.* **27** : 985-987.
- Miller, L. et Berger, T.** (1985). Bacteria identification by Gas chromatography of whole cell fatty acids. Hewlett Packard. Note d'application . pp. 228-241.
- Ming, X. et Daeschel, M. A.** (1993). Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Protect.* **56** : 944-946.

- Ming, X. et Daeschel, M.A.** (1994). Correlation of cellular phospholipid content with nisin resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Protect.* **58** : 416-420.
- Miguelz, E. et Gilmour, D.J.** (1994). Regulation of cell volume in the salt tolerant bacterium *Halomonas elongata*. *Lett. Appl. Bacteriol.* **19** : 363-365.
- Mitchell, P.** (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature.* **191** : 144-148.
- Moll, M.** (1991). Composition et propriétés de la bière. *Dans* : Bière & coolers. Techniques and Documentation Lavoisier (ed), Paris. pp. 264-267.
- Moll, G.N., Clark, J., Chan, W.C., Bycroft, B.W., Roberts, G.C., Konings, W.N. et Driessen, A.J.** (1997). Role of transmembrane pH gradient and membrane binding in nisin pore formation. *J. Bacteriol.* **179** : 135-140.
- Neidhardt, F et Van Bogelen, R.** (1987). Heat shock response. *Dans* : *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : cellular and molecular biology. Neidhardt, F., Low, H.L., Magasanik, B., Schaechter, M. et Umbrger, H.E. (eds). American Society of Microbiology, Washington. pp : 1334-1345.
- Ogden, K. et Tubb, R. S.** (1985). Inhibition of beer-spoilage lactic acid bacteria by nisin. *J. Inst. Brew.* **91** : 390-392.
- Ogden, K.** (1986). Nisin : a bacteriocin with a potential use in brewing. *J. Inst. Brew.* **92** : 379-383.

- Ogden, K. et Waites, M.J. (1986). The action of nisin on beer-spoilage lactic acid bacteria. *J. Int. Brew.* **92** : 463-467.
- Ogden, K. (1987). Cleansing contaminated pitching yeast with nisin. *J. Inst. Brew.* **93** : 302-307.
- Ogden, K., Waites, M.J. et Hammond, J.R.M. (1988). Nisin and brewing. *J. Inst. Brew.* **94** : 233-238.
- Ojcius, D.M. et Young, J.D. (1991). Cytolytic pore-forming proteins and peptides : is there a common structural motif ? *Trends Biochem. Sci.* **16** : 225-229.
- Padan, E. et Schuldiner, S. (1993). Na<sup>+</sup> transport systems in prokaryotes. Dans : *Alkali Cation Transport Systems in Prokaryotes*. Bakker, E.P. (ed). CRC Press, Boca Raton. pp. 3-24.
- Panoff, J.M., Thammavongs, B., Auffray, Y. et Boutibonnes, P. (1995). La réponse au stress hypothermique chez les bactéries mésophiles. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **10** : 7-11.
- Pasteur, L. (1879). Etudes sur la bière, ses maladies, causes qui les provoquent, procédé pour la rendre inaltérable, avec une théorie nouvelle de la fermentation. Dans : *Etudes sur la bière*. Gauthier-Villars (ed), Paris.
- Perez-Martin, J., Rojo, F. et de Lorenzo, V. (1994). Promoters responsive to DNA bending : a common theme in prokaryotic gene expression. *Microbiol. Rev.* **58** : 268-290.

- Posada, J.** (1987). Filtration of beer. *Dans : Brewing Science*. Vol3. Pollock, J.R.A. (ed). Academic Press, London. pp. 379-439.
- Priest, F. G., Cowbourne, M.A. et Hough, J.S.** (1974). Wort enterobacteria - a review. *J. Inst. Brew.* **80** : 342-356.
- Priest, F. G.** (1996). Gram-positive brewery bacteria. *Dans : Brewing Microbiology*. Priest, F.G. et Campbell, I. (eds). Chapman & Hall, London. pp. 127-161.
- Rauch, P.J., Beerthuyzen, M.M. et de Vos, W.M.** (1994). Distribution and evolution of nisin-sucrose elements in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 1798-1804.
- Ray, B.** (1993). Sublethal injury, bacteriocins, and food microbiology. *ASM news.* **59** : 285-291.
- Ray, B.** (1989). Enumeration of injured indicator bacteria from foods. *Dans : Injured index and Pathogenic Bacteria*. (ed) Ray, B. CRC Press, Boca Raton. pp.9-54.
- Rhoads, D.B. et Epstein, W.** (1977). Energy coupling to net K<sup>+</sup> transport in *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* **252** : 1394-1401.
- Richey, B., Cayley, D.S., Mossing, M.C., Kolka, C., Anderson, C.F., Farrar, T.C. et Record, Jr.M.T.** (1987). Variability of the intracellular ionic environment of *Escherichia coli*. Differences between *in vitro* and *in vivo* effects of ion concentration on protein-DNA interactions and gene expression. *J. Biol. Chem.* **262** : 7157-7164.

- Rogers, L.A.** (1928). The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.* **16** : 321-325.
- Rogers, A.M. et Montville, A.J.** (1994). Quantification of factors which influence nisin's inhibition of *Clostridium botulinum* 65A in a model food system. *J. Food Sci.* **59** : 663-668.
- Rollema, H.S., Kuipers, O.P., Both, P., de Vos, W.M. et Siezen, R.J.** (1995). Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 2873-2878.
- Rottenberg, H.** (1979). The measurement of membrane potential and  $\Delta$ pH in cells, organelles, and vesicles. *Meth. Enzymol.* **55** : 547-569.
- Ruhr, E. et Sahl, H.** (1985). Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrob. Agt. Chemoth.* **27** : 841-845.
- Russel, C., Hetari, R.R. et Walker, T.K.** (1954). Vitamin requirements of thirty-four lactic acid bacteria associated with brewery products. *J. Gen. Microbiol.* **10** : 371-376.
- Russell, L.M. et Rosenberg, H.** (1980). The nature of the link between potassium transport and phosphate transport in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **188** : 715-723.
- Russell, N.J.** (1984). Mechanisms of thermal adaptation in bacteria : blueprints for survival. *Trends Biochem. Sci.* **9** : 108-112.

- Russell, N.J., Evans, R.I, ter Steeg, P.F., Hellemons, J., Verheul, A. et Abee, T. (1995). Membranes as a target for stress adaptation. *Int. J. Food Microbiol.* **28** : 255-561.
- Sahl, H. G., Kordel, M. et M. Benz, M. (1987). Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. *Arch. Microbiol.* **149** : 120-124.
- Samain, E., Albagnac, G., Dubourguier, H. C. et Touzel J. P. (1982). Characterization of a new propionic acid bacterium that ferments ethanol and displays a growth factor-dependent association with a Gram-negative homoacetogen. *FEMS. Microbiol. Lett.* **15** : 69-74.
- Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M.D. et Fischer, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *System. Appl. Microbiol.* **6** : 183-195.
- Schleifer, K. H., Leuteritz, M. Weiss, N., Ludwig, W. Kirchhof, G. et Seidel-Rüfer, H. (1990). Taxonomic study of anaerobic, Gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: emended description of *Pectinatus cerevisiiphilus* and description of *Pectinatus frisingensis* sp. nov., *Selenomonas lactificifex* sp. nov., *Zymophilus raffinovorans* gen. nov., sp. nov., and *Zymophilus paucivorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40** : 19-27.
- Schleyer, M., Schmid, R. et Bakker, E.P. (1993). Transient, specific and extremely rapid release of osmolytes from growing cells of *Escherichia coli* K-12 exposed to hypoosmotic shock. *Arch. Microbiol.* **160** : 424-431.

- Schönheit, P. et Perski, H.J.** (1983). ATP synthesis driven by a potassium diffusion potential in *Methanobacterium thermoautotrophicum* is stimulated by sodium. *FEMS Microbiol. Lett.* **15** : 69-74.
- Schuldiner, S. et Padan, E.** (1993a). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in *Escherichia coli*. Dans : *Alkali Cation Transport Systems in Prokaryotes*. (ed) Bakker E.P. CRC Press, Boca Raton. pp. 26-51.
- Schuldiner, S. et Padan, E.** (1993b). Molecular analysis of the role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in bacterial cell physiology. *Int. Rev. Cytol.* **137** : 229-266.
- Scott, V.N. et Taylor, S.L.** (1981). Temperature, pH and spores load effects on the ability of nisin to prevent the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. *J. Food Sci.* **46** : 121-126.
- See, Y.P. et Jackwski, G.** (1989). Estimating molecular weight of polypeptides by SDS gel electrophoresis. Dans : *Protein structure a practical approach*. Creighton, T.E. (ed). Oxford university press, Oxford. pp. 1-21.
- Shefet, S.M., Sheldon, B.W. et Klaenhammer, T.R.** (1995). Efficacy of optimized nisin-based treatments to inhibit *Salmonella typhimurium* and extend shelf life of broiler carcasses. *J. Food Prot.* **58** : 1077-1082.
- Shermann, M. et Goldberg, A.** (1993). Heat shock of *Escherichia coli* increases binding of DnaK (the H.S.P. 70 homolog) to polypeptides by promoting its phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90** : 8648-8652.

- Siebers, A. et Altendorf, K.** (1993). K<sup>+</sup>-translocating Kdp-ATPases and other bacterial P-type ATPases. *Dans : Alkali Cation Transport Systems in Prokaryotes.* (ed) Bakker, E. P. CRC Press, Boca Raton. pp. 225-252.
- Simpson, W.J. et Taguchi, H.** (1995). The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetratogenococcus* and *Aerococcus*. *Dans : The Lactic Acid Bacteria.* Vol. 2. The Genera of Lactic Acid Bacteria. Wood, B.J.B et Holzapfel, W.H. (eds). Blackie Academic and Professional, London. pp. 125-172.
- Simpson, W.J.** (1991). Rapid microbiological methods in the brewery. *Brewers' Guard.* 6 : 30-34.
- Soberka, R., Sciazko, D. et Warzecha, A.** (1988). *Pectinatus*, nouvelle bactérie pouvant affecter la stabilité biologique du moût et de la bière. *Bios.* 19 : 31-37.
- Solberg, O. et Clausen, O.G.** (1973). Classification of certain *Pediococci* isolated from brewery products. *J. Indt. Brew.* 79 : 227-230.
- Spelhaug, S. R. et Harlander, S. K.** (1989). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *J. Food Prot.* 52 : 856-862.
- Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A. et Klaenhammer, T.R.** (1991). Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 3613-3615.

- Stevens, K.A., Klapes, N.A., Sheldon, B.W. et Klaenhammer, T.R.** (1992). Antimicrobial action of nisin against *Salmonella thyphimurium* lipopolisaccharide mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 1786-1788.
- Stock, J. et Roseman, S.** (1971). A sodium-dependent sugar co-transport system in bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44** : 132-138.
- Stumpe, S., Schlösser, A., Schleyer, M. et Bakker, E.P.** (1996). K<sup>+</sup> circulation across the prokaryotic cell membrane : K<sup>+</sup> uptake systems. Dans : *Handbook of biological physics*, vol 2. Koning, W.N., Kaback, H.R. et Lolkema, J.S. (eds). Elsevier Science, Amsterdam. pp. 473-498.
- Svelter, C.H.** (1970). Enzymes activated by monovalent cations. *Science.* 168 : 789-795.
- Suutari, M., et Laakso, S.** (1994). Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Crit. Rev. Microbiol.* **4** : 285-328.
- Tapia de Daza, M.S., Alzamora, S.M. et Chanes, J.W.** (1996). Combination of preservation factors applied to minimal processing of foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **36** : 629-659.
- Takahashi, N.** (1983). Presumed *Pectinatus* strain isolated from Japanese beer. *Bull. Brew. Sci.* **28** : 11-14.
- Tholozan, J.L., Grivet, J.P. et Vallet, C.** (1994). Metabolic pathway to propionate of *Pectinatus frisingensis*, a strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. *Arch. Microbiol.* **162** : 401-408.

- Tholozan, J.L., Membré, J.M. et Kubaczka, M.** (1996). Effect of culture conditions on *Pectinatus cerevisiiphilus* and *Pectinatus frisingensis* metabolism : a physiological and statistical approach. *J. Appl. Bacteriol.* **80** : 418-424.
- Tholozan, J.L., Membré, J.M. et Grivet, J.P.** (1997). Physiology and development of *Pectinatus cerevisiiphilus* and *Pectinatus frisingensis*, two strict anaerobic beer spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **35** : 29-39.
- Tholozan, J.L. et Jacquemont, J.** (1999). Physiological response of *Pectinatus frisingensis*, a beer spoilage bacterium, to mild heat treatments. *Can. J. Microbiol.* (sous presse).
- Thomas, L.V. et Wimpenny, J.W.** (1996). Investigation of the effect of combined variation in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 2006-2012.
- Tiemann, U. et Belitz, H.D.** (1969). About nisin : I. Effect of proteases on nisin activity. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **141** : 260-262.
- Tokuda, H. et Unemoto, T.** (1982). Characterization of the respiration-dependent Na<sup>+</sup> pump in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.* **257** : 10007-10014.
- Tokuda, H., Sugasawa, M. et Unemoto, T.** (1982). Roles of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in alpha-aminoisobutyric acid transport by the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.* **257** : 788-794.

- Tsapis, A. et Kepes, A.** (1977). Transient breakdown of the permeability barrier of the membrane of *Escherichia coli* upon hypoosmotic shock. *Biochim. Biophys. Acta.* **469** : 1-12.
- Tsuchiya, T., Hasan, S.M. et Raven, J.** (1977). Glutamate transport driven by an electrochemical gradient of sodium ions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **131** : 848-853.
- Vaara, M., Vaara, T., Jensen, M., Helander, I., Nurminen, M., Rietschel, E.T. et Makela, P.H.** (1981). Characterization of the lipopolysaccharide from the polymyxin-resistant pmrA mutants of *Salmonella typhimurium*. *FEBS Lett.* **129** : 145-149.
- Vaara, M.** (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* **56** : 395-411.
- Van Vuuren, H.J.J.** (1996). Gram-negative spoilage. *Dans : Brewing Microbiology*. Priest F.G. et Campbell, I. (eds). Chapman and Hall, London. pp. 163-208.
- Verheul, A., Russell, N.J., Van'T Hof, R., Rombouts, F.M. et Abee, T.** (1997). Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 3451-3457.
- Walderhaug, M.O., Dosch, D.C. et Epstein, W.** (1987). Potassium transport in bacteria. *Dans : Ion Transport in Procaryotes*. Rosen, B.P. et Silver, S. (eds). Academic Press, San Diego. pp. 85-130.

- Walker-Simmons, M. et Atkinson, D.E. (1977) Functional capacities and the adenylate energy charge in *Escherichia coli* under conditions of nutritional stress. *J. Bacteriol.* **130** : 676-683.
- Watson, K. (1990). Microbial stress proteins. *Adv. Microb. Physiol.* **31** : 183-223.
- Watier, D. (1994). Etude de la croissance et de la résistance de *Pectinatus* et *Megasphaera*, bactéries anaérobies strictes, contaminants de la bière. Thèse de doctorat. Université des Sciences et Technologies de Lille. France.
- Watier D., Leguerinel I., Hornez J.P., Chowdhury I. et Dubourguier H.C. (1995). Heat resistance of *Pectinatus* sp., a beer spoilage anaerobic bacterium. *J. Appl. Bacteriol.* **78** : 164-168.
- Weiss, N., Seidel, H. et Back, W. (1979). Isolierung und systematische Zuordnung bierschädlicher gramnegativer Bakterien. I: Gramnegative strikt anaerobe Kokken. *Brauwissensch.* **32** : 189-194.
- White, C., Morgan, N. L. et Rockey, J. S. (1992). Inhibition by nisin of K<sup>+</sup> uptake in sensitive *Pediococcus* sp. strain. *Biotechnol. Tech.* **6** : 561-564.
- Yamasaki, K., Moriyama, Y., Futai, M. et Tsuchiya, T. (1980). Uptake and extrusion of K<sup>+</sup> regulated by extracellular pH in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **120** : 125-127.
- Young, T.W. (1996). The biochemistry and physiology of yeast growth. Dans : *Brewing Microbiology*. Priest, F.G. et Campbell, I. (eds). Chapman & Hall, London. pp. 13-42.

**Zähringer, U., Lindner, B. et Rietschel, E.T.** (1994). Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **50** : 211-276.

**Zeikus J.G. et Wolfe R.S.** (1972). *Methanobacterium thermoautotrophicum*, an anaerobic, extreme thermophile. *J. Bacteriol.* **109** : 707-715.

# ***ANNEXES***

## Annexe I

### Composition pour 1 litre de milieu B.C.Y.T. :

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 g
MgSO <sub>4</sub>	0,12 g
NaCl	0,6 g
CaCl <sub>2</sub>	0,08 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
Extrait autolytique de levure	0,5 g
Bio-trypticase	0,5 g
Tampon PIPES sans sodium	11,9 g
Solution de vitamines <sup>(1)</sup>	10 ml
Solution de traces minérales <sup>(2)</sup>	10 ml
Résazurine (0,2%)	1 ml
Eau milli-Q	Q.S.P. 1 l

### Composition pour 1 litre de milieu de reprise (M.R.) :

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 g
NaCl	0,6 g
MgSO <sub>4</sub>	0,12 g
CaCl <sub>2</sub>	0,08 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
Tampon PIPES sans sodium	11,9 g
Solution de vitamines <sup>(1)</sup>	10 ml
Résazurine (0,2%)	1 ml
Eau milli-Q	Q.S.P. 1 l

### (1) Composition de la solution de vitamines :

Biotine	2 mg
Acide folique	2 mg
Pyridoxine-HCl	10 mg
Thiamine-HCl	5 mg
Riboflavine	5 mg
Acide nicotinique	5 mg
Pantothénate de calcium	5 mg
Vitamines B12	0,1 mg
Acide para-aminobenzoïque	5 mg
Acide lipoïque	5 mg
Eau milli-Q	Q.S.P. 1 l

**(2) Composition de la solution de traces minérales :**

NTA (Titriplex I)	12,8 g
FeCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O	1,35 g
MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0,1 g
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,024 g
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,1 g
ZnCl <sub>2</sub> anhydre	0,1 g
CuCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,025 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01 g
Molybdate de Na, 2H <sub>2</sub> O	0,024 g
NaCl	1 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,026 g
NiCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,12 g
Eau milli-Q	Q.S.P. 1 l

## Annexe 2

### Dosage des protéines par la méthode de Lowry *et al.* (1951).

#### Principe:

Le réactif de Folin (acidephosphomolybdique et tungsténique) se réduit en présence de protéines en un complexe bleu de molybdène absorbant à 750 nm. Les bactéries sont traitées à chaud par un détergent (NaOH/SDS) afin de lyser les cellules. La méthode est rendue plus sensible en pré-traitant les protéines par un réactif basique contenant du cuivre. La quantification du dosage est réalisée par comparaison avec une gamme de sérum albumine bovine s'étendant de 0 à 1mg/ml.

#### Protocole:

1. Centrifuger 1 ml de suspension cellulaire et éliminer le surnageant.
2. Remettre le culot cellulaire en suspension dans 1 ml de NaOH/SDS.
3. Chauffer à 100°C pendant 5 minutes.
4. Ajouter aux essais et à la gamme étalon 1 ml de solution bleue cuivrique (0.5 ml CuSO<sub>4</sub> 5%; 0,5 ml de tartrate 10%; 100 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2,5%) puis laisser reposer 10 minutes.
5. Ajouter 0.5 ml de réactif de Folin dilué au 1/5<sup>ème</sup>.
6. Après 30 minutes de temps de contact, lecture de l'absorbance à 750 nm.

## Annexe 3

### Protocole d'extraction et de neutralisation des nucléotides

L'extraction est réalisée à l'acide perchlorique ( $\text{HClO}_4$ ). Ce dernier a la particularité de lyser les cellules et ainsi de permettre la sortie des nucléotides, sans hydrolyser ces derniers. Il précipite les protéines permettant leur élimination avant le passage des échantillons en HPLC. L'extraction est suivie par une neutralisation (pH 6) grâce à une solution de  $\text{KOH}/\text{KHCO}_3$ , entraînant la formation d'un précipité de  $\text{KClO}_4$  insoluble à froid, facilement éliminable, et un dégagement de  $\text{CO}_2$ .

#### Protocole

Les nucléotides sont recherchés à la fois dans le mélange cellules + milieu et dans le milieu extracellulaire seul.

⇒ 1 ml de suspension bactérienne est prélevé et mélangé à 200  $\mu\text{l}$  d'acide perchlorique à 35 %, préalablement refroidi.

⇒ Après un temps de contact de 20 minutes dans la glace, l'échantillon est centrifugé 5 minutes à 13000 g à 4°C.

⇒ 1 ml de surnageant est récupéré et additionné de 350  $\mu\text{l}$  de  $\text{KOH}$  2,6 M/ $\text{KHCO}_3$  0,58 M.

Après un temps de 5 minutes, dans la glace une nouvelle centrifugation (5 min à 13000 g) est effectuée à 4°C.

⇒ 1 ml de surnageant est récupéré et conservé à -80°C.

La recherche des nucléotides dans le surnageant, est basée sur le même protocole. Cependant, 1,2 ml au lieu de 1 ml de culture sont prélevés, ce qui permet de disposer après centrifugation de 1 ml de surnageant traité comme précédemment. La détermination du niveau de nucléotides intracellulaires est réalisée par différence entre ces deux valeurs.

## Annexe 4

### Calcul du volume cellulaire, du pH interne et du potentiel de membrane à partir des mesures de radioactivité

#### Volume cellulaire

Les comptages de la radioactivité (DPM : désintégrations par minutes) en  $^3\text{H}$  dans le culot et le surnageant donnent la volume du culot :

$$V_C = \frac{{}^3H_{culot}}{{}^3H_{sgt}} \times V_{sgt}$$

Le volume interstitiel du culot correspond à la fraction du culot où on trouve du  $^{14}\text{C}$  :

$$V_{ints} = \frac{{}^{14}C_{culot} / {}^3H_{culot}}{{}^{14}C_{sgt} / {}^3H_{sgt}} \times V_{culot}$$

Le volume interne d'eau correspond donc à la différence des deux volumes précédents

$$V_{in} = \left( \frac{{}^3H_{culot}}{{}^3H_{sgt}} - \frac{{}^{14}C_{culot}}{{}^{14}C_{sgt}} \right) \times V_{sgt}$$

${}^3H_{culot}$ :	DPM en ${}^3\text{H}$ dans le culot	$V_{culot}$	Volume du culot
${}^3H_{sgt}$ :	DPM en ${}^3\text{H}$ dans le surnageant	$V_{sgt}$	Volume du surnageant
${}^{14}C_{culot}$ :	DPM en ${}^{14}\text{C}$ dans le culot	$V_{ints}$	Volume interstitiel
${}^{14}C_{sgt}$ :	DPM en ${}^{14}\text{C}$ dans le surnageant	$V_{in}$	Volume d'eau interne

## pH intracellulaire

A l'équilibre de diffusion de l'acide de part et d'autre de la membrane on a :

$$pH_{int} - pH_{ext} = \Delta pH = \log \left( \frac{A^-_{int}}{A^-_{ext}} \right)$$

$A^-_{int}$  : Concentration de la forme ionisée de l'acide à l'intérieure des cellules

$A^-_{ext}$  : Concentration de la forme ionisée de l'acide à l'extérieure des cellules

Si pH extracellulaire est  $> pK_a + 1$ , l'acide est majoritairement sous forme dissociée. A l'équilibre on a :

$$A^t = A^- + AH$$

$$\frac{A^t_{int}}{A^t_{ext}} = \frac{\frac{1}{K_a} + \frac{1}{H^+_{int}}}{\frac{1}{K_a} + \frac{1}{H^+_{ext}}}$$

D'où

$$pH_{int} = \log \left( \frac{A^-_{int}}{A^-_{ext}} \left( 10^{pK_a} + 10^{pH_{ext}} \right) - 10^{pK_a} \right)$$

$A^t$  : concentration totale en acide

AH : Concentration de la forme neutre

$K_a$  : constante de dissociation

## Potentiel de membrane

$$\Delta \Psi = Z \log \left( \frac{[TPP^+]_{int}}{[TPP^+]_{ext}} \right)$$

Avec  $Z = 2,303 RT/nF$

$R$  : constante des gaz parfaits

$F$  : constante de Faraday

$[TPP^+]_{in}$  : concentration interne en  $TPP^+$

$[TPP^+]_{ext}$  : concentration externe en  $TPP^+$

Pour déterminer la concentration interne en  $[TPP^+]$ , le volume cellulaire est déterminé en parallèle et exprimé en  $\mu\text{l}$  par ml de suspension. Les DPM (désintégrations par minute) dues au  $TPP^+$  des culot sont ramenées à ce volume permettant d'obtenir  $[TPP^+]_{in}$

$$[TPP^+]_{int} = \left( \frac{[DPM \text{ } ^3H \text{ } [TPP^+]]_{culot} \times 1000}{Volume \times [protéine] \times 0,3} \right)$$

$[TPP^+]_{ext}$  est calculée directement suite à la détermination des DPM dans 100  $\mu\text{l}$  de surnageant

## Annexe 5

### Résultats du test de Scheffe

Sont présentés uniquement les acides gras qui présentent des différences significatives entre eux.

\*\*\* Différence significative à 0,05

Le teste de Scheffe pour les acides gras membranaires

$\alpha = 0,05$

L'intervalle de confiance 0,95,

Degré de liberté (ddl) =15

F = 3,68

Spector, P., Goodnight, J.H. Sall, J.P. et Sarle, W.S. (1987). The GLM procedure. Dans : SAS/STAT Guide for personal computers, version 6 edition. SAS Institute Inc, Cary. pp. 594-640.

SAS					
C13:0	ddl	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Ficher	p>f
Modèle	2	1,849	0.925	12.41	<b>0,0007</b>
Erreur	15	1,118	0.074		

#### Comparaison multiple de moyennes avec le test de Scheffe

Comparaison de souche	borne inférieure	différence entre les moyennes	borne supérieure
Témoin : Nis 5000	0.123	0.592	1.060 ***
Témoin : Nis-5000+ nisne	0.341	0.764	1.186***
Nis-5000 : Nis-5000 + nisne	-0.250	0.172	1.186

SAS					
ind4	ddl	Somme des carrées	Moyenne des carrées	Ficher	p>f
Modèle	2	0,217	0.108	5.42	<b>0,0169</b>
Erreur	15	0,300	0.020		

#### Comparaison multiple de moyennes avec le test de Scheffe

Comparaison de souche	borne inférieure	différence entre les moyennes	borne supérieure
Témoin : Nis-5000	-0.214	0.004	0.223
Témoin : Nis-5000 + nisne	0.005	0.248	0.490***
Nis-5000 : Nis-5000 + nisne	0.024	0.243	0.1462***

SAS					
C15:0	ddl	Somme des carrées	Moyenne des carrées	Ficher	p>f
Modèle	2	27,106	13.553	16.13	<b>0,0002</b>
Erreur	15	12.607	0.840		

Comparaison multiple de moyennes avec le test de Scheffe

Comparaison de souche	borne inférieure	différence entre les moyennes	borne supérieure
Témoin : Nis-5000	-0.888	0.529	1.947
Témoin : Nis-5000 + nisne	0.796	2.370	3.943***
Nis-5000 : Nis-5000 + nisne	1.481	2.899	4.318***

SAS					
C15:1	ddl	Somme des carrées	Moyenne des carrées	Ficher	p>f
Modèle	2	1,886	0.943	29.93	<b>0,0001</b>
Erreur	15	0.473	0.031		

Comparaison multiple de moyennes avec le test de Scheffe

Comparaison de souche	borne inférieure	différence entre les moyennes	borne supérieure
Témoin : Nis-5000	0.486	0.761	1.036***
Témoin : Nis-5000 + nisne	0.333	0.638	0.943***
Nis-5000 : Nis-5000 + nisne	-0.152	0.123	0.398

SAS					
C16:0	ddl	Somme des carrées	Moyenne des carrées	Ficher	p>f
Modèle	2	0,218	0.109	7.03	<b>0,0070</b>
Erreur	15	0.232	0.0155		

Comparaison multiple de moyennes avec le test de Scheffe

Comparaison de souche	borne inférieure	différence entre les moyennes	borne supérieure
Témoin : Nis-5000	-0.114	0.079	0.272
Témoin : Nis-5000 + nisne	-0.0277	0.186	0.399
Nis-5000 : Nis-5000 + nisne	0.072	0.265	0.458***

SAS					
C16:1	ddl	Somme des carrées	Moyenne des carrées	Ficher	p>f
Modèle	2	1,526	0.763	21.58	<b>0,0001</b>
Erreur	15	0.530	0.035		

Comparaison multiple de moyennes avec le test de Scheffe

Comparaison de souche	borne inférieure	différence entre les moyennes	borne supérieure
Témoin : Nis-5000	0.135	0.426	0.717***
Témoin : Nis-5000 + nisne	0.457	0.780	1.103***
Nis-5000 : Nis-5000 + nisne	0.063	0,354	0.645***

SAS					
C17: 1 DMA	ddl	Somme des carrées	Moyenne des carrées	Ficher	p>f
Modèle	2	111,194	55.597	151.57	<b>0,0001</b>
Erreur	15	5.503	0.367		

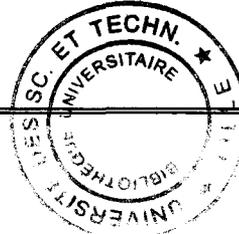
Comparaison multiple de moyennes avec le test de Scheffe

Comparaison de souche	borne inférieure	différence entre les moyennes	borne supérieure
Témoin : Nis-5000	4.322	5.362	6.401***
Témoin : Nis-5000 + nisne	-6.401	-5.362	-4.322***
Nis-5000 : Nis-5000 + nisne	-0.644	0,293	1.230

SAS					
C17:0	ddl	Somme des carrées	Moyenne des carrées	Ficher	p>f
Modèle	2	5,904	2.952	70.61	<b>0,0001</b>
Erreur	15	0.627	0.042		

Comparaison multiple de moyennes avec le test de Scheffe

Comparaison de souche	borne inférieure	différence entre les moyennes	borne supérieure
Témoin : Nis-5000	0.095	0.411	0.728***
Témoin : Nis-5000 + nisne	0.617	0.968	1.319***
Nis-5000 : Nis-5000 + nisne	1.063	1,379	1.695***



SAS					
C17:1	ddl	Somme des carrées	Moyenne des carrées	Ficher	p>f
Modèle	2	203,076	101,538	181.39	<b>0,0001</b>
Erreur	15	8.396	0.559		

Comparaison multiple de moyennes avec le test de Scheffe

Comparaison de souche	borne inférieure	différence entre les moyennes	borne supérieure
Témoin : Nis-5000	6.300	7.457	8.615***
Témoin : Nis-5000 + nisne	6.279	7.564	8.841***
Nis-5000 : Nis-5000 + nisne	-1.051	0,106	1.264

SAS					
C18: Cyclo DMA	ddl	Somme des carrées	Moyenne des carrées	Ficher	p>f
Modèle	2	79,863	39,931	47.34	<b>0,0001</b>
Erreur	15	12.651	0.843		

Comparaison multiple de moyennes avec le test de Scheffe

Comparaison de souche	borne inférieure	différence entre les moyennes	borne supérieure
Témoin : Nis-5000	-5.699	-4.278	-2.857***
Témoin : Nis-5000 + nisne	-6.762	-5.186	-3.609***
Nis-5000 : Nis-5000 + nisne	-0.513	0,907	2.328

SAS					
C18:cyclo	ddl	Somme des carrées	Moyenne des carrées	Ficher	p>f
Modèle	2	308,633	154,317	164.78	<b>0,0001</b>
Erreur	15	14.048	0.936		

Comparaison multiple de moyennes avec le test de Scheffe

Comparaison de souche	borne inférieure	différence entre les moyennes	borne supérieure
Témoin : Nis-5000	-11.412	-9.915	-8.418***
Témoin : Nis-5000 + nisne	-9.069	-7.408	-5.747***
Nis-5000 : Nis-5000 + nisne	-1.009	2,507	4.004