



HAL
open science

Compréhension des mécanismes physiologiques et génétiques impliqués dans l'activité réductrice de *Lactococcus lactis*

Célia Roussel

► **To cite this version:**

Célia Roussel. Compréhension des mécanismes physiologiques et génétiques impliqués dans l'activité réductrice de *Lactococcus lactis*. Alimentation et Nutrition. Université de Bourgogne, 2015. Français. NNT : 2015DIJOS043 . tel-01279386

HAL Id: tel-01279386

<https://theses.hal.science/tel-01279386>

Submitted on 26 Feb 2016

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

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

UNIVERSITE DE BOURGOGNE ET AGROSUP DIJON
INTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques
&
Institut Microbiologie de l'Alimentation au service de la santé

THESE

Présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Sciences des Aliments
Spécialités : Microbiologie et Biologie Moléculaire

Par **Célia ROUSSEL**

COMPRÉHENSION DES MÉCANISMES PHYSIOLOGIQUES ET GÉNÉTIQUES IMPLIQUÉS DANS L'ACTIVITÉ RÉDUCTRICE DE *LACTOCOCCUS LACTIS*

Soutenue le 22 Juin 2015 devant la Commission d'Examen :

Pr R. CACHON
Dr P. GAUDU
Dr M.C. CHAMPOMIER-VERGES
Pr S. DELAUNAY
Pr J.F. CAVIN
Pr H. PREVOST
Dr. E. BEUVIER

AgroSup, Dijon
INRA, Jouy-en-Josas
INRA, Jouy-en-Josas
Ub de Lorraine, Nancy
AgroSup, Dijon
ONIRIS, Nantes
INRA, Poligny

Directeur de thèse
Co-directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Invité

Remerciements

Tout d'abord je remercie Marie-Christine Champomier-Vergès et Stéphane Delaunay d'avoir accepté d'être mes rapporteurs de thèse. Merci également à Eric Beuvier, Hervé Prévost et Jean-François Cavin de participer à mon jury de thèse.

Je tiens aussi à remercier Monsieur Patrick Gervais, directeur de l'UMR PAM, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire afin d'y effectuer cette thèse. Ainsi que Madame Alexandra Gruss, responsable du pôle "Risques" et de l'équipe MicrobAdapt au sein de l'institut Micalis, pour m'avoir permise de réaliser 2 ans de cette thèse dans son équipe.

Je remercie tout particulièrement Rémy Cachon et Philippe Gaudu. Rémy, merci pour ta disponibilité, même si à distance ce n'est pas toujours facile, tes conseils et la confiance que tu m'as accordée durant cette thèse. Philippe, je te remercie du temps que tu m'as octroyé durant ces 2 ans (et quelques mois), merci pour les connaissances que tu as partagé avec moi, tes précieux conseils et ces discussions pendant les centrés, les incubations... Je vous remercie tous les deux de m'avoir encadrée dans mon travail, pour votre sympathie, et votre gentillesse.

Je remercie les chercheurs extérieurs aux laboratoires avec qui j'ai collaboré : Alain Guillot, de la plateforme PAPPSO, pour l'analyse des échantillons protéiques en spectrométrie de masse et pour ces précieux conseils ; Chantal Douchet, de l'UMR Géosciences Montpellier pour l'analyse ICP-MS. Je tiens également à remercier l'ANR d'avoir financé le projet Food-Redox, ainsi que toutes les personnes présentes dans ce projet pour leur implication ainsi que leurs conseils : Catherine Denis, Dominique Ibarra, Joëlle De Conninck, Karine Le Barillec, Didier Majou, Eric Beuvier, Erwann Hamon, Hervé Prévost, Philippe Schmitt, Stéphane Gavoye et Yvan Leguerinel. Merci également à Anne et Julien mes compères de compte-rendu de comités ANR, pour leur gentillesse. Merci aux pôles Vitagora et Valorial.

Je tiens également à remercier les membres de l'équipe PMB, en particulier Jeff et Hélène pour m'avoir initiée au monde de la recherche, il y a maintenant 5 ans. Merci pour leur bienveillance, leurs précieux conseils et leurs encouragements. Je remercie tous les thésards croisés, dont Bao et Dat, avec qui je n'ai pas partagé seulement de la science mais aussi de très bon Nems. Bien sûr Hélène, avec qui j'avais déjà partagé 5 ans d'études (BTS, Licence, Master) avant de débiter chacune de notre côté un projet de thèse. Je remercie également Florence pour sa sympathie, sa disponibilité et pour toutes les tâches administratives dont elle s'est occupées pour moi. Merci à Roger, stagiaire de M2 recherche, avec qui j'ai pu travailler à distance.

Merci également à toutes les personnes de la PPB. Joëlle De Coninck et Alain Durand pour m'avoir accueillie à la plate-forme. Anne-Laure, Guillaume, Samira, Sophie et Stéphanie pour l'ambiance

sympathique à la PPB. Un grand merci à Charline et Bruno, aussi connu sous le nom de « Redox Team » pour leur aide et aussi mais surtout pour ces discussions hors sciences et ses fous rires que nous avons partagé durant 1 an.

Je tiens également à remercier l'équipe MicrobAdapt, pour leurs commentaires et conseils sur ce travail. Un grand merci à "Maman" Bénédicte et à David P. pour l'ambiance dans le bureau, les petits déjeuners, les goûters et tous ces fous rires. Bénédicte, merci de ta gentillesse, ta bonne humeur, ton aide et surtout ton sac de Mary Poppins qui contenait toujours ce qui fallait quand ma santé de fer me lâchait. David P, tu as été comme un grand frère, merci pour ton aide, ta joie de vivre, nos sorties course à pied, l'initiation à la marche (qui aurait cru que je tiendrai 50 km) et toutes les spécialités Espagnol que tu m'as faite découvrir (enfin merci surtout à la cuisinière Rebecca!!). Titia, trop de choses à dire; une amitié est née pendant ces 2 ans. Merci pour les soirées, les lundi sport, la natation et ton aide. Tu as encore la moitié de ta thèse à finir alors bon courage! Merci à l'homme aux clés, Thierry, pour ta bonne humeur et surtout pour l'instauration des blagues of the days! Je remercie également Claire, David H et Karine pour nos discussions, nos plaisanteries, Claire c'est bientôt ton tour alors bon courage à toi aussi pour la fin de ta thèse.

Je tiens à remercier ma famille, mes parents pour m'avoir toujours soutenu et m'avoir laissée libre de choisir mon parcours. Mon frère, mes grands parents, ma marraine, ma tante pour leur soutiens. Un merci particulier à ma grand-mère, Nicole, qui a supporté ma présence pendant ces deux ans et quelques mois. Merci d'avoir été là, d'avoir relu cette thèse même si tu ne comprenais pas toujours tout, de m'avoir changée les idées quand il le fallait, tout simplement de t'être occupée de moi. Pour finir, mes remerciements vont à Fabien qui a su m'accompagner même à distance. Merci de m'avoir encouragée et soutenue tout au long de ces trois ans.

Merci à tous et toutes, espérant n'avoir oublié personne.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	18
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	20
CHAPITRE 1 : Le potentiel d'oxydoréduction.....	21
I. Définition du potentiel d'oxydoréduction	21
I.1. Définition	21
I.2. Système de mesure du E_h	22
I.2.1. Mesure potentiométrique.....	22
I.2.1.1. Electrode de mesure.....	22
I.2.1.2. Electrode de référence	23
I.2.2. Mesure à l'aide d'indicateurs colorés redox	24
I.2.3. Mesures du E_h par les sels de tétrazolium	24
CHAPITRE 2 : Impact du potentiel d'oxydoréduction sur les produits alimentaires	25
I. L'utilisation du E_h en industrie agroalimentaire.....	25
I.1. Le E_h comme indicateur de la qualité organoleptique.....	25
I.2. Le E_h comme indicateur de la qualité microbiologique	26
I.3. Le E_h comme indicateur de la qualité nutritionnelle et de la conservation.....	27
II. Modulation du potentiel d'oxydoréduction	27
II.1. Modification de la composition gazeuse d'un système	27
II.2. Utilisation de composés oxydants ou réducteurs.....	28
II.3. Traitement physico-chimique	29
II.4. Influence de l'activité microbienne	29

II.	Impact du E_h sur la cellule bactérienne	30
III.1.	Les effets sur le métabolisme cellulaire	30
III.2.	Impact du E_h sur la régulation de l'expression des gènes	31
III.3.	Impact du E_h sur la membrane	32
CHAPITRE 3 : Les bactéries lactiques : <i>Lactococcus lactis</i>		32
I.	Les bactéries lactiques et leurs intérêts dans l'industrie alimentaire.....	33
II.	<i>Lactococcus lactis</i>	35
III.	Régulation du pool de NADH chez <i>L. lactis</i>	37
III.1.	Production de NADH	37
IV.1.1.	Glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase	38
IV.1.2.	Mannitol-1-phosphate deshydrogénase	38
IV.1.3.	Pyruvate deshydrogénase	39
IV.2.	Consommation du NADH.....	39
IV.2.1.	Lactate deshydrogénase.....	39
IV.2.2	L'alcool deshydrogénase et l'acétoïne réductase	39
IV.2.3.	La NADH oxydase formant de l'eau (NoxE).....	40
IV.2.4.	La chaîne respiratoire	41
IV.3.	Les molécules à groupement thiol (-SH, -S ⁻).....	42
CHAPITRE 4 : Réponse aux stress due aux espèces réactives de l'oxygène.....		44
I.	Les espèces réactives de l'oxygène	44
II.	Les sources de ROS.....	45
II.1.	Les ménaquinones	45

II.2.	Pyruvate oxydase/ Lactate oxydase	45
III.	La défense contre les ROS	46
III.1.	Les différents mécanismes de détoxification enzymatique et non enzymatique.....	46
III.2.	Le système AhpR	48
III.2.	Thiol réductases cytoplasmiques.....	49
III.2.1.	Le système Thiorédoxine réductase	49
III.2.2.	Le système Glutarédoxine/ glutathion/ glutathion réductase	50
IV.	Système réducteur thiol-disulfure à la surface cellulaire	51
IV.1.	Le système TDOR chez les bactéries Gram(-).....	51
IV.2.	Les systèmes TDOR chez les bactéries Gram (+).....	52
CHAPITRE 5 : Conclusion de la synthèse bibliographique et objectif du travail de thèse.....		54
MATERIELS ET METHODES		56
I.	Matériels biologiques et conditions de croissance	57
II.	Mesure du E_h et du pH	58
II.1.	Caractérisation de la réduction	58
II.1.1.	Filtration des cellules	58
II.1.2.	Neutralisation des thiols.....	58
II.1.3.	Dosage des groupements thiols exofaciaux	58
II.1.4.	Marquage des thiols de surface.....	59
II.1.5.	Milieu de discrimination redox aux sels de tétrazolium	59
III.	Analyse protéomique.....	59

III.1. Obtention des extraits protéiques de <i>L. lactis</i>	59
III.2. Western blot	60
III.3. Préparation de protéines membranaire biotynilées par colonne d'affinité à la Streptavidine.....	61
III.4. Digestion des protéines de surface par la méthode de Shaving	61
IV. Techniques générales de manipulation des acides nucléiques	61
IV.1. Extraction des ARN totaux	61
IV.2. Amplification de l'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR).....	62
IV.2.1. Structure opéronique	62
IV.2.2. Construction de plasmides.....	62
III.3. Surexpression et purification de protéines	63
III.3.1. Surexpression de protéines	63
III.1.2. Purification des protéines	63
V. Cinétiques de croissance	64
VI. Recherche de plage de lyse	64
VII. Dosage Enzymatique.....	65
VIII. Dosage des peroxydes	65
IX. Dosage et analyse des métaux présents dans la partie N ^{ter} de Limg_0524 et Limg_052666	
X. Recherche de la protéine AhpF à la surface de <i>L. lactis</i> par microscopie.....	66
XI. Analyse des acides gras.....	67
XII. Cytométrie en flux.....	67
RESULTATS	68

CHAPITRE 1 : Caractérisation de l'activité réductrice de *Lactococcus lactis* - Les thiols exofaciaux participent-ils à la stabilisation du potentiel d'oxydoréduction en fin de réduction ?69

I.	Objectif de l'étude	69
II.	Résultats	69
II.1.	Activité réductrice de <i>L. lactis</i>	69
II.1.1.	Impact de composés réducteurs ou oxydants sur le potentiel d'oxydoréduction.....	70
II.2.	Impact des cellules dans le maintien de l'activité réductrice	72
II.2.1.	Effet de l'élimination des cellules sur le E _h final.....	72
II.2.2.	Effet des composés thiols de surface sur le E _h final	72
II.2.3.	Dosage des groupements thiols libres à la surface cellulaire.....	75

CHAPITRE 2 : Identification des protéines à thiols de surface par une approche Bioinformatique - A CX₂CX₁₀CX₂C motif involves in binding of zinc ion in two membrane proteins, Limg_0524 and Limg_0526 in *Lactococcus lactis*, and potential role of Limg_0524 in cumene hydroperoxide resistance 76

I.	Introduction de l'article	76
II.	Article.....	77
III.	Résultats supplémentaires	103
III.1.	Activité réductrice des mutants $\Delta 0524$ et $\Delta 0526$	103
III.2.	<i>Lactococcus lactis</i> TIL46	105

CHAPITRE 3 : Identification des protéines membranaires à motifs redox CXXC par une approche biochimique..... 109

I.	Objectif de l'étude	109
II.	Identification de protéines membranaires à motif CXXC.....	109

III. AhpF à la surface de <i>L. lactis</i> ?	112
CHAPITRE 4 : La protéine AhpF intervient dans l'intégrité membranaire de <i>L. lactis</i> lors d'un stress oxydatif lipophile.	113
I. Objectif de l'étude.....	113
II. Résultats.....	113
II.1. Rôle de la protéine AhpF dans la résistance à un stress oxydatif lipophile.....	113
II.2. Régulation de ahpF	115
II.3. Rôle de la protéine AhpF dans l'élimination de composés peroxyde	116
II.4. Effet de composés réducteurs sur la croissance du mutant Δ ahpF lors d'un stress au Cu-OOH.....	118
II.5. Intégrité de la membrane lipidique et de l'ADN.....	119
II.6. Le Cumène hydroperoxyde modifie le profil en acide gras	120
II.7. Activité réductrice du mutant Δ ahpF	122
DISCUSSIONS & PERSPECTIVES.....	124
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	151
ANNEXES	164

Liste des Abréviations

ADHE : alcool deshydrogénase	PAR : 4-(2-pyridylazo) résorcinol
ADN : acide désoxyribonucléique	PCR : polymerase chain reaction
AhpR : alkyl hydroperoxyde réductase	PDH : pyruvate deshydrogénase
ARN : acide ribonucléique	PFL : pyruvate formate lyase
AW : activité de l'eau	PMPS : p-hydroxymercuriphenulsulfonic acide
BIAM : N'-(iodoacetyl)ethendiamine	PMSF : penylmethylsulfonyl fluoride
BT : Blue tetrazolium	RLU : relative luminescence units
ButA/B : acetoin reductase	ROS : espèce réactive de l'oxygène
C14:0 : acide myristique	RT : retro-transcription
C16:0 : acide palmitique	SAM : S-adenosyl-L-méthionine
C16:1 : acide palmitoléique	SOD : superoxyde dismutase
C17:0 : acide heptadecanoic	TDOR : thiol disulfures oxydoréductases
C18:1 : acide oléique	TTC : 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
C18:1n-7 : acide cis-vaccénique	TV : Tétrazolium violet
CFA : acide gras cyclopropane	WT : souche parental, Wild type
CTE chaîne de transport d'électron	WTA : acide téichoïques
Cu-OOH : Cumène hydroperoxyde	Zn : Zinc
cycC19:0 : acide lactobacillique	
DHAP : dihydroxyacetone-phosphate	
DTNB : 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)	
EDTA : acide éthylène diamine tetraacétique	
E _h : potentiel d'oxydoréduction	
GAP : glycéraldéhyde-3-phosphate	
GAPDH : glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase	
GSSH/GSH : glutathion	
H ₂ O ₂ : peroxyde d'hydrogène	
HO· : radicaux hydroxyles	
IPTG : isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside	
LAA : acide lipotéichoïques	
LB : luria-bertani	
LDH : lactate deshydrogénase	
LPS : lipopolysaccharides	
MDPH : mannitol-1-phosphate deshydrogénase	
MK : ménaquinone	
N ₂ : azote	
NEM : N-éthylmaleimide	
NoxE : NADH oxydase	
O ₂ ⁻ : ions superoxydes	
O ₂ : oxygène	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les électrodes de référence utilisées couramment. A : Electrode Argent/chlorure d'argent (Ag/AgCl) ; B : Electrode au calomel (Hg/HgCl ₂).	23
Figure 2 : Exemple de réaction d'un indicateur redox coloré, le bleu de méthylène.....	24
Figure 3 : Réduction du cycle tétrazole des sels de tétrazolium en formazan.	25
Figure 4 : Evolution du E _h pendant la croissance des différentes espèces lactiques dans du lait écrémé préalablement stérilisé (24).	27
Figure 5 : Vue synthétique du métabolisme énergétique. X, intermédiaires carbonés.....	30
Figure 6 : Shift du métabolisme carboné en conditions anaérobie et aérobie. LDH, Lactate deshydrogénase; PFL, Pyruvate formate lyase; PDH, Pyruvate deshydrogénase; ADHE, Alcool deshydrogénase; PTA, Phosphotransacétylase; ACK, Acétate kinase, Pi, Phosphate inorganique. .	30
Figure 7 : Modèle de régulation de l'orientation du pyruvate par rapport au ratio NADH/NAD ⁺	31
Figure 8 : Classification phylogénétique des bactéries lactiques. (169).....	33
Figure 9 : Métabolisme carboné chez <i>L. lactis</i> . MPDH, Mannitol-1-phosphate deshydrogénase, GAPDH, Glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase, LDH, Lactate deshydrogénase, PFL, Pyruvate formate lyase, PDH, Pyruvate deshydrogénase, ADHE, Alcool deshydrogénase, ButA, Acetoïne réductase. (193) ; (152).....	37
Figure 10 : Mécanisme d'action de la NADH oxydase NoxE. La réaction qui se produit au site actif est encadrée en rouge. Inspiré de (109).....	40
Figure 11 : Représentation schématique des composants de la chaîne de transport d'électrons chez les bactéries lactiques. Le donneur d'électron, et l'oxydase terminale constituent la chaîne respiratoire minimale. Les gènes présents chez <i>L. lactis</i> sont indiqués en dessous de chaque composant. Inspiré de (101).....	41
Figure 12 : Exemple de composés soufré indispensable à la cellule.	42
Figure 13 : Voie de biosynthèse de la cystéine et de la méthionine chez <i>L. lactis</i> . Flèches épaisses, gènes régulés par le manque de cystéine ; <i>cysE</i> encadré, contrôle par une rétroaction de la cystéine ;	

SAM, S-adenosyl-méthionine ; SAH, S-adenosylhomocystéine ; SRH, S-ribosylhomocystéine ; AI-2, autoinducer 2. (167).....43

Figure 14 : Réactions catalysées par la Pyruvate oxydase et la Lactate oxydase. Pi ; Phosphate inorganique.....46

Figure 15 : Les différents systèmes enzymatiques, protéiques, non protéiques chez *L. lactis* impliqués dans la défense contre le stress oxydant. *groEL* et *dnaK*, Heat shock proteins ; *trmA*, régulation de gène (homologue à *spx*) ; *ccpA*, régulateur catabolique ; *noxE*, NADH oxydase formant de l'eau, *ahpC/ahpF*, Péroxydase/NADH oxydase formant des peroxydes ; *sodA*, Superoxyde dismutase ; *menC*, synthèse ménaquinone, *noxA/B*, NADH deshydrogénase membranaire ; *recA*, réparation ADN ; *fpg*, Formamido-pyrimidine DNA glycosylase ; *dspA, B*, protège ADN ; *guaA*, biosynthèse de la purine ; *trxBI*, Thiorédoxine réductase ; *pstFEDCBA*, operon transport du phosphate ; *phoU*, régulateur de phosphate ; *copR*, Régulateur de l'homeostasie du Cu^{2+} ; *copZ*, chaperon Cu^{2+} ; *copA*, export ATPase du Cu^{2+} ; *flpA*, régulation de la consommation et du stockage du Zn^{2+} ; *orfW_{A/B}*, consommation Zn^{2+} ; *orfX_{A/B}*, transport Zn^{2+} ; *orfY_{A/B}*, stockage Zn^{2+} ; *mntH*, transporteur de manganèse et de fer. Inspiré de (162).....47

Figure 16 : Les sous-unités de l'alkylhydroperoxyde réductase, AhpF et AhpC. Les nombres indiquent l'endroit et l'ordre de la réaction des centres redox dans les deux structures de protéines (représentées en rubans, excepté pour les atomes des centres rédox représentés en boules et bâtons). Le cadre marqué 1 représente le site de fixation du noyau isoalloxazine de la flavine, les cercles 2 à 4 indiquent les centres redox-actifs à cystéines (11).....49

Figure 17 : Système thiorédoxine. Inspiré de (6).....49

Figure 18 : Système Glutarédoxine/ glutathion/ glutathion réductase. Inspiré de (11)50

Figure 19 : Modèle de formation de ponts disulfures dans le périplasme d'*E. coli*. La flèche noire, indique la réaction oxydante catalysée par DsbA. Lors d'un mauvais repliement de la protéine, DsbC peut assurer le bon repliement de la protéine en agissant en tant que réductase (flèche pointillée) ou isomérase de la liaison disulfide incorrecte. Les flèches bleues indiquent le sens de réduction des électrons. Inspiré de (11)52

Figure 20 : Modèle de formation de ponts disulfures à la surface de *Bacillus subtilis*. (1) Oxydation du substrat par DsbA ou BdbD. Ce dernier est ré-oxydé par BdbC/BdbB (capte les électrons) (2)

active grâce à l'action de la thiorédoxine (TrxA). (3) L'oxydation du substrats par DsbA éjecte des composés redox-actifs dans le milieu. La seconde voie est CcdA (4) qui transmet les électrons provenant des thiorédoxines à plusieurs substrats YneN (fonction inconnu) ou ResA (maturation cytochrome). Flèches à tiret, sens des électrons ; Flèches grises : Protéines exportées du cytoplasme. Inspiré de (97). 53

Figure 21 : Synthèse des différents mécanismes cellulaires intervenant dans l'activité réductrice de *L. lactis*. 55

Figure 22: Schéma des principaux objectifs du travail de thèse et des stratégies mises en œuvre. 55

Figure 23 : Dispositif expérimental pour la conduite des fermentations en milieu liquide dans des flacons Schotts modifiés. 57

Figure 24 : Enceinte Bactron I (Sheldon Manufacturing, Cornelius, USA) permettant les expérimentations en anaérobiose (N₂). 57

Figure 25 : Evolution du E_{h7} et du pH (représentation en pointillé) du milieu MRS lors d'une croissance de *L. lactis* cultivée en milieu dégazé (Bleu) ou non (Rouge). Moyenne de 3 expérimentations indépendantes 69

Figure 26 : Effets de composés oxydants ou réducteurs sur le E_{h7} initial et final. A. Sur le E_{h7} initial et la réduction du milieu par *L. lactis* TIL46 ; B. sur la valeur finale du E_{h7}. E_{h7i}, redox du milieu dégazé à T0 ; E_{h7r}, redox minimal après réduction du milieu. 71

Figure 27 : Effet de la filtration sur le E_{h7} du filtrat d'une culture de *L. lactis* ssp *cremoris* TIL46 en anaérobiose. E_{h7i}, redox du milieu dégazé à T0 ; E_{h7r}, redox minimal après réduction du milieu ; E_{h7rf}, redox dans le filtrat. Les valeurs représentent la moyenne de 3 expérimentations indépendantes. * différences significatives ($\alpha = 0,05$). 72

Figure 28 : Réaction du NEM avec un groupement thiol libre 73

Figure 29 : Structure du BIAM. 73

Figure 30 : Effet du NEM et du BIAM sur le E_{h7} final d'une culture de *L. lactis* ssp *cremoris* TIL46 en anaérobiose. E_{h7i}, redox du milieu dégazé à T0 ; E_{h7r}, redox minimal après réduction du milieu ; E_{h7rN}, redox après addition de NEM ; E_{h7rB}, redox après addition de BIAM. Les valeurs représentent la moyenne de 3 expérimentations indépendantes. * différences significatives ($\alpha = 0,05$). 73

Figure 31 : Présence de thiols libres exofaciaux à la surface des cellules. A et C, cellules TIL46 observées en contraste de phase ; B, cellules TIL46 observées en fluorescence non traitées au BIAM ; D, cellules TIL46 observées en fluorescence traitées au BIAM.	74
Figure 32 : Corrélation entre l'évolution de la concentration des groupements thiols libre de surface, la croissance de <i>L. lactis</i> TIL46 et l'évolution du E _{h7} au cours de la fermentation en anaérobiose.	75
Figure 33 : Prédiction topologique des protéines Limg_0524 et Limg_0526. En vert sont représentées les cystéines.....	77
Figure 34 : Surproduction et purification de la partie N ^{ter} des protéines Limg_0524 et Limg_0526. Différents systèmes testés : petSume, pTYB2, pMal_C4x. Protéines d'intérêts.....	102
Figure 35 : Effets des délétions de <i>llmg_0524</i> et <i>llmg_0526</i> sur la réduction des sels de tétrazolium (0,02mg/ml). Des cultures o/n en M17 glucose 0,5% à 30°C sans agitation ont été spottées sur les géloses aux lait glucosé contenant : TV, tétrazolium violet ou BT, Blue tetrazolium ou TTC, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. Score : pas de réduction, 0 (-) et réduction, 1 (+ ou ++), le calcul du score binaire : $1 \times 2^0(\text{TV N2}) + 1 \times 2^1(\text{TV O2}) + 1 \times 2^2(\text{TTC N2}) + 1 \times 2^3(\text{TTC O2}) + 1 \times 2^4(\text{BT N2}) + 1 \times 2^5(\text{BT O2})$	103
Figure 36 : Effets des délétions de <i>llmg_0524</i> et <i>llmg_0526</i> sur l'évolution du E _{h7} et pH au cours de la croissance de <i>L. lactis</i> MG1363 en M17glucose 1% à 30°C sans agitation. A: condition de bullage initiale, B: aération en continue. Noir, MG1363, Vert, Δ0524, Orange, Δ0526. Moyenne de 3 expérimentations indépendantes	104
Figure 37 : Prédiction topologique de la protéine Limg_1102. En vert sont représentées les cystéines.....	105
Figure 38 : Locus du gène <i>llmg_1102</i> de <i>L. lactis</i> MG1363.....	105
Figure 39 : Effet de la délétion de <i>llmg_0526</i> chez <i>L. lactis</i> TIL46 sur la résistance au lysozyme et au cumène hydroperoxyde en condition statique. Les cellules se sont développées en M17 glucose et galactose à 30°C sans agitation. Lorsque la densité cellulaire atteint DO _{600nm} 0,1 ; 0,5 mg/ml lysozyme, ou 300 μM de Cu-OOH, ou 300 μM de H ₂ O ₂ sont ajoutés dans les cultures : WT (noire), le mutant <i>Allmg_0526</i> (bleu). Les histogrammes sont des représentations de trois croissances indépendantes. Les données sont les moyennes et les écarts-types, de la DO _{600nm} après 8 heures.	106

Figure 40 : Effet de la délétion de *llmg_0526* chez *L. lactis* TIL46 sur la résistance au lysozyme et au cumène hydroperoxyde en milieu M17 agar. Les cellules se sont développées en M17 glucose et galactose à 30°C sans agitation. Lorsque la densité cellulaire atteint DO_{600nm} 0,1 : différentes dilution de la culture est spottées sur boîtes M17 glucose supplémenté de 1 mg/ml de lysozyme, ou de 500 µM de Cu-OOH ou de 500 µM de H₂O₂. Les boîtes sont représentatives de trois expérimentations indépendantes. 107

Figure 41 : Effet de la délétion de *llmg_0526* chez *L. lactis* TIL46 sur la résistance aux phages. Des cellules o/n M17 glucose à 30°C sans agitation, sont mises en contact avec le phage C2(A) ou le phage sk1 (B) dilués à 10⁻¹ en milieu M17 agar 6% CaCl₂ 10mM glucose 0,5%. Puis immédiatement déposé sur une gélose M17 glucose 0,5% avant une incubation de 15 heures à 30°C. 107

Figure 42 : Analyse comparative des acide gras entre la souche TIL46 et le mutant *Δllmg_0526* cultivés en galactose ou glucose. 1, Acide myristique (C14 :0) ; 2, Acide palmitique (C16 :0) ; 3, Acide palmitoléique (C16 :1 n-7) ; 4, Acide cis-vaccénique (C18 :1 n-7) ; 5, Acide lactobacillique ou cyclopropane (cycC19 :0). 108

Figure 43 : Présentation des approches biochimiques utilisées pour l'identification des protéines de surface à motif CXXC. 1 : protéines membranaires révélées (Avidin-HRP), 2 : protéines membranaires détectées au bleu de Coomassie (gel SDS-PAGE)..... 109

Figure 44 : Localisation membranaire de AhpF de *L. lactis* MG1363 par Western blot. Les protéines ont été séparées par gel SDS-PAGE et la protéine AhpF marquée a été détectée avec des anticorps anti-lapin couplé à la peroxydase. Le poids moléculaire indique la position de la protéine AhpF. M, extrait des protéines membranaires, C, extrait des protéines cytoplasmiques, T, extrait protéique total..... 112

Figure 45 : Localisation membranaire de AhpF sur des cellules intactes de *L. lactis* MG1363. Les cellules sont marquées par un anticorps primaire spécifique d'AhpF couplé à l'anticorps secondaire Alexa Fluor 488. A et C, le contraste de phase; B et D, la fluorescence de la GFP. 112

Figure 46 : Le mutant *ΔahpF* est très sensible au alkylhydroperoxyde mais pas à l'hydroperoxyde. Le M17 agar glucose 0,5% est supplémenté par 10% d'un culture o/n (M17glucose à 30°C sans agitation). Les disques déposés sont imbibés par différentes concentrations (670 mM, 67 mM et 6,7

mM) de peroxyde d'hydrogène ou de cumène hydroperoxyde. Les boites présentées sont représentatives de 3 expérimentations indépendantes.	113
Figure 47 : Cinétique de croissance des souches <i>L. lactis</i> MG1363, le mutant $\Delta ahpF$ et le mutant $\Delta ahpF$ complémenté en présence de cumène hydroperoxyde et de peroxyde d'hydrogène. A, condition statique ; B, condition aération. Les cellules se sont développées en M17 glucose à 30°C. Lorsque la densité cellulaire atteint DO _{600nm} 0,1 ; 100 µM de Cu-OOH ou de H ₂ O ₂ sont ajoutés dans les cultures.....	114
Figure 48 : Effet de différentes concentrations d'H ₂ O ₂ ou de Cu-OOH sur la densité cellulaire finale de la souche parentale MG1363 et du mutant $\Delta ahpF$	115
Figure 49 : Expression d' <i>ahpF</i> pendant la croissance de <i>L. lactis</i> MG1363 en présence ou non de Cu-OOH à 40 µM. A, Cellules cultivées en M17Glu en condition statique (A) et en aération (B), * significativement différent pour P < 0,05.	115
Figure 50 : La délétion de <i>ahpF</i> augmente la production de peroxyde endogène pendant la croissance. Les souches <i>L. lactis</i> MG1363 et du mutant $\Delta ahpF$ sont cultivées en en conditions statique et aérée. * représentent les points de prélèvement. Les peroxydes sont dosés selon le dosage de FOX (194).	116
Figure 51 : La délétion de <i>ahpF</i> n'augmente pas l'expression de <i>noxE</i> codant la NADH oxydase. Les souches <i>L. lactis</i> MG1363 et $\Delta ahpF$ portant la fusion transcriptionnelle <i>noxE-lacLM</i> sont cultivées en M17 glucose 0,5% à 30°C. A, en condition d'aération ; B, en condition statique; *, significativement différent pour P < 0,05	117
Figure 52 : La délétion de <i>ahpF</i> n'affecte pas la sensibilité de <i>L. lactis</i> MG1363 à l'hydrogène peroxyde . Les cellules sont cultivées à 30°C en condition statique à différentes concentrations de H ₂ O ₂ et les densités cellulaires sont mesurées et exprimées en % par rapport à la DO _{600nm} finale des cellules sans peroxyde.....	118
Figure 53 : Toxicité du Cumène hydroperoxyde repose sur la réaction de Fenton. Les cellules se sont développées en M17 glucose à 30°C. Lorsque la densité cellulaire atteint DO _{600nm} 0,1 ; le mutant $\Delta ahpF$ est cultivée en présence de Cu-OOH seul ou en présence de composés antioxydants, de piègeurs de radicaux hydroxyles.	119

Figure 54 : La membrane, une cible d'endommagement de Cu-OOH . Les cellules se sont développées en M17 glucose à 30°C en statique (A) et en aération (B). Lorsque la densité cellulaire atteint DO _{600nm} 0,1 ; les cellules sont cultivées en présence de Cu-OOH seul ou en présence de Tween et du C18:1.	119
Figure 55 : L'inhibition de croissance en Cu-OOH n'est pas lié à des dommages sur l'ADN. <i>L. lactis</i> MG1363 et Δ <i>ahpF</i> sont cultivées en M17 glucose à 30°C. Après un choc de 3 heures au Cu-OOH en condition statique ou aéré, les cellules sont lysées et la mixture est déposée sur gel d'agarose contenant du BET. L'ADN est visualisé par exposition au UV et photographié.....	120
Figure 56 : La délétion de <i>ahpF</i> affecte la composition en acides gras chez les cellules exposées au Cu-OOH. Représentation des différences en acides gras entre la souche <i>L. lactis</i> MG1363 et Δ <i>ahpF</i> après 13 heures en M17glucose 0,5% C18:1 ou Cu-OOH/ C18:1 à 30°C en condition statique. 1, acide oléique (C18:1) ajouté dans le milieu ; 2, acide-vaccénique (C18:1 n-7) ; 3, CycC19:0 (dérive du C18:1) ; 4, acide lactobacillique (cycC19:0). Le cadre rouge correspond aux points de DO ₆₀₀ à 13 heures utilisés pour l'extraction des acides gras. Le profil est représentatif de 3 répétitions indépendantes.....	121
Figure 57 : Effet de la délétion de <i>ahpF</i> sur l'évolution du E _{h7} et du pH lors de la croissance. Aération en continue. Noir, MG1363, Bleu, Δ <i>ahpF</i> . Moyenne de 3 expérimentations indépendantes	123
Figure 58 : Schéma récapitulatifs des fonctions impliquées dans l'activité réductrices de <i>L. lactis</i> . Ox, composé oxydé ; Red, composé réduit ; MK, ménaquinones oxydées ; MKH ₂ , ménaquinones réduites ; AhpR, Complexe alkyl hydroperoxyde réductase. En bleu : composés réduits ; en orange : composés oxydés.....	126

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Potentiel standard E_{ho} (à pH 0) et E_{ho}' de différents couples redox en mV à 25 °C (188).	22
Tableau 2 : Listes des agents réducteurs et oxydants utilisés en microbiologie (181).	29
Tableau 3 : Evolution du E_h au cours de la croissance de microorganismes selon leur type respiratoire.	29
Tableau 4 : Principaux régulateurs potentiellement impliqués dans la réponse au E_h chez <i>L. lactis</i> MG1363	31
Tableau 5 : Utilisation des bactéries lactiques dans l'alimentation (45, 115).....	34
Tableau 6 : Comparaison de trois sous espèces de <i>L. lactis</i>	35
Tableau 7 : Enzymes métaboliques retrouvées à la surface des bactéries. (141).....	37
Tableau 8 : Composition du tampon de transfert.....	60
Tableau 9 : Paramètres descripteurs des cinétiques de réduction et d'acidification de <i>L. lactis</i> TIL46 en aérobiose ou anaérobiose.	70
Tableau 10 : Stabilité du complexe Zn/cystéine en présence d'oxydant ou d'un choc thermique. ..	102
Tableau 11 : Protéines communes aux méthodes du shaving, du western blot et de la colonne d'affinité à la streptavidine.	111
Tableau 12 : Composition en acide gras des souches <i>L. lactis</i> MG1363 et $\Delta ahpF$ après 13 heures de croissance en milieu M17 glucose C18:1 ou Cu-OOH/ C18:1 et en condition statique.....	121
Tableau 13 : Composition en acide gras des souches <i>L. lactis</i> MG1363 et $\Delta ahpF$ en milieu M17 glucose suite à un choc au Cu-OOH de 1 heure ou 3 heures en condition statique. Chiffre données en pourcentage.	122

INTRODUCTION GENERALE

Dans l'industrie alimentaire le contrôle de la flore microbienne désirée ou non désirée nécessite la maîtrise de nombreux paramètres physico-chimiques, il s'agit principalement de la température, le pH, l'activité de l'eau (A_w), la concentration en acides organiques et de différents autres additifs. Cependant, bien qu'il ait un rôle crucial dans le métabolisme cellulaire (réactions cellulaires), le potentiel d'oxydoréduction (E_h) n'a pas été retenu comme critère. Pourtant, plusieurs travaux ont montré l'influence du potentiel d'oxydoréduction sur la physiologie microbienne, sur les qualités organoleptiques des aliments, et également son intérêt dans la sécurité microbiologique. Le contrôle de ce paramètre peut être réalisé par l'adjonction de gaz dans les emballages, l'électro-réduction ou l'utilisation de molécules chimiques. Certaines de ces méthodes sont déjà employées par les industries agro-alimentaires, mais elles sont coûteuses et non applicables à certains procédés industriels. Une solution alternative pourrait être l'utilisation des propriétés redox des ferments entrant dans la fabrication des aliments, ces ferments étant sélectionnés sur différents critères : leurs propriétés acidifiantes, protéolytiques, aromatiques, ou encore leurs résistances aux phages.

Parmi les bactéries lactiques utilisées comme ferments et capables de modifier le potentiel d'oxydoréduction, l'espèce *Lactococcus lactis* peut réduire fortement le milieu. Ainsi, la capacité réductrice de ces souches et l'impact sur l'état physiologique des microorganismes désirés ou non désirés dans un milieu alimentaire pourrait être un nouveau critère à prendre en compte. Cela permettrait ainsi d'obtenir différents types de ferments réduisant plus ou moins vite leur milieu et ceci afin d'améliorer la sécurité et la qualité des aliments produits.

Cette proposition a abouti au projet ANR Food-Redox, faisant intervenir 14 partenaires. Six laboratoires de recherche publique (UMR PAM, Dijon ; Micalis, Jouy-en-Josas ; UMR SECALIM, Nantes ; LUBEM, Quimper, UMR SQPOV, Avignon ; URTAL, Poligny), 4 centres techniques de l'industrie alimentaire (ACTILAIT, Maison-Alfort ; AERIAL, Illkirch ; ADRIA Normandie, Villiers Bocage ; Welience, Dijon), le centre national interprofessionnel de la filière laitière française (CNIEL, Paris), un industriel du gaz (Air liquide) et 2 autres entreprises (La case aux épices, Hochfelden et Salaisons Bentz, Jarville la Malgrange). L'objectif de ce projet est de donner à l'industrie une analyse comparative sur la possibilité d'utiliser le potentiel d'oxydoréduction comme nouvelle stratégie pour le contrôle des contaminations microbiennes dans les produits alimentaires. Le recueil des données que constituera Food-Redox permettra de renforcer la sécurité des aliments, d'apporter de nouvelles approches pour les processus et la formulation des produits dans l'industrie alimentaire, de mieux connaître et contrôler l'impact du potentiel redox sur les microorganismes d'origine alimentaire et de développer des méthodes de production durable, ainsi qu'une amélioration de la conservation des aliments.

Au sein de ce projet, l'objectif de l'UMR PAM de Dijon en collaboration avec l'équipe MicrobAdapt (Micalis) de l'INRA de Jouy-en-Josas était d'identifier précisément les acteurs de l'activité réductrice des bactéries lactiques, en s'intéressant plus particulièrement aux protéines de

surface à thiols. En effet faisant suite au programme ANR EUREKA LAB-Redox (2006-2009) qui portait sur l'activité réductrice de *L. lactis* TIL46 (la souche modèle du projet), les thiols exofaciaux avaient été soupçonnés d'être en partie responsables de la réduction des milieux. C'est l'identification de ces protéines et leur caractérisation qui a fait l'objet du présent travail de thèse.

S'intéresser à l'activité réductrice de *L. lactis* nécessite une analyse des connaissances déjà connues sur le potentiel redox, ainsi que sur l'activité réductrice des microorganismes. L'introduction bibliographique qui suit traite du potentiel d'oxydoréduction et des méthodes permettant sa mesure. Cette introduction traitera des différentes méthodes possibles pour moduler le E_h , l'impact de ce dernier sur le métabolisme des microorganismes (métabolisme carboné et de l'oxygène) de *L. lactis* intervenant sur la modulation du potentiel redox. Pour finir, une présentation des différents systèmes de protéines à thiols cytoplasmiques ou membranaires, permettra d'établir un état des connaissances sur la souche modèle choisie pour cette thèse et sur d'autres microorganismes.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : Le potentiel d'oxydoréduction

Les premières études sur la mesure du potentiel d'oxydoréduction (E_h) datent de 1930 mais l'intérêt pour ce paramètre physico-chimique n'a pas suscité autant d'engouement que pour le pH (88). Le E_h est un paramètre qui informe sur les possibilités de transfert des électrons entre différentes molécules chimiques d'un milieu présentant des groupements oxydants ou réducteurs. Il est dépendant de nombreux facteurs qui sont parfois difficiles à identifier. La mesure du redox peut être perturbée par l'environnement, l'état de la surface de l'électrode de platine, les faibles courants d'échanges avec l'électrode, le taux d'oxygène. Pour mesurer ce paramètre de façon directe, rapidement, simplement et avec précision, et réaliser des cinétiques, la mesure potentiométrique est la plus appropriée. Par contre, dans certains milieux (en fromagerie, dans les produits carnés...), cette méthode n'est pas encore facilement applicable. Il est également possible d'utiliser des indicateurs redox qui permettent une mesure indirecte.

I. Définition du potentiel d'oxydoréduction

I.1. Définition

Le potentiel d'oxydoréduction (E_h) est un paramètre physicochimique qui permet de mesurer le pouvoir oxydant ou réducteur d'un système. Plus le système est réducteur (E_h négatif), plus il est apte à donner des électrons. De même, pour un système oxydant, plus le E_h est positif, plus il est apte à capter des électrons.

Lorsque deux systèmes redox sont en compétition, les électrons vont du système dont le E_h est le plus bas (en valeur algébrique) vers celui dont le E_h est le plus haut (88). Ainsi, il est possible d'établir la demi-équation redox correspondant à ce couple (Eq 1.1) :



Le potentiel standard d'un couple informe sur sa capacité à céder ou à capter des électrons. Sa valeur est définie par la loi de Nernst (Eq 1.2) qui établit la relation entre le potentiel redox (E_h) et les activités d'oxydation et de réduction des espèces chimiques engagées dans la réaction.

$$E_h = E_h^\circ + \frac{2,3RT}{nF} \cdot \log \frac{\{Ox\}}{\{Red\}} \quad (\text{Eq 1.2})$$

E_h° : Demi potentiel redox du couple ox/red pour des conditions standards (pression = 1 atm, T = 298 K, pH 0, [Ox] = [Red])

R : constante des gaz parfaits (8,314 J.K-1.mol-1)

T : température absolue (K)

n : nombre d'électrons transférés

F : constante de Faraday (96500 C.mol⁻¹)

Ox : activité de la forme oxydante de l'espèce (mol.L⁻¹)

Red : activité de la forme réduite de l'espèce (mol.L⁻¹)

Or, le plus souvent les réactions d'oxydoréduction font intervenir des protons (m). Il convient alors de prendre en compte l'influence du pH sur l'activité redox (Eq 1.3, 1.4), car la variation d'une unité pH entraîne en théorie une augmentation de 57,7 mV du E_h (88).



$$E_h = E_h^\circ - \frac{2,3mRT}{nF} \text{pH} + \frac{2,3RT}{nF} \cdot \log \frac{\{Ox\}}{\{Red\}} \quad (\text{Eq 1.4})$$

$\frac{2,3mRT}{nF} = \alpha$ = coefficient de Nernst pour les couples redox faisant intervenir l'échange d'un même nombre de protons et d'électrons ($m/n = 1$). Cependant une culture bactérienne ou un milieu alimentaire se compose d'une multitude de couples redox, il convient de déterminer le coefficient de Nernst expérimentalement.

Par convention, le potentiel standard d'un composé présent dans les milieux biologiques est donné à pH 7, ce potentiel est noté E_{h7} (Tableau 1). L'équation de Leistner et Mirna permet de rapporter le E_h d'un milieu pour un pH 7 (pH x) (Eq 1.5).

$$E_{h7} = E_{hx} + \frac{2,3mRT}{nF} (x - 7) \quad (\text{Eq 1.5})$$

E_{h7} : le potentiel d'oxydoréduction à pH 7 à 25°C

E_{hx} : le potentiel d'oxydoréduction à pH x à 25°C

x : Valeur du pH correspondant au milieu biologique

Tableau 1: Potentiel standard E_{h0} (à pH 0) et E_{h7} de différents couples redox en mV à 25 °C (188).

Couples oxydoréducteurs	E_h° (mV)	E_{h7} (mV)
$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow 2\text{H}_2\text{O}$	+1776	+1362
$\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \leftrightarrow 2\text{H}_2\text{O}$	+1229	+815
$\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{e}^-$	+771	+771
Ac. Deshydroascorbique + $4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \leftrightarrow$ Ac. ascorbique	+442	+58
$\text{GSSG} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow 2\text{GSH}$ (G= Glutathion)	+183	-230
$\text{CSSC} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow 2\text{CSH}$ (C= Cystéine)	+74	-340
$2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$	0	-414
$2\text{H}_2\text{SO}_3 + \text{H}^+ + \text{e}^- \leftrightarrow \text{HS}_2\text{O}_4^- + 2\text{H}_2\text{O}$	-56	-262

Pas de E_h° car il n'y a pas d'échange de H^+ .

1.2. Système de mesure du E_h

1.2.1. Mesure potentiométrique

La mesure potentiométrique est une mesure directe, elle permet de déterminer le E_h à l'aide d'électrodes mesurant une différence de potentiel entre une électrode de référence et une électrode de mesure inerte. Lors de la formation du potentiel, des électrons s'échangent entre le système redox et l'électrode de mesure

1.2.1.1. Electrode de mesure

L'électrode de mesure, dite inerte, agit comme un accepteur ou un donneur d'électrons. Le métal de l'électrode est constitué d'or (Au^{3+}/Au) ou de platine (Pt^{2+}/Pt) possédant des potentiels standard très élevés, Pt^{2+}/Pt , +1118 mV et Au^{3+}/Au , +1498 mV, ce qui leur permet d'être électrochimiquement inerte vis-à-vis du milieu (181).

L'utilisation du platine est préférée dans des milieux naturels, et l'or pour des milieux très oxydants (29). La platine présente également un temps de réponse plus rapide et permet une fabrication de l'électrode facilitée et plus robuste ce qui contribue à sa préférence.

Cependant pour l'électrode de platine, Hoare et *al.*, (78) attribuent une mauvaise reproductibilité de la mesure à la présence d'impuretés minérales et organiques, à la formation d'hydrogène peroxyde et à l'oxydation de l'électrode de platine en surface. Des précautions ont été proposées : donner au platine une surface lisse (poudre d'alumine, diamant ou pierre abrasive) pour permettre l'amélioration du temps de réponse, la répétabilité et la reproductibilité des mesures (88).

1.2.1.2. Electrode de référence

Toutes les électrodes de référence possèdent un potentiel constant, correspondant au couple oxydoréducteur. Ces électrodes interviennent dans la mesure du redox puisque l'on mesure le courant entre l'électrode de mesure et l'électrode de référence. Il existe trois électrodes de référence : l'électrode à hydrogène, l'électrode au calomel (HgCl₂) ou l'électrode argent/ chlorure d'argent (Ag/AgCl) (Eq 1.6, Eq 1.7 et 1.8) (88).



Comme on peut le voir à la [Figure 1](#), les 2 dernières électrodes de référence sont constituées d'un métal recouvert d'un sel peu soluble immergé dans une solution de KCl à une concentration donnée (électrolyte de référence). Dépourvue de métaux lourds (mercure), l'électrode argent/chlorure d'argent est préférée.

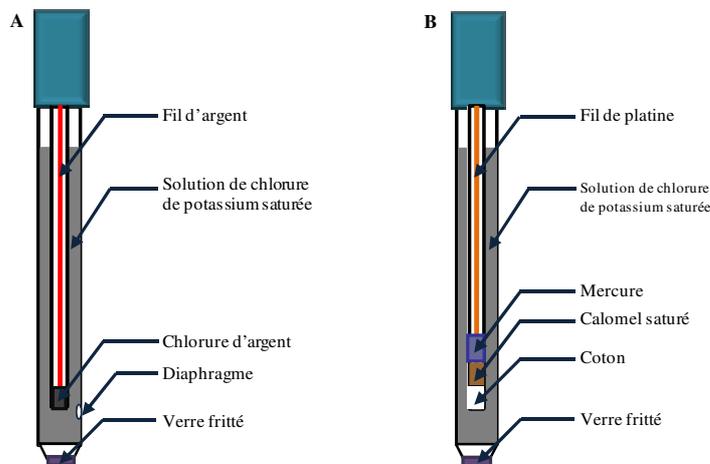


Figure 1 : Les électrodes de référence utilisées couramment. A : Electrode Argent/chlorure d'argent (Ag/AgCl) ; B : Electrode au calomel (Hg/HgCl₂).

Pour calculer le potentiel E_h réel, le potentiel redox mesuré (E_m) doit être corrigé par le potentiel standard de la référence (E_r) pour exprimer le potentiel redox par rapport à l'hydrogène (E_h). (Eq 1.9)

$$E_h = E_m + E_{ref} \quad (\text{Eq 1.9})$$

Cachon et De Connink, (31) ont proposé une équation pour corrélérer le E_r et la température ($^{\circ}\text{C}$) : A 25°C le potentiel de référence de l'électrode Ag/AgCl est 207 mV.

$$\text{Ag/AgCl : } E_r = 207 + 0,8 \times (25 - T) \quad (\text{Eq 1.10})$$

I.2.2. Mesure à l'aide d'indicateurs colorés redox

La mesure colorimétrique intervient lorsque les techniques potentiométriques habituelles ne sont pas adaptées ou difficiles à mettre en place. Le plus souvent la forme oxydée est colorée et la forme réduite est incolore. La Figure 2 présente un exemple de réaction redox standard entre les deux formes constituant le couple redox.

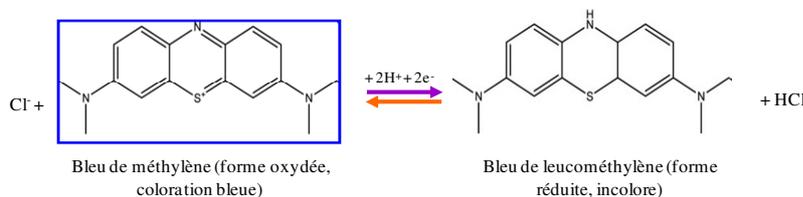


Figure 2 : Exemple de réaction d'un indicateur redox coloré, le bleu de méthylène

D'après Jacob (88), en combinant plusieurs indicateurs redox il est possible d'obtenir une bonne estimation du E_h . Les plus utilisés sont la résazurine qui sert d'indicateur de contamination bactérienne ou levurienne (136), et le bleu de méthylène qui est utilisé durant la fermentation du lait comme contrôle d'anaérobiose.

Cependant, l'utilisation des indicateurs colorés redox dans la mesure du E_h est limitée (88), notamment en présence de microorganismes avec lesquels ils peuvent interférer, jouant le rôle d'accepteurs ou de donneurs d'électrons extracellulaires.

I.2.3. Mesures du E_h par les sels de tétrazolium

Les sels de tétrazolium appartiennent à un autre groupe d'indicateurs redox. Incolores dans leur état oxydé ils sont irréversiblement réduits en formazan coloré tel que montré en Figure 3. Ils servent principalement à caractériser les activités redox cellulaires : indicateur de viabilité, marquage histochimique et mesure d'activité biochimique (40, 145). Récemment, une étude a permis d'élaborer une méthode de caractérisation de la capacité réductrice en gélose au lait (121).

Les sels de tétrazolium interviennent comme accepteurs artificiels d'électrons dans des réactions catalysées par des déshydrogénases. Certains peuvent directement agir avec les flavoprotéines (INT,

NBT), d'autres réagissent avec les coenzymes réduits NADH avec un intermédiaire non enzymatique.

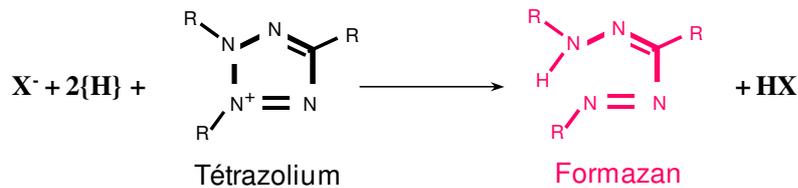


Figure 3 : Réduction du cycle tétrazole des sels de tétrazolium en formazan.

Parmi ces sels il existe deux groupes, certains sont chargés positivement (MTT, INT, CTC, TTC, TV), ils sont donc capables de traverser la membrane plasmique des cellules grâce à la différence de potentiel entre l'extérieur et le cytoplasme (15). Ces sels sont alors réduits à l'intérieur de la cellule par les oxydases et les deshydrogénases de la chaîne de transport d'électrons (CTE). Ceux chargés négativement (XTT, MTS, WST) ont plus de mal à pénétrer dans la cellule, ils passent par des transporteurs d'électrons membranaires. (18, 161)

CHAPITRE 2 : Impact du potentiel d'oxydoréduction sur les produits alimentaires

Le E_h est un paramètre important dont dépendent certaines réactions redox, et qui peut influencer les réactions produites lors des procédés alimentaires. Le E_h intervient sur les qualités organoleptiques favorablement ou défavorablement. Il joue un rôle essentiel sur le développement des flores d'intérêt, d'altération des aliments ou des pathogènes. Il agit à la fois sur leurs croissances, leurs métabolismes, leurs structures ou encore dans l'expression de leurs gènes. Les réactions d'oxydation ou l'effet du E_h sur le métabolisme de la flore du produit fermenté peuvent parfois avoir des effets néfastes (réaction de Maillard) ou provoquer des altérations. Ceci souligne l'importance du contrôle du E_h pendant les procédés de fabrication des produits fermentés. Ce contrôle peut être réalisé par une modification du potentiel redox au cours du processus selon différents moyens : en utilisant la flore présente qui va utiliser les composés du milieu et l'oxygène, l'utilisation de gaz comme l'azote qui chasse l'oxygène sans avoir d'impact négatif sur le métabolisme des bactéries d'intérêt, ou avec un mélange gazeux adéquat.

I. L'utilisation du E_h en industrie agroalimentaire

1.1. Le E_h comme indicateur de la qualité organoleptique

Le potentiel redox peut être un critère révélateur des qualités organoleptiques (toucher, goût, odorat, visuel). Ce dernier intervient dans l'oxydation des lipides comme les acides gras insaturés. Les composés oxydés résultant de cette réaction, ont souvent un effet négatif, avec des

modifications sensorielles non désirables : aspect visuel (grumeau) ou gustatif (goût rance, métallique, oxydé, de poisson).

Une analyse sensorielle a montré des différences d'appréciation des yaourts selon le conditionnement initial du lait (46). Les yaourts fabriqués à partir de lait conditionné sous azote/hydrogène sont plus appréciés que ceux fabriqués à partir de lait conditionné sous azote ou air. En effet, le jury a ressenti de façon différente la maturation des yaourts selon le conditionnement initial du produit, les yaourts fabriqués à partir de lait conditionné sous azote/hydrogène sont moins sujets à la synérèse. D'autres travaux de Martin et *al.*, 2010 (113) ont montré que la viscosité du yaourt est affectée, les yaourts conditionnés sous air sont plus rigides.

Le potentiel redox joue un rôle important dans la formation des composés d'arômes, par exemple pour le fromage, les conditions oxydantes (+300 mV) favorisent la production d'aldéhydes responsables des arômes de fruits. Les conditions réductrices (-200 mV) augmentent la production d'acides carboxyliques, contribuant à l'arôme du fromage affiné (93). (Annexe 1)

1.2. Le E_h comme indicateur de la qualité microbiologique

Le E_h peut être un critère de qualité microbiologique et donner des informations sur le développement de bactéries non souhaitées. Certains coliformes ou les clostridies, produisent de l'hydrogène suite à la fermentation de l'acide lactique en acide butyrique, un réducteur puissant ($E_o' = -414$ mV), entraînant une chute du potentiel (99). Ainsi, la chute brutale du E_h pourrait être un paramètre révélateur de la contamination par ces bactéries.

Les cinétiques de réduction du E_h peuvent être utilisées dans la différenciation et la caractérisation des micro-organismes, en particulier pour la sélection des ferments comme présentés dans la Figure 4. Dans cette étude (24), dix espèces différentes de bactéries lactiques ont été caractérisées durant la fermentation du lait en conditions statiques. Parmi ces espèces, *Enterococcus faecalis* se distingue par sa rapidité à réduire le lait à un E_h très réducteur contrairement aux souches *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* incapables de réduire le lait jusqu'à des valeurs négatives. *Lactococcus lactis* peut être classée parmi les bactéries lactiques les plus réductrices. Son temps de réduction est supérieur à celui de *E. faecalis*, mais sa vitesse de réduction (V_m^r) est similaire. Elle est même six fois supérieure à celle de *St. thermophilus* et 5 fois à celle de *L. helveticus* (32). Cette diversité inter et intra espèces démontre l'intérêt de la sélection de souches selon leur activité réductrice pour l'élaboration des ferments et la maîtrise du potentiel redox.

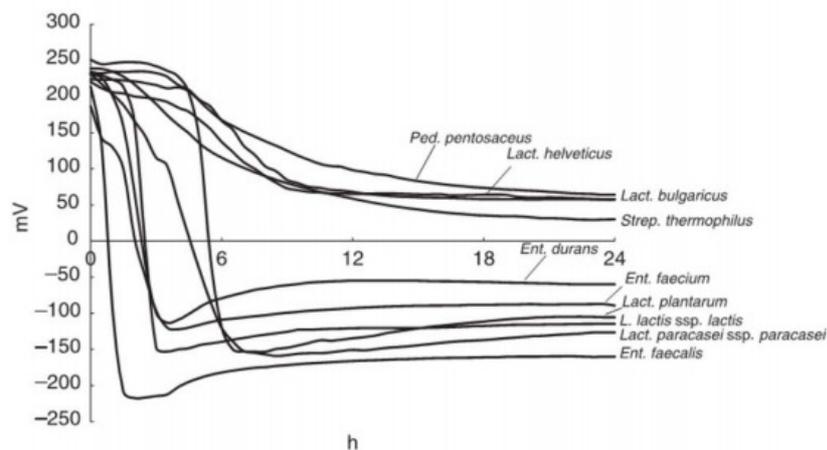


Figure 4 : Evolution du E_h pendant la croissance des différentes espèces lactiques dans du lait écrémé préalablement stérilisé (24).

1.3. Le E_h comme indicateur de la qualité nutritionnelle et de la conservation

La qualité nutritionnelle des produits dépend également du potentiel redox. Alcaraz, (1) a intégré le potentiel redox dans la préparation de produits alimentaires pasteurisés pour assurer une longue durée de conservation des qualités nutritionnelles et des propriétés organoleptiques. En effet, certaines vitamines, dont les vitamines A, C et E, sont très sensibles à l'oxydation et leurs propriétés nutritionnelles ne sont préservées que dans des conditions de E_h négatif (20). La méthode comprend la détermination de la valeur-seuil de cuisson du produit (C_g), la mesure de son pH, ainsi que la déduction de la valeur seuil de pasteurisation correspondante (P). La courbe de traitement thermique est déterminée de façon à ce que les valeurs-seuils de cuisson et de pasteurisation soient atteintes et que le produit soit dans un état physicochimique compatible avec l'inhibition du pathogène alimentaire *Clostridium botulinum*.

Une méthode surtout applicable aux boissons alcoolisées propose un emballage alimentaire contenant un gaz protecteur (H_2) ou plusieurs gaz de conditionnement ; méthode qui a fait l'objet d'un brevet, Cachon et *al.*, (30).

Alwazeer et *al.*, (2) ont montré que conditionner du jus d'orange en absence d'oxygène après un traitement thermique entraîne l'augmentation de la stabilité microbiologique et organoleptique lors de la conservation des jus de fruits pasteurisés.

II. Modulation du potentiel d'oxydoréduction

II.1. Modification de la composition gazeuse d'un système

Pour modifier le E_h d'un aliment, le moyen le plus simple est de modifier la concentration en oxygène dissous. L'oxygène a une forte influence sur l'état redox d'un milieu, c'est l'une des molécules les plus oxydantes ($E_o' = + 815$ mV), la variation d'un log de la concentration en

oxygène peut entraîner une augmentation de +50 à +60 mV du potentiel (91, 174, 176). Pour limiter les problèmes d'oxydation, il est nécessaire de travailler dans des conditions d'atmosphère inerte (88).

Les gaz neutres ou réducteurs (azote, hydrogène, dioxyde de carbone) sont employés en agroalimentaire pour augmenter la qualité des produits, et améliorer leur conservation. En industrie, l'azote est utilisé pour chasser l'oxygène et créer des conditions d'anaérobiose défavorables aux flores d'altérations :

- Microorganismes aérobies, *Pseudomonas* et *Bacillus* ne peuvent pas se développer dans un environnement réducteur (29)
- *Escherichia coli*, en conditions anaérobiques et/ou en présence de composés oxydants sa croissance est ralentie (inhibition des transporteurs de K^+ et H^+) (10)
- *Salmonella typhimurium*, en condition réductrice la bactérie rentre prématurément en phase stationnaire de croissance (95)
- *Listeria monocytogenes*, des conditions réductrices rendent la souche EGD-e plus sensible au traitement thermique (83)

Ces gaz sont donc très appréciés en industrie, puisqu'ils peuvent moduler le E_h sans avoir d'action néfaste sur la stabilité des composés alimentaires ou sur le métabolisme de la flore d'intérêt.

L'ajout d'hydrogène permet de modifier le E_h à des valeurs identiques très réductrices sans entrainer d'effet nocif. Sur ce principe, Cachon et *al.*, (32) ont développé une méthode de contrôle du E_h par un flux l'hydrogène principalement, pour favoriser le développement des microorganismes d'intérêt et réduire le E_h .

II.2. Utilisation de composés oxydants ou réducteurs

L'utilisation de ces composés concerne principalement la recherche. A des concentrations appropriées, l'addition de composés oxydants ou réducteurs permet de moduler le E_h à différents niveaux. Ces composés sont présentés dans le Tableau 2.

Dave et Shah, (43) ont montré que l'acide ascorbique et la cystéine abaissaient le E_h d'un lait utilisé dans la fabrication de yaourt. L'augmentation de la concentration des composés avait comme résultat l'obtention d'un potentiel redox plus bas après la fermentation du lait, cependant ils avaient un effet sur le temps de fermentation. Or le temps de fermentation est un paramètre majeur à respecter, il assure la qualité des produits fermentés puisqu'il est directement lié à la cinétique d'acidification.

L'utilisation d'un agent réducteur tel que le dithiothreitol (DTT), permet de réduire le E_h à des valeurs très réductrices, mais à forte dose le DTT inhibe la croissance des bactéries lactiques, comme l'a montré l'étude de Cesselin et *al.*, (33), sur la croissance de *L. lactis* en aérobiose à 37°C. C'est une des raisons pour lesquelles ces composés ne sont pas utilisés en industrie agroalimentaire.

Tableau 2 : Listes des agents réducteurs et oxydants utilisés en microbiologie (181).

Propriétés redox	Composés chimiques	E _o ' (mV) à 25°C
Oxydant	Peroxyde d'hydrogène	+ 1362
	Oxygène	+ 815
	Ferricyanure de potassium	+ 435
	Acide ascorbique	+ 58
Réducteur	Glutathion	- 230
	Dithiothreitol	- 330
	Cystéine	- 340
	Boro-hydrure de sodium	- 414
	Hydrogène	- 414

II.3. Traitement physico-chimique

Pour éliminer l'oxygène, l'augmentation de la température par traitement thermique ou pasteurisation est une bonne alternative (127). Mais l'élimination de l'oxygène n'est pas permanente si une atmosphère anaérobie n'est pas maintenue. De plus le traitement à la chaleur provoque très souvent des dégradations protéiques, des oxydations lipidiques qui favorisent des réactions indésirables comme la réaction de Maillard (177).

II.4. Influence de l'activité microbienne

Le E_h d'un milieu varie également avec la croissance bactérienne. Les travaux de Jacob, 1970 (88) montrent que le potentiel redox d'une culture bactérienne varie au cours de la croissance, et que les caractéristiques physiologiques (fermentaire, type respiratoire) influencent la variation du E_h tel que présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Evolution du E_h au cours de la croissance de microorganismes selon leur type respiratoire.

Type respiratoire	Exemples	Evolution du E _h au cours de la croissance	Références bibliographiques
<i>Aérobic</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	+135 à -100 mV ^a	(88)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+500 à +100 mV ^a	(138)
<i>Anaérobic facultatif</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	+180 à -230 mV ^a	(88)
	<i>Proteus vulgaris</i>	+150 à -600 mV ^a	(88)
	<i>Salmonella typhimurium</i>	+430 à 70 mV ^a	(138)
<i>Anaérobic stricte</i>	<i>Clostridium paraputrificum</i>	-30 à -550 mV ^b	(88)
	<i>Clostridium perfringens</i>	+216 à -230 mV ^b	(111)
	<i>Clostridium botulinum</i>	-60 à -400 mV ^b	(163)

^a Condition d'aérobiose; ^b Condition d'anaérobiose

La consommation de l'oxygène dissout et les activités métaboliques (synthèse de composés réducteurs, utilisation de composés oxydants) induisent une chute du potentiel E_h en début de croissance.

II. Impact du E_h sur la cellule bactérienne

III.1. Les effets sur le métabolisme cellulaire

Les microorganismes utilisent pour leur métabolisme énergétique différents substrats carbonés ou azotés. Le métabolisme de ces substrats permet (i) la synthèse de l'ATP, fournisseur d'énergie ; (ii) la production d'équivalents réducteurs nécessaires à la croissance des cellules et à la synthèse de produits nécessaires à leur survie. Pour maintenir l'équilibre redox intracellulaire le cofacteur réduit (NADH) doit être ré-oxdé, tel que synthétisé dans la Figure 5 par un métabolisme fermentaire ou respiratoire.

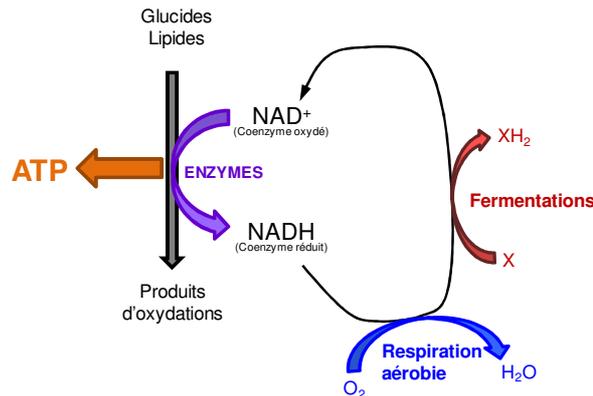


Figure 5 : Vue synthétique du métabolisme énergétique. X, intermédiaires carbonés.

Lors d'une limitation en carbone ou lorsque le sucre présent est différent du glucose, un « shift » du métabolisme s'opère chez les lactocoques. La Figure 6 synthétise ce phénomène dû à une diminution de l'activité de la Lactate deshydrogénase (LDH) et à l'augmentation de l'expression de la Pyruvate formate lyase (PFL) en anaérobiose ou de la Pyruvate deshydrogénase (PDH) en aérobiose et de la NADH oxydase, NoxE, sous le contrôle du ratio $NADH/NAD^{+,H^+}$.

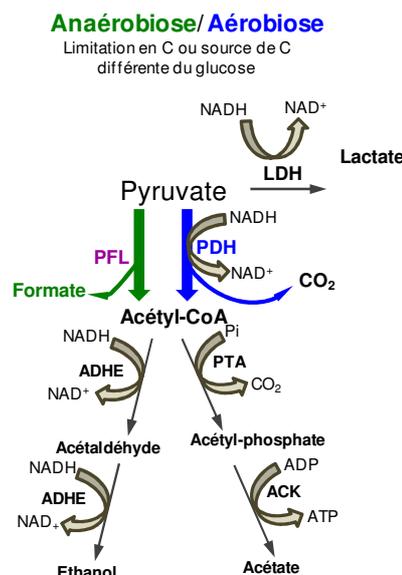


Figure 6 : Shift du métabolisme carboné en conditions anaérobiose et aérobiose. LDH, Lactate deshydrogénase; PFL, Pyruvate formate lyase; PDH, Pyruvate deshydrogénase; ADHE, Alcool deshydrogénase; PTA, Phosphotransacétylase; ACK, Acétate kinase; Pi, Phosphate inorganique.

Un modèle de régulation a été établi entre l'orientation du métabolisme du pyruvate et le ratio de NADH/NAD⁺, à travers le rôle antagoniste qu'il exerce au niveau de la Glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase (GAPDH) et de la LDH (60, 80, 82). Comme montré dans la Figure 7 dans des conditions à fort rapport NADH/NAD⁺ (flux glycolytique haut) la GAPDH devient une enzyme limitante, provoquant l'accumulation intracellulaire du Glyceraldéhyde-3-phosphate (GAP) et de Dihydroxyacétone-phosphate (DHAP), inhibant l'activité de la PFL. Quand le rapport NADH/NAD⁺ est bas, la LDH est limitée par la disponibilité en NADH, et un métabolisme du pyruvate en faveur de la voie de PFL est observé.

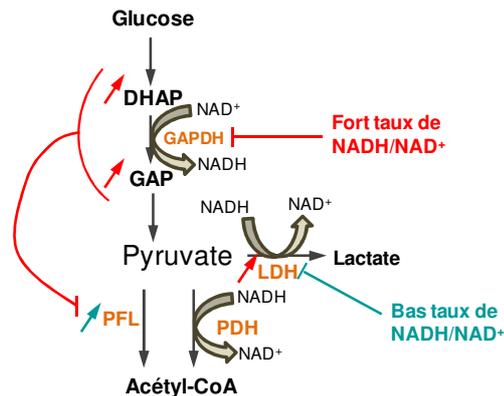


Figure 7 : Modèle de régulation de l'orientation du pyruvate par rapport au ratio NADH/NAD⁺.

III.2. Impact du E_h sur la régulation de l'expression des gènes

Le séquençage du génome de la souche de *L. lactis* IL1403 a permis d'identifier 138 régulateurs potentiels (21). D'après l'analyse *in silico* de ces régulateurs, couplée à une revue des travaux expérimentaux antérieurs chez *L. lactis* MG1363, une dizaine de régulateurs semble avoir un rôle direct ou indirect dans la détection de l'état redox de la cellule (Tableau 4).

Tableau 4 : Principaux régulateurs potentiellement impliqués dans la réponse au E_h chez *L. lactis* MG1363

Régulateur	Famille	Caractéristiques	Fonction	Référence
LlrF	OmpR	Système à deux composants chromosomique	Réponse au stress oxydant	(137)
IcoR/IcoS		Système à deux composants plasmidique	Réponse au stress induit par le cuivre	(92)
Rex		Répresseur, détecte le pool de NADH		(189)
CopR		Répresseur, détecte le cuivre	Réponse au stress induit par le cuivre	(112), (189)
ZitR		Répresseur, détecte le zinc	Réponse au stress induit par le cuivre	(107)
FlpA/FlpB	Protéines		Homéostasie du zinc	(158)
CmbR	FNR-like	Activateur	Régulation de la production de cystéine	(54)

Des régulateurs comme Rex et NadR, pourraient être impliqués dans le contrôle et la détection du E_h intracellulaire (189). Chez *Bacillus subtilis* 1A1, Rex a pour cible la *ldh* et les gènes de la chaîne respiratoire, ainsi la souche peut contrôler son E_h en modulant la régénération du pool NADH/NAD⁺ (100).

La régulation de l'apport en métaux est également importante. Les senseurs d'ions métalliques CoprR (112), ZitR (107) et Fur (72) détecte, le Cuivre, Zinc et le Fer respectivement. Ce dernier régule les gènes codant pour la catalase ou encore l'alkyl hydroperoxide réductase (72). Le zinc participe à la protection des groupements thiols de l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène chez *L. lactis* MG1363 (158) mais à forte dose il devient toxique pour *L. lactis* MG1363 (33).

III.3. Impact du E_h sur la membrane

La membrane cytoplasmique constituant l'interface entre le cytoplasme et le milieu extérieur, régule les flux de nutriments et de produits métaboliques pour maintenir l'homéostasie du cytoplasme. La membrane cellulaire est la première cible des modifications de l'environnement cellulaire (178). Ces changements peuvent altérer : (i) la composition membranaire et la structure bactérienne, (ii) les fonctions des protéines associées, notamment par une modification de l'environnement lipidique des enzymes ; (iii) la peroxydation des lipides qui entraîne la formation d'aldéhydes, d'acides gras insaturés, d'alcanes, de cétones ou d'époxydes. Ces produits ont des longueurs de chaînes plus courtes que les acides gras initiaux augmentant la capacité de rotation de la chaîne carbonée, ainsi la membrane se fluidifie et peut conduire à une perte de l'intégrité structurale nécessaire aux transports et aux activités ATPasiques (178). Cependant de nombreuses bactéries à Gram positif, tel que *L. lactis*, sont capables de synthétiser *in vivo* des acides gras à cycle cyclopropane (CFA) par le transfert d'un groupe méthyle de la S-adenosyl-L-méthionine (SAM) à la double liaison d'insaturation d'un phospholipides membranaires. Cette conversion, catalysée par l'enzyme synthase Cfa nécessite trois ATP par cycle de cyclopropane formé. Ainsi, elle permet de protéger les acides gras contre l'oxydation et a un effet sur la membrane en diminuant sa fluidité. Les CFA jouent un rôle majeur dans l'adaptation aux environnements drastiques (182).

CHAPITRE 3 : Les bactéries lactiques : *Lactococcus lactis*

Les bactéries lactiques sont des microorganismes à Gram positif, non sporulants, non mobiles, aéroanaérobies facultatifs. Certains sont catalase positifs (*Enterococcus faecalis*, *L. plantarum*) et la plupart sont négatifs (*L. lactis*, *Oenococcus oeni*). Ces souches ont un métabolisme fermentaire facultatif produisant majoritairement de l'acide lactique, mais également d'autres acides tels que l'acide acétique ou encore l'acide formique. Dans l'industrie alimentaire les bactéries lactiques sont utilisées pour leurs qualités acidifiantes, protéolytiques et aromatisantes, l'espèce *L. lactis* est très fréquemment utilisée comme ferment. La diversité génomique et plasmidique de *L. lactis* est importante et peut se traduire par une grande diversité phénotypique. De nombreuses voies métaboliques pourraient être impliquées dans l'activité réductrice de *L. lactis*, par exemple le

métabolisme des sucres et des acides aminés qui modifient le pool de NADH, donc le pouvoir réducteur de la cellule, et entrainer la libération de métabolites plus ou moins réducteurs. Le métabolisme des acides aminés modifie également la quantité de cystéine, acide aminé au groupement thiol (couple redox thiol/disulfide). Certaines enzymes cytoplasmiques ont été retrouvées à la surface de microorganismes, ainsi on peut s'interroger sur le rôle potentiel de protéines cytoplasmiques intervenant dans la réduction du E_h du milieu, tel que la NADH oxydase NoxE, l'une ou les deux protéines du complexe Alkyl hydroperoxyde réductase (AhpR), AhpF ou AhpC.

I. Les bactéries lactiques et leurs intérêts dans l'industrie alimentaire

Le groupe hétérogène des bactéries lactiques est représenté par plusieurs genres importants : *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* (Figure 8). Elles rassemblent des coques (bactéries sphériques) et des bacilles (bactéries en forme de bâtonnets). La classification phylogénétique des bactéries lactiques est basée sur la comparaison des séquences d'ADNr 16S et leur génome présente un faible taux de guanine et de cytosine.

En général, les bactéries lactiques ont des besoins complexes en facteurs de croissance tels que : la vitamine B, des acides aminés, des peptides, des bases puriques et pyrimidiques. Les bactéries lactiques survivent dans un milieu à faible activité de l'eau (A_w , quantité d'eau libre dans un aliment par exemple), elles résistent à l'éthanol (10 à 15%), au CO_2 et à un pH bas (5 et parfois moins). C'est principalement leur capacité acidifiante qui est pour le moment utilisée dans la sélection des ferments, même si pour certaines d'autres activités sont recherchées (par exemple la production de gaz par l'espèce *Leuconostoc*).

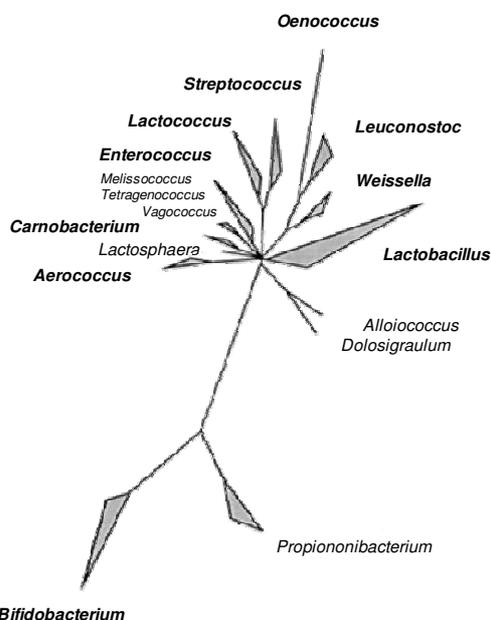


Figure 8 : Classification phylogénétique des bactéries lactiques. (169)

La plupart des bactéries lactiques sont considérées comme GRAS (Generally Recognized As Safe), nomenclature internationale pour les bactéries considérées sûres pour le consommateur. Ce

statut permet l'exploitation de ces souches dans de nombreuses applications, telles que la production de métabolites, la vectorisation de molécules thérapeutiques dans le tube digestif, les processus alimentaires et l'utilisation probiotique (57). Cependant, toutes les bactéries lactiques n'ont pas ce statut, certaines espèces telles que : *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* et *Streptococcus agalactiae* sont des pathogènes opportunistes.

Dans l'industrie alimentaire les produits fermentés sont en constante évolution à la fois au niveau sensoriel et au niveau sanitaire. Les caractéristiques métaboliques des bactéries lactiques en font des acteurs indispensables aux fermentations alimentaires. Pures ou en synergie avec d'autres microorganismes, elles permettent la transformation du lait, de boissons, de produits de salaisons, de végétaux tel que montré dans le Tableau 5. Leur présence joue un rôle majeur dans la conservation des aliments, car la production d'acide lactique qui abaisse le pH inhibe le développement de bactéries non désirées (168), et aussi par la production de bactériocines.

Tableau 5 : Utilisation des bactéries lactiques dans l'alimentation (45, 115).

Genre	Application
<i>Lactococcus & Lactobacillus</i>	Production de fromages
<i>Streptococcus, Leuconostoc & Lactobacillus</i>	Yaourt & produits laitiers
<i>Lactobacillus & Bifidobacterium</i>	Produit probiotique
<i>Pediococcus & Lactobacillus</i>	Fermentations végétaux, viandes et poissons
<i>Oenococcus & Lactobacillus</i>	Boissons alcoolisées

Dans les produits qu'elles fermentent, les bactéries lactiques peuvent libérer des bactériocines et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Parmi les bactériocines, la nisine produite par *L. lactis* permet d'inhiber les *Clostridium*, *Listeria*, *Bacillus* ou *Staphylococcus* (186). Le peroxyde d'hydrogène est produit par certaines bactéries lactiques en présence d'oxygène. Son effet anti-microbien résulte de la formation de radicaux hydroxyles (HO°, réaction de Fenton) très oxydants entraînant la dénaturation de nombreuses enzymes, la peroxydation des lipides membranaires, des cassures de l'ADN. La production d'H₂O₂ par certaines souches de *Lactococcus* inhiberait *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp* et d'autres microorganismes psychrotrophes contaminant les aliments (87).

Les sous-espèces *L. lactis* subsp. *cremoris* et *L. lactis* subsp. *lactis* ont un rôle dans l'acidification des fromages (production d'acide lactique), la texture (exopolysaccharides) et le goût (production d'arôme) (22, 197). En plus de limiter la croissance de bactéries pathogènes, le lactate produit peut servir de source de carbone aux autres microorganismes de la flore d'intérêt, comme le genre *Propionibacterium* (67).

Les bactéries lactiques sont également utilisées comme probiotiques. Selon le rapport FAO/OMS, 2002, les probiotiques sont des « microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte ». Les genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus* possèdent des espèces ayant cette propriété.

Cependant, ces avantages dus aux bactéries lactiques peuvent être altérés. L'un des plus grands fléaux de l'industrie agroalimentaire est la présence de phages lors des fermentations. La conséquence d'une contamination par les phages peut conduire à la lyse cellulaire, à l'altération de la qualité du produit final en ralentissant la fermentation et à un coût économique important pour l'industrie. Les espèces phagiques rencontrées fréquemment dans l'industrie alimentaire appartiennent aux groupes 936, C2 et P335 (28, 50). Pour lutter contre la contamination phagique, les industriels misent sur (i) des précautions d'hygiène (équipements nettoyés et stérilisés entre chaque production, changement d'air régulier), (ii) le changement régulier de ferments ou l'utilisation de ferment mixte, (iii) une seule souche résistante aux phages.

II. *Lactococcus lactis*

Le genre *Lactococcus* qui nous intéresse plus précisément a été proposé par Schleifer et al., (1977), comprend 5 espèces (<http://www.bacterio.net/lactococcus.html>) : *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus reffinolactis*, *Lactococcus plantarum* et *Lactococcus lactis* subdivisé en 3 sous-espèces, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*. Ce genre a un métabolisme homofermentaire facultatif, produisant exclusivement de l'acide lactique (L+), pour 85% de ses souches. La température optimale de croissance avoisine 30°C. Une inhibition totale de croissance est observée à pH supérieur à 9,6 ou lors d'une concentration en NaCl supérieure à 6,5%. Les lactocoques sont le plus souvent retrouvés sur les plantes, la peau des animaux, mais aussi dans les laits fermentés ou frais et les fromages. Utilisés comme ferments purs ou en mélange, ils ont un rôle primordial sur la structure, le goût, et la conservation des produits qu'ils fermentent.

Parmi les lactocoques, 37 génomes ont été séquencés. Une analyse par BLAST de ces génomes révèle un pourcentage d'identité de séquence de 99% entre les souches de sous espèces *cremoris* MG1363 et SK11, pour la souche IL1403 appartenant à une sous espèce différente le pourcentage d'identité est 89 % avec les souches MG1363 ou SK11 (Tableau 6).

Tableau 6 : Comparaison de trois sous espèces de *L. lactis*.

<i>Lactococcus lactis</i>	MG1363	IL1403	SK11
Génome (Mb)	2,53	2,44	2,36
% GC	35,8	35,4	36,8
Protéines codées	2436	2310	2384
Pourcentage d'identité	89 % entre MG1363 et IL1403 ou encore SK11 et IL1403 99% entre MG1363 et SK11		

Les souches de *L. lactis* possèdent aussi une grande source de diversité, les plasmides. Chez les lactocoques, il existe plus de 200 plasmides dont 86 seulement ont été séquencés. Les souches naturelles de *L. lactis* ssp. *cremoris* peuvent contenir de 4 à 7 plasmides. Ces plasmides apportent différentes fonctions le plus souvent d'intérêt technologique. Par exemple, ils peuvent permettre l'utilisation du lactose, une activité protéolytique extracellulaire, le transport du citrate, la sécrétion

de bactériocine, la résistance aux phages ou la production d'exopolysaccharides (122). C'est cette diversité plasmidique qui est à l'origine de la diversité des capacités métaboliques des différentes souches.

Les bactéries ont été divisées en deux groupes par Hans Christian Gram (160). Cette division est due comme on peut le voir dans l'Annexe 2, à des différences d'enveloppes entre les bactéries à Gram positif et celles à Gram négatif, que ce soit au niveau de la structure ou de la composition. Pour les bactéries à Gram positif, l'enveloppe est composée d'une épaisse couche de peptidoglycane et de polymères anioniques (acides téichoïques) (185). Suivant le point d'accroche des acides téichoïques on distingue deux acides différents, les acides téichoïques de la paroi (WTA) greffés au peptidoglycane, et les acides lipotéichoïques (LTA) fixés à la membrane plasmique. Ces acides forment une matrice chargée négativement entourant la bactérie (130). Ils peuvent piéger des molécules cationiques telles que des métaux et servent de réservoir pour les métalloenzymes. La structure des bactéries Gram positif comprend également des polysaccharides et d'autres protéines intervenant dans la biosynthèse des différents composés de la paroi, dans le transport de nutriments ou encore dans l'adhésion des bactéries. Concernant les bactéries à Gram négatif, la membrane externe (lipopolysaccharides (LPS) et de phospholipide) et de la membrane interne (double couche de phospholipides) entourent une fine couche de peptidoglycane dans l'espace périplasmique (160). Pour lutter contre les différents facteurs environnementaux, les cellules doivent maintenir un maillage fort du peptidoglycane. Pour cela la synthèse et la dégradation du peptidoglycane doivent être coordonnées. Chez *L. lactis*, cet équilibre est atteint en régulant les activités enzymatiques autolytiques, la principale autolysine étant AcmA (35).

Que ce soit chez les bactéries à Gram positif ou à Gram négatif on trouve des protéines membranaires qui ont différentes fonctions : enzymatique, de transport ou de respiration. Cependant en plus de ces protéines de surface, d'autres protéines situées habituellement dans le cytoplasme ont été retrouvées à la surface (Tableau 7).

Deux grandes enzymes glycolytiques, la Glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase (GAPDH) et l'Enolase sont représentées à la surface de *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Borrelia* ou encore *Staphylococcus* et *Streptococcus* (141). Chez plusieurs pathogènes, la GAPDH facilite la colonisation des cellules hôtes (141). Pour *Lactobacillus plantarum* la présence de GAPDH à la surface est jugée impliquée dans l'adhérence à la mucine gastrique et aux cellules Caco-2 (94) (149). Une analyse du protéome de surface de *L. lactis* TIL448 par Meyrand et *al.*; (118) a montré la présence en surface de : Nisine resistance protein, Pyruvate kinase, Fructose-biphosphate kinase ou encore de la GAPDH et d'autres enzymes du métabolisme carboné. Pour la plupart de ces enzymes du métabolisme carboné leur présence à la surface reste inexplicée.

Tableau 7 : Enzymes métaboliques retrouvées à la surface des bactéries. (141)

Enzymes	Bactéries	Références
Glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus gordonii</i> , <i>Mycobacterium avium</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Neisseria lactamica</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. lactis</i>	(143), (124), (129), (71), (118)
Phosphoglycérate kinase	<i>S. pyogenes</i> , <i>L. lactis</i>	(118)
Triosephosphate isomérase	<i>S. pyogenes</i> , <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	(56)
Phosphoglycérate mutase	<i>S. pyogenes</i> , <i>L. lactis</i>	(118)
alpha-énolase	<i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>L. lactis</i>	(118), (142)
Pyruvate deshydrogénase	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	(42)

III. Régulation du pool de NADH chez *L. lactis*

III.1. Production de NADH

La glycolyse est la voie principale d'utilisation des sucres. La Figure 9 synthétise les étapes de la glycolyse permettant la transformation de glucose en deux molécules de pyruvate avec libération d'énergie (ATP : Adénosine TriPhosphate) et de pouvoir réducteur.

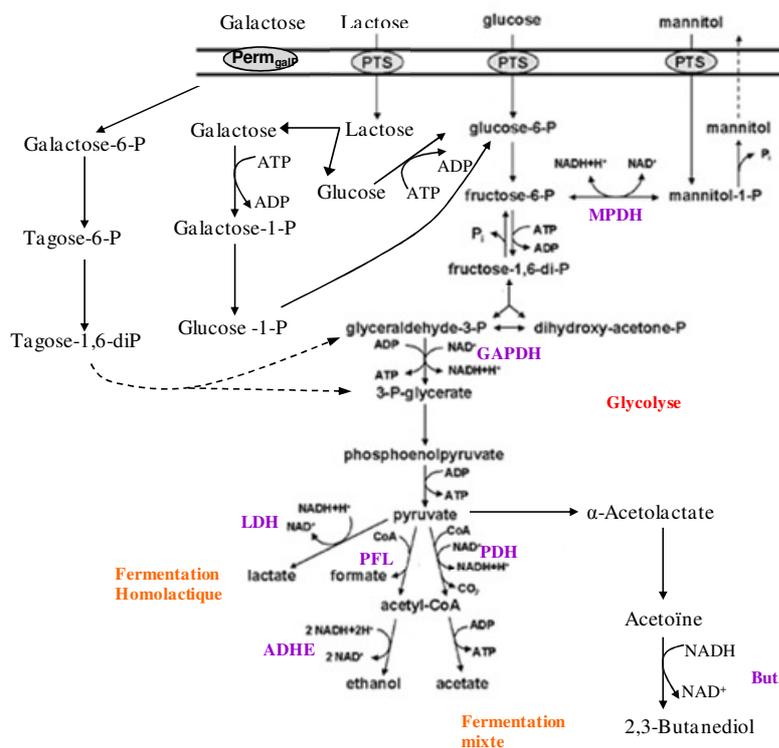


Figure 9 : Métabolisme carboné chez *L. lactis*. MPDH, Mannitol-1-phosphate deshydrogénase, GAPDH, Glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase, LDH, Lactate deshydrogénase, PFL, Pyruvate formate lyase, PDH, Pyruvate deshydrogénase, ADHE, Alcool deshydrogénase, ButA, Acetoïne réductase. (193) ; (152)

IV.1.1. Glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase

La Glycéraldéhyde-3-phosphate (GAPDH) permet la production d'énergie et le pouvoir réducteur, sous forme d'ATP et de NADH respectivement (Figure 9). Elle catalyse la seule réaction d'oxydation de la glycolyse, par phosphorylation oxydative du glucose-3-phosphate et du 1,3-biphosphoglycéraldéhyde *via* le NAD⁺. Chez *L. lactis*, des expériences montrent l'importance de l'activité de la GAPDH dans l'orientation du flux métabolique et dans le métabolisme du pyruvate chez les bactéries lactiques (37, 52).

La prise en charge par la GAPDH constitue une étape limitante pour le flux glycolytique. L'inhibition de l'activité GAPDH conduirait : (i) à une baisse de la glycolyse, due en partie à une modification du ratio NADH/NAD⁺ perturbant l'activité de certaines enzymes, et (ii) à l'augmentation du pool de FBP (fructose-1,6-bis-phosphate), un effecteur de plusieurs enzymes et de certains régulateurs. La GAPDH est fortement contrôlée par le ratio NADH/NAD⁺, le mécanisme d'inhibition correspond à une inhibition par compétition entre GAPDH et NAD⁺. L'enzyme a une activité maximale pour un ratio NADH/NAD⁺ compris entre 0 et 0,05. Le pH influence également l'activité de l'enzyme, entre un pH de 5 à 6 la GAPDH est fortement inhibée (116).

Deux gènes de *L. lactis* codent deux GAPDH NADH dépendantes, *gapB* et *gapA*. GapB est produite majoritairement et dans toutes les conditions de croissances testées. GapA est produite sous certaines conditions (16, 153). Vido *et al.*, (183, 184) ont montré que la GAPDH était sensible à l'oxydation conduisant à 2 isoformes. Celles-ci sont identifiables sur gel bidimensionnel. Ils ont également observé que la forme oxydée (la plus acide, pI bas) de GapB n'a plus d'activité enzymatique mais peut-être réactivée par réduction avec le DTT, ce qui indique que l'oxydation de GapB serait réversible par des systèmes enzymatiques.

IV.1.2. Mannitol-1-phosphate deshydrogénase

La Mannitol-1-phosphate deshydrogénase (MPDH) appartient à la famille des oxydoréductases, elle agit sur le groupe CH-OH (par exemple mannitol-1-phosphate) avec le NAD⁺ comme accepteur. Elle catalyse la conversion réversible du mannitol-1-phosphate en fructose-6-phosphate, un intermédiaire de la glycolyse. Ainsi la MPDH intervient dans l'homéostasie redox chez de nombreux microorganismes (131). La mise en place de ce métabolisme est une façon alternative de régénérer le NAD⁺ en absence de l'enzyme centrale LDH (Figure 9) (62, 133).

Naturellement, *L. lactis* ne produit généralement pas de mannitol. La formation de ce composé est obtenue lorsque sa capacité à régénérer le NAD⁺ est gravement entravée. Des forts taux de mannitol intracellulaire et de mannitol-1-phosphate ont été ainsi produits chez une souche de *L. lactis* déficiente en LDH (131).

IV.1.3. Pyruvate deshydrogénase

La Pyruvate deshydrogénase (PDH) est la première des trois enzymes du complexe pyruvate déshydrogénase. La PDH est constituée d'une décarboxylase, d'une acétyltransférase et d'une oxydo-réductase intervenant dans la décarboxylation oxydative irréversible du pyruvate en acétyl-CoA (165). Chez *L. lactis*, dans des conditions anaérobies le ratio NADH/ NAD⁺ à un rapport élevé, ce qui inhibe le complexe pyruvate deshydrogénase (164). Elle est également sensible à un pH élevé qui inhibe son activité (37, 82).

IV.2. Consommation du NADH

L'utilisation du pyruvate permet la régénération du cofacteur NAD⁺. Il existe des voies alternatives de dégradation du pyruvate qui participent à sa régénération, ces voies aboutissent à la production de métabolites supplémentaires, on parle de fermentation acide mixte (Figure 9).

IV.2.1. Lactate deshydrogénase

Chez *L. lactis* la L-lactate deshydrogénase (LDH) catalyse la conversion du pyruvate en L-lactate lors de la fermentation homolactique. La réduction du pyruvate par la LDH permet la régénération du cofacteur NAD⁺, réduit lors de la glycolyse. Elle intervient donc dans le maintien de la balance du ratio NADH/NAD⁺ et de l'activité réductrice intracellulaire.

Le gène de la LDH appartient à l'opéron *las* qui comprend également la Phosphofructokinase (PF) et la Pyruvate kinase (PK). Gaspar et *al.*, 2007 (63) rapportent que chez un mutant LDH (*L. lactis* FI9078), le glucose est toujours préférentiellement transformé en lactate. Ils ont identifié une deuxième activité LdhB codée par le gène *ldhB*. Le gène est de 1636 bp pour la souche FI9078 contre 314 bp dans la souche parentale *L. lactis* MG1363. Cette différence de taille est due à l'insertion d'un élément IS905 (1314 bp) créant un promoteur hybride en amont du gène *ldhB*. Contrairement à la LDH, l'affinité de LdhB pour le NADH et son activation par le FBP sont fortement dépendantes du pH.

Van Niel et *al.*, 2004 (180) ont démontré que la LDH est coréglée au niveau du substrat par au moins deux mécanismes. Le premier mécanisme est basé sur la régulation allostérique, tandis que le second apparaît comme une inhibition compétitive par le NAD⁺. Un fort ratio NADH/NAD⁺ augmente l'activité de la LDH.

IV.2.2 L'alcool deshydrogénase et l'acétoïne réductase

L'alcool deshydrogénase convertit l'acétyl-CoA en éthanol, en régénérant 2 molécules de NAD⁺ (Figure 9). L'expression de l'AdhE est 91 et 23 fois plus faible en respiration et en aération respectivement (146) Une étude de 1998 (5) avait déjà montré l'absence de formation d'éthanol en aérobiose, alors que le gène était fortement transcrit. De ce fait Pedersen et *al.*, (146) suggèrent que l'activité de AdhE est régulée par la quantité de NADH et non pas la présence d'oxygène.

L'acétoïne réductase (ButA) convertie l'acétoïne en 2,3-butanediol en utilisant une molécule de NADH, comme on peut le voir à la [Figure 9](#). Cette voie induit un taux de croissance et une biomasse plus élevée (61). En absence de LDH le 2,3-butanediol est surproduit, permettant alors la régénération du NAD⁺ et l'utilisation du pyruvate (59). Chez *L. lactis* le gène codant pour ButA est en opéron avec le gène *butB* (deshydrogénase du 2,3-butanediol).

IV.2.3. La NADH oxydase formant de l'eau (NoxE)

La NADH oxydase formant de l'eau (NoxE) codée par le gène *noxE* chez *L. lactis* TIL 46 permet à la bactérie de mieux croître en présence d'oxygène (172). Elle catalyse la réduction du dioxygène en H₂O en utilisant deux molécules de NADH, tel que présenté dans la [Figure 10](#). La diminution du ratio NADH/NAD⁺ par NoxE participe au flux métabolique, la surproduction de l'enzyme entraîne le passage d'un métabolisme homofermentaire à un métabolisme mixte (132). En outre, NoxE de *L. lactis* est impliquée dans la réduction d'autres composés oxydants, comme le 2,6-dichlorindophénol (DCIP) et le bleu de méthylène, qui sont des indicateurs colorés d'oxydoréduction (108).

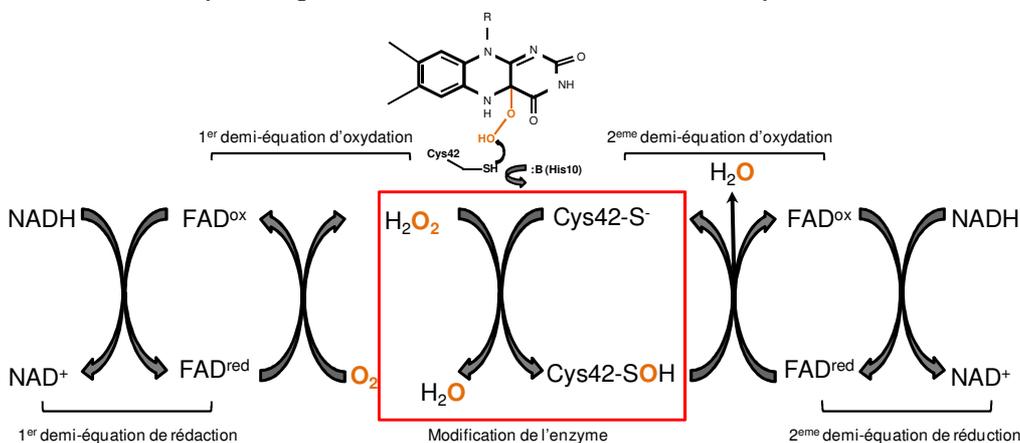


Figure 10 : Mécanisme d'action de la NADH oxydase NoxE. La réaction qui se produit au site actif est encadrée en rouge. Inspiré de (109)

Son activité dépend également du taux de croissance et du pH, un taux de croissance élevé entraîne une augmentation de son activité. A un pH inférieur à 6, NoxE est réversiblement inactivée, alors qu'à un pH supérieur à 9, l'enzyme est inactivée de façon irréversible. Le peroxyde d'hydrogène, les composés sulfhydryle actifs (HgCl₂, iodoacétate) et la quinine (inhibiteur spécifique des flavoprotéines) peuvent inhiber l'action de NoxE. L'activité de la NADH oxydase et son expression sont augmentées en présence d'oxygène (132), cependant les mécanismes de régulation impliquant l'oxygène ne sont pas connus. Dans une étude de 2003, Gaudu et *al.* (65) ont montré que le gène *noxE* était réprimé par le régulateur de la répression catabolique, montrant le rôle essentiel de NoxE dans le métabolisme carboné. Par ailleurs, chez *S. agalactiae*, cette enzyme est importante pour la synthèse des acides gras en maintenant l'activité du complexe PDH en aérobiose (195).

IV.2.4. La chaîne respiratoire

La plupart des bactéries lactiques sont équipées génétiquement pour avoir un métabolisme respiratoire, mais elles sont incapables de respirer si l'hème (ou son précurseur PPIX), n'est pas présent dans le milieu (102). L'hème est un cofacteur indispensable à la cytochrome oxydase le dernier accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire. Chez *L. lactis* la chaîne respiratoire comprend : les NADH deshydrogénases (NoxA, NoxB) membranaires qui transfèrent les d'électrons (27, 66), aux ménaquinones (128, 151) qui ensuite les transfèrent à la cytochrome *bd* oxydase (CydAB) qui réduit l'oxygène en eau (27, 51, 101).

D'autres bactéries lactiques telles que certains lactobacilles (*L. plantarum*) et les streptocoques (*S. agalactiae*) doivent acquérir en plus de l'hème les ménaquinones pour respirer (26, 196).

La respiration a pour conséquence de doubler la biomasse, de favoriser la résistance au stress et de stabiliser les microorganismes dans le temps, donc aide à la conservation. La Figure 11, synthétise les phénomènes expliquant cela (i) gain d'énergie, (ii) génère moins de stress acide car le NAD⁺ est régénéré *via* la chaîne respiratoire au détriment de la LdH (51), (iii) produit moins d'espèce toxique de l'oxygène (HO[°] ou H₂O₂), (iiii) agit comme une pompe à protons. Au niveau du métabolisme, la respiration diminue la production de lactate au profit des métabolites secondaires, l'acétoïne et l'acétate, condition moins acidifiante. La respiration est donc intéressante au niveau industriel pour améliorer la production de ferments et la production de composés aromatiques.

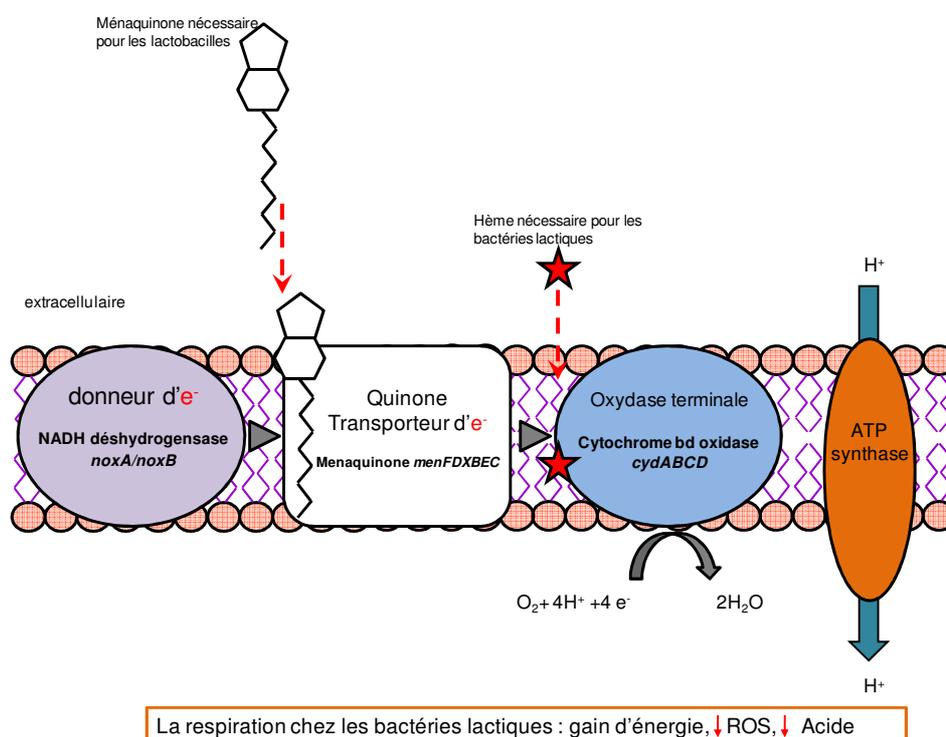


Figure 11 : Représentation schématique des composants de la chaîne de transport d'électrons chez les bactéries lactiques. Le donneur d'électron, et l'oxydase terminale constituent la chaîne respiratoire minimale. Les gènes présents chez *L. lactis* sont indiqués en dessous de chaque composant. Inspiré de (101).

Chez *L. lactis* les NADH déshydrogénases, NoxA et NoxB, interviennent dans la réduction des ménaquinones. NoxA et NoxB sont deux flavoprotéines codées par les gènes *noxA* et *noxB* (27). Les deux gènes sont régulés par un régulateur de la réponse catabolique (CcpA), le gène *noxA* est réprimé par CcpA alors que le gène *noxB* est activé par CcpA (198). L'étude de Brooijmans et *al.*, (26) suggère que NoxA est essentielle à la chaîne respiratoire, en l'absence de ce gène *L. lactis* B1157 possède un phénotype de respiration négatif.

IV.3. Les molécules à groupement thiol (-SH, -S⁻)

L'utilisation des acides aminés est également impliquée dans l'équilibre du ratio NADH/NAD⁺. Le catabolisme des acides aminés est également une voie alternative pour la production d'énergie (ATP) lors d'une carence en source de carbone. La cellule peut rester métaboliquement active *via* la voie de l'arginine déiminase, qui produit 1 mole d'ATP pour une mole d'arginine. La cellule est alors en état viable mais non-cultivable (58). Les enzymes du catabolisme (exemples : glutamate deshydrogénase, 3-phosphoglycérate deshydrogénase) utilisent à la fois le NADH ou le NAD⁺ pour les dégrader. Cette stabilité de l'équilibre énergétique permet à la cellule de maintenir sa force promotrice, en continuant d'importer de petits métabolites.

Dans la cellule, certains composés indispensables tels que la cystéine ou la méthionine sont constitués de soufre (Figure 12). La méthionine qui est le précurseur de S-adenosyltransférase (SAM), est indispensable aux réactions de la méthyltransférase, comme lors de la transformation des acides gras insaturés en CFA. La méthionine peut être transformée en cystéine et inversement. La voie de biosynthèse de ces acides aminés chez *L. lactis* est synthétisée dans la Figure 13.

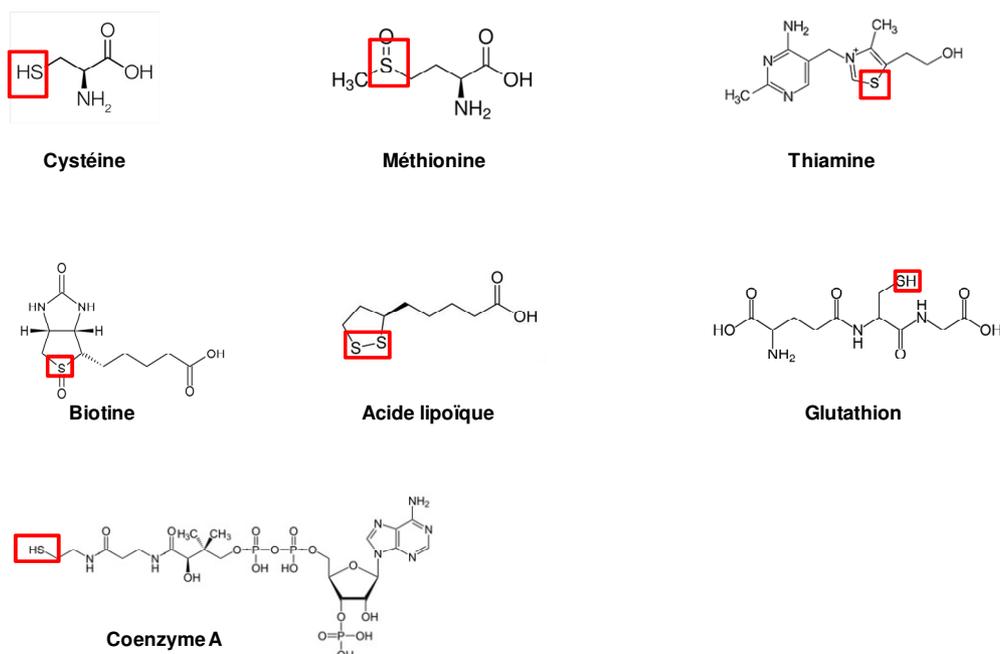


Figure 12 : Exemple de composés soufré indispensable à la cellule.

La cystéine a un rôle central, puisque sa synthèse est la voie principale d'acquisition de soufre chez les microorganismes et les plantes. C'est également un acide aminé important pour la fixation de fer notamment dans les domaines catalytiques, pour les cytochromes, l'aconitase et la GAPDH. La cystéine intervient dans la structure des protéines et dans leur stabilité par l'intermédiaire de ponts disulfures. Les protéines possédant des cystéines, telle que la thiorédoxine, jouent un rôle dans la protection contre le stress oxydant. Des composés importants pour les cellules sont aussi issus de la cystéine : des vitamines du métabolisme bactérien (la thiamine, la biotine), l'acide lipoïque (cofacteur de PDH ou de l' α -cétoglutarate deshydrogénase), le glutathion (propriétés oxydoréductrice) et le coenzyme A (important pour PDH et la synthèse des acides gras) (Figure 12).

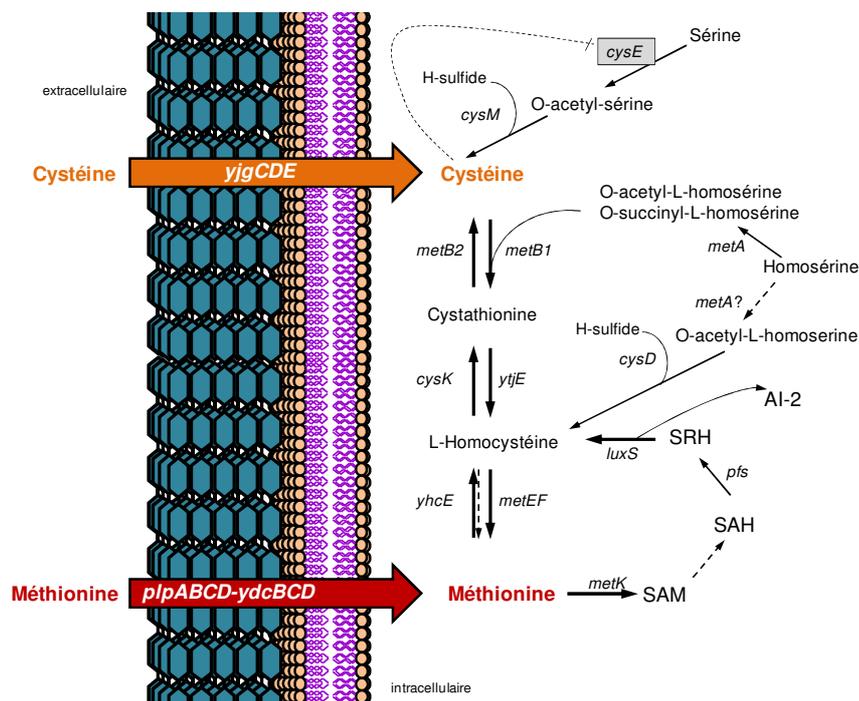


Figure 13 : Voie de biosynthèse de la cystéine et de la méthionine chez *L. lactis*. Flèches épaisses, gènes régulés par le manque de cystéine ; *cysE* encadré, contrôle par une rétroaction de la cystéine ; SAM, S-adenosyl-méthionine ; SAH, S-adenosylhomocystéine ; SRH, S-ribosylhomocystéine ; AI-2, autoinducer 2. (167)

Le gène *metC* (Cystathionine β -lyase) en opéron avec le gène *cysK* (Cystéine synthétase) (55) sont autorégulés par la concentration en méthionine et en cystéine. Chez *L. lactis* l'enzyme Cystathionine β -lyase dégrade les acides aminés contenant des sulfures, et catalyse la synthèse de la méthionine. *L. lactis* a été décrit comme étant prototrophe vis-à-vis de la cystéine et auxotrophe vis-à-vis de la méthionine (39). Fernández et al., (54) ont démontré que la cystéine et le glutathion réduisent l'activité de la cystathionine lyase et l'expression de l'opéron. En revanche l'ajout de méthionine ou de composés soufrés (sulfate, sulfite...) n'a aucun effet sur l'activité de la cystathionine lyase.

CHAPITRE 4 : Réponse aux stress due aux espèces réactives de l'oxygène

Le plus souvent, *L. lactis* n'est pas capable de respirer, cependant elle peut se développer en présence d'oxygène en le consommant et en éliminant ses dérivés, les espèces toxiques de l'oxygène (O_2° , H_2O_2 , HO°) ou ROS (Reactive Oxygen Species). Dans ce chapitre 4, nous décrirons les différentes voies de dégradation de l'oxygène et de ses dérivés.

En plus du métabolisme de l'oxygène, nous nous intéresserons aux rôles des thiols dans les mécanismes redox cellulaires et à leur possible implication dans l'activité réductrice de *L. lactis*. Au sein des protéines, les groupements thiols sont portés par les acides aminés cystéines et méthionines. Dans tous les organismes les groupements thiols sont impliqués dans l'acquisition de la structure tertiaire et quaternaire (75), la résistance aux stress tel que le stress oxydant (23), ou comme signalisation au sein d'une cellule ou entre cellules (104).

I. Les espèces réactives de l'oxygène

L'effet toxique de l'oxygène est dû aux ROS produits. Les dommages qu'ils provoquent au niveau cellulaire, moléculaire et métabolique sont majoritairement dus à des réactions d'oxydation. L'oxygène et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont les deux composés oxydants les moins toxiques pour la cellule. S'agissant de composés électriquement neutres ils sont capables de diffuser au travers de la membrane plasmique et ne s'accumulent pas dans le cytoplasme. Ils réagissent spontanément avec des composés réduits tels que des ions métalliques (Fe^{2+} et Cu^{2+}), les flavines, les quinones ou par des réactions enzymatiques entraînent la production d'ions superoxydes (O_2°) et de H_2O_2 (11). Certaines longueurs d'onde peuvent aussi activer l'oxygène en ion superoxyde, H_2O_2 en HO° .

L'ion superoxyde est chargé négativement à pH neutre, il peut donc s'accumuler dans le cytoplasme. Il est peu réactif et il est principalement responsable de l'oxydation des molécules à faibles potentiels redox (85). L'oxydation a lieu au niveau de certains groupements fer-soufre, entraînant une déstabilisation de cette structure dans les protéines (polyphénols, ascorbate, catécholamines) provoquant l'expulsion d'un atome de fer, inactivant l'enzyme.

H_2O_2 est plus ou moins toléré par les bactéries lactiques. L' H_2O_2 peut oxyder des groupements thiols libres des résidus cystéines de certaines enzymes affectant alors leurs activités, comme c'est le cas pour la Glucokinase ou la GAPDH (85). L' H_2O_2 est également responsable de dommages membranaires via la peroxydation des lipides (85, 123).

Le radical hydroxyle formé par la réaction entre l' H_2O_2 et les ions métalliques tels que le fer ferreux (Fe^{2+}). Il est le composé oxygéné le plus dangereux. Fortement instable et oxydant, il peut réagir avec toutes les molécules de la cellule : ADN, protéines, acides gras (84, 85, 123).

II. Les sources de ROS

II.1. Les ménaquinones

Lorsque la respiration est non fonctionnelle, l'oxygène est transformé en ions superoxyde, et d'autres composés, tels que le Fer (Fe^{3+}) ou le Cuivre (Cu^{2+}) sont réduits par les ménaquinones.

Les ménaquinones (MK) participent à différentes fonctions cellulaires, comme la formation de ponts disulfures dans les protéines périplasmiques (9), ou la défense contre le stress oxydant (166). Les lactocoques produisent le plus de ménaquinones que les streptocoques ou *Leuconostoc mesenteroides* par exemples (MK-8, MK-9, MK-10) (38, 128). Chez *L. lactis*, la production de MK a lieu quelles que soient les conditions de croissance et leur métabolisme (respiration ou fermentation). Brooijmans et al., (26) ont montré que la production de MK était plus importante en fin de croissance et deux fois plus importante en anaérobiose qu'en aérobiose.

L'implication directe et indirecte des ménaquinones et des NADH deshydrogénases associées dans la réduction de l'oxygène ou d'autres composés oxydants, font qu'elles ont un rôle important dans l'activité réductrice de *L. lactis*. Par exemple, les ions superoxydes produits par les ménaquinones restent à l'extérieur de la cellule et peuvent oxyder ou réduire des composés du milieu. La réduction des ions superoxydes peut se faire par le fer ferreux ou le manganèse présent dans le milieu. De ce fait les ménaquinones réduisent indirectement d'autres composés du milieu tels que Fe^{3+} et Mn^{3+} , mais elles réduisent directement Cu^{2+} et Cu^+ mais aussi le Fer (151). Tachon et al., (173) ont montré que les ménaquinones étaient importantes dans la réduction des sels de tétrazolium en milieu gélosé.

II.2. Pyruvate oxydase/ Lactate oxydase

La Pyruvate oxydase et la lactate oxydase réduisent l'oxygène en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

La pyruvate oxydase catalyse la décarboxylation du pyruvate en générant du peroxyde d'hydrogène, du CO_2 et de l'acétyl-phosphate selon le mécanisme décrit dans la [Figure 14](#). Son rôle est de maintenir la production d'énergie lorsque la principale source de carbone est épuisée en condition aérobie. En effet l'acétyl-phosphate produit, est transformé en acétate par l'Acétate kinase qui génère de l'ATP. Chez *S. pneumoniae*, la Pyruvate oxydase, codée par le gène *spxB* est active en présence d'oxygène et lorsque tout le glucose est métabolisé (175). Lors de la conversion du pyruvate, SpxB induit une concentration élevée d' H_2O_2 inhibant partiellement une des enzymes nécessaires à la production en acide gras, FabF (14).

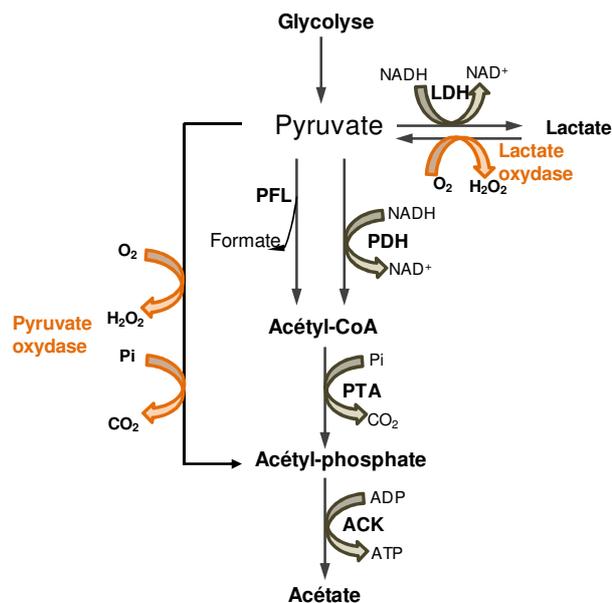


Figure 14 : Réactions catalysées par la Pyruvate oxydase et la Lactate oxydase. Pi ; Phosphate inorganique.

La Lactate oxydase réalise la réaction inverse de la Lactate déshydrogénase, elle catalyse la conversion du lactate en pyruvate en utilisant l'oxygène comme cofacteur et non le NAD⁺ tel que décrit dans la [Figure 14](#). Elle réalimente la Pyruvate oxydase en pyruvate et maintient la production d'énergie en présence de lactate (175). Chez *L. lactis* IL1403 l'expression du gène *lctO* codant la Lactate oxydase est induite en présence de cuivre par le régulateur CopR (112). En présence de cuivre, elle réagit avec l'oxygène et évite que celui-ci réagisse avec le cuivre ce qui limite la production de dérivés réactifs spécifiques de l'oxygène plus toxique que l'H₂O₂ (12). Cependant cette enzyme n'est pas présente chez toutes les souches de Lactocoque, seulement les souches de sous espèce *L. lactis* subsp. *lactis* tel que IL1403.

III. La défense contre les ROS

III.1. Les différents mécanismes de détoxification enzymatique et non enzymatique

Différents mécanismes de défense contre les ROS existent chez les Lactocoques, allant de la réaction enzymatique au système non protéique ou de réparations des dommages. Ces systèmes sont présentés dans la [Figure 15](#).

Pour HO[°] il n'existe pas de système de détoxification spécifique, mais certaines molécules telles que le glutathion, la cystéine et le pyruvate sont capables de le neutraliser. Aussi, pour limiter la production de HO[°], la cellule a su développer différentes stratégies. La première est d'éviter la production d'H₂O₂ via l'activité de la NADH oxydase qui forme de l'H₂O. Ils existent aussi des protéines qui piègent le fer intracellulaire comme DpsA et DpsB (170), limitant la réaction de Fenton (réaction d'oxydation entre H₂O₂ et Fe²⁺ produisant du HO[°]).

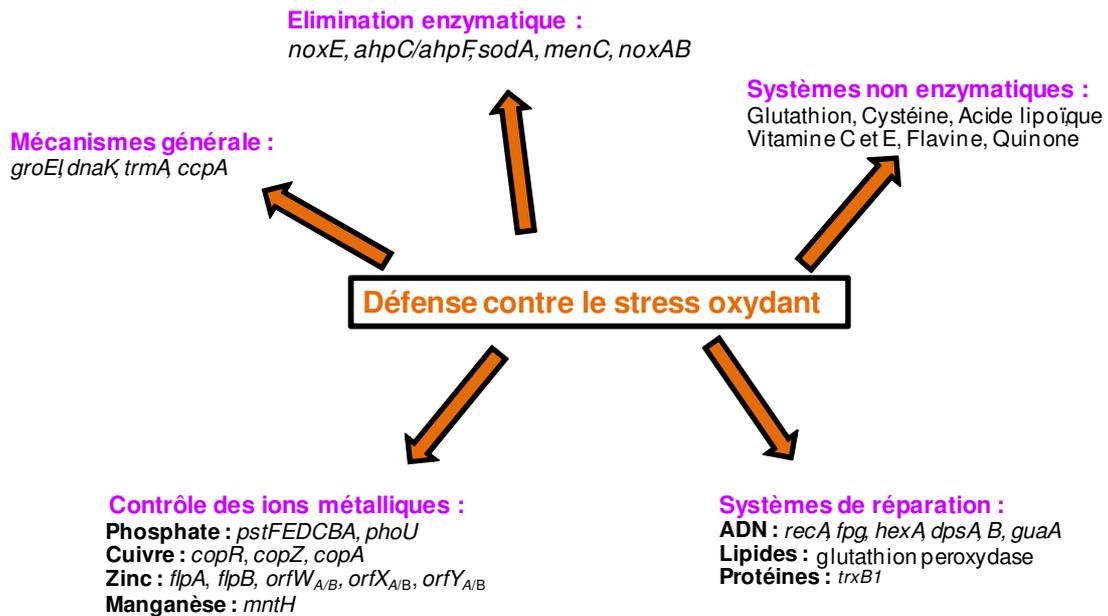


Figure 15 : Les différents systèmes enzymatiques, protéiques, non protéiques chez *L. lactis* impliqués dans la défense contre le stress oxydant. *groEL* et *dnaK*, Heat shock proteins ; *trmA*, régulation de gène (homologue à *spx*) ; *ccpA*, régulateur catabolique ; *noxE*, NADH oxydase formant de l'eau, *ahpC/ahpF*, Péroxydase/NADH oxydase formant des peroxydes ; *sodA*, Superoxyde dismutase ; *menC*, synthèse ménaquinone, *noxA/B*, NADH deshydrogénase membranaire ; *recA*, réparation ADN ; *fpg*, Formamido-pyrimidine DNA glycosylase ; *dpsA, B*, protège ADN ; *guaA*, biosynthèse de la purine ; *trxB1*, Thiorédoxine réductase ; *pstFEDCBA*, operon transport du phosphate ; *phoU*, régulateur de phosphate ; *copR*, Régulateur de l'homeostasie du Cu^{2+} ; *copZ*, chaperon Cu^{2+} ; *copA*, export ATPase du Cu^{2+} ; *flpA*, régulation de la consommation et du stockage du Zn^{2+} ; *orfW_{A/B}*, consommation Zn^{2+} ; *orfX_{A/B}*, transport Zn^{2+} ; *orfY_{A/B}*, stockage Zn^{2+} ; *mntH*, transporteur de manganèse et de fer. Inspiré de (162)

De plus, l'activité de la Superoxyde dismutase (SOD) permet de limiter la réaction de Fenton en abaissant la quantité de fer libre à partir des centres Fe-soufre. Celle présente chez les Lactocoques n'est active qu'en présence de manganèse (179). Chez les bactéries lactiques, l'élimination des ions superoxydes peut également se faire par des systèmes non enzymatiques, tels qu'un taux élevé en glutathion intracellulaire (mais absent chez *L. lactis*) (84) ou par le manganèse cellulaire (156). *L. plantarum* ne possède ni SOD ni catalase, en revanche le manganèse qu'elle cumule au niveau intracellulaire, lui permet de se défendre contre les espèces toxique de l'oxygène (4).

La plupart des bactéries lactiques n'ayant pas de catalase (élimination de H_2O_2 en H_2O) détoxifient H_2O_2 par des peroxydases. Quatre gènes sont annotés comme codant des peroxydases dans le génome de *L. lactis* MG1363 : *tpx*, une Thiol peroxydase ; *gpo*, une Glutathion peroxydase ; *cpo*, une non-hème Chloride peroxydase et *ahpC*, la peroxyredoxine du complexe AhpR. Les deux enzymes Gpo et Tpx sont activées par la glutathion peroxydase/réductase et le système Thiorédoxine respectivement (106).

D'autres mécanismes non enzymatiques permettent l'élimination de H_2O_2 . Van Niel et al., (179) ont également montré que le diacétyle produit lors de la fermentation mixte, interagit avec

H_2O_2 . La réaction entre le pyruvate et H_2O_2 produit de l'eau, de l'acétate et du CO_2 (179). Le pyruvate restaure une croissance chez un mutant thioredoxine reductase (183).

Lactobacillus reuteri est un autre exemple décrivant l'importance des cystéines dans la lutte contre le stress oxydant. Les cystéines ou les dérivés comme le glutathion sont essentiels pour la défense contre les dommages causés par le H_2O_2 (114). Par exemple le glutathion *via* le système glutathion peroxydase/ réductase protège les protéines contre des endommagements irréversibles. En revanche, chez *E. coli*, l'augmentation de la concentration intracellulaire en cystéine provoque un environnement prooxydant favorisant les dommages sur l'ADN (144).

Des anti-oxydants comme l'acide α -lipoïque et son équivalent réduit l'acide dihydrolipoïque possèdent une spécificité pour les ROS. L'acide dihydrolipoïque participe aux réactions d'oxydo-réduction thiol-disulfure pour former l'acide α -lipoïque. L'action anti-oxydante de l'acide α -lipoïque permet de piéger $\text{HO}\cdot$ et O_2^- (140). Il a été également montré former des complexes stables avec des métaux comme Mn^{2+} , Cu^{2+} et $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. L'acide déhydroascorbique a lui la capacité de piéger $\text{HO}\cdot$, le radical peroxyde, le O_2^- et de chélater le Fe^{2+} ainsi que le Fe^{3+} (125).

III.2. Le système AhpR

Outre la NADH oxydase NoxE, *L. lactis* en possède une seconde, AhpF, qui consomme l'oxygène *in vitro* mais produit du peroxyde d'hydrogène *via* le NADH (89). Le produit d'AhpF est ensuite réduit en eau par AhpC.

Pour que AhpC puisse être active, elle doit être réduite par AhpF, qui fonctionne alors comme une disulfure réductase (76). Ces deux protéines forment le complexe Alkyl hydroperoxyde réductase (AhpR). La réaction globale de ce système décrite dans la Figure 16 est équivalente à l'action de NoxE, mais la part de l'oxygène réduit en eau par AhpR est faible (90). Chez *L. lactis* les deux protéines sont codées par les gènes *ahpF* et *ahpC*, induit légèrement par le régulateur du métabolisme azoté CodY (73). L'activité disulfure réductase d'AhpF pourrait aussi intervenir dans la réduction d'autres composés oxydants que l'oxygène.

AhpF est composée d'un domaine liant le FAD désigné par le cadre dans la [Figure 16](#), et de deux centres redox-actifs à motif Cys-X-X-Cys représentés par les cercles 2 et 3 dans la [Figure 16](#) pouvant fixer des nucléotides à pyridine. La rotation des centres redox par rapport au domaine FAD ([Figure 16 cadre 1](#)), alterne d'une position où elle peut prendre des électrons du nucléotide, et à une position où elle peut livrer des électrons au centre redox ([Figure 16 cercle 2](#)). AhpF agit comme donneur direct d'électrons ([Figure 16 cercle 3](#)) dans le processus de réutilisation d'AhpC. Les cystéines de AhpC sont oxydées en pont disulfure pendant la catalyse de réduction du peroxyde. Cette liaison correspond aux centres redox-actifs décrit par les cercles 4 de la Figure 16. AhpF est le donneur d'électrons aux substrats hydroperoxydes, formant une molécule d'eau et l'alcool correspondant (ou une deuxième molécule d'eau) ([Figure 16](#)).

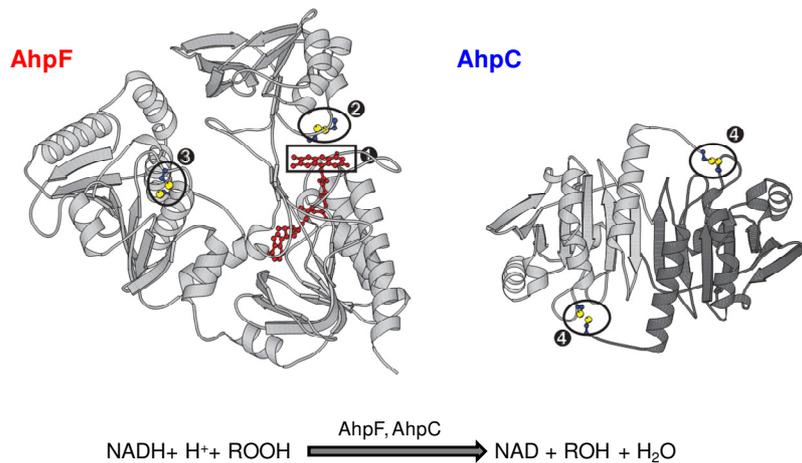


Figure 16 : Les sous-unités de l'alkylhydroperoxyde réductase, AhpF et AhpC. Les nombres indiquent l'endroit et l'ordre de la réaction des centres redox dans les deux structures de protéines (représentées en rubans, excepté pour les atomes des centres rédox représentés en boules et bâtons). Le cadre marqué 1 représente le site de fixation du noyau isoalloxazine de la flavine, les cercles 2 à 4 indiquent les centres redox-actifs à cystéines (11).

III.2. Thiol réductases cytoplasmiques

III.2.1. Le système Thiorédoxine réductase

La thiorédoxine est une petite protéine redox (d'environ 12 kDa) avec deux résidus cystéine rédox-actifs dans le site actif : - Cys-Gly-Pro-Cys. La thiorédoxine existe sous la forme réduite dithiol ou sous la forme oxydée disulfure. La fonction thiol réducteur de la thiorédoxine est basée sur la réaction rapide entre la thiorédoxine et les substrats, dont elle réduit rapidement les ponts disulfures. La thiorédoxine oxydée (Trx-S₂) est réduite par le NADH et la thiorédoxine réductase contenant du FAD comme décrit [Figure 17](#).

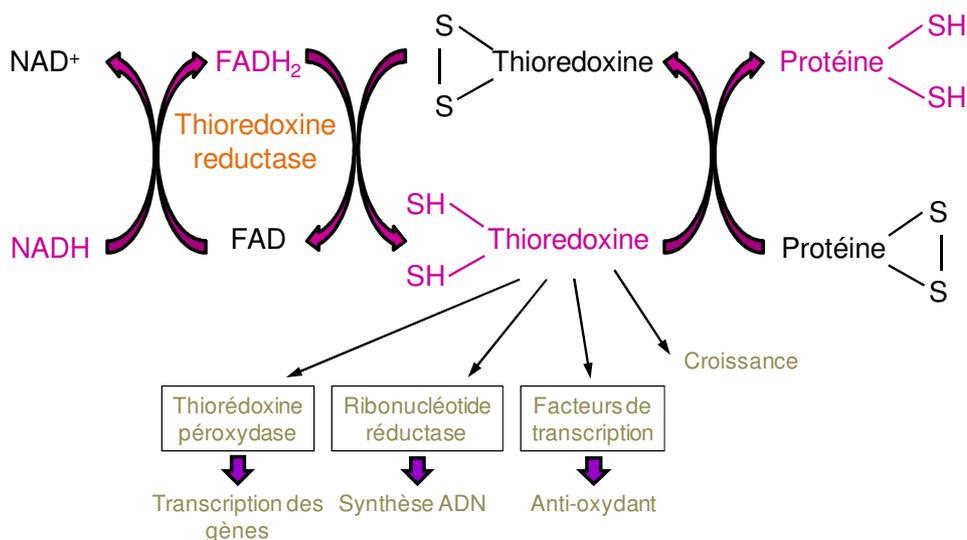


Figure 17 : Système thiorédoxine. Inspiré de (6).

La thiorédoxine est responsable du maintien d'un environnement réducteur dans le cytosol de toutes les cellules. Ce système enzymatique intervient donc dans le contrôle de la balance thiol-disulfure du cytoplasme, qui joue un rôle important dans l'activité et la structure des enzymes. De même, la thiorédoxine est impliquée dans le système de défense contre le stress oxydant chez de nombreuses espèces dont *L. lactis* (183). Les autres fonctions de la thiorédoxine comprennent la régulation d'enzymes redox et des facteurs de transcription par l'intermédiaire de thiol (par exemple OxyR) (192).

Contrairement à *B. subtilis* où la délétion du gène de la thiorédoxine (*trxBI*) est létale, chez *L. lactis* ce n'est pas un élément essentiel à la croissance. Cependant, la délétion de ce gène chez *L. lactis* conduit à une augmentation de la forme oxydée de l'enzyme glycolytique GAPDH, et induit la production de protéines impliquées dans la biosynthèse des acides gras et des ménaquinones, considérés comme des indicateurs d'un déséquilibre rédox (183). Dans cette étude est suggérée l'existence d'une autre fonction redox qui compenserait la déficience en thiorédoxine, TrxB1.

III.2.2. Le système Glutarédoxine/ glutathion/ glutathion réductase

Le glutathion est un tripeptide (glutamine, cystéine, glycine) dont le fonctionnement est similaire à celui de la thiorédoxine. La Glutathione réductase réduit le glutathion GSSG en glutathion GSH via les électrons fournis par le cofacteur NADH (Figure 18). Le glutathion GSH peut alors intervenir soit comme cofacteur enzymatique soit comme donneur d'électrons à la glutarédoxine qui est une Thiol-disulfure oxydoréductase capable de réduire les ponts disulfures de protéines, de glutathionyler des protéines ou des composés thiol-disulfure non-protéiques (11).

Le GSH est rencontré chez les eucaryotes et les bactéries Gram (-). Les bactéries Gram (+) ne sont pas capables de le synthétiser, cependant certaines souches peuvent l'utiliser. Chez les microorganismes qui le produisent, le GSH joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie redox intracellulaire. Le GSH est impliqué dans de nombreux mécanismes biologiques, tels que le stockage de cystéine, la stabilisation des structures et des fonctions protéiques, la régulation d'activités enzymatiques via la réduction de pont disulfure et dans des mécanismes de résistance au stress oxydatif. Lors d'un stress oxydant, le GSH fonctionne en partenariat avec la GSH peroxydase (*gpo*) pour éliminer efficacement le H₂O₂ intracellulaire.

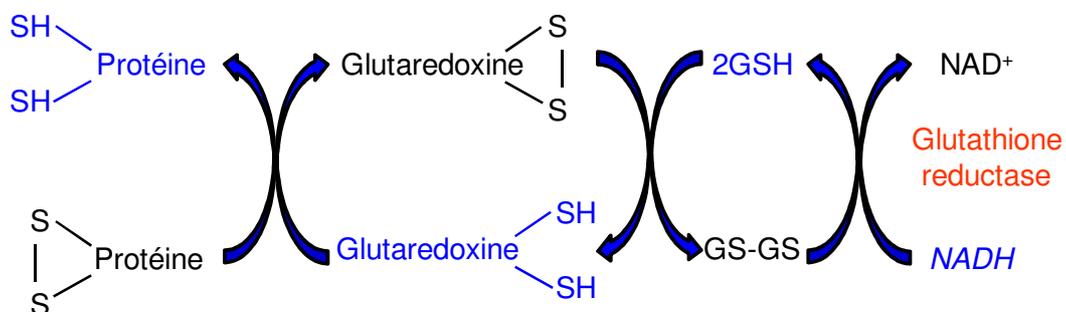


Figure 18 : Système Glutarédoxine/ glutathion/ glutathion réductase. Inspiré de (11)

L. lactis, incapable de synthétiser le GSH, peut néanmoins l'accumuler dans son cytoplasme après l'avoir importé du milieu extracellulaire (53, 191). La souche *L. lactis* ssp *cremoris* SK11 peut en accumuler jusqu'à 60 mM. La présence du glutathion permet à la souche d'augmenter de cinq fois sa résistance au stress oxydatif, en éliminant l' H_2O_2 en eau par la glutathion peroxydase, dont l'activité est augmentée en condition aérobie.

IV. Système réducteur thiol-disulfure à la surface cellulaire

Chez les eucaryotes et les procaryotes, la maturation des domaines protéiques extracellulaires par formation de ponts disulfures, est une étape très importante. Pour maintenir l'activité catalytique d'enzymes métaboliques, ou de certaines protéines *via* des modifications de l'état rédox de leurs cystéines, et également pour que les protéines atteignent leur conformation native, les réactions rédox thiol-dépendantes sont essentielles. Le cytoplasme étant un environnement réducteur, il est peu favorable à la formation de ponts disulfures, c'est pour cela que la plupart des protéines possédant des ponts disulfures sont retrouvées à l'extérieur ou à la surface cellulaire. Ainsi, grâce au système enzymatique Thiol-disulfures oxydoréductases (TDOR), qui catalyse des échanges thiol-pont disulfure, les protéines ont un repliement fonctionnel. Le site actif de ce système est appelé motif thiorédoxine pour son homologie de structure avec celui de la thiorédoxine, en effet le motif est constitué de deux cystéines Cys-X-X-Cys (X est un acide aminée). Les systèmes TDOR sont localisés dans le réticulum endoplasmique pour les eucaryotes, et dans le périplasma ou à la surface cellulaire chez les procaryotes. Entre les bactéries Gram (-) et Gram (+), les mêmes systèmes TDOR ne sont pas retrouvés, cependant ils ont la même utilité.

IV.1. Le système TDOR chez les bactéries Gram(-)

Chez les bactéries Gram (-) représentées par *E. coli*, deux protéines TDORs sont retrouvées, DsbA libre dans le périplasma où se forment les ponts disulfures, et DsbB ancrée à la membrane cytoplasmique. Selon le mécanisme décrit dans la [Figure 19](#), elles catalysent la formation des ponts disulfures des protéines périplasmiques.

DsbA possède un motif CXXC et agit comme une Thiol oxydase. Lorsque le polypeptide nouvellement synthétisé apparaît dans le périplasma, le pont disulfure entre les cystéines du motif de DsbA est rapidement transféré à la protéine cible, tel que présenté dans la [Figure 19](#). Par rapport à la thiorédoxine dont le potentiel redox standard est de -270 mV, DsbA à un potentiel plus élevé de -119 mV, ce qui fait de cette protéine à thiols, la plus oxydante connue (159). Lorsque que DsbA est réduite, elle doit être ré-oxydée par DsbB qui est une Quinone réductase. DsbB transfère ses électrons vers les ubiquinones qui les transportent ensuite vers une oxydase en condition aérobie. En anaérobiose ce sont les ménaquinones qui transportent les électrons de DsbB, et elles sont réoxydées par une oxydoréductase telle que la Fumarate réductase.

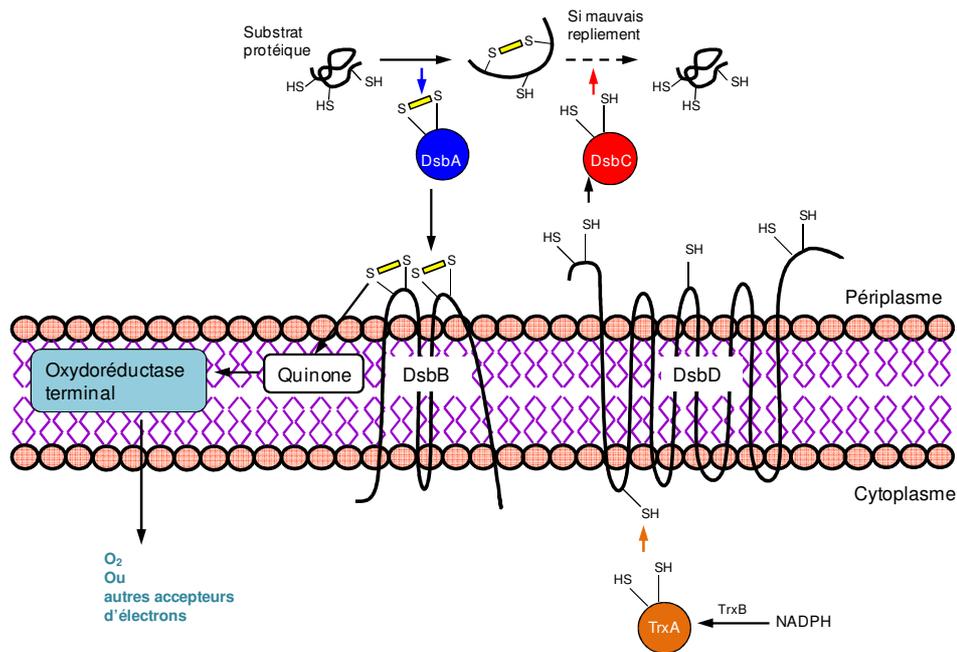


Figure 19 : Modèle de formation de ponts disulfures dans le périplasm d'*E. coli*. La flèche noire, indique la réaction oxydante catalysée par DsbA. Lors d'un mauvais repliement de la protéine, DsbC peut assurer le bon repliement de la protéine en agissant en tant que réductase (flèche pointillée) ou isomérase de la liaison disulfide incorrecte. Les flèches bleues indiquent le sens de réduction des électrons. Inspiré de (11)

Un second système composé de DsbC et DsbD existe chez les bactéries Gram (-). Par rapport au premier système, DsbC-DsbD permet l'isomérisation des paires de cystéines incorrectement assemblées lors de la maturation des protéines. DsbC est composée d'un motif thiorédoxine catalysant la réaction d'isomérisation des protéines dans le périplasm. DsbC est maintenue à l'état réduit par le transfert des électrons du motif CXXC de DsbD réduit ancré à la membrane. La protéine DsbD possède un second motif CXXC cytoplasmique qui lui permet d'être maintenue à l'état réduit par la réduction de ce motif *via* la thiorédoxine.

IV.2. Les systèmes TDOR chez les bactéries Gram (+)

Les bactéries Gram (+) sont dépourvues de périplasm mais des protéines dont l'activité est similaire à celle citée précédemment ont été retrouvées. Chez *Bacillus subtilis* par exemple (98), les TDORs sont nommés Bdb pour *Bacillus* disulfide bond, et sont constituées de BdbD et BdbBC, la première protéine a une activité thiol oxydase, et la seconde a une activité thiol oxydase et quinone oxydase, comme le décrit la [Figure 20](#). Un second système est aussi présent chez *Bacillus*, le centre réducteur CcdA est associé à deux TDORs qui présentent des fonctions et une structure similaire à DsbD de *E. coli*. Un autre système TDOR a été étudié chez *B. subtilis*, ResA, appartenant à l'opéron *resABCDE* (171). ResA intervient dans le mécanisme de maturation de l'apocytochrome C (79). Cette protéine a un rôle équivalent à celui de la protéine DsbE chez *E coli* K-12 (150).

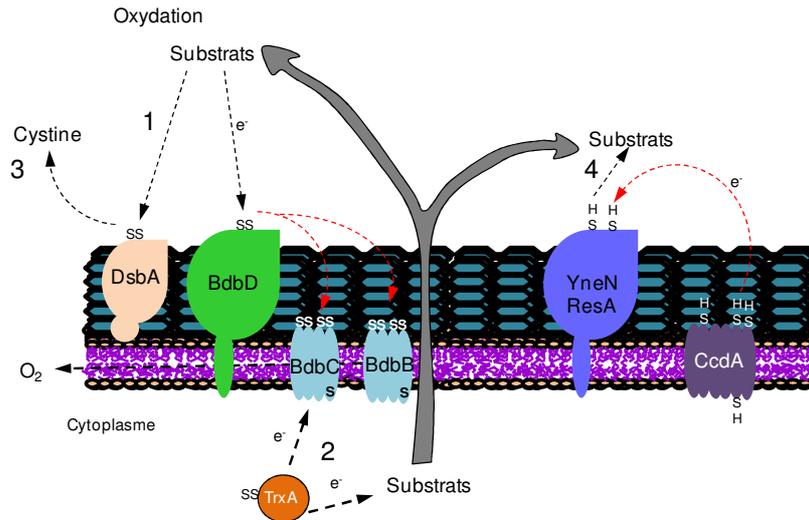


Figure 20 : Modèle de formation de ponts disulfures à la surface de *Bacillus subtilis*. (1) Oxydation du substrat par DsbA ou BdbD. Ce dernier est ré-oxydé par BdbC/BdbB (capte les électrons) (2) active grâce à l'action de la thiorédoxine (TrxA). (3) L'oxydation du substrats par DsbA éjecte des composés redox-actifs dans le milieu. La seconde voie est CcdA (4) qui transmet les électrons provenant des thiorédoxines à plusieurs substrats YneN (fonction inconnu) ou ResA (maturation cytochrome). Flèches à tiret, sens des électrons ; Flèches grises : Protéines exportées du cytoplasme. Inspiré de (97).

Chez les bactéries Gram (+) à faible pourcentage en GC, quelques séquences TDORs ont été identifiées chez *Lactobacillus sakei*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Listeria* (96). Chez *S. gordinii*, d'après Davey *et al.*, (44) le système est nommé SdbA (*Streptococcus* disulfide bond protein A). Le système SdbA intervient dans de nombreuses activités cellulaires : formation de biofilm, activité bactériocine et la compétence, la formation de ponts disulfures. Pour finir, le système SdbA possède une forte homologie de séquence avec des protéines redox active TlpA, DsbE et ResA. La protéine TlpA, présente chez la souche *S. pneumoniae* est considérée comme appartenant à la famille des antioxydants thiol-spécifique. Andisi *et al.*, (3) ont montré que cette lipoprotéine membranaire avait une action réparatrice sur les protéines de surface contenant les méthionines sont oxydées. Outre son rôle dans la résistance à un stress au peroxyde extérieur, TlpA intervient dans la virulence.

Pour *L. lactis*, il n'y a pas de système TDOR identifié à partir du génome ou démontré expérimentalement.

CHAPITRE 5 : Conclusion de la synthèse bibliographique et objectif du travail de thèse

Le potentiel redox a un impact sur les propriétés organoleptiques (stabilité et production de composés aromatiques), ainsi que sur le développement de la flore d'intérêt ou d'altération dans les produits fermentés. Son contrôle et sa maîtrise semblent être importants pour limiter l'apparition de défauts de qualité et améliorer la standardisation des produits fermentés. La plupart des méthodes utilisées pour contrôler ou faire varier ces paramètres sont souvent inadaptées, néfastes (modification d'arômes) et coûteuses. La meilleure alternative serait d'utiliser les capacités réductrices des bactéries lactiques pour moduler le potentiel redox dans les produits fermentés.

L'utilisation de Lactocoques pour moduler le E_h du milieu nécessite d'identifier les mécanismes physiologiques impliqués dans cette activité réductrice. La [Figure 21](#) synthétise les différents systèmes connus chez *L. lactis* pouvant jouer sur le E_h , (i) les mécanismes redox intervenant dans le transfert d'énergie (cycle de la glycolyse, chaîne respiratoire), dans la maturation et le repliement de protéines cytoplasmiques. (ii) L'élimination de l'oxygène, par l'activité de la NADH oxydase NoxE (172). (iii) Une étude préliminaire a suspecté l'implication des protéines à thiols exofaciaux dans la stabilisation du E_h à -200 mV en fin de croissance (120), comme décrit précédemment chez *E. coli* et *B. subtilis*. Une corrélation entre des variations du E_h et le nombre de groupements thiols exofaciaux accessibles avait été observée par Oktyarbr'skii *et al.*, (139). Cependant les systèmes mis en jeu ne sont pas identifiés à ce jour. Une première approche dans l'identification de ces systèmes a été développée chez *L. lactis*. En utilisant des molécules capables de neutraliser les thiols Michelon *et al.*, (120) suggèrent que les groupements thiols exofaciaux sont responsables du E_h réducteur atteint par *L. lactis* TIL46. Une analyse protéomique par un marquage spécifique des protéines de surface à thiol laisse penser que des protéines exposant des motifs CXXC pourraient spécifiquement être impliquées dans l'activité réductrice de *L. lactis* TIL46. Cependant à la fin de ce travail aucune protéine n'avait été identifiée comme telle.

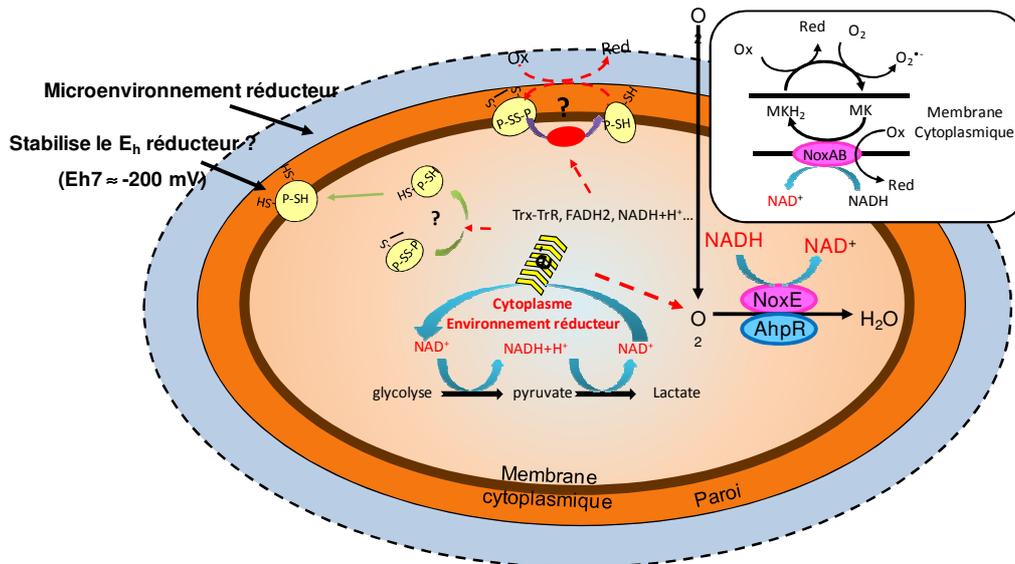


Figure 21 : Synthèse des différents mécanismes cellulaires intervenant dans l'activité réductrice de *L. lactis*.

Le présent travail a pour objectif d'identifier des protéines à groupements thiols présentes à la surface pouvant être impliquées dans l'activité réductrice de *L. lactis*. Pour les rechercher deux analyses ont été faites en parallèle. Une recherche *via* des logiciels de bioinformatique, et une analyse protéomique/biochimique, la Figure 22 résume les principaux objectifs et les stratégies mises en œuvre pour y répondre.

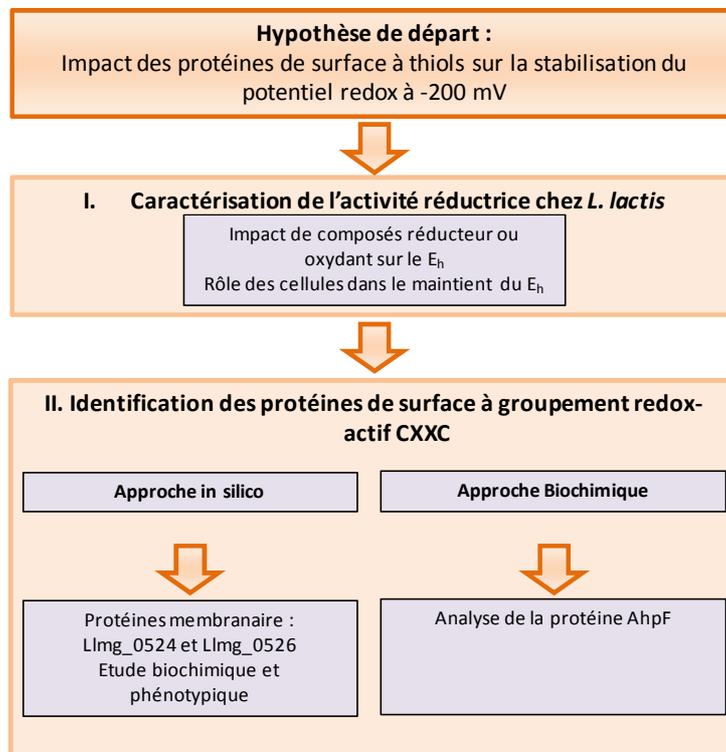


Figure 22: Schéma des principaux objectifs du travail de thèse et des stratégies mises en œuvre.

MATERIELS ET METHODES

I. Matériels biologiques et conditions de croissance

Toutes les espèces et souches bactériennes utilisées sont présentées dans l'Annexe 3. Les souches de *L. lactis* ont été cultivées à 30°C, sans agitation en milieu M17. Les bactéries *E. coli* ont été développées en milieu LB (Luria-Bertani) à 37°C, sous agitation à 200 rpm. Pour sélectionner les transformants, 100 µg/ml d'ampicilline ou 5 µg/ml de tétracycline ou 0,1 µg/ml d'érythromycine ont été ajoutés au milieu lors de la croissance.

Les fermentations ont été réalisées dans des flacons Schott modifiés (flacons Schott, col GL45, Polylabo, France) de 250 ml (Figure 23) pour pouvoir permettre : le bullage de gaz à l'intérieur du flacon (condition anaérobie). L'ensemencement et les prélèvements sont réalisés à l'aide d'une seringue.

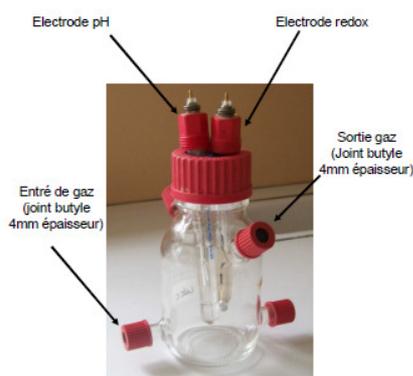


Figure 23 : Dispositif expérimental pour la conduite des fermentations en milieu liquide dans des flacons Schotts modifiés.

En anaérobiose, les flacons dégazés par un bullage sous N₂ sont placés dans l'enceinte Bactron I (Figure 24) inertée du même gaz. Le pourcentage d'oxygène dans l'enceinte est maintenu à 0% (v/v) et suivi via un capteur permettant de détecter toute rupture de l'anaérobiose (OLDHAM MX32, Industrial Scientific, Arras, France). Les flacons ont été ensemencés dans l'enceinte Bactron I où la température est de 30°C.

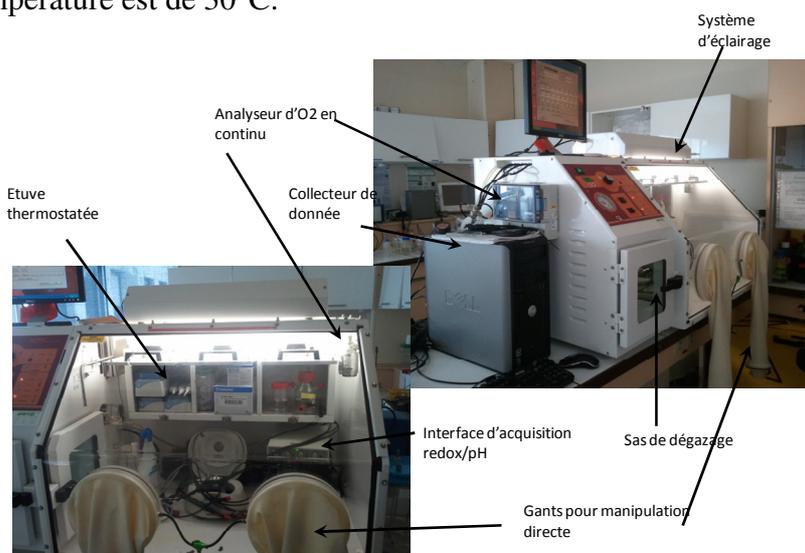


Figure 24 : Enceinte Bactron I (Sheldon Manufacturing, Cornelius, USA) permettant les expérimentations en anaérobiose (N₂).

II. Mesure du E_h et du pH

Le pH et le E_h ont été suivis au cours du temps grâce à une sonde redox combinée stérile (405-DXK-SC K8S/120 Mettler Toledo SARL, Paris, France) et d'une électrode pH combinée stérile (4805-DXK-S8/120, Mettler Toledo SARL, Paris, France). Les données ont été collectées sur une interface multi-canaux (ELIT 8088 multi-channel pH-meter/redox-meter Computer interface, Bioblock, Ilkirch, France). Avant chaque utilisation, l'anneau de platine des électrodes redox a été poli à l'aide d'une poudre d'alumine (oxyde d'alumine, VWR Prolabo, Lyon, France) et ce afin de restaurer l'état de la surface du platine.

II.1. Caractérisation de la réduction

II.1.1. Filtration des cellules

Dans l'enceinte Bactron I, 5 ml d'une culture de *L. lactis* réalisées en anaérobiose ont été filtrés en fin de réduction ($E_{h7min} \approx -200$ mV), en utilisant des filtres de 0,22 μm MILLEXGV poly(vinylidene fluoride) (Millipore, Carrig-twohill, Irlande), pour déterminer l'impact des micro-organismes sur le E_h final. Le filtrat est récupéré dans des flacons Schott de 25 ml, où est placée une des électrodes redox combinée. La valeur du E_h dans le filtrat est relevée lorsqu'elle est stabilisée (délai inférieur à 30 min).

II.1.2. Neutralisation des thiols

Le rôle des groupements thiols a été étudié en utilisant des réactifs réagissant spécifiquement avec les thiols, tel que le N-ethylmaleimide (NEM) (Sigma Aldrich, Lyon, France) ou le N-(biotinoyl)-N'-(iodoacetyl)ethylendiamine (BIAM). Toute l'expérimentation a été réalisée dans l'enceinte anaérobie Bactron. Le NEM (eau/méthanol) a été ajouté à une concentration finale de 25 mM en phase de stabilisation du potentiel à -200 mV. Une expérimentation témoin a été effectuée avec la solution de solubilisation du NEM : méthanol/eau (3/1) pour vérifier qu'elle n'affecte pas la valeur du E_h réducteur. Quant au BIAM il a été ajouté à une concentration de 40 μM finale, contrairement au NEM, seul les thiols libres de surface sont neutralisés. Dans les deux cas la valeur du E_h est notée après stabilisation du potentiel.

II.1.3. Dosage des groupements thiols exofaciaux

Les groupements thiols exofaciaux accessibles ont été dosés en utilisant la méthode d'Ellman. Le 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Sigma Aldrich, Lyon, France) est un réactif ne traversant pas la membrane des bactéries, et qui réagit avec les groupements thiols. Des échantillons de cellules ont été centrifugés durant 10 min à 3 500g, puis resuspendus dans 1 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 8 contenant 10 μl de DTNB à une concentration de 6 mM. Après 30 minutes d'incubation dans l'obscurité, les cellules ont été centrifugées à 3 500g pendant 15 min. Pour éliminer les bactéries présentes dans le milieu, les surnageants ont été filtrés par un filtre de 0,22 μm (Millipore, Carrig-twohill, Irlande). La concentration de groupements thiols libres a été

mesurée par spectrophotométrie à 412 nm, puis calculée en utilisant une courbe étalon établie à partir de différentes concentrations de N-acétyl-L-cystéine (de 5 à 60 μM) (Sigma Aldrich, Lyon, France).

II.1.4. Marquage des thiols de surface

A partir d'une culture de *L. lactis* TIL46 en anaérobie, 1 ml de cellules a été lavé deux fois en PBS 2X, puis repris dans 1 ml. Après 30 minutes d'incubation avec 40 μM Alexa Fluor® 488 C5 Maleimide (Life technologies), les cellules ont été lavées trois fois en PBS 1X. Cinquante μl de cellules marquées sont déposés sur des lames superfrost ultraplus (Thermofischer scientific). L'excédant de cellules est éliminé après 5 minutes à température ambiante. Les bactéries sont ensuite fixées au paraformaldéhyde 3% en chambre humide pendant 10 minutes à température ambiante. Après trois lavages, les lamelles ont été montées en présence de DAPI reagent (Invitrogen). Avant le marquage au fluorophore, certains échantillons ont été traités pendant 30 minutes à 30°C par 30 μM de BIAM, puis lavés 2 fois en PBS 2X. Les lames sont observées grâce à un microscope à épifluorescence Zeiss.

II.1.5. Milieu de discrimination redox aux sels de tétrazolium

Le milieu est à base de lait écrémé UHT agar 1,5% (m/v) supplémenté par des sels de tétrazolium TV, TTC et BT (Sigma Aldrich). Les sels ont été ajoutés à une concentration finale de 0,02 mg/ml. Avant une incubation de 15 heures à 30°C en conditions aérobie et anaérobie, 5 μl de chaque souche bactérienne sont déposés sur les boîtes. Une coloration violette, rouge ou bleue indique une réduction en formazan des sels de tétrazolium TV, TTC et BT respectivement.

III. Analyse protéomique

*III.1. Obtention des extraits protéiques de *L. lactis**

Les cellules de *L. lactis* en anaérobiose sont collectées à une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 1,5 par centrifugation (15 min à 3 500g). Les bactéries sont ensuite resuspendues en tampon phosphate 0,5 M à pH 7,5 contenant 0,2 μM de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma Aldrich, Lyon, France). La suspension est traitée pendant 30 minutes à 30°C par 0,9 mM de BIAM, et le marquage est stoppé par l'ajout de 200 μl de NEM à 1 M. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois dans du tampon phosphate puis le culot bactérien est resuspendu en tampon phosphate, PMSF 0,2 μM et du lysozyme à 0,1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Sigma Aldrich, Lyon, France). Après 15 minutes à 37 °C, une centrifugation de 15 min à 21 000g permet de séparer les protoplastes et la paroi cellulaire.

Les protoplastes présents dans le culot cellulaire sont resuspendus dans du tampon phosphate additionné de 0,2 μM de PMSF. Les protoplastes sont lysés au fast prep ® par 3 cycles de 45 s à 6 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (MP Biomedicals, USA). Les membranes sont ensuite récupérées par une ultra-centrifugation de 300 000g pendant 30 min.

Les protéines membranaires sont resuspendues en tampon Tris-HCl, 5 mM ; EDTA, 20 mM ; PMSF, 0,2 mM ; n-dodecyl-1-maltoside, 0,5% (p/v) (Sigma Aldrich, Lyon, France). La concentration des échantillons est estimée par la méthode de dosage de Bradford (Bio-rad, Marne-la-coquette, France).

III.2. Western blot

Les protéines possédant des groupements SH peuvent être spécifiquement observées sur membrane par la méthode Western-Blot.

Les protéines séparées sur gel SDS-PAGE sont transférées sur une membrane de nitrocellulose par l'application d'un champ électrique. Après l'électrotransfert de 1h30 à 100 V et à 350 mA en tampon de transfert (Tableau 8) la membrane de nitrocellulose est traitée par une solution de PBS à 1% de caséine pendant 30 minutes à température ambiante et sous agitation. Cette étape bloque les sites interspécifiques d'adhésion aux anticorps ou protéines nécessaires à la révélation. Trois lavages en PBS/Tween 0,1 %, sont effectués.

Tableau 8 : Composition du tampon de transfert

Composés	Concentration
Tris	3 g/l
Glycine	14,4 g/l
Méthanol	20%

- Identification des protéines membranaires marquées au BIAM :

Après lavage, la membrane est incubée durant 1 heure avec 20 ml de solution au 1/1500 d'avidine conjuguée à la peroxydase (avidine-HRP) (Bio-rad). L'avidine est une protéine se liant à l'étiquette Strep-tag. Trois lavages de 10 minutes sont effectués avec une solution de PBS/Tween 0,1 %. Les protéines marquées sont révélées grâce à une solution contenant 50 mg de 3-3'Diaminobenzidique (Bio-rad) et 30 µl de peroxyde d'hydrogène (Sigma) à 3%. Les bandes d'intérêt sont analysées par spectrométrie de masse.

- Immuno-blot pour la détection de la protéine AhpF :

Suite au lavage, la membrane est incubée durant 1 heure avec l'anticorps primaire au 1/2000 (anticorps de lapin polyclonaux contre AhpF) (77). La membrane est lavée 3 fois en PBS/Tween 0,1%, puis l'anticorps secondaire Anti-lapin couplé à une peroxydase (dilution 1/3000) est ajouté pendant 1 heure. Après 3 lavages, la membrane est révélée par le kit ImmunStarTM WesternTM chimiluminescence (Bio-rad).

III.3. Préparation de protéines membranaires biotynilées par colonne d'affinité à la Streptavidine

La Streptavidine sepharose (100 µl) est lavée 2 fois avec le tampon A (1% NP-40 et 0,1 % SDS en PBS pH 8), puis 2 fois avec du PBS pH 8. Cinq cent µl d'extrait protéique de surface sont ajoutés, et la suspension est incubée 90 minutes sous agitation en chambre froide. La résine est alors lavée 3 fois en tampon A, 2 fois en tampon B (0,4M NaCl + tampon A) et 1 fois par 50 mM Tris-HCl pH 7,5. Les protéines fixées sur la colonne Streptavidine sont éluées dans 500 µl de tampon d'éluion (2% SDS, 3 mM biotine, 6 M urée and 2 M thiourée en PBS) par un traitement de 15 minutes à température ambiante et 15 minutes à 96°C (154). Pour identifier les protéines fixées de façon aspécifique, un contrôle négatif a été réalisé en utilisant des protéines non marquées.

L'éluat récupéré est analysé par spectrométrie de masse suite à un short run (migration de 1 cm en gel SDS-PAGE).

III.4. Digestion des protéines de surface par la méthode de Shaving

Cent ml d'une culture de *L. lactis* sont centrifugés à 3 500 g pendant 10 minutes à 4 °C. Le culot est lavé deux fois par du PBS 2X à pH 7,4 ; puis est repris dans 0,8 ml de tampon PBS 2X à 40% de lactose et 5 mM de DTT. La digestion est réalisée pendant 10 minutes à 37 °C, en présence de 10 µg de trypsin. La suspension digérée est ensuite centrifugée à 3 500g pendant 10 minutes à 4 °C, puis le surnageant est filtré par des filtres millipore à 0,22 µm. Le filtrat est alors dessalé et les peptides sont élués par un mélange acétonitrile/ 0,1% d'acide formique, puis concentrés au Speed Vac Concentrator (Eppendorf) pour l'analyse par spectrométrie de masse.

IV. Techniques générales de manipulation des acides nucléiques

IV.1. Extraction des ARN totaux

Les extractions d'ARN totaux ont été réalisées en début de phase de croissance (DO_{600} 0,1) et en début de phase exponentielle (DO_{600} 0,3-0,4). Après centrifugation les cellules sont resuspendues dans 400 µl de solution de resuspension (glucose 10%, tris 12,5 mM pH 7,6 ; EDTA 5 mM). Les ARN totaux sont extraits par cassage aux billes additionnées de 400 µl de phénol acide pH 4,5 (Interchim), et par 3 cycles de puissance 6,5 pendant 45 s dans un Fastprep FP120 (QBiogen). Entre chaque cycle, une alternance de 1 minute dans la glace évite la dégradation des ARNs par l'échauffement. Après une centrifugation à 13 000g de 5 minutes à 4°C, la phase aqueuse est récupérée et mise en contact pendant 5 minutes avec 1 ml de Trizol reagent (Invitrogen). La suspension est purifiée par un mélange chloroforme/ alcool isoamylique (24/1, v/v). Les ARNs présents dans la phase aqueuse sont précipités par 500 µl d'isopropanol à température ambiante et récoltés par centrifugation. Le culot d'ARN est lavé par de l'éthanol à 70% (v/v), puis séché et repris dans 50 µl d'eau sans DNase et RNase.

IV.2. Amplification de l'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR)

IV.2.1. Structure opéronique

Pour identifier la présence d'un co-transcript nous avons utilisé la technique de la RT-PCR. Les amorces utilisées sont listées dans l'Annexe 4. Les ARN extraits ont été traités à la DNaseI (Ambion) et la contamination par de l'ADN a été vérifiée avant la réaction de transcription inverse. Les ADN complémentaires (ADNc) ont été synthétisés par le kit iScript cDNA synthesis (Biorad) selon les instructions du fabricant.

Un contrôle positif a été réalisé en remplaçant l'ADNc par l'ADN de *L. lactis* MG1363. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose de 1% (m/v).

Pour comparer le niveau de transcription suivant les conditions de croissance, 4 µl d'ADNc pur ou dilué ont été utilisés dans l'analyse par PCR. L'expérience de RT-PCR a été réalisée en utilisant des amorces conçues pour amplifier la région interne de *llmg_0524* (300 pb) et d'un contrôle, le gène *ahpC* (419 pb).

IV.2.2. Construction de plasmides

Les plasmides obtenus sont listés dans l'Annexe 5.

Fusions transcriptionnelles : Afin d'analyser l'expression de gènes *llmg_0524* et *llmg_0526*, des fusions transcriptionnelles ont été construites entre le plasmide pTCV-lac (147) portant le gène rapporteur *lacZ* et les régions promotrices putatives de chaque gène. Les amorces utilisées sont énumérées dans l'Annexe 4. Après digestion par les enzymes de restriction XmaI et EcoRI, chaque produit de PCR est cloné dans le pTCV-lac, les plasmides résultant sont P₀₅₂₄-pTCV-lac et P₀₅₂₆-pTCV-lac. Ces plasmides ont été transformés dans des cellules électrocompétentes de la souche *E. coli* TG1 (48). La présence de l'insert a été confirmé par PCR et séquençage en utilisant des oligonucléotides spécifiques Vlac1 et Vlac2 (147). Les deux plasmides ont été transformés dans des cellules compétentes de *L. lactis* MG1363 (81) et sélectionnés avec de l'érythromycine.

Mutants de délétion et complémentation : Des procédures de recombinaison d'ADN standard ont été utilisées comme décrit par Sambrook et Russell (155). Les fragments amplifiés par PCR ont été purifiés avec le kit de purification PCR Purelink™ rapide ou un kit d'extraction sur gel (Invitrogen). Les mutants de délétion ont été construits par « double crossing over », comme le décrit Biswas et al., (17). Avec des oligonucléotides spécifiques (Annexe 4) deux fragments d'ADN situés en amont et en aval des gènes cibles ont été amplifiés. Ces fragments ont été fusionnés dans une seconde PCR et le produit d'ADN est ligé avec le pBR322p+Ghost8, après digestion par les enzymes de restrictions EcoRI et XbaI. L'insert a été confirmé par séquençage. Le vecteur modifié a été transformé par électroporation dans la souche de *L. lactis*, et les transformants ont été sélectionnés à 30°C sur M17 glucose supplémenté par de la tétracycline. Après intégration dans le locus à 37°C, l'excision du plasmide est effectuée à 30°C. La suppression de *llmg_0524*, *llmg_0526* et *ahpF* dans plusieurs clones est vérifiée par PCR avec des oligos conçus à l'extérieur du site de recombinaison.

Pour la complémentation des gènes *llmg_0524* et *llmg_0526*, l'opéron complet, y compris 500 pb en amont du gène *llmg_0524* est amplifié par PCR avec la paire d'amorces 524-526-cplR et 524-526-cplF et cloné dans les sites HindIII et SalI du pAK80. Le plasmide résultant est ensuite mis en place dans les mutants *Δllmg_0524* et *Δllmg_0526* avec l'érythromycine. Pour la complémentation du gène *ahpF*, le site correspondant à l'opéron *ahpC-ahpF* ainsi que 500 pb en amont de *ahpC* ont été clonés dans le pRV300 au niveau des sites de restriction SmaI et NotI. Le plasmide obtenu est intégré au niveau du locus de *ΔahpF* et les clones sont sélectionnés par ajout d'érythromycine.

III.3. Surexpression et purification de protéines

III.3.1. Surexpression de protéines

Les parties N-Terminal (N^{ter}) des protéines Llm_g_0524 et Llm_g_0526 ont été surexprimées par le système d'expression du promoteur T7 du vecteur pTYB2 ou petSumo (Biolabs) pour la protéine Llm_g_0524 et sous l'expression du promoteur tac du vecteur pMAL-c4X (Biolabs) pour la protéine Llm_g_0526 et Llm_g_0524. Les promoteurs de ces vecteurs sont inductibles par l'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside). Le vecteur pTYB2 possède un tag Intein et le petSumo un tag histidine. Les fragments PCR correspondant au domaine N^{ter} des protéines ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces possédant des sites de restriction spécifiques pour permettre la ligation au vecteur pTYB2 (NdeI et XhoI) ou au petSumo ou pour le vecteur pMAL-c4X (EcoRI et SalI). Pour la surexpression, les parties N^{ter} de ces deux protéines ont été clonées dans les vecteurs, ce qui a permis une surexpression chez *E. coli*. Les plasmides pTYB2-N^{ter}524 et petSumo-N^{ter}524 ont été transformés chez *E. coli* BL21 (DE3) possédant le gène de la T7 ARN polymérase sous contrôle inductible *lacUV*. Les plasmides pMAL-c4X-N^{ter}526 et pMal-C4X-N^{ter}524 ont été transformés chez *E. coli* TG1.

III.1.2. Purification des protéines

A partir d'un litre de culture des souches transformées, l'expression des protéines est induite à DO_{600nm} 0,5 par 0,5 mM d'IPTG pendant 4 heures à 30°C. Le culot cellulaire est récupéré par centrifugation, puis lavé par du tampon Tris-HCl à 10 mM préalablement traité au chelex (élimination des métaux). Les extraits protéiques totaux ont été obtenus par passage au fast prep.

L'extrait protéique contenant la partie N^{ter} de la protéine Llm_g_0524 produite à partir du vecteur pTYB2 est mis en contact avec la résine de chitin (Biolabs). Grâce à l'affinité de cette résine vis-à-vis du tag intein, N^{ter}Llm_g_0524 est retenue. Par des lavages successifs les protéines retenues de façon non spécifique sont décrochées. L'élution de N^{ter}Llm_g_0524 se fait par ajout de DTT à 30 mM entraînant le clivage du tag intein.

Pour récupérer la protéine obtenue à partir du vecteur petSumo, la résine utilisée est ProBond (invitogen). La protéine est éluée grâce à l'ajout d'imidazole à 150 mM.

En ce qui concerne la purification après utilisation du système pMal-c4X, des billes d'amyloses ont été utilisées pour leur affinité avec MalE, permettant de retenir les protéines recombinantes

malE-N^{ter}Llmg_0526 et malE-N^{ter}Llmg_0524. Une série de 3 lavages permet de décrocher les protéines fixées de façon non spécifique. L'élution des protéines d'intérêts se fait par un compétiteur de malE vis à vis de la colonne d'amylose, le maltose à 10 mM.

La qualité de purification des protéines a été vérifiée en électrophorèse sur gel SDS-PAGE (polyacrylamide) à 12,5%. La concentration des protéines a été déterminée par l'utilisation du dosage de Bradford (Biorad).

V. Cinétiques de croissance

Les cinétiques des croissances des souches de *L. lactis* ont été évaluées comme suit:

i) En milieu liquide M17 supplémenté de galactose ou de glucose, les cellules sont ajoutées à une densité cellulaire initiale de DO_{600nm} 0,025. Lorsque les cultures ont atteint une DO_{600nm} 0,1, différents composés ont été ajoutés: le cumène hydroperoxyde (Cu-OOH, 20 à 550 µM), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, 20 à 550 µM), la cystéine (2 mM), la catalase (10 000 U), la bacitracine (10 et 20 µM), la rifampicine (10 et 20 µM), la nisine (2,5 à 25 µg/ml), le DTT (0,05 à 0,2 M), le lysozyme (0,05 à 5 mg/ml), la mutanolysine (2,5 à 25 U/ml), le paraquat (0,1 à 10 mM), le SDS (0,005 ; 0,0075 ; 0,01%), l'EDTA (Éthylène Diamine Tétra Acétique, 1,25 mM), l'acide lactique (0,1%), le NaOH (0,01 et 0,1 M), le tween 80 (0,1%), l'acide oléique (C18:1, 1 mM), l'acide heptadecanoïc (C17:0, 1 mM), le desferal (100 µM), la bathocuproïne (0,5 et 1 mM), la thiourée (0,5 et 1 mM), la ferrozine (0,5 et 1 mM), le glutathion (0,250 et 2 mM), l'acide lipoïque (1 mM). Les cinétiques de croissance ont été effectuées sur 17 heures ou 8 heures en mesurant la densité optique à 600 nm.

ii) En gélose molle : une épaisseur de M17 agar contenant 0,5% de glucose ou galactose, puis une seconde épaisseur d'agar 0,6% supplémenté à 10% par une suspension bactérienne de 17 heures. Sur la partie d'agar 0,6% sont déposés des disques filtre de diamètre 6 mm, sur lesquels a été préalablement déposé 30 µl de Cu-OOH ou de H₂O₂ aux concentrations 640 mM, 64 mM et 6,4 mM. Le diamètre d'inhibition est mesuré après 17 heures à 30°C.

iii) En milieu agar : les produits sont directement ajoutés à la gélose M17 glucose ou galactose à 0,5%. A été testé le DTT (0,5 mM), le Cu-OOH (500 µM), le H₂O₂ (500 µM) et le lysozyme (0,5 et 1 mg/ml). Lorsque les cultures ont atteint une DO_{600nm} 0,1 ; la suspension est diluée en cascade jusqu'à la dilution 10⁻⁴, puis spottée. La croissance est suivie aux temps 15 heures et 38 heures après une incubation à 30°C.

VI. Recherche de plage de lyse

Observation de plage de lyse *via* des phages spécifiques aux lactocoques, les phages C2 et SKI (S. Kulakauskas, (INRA MICALIS Equipe phage, Jouy-en-Josas, France) (34, 110). A partir d'une culture de 17 heures, 0,1 ml est mis en contact avec 10 µl de phages dilué de 10⁰ à 10⁻⁴, en gélose

M17 agar 6%, supplémentée de CaCl₂ 10 mM et de glucose à 0,5%. Cette gélose est immédiatement coulée sur une boîte M17 glucose 0,5% et incubée 17 heures à 30°C.

VII. Dosage Enzymatique

Dosage β -galactosidase : L'activité β -galactosidase a été quantifiée par luminescence dans le lecteur de microplaques Infini M200 (Tecan) en utilisant le système de dosage β -Glo® comme recommandé par le fournisseur (Promega). Cette activité a été déterminée à partir de cellules cultivées en M17 supplémenté avec du glucose ou du galactose possédant les plasmides P₀₅₂₄-pTCV-lac ou P₀₅₂₆-pTCVlac et pRV300-AhpFlacLM ou pRV300-NoxElacLM. Les résultats sont normalisés par rapport à ceux obtenus avec la souche *L. lactis* MG1363 portant le plasmide pTCV-lac.

Dosage de la Phosphatase alcaline (PhoA) : Pour déterminer l'orientation de protéines, nous avons utilisé le plasmide pHA-Zed (49) hébergeant le gène *phoA*, codant pour une enzyme, la phosphatase alcaline dont l'expression est sous un promoteur arabinose dépendant. Les amorces utilisées pour amplifier la région d'ADN correspondent à la région N^{ter} des protéines comprenant (PhoA1) ou non, le domaine transmembranaire (PhoA2) sont énumérées dans l'Annexe 4. Les produits de PCR et pHA-Zed ont été digérés par XhoI et KpnI et ligés ensemble, conduisant à la construction des plasmides, 524PhoA1, 524PhoA2, 526PhoA1 et 526PhoA2, ou encore AhpFphoA1 et AHpFphoA2. Les plasmides ont été transformés dans la souche *E. coli* CC118 et les clones recombinants ont été sélectionnés par ajout d'ampicilline. Pour la mesure des activités PhoA, des cultures de nuit sont diluées dans du milieu LB à DO_{600nm} 0,050. A DO_{600nm} 0,5 la suspension est traitée pendant 2 heures avec 0,2% d'arabinose. Des échantillons de 100 μ l sont lavés par 0,8 ml de tampon Tris HCl pH 8 (1 M) et incubés à 37 ° C, jusqu'à l'apparition d'une couleur jaune suite à l'addition de 100 μ l de phosphate ρ -nitrophényle (4 g/l). La réaction est arrêtée par l'addition de 200 μ l de K₂HPO₄ (1M). La DO est mesurée à 405 nm et les résultats sont exprimés en unités Miller par la formule suivante: $[DO_{405} - (1,75 \times DO_{405})] \times 1000 / [\text{temps d'incubation (min)} \times 0,1 \times DO_{600}]$. Ces activités ont également été analysées qualitativement sur boîtes LB agar supplémentées par du phosphate de 5-bromo-4-chloro-3-indolyle (BCIP). Les clones possédant une activité PhoA extracellulaire affiche une couleur bleue due à l'hydrolyse du BCIP en 5-bromo-4-chloro-3-indole (BCI).

VIII. Dosage des peroxydes

Les peroxydes ont été dosés lors d'une cinétique de croissance en M17 glucose à 30°C sans agitation ou en condition aérée. 50 μ L de cultures sont centrifugés, les peroxydes sont dosés soit à partir du culot bactérien (lavé en PBS 1X), soit du surnageant de culture. L'ajout de 950 μ l de réactif FOX (Ferrous oxidation with Xylenol Orange) permet le dosage (194). FOX est composé de 100 μ M de Xylenol orange, 250 μ M de sulfate d'ammonium ferreux, de 100 mM de sorbitol et

25 mM d'acide sulfurique. Après une incubation de 30 min à température ambiante l'absorbance est mesurée à 560 nm. La concentration en peroxyde est déterminée grâce à une courbe étalon d'H₂O₂.

IX. Dosage et analyse des métaux présents dans la partie N^{ter} de Limg_0524 et Limg_0526

Quantification du Zinc : La présence d'ions zinc dans les protéines purifiées MalE-0524N^{ter} et MalE-0526N^{ter} a été déterminée par dosage colorimétrique du PAR (4- (2-pyridylazo) résorcinol). La fixation du zinc au PAR forme un complexe Zn(PAR)₂ qui absorbe à 495-500 nm ($\epsilon_{495} = 66 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Quarante μM de protéines sont précipitées pendant 30 minutes dans la glace avec de l'acide trichloroacétique (TCA) à 10%. Après centrifugation (15 minutes, 13 000g), le surnageant est neutralisé par du NaOH et du Tris-HCl pH 7,5 ajouté en concentrations finales de 0,5 M respectivement. Quatre cents μl de cette suspension sont incubés pendant 1 heure avec une solution de PAR fraîchement préparée (200 μM) pour un volume final de 1000 μl . La formation du complexe a été déterminée à DO_{495nm}.

Dosage PMPS-PAR : Le *p*-hydroxymercuriphenylsulfonic acide (PMPS) est utilisé pour déterminer la position des ligands zinc chez MalE-0524N^{ter} et MalE-526N^{ter}, ce composé crée une liaison cystéine-Hg. Les protéines sont d'abord traitées par le PMPS à différentes concentrations et les ions zinc libérés sont dosés par le test colorimétrique au PAR.

Stabilité du complexe cystéine et zinc : La stabilité du complexe cystéine/Zn est testée dans différentes conditions : un changement de température de 30°C à 37°C et l'addition de 10 équivalents de peroxyde d'hydrogène ou de cumène hydroperoxyde. Après une incubation d'1 heure, le zinc libéré a été dosé avec le PAR.

L'analyse ICP-MS : Les métaux (Mg, Cu, Fe, Co, Mn, Zn) sont identifiés et quantifiés par un couplage plasma induit par haute fréquence- spectrométrie de masse (ICP-MS) (Agilent 7700x) au centre Géosciences de Montpellier.

X. Recherche de la protéine AhpF à la surface de *L. lactis* par microscopie

A partir d'une culture de *L. lactis* MG1363 ou ΔahpF , 1 ml a été lavé deux fois en PBS 1X, puis repris dans 1 ml de PBS 1X . Cinquante μl de cellules marquées sont déposés sur des lames superfrost ultraplus (Thermofischer scientific). L'excédant de cellules est éliminé après 5 minutes. Les bactéries sont fixées au paraformaldéhyde 3% en chambre humide pendant 10 minutes à température ambiante. Le paraformaldéhyde est éliminé par trois lavages. Les sites aspécifiques sont bloqués pendant 1 heure par une solution de PBS BSA (serum albumine bovine) 1X. Après 3 lavages les lames sont incubées pendant 1 heure avec l'anticorps primaire anticorps de lapin polyclonaux d'AhpF 1/300. Pour visualiser le marquage en microscopie épifluorescence (Zeiss), les lames sont lavées 3 fois par du PBS et incubées avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à

l'Alexa Fluor 488 (Life technologies). Après 1 heure les cellules sont lavées trois fois en PBS 1X puis les lamelles sont montées en présence de DAPI reagent.

XI. Analyse des acides gras

Les souches WT et mutantes ont été cultivées en M17 glucose ou galactose. 200 µl de culture ont été centrifugés à 4°C, les culots sont lavés une fois en NaCl 0,9% Triton x-100 0,01% et deux fois en NaCl 0,9%.

Les compositions en acides gras (AG) sont analysées comme décrit par Brinster et *al.*, (25), 2 à 5 mg de cellules sont traités au méthanolate de sodium et les AG méthylesther sont extraits par addition de 200 µl d'heptane contenant du méthyl 10-undecenoate à 0,22 mM (Sigma-Aldrich). Les analyses ont été réalisées avec l'automate Autosystem XL gas Chromatograph (Perkin Elmer) équipé avec une colonne DB-Wax (F&W Scientific) 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Les résultats ont été collectés et traités à l'aide du logiciel Turbochrom system (Perkin Elmer).

XII. Cytométrie en flux

Un cytomètre Partec (Görlitz Allemagne) cyflow space a été utilisé. La source Laser est réglée à 488 nm, les données obtenues ont été traitées grâce au logiciel Flomax. Chaque échantillon de 1 ml contient environ 10^6 cellules/ml de cellules marquées ou non. Les liquides utilisés pour l'entretien et la gaine sont de la marque Partec.

RESULTATS

CHAPITRE 1 : Caractérisation de l'activité réductrice de *Lactococcus lactis* - Les thiols exofaciaux participent-ils à la stabilisation du potentiel d'oxydoréduction en fin de réduction ?

I. Objectif de l'étude

L. lactis est une bactérie lactique fortement réductrice, cette caractéristique lui confère un immense intérêt dans l'industrie fromagère. Si l'on prend l'exemple du lait, la souche est capable de le réduire à -200 mV (24). Les mécanismes intervenant dans l'activité réductrice et les différents composés réduits par les lactocoques ne sont pas tous identifiés à l'heure actuelle. Nous savons que l'activité réductrice est séparée en 3 temps : (i) une phase de latence, correspondant à l'élimination de l'oxygène, la durée de cette phase est plus ou moins longue. Cette phase est attribuée à l'activité de la NADH oxydase, NoxE : il n'y a pas de réduction du milieu sans NoxE (172) et l'élimination de l'oxygène instaure la réduction du milieu par les cellules, (ii) la phase de réduction est caractérisée par une diminution rapide du E_h à une valeur réductrice d'environ -200 mV quelque soit le milieu (riche, lait), (iii) la phase de stabilisation du E_{h7} minimal de -200 mV en anaérobiose. Notre intérêt se porte plus particulièrement sur cette dernière phase, qui est identique quelque soit le potentiel de départ et les conditions d'aérobiose ou d'anaérobiose. L'objectif est d'identifier le ou les composés qui seraient impliqués dans la stabilisation du potentiel, afin d'apporter des réponses quant aux mécanismes de réduction et de sa stabilisation.

II. Résultats

II.1. Activité réductrice de *L. lactis*

Le suivi de l'évolution du E_{h7} et du pH de *L. lactis* TIL46 en flacons Schott modifiés a été réalisé en milieu dégazé (anaérobiose) ou non (aérobiose initiale) à 30°C en MRS. Les cinétiques de réduction et d'acidification enregistrées en continu sont présentées ci-dessous (Figure 25).

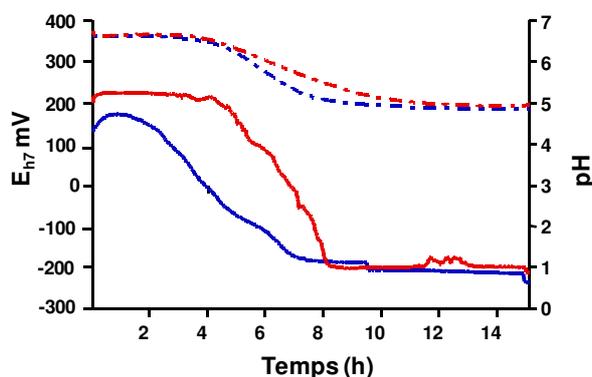


Figure 25 : Evolution du E_{h7} et du pH (représentation en pointillé) du milieu MRS lors d'une croissance de *L. lactis* cultivée en milieu dégazé (Bleu) ou non (Rouge). Moyenne de 3 expérimentations indépendantes

Avant l'ensemencement dans les milieux dégazés ou non dégazés, les pH initiaux sont respectivement de $6,6 \pm 0,0$ et $6,6 \pm 0,2$ et les E_{h7} de 160 ± 5 mV et 208 ± 10 mV (Tableau 9). La différence de E_{h7} entre les deux milieux est due à l'oxygène dissout dans le milieu. Les profils d'acidification ne sont pas similaires, avec une baisse de pH plus rapide en l'absence d'oxygène (V_m^a) (Tableau 9). Le profil de réduction est également différent, en aérobiose, la réduction débute après 3 heures de culture alors qu'en anaérobiose la réduction commence après 6 heures de croissance. Cette différence n'interfère pas sur la vitesse de réduction maximale (V_m^r) et le E_{h7} final, puisque ceux-ci sont similaires (Tableau 9).

Tableau 9 : Paramètres descripteurs des cinétiques de réduction et d'acidification de *L. lactis* TIL46 en aérobiose ou anaérobiose.

	Anaérobiose	Aérobiose
E_{h7} initial	$+160 \pm 5$	$+208 \pm 10$
V_m^r ($mV \cdot h^{-1}$)	-201 ± 10	-239 ± 23
T_m^r (heure)	$3 \pm 0, 5$	$6,26 \pm 0,6$
pH_m^r (unité pH)	$6,6 \pm 0,02$	$5,9 \pm 0,8$
E_{h7} final (mV)	-203 ± 10	-195 ± 13
pH initial	$6,6 \pm 0,03$	$6,6 \pm 0,2$
V_m^a ($mV \cdot h^{-1}$)	$-0,47 \pm 0,1$	$-0,26 \pm 0,1$
T_m^a (heure)	$6,26 \pm 0$	$6,2 \pm 0,1$
pH_m^a (unité pH)	$5,6 \pm 0,09$	$5,9 \pm 0,8$
pH final (mV)	$4,97 \pm 0$	$5,16 \pm 0,5$

II.1.1. Impact de composés réducteurs ou oxydants sur le potentiel d'oxydoréduction

Partant de l'hypothèse que la réduction du milieu par *L. lactis* repose sur une activité réductrice basée sur les thiols, nous avons testé un réducteur à thiols, le dithiothréitol (DTT), et un oxydant de thiols, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sur le E_h initial et final. Les concentrations choisies sont en accord avec les différents partenaires de l'ANR, concentrations minimales permettant d'obtenir - 300 mV ou + 400 mV.

L'ajout de composés oxydants et réducteurs avant la réduction du milieu et lors de la stabilisation du E_{h7} par *L. lactis* permet d'obtenir des informations quand à : (i) l'état des molécules présentes au départ dans le milieu, (ii) sur la capacité des cellules à réduire le milieu suivant le potentiel de départ. (Figure 26)

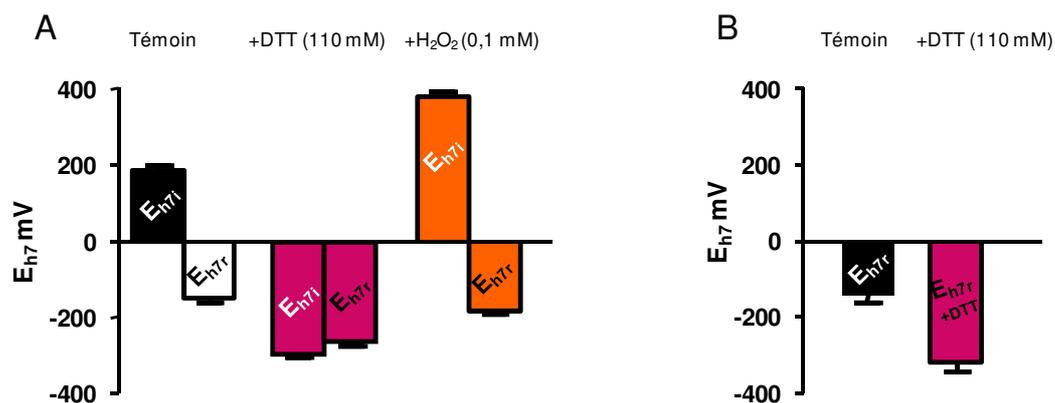


Figure 26 : Effets de composés oxydants ou réducteurs sur le E_{h7} initial et final. A. Sur le E_{h7} initial et la réduction du milieu par *L. lactis* TIL46 ; B. sur la valeur finale du E_{h7}. E_{h7i}, redox du milieu dégazé à T0 ; E_{h7r}, redox minimal après réduction du milieu.

Aucun des composés n'a affecté le pH initial de 6,6. L'utilisation du dithiothrétiol (DTT), qui est une molécule réductrice très réactive comprenant 2 groupements thiols et réduisant les ponts disulfures en groupements thiols, diminue considérablement la valeur du E_{h7} avec une chute de 462 mV par rapport au E_{h7i} témoin (Figure 26A). Cette forte réduction indique la capacité des thiols à réduire le milieu, même au-delà des -200 mV obtenus par le Lactocoque. En fin de croissance un E_{h7} de -250 mV est mesuré, correspondant à une variation du potentiel de +39 mV. Le fait de partir d'un milieu déjà très réducteur ne permet pas aux cellules de réduire plus le potentiel, cependant en présence de DTT la croissance de *L. lactis* est perturbée comme l'ont montré Cesselin *et al.*, (33) une concentration de 30 mM de DTT affecte la croissance de *L. lactis* MG1363.

Contrairement au DTT, H₂O₂ augmente la valeur du E_{h7} à +380 mV (Figure 26A). Ce composé est plus oxydant que l'oxygène, puisqu'on a une différence d'environ +180 mV par rapport à un milieu saturé en oxygène. Le fait d'ajouter l'H₂O₂, n'a pas empêché les cellules de réduire le milieu. Le E_{h7} final est de -180 mV contre -200 mV dans le milieu témoin sans composés réducteurs ou oxydants.

L'ajout de DTT en fin de réduction va apporter des indices sur l'état cellulaire et des composés présents en fin de réduction (Figure 26B). Son ajout entraîne une diminution de la valeur du E_{h7f} témoin, de -146 mV à -315 mV. Cette chute de 169 mV nous informe sur la présence de protéines/composés à ponts disulfures soit à la surface de *L. lactis* ou secrétées dans le milieu, et/ou de molécules produites lors de la réduction du milieu. Il peut s'agir également des thiols propres à la molécule DTT, ce résultat montre la problématique particulière du sujet, sa complexité, mais également la capacité des molécules à thiols à réduire, directement ou indirectement un milieu de culture avant ou après fermentation.

II.2. Impact des cellules dans le maintien de l'activité réductrice

II.2.1. Effet de l'élimination des cellules sur le E_h final

L'expérimentation précédente nous informe sur la présence potentielle de composés soufrés dans le milieu ou à la surface cellulaire lorsque le potentiel est stabilisé à -200 mV. Pour déterminer si la biomasse est liée à la valeur du potentiel redox, la culture a été filtrée en fin de réduction, sous un environnement neutre (azote) pour se protéger de la réincorporation d'oxygène et le E_{h7} du filtrat a été mesuré (Figure 27).

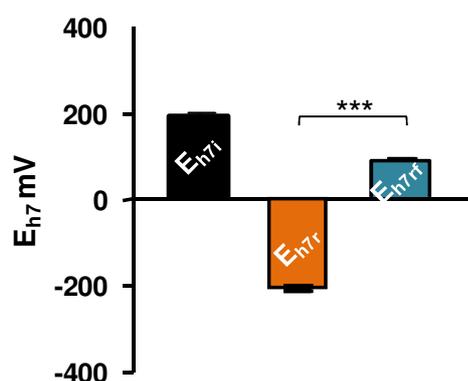


Figure 27 : Effet de la filtration sur le E_{h7} du filtrat d'une culture de *L. lactis* ssp *cremoris* TIL46 en anaérobiose. E_{h7i} , redox du milieu dégazé à T0 ; E_{h7r} , redox minimal après réduction du milieu ; E_{h7rf} , redox dans le filtrat. Les valeurs représentent la moyenne de 3 expérimentations indépendantes. * différences significatives ($\alpha = 0,05$)

Le filtrat a été recueilli lors de la stabilisation du potentiel redox, à pH 4,5. L'élimination des cellules restaure à 45 % le E_{h7} initial. Cette restauration partielle du E_{h7} , nous montre qu'en fin de fermentation la stabilisation du potentiel à -200 mV est principalement dû à la présence des cellules et un peu à la présence de composés réducteurs ou de composés oxydants initialement présents qui ont été consommés.

II.2.2. Effet des composés thiols de surface sur le E_h final

Nous venons de voir que la stabilisation du potentiel vers des valeurs très réductrices est en grande partie générée par la présence des cellules de *L. lactis*. Dans l'étude bibliographique, nous avons observé que de nombreux mécanismes redox cellulaires liés à l'activité métabolique faisaient intervenir des composés à groupements thiols. Ces groupements dont le potentiel standard est situé entre -115 mV et -340 mV pourraient intervenir dans l'activité réductrice de *L. lactis* et dans la stabilisation du potentiel à -200 mV par leur présence au niveau intracellulaire, extracellulaire ou encore si ils sont sécrétés. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé des molécules capables de se fixer spécifiquement aux groupements thiols libres et neutraliser leurs fonctions réductrices comme le N-éthylmaléimide (NEM) ou le N-(biotinoyl)-N'-(iodoacetyl)éthylendiamine (BIAM).

Le NEM est composé d'un noyau maléimide. Ce noyau réagit rapidement avec les groupements thiols libres *via* une réaction d'alkylations conduisant à une liaison covalente très stable (Figure 28). Le NEM est le plus souvent utilisé comme un inhibiteur d'activité enzymatique, mais il peut

également inhiber des transporteurs membranaires où sont impliqués des groupements thiols (24). Ce composé peut diffuser à travers les membranes cytoplasmiques et ne possède pas d'activité redox.

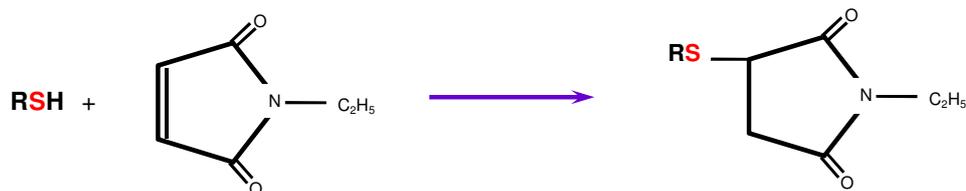


Figure 28 : Réaction du NEM avec un groupement thiol libre

Le second composé choisi, le BIAM (Figure 29), est une molécule de iodoacétamide biotinylée, qui contrairement au NEM, est incapable de traverser la membrane cytoplasmique (119). Par une réaction d'alkylation, l'iodoacétamide se lie spécifiquement aux groupements thiols libres.

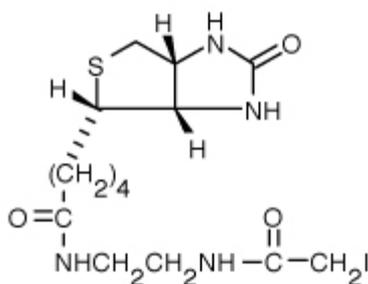


Figure 29 : Structure du BIAM.

La neutralisation des thiols libres totaux par le NEM (25 mM) permet de restaurer partiellement le potentiel redox du milieu à T₀. Celui-ci augmente de -199 ± 14 mV à $+81 \pm 7$ mV, soit une différence de 280 mV (Figure 30). Ce résultat est semblable à celui obtenu précédemment après filtration des cellules, et restaure en partie le potentiel initial. Il semble donc que l'E_{h7} minimal atteint par *L. lactis* dépende de la présence des thiols mais également de l'existence de composés réducteurs présents dans le milieu en fin de fermentation, ou de composés oxydants présents à l'origine qui ont été réduits (cas par exemple de l'oxygène en aérobiose).

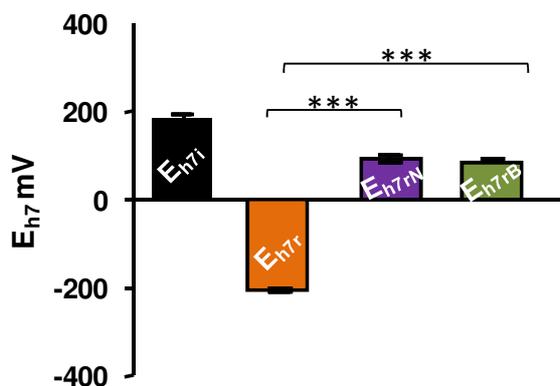


Figure 30 : Effet du NEM et du BIAM sur le E_{h7} final d'une culture de *L. lactis* ssp *cremoris* TIL46 en anaérobiose. E_{h7i}, redox du milieu dégazé à T₀ ; E_{h7r}, redox minimal après réduction du milieu ; E_{h7rN}, redox après addition de NEM ; E_{h7rB}, redox après addition de BIAM. Les valeurs représentent la moyenne de 3 expérimentations indépendantes. * différences significatives ($\alpha = 0,05$)

Pour mener plus loin notre investigation et savoir si la présence des groupements thiols libres de la surface intervient dans le maintien du potentiel réducteur, on utilise le BIAM (40 μM) pour neutraliser les thiols extracellulaires. Ainsi sur la [Figure 30](#) suite à l'ajout du BIAM, une remontée du E_{h7} à +81 mV est obtenue. Ce résultat est en accord avec les deux expérimentations précédentes, filtration des cellules et l'ajout NEM ([Figure 30](#)).

Afin de vérifier que la fixation du BIAM est spécifique des thiols extracellulaires, une sonde fluorescente a été utilisée, l'Oregon green maleimide Alexa 488. Cette sonde est incapable de traverser la membrane cytoplasmique (life technologies), et se lie spécifiquement aux thiols par son cycle maléimide.

Sur la [Figure 31](#), A et B représentent le même champ microscopique. Lors de l'excitation à 488 nm la totalité des bactéries fluorescences vertes, révélant la présence de groupements thiols à la surface. Par contre suite au traitement par le BIAM (C et D) aucune cellule ne fluoresce. Les groupements thiols de surface se sont plus accessibles au fluorochrome confirmant leurs neutralisations par le BIAM.

En conclusion le maintien du potentiel à -200 mV par *L. lactis* peut-être dû en partie à la présence des thiols exofaciaux, et également à la présence de composés réducteurs sécrétés provenant du métabolisme bactérien et/ou de la réduction de molécules oxydantes présentes initialement dans le milieu.

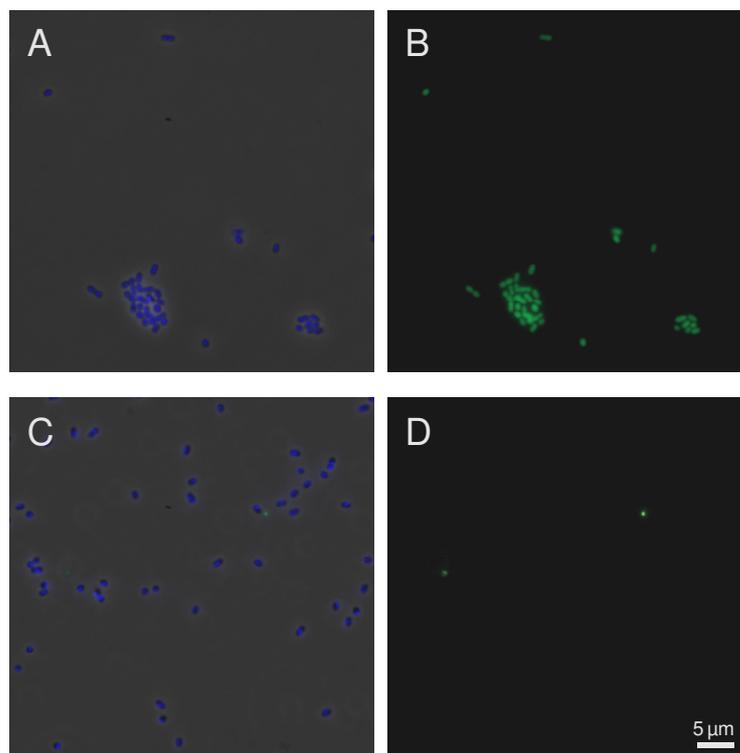


Figure 31 : Présence de thiols libres exofaciaux à la surface des cellules. A et C, cellules TIL46 observées en contraste de phase ; B, cellules TIL46 observées en fluorescence non traitées au BIAM ; D, cellules TIL46 observées en fluorescence traitées au BIAM.

II.2.3. Dosage des groupements thiols libres à la surface cellulaire

Pour savoir comment les thiols peuvent influencer la réduction du milieu, nous allons regarder l'évolution des groupements thiols en fonction de l' E_{h7} , du pH et de la croissance cellulaire en anaérobiose. Pour ce dosage nous utilisons la méthode d'Ellman, avec le réactif DTNB qui réagit spécifiquement avec les groupements thiols libre *via* une réaction d'échange thiol-disulfure. La réaction entre le DTNB et un groupement thiolate libère l'anion nithiobenzoate (TNB-) qui absorbe à 412 nm. En dosant par spectrophotométrie le TNB-, on peut quantifier les groupements thiols.

Une heure après l'ensemencement, à $DO_{600nm} = 0,1$ la valeur du E_{h7} est de $+209 \pm 24$ mV, le pH de $6 \pm 0,2$ et la concentration en thiols libres de surface est de $0,61 \pm 0,04$ μ M (Figure 32). En fin de phase de réduction quand le potentiel se stabilise à $-179 \pm 9,3$ mV, la concentration en thiol est de $3,8 \pm 0,36$ μ M. Lorsque le potentiel est stable, nous constatons une stabilisation de la concentration. Ce dosage montre une corrélation entre la réduction du milieu et la quantité de thiol.

L'évolution de la concentration en groupement thiols exofaciaux est également corrélée avec la croissance de *L. lactis* TIL46. Lors de la phase de réduction, cette corrélation est linéaire, avec une pente de $0,26$ μ mol par cellule. Mais celle-ci chute à $0,16$ μ mol par cellule en fin de réduction. Cette cassure de pente entre l'étape de réduction et la stabilisation du potentiel, correspond au ralentissement puis à l'arrêt de la croissance.

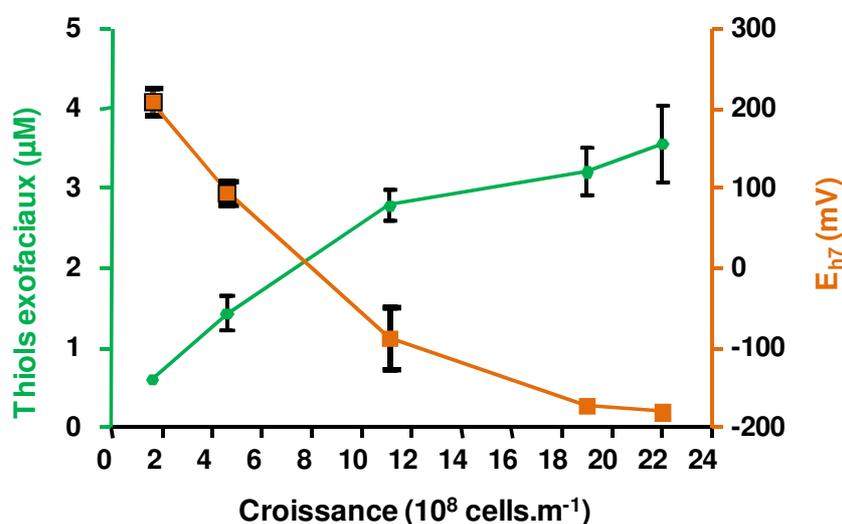


Figure 32 : Corrélation entre l'évolution de la concentration des groupements thiols libre de surface, la croissance de *L. lactis* TIL46 et l'évolution du E_{h7} au cours de la fermentation en anaérobiose.

Ces résultats montrent que l'activité réductrice de *L. lactis* est corrélée à la présence des thiols exofaciaux. Cependant au vu de l'augmentation proportionnelle entre la quantité de cellules et de groupements thiols libres à la surface, nous pouvons supposer que ce sont tous les thiols exofaciaux

qui interviendraient sur le potentiel redox plutôt que l'activité enzymatique liée à la production à une étape de la culture d'une protéine à thiols spécifique.

En conclusion pour atteindre la valeur réductrice de -200 mV différents facteurs sont nécessaires, (i) la présence physique des cellules dans le milieu, (ii) la présence des groupements thiols exofaciaux, (iii) la production de composés réducteurs et/ou la transformation des composés oxydants du milieu.

CHAPITRE 2 : Identification des protéines à thiols de surface par une approche Bioinformatique - A CX₂CX₁₀CX₂C motif involves in binding of zinc ion in two membrane proteins, Llm_g_0524 and Llm_g_0526 in *Lactococcus lactis*, and potential role of Llm_g_0524 in cumene hydroperoxide resistance

I. Introduction de l'article

Dans ce travail nous avons développé une approche bioinformatique pour rechercher dans le génome de *L. lactis* MG1363 des protéines à thiols susceptibles d'être impliquées dans l'activité réductrice de *L. lactis*.

Le génome de *L. lactis* code plusieurs centaines de protéines possédant des motifs CXXC potentiellement liées à l'activité redox mais la plupart de ces protéines sont localisées dans le cytoplasme et quelques une dans la membrane. Sept protéines membranaires ont été retenues dans l'analyse *in silico*. Dans cette étude nous avons choisi d'étudier deux protéines membranaires de fonction inconnue contenant un motif CX₂CX₁₀CX₂C, Llm_g_0524 et Llm_g_0526.

Au niveau génomique les gènes *llmg_0524* et *llmg_0526* sont séparés par 275 paires de bases dans lesquelles une petite protéine de 64 acides aminés est codée, Llm_g_0525. En analysant les ARN par RT-PCR, nous avons démontré que ces gènes forment un opéron. Grâce à une fusion transcriptionnelle avec le gène *LacZ*, nous avons déterminé que cet opéron est temporairement induit en début de phase de croissance. Le pic d'expression est à DO_{600nm} = 0,1 en milieu glucose, contrairement au milieu galactose, où l'induction est plus tardive et plus faible (DO_{600nm} = 0,3) mais constante jusqu'à DO_{600nm} = 0,6. Ces dernières affirmations ont été confirmées par de la RT-PCR semi quantitative.

Ces protéines sont riches en cystéine formant un motif permettant la fixation du Zinc. Contrairement à notre hypothèse de départ, ces thiols sont intracellulaires ([Figure 33](#)) et ne participent pas à la réduction du milieu. Dans cette étude nous avons montré que les protéines

jouaient un rôle dans l'intégrité de l'enveloppe et dans la protection de la cellule face à un agent oxydant, le cumène hydroperoxyde.

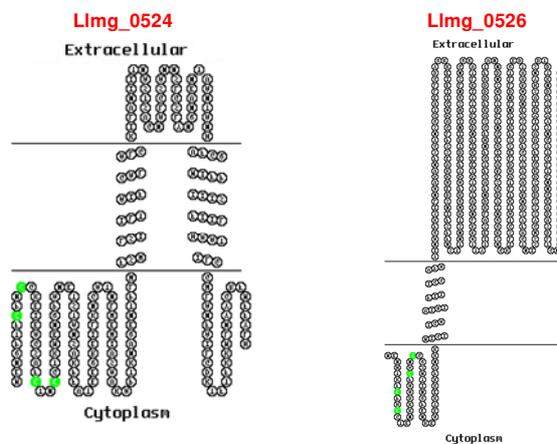


Figure 33 : Prédictions topologiques des protéines Lmg_0524 et Lmg_0526. En vert sont représentées les cystéines.

II. Article

L'article a été soumis à BMC microbiology.

Characterization of two *Lactococcus lactis* zinc membrane proteins, Llm_g_0524 and Llm_g_0526, important for cell wall integrity.

Running title: characterization of zinc proteins

Célia Roussel^{1,2}, Bénédicte Cesselin^{1,2}, Rémy Cachon³, and Philippe Gaudu^{1,2*}.

¹ INRA, UMR1319 Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France,

² AgroParisTech, UMR Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France,

³ UMR A 02.102 Unité Procédés Alimentaires et Microbiologiques, AgroSup Dijon-Université de Bourgogne, 1-esplanade Erasme, F-21000 Dijon, France.

*To whom correspondence should be addressed: Philippe Gaudu

E-mail: philippe.gaudu@jouy.inra.fr; Tel: (+33) 01 34 65 20 80; Fax: (+33) 01 34 65 20 65.

Institut Micalis UMR1319 et AgroParisTech, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas, cedex

Abstract

Background: Due to its extraordinary chemical properties, the cysteine amino acid residue is often involved in protein folding, electron driving, sensing stress, and binding metals such as iron or zinc. *Lactococcus lactis*, a Gram-positive bacterium, houses around one hundred cysteine-rich proteins (with the CX₂C motif) in the cytoplasm, but only a few in the membrane.

Results: In order to understand the role played by this motif we focused our work on two membrane proteins of unknown function: Llm_g_0524 and Llm_g_0526. Each of these proteins has two CX₂C motifs separated by ten amino-acid residues (CX₂CX₁₀CX₂C). Together with a short intervening gene (*llm_g_0525*), the genes of these two proteins form an operon, which is induced only during the early log growth phase. In both proteins, we found that the CX₂CX₁₀CX₂C motif chelated a zinc ion via its cysteine residues, but the sphere of coordination was remarkably different in each case. In the case of Llm_g_0524, two of the four cysteines were ligands of a zinc ion whereas in Llm_g_0526, all four residues were involved in binding zinc. In both proteins, the cysteine-zinc complex was very stable at high temperature or in the presence of oxidative agents, suggesting a probable role in protein stability. We found that the complete deletion of *llm_g_0524* increased the sensitivity of the mutant to cumene hydroperoxide whereas the deletion of the cysteine motif in Llm_g_0524 led on growth arrest. The latter mutant was much more resistant to lysozyme than other strains.

Conclusions: Our data suggest that The CX₂CX₁₀CX₂C motif is used to chelate a zinc ion but not predict the number of cysteine residue involved as ligand of metal. Although no other motifs are present in sequence to identify roles play by these proteins, our results suggests that this operon contribute to the cell wall integrity.

Keywords: cysteine, zinc, membrane proteins, growth, cumene hydroperoxide, lysozyme

Background

Cysteine is an extraordinary amino acid residue because of the chemical reactivity of its thiol group (SH). In contact with oxidative compounds, the thiol group can oxidize itself into sulfenic acids (SOH) or form a disulfide bond (R-S-S-R') with another cysteine residue, either from the same or from a different protein. These oxidized states can revert back to the reduced form (R-SH) via the action of an electron donor [1, 2]. In contrast, autooxidation into sulfinic (SO₂H) and sulfonic acid (SO₃H) forms irreversible states of cysteine. In proteins containing an iron-sulfur cluster, cysteine enables the sequestration of redox metals, determined by the identity of the redox-sensitive transcriptional regulator: *Escherichia coli* SoxR[2S/2Fe] is a sensor of superoxides, while *E. coli* FNR[4S/4Fe] is a sensor of oxygen [3]. This amino acid can also bind non-redox metals such as zinc ion, for example in the zinc finger complex, thus enabling the correct folding of proteins. It is worth noting this latter complex is mainly found in eukaryotic cells [4]. Due to the redox properties of cysteine, the oxidation of this amino acid can activate transcriptional factors directly, as has been described in *E. coli* (OxyR, [5]) and *Bacillus subtilis* (OhrR, [6]), as well as indirectly, via the oxidation of a [Fe/S] cluster (as occurs in SoxR and FNR in *E. coli*). In addition, cysteine residues have also been associated with enzymatic activities, such as those involving glyceraldehyde dehydrogenase (Gapdh, a metabolic enzyme, [7]), heat shock chaperone proteins (Hsp33 [8], DnaJ [9]), and thioredoxins and glutaredoxins (electron carriers [2]). Thus, because of their involvement in multiple key aspects of cellular metabolism, the presence of cysteine residues in proteins is expected to be widely distributed across all organisms, from viruses to complex forms like the eukaryotic cell.

Unexpectedly, recent studies on extracytoplasmic proteins whose activation is mediated by intramolecular disulfide bonds revealed that proteins in Gram-positive bacteria are proportionately poorer in cysteine residues than proteins found in other bacteria, a phenomenon termed “cysteine exclusion” [10, 11]. One proposed explanation was that, unlike Gram-negative bacteria, Gram-positive bacteria have neither a periplasmic space nor outer membrane. Thus, exported cysteine-rich proteins would be subject to oxidation, which, in the absence of repair machinery such as the DsB system in *E. coli* [1], would lead to their inactivation. In Gram-positive bacteria, a system has been identified in *B. subtilis* that repairs misfolded exported proteins (BdB system) [12] but this might be an exception to the norm, as only two similar systems have been identified since: in *Mycobacterium tuberculosis* [13, 14] and in *Streptococcus gordonii* [10].

Compared to *E. coli* or *B. subtilis*, *Lactococcus lactis*, a facultatively aerobic bacterium of high technological interest, has an even lower amount of cysteine residue in its proteins [10, 11, 15]. Thus far, investigations of the proteins of this bacterium have characterized only a few whose cysteine residues interact with an iron-sulfur cluster or catalyze reduction of substrates, and all of these are cytosolic proteins. In the activase protein (NrdG) of the anaerobic ribonucleotide reductase complex (RNR) these residues are predicted to sequester a [4Fe/4S] cluster [16] although only

three were enough to form the cluster [17]. In the dihydroorotate dehydrogenase (PyrK) four cysteines should sequester a [2Fe/2S] redox cluster [18]. Both RNR and PyrK are connected to DNA synthesis. In the alkylhydroperoxide reductase (AhpC/AhpF) [19] and thioredoxin reductase/thioredoxin system (TR/Trx) [7], cysteines directly catalyze the reduction of substrates. AhpC/AhpF is one of the few enzymes described so far that play a role in oxidative stress resistance. TR/Trx maintains the intracellular redox state to protect intracellular proteins (like Gapdh) against oxidation [7, 20]. Finally, Clp ATPase (ClpE) was reported to contribute to the degradation of misfolded or truncated intracellular proteins [21], and its activity could depend on a putative cysteine-containing zinc finger [22].

In this study, using a bioinformatic approach, we selected cysteine-rich proteins located in the membrane as they might constitute a first signaling pathway to detect environmental stress through cysteine oxidation and therefore be important to the cell. We found seven proteins, of which four had unknown functions: Llmg_0524, Llmg_0526, Llmg_1066, and Llmg_1102. Subsequently we focused on Llmg_0524 and Llmg_0526, demonstrating that genes of these two proteins, together with that encoding a predicted small membrane protein (Llmg_0525, protein free of cysteine residues), form an operon. This operon was induced temporarily and at very early log growth phase. The N-terminal extremities (N^{ter}) of proteins Llmg_0524 and Llmg_0526 were located inside cells and each contained four cysteine residues in the same CX₂CX₁₀CX₂C motif. We found that this motif housed a zinc ion, but the proteins differed in the number of cysteine residues involved in metal coordination: only two of the residues of Llmg_0524 were involved, whereas all four were involved in Llmg_0526. Finally, through different constructions in Llmg_0524 we found that this protein had a severe impact on growth and affected resistance to cumene hydroperoxide suggesting this operon also plays a role in oxidative stress resistance.

Results

***In silico* analysis of the cysteine-rich membrane proteins.** To identify the predicted membrane proteins that contained the CX₂C motif in *L. lactis* strain MG1363, we used a bioinformatic approach. From the genome database we found only 119 proteins that carried the motif (see Materials and methods), and when we used the prediction program (TMHMM server) to extract only membrane proteins, this number dropped to seven. Three of these proteins had a predicted function, whereas the remaining four did not (Table 1). Llmg_0199 (FeoB) and Llmg_1729 (CopA) have been linked to metal (iron and copper, respectively) homeostasis in bacteria [23-25]. The former protein is particularly likely to serve an essential function, as iron is necessary in *L. lactis* not only for DNA synthesis (with RNR and PyrK) but also for heme synthesis from protoporphyrinogen IX [26]. Heme enables *L. lactis* to undergo respiration, and this growth condition translates into increased biomass yield and an increase in long-term survival versus fermentation [26, 27]. Llmg_2304 (ComC) contained six cysteines, including two CX₂C motifs

separated by 21 amino-acid residues. This protein is similar to PilD, a peptidase involved in pili synthesis. In *Pseudomonas* species, the cysteine residues of PilD should complex a zinc ion. However, studies revealed that the cysteine-zinc complex may be unstable *in vitro* as, in some protein preparations, a disulfide bond was formed instead [28, 29]. Llm_g_0524 and Llm_g_0526 each contained four cysteines, in a CX₂CX₁₀CX₂C motif in the N-terminal extremity (N^{ter}) (Fig. S1), while Llm_g_1066 harbored a CX₂C motif in its C-terminal extremity (C^{ter}). Llm_g_1102 contained four target motifs in its N^{ter} domain, which were organized into two CX₂CX₁₄CX₂C motifs. With the exception of the cysteine motif, no other signatures were detected that predicted the function of the latter four proteins.

Table 1. Putative membrane proteins containing CX₂C motif in *L. lactis* strain MG1363.

Proteins	N. of TMD	N. of cysteine	N. of CX ₂ C motif
Llm _g _0199, FeoB	12	5	1
Llm _g _1729, CopA	8	4	1
Llm _g _2304, ComC	6	6	2
Llm _g _0524	2	4	2
Llm _g _0526	1	4	2
Llm _g _1066	2	2	1
Llm _g _1102	1	8	4

N.: number; TMD, number of transmembrane domain (TMHMM prediction program, cut off >0.4).

To understand the role of the cysteine motif in *L. lactis* proteins, we continued our investigation by focusing on Llm_g_0524 and Llm_g_0526. We aimed to determine: i) the genetic organization and expression of these proteins; ii) the localization and properties of the cysteine motif within the proteins; and iii) the role of these proteins.

Temporal expression of the llm_g_0524-0525-0526 operon. We found a stem loop upstream of the llm_g_0524 ORF (-15.3 Kcals) and another one downstream of the llm_g_0526 ORF (-15.2 Kcals), suggesting a potential operonic structure for the three genes: the llm_g_0524 ORF; the llm_g_0525 ORF, which encodes a small (64 amino-acid residues) hydrophobic protein free of cysteines; and the llm_g_0526 ORF (Fig 1A). To test our hypothesis, we performed RT-PCR assays with different primer pairs and total RNA that had been extracted from cells harvested in the exponential growth phase (Fig. 1B). The results showed that an mRNA transcript overlapped two adjacent genes (llm_g_0524-0525 and llm_g_0525-0526). We also performed PCR with primers designed inside the llm_g_0524 and llm_g_0526 ORFs; the transcripts of this PCR product covered all three genes. No PCR amplification was obtained with primer pairs designed for the llm_g_0526 and llm_g_0527 ORFs (or for glpT and llm_g_0524), a result that was consistent with the presence of stem

loops (data not shown). Finally, we cloned a DNA fragment that covered the region from the middle of the *llmg_0524* ORF to the beginning of the *llmg_0526* ORF (start codon included); this fragment was inserted upstream of the promoterless *lacZ* gene of the pTCV-*lac* plasmid [30], generating plasmid P₀₅₂₆-pTCV-*lac*. After we introduced this plasmid into *L. lactis* strain MG1363, we did not detect any β -galactosidase (β -Gal) activity under the tested conditions (static, aeration, and peroxide stress growth conditions), suggesting the absence of a promoter, specifically the one upstream of the *llmg_0524* ORF. Taken together, these results indicate that the three genes are clustered in an operon and under the control of a promoter located upstream of the *llmg_0524* ORF.

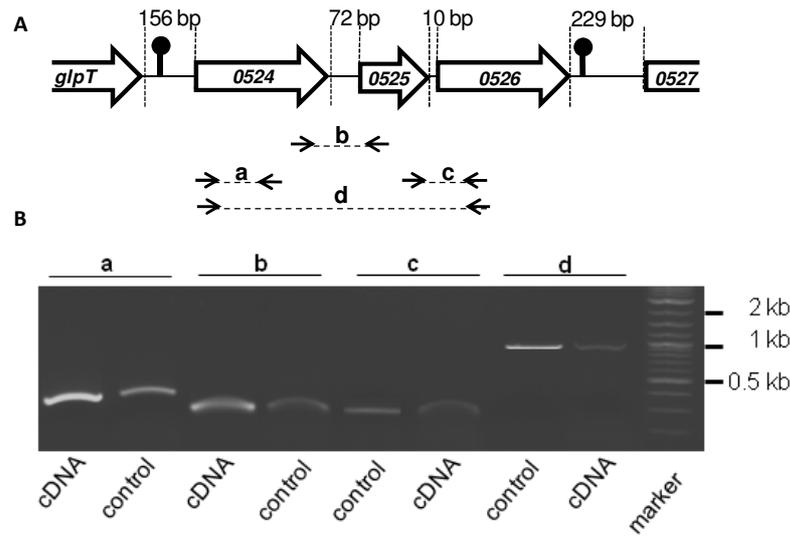


Fig. 1. *llmg_0524*, *llmg_0525*, and *llmg_0526* form an operon. A. Schematic representation of the locus; bp - base pair. B. RT-PCR analysis of the locus. Total RNA was transformed into cDNA, which in turn was used as the template for PCR with different primer pairs (a, b, c, and d). Control - genomic DNA.

To study the expression of the operon, we cloned the promoter region into the pTCV-*lac* plasmid, creating plasmid P₀₅₂₄-pTCV-*lac*, and introduced this into *L. lactis* strain MG1363. With ortho-nitrophenyl galactoside as the growth substrate and glucose as the energy source, we did not detect any β -Gal activity. However, using a more sensitive test with a fluorescent substrate (β -Glo), we managed to detect some β -Gal activity, indicating that the operon was poorly expressed. Under these conditions, we observed β -Gal induction at the beginning of growth (Fig. 2A), with a peak around OD₆₀₀ 0.1. Beyond this point, β -Gal activity decreased progressively with further growth. When glucose was replaced by galactose as the energy source, β -Gal expression increased but appeared later (OD₆₀₀ 0.3) in growth than was observed with glucose. Moreover, instead of having a peak, transcript quantity reached a stable plateau at OD₆₀₀ 0.5. To validate gene expression we performed semi-quantitative RT-PCR assays (Fig. 2B), which revealed relative transcript amounts that were concordant with the β -Gal activity patterns. None of the other tested growth conditions (anaerobic, aeration, and oxidative stress; data not shown) resulted in changes to the expression of

the operon. We thus conclude that transcript production is temporary and occurs only during the early log growth phase.

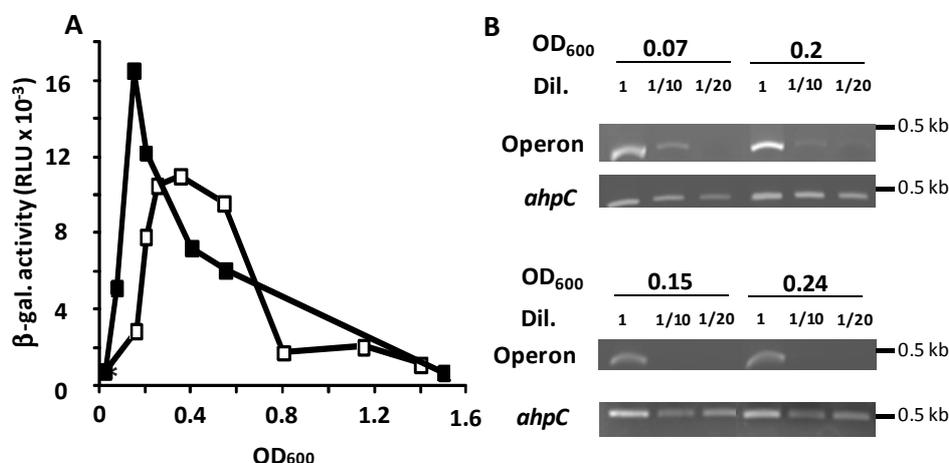


Fig. 2. Temporal expression of the operon. A. Expression kinetics of the operon. Cells were grown in M17glucose (black squares) or M17galactose (white squares). At regular intervals, aliquots were collected to assess β -gal activity. Results are the means of three independent experiments. Standard deviations are $\leq 15\%$ of means. B. Semi-quantification of the *llmg_0524* transcript. Cells were grown on glucose (top) or on galactose (bottom) and collected at certain growth phases. Total mRNA was prepared for semi-quantitative RT-PCR determination. Control - *ahpC*. Dil. - dilution.

Membrane localization of Lmg_0524 and Lmg_0526. Analyses of these proteins with topology prediction programs suggested that Lmg_0524 contained two transmembrane domains (Fig. S1) but the programs yielded no information about the localization of the N^{ter} domain (inside or outside). Lmg_0526 contained a unique transmembrane domain with the N^{ter} region, indicating that this end is probably inside the cell. To obtain direct experimental evidence regarding the membrane topology of these proteins, we performed an alkaline phosphatase (PhoA) assay [31]. PhoA is activated via the oxidation of its cysteine residue to form a disulfide bridge, a reaction which occurs mainly in the periplasm of *E. coli* cells. The PhoA assay thus consists of fusing the signal-sequence-less *phoA* gene to a target DNA sequence and then monitoring for PhoA activity; such activity should only be detectable if the target DNA addresses the resulting protein into the periplasmic space. We therefore constructed a set of plasmids that each contained a different portion of the *llmg_0524* and the *llmg_0526* ORFs fused to *phoA* (Fig. 3A), and then established the plasmids in the *E. coli phoA* mutant. Bacteria were grown on LB agar supplemented with arabinose for the production of fusion proteins and with a chromogenic compound for the detection of PhoA activity. Cells that produced the PhoA2 hybrid proteins (containing the transmembrane domain) generated a strong blue color, while those that produced the PhoA1 constructs (lacking the transmembrane domain) displayed only weak coloration (Fig. 3B). Quantification of the PhoA activity confirmed these observations, revealing the strongest activity in cells with the PhoA2 fusions (Fig. S2). We therefore conclude the two proteins are located in the membrane, with the N^{ter} ends located in the cytoplasm.

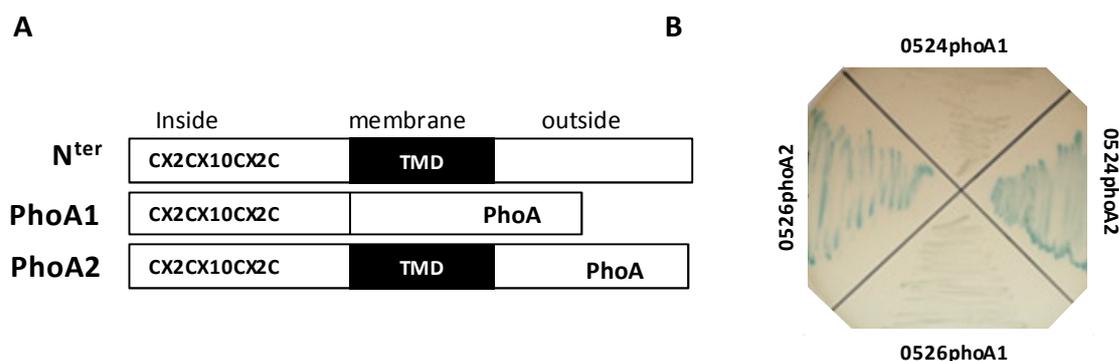


Fig. 3. N^{ter} end of Llm_g_0524 and Llm_g_0526 is intracellular. A. Schematic representation of the protein fusions. B. Phosphatase activity of cells that overproduced the protein fusions. Fusion proteins were overproduced in cells, which were then treated with arabinose. Phosphatase activity was revealed by a chromogenic compound in agar plates.

Llm_g_0524 and Llm_g_0526 are zinc metalloproteins. As the CX₂CX₁₀CX₂C motif in Llm_g_0524 and Llm_g_0526 was identical to that of the zinc metalloprotein DnaJ [9, 32], we suspected that our target proteins also bound a metal. To investigate this, we fused the N^{ter} domain of Llm_g_0524 and Llm_g_0526 (51 amino-acid residues) to the maltose binding protein MalE, creating MalE-0524^{N^{ter}} and MalE-0526^{N^{ter}}, respectively. After overproduction and purification, the hybrid proteins were analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) to determine their metal content (Table 2). The magnesium content of the samples was used as a control of sample quality because magnesium has not been reported to bind with cysteine residues and was present at similar levels in preparations of both proteins. As we predicted, the results revealed the presence of metals in our preparations. In the presence of MalE-0524^{N^{ter}}, zinc was far more abundant than iron. However, in preparations of MalE-0526^{N^{ter}}, although zinc was still the most abundant, there was also a quantity of iron ion. However, this protein (as well as MalE-0524^{N^{ter}}) was colorless (Fig. S3) and its UV-visible spectrum did not display any absorption bands in visible wavelengths, which are characteristic of iron-cysteine proteins [33]. Furthermore, when the medium was supplemented with zinc salt, the level of iron in the preparation decreased dramatically, indicating that the affinity of MalE-0526^{N^{ter}} to iron was not specific. Altogether these results indicate that Llm_g_0524 and Llm_g_0526 are zinc metalloproteins.

Table 2. Llm_g_0524 and Llm_g_0526 are zinc metalloproteins.

Protein	Ratio [Metal]/[protein]			Ratio [Zinc(PAR) ₂]/[protein]
	Mg	Fe	Zn	
MPB-0524 ^{N^{ter}}	0.21 ± 0.05	0.07 ± 0.01	0.45 ± 0.02	0.5 ± 0.07
MBP-0526 ^{N^{ter}}	0.26 ± 0.02	0.54 ± 0.05	0.79 ± 0.05	0.8 ± 0.10
+ zinc				
MPB-0524 ^{N^{ter}}	0.20 ± 0.07	0.02 ± 0.01	0.42 ± 0.08	0.4 ± 0.03
MBP-0526 ^{N^{ter}}	0.30 ± 0.11	0.03 ± 0.01	0.65 ± 0.14	0.8 ± 0.05

All Buffers were treated with Chelex. Analyse are a means of three independent protein purifications. + zinc, cultures were supplemented with 0.1 mM of zinc salt.

The CX₂CX₁₀CX₂C motif binds zinc metal directly. The ICP-MS analysis allowed us to determine the stoichiometry ratio of zinc to protein: 0.5:1 for MalE-0524^{Nter} and 0.8:1 for MalE-0526^{Nter}. These ratios did not change when we supplemented the media with zinc salt, and were further confirmed by the titration of zinc ions with the chelator PAR, (4-(2-pyridylazo) resorcinol (Table 2). To demonstrate that this metal was coordinated in the proteins via the thiol group of the cysteine, we treated the proteins with p-hydroxy mercury-phenylsulfonate agent (PMPS). PMPS specifically disrupts the cysteine-zinc bond by forming a cysteine-mercury and; the released zinc ion can be titrated with PAR [34]. Evidence of zinc-PAR₂ complex formation appeared progressively with increasing amounts of PMPS in the mixture (Fig. 4). For MalE-0524^{Nter}, two equivalents of PMPS versus protein were required to release around 90% of the zinc ions, and adding more PMPS (or zinc in the medium) did not significantly change the absorbance. As there were no cysteines in the MalE portion of the fusion protein, this result meant that two cysteine residues of Llmg_0524^{Nter} were involved in binding the zinc metal. If this were the case, the protein should therefore also contain free thiols, which we determined via titration with 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), a compound which reacts to free thiol groups. We observed that the ratio of free cysteine:protein was close to one (Table 3), demonstrating that not all cysteines were effectively involved in the binding of zinc. In MalE-0526^{Nter}, instead, four equivalents of PMPS were required to release most of the zinc from the protein, indicating a stoichiometry of 4:1 of PMPS:zinc and thus the presence of a zinc(Cys)₄ complex. In agreement with these observations, titration with DNTB indicated a low amount of free thiol groups in our preparations. We thus conclude that each of the two proteins harbors a zinc-cysteine module but in different coordination spheres: zinc(Cys)₂(X)₂ (X - unknown ligand) in Llmg_0524 and zinc(Cys)₄ in Llmg_0526.

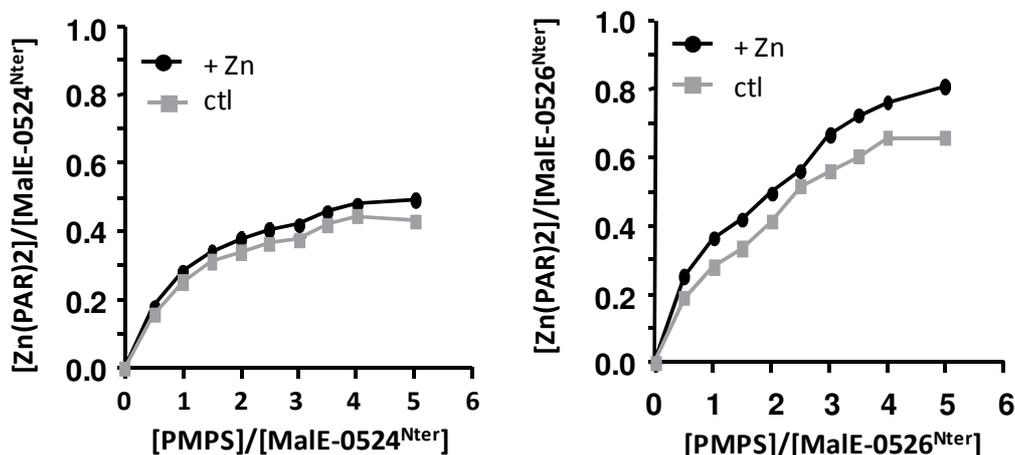


Fig. 4. Presence of a cysteine-zinc module in proteins. The cysteine-zinc bond was characterized by PMPS-PAR assays with 20 μ M of proteins. MalE-0524^{Nter} (left) or MalE-0526^{Nter} (right) were purified from cultures (ctl - control; grey squares) that were supplemented with zinc salt (black circles) Results are the means and standard deviations ($\leq 10\%$) from three independent preparations.

In addition, we tested the stability of the zinc module in the presence of oxidative agents (hydrogen peroxide, cumene hydroperoxide) and high temperature. In the presence of ten

equivalents of oxidant or high temperature (37°C), no released zinc ions were detected by PAR (data not shown), indicating that the modules in these proteins are very stable.

Table 3. Determination of free thiol groups in protein fusions.

	MalE-524 ^{Nter}	MalE-524 ^{Nter} , zinc	MalE-526 ^{Nter}	MalE-526 ^{Nter} , zinc
Thiol (μM)	17 ± 3	17 ± 2	8 ± 1	5 ± 0.5
Thiol/protein	0.85 ± 0.15	0.85 ± 0.1	0.4 ± 0.05	0.25 ± 0.02

20 μM of protein (equivalent to 80 μM of free thiol groups) was used for thiol group determination by DTNB assays.

Llm_g_0524 is required for resistance against cumene hydroperoxide and cell wall integrity. To investigate the function of this operon *in vivo*, deletion mutants were constructed for *llmg_0524* and *llmg_0526*. As our *in silico* analyses did not yield any information about the potential functions of these proteins, we screened the mutants in several growth conditions (salt, temperature, acid, base, reducing or oxidative agents, and sugars, alone and in combination). From these we found no clear phenotypic changes in the $\Delta llmg_0526$ mutant compared to its isogenic wild-type (wt) strain (data not shown). In the $\Delta llmg_0524$ mutant, instead, we found one growth condition in which the $\Delta llmg_0524$ mutant was more sensitive than the wt strain: growth in the presence of cumene hydroperoxide (CHP), an oxidative agent [35], and with galactose as an energy source (Fig. 5). In contrast, we did not observe any difference between the two strains treated hydrogen peroxide (data not shown). Resistance to CHP was completely restored when we transformed the $\Delta llmg_0524$ mutant with a plasmid expressing the wt operon (*p_{llmg_0524}^C*). Interestingly, the plasmid *p_{llmg_0524}^{c,Δcyst}*, which carried a version of the operon in which the DNA region encoding the cysteine motif of Llm_g_0524 had been deleted, was unable to complement the mutant. In fact, the mutant producing the truncated Llm_g_0524 grew very poorly even in the absence of stress, and on glucose as energy sources as well (Fig. 6A). Then, we asked whether the modifications of lipid or cell wall synthesis were responsible of that growth defect. Addition of Tween-80, a donor of long chain fatty acids, did not have any effect on the growth. In contrast, we found that the mutant, carrying the plasmid *p_{llmg_0524}^{c,Δcyst}*, became more resistant to lysozyme, an hydrolase of peptidoglycan, than the other strains (Fig. 6B) indicating that the growth defect was due to cell wall modifications. We conclude the Llm_g_0524 is linked to cell wall integrity and resistance to stressful conditions.

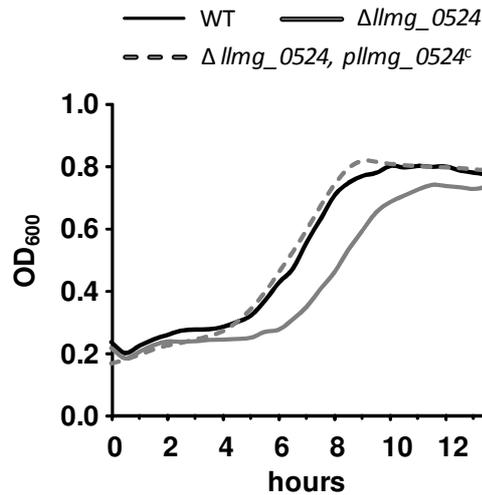


Fig. 5. Role of *Llmg_0524* mutant in cumene hydroperoxide resistance and growth. A. Deletion of *llmg_0524* affects cumene hydroperoxide sensitivity. Cells were grown in M17galactose in static conditions at 30°C. When cell density reached OD₆₀₀ 0.1, 0.3 mM of cumene hydroperoxide (Cu-OOH) was added to the culture. WT - black line, Δ*llmg_0524* mutant - gray line, Δ*llmg_0524* mutant carrying the plasmid encoding the full operon (*pllmg_0524^c*) - gray dashed line. The curves are representative of three independent trials.

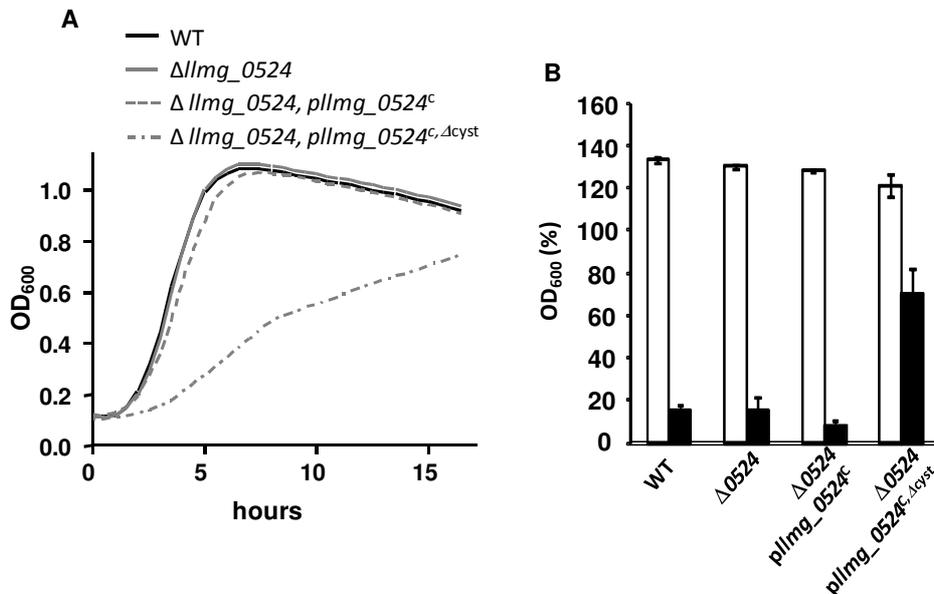


Fig. 6. Role of *Llmg_0524* in the cell wall integrity. A. Deletion of the cysteine-rich motif in *Llmg_0524* leads on growth defect. Cells were grown in M17glucose in static conditions at 30°C. The Δ*llmg_0524* mutant carrying the plasmid *pllmg_0524^{c,Δcyst}* is represented by a dark gray dashed line. The plasmid encoded the full operon, but lacked the region in the *llmg_0524* ORF corresponding to the cysteine motif. The curves are representative of three independent trials (same results were obtained with galactose as a carbon source). B. Deletion of the cysteine-rich motif in *Llmg_0524* leads on lysozyme resistance. After overnight cultures, strains were washed in PBS buffer and recovered at the same OD₆₀₀. After 60 minutes of incubation in absence (white bars) or in presence of lysozyme (black bars), we added SDS at 0.1% final concentration and measured OD₆₀₀. Results, plus standard deviation, are the means of three independent experiments. They are expressed in percent of OD₆₀₀ measured in samples incubated 60 minutes in absence of lysozyme and SDS.

Discussion

In this study we characterized Llm_g_0524 and Llm_g_0526, two proteins of unknown functions with the same CX₂CX₁₀CX₂C motif. This motif bound a zinc ion. We found that the cysteine-zinc complex was stable when subjected to stress, suggesting it plays a role in protein stability rather than as a sensor. This hypothesis is supported by our observation that deletion of this motif in Llm_g_0524 had serious impacts on cell growth. In addition, we did find that Llm_g_0524 also increased resistance against the oxidative agent cumene hydroperoxide.

A cysteine motif to chelate metal. In *L. lactis* strain, we demonstrated that the CX₂CX₁₀CX₂C motif bound zinc ion. This by itself is not novel, as this motif is also found in other proteins (Table S2), and in some of these, it has been experimentally demonstrated to bind this metal. For example, the DnaJ protein of *E. coli* binds zinc ion using all four cysteines of the motif, and formation of the zinc-cysteine complex is required for protein activation [9, 32]. More recently, the same motif was found in *E. coli* YciM, a membrane protein, in which the four cysteine residues were involved in metal coordination. However, YciM is proposed to bind iron ion instead of zinc [33]. From these observations alone, it was clear that the motif is used for trapping metal, but the question remained: is it possible to predict which metal, and the individual cysteine residues' contributions to sphere coordination, based only on the motif? In this study, zinc ion is the major metal found suggesting that this motif has a bigger affinity to zinc ion than iron. With the MalE-0526^{Nter} fusion protein, PMPS-PAR assays demonstrated the presence of a zinc(Cys)₄ module in Llm_g_0526, clearly indicating that all cysteine residues were engaged in zinc coordination. Unexpectedly, however, similar tests using the fusion MalE-0524^{Nter} revealed that only two residues bound zinc. The two other cysteines of the protein were free, although we detected only one residue that was accessible to DTNB. That observation also indicated that MalE-0524^{Nter} lacked a disulfide bond, suggesting that the fusion protein was not redox reactive in our preparations. To our knowledge, zinc usually binds four ligands, with cysteine and histidine residues as the most common ligands by far [4]. However, no histidine is present in the cytoplasmic portion of Llm_g_0524, which suggests that the metal coordination of this protein is unusual. Additional experiments will be needed to determine the other ligands of zinc ion in Llm_g_0524, as well as the parameters that could govern the specificity of metal.

Role of the *llm_g_0524-0525-0526 operon.* Unlike cysteine, zinc is not redox reactive. As the bound modules in Llm_g_0524 and Llm_g_0526 were very stable in the presence of oxidative agents or high temperature, it is unlikely that the module is used as a direct sensor of stress, as has been described, e.g., for the chaperone Hps33 [8]. Instead, for Llm_g_0524 at least, we think that the Zn module serves to stabilize the folded structure of the protein as required for its function, perhaps for interaction with other proteins. This hypothesis is supported by the dramatic growth differences we observed between the wild-type and the truncated-Llm_g_0524 mutant strain, which lacked the

cysteine motif (Fig. 6). Even in the absence of stress, this strain displayed a severe growth defect. Similarly, in *E. coli*, YciM mutants lacking this motif were unstable and formed aggregates [33]. In addition, our experiments with deletion mutants suggest that this operon plays a role in cell wall integrity in particular with peptidoglycan synthesis since that mutant, producing the truncated Llm_g_0524, was more resistant to lysozyme than other strains. A modification of cell wall may explain the light resistance to cumene-hydroperoxide observed in the Δ llm_g_0524 mutant. The mechanism of protection is still unknown, but it does not depend on the Zn module, as *in vitro* it was stable in the presence of hydroperoxide. Studies are in progress to characterize the modification of cell wall linked to Δ llm_g_0524 deletion. Our experiments with the Δ llm_g_0526 mutant did not produce any reproducible phenotypes even against the cumene hydroperoxide toxicity. In a protein BLAST search, this protein displays similarity to *S. aureus* TcaA, which has a cysteine motif inside, which might bind metal although this has not been confirmed [36]. Downstream of the motif, we found a transmembrane domain followed by a long extracellular chain. Deletion of the *tca* ORF increased sensitivity to teicoplanin, an antibiotic in the glycopeptide family, and this gene was induced by envelope stress [36]. In *L. lactis*, the envelope stress regulon controlled by the two-component system (CesRS) did not induce the llm_g_0524-0525-0526 operon [37].

Conclusions

Cysteine motifs in proteins are often associated to redox activity (like thioredoxin) or iron-sulfur cluster (like [4Fe/4S]) in bacteria, but less is known about cysteine motif in chelating zinc ion. In this work, we characterized in *Lactococcus lactis*, two membrane proteins (Llm_g_0524 and Llm_g_0526) carrying a CX₂CX₁₀CX₂C motif. The motif bound zinc ion although the sphere of coordination of zinc was remarkably different between the two proteins. Our works suggest that Llm_g_0524, and maybe other proteins of operon, is linked to cell wall integrity. The function of this protein in the machinery of cell wall synthesis remains to uncover now, as well as its zinc module.

List of abbreviations

wt, wild type

CHP, cumene hydroperoxide

PAR, 4-(2-pyridylazo) resorcinol

N^{ter}, N-terminal

DTNB, 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)

PMPS, p-hydroxymercuriphenylsulfonic acid

ICP-MS, inductively coupled plasma mass spectrometry

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests and no financial competing interests.

Authors' contributions

CR, BC, and PG carried out all experiments. RC provided intellectual input. CR and PG wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Methods

Ethics

All authors declared that no animal and human have been used in this study.

Bacterial strains and growth conditions. The strains and plasmids used in this work are listed in Table S1. For routine growth, *L. lactis* strains were grown in M17 (Oxoid) medium that was supplemented with 0.5% glucose, at 30°C without shaking. The *E. coli* strain, used as a cloning host, was grown aerobically in Luria-Bertani medium (LB), at 37°C with shaking. Antibiotics were used when needed at the following concentrations: 100 µg/ml of ampicillin or 40 µg/ml of kanamycin for *E. coli* strains, 5 µg/ml of tetracycline or 0.1 µg/ml of erythromycin for *L. lactis* strains. The growth of *L. lactis* strains was evaluated as follows: i) Wild-type and mutant strains were grown in M17 media that was supplemented with sugars (galactose, glucose) from an initial cell density (OD₆₀₀) of 0.025. When cultures reached 0.1 of OD₆₀₀, the following compounds were added at 0.3 mM: cumene hydroperoxide or hydrogen peroxide. Growth was measured for 24h by assessing optical densities in an Infinite M200 (Tecan) spectrophotometer.

In silico analysis. *L. lactis* proteins that contained the CX₂C motif were identified and downloaded from a genome database (Genolist server, [38]) and further analyzed with the prediction program TMHMM (Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark, [39]) to identify membrane domains. Proteins with a probability of transmembrane domain less than 0.4 were filtered out.

Plasmid and mutant constructions. Standard DNA recombination procedures were used, as described by Sambrook and Russell [40]. PCR amplifications were carried out using Taq Phusion DNA polymerase (Finnzymes). Amplified fragments were purified with the PurelinkTM Quick PCR Purification kit or Quick Gel Extraction kit (Invitrogen). Plasmid extraction was performed with the QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen). Deletion mutants were constructed using the double-crossing-

over method as described by [41]. Using specific primers (Table S1), the DNA fragments located upstream and downstream, respectively, of the target genes were amplified. These fragments were then fused in a second PCR and the DNA product was ligated into the EcoRI and XbaI sites of plasmid pBR322p+Ghost8. The insert was checked by sequencing. The modified plasmids were first transformed into *E. coli* strain TG1 by electroporation [42] before their introduction into *L. lactis* strains [43]. Transformants were selected on M17 glucose that was supplemented with tetracycline at 30°C. After integration of the plasmid into the locus at 37°C, it was excised at 30°C. The deletion of *llmg_0524* and *llmg_0526* in ten clones was checked by PCRs with oligos outside (upstream and downstream) of the recombination sites. For the complementation tests, the full operon, including a 500-bp open reading frame (ORF) upstream of *llmg_0524*, was amplified by PCR with primer pair 524-526-cplR and 524-526-cplF and cloned in the HindIII and SalI sites of pAK80 [44]. The resulting plasmid, *pllmg_0524^C*, was then transformed in the Δ *llmg_0524* mutant with erythromycin as selection. A similar construct, in which only the cysteine region of *llmg_0524* was omitted, was created and designated *pllmg_0524^{C,Δcyst}*.

RT-PCR and gene expression analysis. RT-PCR. Total RNA was extracted from 50 ml of culture of *L. lactis* strain MG1363 at the early exponential phase (OD₆₀₀ 0.1-0.2) using the Trizol reagent method (Invitrogen). The RNA preparation was treated with DNase I (Fermentas) to eliminate DNA contamination (this was confirmed by the absence of PCR product following a PCR with the *ahpC* gene as the target). DNA-free RNA was translated into cDNA by the iScriptTM cDNA synthesis kit (Biorad). To analyze whether *llmg_0524* and *llmg_0526* genes are transcribed in an operon, 4 μ l cDNA was used for amplification by PCR with primers listed in Table S1. Semi-quantitative RT-PCR. 4 μ l of cDNA, pure or diluted, was used in a PCR analysis containing primers that were designed to amplify the internal region of *llmg_0524* (300 bp) and a control gene *ahpC* (419 bp) (Table S1).

Gene expression. To analyze *llmg_0524* and *llmg_0526* gene expression, we constructed transcriptional fusions between the plasmid pTCV-*lac* [30], carrying the *lacZ* reporter gene, and the putative promoter region of each gene. The specific primers used for amplifying each promoter region are listed in Table S1. After digestion with XmaI and EcoRI restriction enzymes, each PCR product was cloned into pTCV-*lac*, resulting in the creation of plasmids P₀₅₂₄-pTCV-*lac* and P₀₅₂₆-pTCV-*lac*. The ligation products were transformed into *E. coli* strain TG1, at which point the insertions were confirmed by PCR and sequencing using the specific oligonucleotides Vlac1 and Vlac2. The two plasmids were transformed into *L. lactis* strain MG1363 and transformants were selected on plates supplemented with erythromycin.

Enzymatic assays. β -galactosidase fusion assays. Cells that contained plasmids P₀₅₂₄-pTCV-*lac* or P₀₅₂₆-pTCV-*lac* were grown in M17 medium supplemented with glucose or galactose. β -Galactosidase activity was quantified by luminescence in an Infinite M200 spectroluminometer (Tecan) using the β -Glo[®] assay system, as recommended by the manufacturer (Promega). Results

were normalized to those obtained from *L. lactis* strain MG1363 carrying the plasmid pTCV-*lac*. Alkaline Phosphatase (*PhoA*) assay. To determine the orientation of proteins, we identified the DNA regions that corresponded to the N-terminal extremity (N^{ter}) of proteins with or without the transmembrane domain and cloned them into the XhoI and KpnI sites of the plasmid pHA-Zed [31]. This plasmid contained the *phoA* gene, which encodes an alkaline phosphatase enzyme under the control of an arabinose-dependent promoter region. The plasmids thus obtained were designated p524PhoA1 and p526PhoA1 (containing the N^{ter} of *llmg_0524* or *llmg_0526*, respectively, without the membrane domain and with *phoA*), and p524PhoA2 and p526PhoA2 (same as PhoA1 plasmids but with the membrane domain). The plasmids were transformed into *E. coli* strain CC118 [31] and recombinant clones were selected with ampicillin. To measure PhoA activity in *E. coli* strains, overnight cultures were diluted in LB broth to OD₆₀₀ 0.05 and grown until they reached OD₆₀₀ 0.5, at which point the cultures were treated for 2 hours with 0.2% arabinose. A 100- μ l aliquot was taken from each culture, washed twice, and incubated with 0.8 ml of Tris HCl buffer pH 8 (1 M) and 100 μ l *p*-nitrophenyl phosphate (at 4 g/l) at 37°C. When a yellow color appeared, we stopped the reactions by adding 200 μ l K₂HPO₄ (1M). Substrate hydrolysis was measured at OD₄₀₅ and results are expressed in Miller units using the following formula: $[\text{OD}_{405} - (1.75 \times \text{OD}_{405})] \times 1000 / [\text{incubation time (min)} \times \text{OD}_{600} \times 0.1]$. PhoA activity was visually analyzed on plates that contained LB agar supplemented with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP). The clones producing extracytoplasmic PhoA displayed a blue color due to the hydrolysis of BCIP in 5-bromo-4-chloro-3-indole (BCI) and inorganic phosphate under aerobic growth conditions.

Overproduction and purification of Male-N^{ter} fusions. For purification of the N-terminal region (N^{ter}) of proteins (the first 51 amino acid residues), we used the pMalTM Protein Fusion and Purification System (Biolabs). The *llmg_0524'* fragment was amplified by PCR and cloned into the pMal-c4x vector and the product transformed into *E. coli* strain TG1. A transformant containing the plasmid pMal-0524N^{ter} was cultured until it reached OD₆₀₀ 0.5 for induction by IPTG (isopropyl 1-thiol- β -D-galactopyranoside, 0.5 mM). After 4h, cells were washed twice in 10 mM Tris-HCl pH 7.5 buffer, pretreated with Chelex resin (Sigma), and stored as a cell pellet at -80°C. We purified Male-0524N^{ter} by affinity chromatography as described in [45] with Chelex-treated buffers. The same strategy was used to produce the fusion Male-0526N^{ter}. Protein purity was confirmed by SDS-PAGE and proteins were concentrated in spin columns (Centricon, Amicon, cut off: 10 KDa). Protein concentrations were determined with the Bradford assay method (Biorad) with bovine serum albumin as the standard.

Zinc relative abundance determination.

Zinc Quantification. Proteins (40 μ M) were precipitated during 30 min in ice with trichloroacetic acid (TCA) at 10%. After centrifugation (15 min, 15,000 g), the supernatant was first neutralized with NaOH and then Tris-HCl pH 7.5 was added to 0.5 M final concentration. Samples of 400 μ l each were incubated for 1h in a solution of 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR) at 200 μ M final

concentration in a total volume of 1 ml. The formation of the $\text{Zn}(\text{PAR})_2$ complex was determined at OD_{495} ($\epsilon_{495} = 66 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). PMPS-PAR assays. ρ -hydroxymercuriphenylsulfonic acid (PMPS) was used to determine if ligands formed between zinc and MalE-0524^{Nter} or MalE-0526^{Nter}. Proteins were first treated with PMPS at different concentrations and a colorimetric PAR assay was used to determine the amount of zinc ion released into solution.

Stability of cysteine/zinc complex. The stability of the complex was tested by treating proteins at 37°C or in the presence of 10 equivalents of hydrogen peroxide or cumene hydroperoxyde at 30°C. After 1h incubation, the amount of zinc ion released into solution was determined by the colorimetric PAR assay.

Free accessible thiol groups titration.

Accessible thiol groups were measured using Ellman's method. Proteins (20 μM) were incubated with 60 μM of 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8), at room temperature in the dark. After 30 min, the OD_{412} was determined. The concentration of accessible thiol groups was estimated using a standard curve of N-acetyl-L-cysteine (5-60 μM).

ICP-MS analysis. Metal ions (Mg, Cu, Fe, Co, Mn, Zn) were identified and quantified by inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Agilent 7700x) at the Geosciences-Montpellier facility (Université Montpellier II). Cu, Co, and Mn ions were not detected in our preparations.

Lysozyme assays. Strains were grown in M17Glu 0.5% for overnight. Cells were washed once in PBS buffer and recovered in the buffer for OD_{600} determination. After OD_{600} adjustments, strains were treated or not with lysozyme (1mg/ml) for 60 minutes at 30°C. Then, we added a solution of sodium dodecyl-sulfate (SDS) at 0.1% final concentration to clear the cell suspension and measured the OD_{600} .

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Chantal Douchet for ICP-MS analysis, G. von Heijne and D. Daley for plasmid pHA-1::yedZ and *E. coli* strain CC118; and the MicrobAdapt team, David Pérez-Pascual, and Lionel Rigottier-Gois for fruitful discussion. We thank L. Higgins for English corrections. This work is funded by the Agence Nationale de la Recherche Food Redox project (ANR-11-ALID-0001).

REFERENCES

1. Kadokura H, Katzen F, Beckwith J: **Protein disulfide bond formation in prokaryotes.** *Ann Rev Biochem* 2003, **72**:111-135.
2. Lu J, Holmgren A: **The thioredoxin antioxidant system.** *Free Rad Biol Med* 2014, **66**:75-87.
3. Kiley PJ, Beinert H: **The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria.** *Curr Opin Microbiol* 2003, **6**(2):181-185.
4. Andreini C, Bertini I, Cavallaro G: **Minimal functional sites allow a classification of zinc sites in proteins.** *PLoS one* 2011, **6**(10):e26325.
5. Zheng M, Aslund F, Storz G: **Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation.** *Science* 1998, **279**(5357):1718-1721.
6. Soonsanga S, Lee JW, Helmann JD: **Oxidant-dependent switching between reversible and sacrificial oxidation pathways for *Bacillus subtilis* OhrR.** *Mol Microbiol* 2008, **68**(4):978-986.
7. Vido K, Diemer H, Van Dorselaer A, Leize E, Juillard V, Gruss A, Gaudu P: **Roles of thioredoxin reductase during the aerobic life of *Lactococcus lactis*.** *J Bacteriol* 2005, **187**(2):601-610.
8. Ilbert M, Horst J, Ahrens S, Winter J, Graf PC, Lilie H, Jakob U: **The redox-switch domain of Hsp33 functions as dual stress sensor.** *Nat Struct Mol Biol* 2007, **14**(6):556-563.
9. Ishii Y, Sonezaki S, Iwasaki Y, Tauchi E, Shingu Y, Okita K, Ogawa HI, Kato Y, Kondo A: **Single-step purification and characterization of MBP (maltose binding protein)-DnaJ fusion protein and its utilization for structure-function analysis.** *J Biochem* 1998, **124**(4):842-847.
10. Daniels R, Mellroth P, Bernsel A, Neiers F, Normark S, von Heijne G, Henriques-Normark B: **Disulfide bond formation and cysteine exclusion in gram-positive bacteria.** *J Biol Chem* 2010, **285**(5):3300-3309.
11. Dutton RJ, Boyd D, Berkmen M, Beckwith J: **Bacterial species exhibit diversity in their mechanisms and capacity for protein disulfide bond formation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(33):11933-11938.
12. Kouwen TR, van der Goot A, Dorenbos R, Winter T, Antelmann H, Plaisier MC, Quax WJ, van Dijk JM, Dubois JY: **Thiol-disulphide oxidoreductase modules in the low-GC Gram-positive bacteria.** *Mol Microbiol* 2007, **64**(4):984-999.
13. Chim N, Harmston CA, Guzman DJ, Goulding CW: **Structural and biochemical characterization of the essential DsbA-like disulfide bond forming protein from *Mycobacterium tuberculosis*.** *BMC Struct Biol* 2013, **13**:23.
14. Wang X, Dutton RJ, Beckwith J, Boyd D: **Membrane topology and mutational analysis of *Mycobacterium tuberculosis* VKOR, a protein involved in disulfide bond formation and a homologue of human vitamin K epoxide reductase.** *Antioxidants & Redox Signaling* 2011, **14**(8):1413-1420.
15. Rochat T, Boudebouze S, Gratadoux JJ, Blugeon S, Gaudu P, Langella P, Maguin E: **Proteomic analysis of spontaneous mutants of *Lactococcus lactis*: Involvement of GAPDH and arginine deiminase pathway in H₂O₂ resistance.** *Proteomics* 2012, **12**(11):1792-1805.
16. Torrents E, Buist G, Liu A, Eliasson R, Kok J, Gibert I, Graslund A, Reichard P: **The anaerobic (class III) ribonucleotide reductase from *Lactococcus lactis*. Catalytic properties and allosteric regulation of the pure enzyme system.** *J Biol Chem* 2000, **275**(4):2463-2471.

17. Tamarit J, Gerez C, Meier C, Mulliez E, Trautwein A, Fontecave M: **The activating component of the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. An iron-sulfur center with only three cysteines.** *J Biol Chem* 2000, **275**(21):15669-15675.
18. Nielsen FS, Andersen PS, Jensen KF: **The B form of dihydroorotate dehydrogenase from *Lactococcus lactis* consists of two different subunits, encoded by the *pyrDb* and *pyrK* genes, and contains FMN, FAD, and [FeS] redox centers.** *J Biol Chem* 1996, **271**(46):29359-29365.
19. Tachon S, Brandsma JB, Yvon M: **NoxE NADH oxidase and the electron transport chain are responsible for the ability of *Lactococcus lactis* to decrease the redox potential of milk.** *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**(5):1311-1319.
20. Efler P, Kilstrup M, Johnsen S, Svensson B, Hagglund PM: **Two *Lactococcus lactis* thioredoxin paralogues play different roles in responses to arsenate and oxidative stress.** *Microbiology* 2015.
21. Ingmer H, Vogensen FK, Hammer K, Kilstrup M: **Disruption and analysis of the *clpB*, *clpC*, and *clpE* genes in *Lactococcus lactis*: ClpE, a new Clp family in gram-positive bacteria.** *J Bacteriol* 1999, **181**(7):2075-2083.
22. Elsholz AK, Hempel K, Pother DC, Becher D, Hecker M, Gerth U: **CtsR inactivation during thiol-specific stress in low GC, Gram+ bacteria.** *Mol Microbiol* 2011, **79**(3):772-785.
23. Aranda J, Cortes P, Garrido ME, Fittipaldi N, Llagostera M, Gottschalk M, Barbe J: **Contribution of the FeoB transporter to *Streptococcus suis* virulence.** *Int Microbiol* 2009, **12**(2):137-143.
24. Magnani D, Barre O, Gerber SD, Solioz M: **Characterization of the CopR regulon of *Lactococcus lactis* IL1403.** *J Bacteriol* 2008, **190**(2):536-545.
25. Naikare H, Palyada K, Panciera R, Marlow D, Stintzi A: **Major role for FeoB in *Campylobacter jejuni* ferrous iron acquisition, gut colonization, and intracellular survival.** *Infect Immun* 2006, **74**(10):5433-5444.
26. Duwat P, Sourice S, Cesselin B, Lamberet G, Vido K, Gaudu P, Le Loir Y, Violet F, Loubiere P, Gruss A: **Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival.** *J Bacteriol* 2001, **183**(15):4509-4516.
27. Pedersen MB, Garrigues C, Tuphile K, Brun C, Vido K, Bennedsen M, Mollgaard H, Gaudu P, Gruss A: **Impact of aeration and heme-activated respiration on *Lactococcus lactis* gene expression: identification of a heme-responsive operon.** *J Bacteriol* 2008, **190**(14):4903-4911.
28. Aly KA, Beebe ET, Chan CH, Goren MA, Sepulveda C, Makino S, Fox BG, Forest KT: **Cell-free production of integral membrane aspartic acid proteases reveals zinc-dependent methyltransferase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* prepilin peptidase PilD.** *MicrobiologyOpen* 2013, **2**(1):94-104.
29. Strom MS, Bergman P, Lory S: **Identification of active-site cysteines in the conserved domain of PilD, the bifunctional type IV pilin leader peptidase/N-methyltransferase of *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Biol Chem* 1993, **268**(21):15788-15794.
30. Poyart C, Trieu-Cuot P: **A broad-host-range mobilizable shuttle vector for the construction of transcriptional fusions to beta-galactosidase in gram-positive bacteria.** *FEMS microbiol lett* 1997, **156**(2):193-198.
31. Drew D, Sjostrand D, Nilsson J, Urbig T, Chin CN, de Gier JW, von Heijne G: **Rapid topology mapping of *Escherichia coli* inner-membrane proteins by prediction and PhoA/GFP fusion analysis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(5):2690-2695.

32. Linke K, Wolfram T, Bussemer J, Jakob U: **The roles of the two zinc binding sites in DnaJ.** *The J Biol Chem* 2003, **278**(45):44457-44466.
33. Nicolaes V, El Hajjaji H, Davis RM, Van der Henst C, Depuydt M, Leverrier P, Aertsen A, Haufroid V, Ollagnier de Choudens S, De Bolle X *et al*: **Insights into the function of YciM, a heat shock membrane protein required to maintain envelope integrity in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 2014, **196**(2):300-309.
34. Vitale S, Fauquant C, Lascoux D, Schauer K, Saint-Pierre C, Michaud-Soret I: **A ZnS(4) structural zinc site in the *Helicobacter pylori* ferric uptake regulator.** *Biochemistry* 2009, **48**(24):5582-5591.
35. Asad LM, Medeiros DC, Felzenszwalb I, Leitao AC, Asad NR: **Participation of stress-inducible systems and enzymes involved in BER and NER in the protection of *Escherichia coli* against cumene hydroperoxide.** *Mut Research* 2000, **461**(1):31-40.
36. McCallum N, Brassinga AK, Sifri CD, Berger-Bachi B: **Functional characterization of TcaA: minimal requirement for teicoplanin susceptibility and role in *Caenorhabditis elegans* virulence.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2007, **51**(11):3836-3843.
37. Veiga P, Bulbarela-Sampieri C, Furlan S, Maisons A, Chapot-Chartier MP, Erkelenz M, Mervelet P, Noiroot P, Frees D, Kuipers OP *et al*: **SpxB regulates O-acetylation-dependent resistance of *Lactococcus lactis* peptidoglycan to hydrolysis.** *J Biol Chem* 2007, **282**(27):19342-19354.
38. Lechat P, Hummel L, Rousseau S, Moszer I: **GenoList: an integrated environment for comparative analysis of microbial genomes.** *Nuc Acids Res* 2008, **36** D469-474.
39. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL: **Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes.** *J Mol Biol* 2001, **305**(3):567-580.
40. Sambrook J, Russell DW: **Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed.** *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY* 2001.
41. Biswas I, Gruss A, Ehrlich SD, Maguin E: **High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria.** *J Bacteriol* 1993, **175**(11):3628-3635.
42. Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW: **High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.** *Nuc Acids Res* 1988, **16**(13):6127-6145.
43. Holo H, Nes IF: **High-Frequency Transformation, by Electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris Grown with Glycine in Osmotically Stabilized Media.** *Appl Environ Microbiol* 1989, **55**(12):3119-3123.
44. Israelsen H, Madsen SM, Vrang A, Hansen EB, Johansen E: **Cloning and partial characterization of regulated promoters from *Lactococcus lactis* Tn917-lacZ integrants with the new promoter probe vector, pAK80.** *Appl Environ Microbiol* 1995, **61**(7):2540-2547.
45. Lechardeur D, Fernandez A, Robert B, Gaudu P, Trieu-Cuot P, Lamberet G, Gruss A: **The 2-Cys peroxiredoxin alkyl hydroperoxide reductase c binds heme and participates in its intracellular availability in *Streptococcus agalactiae*.** *J Biol Chem* 2010, **285**(21):16032-16041.

SUPPLEMENTAL MATERIALS

Limg_0524

MENQPTFC**PH**CGKEIEAGSVFC**TN**CGTKMENQPANETSTANSVKPFVTEEQREILKNGATNLWEWI
VSAVKAPTKNVQENTPL**WFSWLSIILT**AIFGALAL**GKILVNIIT**NASTSVGNALGSANNSLGSLYNQN
VENTVANTANHVFGQMIFPI**IISFIILHAATILGGWLAN**FAILGDKTFTFKMLNYYGRFMFFYLH

Limg_0526

MENNTK**FC**PHCGTENKKDAAF**CAN**CGQSMINQPENKEAETKEKRPVNKKMIGIGAVIA**IFIIGGVF**
AYINAQPKSILNAVKNVFSGYNSQGTVELLGDYQKKEIEIGAKVGLPSSEVKKAEDSNIFSFFNSTTN
NSTKWQKFAKYFEDTRINISHSQNLNSGQKVTLKITTLLKDNPIKEETKTYTVKNLKKATTYTIESVLKD
NPVSFTGFNFHFGSVKFDDDKFTVNNDNSAPTDLTNGEQIIVRLSQDYINQQKSNKILSGTATKTLTV
ADLESSPKISLNDLLTQEDTVVRADNESSTGDFGTTYTVTRMDSYFVGTNISSWGYSSDDSDKG
EFSVVTIYKIVSHYNSD**TD**T**KND**STSYYSNGYTGLTLNNGKVDVSDLTGNNKYKGGSSSEQA**AVD**
QLKSDYSSATKLN

Fig. S1. Amino acid sequence of Limg_0524 and Limg_0526. Limg_0524 has two hundred amino acid residues including four cysteines in N^{ter} extremity and two transmembrane domains (TMD). Limg_0526 has four hundred twenty-one amino acid residues including four cysteines in N^{ter} extremity and a transmembrane domain. Cysteine residues are clustering in a CX₂CX₁₀CX₂C motif in the two proteins. Cysteine amino acid residues are in bold red, predicted membrane helices are in bold black.

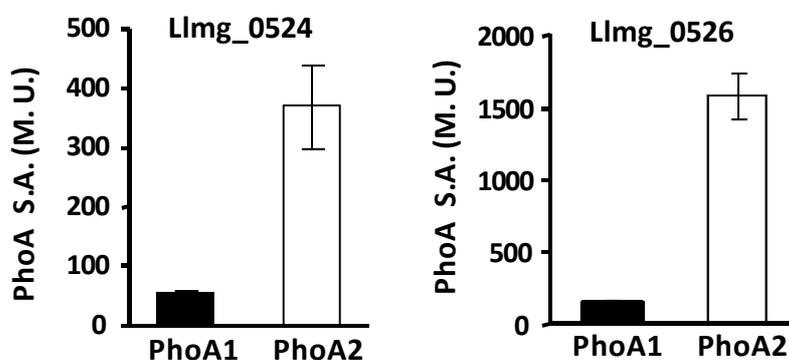


Fig. S2. Determination of PhoA activities in different fusions. Data were from three independent experiments and presented as mean \pm SEM. PhoA1 contained only the N^{ter} domain, PhoA2 N^{ter} domain and the predicted transmembrane domain.

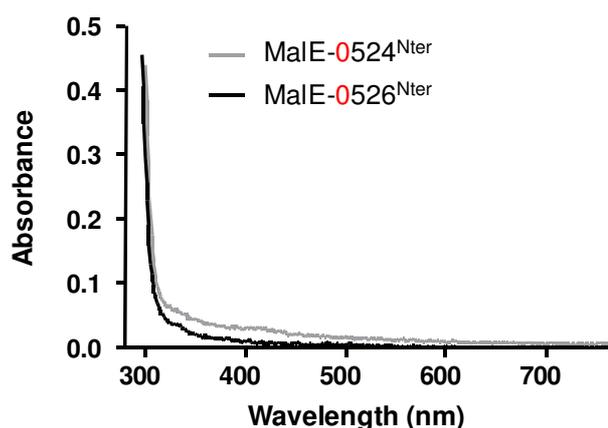


Fig. S3. UV-visible spectra of protein fusions. 20 μ M of proteins were used. Analysis is performed in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, at room temperature.

Table S1. Strains and plasmids.

Plasmid or strains	Relevant characteristic(s)	Source or reference
Plasmids		
pBR322pGhost8	Temperature-sensitive vector, Am ^r _{E. coli} Tet ^r _{L. lactis}	41
pBR322pGhost8-Δ0524	pBR322pGhost8 carrying the flanking regions of <i>limg_0524</i> gene	This study
pBR322pGhost8-Δ0526	pBR322pGhost8 carrying the flanking regions of <i>limg_0526</i> gene	This study
pAK80	Ery ^r , containing promoterless β-galactosidase gene	44
pAK80- <i>limg_0524</i> ^C	pAK80 carrying the locus of <i>limg_0524-0525-0526</i>	This study
pAK80- <i>limg_0524</i> ^{C,Δcyst}	pAK80 carrying the locus of <i>limg_0524-0525-0526</i> with deletion of cysteine region of <i>limg_0524</i>	This study
pHA1-YedZ	Am ^r , containing an arabinose inducible promoter followed by the <i>phoA</i> gene	31
pHA1-524phoA1	pHA1 carrying DNA encoding the N-ter domain of <i>limg_0524</i>	This study
pHA1-524phoA2	pHA1 carrying DNA encoding the N-ter and transmembrane domains of <i>limg_0524</i> gene	This study
pHA1-526phoA1	pHA1 carrying DNA encoding the N-ter domain of <i>limg_0526</i> gene	This study
pHA1-526phoA2	pHA1 carrying DNA encoding the N-ter and transmembrane domains of <i>limg_0526</i> gene	This study
pTCV- <i>lac</i>	Shuttle vector with lacZ reporter gene, Ery ^r _{L. lactis} Kan ^r _{E. coli}	30
P ₀₅₂₄ -pTCV- <i>lac</i>	5' region of <i>limg_0524</i> cloning into pTCV- <i>lac</i>	This study
P ₀₅₂₆ -pTCV- <i>lac</i>	5' region of <i>limg_0526</i> cloning into pTCV- <i>lac</i>	This study
pMAL-c4X	cloning vector, Am ^r	New England Biolabs
pMAL-0524 ^{Nter}	Expression of N ^{ter} MBP-tagged <i>limg_0524</i> '	This study
pMAL-0526 ^{Nter}	Expression of N ^{ter} MBP-tagged <i>limg_0526</i> '	This study
Strains		
<i>E. coli</i>		
TG1	<i>E. coli</i> TG1, <i>SupE hsdΔ5 thiΔ(lac-proAB) F' traD36 proAB+ lacIqlacZΔM15</i> , used as cloning host strain	Gibson, 1984
TG1 MalE-0524 ^{Nter}	Am ^r ; TG1 carrying plasmid pMAL-0524 ^{Nter}	This study
TG1 MalE-0526 ^{Nter}	Am ^r ; TG1 carrying plasmid pMAL-0526 ^{Nter}	This study
CC118	<i>Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74ΔphoA20 galE galK thi rpsE rpoB argE(am) recA1</i>	Lee et al., 1994
CC118 0524phoA1	Am ^r ; CC118 carrying plasmid pHA1-0524phoA1	This study
CC118 0524phoA2	Am ^r ; CC118 carrying plasmid pHA1-0524phoA2	This study
CC118 0526phoA1	Am ^r ; CC118 carrying plasmid pHA1-0526phoA1	This study
CC118 0526phoA2	Am ^r ; CC118 carrying plasmid pHA1-0526phoA2	This study
<i>Lactococcus lactis</i>		
MG1363	derived from <i>L. lactis</i> NCDO763	Gasson, 1983
Δ <i>limg_0524</i>	deletion of <i>limg_0524</i> in MG1363	This study
Δ <i>limg_0524</i> , <i>limg_0524</i> ^C	pAK80- Δ <i>limg_0524</i> carrying pAK80- <i>limg_0524</i> ^C	This study
Δ <i>limg_0524</i> , <i>limg_0524</i> ^{C,Δcyst}	pAK80- Δ <i>limg_0524</i> carrying pAK80- <i>limg_0524</i> ^{C,Δcyst}	This study
Δ <i>limg_0526</i>	deletion of <i>limg_0526</i> in MG1363	This study
MG1363 P ₀₅₂₄	Ery ^r ; MG1363 carrying plasmid P ₀₅₂₄ -pTCV- <i>lac</i>	This study
MG1363 P ₀₅₂₆	Ery ^r ; MG1363 carrying plasmid P ₀₅₂₆ -pTCV- <i>lac</i>	This study

Primers

Use and name	Sequence (5'→3')
--------------	------------------

Mutants

Iimg_0526 deletion

Δ0526For	GATCGGATCCATACAGTAGCAAACACTGCC
Δ0526intRev	CTGCCTGCTCTGATGACGAACTTTCTGTGCCACAATGTGGGC
Δ0526Rev	GATCTCTAGATCCCAAACTCATTTTCGCCG
Δ0526intFor	GCCACATTGTGGCACAGAAAGTTCGTCATCAGAGCAGGCAG
0526extFor	GGAGCGCTTGCCTTGGGAAAA
0526extRev	TGTGTAAAGGTCAATCGTCGC

Iimg_0524 deletion

Δ0524For	GATCGGATCCTATTGTCTTATTAATTATGGG
Δ0524intRev	CGTCCATAATAATTAAGCATCTCTTTGCCACAGTTTGGGC
Δ0524Rev	GATCTCTAGAAAAAATCGCTATTACAGCACC
Δ0524intFor	GCCCAAACTGTGGCAAAGAGATGCTTAATTATTATGGACG
0524extFor	GGGCAGTTATCCTGACTTCAC
0524extRev	TGGCAGTCCAACCTTTTGCACC

Transcriptional fusion

Iimg_0524 expression

P ₀₅₂₄ Rev	GATCCCGGGTATTAGGATAAAAATTACAATC
P ₀₅₂₄ For	GATCGAATTCGTTTATGCTTTTGCTATTGC

Limg_0524 orientation

0524phoAFor	GATCCTCGAGGATGGAAAACCAACCAACCTTTTCG
0524phoARev1	GATCGGTACCGAGAGGGGAGTATTTTCTGTACG
0524phoARev2	GATCGGTACCGACGAACCAAGTGCATTCCCAC

Limg_0526 orientation

0526phoAFor	GATCCTCGAGGATGGAAAACAACACAAAATTTTGC
0526phoARev1	GATCGGTACCGACATTTTTTTATTTACTGGACG
0526phoARev2	GATCGGTACCGATGTTGAGTTATTTGTCGTTGAGTTG

Complementation

Iimg_0524 and *Iimg_0526* Complementation

524-526-cplF	GATCAAGCTTGTATTATGCTTTTGCGGGTATTGC
524-526-cplR	GATCGTCCGACGTCTTTTGAACCTTTTTCGGG
524ΔC intRev	CTGATTCTCCATTTTTGTTCCAAAGGTTGGTTGTTTCCAT
524ΔC intFor	ATGGAAAACCAACCAACCTTTGGAACAAAATGGAGAATCAG

N^{ter}0526 purification

malE-Nter0526For GATCGAATTCATGGAAAACAACACAAAATTTTGCC

malE-Nter0526Rev

GATCGTGGACTTATTACATTTTTTTTATTACTGGAC

N^{ter}0524 purification

malE-Nter0524For GATCGAATTCATGGAAAACCAACCAACCTTTTGCC

malE-Nter0524Rev

GATCGTGGACTTATTATTGTTCTTCAGTAACAAAAGG

Operon

524-opFor GGGTTGTTCAATCTTATGGCT

524-opFor2 CAACCAACCTTTTGCCCAAAC

524-opRev TTTTCCAAGGCAAGCGCTCC

524-525opFor GGCGATAAACTTTTACATTC

524-525opRev TAAAAAATGAAATAAATCCCC

525-526opFor GCATGGCTTGCTAATAGTGCG

525-526opRev TTTCTGTGCCACAATGTGGGC

526-opFor GGGGATTTTGAACAACCTTAT

526-opRev AATCAATAAATCATTCTCCC

Table S2. Proteins containing the CX₂CX₁₀CX₂C motif in some bacterial species.

strains	Membrane protein	Cytoplasmic protein
<i>L. lactis</i> MG1363	Limg_0524 (2 TMD), Limg_0526 (1 TMD)	DnaJ (chaperone), RadA (DNA repair)
<i>L. lactis</i> IL1403		DnaJ, RadA
<i>S. thermophilus</i> LMD-9	STER_0131 (4 TMD)	DnaJ
<i>Lb. sakei</i> subsp <i>sakei</i>	LSA1310 (5 TMD); LSA0043 (6TMD);	DnaJ, RadA, LSA1423, LSA1707
<i>Lb. plantarum</i> WCFS1	Lp_2948 (1 TMD), lp_2949 (1 TMD)	DnaJ, RadA, lp_3139, lp_3215, lp_1729
<i>B. subtilis</i> 168	YvbJ (1 TMD), YxkC (1 TMD)	DnaJ, RadA, YczA, YqxK
<i>E. coli</i> K-12	FdhE (1 TMD), PqiA (8 TMD), YciM	DnaJ, RadA, YejH, YhgH
<i>Pathogens/opportunists</i>		
<i>E. faecalis</i> V583	EF_1523 (1 TMD), EF_1542 (1 TMD)	DnaJ, RadA
<i>L. mono.</i> e-GDE		DnaJ, RadA
<i>S. aureus</i> Mu50	TcaA , Sav0751	DnaJ, RadA
<i>S. agalactiae</i>		DnaJ, RadA
<i>S. pneumoniae</i> R6		DnaJ
<i>S. pyogenes</i> M1 M 1		DnaJ, RadA, M5005 Spy_0176

The transmembrane domain (TMD) is defined by HMMTOP software G.E. Tusnàdu and I. simon 2001 bioinformatics 17:849; in bold, proteins which are the closest to Limg_0526 based on structural organization. RadA in *S. pneumoniae*, *S. thermophilus* contains only one cysteine. HMMTOP indicates no TMD in *E. coli* YciM but was demonstrated experimentally. RadA in *S. pneumoniae*, *S. thermophilus* contains only one cysteine.

Données complémentaires à l'article :

- Pour connaître l'aptitude des protéines Llm_g_0526 et Llm_g_0524 à fixer des métaux, la partie N^{ter} des protéines a été purifiée par le système pMalC-4X (Figure 34). La purification de la partie N^{ter} de Llm_g_0524 a été plus compliquée, 3 systèmes ont été testés sans succès (petSumo, pTYB2, pMal_C4X). La 4^{ème} construction avec le système pMal_C4X, nous a permis d'obtenir une purification propre, MalE-524^{N^{ter}}. Pour cette construction, la partie N^{ter} de Llm_g_0524 a été réduite à 51 acides aminés (taille de Llm_g_526^{N^{ter}}) (Figure 34).

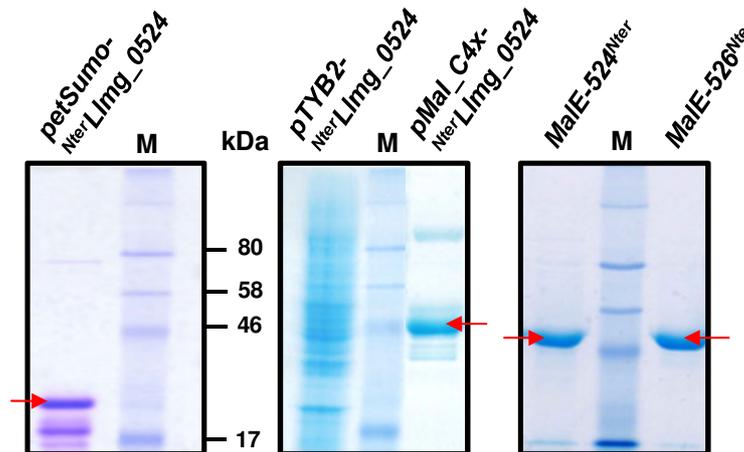


Figure 34 : Surproduction et purification de la partie N^{ter} des protéines Llm_g_0524 et Llm_g_0526. Différents systèmes testés : petSumo, pTYB2, pMal_C4x. → Protéines d'intérêts.

- Pour ces deux protéines le complexe Cystéine/Zn est très stable, l'ajout d'oxydant ou encore l'effet de la température n'entraîne pas la libération du Zn (Tableau 10).

Tableau 10 : Stabilité du complexe Zn/cystéine en présence d'oxydant ou d'un choc thermique.

	[Zn]/[526]	[Zn]/[526Zn]	[Zn]/[524]	[Zn]/[524Zn]
PBS 1X Glycérol 5 %	0,10 ± 0,06	0,08 ± 0,04	0,07 ± 0,04	0,05 ± 0,0
Cumène-OOH	0,13 ± 0,08	0,05 ± 0,05	0,06 ± 0,03	0,04 ± 0,02
H ₂ O ₂	0,12 ± 0,07	0,05 ± 0,05	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,02
Cumène-OOH + Fe	0,04 ± 0,0	0,14 ± 0,0	0,15 ± 0,0	0,04 ± 0,0
H ₂ O ₂ + Fe	0,07 ± 0,04	0,22 ± 0,09	0,23 ± 0,02	0,11 ± 0,02
37°C	0,13 ± 0,05	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0	0,04 ± 0,01

III. Résultats supplémentaires

III.1. Activité réductrice des mutants $\Delta 0524$ et $\Delta 0526$

Les phénotypes du mutant *llmg_0524* suggèrent une modification de l'enveloppe bactérienne. Nous avons alors testé si l'activité réductrice était modifiée ou non par les délétions des gènes *llmg_0524* et *llmg_0526*.

Dans un premier temps les sels de tétrazolium ont été utilisés pour déterminer le score correspondant à leur capacité à réduire ces trois sels (121). Les trois souches réduisent modérément (+) le TV et le TTC en aérobiose, et ne réduisent pas le BT (-) (Figure 35). En anaérobiose, l'intensité de coloration des spots est plus élevée (++) pour les trois sels. Que se soit pour la souche *L. lactis* MG1363 ou les mutants $\Delta 0524$ et $\Delta 0526$, le score est de 31. La capacité des souches à réduire les sels de tétrazolium n'est donc pas affectée par la délétion de ces deux gènes.

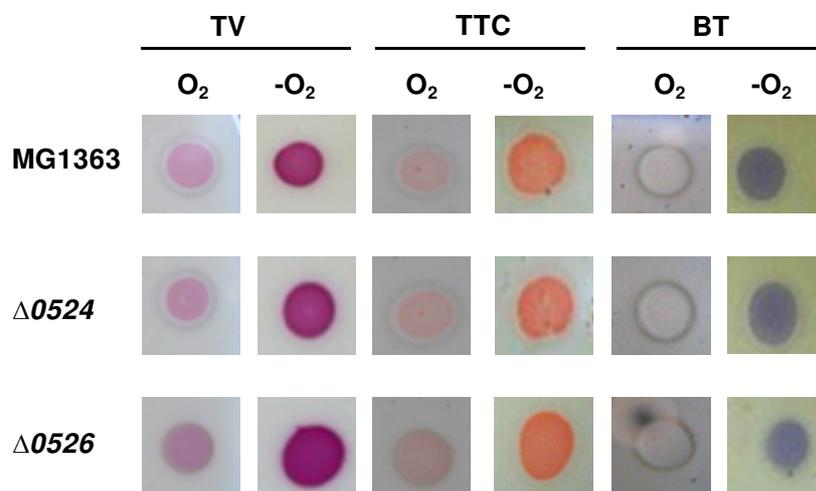


Figure 35 : Effets des délétions de *llmg_0524* et *llmg_0526* sur la réduction des sels de tétrazolium (0,02mg/ml). Des cultures o/n en M17 glucose 0,5% à 30°C sans agitation ont été spottées sur les gélases au lait glucosé contenant : TV, tétrazolium violet ou BT, Blue tetrazolium ou TTC, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. Score : pas de réduction, 0 (-) et réduction, 1 (+ ou ++), le calcul du score binaire : $1 \times 2^0(\text{TV N2}) + 1 \times 2^1(\text{TV O2}) + 1 \times 2^2(\text{TTC N2}) + 1 \times 2^3(\text{TTC O2}) + 1 \times 2^4(\text{BT N2}) + 1 \times 2^5(\text{BT O2})$

Dans deuxième temps, l'activité réductrice a été observée en analysant leur cinétique de réduction et d'acidification du milieu M17 glucose 1% en condition de bullage d'air avant ensemencement et en injectant de l'oxygène tout au long de la croissance.

En condition de bullage initiale (Figure 36A), le pH initial est de 6,5 pour les trois souches. Le potentiel de départ pour *L. lactis* MG1363, les mutants $\Delta 0524$ et $\Delta 0526$, est de 87 mV, 48 mV et 93 mV respectivement. Cet écart est dû à la différence du taux d'oxygène suite au bullage initial d'air. En 5 heures les trois souches ont réduit le milieu à -200 mV. Les profils de cinétique semblent similaires entre la souche parentale et les deux mutants, cependant les mutants $\Delta 0524$ et $\Delta 0526$ réduisent légèrement plus vite le milieu que le contrôle : 1,4 fois plus rapidement. De même les

mutants atteignent un pH de 4,6 au bout de 6 heures, alors que la souche parentale a acidifié le milieu à 4,6 après 8 heures de croissance.

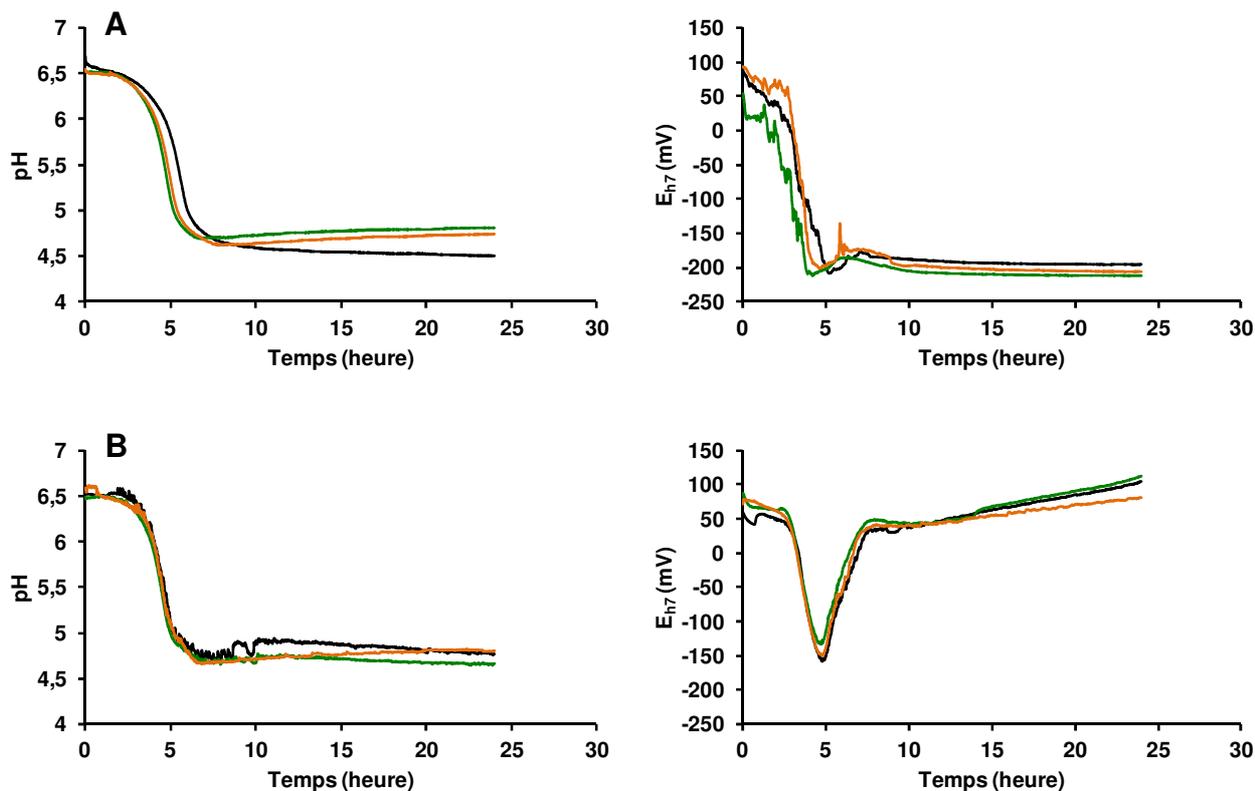


Figure 36 : Effets des délétions de *lmg_0524* et *lmg_0526* sur l'évolution du E_{h7} et pH au cours de la croissance de *L. lactis* MG1363 en M17glucose 1% à 30°C sans agitation. A: condition de bullage initiale, B: aération en continue. Noir, MG1363, Vert, $\Delta 0524$, Orange, $\Delta 0526$. Moyenne de 3 expérimentations indépendantes

En condition d'aération continue (Figure36B), le pH initial est également de 6,5. En 5 heures *L. lactis* MG1363, les mutants $\Delta 0524$ et $\Delta 0526$ ont réduit le milieu à -158 mV, -133 mV et -150 mV respectivement. Dans ces conditions, l'acidification et la réduction du milieu, sont similaires pour la souche parentale et les deux mutants. Après 5 heures le potentiel redox augmente vers des valeurs positive, comme on peut le voir sur les courbes en 6 heures les souches ont totalement acidifié leur milieu. Ajoutant de l'oxygène en continu, le milieu se réoxyde et les cellules n'ayant plus un métabolisme carboné actif à pH 4,6 ; par conséquent, elles ne peuvent ni éliminer l'oxygène ni produire de composés réducteurs. Dans ces conditions, l'électrode répond surtout à la présence d'oxygène dans le milieu.

III.2. *Lactococcus lactis* TIL46

Dans le premier chapitre sur la caractérisation de l'activité réductrice nous avons travaillé sur la souche modèle de l'ANR Food-Redox, *L. lactis* TIL46. Quelques difficultés ont été rencontrées quand à la présence naturelle de 4 plasmides avec cette souche (64), c'est pourquoi, nous avons décidé d'utiliser une souche équivalente sans plasmide, *L. lactis* MG1363 dont le génome est connu.

Suite à l'analyse bioinformatique, trois protéines de fonction inconnues avaient été retenues : Llm_g_1102, Llm_g_0524 et Llm_g_0526.

Tout comme les protéines Llm_g_0524 et Llm_g_0526, la protéine Llm_g_1102 possède des motifs CXXC du côté N^{ter}. Ce motif est retrouvé 4 fois dans la protéine et les analyses topologiques indiquent que la partie N^{ter} serait extracellulaire (Figure 37). Au niveau du génome (Figure 38), le gène *llmg_1102* est encadré par deux gènes de fonctions inconnues : *llmg_1101* et *llmg_1103*. D'après l'organisation génétique on peut suggérer que *llmg_1101* est en opéron avec *llmg_1102*. Contrairement à l'opéron *llmg_0524-0525-0526*, les gènes *llmg_1101*, *llmg_1102* et *llmg_1103* sont présents dans le génome de *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403.

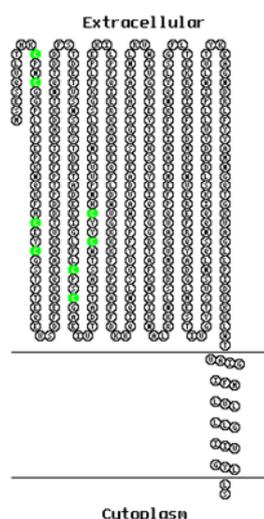


Figure 37 : Prédiction topologique de la protéine Llm_g_1102. En vert sont représentées les cystéines.



Figure 38 : Locus du gène *llmg_1102* de *L. lactis* MG1363.

Pour déterminer le rôle de la protéine Llm_g_1102, nous avons choisi de construire un mutant de délétion du gène *llmg_1102* par double crossing over. Suite à l'intégration du plasmide pBr322pGhost8- Δ *llmg_1102* au génome de *L. lactis* TIL46, l'excision du plasmide n'a pas permis

d'obtenir une souche délétée du gène. Différentes conditions ont été testées : en anaérobie, en présence de DTT ou de saccharose pour protéger l'intégrité de la surface et en cas de sensibilité à un stress oxydant. Cependant cela n'a pas abouti à un résultat positif, comme dernière solution nous avons construit un plasmide suicide, le pRV300- Δ lmg_1102. Ce plasmide doit s'intégrer au niveau du gène *lmg_1102* et l'inactiver. Cette dernière construction n'a pas abouti non plus.

Les mutants de délétion *lmg_0524* et *lmg_0526* ont été construits une première fois, mais suite à un problème de stabilité, nous avons eu des révertants. Lors du second essai seul le Δ *lmg_0526* a pu être reconstruit de façon stable. En condition témoin glucose ou galactose la croissance du mutant est identique à la souche de référence *L. lactis* TIL46. Dans deux conditions le mutant est discriminé de la souche sauvage : i) en présence de lysozyme (Figure 39 et Figure 40), la délétion du gène *lmg_0526* apporte une résistance au lysozyme. Après 8 h de croissance la DO_{600nm} de la culture du mutant est de 0,9 contre 0,6 chez le WT. ii) Si l'on supplémente le milieu par du Cu-OOH Δ *lmg_0526* est plus sensible que le contrôle, à 8 heures la DO_{600nm} de la culture est de 0,35 contre 0,7 pour le WT. Le Cu-OOH entraîne un retard de croissance, comme on peut le voir en milieu gélosé (Figure 40). L'ajout d'un autre composé hydroperoxyde tel que l'H₂O₂ n'impacte pas sur la croissance du WT et du mutant (Figure 39 et Figure 40). Au vu des résultats, on peut suggérer que la suppression de la protéine membranaire Lmg_0526 entraîne des modifications au niveau de la surface bactérienne. Par contre ces modifications sont-elles structurales, au niveau de la composition en acide gras, ou du peptidoglycane ?

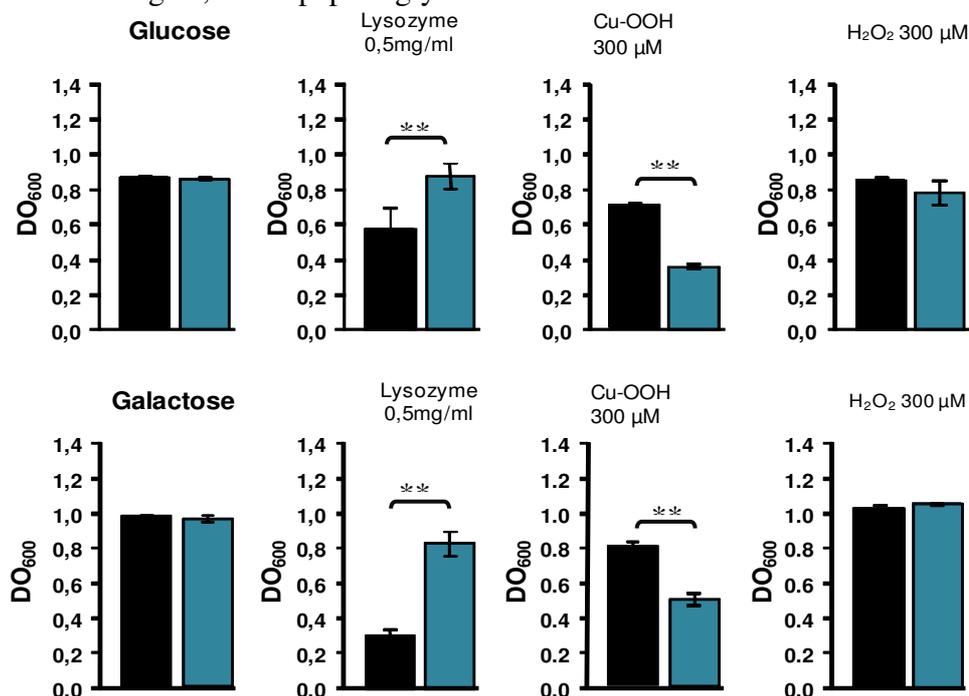


Figure 39 : Effet de la délétion de *lmg_0526* chez *L. lactis* TIL46 sur la résistance au lysozyme et au cumène hydroperoxyde en condition statique. Les cellules se sont développées en M17 glucose et galactose à 30°C sans agitation. Lorsque la densité cellulaire atteint DO_{600nm} 0,1 ; 0,5 mg/ml lysozyme, ou 300 μM de Cu-OOH, ou 300 μM de H₂O₂ sont ajoutés dans les cultures : WT (noire), le mutant Δ *lmg_0526* (bleu). Les histogrammes sont des représentations de trois croissances indépendantes. Les données sont les moyennes et les écarts-types, de la DO_{600nm} après 8 heures.

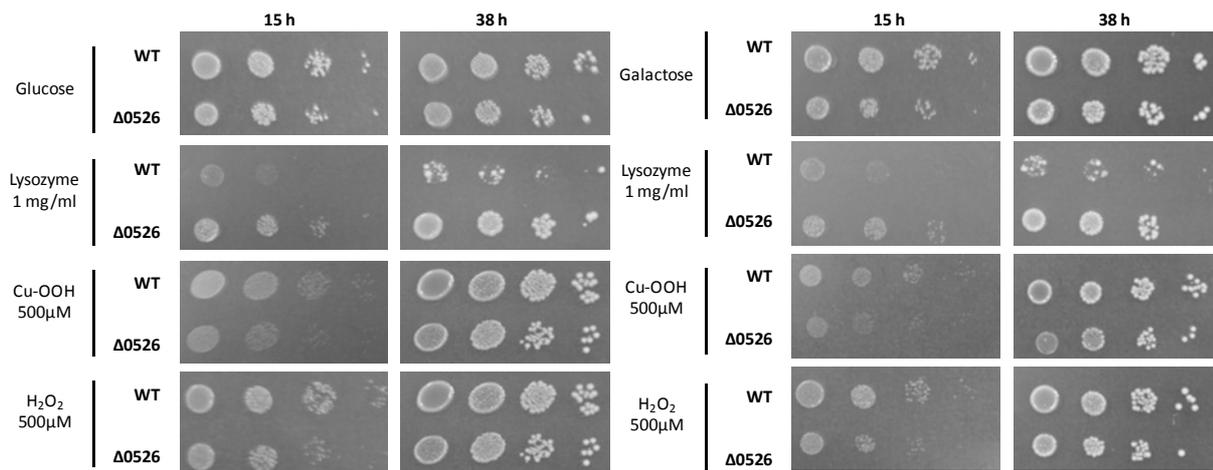


Figure 40 : Effet de la délétion de *lmg_0526* chez *L. lactis* TIL46 sur la résistance au lysozyme et au cumène hydroperoxyde en milieu M17 agar. Les cellules se sont développées en M17 glucose et galactose à 30°C sans agitation. Lorsque la densité cellulaire atteint DO_{600nm} 0,1 : différentes dilution de la culture est spottées sur boîtes M17 glucose supplémenté de 1 mg/ml de lysozyme, ou de 500 μ M de Cu-OOH ou de 500 μ M de H_2O_2 . Les boîtes sont représentatives de trois expérimentations indépendantes.

Pour répondre à cette dernière question, nous nous sommes intéressés au rôle de la protéine Llm_g_0526 vis à vis des phages. En effet si l'enveloppe est modifiée, l'adhésion des phages pourrait-être affectée. Pour cela nous avons choisi deux phages : C2 (génome de 20-23 Kb) et sk1 (génome 28-33Kb) du groupe 936 (39). La souche *Δlmg_0526* est un peu plus résistante au phage C2 ou sk1. Les phages ont pu faire 2 fois moins de plages de lyse chez le mutant par rapport à la souche WT (Figure 41). Ces résultats suggèrent que l'adhésion des phages est modifiée en l'absence de la protéine Llm_g_0526, appuyant l'idée d'une modification de l'enveloppe.

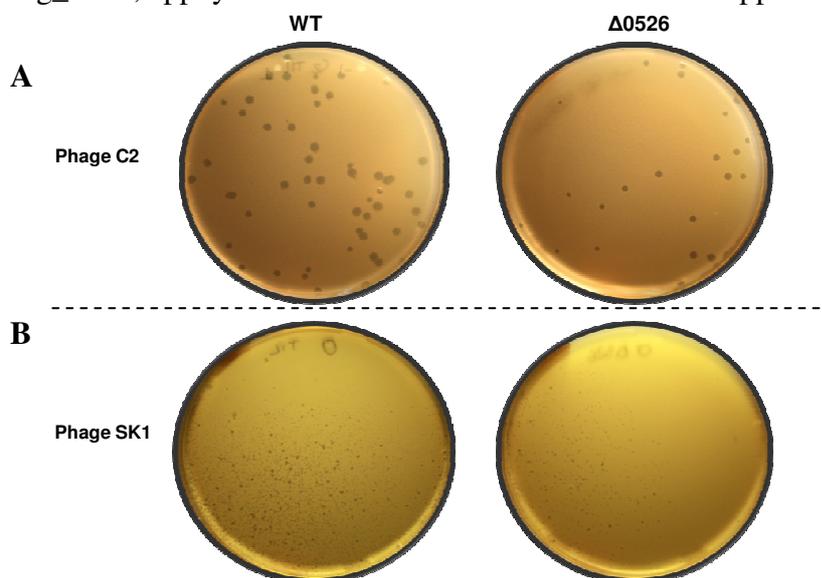


Figure 41 : Effet de la délétion de *lmg_0526* chez *L. lactis* TIL46 sur la résistance aux phages. Des cellules o/n M17 glucose à 30°C sans agitation, sont mises en contact avec le phage C2(A) ou le phage sk1 (B) dilués à 10^{-1} en milieu M17 agar 6% $CaCl_2$ 10mM glucose 0,5%. Puis immédiatement déposé sur une gélose M17 glucose 0,5% avant une incubation de 15 heures à 30°C.

Pour déterminer si l'enveloppe de *L. lactis* TIL46 est modifiée au niveau de la membrane lipidique, l'analyse de sa composition en acides gras (AG) a été réalisée. Aucune différence n'est apparue entre le profil AG de la souche WT et le mutant *Allmg_0526*, à partir de culture à DO_{600nm} 0,1 en M17 glucose ou galactose (Figure 42). En début de croissance, la composition en AG n'est pas perturbée par l'absence de *Llmg_0526*.

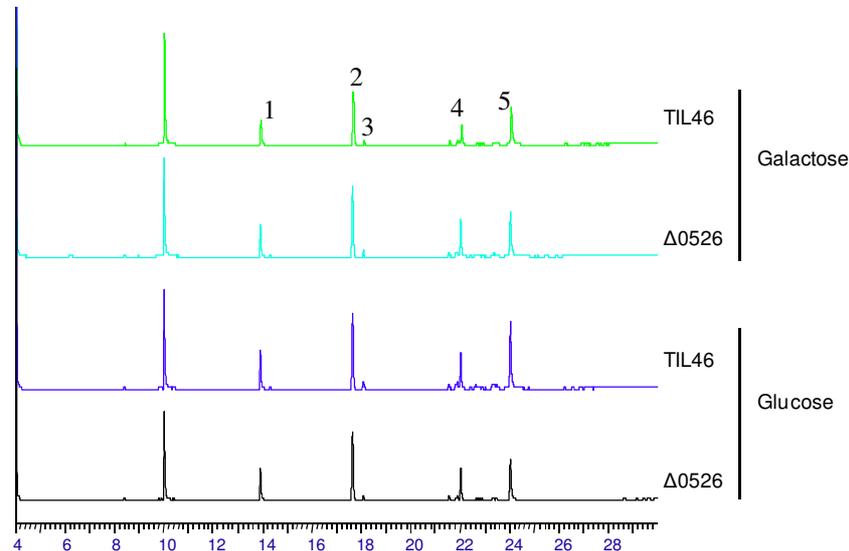


Figure 42 : Analyse comparative des acides gras entre la souche TIL46 et le mutant *Allmg_0526* cultivés en galactose ou glucose. 1, Acide myristique (C14 :0) ; 2, Acide palmitique (C16 :0) ; 3, Acide palmitoléique (C16 :1 n-7) ; 4, Acide cis-vaccénique (C18 :1 n-7) ; 5, Acide lactobacillique ou cyclopropane (cycC19 :0).

Pour confirmer nos différents phénotypes, la souche mutée a été complétée. Cependant aucune des complémentations : pBr322pGhost8-524^c, pRV300-526^c et pAK80-524^c, n'a permis de restaurer le phénotype WT. Il est donc possible que le génome du mutant *Allmg_0526* possède une seconde mutation qui est apparue soit : i) lors de l'intégration du plasmide à 37°C (36), ii) aux nombreux transposons portés par les plasmides de la souche (190). Ne pouvant pas affirmer que ces phénotypes soient dus à la délétion de *llmg_0526*, nous avons décidé de changer de souche en choisissant *L. lactis* MG1363.

CHAPITRE 3 : Identification des protéines membranaires à motifs redox CXXC par une approche biochimique

I. Objectif de l'étude

Précédemment nous avons recherché les protéines membranaires à groupement CXXC en utilisant les logiciels de bioinformatique. Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à l'identification de ces protéines en utilisant une approche biochimique.

II. Identification de protéines membranaires à motif CXXC

En utilisant trois approches protéomiques couplées à de la spectrométrie de masse des résultats différents ont été obtenus quant aux protéines de surface à motif redox : 9 protéines par le shaving ; 164 protéines par western blot et 37 protéines par une colonne d'affinité à la streptavidine (Annexe 6, 7 et 8 respectivement). La Figure 43 schématise les 3 approches utilisées.

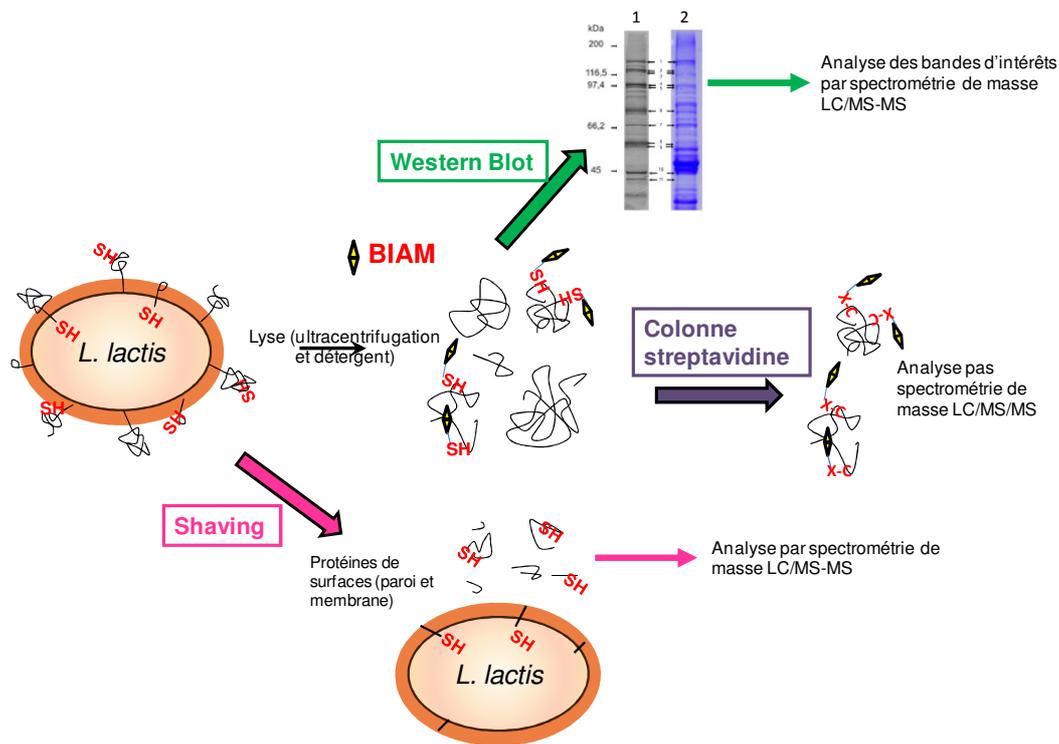


Figure 43 : Présentation des approches biochimiques utilisées pour l'identification des protéines de surface à motif CXXC. 1 : protéines membranaires révélées (Avidin-HRP), 2 : protéines membranaires détectées au bleu de Coomassie (gel SDS-PAGE)

Les protéines obtenues à partir de ces 3 trois approches contiennent pour 44%, 62% et 58% un ou plusieurs résidus cystéine, respectivement. Aucune correspondance n'a été trouvée entre les résultats obtenus par les méthodes du shaving et la colonne d'affinité à la streptavidine. Quant au western

blot et le shaving deux protéines communes sont identifiées : Limg_0482, de fonction inconnue et Limg_1441, une fumarate réductase à flavoprotéine (Tableau 11). Les deux protéines possèdent une cystéine, mais aucun motif CXXC. La comparaison des protéines entre les résultats obtenues par la colonne d'affinité à la streptavidine et le western blot, indiquent 18 protéines communes (Tableau 11), 8 d'entre elles contiennent deux cystéines ou plus dans leur séquence. Seulement une protéine commune possède le motif redox, CXXC, la protéine AhpF. Un mutant de délétion du gène *ahpF* a été construit pour caractériser la localisation et son rôle biologique de cette protéine.

Tableau 11 : Protéines communes aux méthodes du shaving, du western blot et de la colonne d'affinité à la streptavidine.

	Localisation	Locus de MG1363	Gènes	Coverage	PAI	Cystéines	
Western Blot VS Shaving	Cytoplasmique	llmg_0482	Hypothetical protein	24/34	0,53/2,72	1	
	Extracellulaire	llmg_1441	<i>frdC</i> , fumarate reductase flavoprotein subunit	77/70	2,04/12,04	1	
	Membranaire	llmg_0727	<i>ptnD</i> , mannose-specific PTS system component IID	32/34	0,58/0,46	1	
		llmg_2539	<i>gapB</i> , glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	49/65	1,50/3,73	2	
		llmg_0071	<i>pdhD</i> , dihydrolipoamide dehydrogenase	44/51	1,00/1,03	2	
		llmg_2380	<i>rplB</i> , 50S ribosomal protein L2	55/39	1,00/0,53	1	
		llmg_2160	<i>metK</i> , S-adenosylmethionine synthetase	63/29	1,77/0,48	1	
		llmg_0357	<i>ahpF</i> , alkyl hydroperoxide reductase	69/43	1,52/0,56	5	
		llmg_1948	<i>atpA</i> , ATP synthase F0F1 subunit alpha	26/40	0,73/1,47	1	
		llmg_1120	<i>ldh</i> , L-lactate dehydrogenase	29/28	0,67/0,89	1	
		llmg_0127	<i>ptsI</i> , phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	77/25	3,30/0,67	2	
Western Blot VS Streptavidine		Cytoplasmique	llmg_2161	<i>cfa</i> , cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	20/47	0,47/1,18	3
			llmg_1119	<i>pyk</i> , pyruvate kinase	78/46	2,52/0,86	1
			llmg_1116	<i>telA1</i> , toxic anion resistance protein	75/29	1,77/0,48	0
			llmg_2069	<i>pepC</i>	73/42	2,80/1,00	2
			llmg_2484	<i>glnA</i>	51/43	1,33/0,83	3
	llmg_0403		<i>pepA</i> , glutamyl-aminopeptidase	32/30	0,54/0,54	2	
	llmg_0868		<i>tkt</i> , transketolase	83/26	2,65/0,29	0	
	llmg_1724		<i>rpsA</i> , 30S ribosomal protein S1	80/85	2,44/1,57	0	
	llmg_1493	<i>rplU</i> , 50S ribosomal protein L21	24/34	0,40/0,60	0		

Coverage, recouvrement protéique ; PAI,

III. AhpF à la surface de *L. lactis* ?

La protéine AhpF est considérée comme une protéine cytoplasmique. Pour valider la présence de cette protéine à la surface de *L. lactis*, un western blot a été réalisé avec différentes fractions d'extractions de protéines de la souche sauvage MG1363 et du mutant Δ ahpF. Dans l'analyse par Western blot (Figure 44), la protéine AhpF a été détectée dans l'extraction de protéines totales de la souche sauvage, mais pas dans la souche Δ ahpF. Cette observation valide l'efficacité de l'anticorps spécifique contre la protéine AhpF. La protéine a été trouvée dans le cytoplasme ainsi que dans les extraits des protéines de surface, cependant elle est plus abondante dans le compartiment cytoplasmique. (Figure 44)

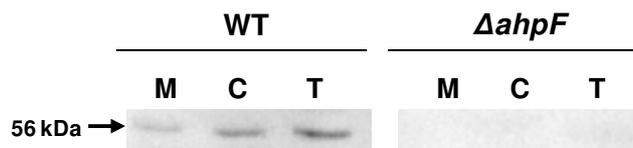


Figure 44 : Localisation membranaire de AhpF de *L. lactis* MG1363 par Western blot. Les protéines ont été séparées par gel SDS-PAGE et la protéine AhpF marquée a été détectée avec des anticorps anti-lapin couplé à la peroxydase. Le poids moléculaire indique la position de la protéine AhpF. M, extrait des protéines membranaires, C, extrait des protéines cytoplasmiques, T, extrait protéique total.

Cette observation a été validée en microscopie par un marquage immunofluorescent. Les deux souches, MG1363 et Δ ahpF ont été cultivées et étiquetées avec un anticorps spécifique contre AhpF puis par un anticorps fluorescent secondaire. La souche parentale montre une forte fluorescence, soulignant une grande quantité de la protéine AhpF à la surface bactérienne (Figure 45B), le mutant Δ ahpF présente une diminution importante de la fluorescence en surface (Figure 45D). Le signal obtenu pour la souche Δ ahpF peut provenir d'un fragment de la protéine résiduelle (92 acides aminés) ou d'un lavage insuffisant. En parallèle, les cellules marquées ont été analysées par cytométrie en flux, on obtient une différence significative entre le WT et la souche mutante avec une fluorescence de $7,5 \pm 1,2\%$ et $2,17 \pm 0,8\%$, respectivement. Ces résultats suggèrent que la protéine AhpF considérée comme protéine cytoplasmique, pourrait également être associée à la membrane bactérienne.

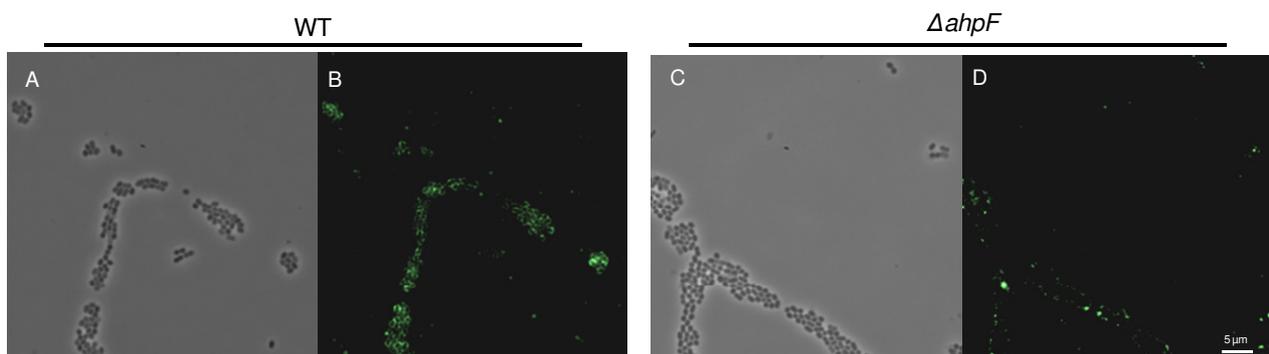


Figure 45 : Localisation membranaire de AhpF sur des cellules intactes de *L. lactis* MG1363. Les cellules sont marquées par un anticorps primaire spécifique d'AhpF couplé à l'anticorps secondaire Alexa Fluor 488. A et C, le contraste de phase; B et D, la fluorescence de la GFP.

En conclusion, la protéine AhpF est bien localisée au niveau de la surface de *L. lactis*.

CHAPITRE 4 : La protéine AhpF intervient dans l'intégrité membranaire de *L. lactis* lors d'un stress oxydatif lipophile.

I. Objectif de l'étude

Dans l'approche biochimique la protéine AhpF a été identifiée parmi les protéines de surface de *L. lactis* MG1363. Des études ont déjà démontré le rôle de la protéine AhpF dans l'élimination de l'oxygène de *L. lactis*. Cependant des études dans l'activité cellulaire en présence de composés oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène ou le cumène hydroperoxyde, n'ont pas été menées. Le fait de retrouver cette protéine en surface nous questionne quant à son rôle dans la membrane de *L. lactis*. La protéine intervient-elle dans l'intégrité de la membranaire de *L. lactis* en modifiant indirectement ou non la composition en acide gras ou la synthèse du peptidoglycane lors d'un stress oxydatif ? Nous allons avec cette étude tenter de répondre à cette question.

II. Résultats

II.1. Rôle de la protéine AhpF dans la résistance à un stress oxydatif lipophile

Les peroxydases dégradant les peroxydes (89), la délétion de *ahpF* devrait augmenter la sensibilité du mutant à ces agents oxydants. Nous avons testé le cumène hydroperoxyde (Cu-OOH) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

En milieu M17 agar glucose 0,5%, la souche sauvage présente une légère sensibilité au Cu-OOH contrairement au peroxyde d'hydrogène même à une très forte dose d'oxydant. La délétion de *ahpF* rend le mutant extrêmement sensible au Cu-OOH, concernant le peroxyde d'hydrogène le phénotype est proche de la souche sauvage MG1363 (Figure 46).

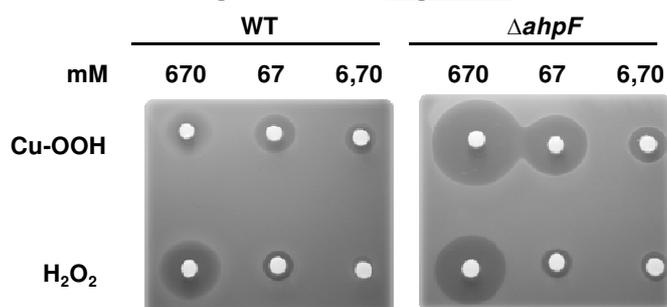


Figure 46 : Le mutant Δ *ahpF* est très sensible au alkylhydroperoxyde mais pas à l'hydroperoxyde. Le M17 agar glucose 0,5% est supplémenté par 10% d'une culture o/n (M17glucose à 30°C sans agitation). Les disques déposés sont imbibés par différentes concentrations (670 mM, 67 mM et 6,7 mM) de peroxyde d'hydrogène ou de cumène hydroperoxyde. Les boîtes présentées sont représentatives de 3 expérimentations indépendantes.

Les mêmes résultats sont observés lors d'une cinétique de croissance en milieu liquide M17 glucose 0,5% statique (Figure 47A). Si le milieu est supplémenté par 100 μ M d'H₂O₂, la croissance du mutant Δ *ahpF* est identique à celle de la souche WT, les DO_{600nm} à 13 heures des cultures sont respectivement de $0,771 \pm 0,075$ et $0,789 \pm 0,103$. En revanche, lorsque le milieu est supplémenté

par 100 μM de Cu-OOH, la cinétique de croissance de la souche WT est un peu affectée, la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ à 13 heures est de $0,6 \pm 0,007$. En présence de Cu-OOH, après 13 heures de croissance la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de la culture correspond à $0,297 \pm 0,170$ chez le mutant contre 0,6 pour le WT. Cependant lorsque la souche ΔahpF est complétée par le gène *ahpF*, elle présente une cinétique de croissance semblable à celle de la souche parentale, avec un $\text{DO}_{600\text{nm}}$ finale de $0,609 \pm 0,014$ et de $0,741 \pm 0,197$. En condition d'aération (Figure 47B), le résultat est similaire, l' H_2O_2 n'impacte pas sur la croissance du mutant mais le Cu-OOH oui. Il est à noter que le mutant résiste mieux au Cu-OOH en aérobiose car la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ final de la culture représente environ 50% de celle de la souche parentale.

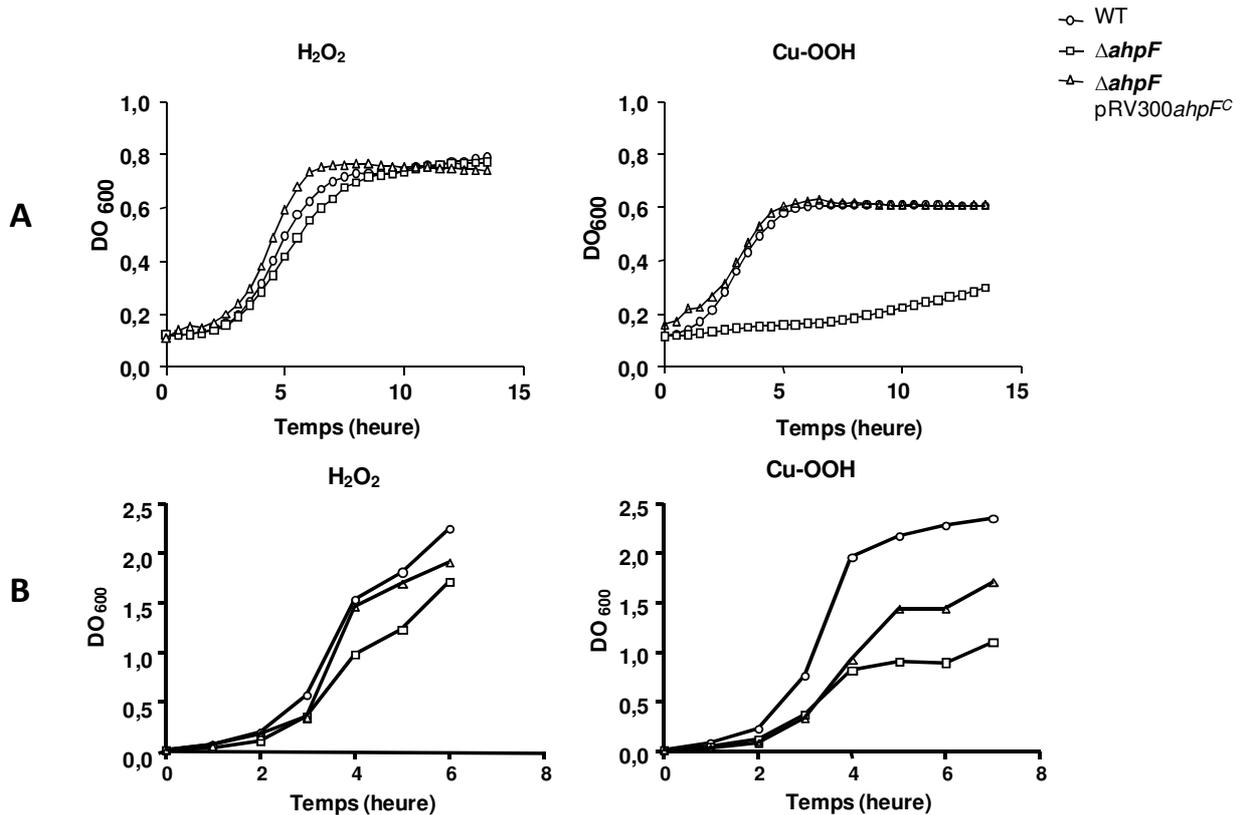


Figure 47 : Cinétique de croissance des souches *L. lactis* MG1363, le mutant ΔahpF et le mutant ΔahpF complété en présence de cumène hydroperoxyde et de peroxyde d'hydrogène. A, condition statique ; B, condition aération. Les cellules se sont développées en M17 glucose à 30°C. Lorsque la densité cellulaire atteint $\text{DO}_{600\text{nm}}$ 0,1 ; 100 μM de Cu-OOH ou de H_2O_2 sont ajoutés dans les cultures.

Le mutant ΔahpF étant fortement perturbé dans sa cinétique de croissance à une concentration de 100 μM en Cu-OOH, nous avons cherché la concentration seuil entraînant un ralentissement de sa croissance (Figure 48). A partir de 20 μM de Cu-OOH la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ à 13 heures diminue de 50% et de 15% pour la souche non traitée, le même résultat est obtenu avec 40 μM de Cu-OOH (Figure 48). En présence de 80 ou 100 μM de Cu-OOH la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ finale chute de 75% pour le mutant ΔahpF et de 20% pour la souche WT. En revanche, une gamme identique en H_2O_2 n'affecte pas la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ finale, confirmant les résultats précédents (Figure 48).

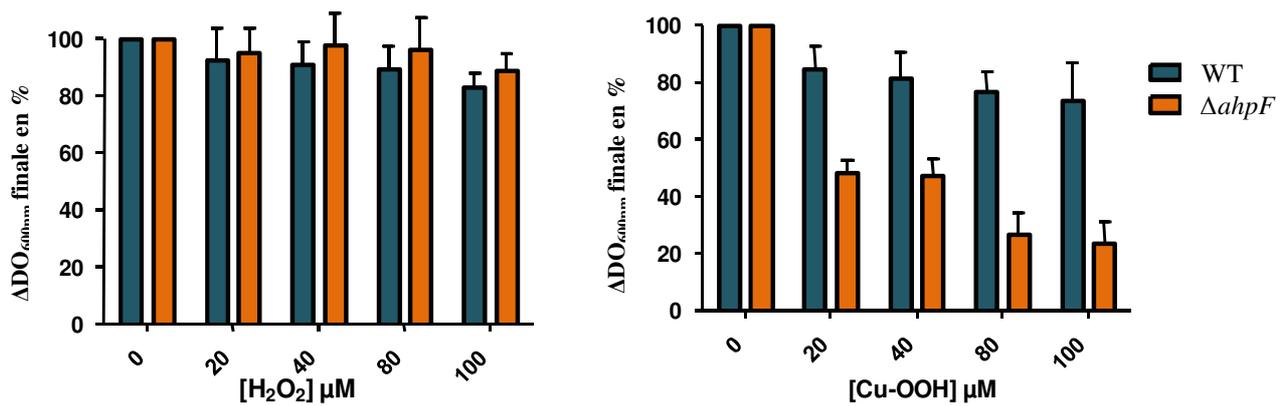


Figure 48 : Effet de différentes concentrations d'H₂O₂ ou de Cu-OOH sur la densité cellulaire finale de la souche parentale MG1363 et du mutant $\Delta ahpF$.

II.2. Régulation de *ahpF*

Les gènes *ahpF* et *ahpC* étant séparés par 66 nucléotides, il est probable qu'ils forment un opéron. L'absence de terminateur de RNA polymérase en aval de *ahpC* et de RBS en amont de *ahpF* supporte cette hypothèse. L'expression du gène *ahpF* a donc été suivie grâce à une fusion transcriptionnelle en clonant les gènes d'une β -galactosidase après le codon STOP de *ahpF* (Figure 49). En milieu M17 glucose 0,5%, l'expression du gène *ahpF* chez *L. lactis* MG1363, augmente au cours de la croissance. Elle est maximale en début de phase stationnaire de croissance. En conditions statiques (Figure 49A), l'activité augmente de 5 fois entre le début de la phase exponentielle

(30 UM) et l'entrée en phase stationnaire (150 UM) pour baisser un peu chez les cellules en phase stationnaire (o/n). En aération (Figure 49B), l'activité est légèrement augmentée en phase exponentielle (50 UM) et double seulement quand les cellules atteignent la phase stationnaire (100 UM). En phase stationnaire tardive, l'activité baisse un peu comme observée en condition statique.

Sous l'effet de Cu-OOH, l'activité n'est pas du tout augmentée, elle baisse légèrement dans les 2 conditions de croissance. Par exemple, à l'entrée de la phase stationnaire, l'activité est 30% plus faible par rapport à la condition sans traitement.

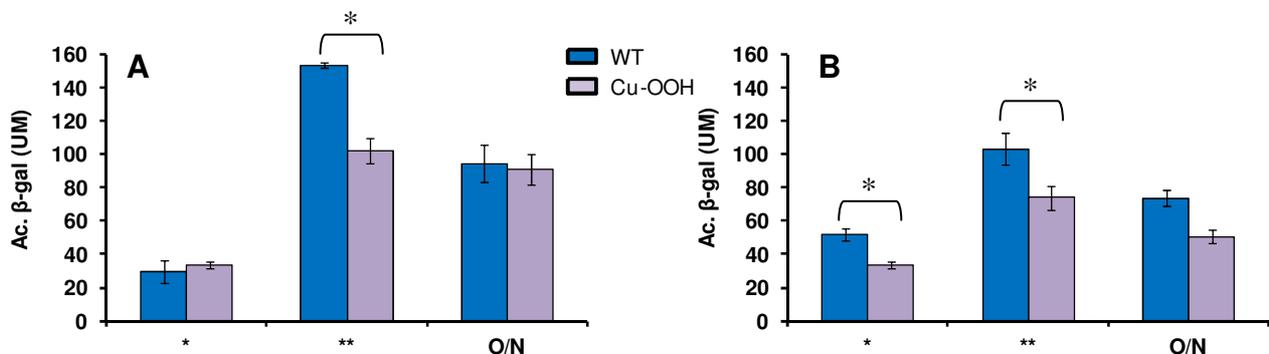


Figure 49 : Expression d'*ahpF* pendant la croissance de *L. lactis* MG1363 en présence ou non de Cu-OOH à 40 μM. A, Cellules cultivées en M17Glu en condition statique (A) et en aération (B), * significativement différent pour P < 0,05.

En conclusion, l'opéron putatif ne répond pas aux stress causés par le cumène hydroperoxyde mais probablement à la phase de croissance.

II.3. Rôle de la protéine AhpF dans l'élimination de composés peroxyde

La protéine AhpF appartient au système AhpR qui élimine de l'oxygène *via* la production d'H₂O₂, transformé ensuite par la seconde protéine du système AhpC active grâce à l'action d'AhpF (76, 89). De ce fait, nous avons recherché la présence de peroxyde au cours de la croissance.

En condition statique, des peroxydes sont détectés à faible dose puis éliminés du milieu par la souche WT (Figure 50). En début de croissance la quantité de peroxyde dans le culot cellulaire et le surnageant sont de $4,0 \pm 5,6 \mu\text{M}$ et $5,0 \pm 7,6$, respectivement. Pour le mutant ΔahpF la quantité de peroxyde dans le culot cellulaire et le surnageant est beaucoup plus importante d'environ 20 fois en début de croissance. Après 17 heures de culture, on détecte très peu de peroxyde chez le mutant ΔahpF .

En condition d'aération, du peroxyde est détecté dans le surnageant pendant la cinétique de croissance *L. lactis* MG1363 (Figure 50). La quantité de peroxyde dans le culot cellulaire de la souche WT augmente au cours de la croissance et se stabilise lors de la phase stationnaire de croissance ($9,2 \mu\text{M}$ à $52,7 \mu\text{M}$). En revanche, chez le mutant ΔahpF la quantité de peroxyde est beaucoup plus forte que pour la souche WT. Tout au long de la croissance les peroxydes sont de plus en plus dosés dans le surnageant de culture, $204,9 \pm 51,9 \mu\text{M}$ de peroxyde en début de croissance, et $802,7 \pm 78,2 \mu\text{M}$ après 17 heures de culture. Au niveau du culot cellulaire, la quantité de peroxyde évolue de $30,0 \pm 8,5 \mu\text{M}$ en phase de latence, de $70,9 \pm 3,5 \mu\text{M}$ en phase stationnaire et de $32,8 \pm 5,3 \mu\text{M}$ après 17 heures de croissance.

		WT			ΔahpF		
		*	**	O/N	*	**	O/N
Aération	ROOH Cellules (μM)	$9,2 \pm 6,2$	$56,3 \pm 3,6$	$52,7 \pm 0,0$	$30,0 \pm 8,5$	$70,9 \pm 3,6$	$32,8 \pm 5,3$
	ROOH Surnageant (μM)	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$204,9 \pm 51,9$	$242,7 \pm 71,5$	$802,7 \pm 78,2$
Statique	ROOH Cellules (μM)	$4,0 \pm 5,6$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$39,7 \pm 4,2$	$6,3 \pm 6,3$	$0,0 \pm 0,0$
	ROOH Surnageant (μM)	$5,0 \pm 7,6$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$152,6 \pm 32,2$	$6,9 \pm 9,2$	$5,9 \pm 5,9$

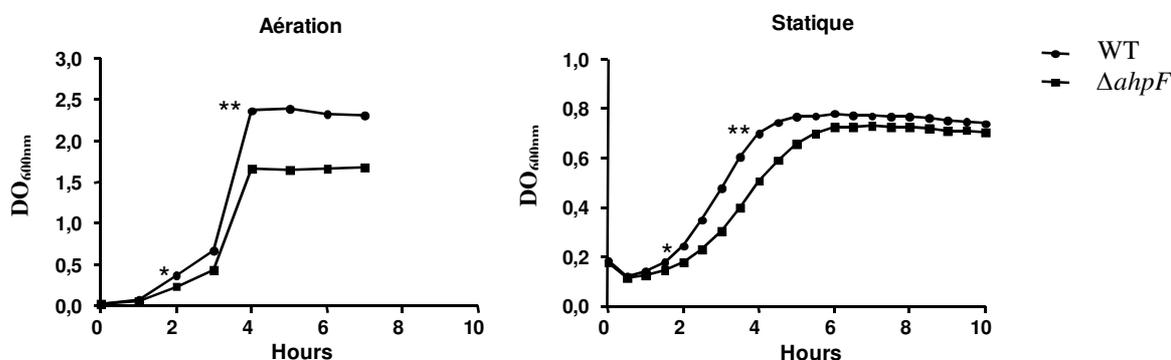


Figure 50 : La délétion de *ahpF* augmente la production de peroxyde endogène pendant la croissance. Les souches *L. lactis* MG1363 et du mutant ΔahpF sont cultivées en en conditions statique et aérée. * représentent les points de prélèvement. Les peroxydes sont dosés selon le dosage de FOX (194).

La délétion du gène *ahpF* conduit à une accumulation de peroxydes dans le milieu de culture. Cette accumulation de peroxyde n'est pas due à une diminution des capacités du mutant Δ *ahpF* produire la NADH oxydase. Comme on peut le voir à la [Figure 51](#), le gène *noxE* est toujours exprimé tout au long de la croissance du mutant Δ *ahpF*, malgré quelques petits changements entre les conditions statique et aérée : en aération on observe moins d'expression chez Δ *ahpF* recueillie après un culture de nuit (o/n) mais plus en statique. En condition d'aération ([Figure 51A](#)), l'expression du gène *noxE* chez le mutant Δ *ahpF* est identique à celle de la souche parentale, sauf après une culture 17 heures, l'expression de *noxE* chute chez le mutant Δ *ahpF*. Cependant l'accumulation de H₂O₂ en aération peut inactiver la protéine sans perturber son expression. En condition statique ([Figure 51B](#)), l'expression du gène *noxE* est plus forte chez le mutant Δ *ahpF* en début de croissance et après 17 heures de croissance.

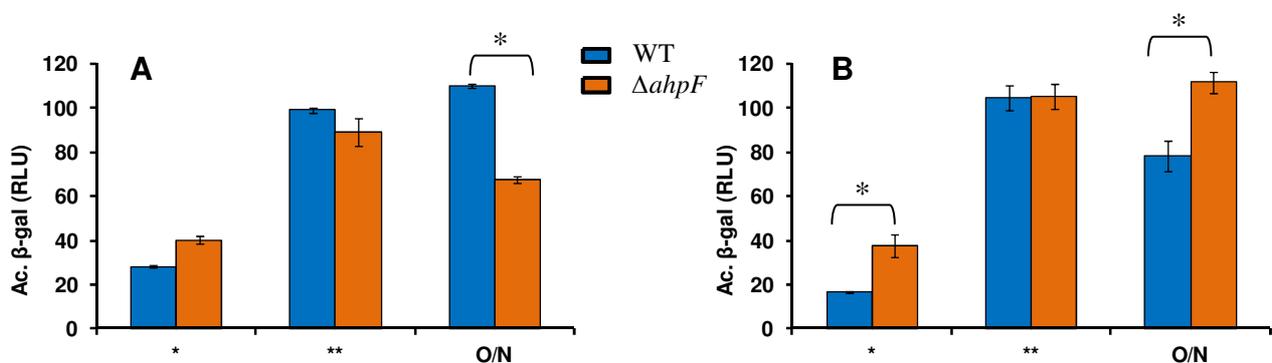


Figure 51 : La délétion de *ahpF* n'augmente pas l'expression de *noxE* codant la NADH oxydase. Les souches *L. lactis* MG1363 et Δ *ahpF* portant la fusion transcriptionnelle *noxE-lacLM* sont cultivées en M17 glucose 0,5% à 30°C. A, en condition d'aération ; B, en condition statique; *, significativement différent pour $P < 0,05$

Lors de la cinétique de croissance de Δ *ahpF*, des peroxydes sont naturellement produits dans le milieu, pourtant sa croissance n'est pas perturbée par rapport à la souche WT. En utilisant de la catalase, nous avons observé la formation de bulles traduisant la production d'oxygène à partir de H₂O₂. Une gamme d'H₂O₂ a été testée pour déterminer la concentration en H₂O₂ capable d'impacter sur la densité finale des deux souches. La [Figure 52](#) synthétise en pourcentage les DO_{600nm} après 17 heures de croissance, les concentrations de 100 à 800 μ M diminuent la DO_{600nm} d'environ 20%, et une concentration de 1 000 μ M entraîne une diminution de la DO de 80 %. On remarque également que les deux souches se comportent de manière identique vis-vis de H₂O₂.

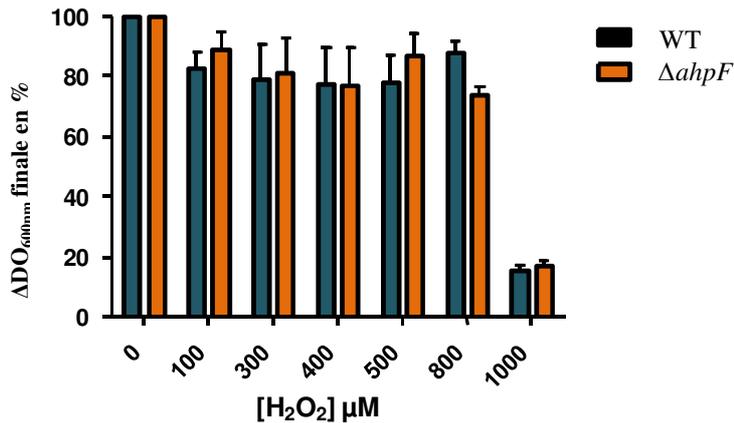


Figure 52 : La délétion de *ahpF* n'affecte pas la sensibilité de *L. lactis* MG1363 à l'hydrogène peroxyde . Les cellules sont cultivées à 30°C en condition statique à différentes concentrations de H₂O₂ et les densités cellulaires sont mesurées et exprimées en % par rapport à la DO_{600nm} finale des cellules sans peroxyde.

En conclusion, les résultats suggèrent le rôle essentiel de AhpR dans l'élimination des peroxydes du type Cu-OOH.

II.4. Effet de composés réducteurs sur la croissance du mutant *ΔahpF* lors d'un stress au Cu-OOH

D'après les nombreuses études chez *E. coli* avec H₂O₂ comme oxydant, la toxicité des peroxydes repose sur la formation des radicaux, dont HO° par réduction du peroxyde en présence de métaux (Fer ou Cuivre). Pour démontrer si un tel mécanisme existe chez *L. lactis* MG1363 nous avons testé différents antioxydants (notamment réducteurs), des piègeurs de HO° (thiourée) et de métaux (ferrozine, bathocuproïne). Ces molécules devraient restaurer la croissance du mutant exposé au Cu-OOH (Figure 53).

L'ajout de ces composés en milieu M17 glucose 0,5% ne perturbe pas la croissance de la souche parentale ou du mutant *ΔahpF* (données non présentées). La Figure 53 synthétise la moyenne des cinétiques en présence de Cu-OOH et des composés réducteurs, lors de trois expérimentations répétées indépendamment. L'ajout d'acide lipoiique (■) ou de cystéine (↔) restaure totalement la croissance. En effet en comparant à la cinétique de croissance sans Cu-OOH du mutant *ΔahpF* (—■) la DO_{600nm} à 13 heures et le temps de latence sont identiques. L'ajout de GSH (↔) restaure partiellement la croissance. La croissance débute après 9 heures à 30°C sans agitation, et la DO_{600nm} à 13 heures est d'environ 0,75 contre 0,2 en présence de Cu-OOH et de 0,9 sans Cu-OOH. Le DTT (●) est peu efficace, il ne restaure que partiellement la croissance, la DO_{600nm} à 13 heures est de 0,6 et la phase de latence de 9 heures. La présence de Thiourée (▲) restaure la croissance, la DO_{600nm} après 13 heures est de 0,8, mais la phase de latence a une durée de 5 heures.

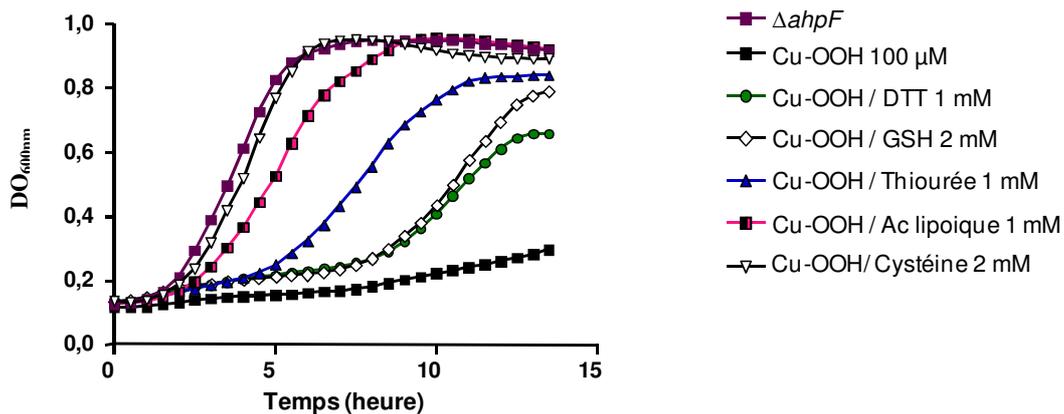


Figure 53 : Toxicité du Cumène hydroperoxyde repose sur la réaction de Fenton. Les cellules se sont développées en M17 glucose à 30°C. Lorsque la densité cellulaire atteint DO_{600nm} 0,1 ; le mutant $\Delta ahpF$ est cultivée en présence de Cu-OOH seul ou en présence de composés antioxydants, de piègeurs de radicaux hydroxyles.

Dans les conditions testées, les chélateurs des métaux n'ont pas eu d'effet significatif sur la croissance en présence de Cu-OOH (données non présentées). En conclusion, les différents tests suggèrent un mécanisme de toxicité du Cu-OOH proche de celui décrit chez *E. coli*.

II.5. Intégrité de la membrane lipidique et de l'ADN

La production de radicaux très oxydants par la décomposition des peroxydes indique que les macromolécules de la cellule sont des cibles potentielles du Cu-OOH. Aussi, nous avons réalisé une série de tests ciblant la membrane lipidique et l'ADN : complémentation par des acides gras exogènes (tween80, acide oléique) pour la membrane ; intégrité de l'ADN.

Si l'on compare les croissances du mutant $\Delta ahpF$ avec le Cu-OOH (—■—) et le Cu-OOH/Tween (—●—) en condition statique : la phase de latence est diminuée à 1 heure en présence de Tween, et la DO_{600nm} est de 0,8 après 13 heures (Figure 54A). De plus la cinétique de croissance de la condition Cu-OOH/Tween est semblable à la cinétique sans Cu-OOH (—■—). L'ajout de tween restaure donc complètement la croissance du mutant $\Delta ahpF$ en présence de Cu-OOH.

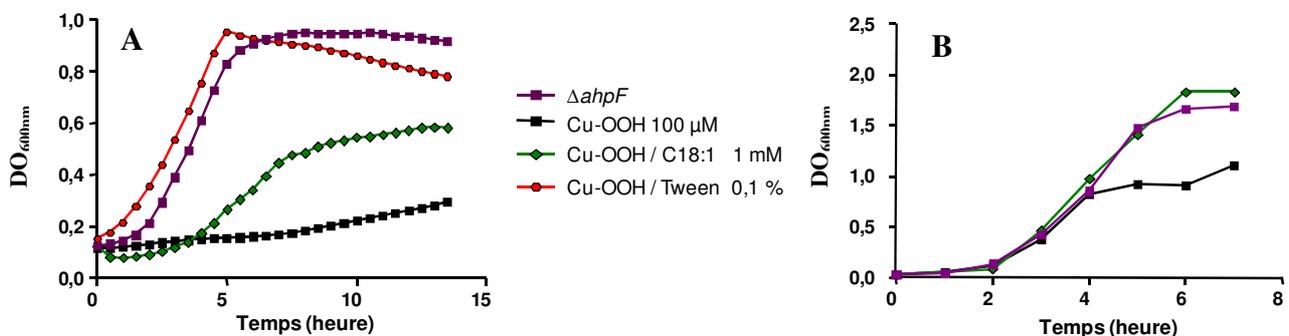


Figure 54 : La membrane, une cible d'endommagement de Cu-OOH . Les cellules se sont développées en M17 glucose à 30°C en statique (A) et en aération (B). Lorsque la densité cellulaire atteint DO_{600nm} 0,1 ; les cellules sont cultivées en présence de Cu-OOH seul ou en présence de Tween et du C18:1.

L'utilisation du C18:1 restaure partiellement la croissance du mutant $\Delta ahpF$ en présence de Cu-OOH (\rightarrow) en condition statique. Après 3 heures, la phase exponentielle de croissance débute, et contrairement à la cinétique sans Cu-OOH la DO_{600nm} après 13 heures atteint 0,6 (Figure 54A). Cependant tous les acides gras ne permettent pas de restaurer la croissance, pour exemple l'ajout de C17:0 ne permet pas la croissance de *L. lactis* lors d'un stress au Cu-OOH (donnée non présentée).

En condition d'aération la supplémentation du milieu par le C18:1 en parallèle du Cu-OOH restaure entièrement la croissance du mutant $\Delta ahpF$ (Figure 54B).

En conclusion, l'inhibition de croissance provoquée par Cu-OOH est dû à une altération de la membrane lipidique.

L'oxydation des lipides par le Cu-OOH peut entraîner l'altération de l'ADN chromosomique. Un choc au Cu-OOH (40 et 100 μM) a été réalisé quand les cultures avaient une DO_{600nm} de 0,2 en conditions statique ou aérée. Après 3 heures l'ADN chromosomique est extrait pour vérifier son état.

Que se soit pour la souche WT ou le mutant $\Delta ahpF$, après 3 heures le Cu-OOH à 40 ou 100 μM n'a pas altéré l'ADN chromosomique puisqu'aucun smir n'est visible sur le gel (Figure 55).

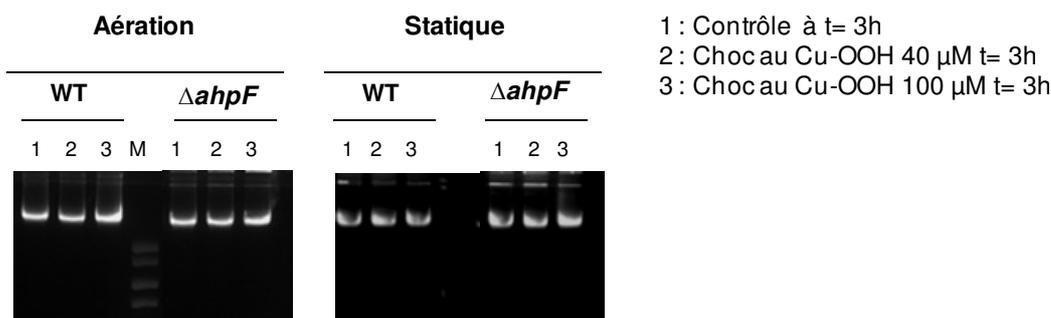


Figure 55 : L'inhibition de croissance en Cu-OOH n'est pas lié à des dommages sur l'ADN. *L. lactis* MG1363 et $\Delta ahpF$ sont cultivées en M17 glucose à 30°C. Après un choc de 3 heures au Cu-OOH en condition statique ou aéré, les cellules sont lysées et la mixture est déposée sur gel d'agarose contenant du BET. L'ADN est visualisé par exposition au UV et photographié.

En conclusion, l'inhibition de croissance par le Cu-OOH n'est probablement pas du à des cassures sur l'ADN.

II.6. Le Cumène hydroperoxyde modifie le profil en acide gras

Pour déterminer l'action possible du Cu-OOH sur la membrane, le profil en acide gras des deux souches (la souche parentale, $\Delta ahpF$) ont été comparés dans deux conditions de croissance différentes : i) cellules en présence de C18 :1/Cu-OOH 100 μM et analyse des cellules recueillies en phase stationnaire ; ii) cellules en phase exponentielle traitées avec Cu-OOH 40 μM , cette concentration permet d'obtenir une croissance du mutant tout en provoquant un stress.

Après 13 heures de culture statique sans Cu-OOH les profils d'acides gras entre la souche WT et le mutant $\Delta ahpF$ sont identiques (données non présentées). L'ajout d'acide oléique à 1 mM (C18:1)

en début de croissance entraîne l'apparition de 2 pics sur le profil, comme on peut le voir dans la [Figure 56](#). Le pic 1 correspond au C18:1 exogène absorbé du milieu de culture, et le pic 2 correspond au C18:1 endogène (C18:1 n-7). Les pics 3 et 4 correspondent à une transformation métabolique du C18:1 en C19:0 cyclique. L'absorption de C18:1 ne modifie pas la composition en acides gras et les proportions ($\leq 5\%$ de variations entre les souches) entre les deux souches.

En présence de Cu-OOH (100 μM), on détecte beaucoup moins de C18:1 endogène chez le mutant par rapport au WT (3,1% contre 9,3% respectivement) mais ce changement n'est pas corrélé à une transformation en C19:0 dont les proportions restent similaires entre les 2 souches ([Tableau 12](#)). Pour le C18:1 exogène, pas de différence notable n'est observée contrairement à son dérivé C19:0. Le mutant en contient beaucoup plus par rapport au WT (28,9% contre 19,2%).

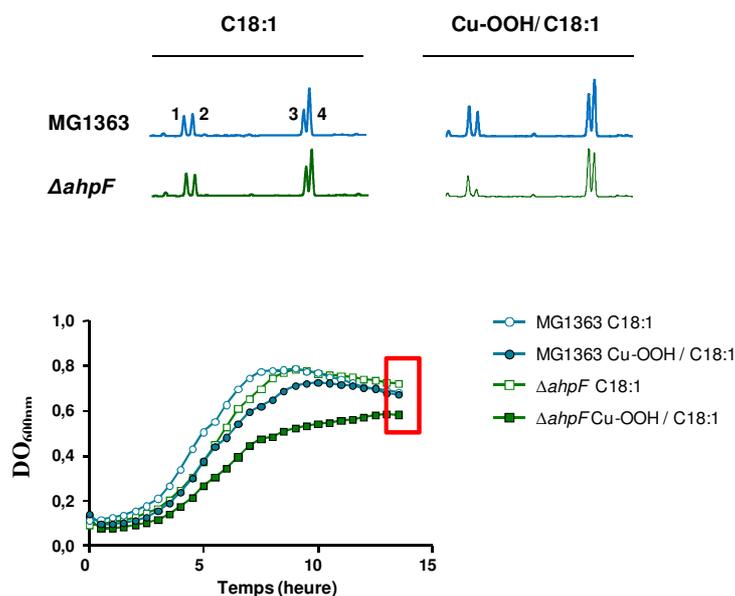


Figure 56 : La délétion de *ahpF* affecte la composition en acides gras chez les cellules exposées au Cu-OOH. Représentation des différences en acides gras entre la souche *L. lactis* MG1363 et ΔahpF après 13 heures en M17glucose 0,5% C18:1 ou Cu-OOH/ C18:1 à 30°C en condition statique. 1, acide oléique (C18:1) ajouté dans le milieu ; 2, acide-vaccénique (C18:1 n-7) ; 3, CycC19:0 (dérive du C18:1) ; 4, acide lactobacillique (cycC19:0). Le cadre rouge correspond aux points de DO_{600} à 13 heures utilisés pour l'extraction des acides gras. Le profil est représentatif de 3 répétitions indépendantes.

Tableau 12 : Composition en acide gras des souches *L. lactis* MG1363 et ΔahpF après 13 heures de croissance en milieu M17 glucose C18:1 ou Cu-OOH/ C18:1 et en condition statique.

	MG1363		ΔahpF	
	C18:1	Cu-OOH/ C18:1	C18:1	Cu-OOH/ C18:1
C14:0	9,3 \pm 0,7	6,8 \pm 0,9	8,4 \pm 0,9	6,4 \pm 0,7
C16:0	22,1 \pm 1,6	21,5 \pm 2,0	22,7 \pm 2,2	21,9 \pm 2,8
C18:1	10,8 \pm 0,02	14,2 \pm 2,1	9,5 \pm 2,0	10,4 \pm 0,8
C18:1 n-7	10,8 \pm 1,0	9,3 \pm 0,8	7,5 \pm 2,3	3,1 \pm 0,4
CycC19:0	14,7 \pm 0,4	19,2 \pm 1,5	18,6 \pm 1,3	28,9 \pm 3,3
CycC19:0n-7	25,6 \pm 2,2	22,4 \pm 1,7	28,3 \pm 2,6	21,3 \pm 1,0

Les chiffres correspondant aux quantités d'acide gras sont donnés en pourcentage de la quantité totale en acides gras identifiés en chromatographie.

Chez des cellules en phase exponentielle et en condition statique, au temps 1 heure et 3 heures les profils et les quantités en acide gras sont identiques entre les deux souches (Tableau 12), mais la proportion en C18:1n-7 et cycC19:0 s'est inversée entre le temps 1 heure et le temps 3 heures. Par contre, que se soit au temps 1 heure ou 3 heures l'ajout de Cu-OOH modifie les profils du mutant $\Delta ahpF$ (Tableau 13) : 1,2 fois moins de C14:0 ; 1,3 fois moins de C18:1n-7 et 1,4 fois plus de C19:0.

Tableau 13 : Composition en acide gras des souches *L. lactis* MG1363 et $\Delta ahpF$ en milieu M17 glucose suite à un choc au Cu-OOH de 1 heure ou 3 heures en condition statique. Chiffre donnés en pourcentage.

	WT				$\Delta ahpF$			
	1 h		3 h		1 h		3 h	
	Ø	Cu-OOH	Ø	Cu-OOH	Ø	Cu-OOH	Ø	Cu-OOH
C14:0	9,6 ± 0,6	8,4 ± 0,6	8,6 ± 0,4	8,2 ± 0,3	7,9 ± 0,2	6,5 ± 0,6	7,4 ± 0,5	6,6 ± 0,2
C16:0	29,5 ± 0,2	29,8 ± 1,8	30,2 ± 1,1	28,8 ± 1,1	30,2 ± 1,7	30,6 ± 4,1	30,1 ± 2,0	29,9 ± 0,4
C16:1 n-7	3,0 ± 0,4	5,6 ± 4,5	3,0 ± 0,8	2,5 ± 0,3	2,9 ± 1,1	4,5 ± 3,8	1,6 ± 0,6	1,4 ± 0,9
C18:0	2,8 ± 0,4	4,1 ± 1,3	2,9 ± 0,7	3,0 ± 0,7	3,4 ± 1,1	3,8 ± 1,5	3,3 ± 0,7	2,8 ± 0,0
C18:1 n-7	35,1 ± 1,4	32,8 ± 2,2	19,8 ± 2,1	21,2 ± 0,6	30,1 ± 3,4	24,2 ± 3,6	13,8 ± 1,6	14,5 ± 0,7
CycC19:0	16,1 ± 0,3	15,3 ± 1,1	34,1 ± 3,7	33,4 ± 1,6	19,1 ± 1,7	21,2 ± 2,8	33,4 ± 4,4	40,0 ± 1,7

En condition aérée (Annexe 9), sans Cu-OOH le mutant $\Delta ahpF$, au temps 1 heure a 1,4 fois moins de C18:1n-7, et au temps 3 heures, 1,4 fois moins de C18:1n-7 et 1,5 fois plus de cycC19:0. L'ajout de Cu-OOH ne modifie pratiquement pas les différences précédentes, le profil du mutant $\Delta ahpF$ présente : 1,6 fois moins de C18:1n-7 ; 1,5 fois plus de cycC19:0 et 1,4 fois moins de C14:0 (temps 1 heure).

La sensibilité du mutant $\Delta ahpF$ au Cu-OOH semble être causée par une modification de sa membrane lipidique, même si la souche peut encore synthétiser tous ses acides gras. En conclusion : AhpR permet une protection de la membrane contre le Cu-OOH via un équilibre entre C18:1 et le C19:0. Le C19:0 permettrait de mieux stabiliser la membrane en présence de Cu-OOH.

II.7. Activité réductrice du mutant $\Delta ahpF$

AhpF intervenant dans l'élimination de l'oxygène, nous avons testé si l'activité réductrice était modifiée ou non par la délétion du gène *ahpF*.

La capacité du mutant $\Delta ahpF$ à réduire les sels de tétrazolium est identique à la souche WT. Les activités réductrices et d'acidifications en condition de bullage initial sont identiques entre la souche parentale et le mutant (données non présentées).

En condition d'aération continue (Figure 57), acidifie aussi rapidement que la souche parentale MG163. Par contre le mutant réduit le milieu 1,4 fois moins rapidement et son E_{h7} final est plus élevé que la souche sauvage MG1363, -120 pour le mutant contre -157 chez la souche WT.

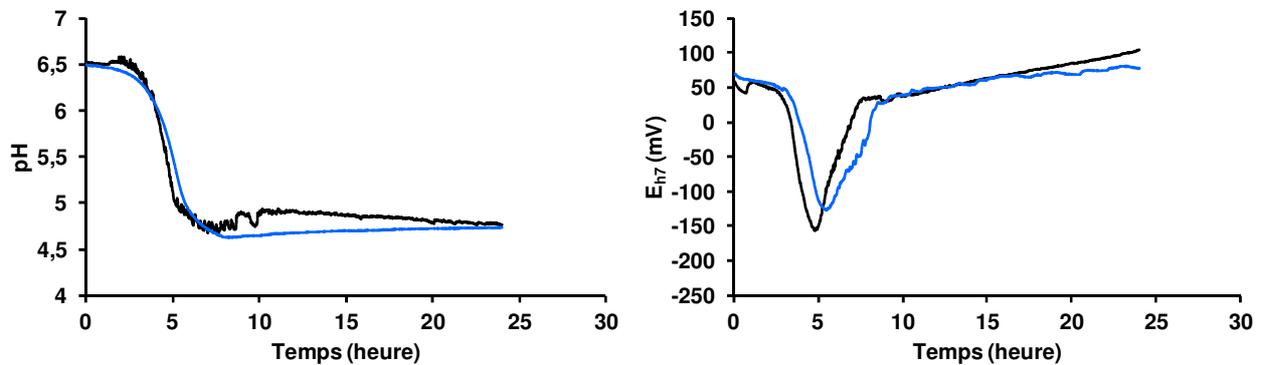


Figure 57 : Effet de la délétion de *ahpF* sur l'évolution du E_{h7} et du pH lors de la croissance. Aération en continue. Noir, MG1363, Bleu, $\Delta ahpF$. Moyenne de 3 expérimentations indépendantes

En conclusion, ce résultat est en accord avec l'étude de Tachon et *al.*, (172) qui a déterminé que la délétion du gène *ahpF* altérerait les capacités réductrices de *L. lactis* TIL46 dans le lait en condition d'aérobie mais pas d'anaérobie. Confirmant le rôle de AhpR dans la réduction du E_{h7} uniquement en aérobie.

DISCUSSIONS & PERSPECTIVES

La démarche de l'étude

Encore peu pris en compte dans les procédés alimentaires, le potentiel redox joue pourtant un rôle important. Comme il a été décrit dans l'introduction, le potentiel peut intervenir négativement ou positivement à la fois sur la flore microbienne, et sur les qualités organoleptiques. Dans l'optique de donner à l'industrie une analyse comparative sur l'utilisation du E_h comme stratégie de lutte contre la contamination microbienne dans les industries, le projet ANR Food-Redox dans lequel s'intègre ce travail de thèse a été mis en place. L'objectif est d'améliorer la conservation, de renforcer la sécurité des aliments par de nouvelles approches pour les processus et la formulation des produits, de mieux connaître et contrôler l'impact du potentiel redox sur les microorganismes d'origine alimentaire. Le développement de la flore microbienne est l'origine principale de la variation du E_h lors de la production de produits fermentés. Massivement utilisé dans les procédés alimentaires pour leurs propriétés acidifiantes, protéolytiques et aromatiques, les bactéries lactiques ont été choisies comme bactéries modèles dans ce projet, et plus particulièrement *Lactococcus lactis*.

L'activité réductrice des bactéries lactiques est variable et dépend dans un premier temps de l'élimination de l'oxygène du milieu. La consommation de l'oxygène est principalement due à la NADH oxydase NoxE, au complexe AhpR, et la chaîne de transport d'électrons si de l'hème est disponible dans le milieu. L'activité de la NADH oxydase NoxE augmente au cours de la croissance mais diminue lors de la phase stationnaire de croissance, lorsque le pH devient acide (108) ou quand H_2O_2 est présent. Le complexe AhpR et la chaîne de transport d'électrons interviennent principalement en fin de croissance pour réduire le taux d'oxygène très bas. A travers des études antérieures sur des mutants déficients en ménaquinone et *ahpF*, on constate que les cellules restent capables de réduire le milieu à -200 mV malgré une diminution de la vitesse de réduction (172) ([Figure 58](#)). Par ailleurs d'autres bactéries lactiques dépourvues de ménaquinones sont capables de réduire le milieu comme *L. plantarum*.

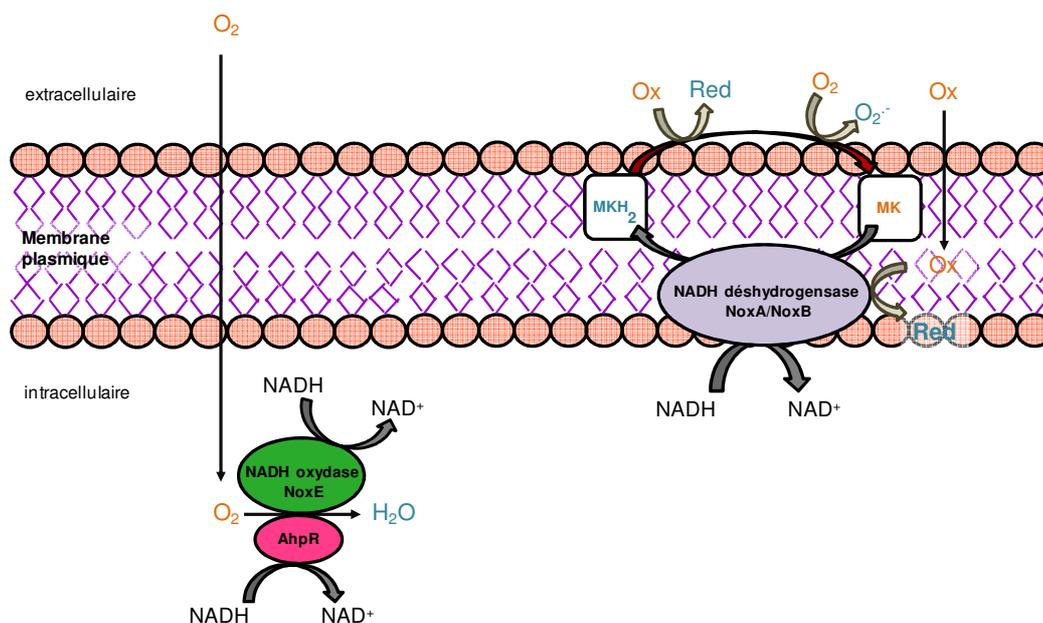


Figure 58 : Schéma récapitulatifs des fonctions impliquées dans l'activité réductrice de *L. lactis*. Ox, composé oxydé ; Red, composé réduit ; MK, ménaquinones oxydées ; MKH₂, ménaquinones réduites ; AhpR, Complexe alkyl hydroperoxyde réductase. En bleu : composés réduits ; en orange : composés oxydés.

Dans un étude de 2010, Michelon et *al.*, (120) ont alors proposé d'autres acteurs dans la baisse du E_{h7} : les protéines à thiols de surface.

Ainsi, ce travail de thèse avait pour objectif d'identifier ces protéines de surface à motif redox actif, CXXC. Pour aborder cette approche difficile nous avons élaboré en parallèle deux méthodes : l'une bioinformatique et l'autre biochimique.

L'approche bioinformatique/génétique consiste en une analyse des protéines de surface à résidus CXXC *via* les bases de données tels que locate P database, TMpred server, TMHMM server, Topo2 Transmembranaire protein display. Cette méthode nous a permis de mettre en évidence 4 protéines de fonctions inconnues dont 3 qui possédaient plusieurs groupements CXXC. Parmi elles nous avons identifié une protéine impliquée dans la résistance à un stress oxydatif (Llmg_0524).

L'approche biochimique a consisté en une analyse des protéines de surface à résidus CXXC en comparant différentes méthodes de séparation des protéines. Ces méthodes nous ont permis de montrer la présence en surface d'une protéine cytoplasmique connue pour son rôle dans l'élimination de l'oxygène, AhpF. Nous avons approfondi son rôle dans la résistance aux stress oxydatifs et sur l'activité réductrice de *L. lactis*.

Mécanismes de réduction

Après que la valeur réductrice de -200 mV ai été atteinte, nous avons vu que l'élimination des cellules par filtration permet de restaurer le E_h initiale à 45%, indiquant que la présence physique des cellules dans le milieu est requise à cette stabilisation.

En bloquant les thiols par du NEM ou du BIAM en fin de réduction, le potentiel initial a été restauré à 40%. Ce qui indique que la stabilisation du potentiel est en grande partie due à la présence du couple réducteur thiol/disulfure présents chez les protéines à cystéines.

L'évolution du E_{h7} est corrélée de façon linéaire avec le dosage de thiol libre des cellules. Cette linéarité pourrait suggérer que la baisse du E_{h7} est simplement due à la présence de protéines en surface plutôt qu'une réponse spécifique à travers la mise en place d'un système spécifique de réduction contrairement à *E. coli* ou *B. subtilis*. Dans l'espace périplasmique de *E. coli* l'environnement réducteur (-165 mV) est principalement maintenu par les protéines TDOR Dsb (117). Une récente étude sur *B. cereus* (105) confirme chez un autre modèle microbien le rôle des thiols exofaciaux dans l'activité de réductrice.

Cependant de tels systèmes n'existent pas chez *L. lactis*.

Pour rechercher de tels systèmes, j'ai développé plusieurs approches, cependant aucune ne s'est réellement révélée plus pertinente l'une que l'autre. La méthode du shaving utilisée dans ce travail n'a pas donné de résultat très positif probablement lié aux très faibles nombres de protéines identifiées. L'approche combinant le BIAM et la streptavidine, plus spécifique des thiols libres, ne nous a pas permis d'identifier des candidats potentiels à l'exception de AhpF. En aérobiose, le mutant diminue moins le E_{h7} que la souche parentale (-120 contre -150 mV) mais ceci est probablement lié à la production de peroxyde par la bactérie. Le dosage de cet oxydant indique que le mutant $\Delta ahpF$ produit jusqu'à 800 μM de peroxyde, probablement de H_2O_2 . En anaérobiose, la délétion n'a cependant pas d'effet sur le E_{h7} en accord avec des résultats obtenus chez un mutant $\Delta ahpF$ de TIL46 cultivé en lait (172).

En parallèle, j'ai développé une approche bioinformatique. Si l'on se base sur les critères du motif redox CXXC et de la localisation membranaire, nous avons trouvé 7 protéines répondant à ces critères. Parmi celles étudiées dans ce travail, Limg_0524 et Limg_0526, elles n'ont pas d'effet sur le E_{h7} .

Ce travail montre la complexité pour identifier le mécanisme de réduction du milieu par *L. lactis*.

Si l'on émet l'hypothèse que l'ensemble des protéines membranaires possédant au moins une cystéine contribue individuellement à la réduction du milieu, il faudrait alors rechercher les protéines de surface les plus abondantes contenant des cystéines.

Néanmoins mon travail de thèse m'a permis d'étudier des protéines membranaires riches en cystéines, dont les fonctions étaient complètement inconnues jusqu'alors Limg_0524 et Limg_0526, et de caractériser plus en détail le rôle de AhpF dans la résistance aux peroxydes.

Caractérisation des protéines à thiols exofaciaux Llm_g_0524 et Llm_g_0526

- Chélation de métaux

A travers l'étude de ces 2 protéines, j'ai mis en évidence un motif riche en cystéines (CX₂CX₁₀CX₂C) qui avait été étudié uniquement sur des protéines cytoplasmiques comme DnaJ, RadA, mais pas chez des protéines membranaires. A travers une analyse bioinformatique (SMART), on s'aperçoit que ce motif est présent dans des protéines chez plusieurs organismes Gram(+) comme Gram(-). Le rôle de ce motif et sa fonction dans les protéines n'étaient pas connues avant ce projet. Durant mon travail, une étude chez *E. coli* a montré que ce motif fixe du fer ou du zinc (134), les auteurs avançant plutôt la présence du fer dans la protéine. Dans nos 2 exemples, le zinc semble être le seul métal piégé par ce motif. La présence de fer dans certaines préparations résultent plus des conditions de croissance et purification qu'un véritable complexe cystéine-fer. Dans les conditions avec Zinc, le fer est quasiment absent. Nous proposons chez *L. lactis*, que *in vivo* ces deux protéines possèdent effectivement du zinc car ce métal est largement abondant *in vivo*. Des études de dosages de métal indiquent que le zinc est 25 fois plus élevé que le fer chez *L. lactis* (69).

- Rôle du complexe Zinc-cystéine et de l'opéron

En revanche le motif est nécessaire à la stabilité des protéines Llm_g_0524 et Llm_g_0526. En effet, la délétion du motif chez la protéine Llm_g_0524 perturbe fortement la croissance cellulaire de *L. lactis* MG1363. Nous suggérons que l'opéron peut intervenir dans l'intégrité de la surface cellulaire. En effet la délétion du gène Llm_g_0524 entraîne une sensibilité au cumène hydroperoxyde, et la complémentation du mutant par la protéine Llm_g_0524 tronquée des cystéines rend la souche plus résistante au lysozyme. Le lysozyme est une hydrolase qui coupe les liaisons β1-4 du peptidoglycane (couple N-acétyl-glucosamine/ acide N-acétylmuramique).

- Perspectives

La fonction de ces deux protéines sur l'intégrité de l'enveloppe reste à découvrir : dans un premier temps, on peut rechercher des modifications sur le peptidoglycane, puis voir si la synthèse des précurseurs du peptidoglycane est modifiée ? On pourrait également s'intéresser aux profils des acides gras comme décrit dans la partie AhpF de ce travail. Une modification de la membrane pourrait gêner le transfert des unités du peptidoglycane vers l'extérieur.

De même, il serait intéressant de définir si des interactions existent entre Llm_g_0524 et Llm_g_0526, mais également avec Llm_g_0525 et qu'elle est la fonction de la protéine Llm_g_0525.

Lors de l'étude de ces protéines chez la souche *L. lactis* TIL46, nous nous étions intéressés à l'effet des phages, l'un des plus grands fléaux pour l'industrie laitière. Le mutant *Allm_g_0526* était apparu

plus résistant à la présence des phages C2 et SKI. Il serait intéressant de déterminer si le même phénotype est conservé chez la souche *L. lactis* MG1363. Pour pouvoir caractériser si la protéine est impliquée dans la reconnaissance aux phages, ou si comme l'hypothèse précédente la délétion du gène a modifié de la surface rendant alors moins accessible les récepteurs spécifiques à ces phages ?

Outre l'intérêt pour les protéines Limg_0524 et Limg_0526 lors de l'analyse bioinformatique, l'étude d'une autre protéine hypothétique Limg_1102 avait également débuté chez la souche *L. lactis* TIL46. Cependant le mutant n'a pas pu être construit dans cette souche. Ne possédant ni plasmide ni de transposon contrairement à *L. lactis* TIL46 (190), la souche *L. lactis* MG1363 pourrait permettre d'obtenir des mutants de Limg_1102 plus facilement. afin de caractériser le rôle de cette protéine à 4 motifs CXXC. Contrairement aux protéines Limg_0524 et Limg_0526 ses cystéines seraient extracellulaires, d'après une analyse *in silico*. La comparaison par BLAST de la séquence protéique a révélé une identité de recouvrement de 51% et 29%, avec une protéine membranaire de fonction inconnue, nommée YdJG, chez *E. faecalis* et *B. subtilis* respectivement.

La protéine Alkyl hydroperoxyde reductase subunit F (AhpF)

- Approche biochimique

Les trois méthodes qui ont été utilisées lors de cette thèse sont complémentaires et donnent des informations importantes sur les protéines présentes dans la surface cellulaire. Tout d'abord, la technique de shaving est une méthode simple, mais sensible, récemment mise au point pour identifier les protéines à la surface cellulaire exposées au milieu extracellulaire (118). Cependant, les temps de traitement à la trypsine doivent être courts pour éviter la lyse de *L. lactis*, qui pourrait contaminer l'échantillon avec des protéines cytoplasmiques non spécifiques. Les protéines de surface présentes en petite quantité ou avec une partie extracellulaire courte peuvent être manquées par cette méthode. D'autre part, avec l'analyse par western blot, il est possible de détecter la présence de la quasi-totalité des protéines de surface de la cellule, sauf si elles ne sont pas en mesure de pénétrer ou de migrer en gel SDS-PAGE. En raison des limites de migration dans les 1D-gel, l'analyse d'une bande spécifique identifie un grand nombre de protéines. Ainsi, cette analyse est utile effectuer une détection préliminaire des protéines d'intérêts. Enfin, la technique d'affinité à la streptavidine permet un affinage de l'analyse, car seuls les protéines marquées spécifiquement seront retenues, réduisant considérablement le nombre des protéines non spécifiques. En conclusion, la combinaison de ces trois méthodes de détection permet un résultat plus robuste et plus méticuleux.

Dans cette approche, seule une protéine contenant un motif CXXCa été mise en évidence : AhpF. Cette protéine est une NADH oxydase produisant du peroxyde d'hydrogène *via* l'oxydation de NADH. Le peroxyde d'hydrogène alors produit est réduit par la protéine AhpC en H₂O. Ces deux protéines sont transcrites au sein de l'opéron AhpR (89). Comme tous les logiciels de bioinformatique et les articles bibliographiques l'indiquent, la protéine AhpF est majoritairement

retrouvée dans le cytoplasme. Cependant par Western Blot et par une analyse en microscopie à épifluorescence, nous avons trouvé sa présence à la surface de *L. lactis*. Ce n'est pas la première protéine cytoplasmique identifiée comme pouvant se retrouver à la surface bactérienne. En effet, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) qui convertit le glucose-3-phosphate en 1,3-biphosphoglycéraldéhyde dans le cytoplasme, est connue pour être également présente à la surface bactérienne. Cette enzyme est présente sur la surface de *L. lactis* (118) et des genres *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* et *Streptococcus* (15). Sa présence en surface semble dépendre de facteurs environnementaux. Chez *S. cerevisiae*, l'augmentation de la température entraîne la présence de GAPDH dans la paroi cellulaire (47). GAPDH en surface de souches pathogènes facilite la colonisation de cellules hôtes (141). D'autres enzymes glycoliques sont suspectées comme facteurs de virulence lorsqu'elles se retrouvent à la surface d'agents pathogènes, la phosphoglycérate kinase, la phosphoglycérate mutase et la trioephosphate isomérase (141). Chez *L. lactis* TIL448, 49 protéines cytoplasmiques ont été identifiées à la surface, des chaperonnes moléculaires, des enzymes du métabolisme carboné ou des protéines ribosomales (118).

- Participation de la protéine AhpF dans la protection au Cumène hydroperoxyde

Comme, Michelon et *al.*, (120) ont suggéré que les protéines de surface à thiol pourraient être impliquées dans le micro-environnement réducteur autour de la cellule, AhpF étant une NADH oxydase au motif CXXC, on peut spéculer quant à son rôle en surface. Par exemple, chez *S. pneumoniae*, une protéine de surface, TlpA, appartenant à la famille des antioxydants thiol-spécifiques, intervient dans la réponse au stress d'un peroxyde exogène (3). Higuchi et *al.*, (76) ont présenté le mode d'action de l'opéron AhpF chez les bactéries lactiques, et ont suggéré la capacité d'AhpF à réduire AhpC, la protéine AhpF pourrait également réduire d'autres composés que l'oxygène. De plus, chez *S. pyogenes*, une étude de Pulliainen et *al.*, (148) présente le rôle de l'opéron AhpF/AhpC dans l'élimination d'H₂O₂ ou de composés organiques hydroperoxydes exogènes. Chez *E. coli* le rôle de l'opéron AhpF/AhpC a également été mis en évidence dans la protection contre un peroxyde organique, le cumène hydroperoxyde (7).

Notre étude montre que la souche *L. lactis* MG1363 muté dans le gène *ahpF* est fortement sensible au cumène hydroperoxyde mais pas à l'hydrogène peroxyde. Ainsi comme décrit précédemment chez *S. pyogenes*, l'opéron AhpF/AhpC pourrait éventuellement être utilisé par *L. lactis* dans l'élimination de composés hydroperoxydes organiques. La résistance de la souche mutée au peroxyde d'hydrogène peut s'expliquer par l'existence d'autres systèmes. Chez *L. lactis* MG1363 d'autres peroxydases que AhpC sont présentes, Tpx, thiol peroxydase et Cpo, une non-hème chlorure peroxydase. Chez *L. lactis* le rôle de Cpo n'est pas décrit, mais une étude de 2014 démontre l'expression des gènes *cpo* et *tpx* en condition d'oxygénation chez *L. lactis* MG1363 (41). Cependant ces systèmes doivent être peu actifs, car en comparaison à la souche parentale, l'absence de AhpF provoque une accumulation du peroxyde d'hydrogène en condition d'aération.

Chez *E. coli* un prétraitement de la souche par l'hydrogène peroxyde la protège contre le cumène hydroperoxyde (8). Nous n'avons pas testé un tel traitement, mais l'ajout d'une faible concentration en cumène hydroperoxyde (20 μ M) lors de la préculture, ne permet pas l'adaptation de *L. lactis* MG1363 à une forte concentration (100 μ M) en cumène hydroperoxyde (donnée non présentée).

L'utilisation de composés anti-oxydants, tel que la glutathion réduit, l'acide lipoïque, permet de restaurer la croissance du mutant Δ *ahpF* en présence de cumène hydroperoxyde. De même que l'utilisation de détergent (tween 80) ou d'acide oléique. Ce résultat montre que le cumène hydroperoxyde, impacte la membrane lipidique, les composés réducteurs protègent d'une peroxydation lipidique, alors que le tween 80 (donneur d'acide oléique) et l'acide oléique vont s'intégrer à la membrane. Chez *Helicobacter pylori*, la peroxydation des lipides en absence des thiols peroxydase, AhpC et BCP, provoque une altération de l'ADN (187). Dans notre cas l'ADN n'est pas endommagé.

Cependant ce sont plus particulièrement les acides gras insaturés qui sont sensibles à l'oxydation, *L. lactis* MG1363 en possède peu.

En présence du cumène hydroperoxyde, ou en condition d'aération, l'acide lactobacillique (cycC19:0) est détecté en plus grande proportion dans la membrane du mutant Δ *ahpF*, contrairement à son précurseur l'acide cis-vaccénique (C18:1n-7) qui diminue. Chez les bactéries lactiques, la synthèse des acides gras cyclopropanes est connue pour favoriser la tolérance à de nombreux stress. Chez *S. thermophilus* l'augmentation en cyclopropane permet la résistance aux basses températures (13). Pour *O. oeni* cela permet l'adaptation à un stress acide et à l'éthanol (70). Chez *L. lactis*, il a été montré que la proportion en cyclopropane est augmentée lors d'un stress osmotique (74). Chez *Lactobacillus helveticus* ou *Lactobacillus sanfranciscensis* en condition de micro-aération ou d'aération respectivement, la quantité d'acide gras cyclopropane est amplifiée (126). Le mécanisme de cyclopropanation des acides gras insaturés de la membrane pourrait contribuer à la survie de *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 Δ *ahpF* exposé à un stress oxydatif.

- Perspectives

Pour valider la présence de la protéine AhpF à la surface de *L. lactis* MG1363 d'autres expérimentations sont nécessaires. La méthode d'identification par marquage à l'alexa fluor 488 couplé à de la cytométrie en flux est à améliorer. La présence d'amas cellulaire compte pour un événement, ce qui impacte sur la détermination du pourcentage de cellules marquées. Pour améliorer cette méthode, il faudrait traiter les cellules au sonicateur, afin d'obtenir une séparation optimale des cellules avant le marquage. Il sera nécessaire de déterminer le temps de sonication pour ne pas provoquer de lyse bactérienne. Déterminer à quel stade de croissance ou dans quelles conditions

L. lactis peut exposer la protéine en surface. Et surtout quel est l'intérêt de *L. lactis* d'avoir AhpF à sa surface.

La protéine AhpF a un rôle dans la réponse au stress du cumène hydroperoxyde, mais a-t-elle le même impact avec d'autres composés organique hydroperoxydique, comme le tert-butyl hydroperoxyde. Pour déterminer si le rôle AhpF dans la résistance au stress oxydatif lipophile est dû à la protéine ou à l'opéron AhpF/AhpC, il faudrait réaliser des expérimentations complémentaires avec une souche mutée du gène *ahpC*.

Le mutant du gène *ahpF* produisant plus de peroxydes endogène, il faut identifier les différences sources de peroxyde chez *L. lactis*. La nature et le rôle des oxydases qui les produiraient (lactate oxydase, pyruvate oxydase) et comment *L. lactis* élimine ces peroxydes en condition en statique (rôle de Tpx).

Applications

L'utilisation de la souche *L. lactis* en tant que ferment réducteur pourrait être intéressante. En effet *L. lactis* est alternative à l'emploi de traitements technologiques (électroréduction, gaz réducteurs) ou de molécules chimiques (cystéines) d'usage couteux et fortement réglementé en industrie agro-alimentaire. *L. lactis* pourrait favoriser la survie d'autres microorganismes d'intérêt, tel que les souches probiotiques dont la survie est favorisée en condition réductrice (19).

L. lactis pourrait également :

- protéger de l'effet de l'oxydation les qualités organoleptique des aliments fermentés, en piégeant les ROS.
- avoir un impact sur la qualité des produits laitiers fermentés. L'application d'un mélange réducteur N₂/H₂ peut induire une diminution du phénomène de synérèse, une augmentation de la production d'acétaldéhyde (arôme majeur du yaourt), une diminution de la production de dicétones (catabolisme oxydatif) et une augmentation de l'acceptabilité du yaourt au cours de la conservation (113).
- intervenir sur la virulence des pathogènes dans un contexte alimentaire. Par exemple les propriétés réductrices de la souche *L. lactis* sbsp. *lactis* bv. *diacetylactis* LD61 interfèrent avec l'expression de la virulence de la souche *Staphylococcus aureus* (135).

D'autres applications possibles des bactéries lactiques en l'industrie agroalimentaire sont présentées dans l'article suivant :

Innovative strategies based on lactic acid bacteria and redox potential for improving processes in the fermented foods industry.

Célia Roussel^(1,2,3), Bruno Ebel^(1,4), Damien Michelon^(1,5), Florence Martin-Dejardin⁽¹⁾, Eric Beuvier⁽⁶⁾, Patrick Gervais⁽¹⁾, Joëlle De Coninck⁽⁷⁾, Philippe Gaudu^(2,3), Rémy Cachon^{(1)*}

⁽¹⁾ UMR A 02.102 Procédés Alimentaires et Microbiologiques, AgroSup Dijon-Université de Bourgogne, 1 esplanade Erasme, F-21000 Dijon, France (Tel. : +33 380774073; Fax: +33 380772384; e-mail: remy.cachon@u-bourgogne.fr)

⁽²⁾ INRA, UMR1319 Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France,

⁽³⁾ AgroParisTech, UMR Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France,

⁽⁴⁾ Present address: Laboratoire Réaction et Génie des Procédés, UMR 7274, CNRS-Université de Lorraine, 2 avenue Forêt de Haye, TSA 40602, 54518 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

⁽⁵⁾ Present address: Agence nationale de sécurité sanitaire (ANSES), 23, avenue du Général De Gaulle, F-94706 Maisons-Alfort, France

⁽⁶⁾ INRA, UR 342 Technologie et Analyses Laitières, F-39800 Poligny, France

⁽⁷⁾ Welience Agroalimentaire et Bio-Industriel, Plate-forme de Prédéveloppement en Biotechnologies, 17 rue Sully, F-21000 Dijon, France

* Corresponding author.

Abstract:

Lactic acid bacteria (LAB) are important microorganisms in the food industry as functional starters for the manufacture of fermented food products and as probiotics. Modifying the redox potential (E_h) in LAB fermented foods offers new solutions for optimizing food processes and controlling food quality. This paper presents the strategies for modifying E_h in food products using chemical, electrochemical and microbiological tools. The interest of this parameter in terms of production of LAB biomass (starters, probiotics) and fermented food products (fermented milks, cheeses and others) will be exposed.

1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are Gram positive bacteria which belong to the Firmicutes phylum; these bacteria have GRAS (generally recognized as safe) status. LAB can be found in a diversity of environments highlighting their adaptive evolution. Amongst the different parameters which characterise these environments, the redox state has only very recently been taken into consideration. It has however already been addressed indirectly in studies on the impact of oxidative stress on lactic acid bacteria (Sugimoto, Abdullah Al, & Sonomoto, 2008). Indeed, the notion of oxidation has often been associated with the presence of oxygen, and the amalgam oxygen/oxidation can narrow the view of the oxidoreduction process. A broader vision can be proposed regarding the adaptation of lactic acid bacteria to extracellular redox. The metabolism of lactic acid bacteria, chemotrophic organisms, involves a series of dehydrogenations (oxidations) and hydrogenations (reductions) and is governed by the requirement to balance reactions producing and consuming redox cofactors (NADH). In addition, the acidifying activity of LAB is associated with a reducing activity that can lead media to very reducing values (Brasca, Morandi, Lodi, & Tamburini, 2007; Cachon, Jeanson, Aldarf, & Divies, 2002). This activity varies among species, and we are only just beginning to discover the mechanisms involved (Michelon, et al., 2013; Tachon, et al., 2009). Studies aimed at reducing the medium by injecting gas (Cachon, Capelle, Diviès, & Prost, 2001; Cachon, Diviès, Jeannot, & Prost, 2002), adding molecules (Dave & Shah, 1997a, 1997b; Grosch & Wieser, 1999; Moreton, 1998) or using technological treatments (Bolduc, Bazinet, Lessard, Chapuzet, & Vuilleumard, 2006; Moreton, 1998; Riondet, 1999) have shown that it is possible to act on the metabolisms of interest such as the production of aroma compounds, bacterial growth and cell survival (Bolduc, Raymond, Fustier, Champagne, & Vuilleumard, 2006; Dave & Shah, 1998; Ebel, Martin, Le, Gervais, & Cachon, 2011; Martin, et al., 2010). New avenues are being envisaged aimed at optimising food processes and controlling product quality. The results presented here are very promising and underline the consequential prospects.

2. Definition, measurement and manipulation of E_h

In the same way as pH characterises the acid-base characteristics, E_h characterises the oxidoreductive properties of a medium. Using redox sensors as recommended by Clark and Hewitt in the middle of the last century, the redox state can be measured directly and monitored on line (Clark, 1960). The use of sensors to measure the pH of a medium is very easy to implement nowadays, however measuring E_h is more complex and requires a specific metrological approach (Abraham, 2007; Galster, 2000).

2.1. E_h Measurement

The principle of measuring the E_h of a medium consists in measuring the electromotive force between a metal electrode (platinum, gold) and a reference electrode immersed in the medium being measured. In practice, two references are used: the calomel electrode and the silver/silver chloride electrode (Ag/AgCl). The reference electrode and the measuring electrode are combined and the oxidoreduction potential (E_m) is measured in volts. Oxidoreduction potentials must always be reported relative to the standard hydrogen electrode, consequently the potentials measured (E_m) must be adjusted according to the reference value (E_r) in relation to the hydrogen electrode: $E_h = E_m + E_r$. For example, the reference Ag/AgCl is 207 mV at 25°C ($E_r = 207 + 0.8 (25 - T^\circ\text{C})$). Microelectrodes are preferred for heterogeneous systems, E_h gradients have been highlighted in cheese matrices such as Camembert (Abraham, Cachon, Colas, Feron, & DeConinck, 2007) and Cheddar (Topcu, McKinnon, & McSweeney, 2008).

2.2. Manipulation of E_h in food systems

There are four methods to manipulate E_h of foods that can be used in the food industry, i.e. use of LAB, redox molecules, gas and heating or electroreduction.

2.2.1. Use of LAB

Traditionally, acidifying, texturizing, proteolytic and aromatic properties, resistance to phages and barrier effects regarding undesirable flora are particularly sought after in LAB. They must however be able to withstand unfavourable conditions met in industrial processes, including oxidating environments. LAB do not have a complete respiratory chain but can survive in the presence of oxygen due to active mechanisms (Condon, 1987). The oxidative stress resistance mechanisms of LAB of technological and probiotic interest have been more particularly studied (Higuchi, Yamamoto, & Kamio, 2000). The ability to reduce the medium contributes to the resistance of LAB to oxidative environments but also the sensory and microbiological quality of fermented products (Riondet, et al., 2000; Urbach, 1995; Vermeulen, Kretzer, Machalitz, Vogel, & Gänzle, 2006). The continuous monitoring of E_h during lactic fermentation, which can be coupled with pH measurement, provides qualitative and quantitative data for the comparison of LAB species or strains, different physiological states (impact of stress, method of cell preparation), and fermentation conditions (matrices, dissolved oxygen concentration, etc.). This will be presented in the following section 2.2.1.1 and 2.2.1.2.

Table 1: Acidifying and reducing capacities of different LAB used in the food industries.

LAB	Food origin	Culture medium	Starting pH, E_h (mV), E_{h7} (mV) ^a	Final pH, E_h (mV), E_{h7} (mV) ^a	References
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Probiotic food	FS-Milk	6.5 , 372, 352	5.8 , 30, -16	
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Probiotic food	FS-Milk	6.5 , 405, 380	5.6 , 15, -20	
<i>Enterococcus durans</i>	Cheese	RS-Milk	NS, 200 to 250, NS	NS, -120 (n=10) ^b , NS	(Brasca, Morandi, Lodi, & Tamburini, 2007)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cheese	RS-Milk	NS, 200 to 250, NS	NS, -221 (n=10) ^b , NS	(Brasca, et al., 2007)
<i>Enterococcus faecium</i>	Cheese	RS-Milk	NS, 200 to 250, NS	NS, -138 (n=10) ^b , NS	(Brasca, et al., 2007)
<i>Lactobacillus brevis</i>	Probiotic food	S-Milk	6.5 , 252, 233	3.9 , -85, -207	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Yoghurt Cheese	S-Milk RS-Milk	6.5 , 233, 215 NS, 200 to 250, NS	3.2 , 30, -122 NS, 54 (n=9) ^b , NS	(Brasca, et al., 2007)
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Cheese Cheese	S-Milk RS-Milk	6.5 , 233, 215 NS, 200 to 250, NS	3.4 , 83, -60 (n=5) ^b NS, 54 (n=8) ^b , NS	(Brasca, et al., 2007)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Cheese Delicatessen Bakery product	RS-Milk MRS* Buckwheat dough	NS, 200 to 250, NS 6.0 , 220, 190 6.5 , 372, 345	NS, -154 (n=5) ^b , NS 5.1 , -60, -117 3.9 , 256, 89	(Brasca, et al., 2007) (Capuani, Behr, & Vogel, 2012)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Probiotic food Probiotic food	RS-Milk MRS	6.5 , 320, 300 6.5 , 190, 175	4.0 , -80, -200 4.7 , -110, -202	
<i>Lactobacillus sakei</i>	Bakery product Delicatessen	Buckwheat dough MRS*	6.5 , 313, 286 6.0 , 220, 190	4.0 , 267, 105 5.1 , -53, -110	(Capuani, et al., 2012)
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Cheese	RS-Milk	NS, 200 to 250, NS	NS, -169 (n=10) ^b , NS	(Brasca, et al., 2007)
<i>Lactococcus</i> sp.	Cheese Cheese Cheese Cheese Cheese	S-Milk S-Milk MRS RS-Milk S-Milk	6.5 , 233, 215 6.5 , 233, 215 6.5 , 198, 183 NS, 200 to 250, NS 6.5 , 233, 215	4.4 , -114, -213 4.4 , -117, -216 (n=9) ^b 4.5 , -138, -213 (n=3) ^b NS, -162 (n=10) ^b , NS 5.4 , -144, -207 (n=8) ^b	(Cachon, Jeanson, Aldarf, & Divies, 2002) (Michelon, et al., 2010) (Brasca, et al., 2007) (Cachon, et al., 2002)
<i>Lactococcus</i> sp. protease ⁻ Commercial mixed starter	Cheese Cheese	S-Milk S-Milk	6.4 , 315, 293	4.5 , -133, -229	
<i>Leuconostoc</i> sp.	Cheese	S-Milk	6.5 , 233, 215	5.8 , 120, 72 (n=13) ^b	
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Cheese Bakery product Delicatessen	RS-Milk Buckwheat dough MRS*	NS, 200 to 250, NS 6.6 , 331, 310 6.0 , 220, 190	NS, 59 (n=6) ^b , NS 4.5 , 317, 182 5.4 , -20, -68	(Brasca, et al., 2007) (Capuani, et al., 2012)
<i>Staphylococcus xylosum</i>	Delicatessen	MRS*	6.0 , 220, 190	5.9 , -40, -73	
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Delicatessen	MRS*	6.0 , 220, 190	5.8 , -21, -57	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Cheese, Yoghurt	S-Milk RS-Milk	6.5 , 233, 215 200 to 250	4.7 , 0, -93 (n=6) ^b NS, 8 (n=10) ^b , NS	(Brasca, et al., 2007)
<i>Weissella cibaria</i>	Bakery product	Buckwheat dough	6.5 , 359, 332	4.1 , 187, 30	(Capuani, et al., 2012)

^a $E_{h7} = E_h$ at pH 7 calculated by applying the Leistner and Mirna equation (Leistner & Mirna, 1959), E_{h7} calculation allows to overcome pH dependency (Cachon, et al., 2002).

^b average values obtained with n different strains.

FS-Milk=Fortified Skimmed Milk; RS-Milk=Reconstituted Skimmed Milk; S-Milk=Skimmed Milk; MRS=de Man Rogosa and Sharpe medium (De Man, Rogosa, & Sharpe, 1960);

MRS*=modified MRS medium whose salts have been replaced by 4.1 % NaCl, 23 % tryptone, and 0,6 % KNO₃. NS = value Not Specified in the bibliographic reference.

In the Refences column, rows without references are personal data.

2.2.1.1. LAB diversity

Table 1 shows a broad overview of the reducing capacity of LAB. Species such as *Streptococcus thermophilus* are very weak reductants, contrary to *Lactococcus* sp. or *Lactobacillus plantarum*. The reducing capacity of the latter two species actively contributes to the reducing E_h found in the center of some cheeses (Abraham, 2007; Aubert, et al., 2002; Topcu, et al., 2008). Cachon *et al.* (2002) proposed to characterise the reducing capacity in the same way as the acidifying capacity. Characteristic kinetic parameters such as maximal speed (V_m^r , V_m^a), the time required to reach maximal speed (T_m^r , T_m^a) and pH in the same time (pH_m^r , pH_m^a), are calculated from the reduction and acidification kinetics. Interspecies differences can thus be characterised better. Commercial cocktails used for manufacturing fresh cheese, soft cheese, blue cheese and for milk maturation have shown T_m^r varying from 1 to 8 hrs (Aubert, et al., 2002).

2.2.1.2. Mechanisms involved in LAB reducing activity

The mechanisms involved in the reducing activity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* have recently been proposed (Figure 1) which include reduction mechanisms of oxidising compounds in the medium, such as oxygen, and mechanisms responsible for the stabilisation of the reducing E_h in an anaerobic environment (Michelon, et al., 2010; Michelon, et al., 2013; Tachon, et al., 2009). Menaquinones and NADH dehydrogenases NoxE, NoxA and NoxB are involved in the reduction of an aerobic medium (Tachon, et al., 2009). Proteins in the cell envelope exposing exofacial thiol groups could be the cause of the reducing E_h measured at anaerobic medium condition (Michelon, et al., 2010).

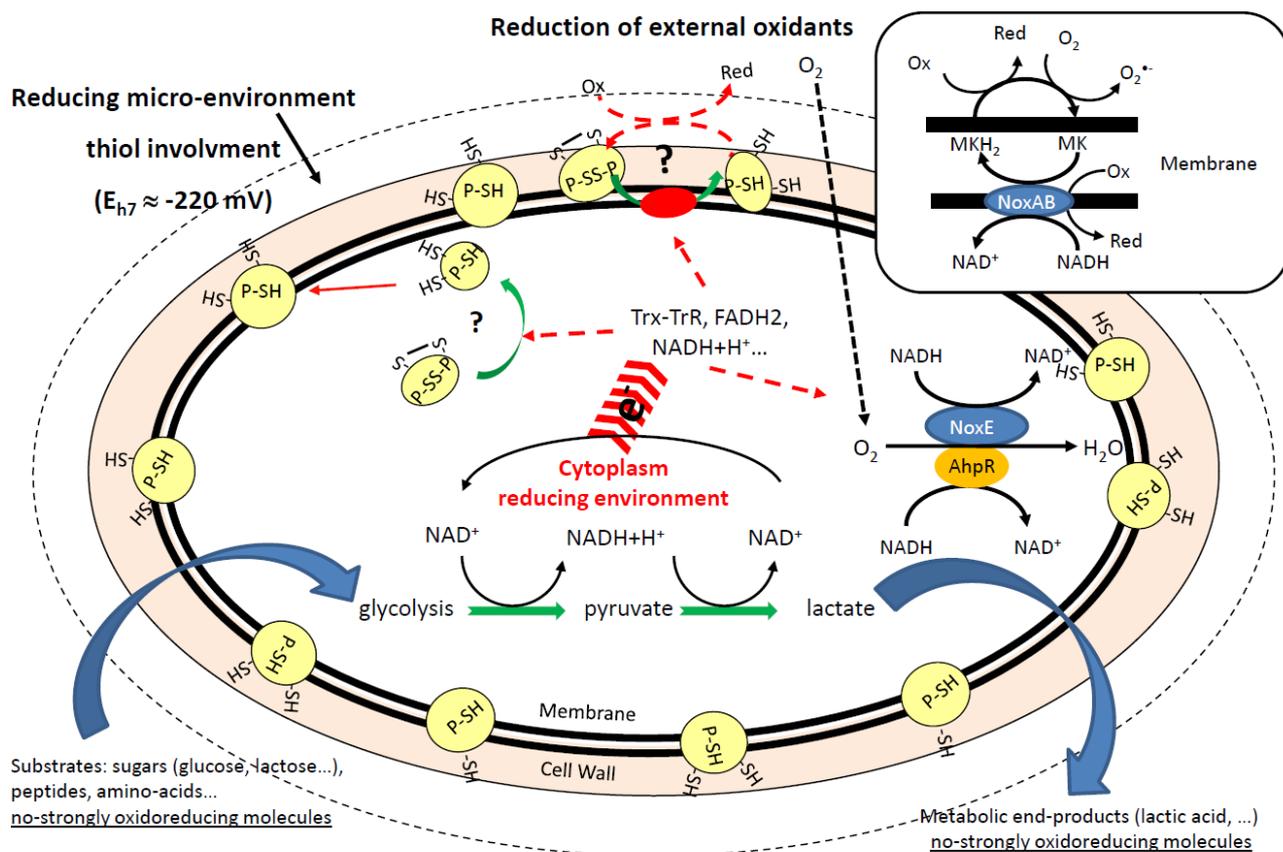


Figure 1: Summary diagram of the cell functions involved in the reducing activity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. P-SH, proteins-thiols; P-SSP, oxidated proteins-thiols; Trx-TrxR, thioredoxin-thioredoxin reductase system; NoxAB, NADH membrane dehydrogenases NoxA and NoxB; NoxE, NADH oxydase; AhpR, alkyl hydroperoxide reductase complex; Ox, oxide compound; Red, reduced compound; MK, oxidated menaquinone; MKH2, reduced menaquinone; ?, hypothesis (Michelon, et al., 2010; Tachon, et al., 2009).

2.2.2. Use of redox molecules

Few molecules are authorised in the food industry. Dave and Shah (1997a, 1997b) used ascorbic acid or cysteine to lower the E_h of a milk used to manufacture yoghurts. Moreton (1998) also added ascorbic acid to stabilize the E_h of a fermented milk during preservation. In dough proofing, ascorbic acid is added to act on the equilibrium between the sulphhydryl / disulphide forms of cysteine residues of gluten proteins (Grosch & Wieser, 1999).

2.2.3. Use of nitrogen and hydrogen

Dissolved oxygen content can traditionally be decreased using a vacuum; pure nitrogen or a gas mixture (nitrogen/hydrogen) can also be injected into the medium or the product headspace. The major advantage of these gases is their innocuousness with regard to the products and their authorised use in the food industry. They are also odourless and tasteless and it is possible to work

with pure gases or mixtures and they can be used sequentially in a process. Cachon *et al.* (2001; 2002) proposed a method of reducing E_h using a flow of a mixture of nitrogen and hydrogen (96%/4%). An E_h of -286 mV was thus attained in milk, compared with +220 mV obtained with pure nitrogen. This modification can be achieved by bubbling in a vat, or using gas-liquid exchangers optimized in relation to the volumes to be treated and to prevent foaming (Jallais & Ibarra, 2009).

2.2.4. Heating and electroreduction

Autoclave sterilisation decreases E_h by nearly 150 mV in media like TSB and is essentially due to the production of antioxidant compounds resulting from the Maillard reaction (Riondet, 1999). Heat treatments also promote the elimination of dissolved oxygen (of which the solubility decreases as the temperature increases) and the formation of reducing sulphur groups (Greenbank & Wright, 1951; Moreton, 1998).

Electroreduction is a physical treatment that consists in reducing an aqueous solution (milk, water...) using electrolysis (Figure 2). The electrolytic cell is made up of two compartments separated by an ion exchange membrane. The liquid being treated circulates in the compartment containing the cathode and the reactive compounds are converted into their reduced forms by electroreduction (Bazinet, Lamarche, Boulet, & Amiot, 1997; Bolduc, Raymond, et al., 2006). Electroreduction decreases E_h and the concentration of dissolved oxygen in milk (Bolduc, Bazinet, et al., 2006), but the process requires optimization because the reducing E_h obtained by electroreduction is not stable over time. After 4 days of conservation, E_h is again positive (Schreyer, Britten, Chapuzet, Lessard, & Bazinet, 2008).

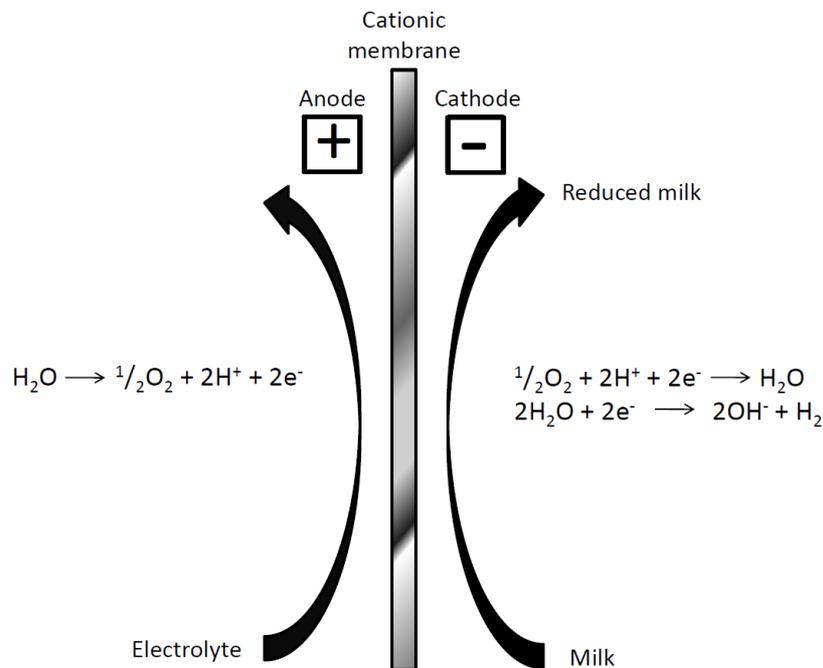


Figure 2: Simplified diagram of an electrolytic cell.

3. Physiological adaptation of LAB to external E_h

The bacteria cell exchanges electrons with the external medium via redox mechanisms or redox compounds, so any variation in extracellular E_h is likely to affect the intracellular redox equilibrium and consequently the related metabolic reactions.

3.1. Oxidative media

LAB can reduce the oxygen in the medium to water thus eliminating this inhibitory molecule; this reaction consumes NADH and modifies the redox equilibrium by decreasing the availability of NADH for other re-oxidation pathways. Mixed fermentation products of *Lactococci* are modified (Neves, Pool, Kok, Kuipers, & Santos, 2005), and a reorientation of the metabolic fluxes to the production of acetic acid is observed in heterofermentative lactic acid bacteria such as *Leuconostocs*, with an increase in biomass in the two microorganisms linked to the increase in ATP production in the acetate kinase pathway. The production of carbonyl compounds from citrates, of which diacetyl (characteristic aroma of certain fermented milk products), requires an oxidising medium. Alpha-acetolactate is converted into diacetyl by oxidative decarboxylation (Jönsson & Pettersson, 1977; Monnet, Schmitt, & Divies, 1994). Kieronczyk *et al.* (2006) have recently shown a clear influence of E_h on amino acid catabolism (phenylalanine, leucine, methionine) in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. The production of aldehydes and volatile sulphur compounds is favoured by oxidising conditions and is mainly the result of chemical oxidation of the α -keto acids produced by amino acid transamination. Conversely, carboxylic acid synthesis (phenylacetic, methylthiopropionic and isovaleric acids) is promoted by reducing conditions. Afzal *et al.* (2013) recently demonstrated the effect of different dissolved oxygen concentrations on the intracellular biosynthesis of 3-methylbutanal from leucine catabolism in *Carnobacterium maltaromaticum*, a LAB retrieved from meat and cheeses. This was attributed to the simultaneous activation and stimulation of both the α -ketoacid decarboxylase and the α -ketoacid dehydrogenase pathways. At membrane level, an oxidising environment can lead to lipid peroxidation. This chain reaction results in the formation of compounds such as aldehydes, unsaturated fatty acids, alkanes, ketones and epoxides, with shorter carbon chains thus increasing membrane fluidity (Hauville, Remita, Therond, Jore, & Gardes-Albert, 2001). This fluidification can affect membrane transport by increasing permeability to H^+ ions inducing a decrease in internal pH thus destroying the ΔpH and therefore the proton motive force and associated ATPase activities (Miyoshi, *et al.*, 2003).

3.2. Reducing media

Reducing conditions affect membrane fluidity and surface properties of bacteria. Ouvry *et al.* (2002) highlighted in *Lactobacillus plantarum* an attenuation of the redox effect on the growth and activation of ATPase activity at 10°C in comparison with 37°C. At 37°C, a stiffening of the cell membrane and a difference in growth are observed in reducing conditions. Furthermore, this

stiffness is maintained throughout growth in reducing conditions. This indicates that the E_h of the medium can influence the synthesis of fatty acids and/or membrane proteins. If the E_h leads to an increase in membrane proteins, the membrane protein / lipid ratio can increase and maintain membrane rigidity. Moreover, *Lactobacillus plantarum* is a weaker electron donor and a stronger electron acceptor at -400 mV than at +250 mV and in stationary phase; the cells are clearly more hydrophilic in reducing conditions. The surface properties are directly linked to the composition of the cell envelope. The presence of $-\text{COO}^-$ and $-\text{HSO}_3^-$ groups could therefore be the cause of this electron donor characteristic and modifications in the teichoic acid content could affect the hydrophobicity. In *Escherichia coli* (Riondet, Cachon, Waché, Alcaraz, & Diviès, 1999) or *Saccharomyces carlsbergensis* (Petrov, Smirnova, & Okorokov, 1992), the decrease in E_h could modify the oxidoreductive equilibrium of the thiol functions of membrane proteins, leading to the permeabilization of the membrane to protons. However, Waché *et al.* (2002) did not observe any modification in the internal pH and the ΔpH in a strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* grown in acidic medium with dithiothreitol. These initial results underline the microbial biodiversity regarding redox.

4. Applications in food processes

4.1. Growth and viability of LAB

The sensitivity of LAB strains (technological starters or probiotics) to oxidative stress mainly generated by oxygen incorporation is a major problem (Yamamoto, Gaudu, & Gruss, 2011). Altering the expression of genes coding key proteins involved in intracellular redox is a solution to improve antioxidative properties of LAB (Zhang & Li, 2012). However, it is crucial that such modified lactic acid bacteria are recognized as safe for consumption. Extracellular E_h can be controlled or modified using chemical additives, but these are negatively perceived by consumers and remain strictly regulated. The addition of whey proteins and cysteine has been used to decrease E_h to values below -121 mV (Dave & Shah, 1997a, 1998). Ascorbic acid has also been used to protect probiotics from oxygen and increase the nutritional value of fermented milk (Dave & Shah, 1997b, 1998). However, only the use of cysteine enables a negative redox potential to be conserved during product storage (Dave & Shah, 1997a) as ascorbic acid is rapidly oxidised in the containers used (Dave & Shah, 1997b). In addition, the use of cysteine or ascorbic acid for making starters has a negative impact on the organoleptic properties of fermented milk (Talwalkar & Kailasapathy, 2004). Electroreduction is another avenue to be envisaged which enables E_h to be decreased without affecting the organoleptic and nutritional qualities of milk, and this with no addition of chemicals (Schreyer, 2007). A positive impact on the viability/survival of probiotic strains has also been observed (Bolduc, Raymond, et al., 2006). Cruz et al. (2012, 2013) proposed the use of glucose oxidase coupled with low oxygen permeability packaging systems to minimize oxidative stress in fermented milk containing probiotics. Finally, to increase the viability/survival of probiotics in

products, an alternative method to those described previously consists in using gas. Bubbling with nitrogen or a mixture of nitrogen and hydrogen has a positive effect on the survival of *Bifidobacterium bifidum* in fermented milk during storage (Ebel, et al., 2011). Furthermore, the use of gas has no impact on the manufacturing time or the viability and survival of the starters. The improvement in the survival of LAB by modification of E_h can also be considered in dry products. Indeed, Cachon *et al.* (2006) have shown that reducing culture conditions obtained using a reducing gas (N_2-H_2) favour the viability of freeze-dried *Lactobacillus rhamnosus* bacteria (Table 2). More recently, authors have shown the beneficial role of cysteine on the survival of atomised probiotics during storage (Rodrigues, et al., 2011). The latter result is however strain-specific; of the three strains tested only the survival of the *Lactobacillus acidophilus* strain was improved by the presence of cysteine.

Table 2: Effect of gaseous conditions during culture on the survival of a lyophilized probiotic lactic acid bacterium, *Lactobacillus rhamnosus*, conserved at room temperature.

Culture conditions	VPC after 1 day	VPC after 2 months	VPC after 7 months	VPC after 19 months
Standard - $E_{hi}=+320$ mV	$8.83^a \pm 0.07$	$7.08^a \pm 0.13$	$6.76^a \pm 0.05$	$6.04^a \pm 0.14$
N_2 (100 %) - $E_{hi}=+220$ mV	$8.93^b \pm 0.02$	$7.34^b \pm 0.08$	$6.95^b \pm 0.24$	$6.30^b \pm 0.14$
N_2 (96%) / H_2 (4%) - $E_{hi}=-286$ mV	$9.00^c \pm 0.08$	$7.60^c \pm 0.07$	$7.28^c \pm 0.04$	$6.63^c \pm 0.11$

$E_{hi}=E_h$ at the beginning of the culture.

VPC = Viable Plate Counts (log CFU/g lyophilized powder), n=3.

Same superscript letters within a column indicate that groups were not significantly different at 5% α risk (ANOVA).

Lactic flora can also spoil food leading to various changes (acidification, production of off-flavour and gas, slime formation) in desserts, retail food products, juices and sauces. For products packaged under modified atmosphere, the partial or complete exclusion of oxygen inhibits the proliferation of Gram negative bacteria whilst favouring the growth of Gram positive bacteria such as lactic acid bacteria. Ouvry *et al.* (2002) showed the effect of a reducing E_h obtained using hydrogen gas combined with common inhibitory factors (NaCl, acetic acid and temperature) on the slowdown of growth and acidification. The combination of E_h and heat stress has also been studied for slowing the growth of microorganisms (Riondet, et al., 2000), and has been applied in the field of pasteurized orange juice (Alwazeer, Cachon, & Divies, 2002; Alwazeer, Delbeau, Divies, & Cachon, 2003). In both cases the contaminant was *Lactobacillus plantarum*.

4.2. Manufacture of fermented milk products

Milk E_h is generally above 150 mV at pH 6.5-6.7 (table 1). In raw milk, E_h is governed by the quantity of dissolved oxygen, but also by molecules naturally present in milk such ascorbic acid, riboflavin, iron, copper, thiol groups and phenolic compounds (Abraham, 2007; Walstra, Wouters,

& T.J., 2006). If heat treatment is applied to milk before cheese making, milk E_h decreases (McSweeney, Caldeo, Topcu, & Cooke, 2010). The E_h is much lower in cheese than in milk; values reported in the literature are from -259 mV to -360 mV for Camembert (Abraham, et al., 2007; Aubert, et al., 2002), from -118 mV to -270 mV for Cheddar (Green & Manning, 1982; Topcu, et al., 2008), -156 mV for Comté (Aubert, et al., 2002), and from -270 mV to -300 mV for Emmental (Langeveld & Galesloot, 1971). Recently, Caldeo and McSweeney (2012) studied changes in redox potential (E_h) during the simulated cheesemaking of Cheddar, Gouda, Emmental and Camembert cheeses; cheeses were obtained from 4 L of milk. At the end of manufacturing process (beginning of ripening), they measured E_h values of -117 mV, -118mV, +230mV and -115mV for Cheddar-type, Gouda-type, Emmental-type and Camembert-type, respectively. Green and Manning (1982) observed that the decrease in redox in cheese was due to lactic starters. A cheddar-type cheese manufactured with only δ -glucono-lactone to acidify had an E_h of +315 mV whereas in cheddar made with lactic acid bacteria (*Lactococci*) it is normally -150 mV to -200 mV. In the case of Cheddar, the stabilisation of the redox measurement is long, approximately 48 hours, contrary to Camembert which is between 10 minutes and 1 hour (Abraham, et al., 2007; Topcu, et al., 2008). However, according to McSweeney *et al.* (2010), this measurement is more rapid in Cheddar by introducing miniature electrodes in the cheese during moulding and pressing. The evolution of the redox potential depends on the cheese manufacturing process implemented and the lactic starters used. In the manufacturing of a semi-hard cheese, Abraham (Abraham, 2007) has shown that during renneting, mixing, coagulum cutting and lactose removal phases, the medium remains oxidising due to persistent levels of dissolved oxygen between 20% and 60%, then progressively becomes reducing during pressing when no oxygen is incorporated thus allowing the lactic acid bacteria to express their reducing activity. It thus seems possible to modulate E_h during cheese manufacturing via the action of LAB. Gas or reducing molecules (cysteine and ascorbic acid) can also be used, like those used in the manufacturing of fermented milk/yoghurt and cheese (Dave & Shah, 1997a, 1997b; Ebel, et al., 2011; Ledon & Ibarra, 2006; Martin, et al., 2011; Martin, et al., 2010). Martin et al. (2009, 2010, 2011) studied the effects of E_h on yoghurts made under various gaseous conditions. The milk prepared under air was an oxidizing medium. Nitrogen, which is a neutral gas, can be used to remove oxygen from milk - even so the milk E_h remained oxidizing in these conditions - and hydrogen gave a reducing E_h (below 0). These studies focused on the effect of gas bubbling on gel structures through viscoelastic properties, the measurement of whey separation and production of aroma compounds by *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* (Table 3).

Table 3: Characteristics of the yoghurt gel structure depending on the different E_h conditions (Martin et al. 2009, 2010, 2011). Apparent viscosity η at 500 1/s of yoghurts at pH = 4.6 and 4°C (measurements were made 24 hours after addition of starter culture). Evolution of the average whey separation (WS) over 28 days in yoghurts.

Gaseous conditions applied to milk	pH		E_{h7} (mV)		η (Pa.s)	WS (g/100g of yoghurt)
	At t= 0 hours	At t= 3.5 hours	At t= 0 hours	At t= 3.5 hours		
Air	6.80 ^a ± 0.0	4.6 ^a ± 0.0	425 ^a ± 20	171 ^a ± 2	0.046 ^a ± 0.00	1.98 ^a ± 0.54
Bubbled air	6.80 ^a ± 0.0	4.6 ^a ± 0.0	435 ^a ± 3	241 ^a ± 8	0.046 ^a ± 0.00	1.76 ^a ± 0.31
Bubbled N ₂	6.81 ^a ± 0.0	4.6 ^a ± 0.0	285 ^b ± 11	139 ^b ± 5	0.035 ^b ± 0.00	1.03 ^{ab} ± 0.27
Bubbled N ₂ - H ₂	6.81 ^a ± 0.0	4.6 ^a ± 0.0	-345 ^c ± 4	-309 ^c ± 10	0.021 ^c ± 0.01	0.59 ^b ± 0.12

Values are means from triplicate experiments.

Same superscript letters within a column indicate that groups were not significantly different at 5% α risk (ANOVA).

Yoghurts produced under air and under bubbled air have the highest apparent viscosity. The apparent viscosity of yoghurt made under bubbled N₂ was lower (0.035 Pa.s) than other oxidizing conditions (0.046 Pa.s), whereas values obtained under bubbled N₂ - H₂ were the lowest (0.021 Pa.s). Apparent viscosity of GDL-gels was also clearly affected by the gas type. A reducing environment reduces apparent viscosity of yoghurt. Whey separation of yoghurts occurred from the very first day of storage and the volume of whey separation was almost constant during the 28 days of storage. The highest whey separation was obtained for yoghurt made under air and bubbled air. Whey separation was lower for yoghurts prepared under bubbled N₂ (1.03 g / 100 g) and N₂ - H₂ (0.59 g / 100 g). So, the more reducing the environment, the lower the whey separation. Adjusting the E_h of milk under reducing conditions (under N₂ - H₂) could be a possible way of significantly decreasing the phenomenon of whey separation. The impact of these different E_h on the biosynthesis of acetaldehyde, dimethyl sulphide, diacetyl and pentane-2,3-dione by bacteria in yoghurts was studied. The analyses of the amount of the four aroma compounds produced during 28 days of storage showed that acetaldehyde and diacetyl concentrations were significantly higher in yoghurts made under bubbled air compared to standard yoghurts. The concentration of dimethyl sulphide was significantly lower and that of pentane-2,3-dione was the same. Under bubbled N₂ the acetaldehyde concentration was similar to that of yoghurts made under bubbled air whereas the concentration of dimethyl sulphide was lower. The concentration of diacetyl was the same as in standard yoghurts and the concentration of pentane-2,3-dione was not significantly different from that of yoghurts made under air (bubbled or not). So, oxidative E_h conditions clearly increased the production of these four aroma compounds in yoghurts. These results are consistent with the literature. Indeed, (Kieronczyk, et al., 2006) showed that oxidative conditions stimulated the production of volatile sulphur compounds such as dimethyl sulphide and aldehydes such as acetaldehyde. In the presence of oxygen, oxidative decarboxylation of 2-acetolactate and 2-aceto-hydroxybutyrate to diacetyl and pentane-2,3-dione respectively was also favoured (Boumerdassi, Desmazeaud, Monnet, Boquien, & Corrieu, 1996; Hugenholtz & Kleerebezem, 1999; Monnet, et

al., 1994; Neijssel, Snoep, & Teixeira de Mattos, 1997). The result obtained for diacetyl can be explained by the fact that in anaerobic conditions lactic acid bacteria dehydrogenate the NADH produced during glycolysis via lactate dehydrogenase (LDH) activity. Boumerdassi et al. (1996) showed that oxygen increases NADH oxidase activity (Condon, 1987), which causes NADH re-oxidation to the detriment of LDH, butanediol dehydrogenase and acetoin dehydrogenase activity (Bassit, Boquien, Picque, & Corrieu, 1993). Then, excess pyruvate is partially eliminated through acetolactate production, which increases diacetyl production (Boumerdassi, et al., 1996). Finally, for yoghurts made under bubbled $N_2 - H_2$ (reducing conditions), acetaldehyde and pentane-2,3-dione concentrations were the same as in yoghurts prepared under ambient air. The concentration of dimethyl sulphide was the same as in yoghurts made under N_2 and the concentration of diacetyl was significantly lower than under the other three E_h conditions. So, controlling the redox in cheese is primordial as the aromatic characteristics are closely linked to this parameter. Green & Manning (1982) and Kristoffersen (1985) have shown that a negative redox is essential for the good development of the characteristic flavour of certain fermented milk products such as cheese, notably via the production of thiol compounds. In addition, Ledon & Ibarra (2006) improved the sensory properties, notably through the increased production of volatile fatty acids, by ripening the cheese under a reducing atmosphere. Finally, according to Beresford *et al.* (2001), redox acts as a selective agent for bacterial growth; the heart of the cheese is considered as an anaerobic medium (which varies according to the size of the cheese) promoting the growth of strict or facultative anaerobic bacteria.

5. Conclusion

Modifying the E_h of a food product can involve the reducing activity of starters, the injection of gas (nitrogen, hydrogen), the product formulation with the addition of molecules (cysteine, ascorbic acid), or a technological treatment (heat treatment, electroreduction). The reduction by LAB and use of gas have a significant impact on the E_h of the medium and are the most suitable for food use. The increased knowledge of the mechanisms involved in the reducing activity of LAB enables new applications to be envisaged to control E_h in food matrices. Gas acts directly on the physico-chemical properties of the medium interacting with lactic starters with an impact on the microbiological, nutritional and sensory properties of food products. The use of neutral gases or reducers in food processes thus presents vast innovation potential.

Acknowledgements

This work was partly supported by a research grant from ANR (project Food-Redox), program supported by Vitagora (Dijon, France) and Valorial (Rennes, France). The thesis of Celia Roussel was supported by ANR research Food-Redox grant. The thesis of Damien Michelin was supported by EUREKA research grant (Σ13562-Labredox). The thesis of Bruno Ebel was supported by research grants from Senoble (Jouy, France), the ANRT (Paris, France) and the FUI Probiotique, program supported by Vitagora. The thesis of Florence Martin-Dejardin was supported by a grant from the French government.

References

- Abraham, S. (2007). *Evolution du potentiel d'oxydoréduction dans le lait au cours de la transformation fromagère : Impact des composants intrinsèques et des bactéries lactiques*. University of Burgundy, Dijon, France.
- Abraham, S., Cachon, R., Colas, B., Feron, G., & DeConinck, J. (2007). E_h and pH gradients in camembert cheese during ripening: Measurements using microelectrodes and correlations with texture. *International Dairy Journal*, 17, 954-960.
- Afzal, M. I., Boulahya, K. A., Paris, C., Delaunay, S., & Cailliez-Grimal, C. (2013). Effect of oxygen on the biosynthesis of flavor compound 3-methylbutanal from leucine catabolism during batch culture in *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28. *Journal of Dairy Science*, 96, 352-359.
- Alwazeer, D., Cachon, R., & Divies, C. (2002). Behavior of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* in fresh and thermally processed orange juice. *J. Food Protect.*, 65, 1586-1589.
- Alwazeer, D., Delbeau, C., Divies, C., & Cachon, R. (2003). Use of redox potential modification by gas improves microbial quality, color retention, and ascorbic acid stability of pasteurized orange juice. *International Journal of Food Microbiology*, 89, 21-29.
- Aubert, C., Capelle, N., Jeanson, S., Eckert, H., Diviès, C., & Cachon, R. (2002). Le potentiel d'oxydo-réduction et sa prise en compte dans les procédés d'utilisation des bactéries lactiques. *Science des Aliments*, 22, 177-187.
- Bassit, N. m., Boquien, C.-Y., Picque, D., & Corrieu, G. (1993). Effect of Initial Oxygen Concentration on Diacetyl and Acetoin Production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1893-1897.
- Bazinet, L., Lamarche, F., Boulet, M., & Amiot, J. (1997). Combined Effect of pH and Temperature during Electroreduction of Whey Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 101-107.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. M., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259-274.
- Bolduc, M.-P., Bazinet, L., Lessard, J., Chapuzet, J.-M., & Vuilleumard, J.-C. (2006). Electrochemical modification of the redox potential of pasteurized milk and Its evolution during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4651-4657.
- Bolduc, M.-P., Raymond, Y., Fustier, P., Champagne, C. P., & Vuilleumard, J.-C. (2006). Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk. *International Dairy Journal*, 16, 1038-1048.
- Boumerdassi, H., Desmazeaud, M., Monnet, C., Boquien, C. Y., & Corrieu, G. (1996). Improvement of Diacetyl Production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 483 Through Oxygen Control. *Journal of Dairy Science*, 79, 775-781.
- Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., & Tamburini, A. (2007). Redox potential to discriminate among species of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1516-1524.
- Cachon, R., Capelle, N., Diviès, C., & Prost, L. (2001). *Method for culturing micro-organisms in reducing conditions obtained by a gas stream*. Patent # WO0202748, L'Air Liquide,
- Cachon, R., Delbeau, C., Feron, G., & Ledon, H. (2006). *Method of modifying the viability of a lyophilized microorganism by treating the growth medium thereof with gases*. Patent # WO2006090078, L'Air Liquide,
- Cachon, R., Diviès, C., Jeannot, P., & Prost, L. (2002). *Method for processing perishable products under modified atmosphere containing hydrogen and resulting packaged products*. Patent # WO0202409, L'Air Liquide, France.

- Cachon, R., Jeanson, S., Aldarf, M., & Divies, C. (2002). Characterisation of lactic starters based on acidification and reduction activities. *Lait*, 82, 281-288.
- Caldeo, V., & McSweeney, P. L. H. (2012). Changes in oxidation-reduction potential during the simulated manufacture of different cheese varieties. *International Dairy Journal*, 25, 16-20.
- Clark, W. M. (1960). *Oxidation-reduction potentials of organic systems*. Baltimore, USA: Waverly press.
- Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Letters*, 46, 269-280.
- Cruz, A. G., Castro, W. F., Faria, J. A. F., Bolini, H. M. A., Celeghini, R. M. S., Raices, R. S. L., Oliveira, C. A. F., Freitas, M. Q., Conte Júnior, C. A., & Mársico, E. T. (2013). Stability of probiotic yogurt added with glucose oxidase in plastic materials with different permeability oxygen rates during the refrigerated storage. *Food Research International*, 51, 723-728.
- Cruz, A. G., Castro, W. F., Faria, J. A. F., Lollo, P. C. B., Amaya-Farfán, J., Freitas, M. Q., Rodrigues, D., Oliveira, C. A. F., & Godoy, H. T. (2012). Probiotic yogurts manufactured with increased glucose oxidase levels: Postacidification, proteolytic patterns, survival of probiotic microorganisms, production of organic acid and aroma compounds. *Journal of Dairy Science*, 95, 2261-2269.
- Dave, R. I., & Shah, N. P. (1997a). Effect of cysteine on the viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, 7, 537-545.
- Dave, R. I., & Shah, N. P. (1997b). Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, 7(6-7), 435-443.
- Dave, R. I., & Shah, N. P. (1998). Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *Journal of Dairy Science*, 81, 2804-2816.
- Ebel, B., Martin, F., Le, L. D. T., Gervais, P., & Cachon, R. (2011). Use of gases to improve survival of *Bifidobacterium bifidum* by modifying redox potential in fermented milk. *Journal of Dairy Science*, 94, 2185-2191.
- Galster, H. (2000). Techniques of measurement, electrode processes and electrode treatment. In J. Schüring, H. D. Schultz, W. R. Fischer, J. Böttcher & W. H. M. Duijnisveld (Eds.), *Redox: fundamentals, processes and applications* (pp. 13-23). Berlin: Springer-Verlag.
- Green, M. L., & Manning, D. J. (1982). Development of texture and flavour in cheese and other fermented products. *Journal of Dairy Research*, 49, 737-748.
- Greenbank, G. R., & Wright, P. A. (1951). The Deaeration of Raw Whole Milk before Heat Treatment as a Factor in Retarding the Development of the Tallowy Flavor in its Dried Product. *Journal of Dairy Science*, 34, 815-818.
- Grosch, W., & Wieser, H. (1999). Redox Reactions in Wheat Dough as Affected by Ascorbic Acid. *Journal of Cereal Science*, 29, 1-16.
- Hauville, C., Remita, S., Therond, P., Jore, D., & Gardes-Albert, M. (2001). Radiation induced peroxidation of polyunsaturated fatty acids: Recent results on formation of hydroperoxides. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 79, 176-179.
- Higuchi, M., Yamamoto, Y., & Kamio, Y. (2000). Molecular biology of oxygen tolerance in lactic acid bacteria: Functions of NADH oxidases and Dpr in oxidative stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90, 484-493.
- Hugenholtz, J., & Kleerebezem, M. (1999). Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 492-497.
- Jallais, S., & Ibarra, D. (2009). *Method of Lowering the Redox Potential of a Liquid by Injection of a Gas While Preventing Foaming*. Patent # US2009291177, L'Air Liquide, France.

- Jönsson, H., & Pettersson, H. (1977). Studies on the citric acid fermentation in lactic starter cultures with special interest in alpha-aceto-lactic acid. Metabolic studies. *Milchwissenschaft*, *32*, 587-594.
- Kieronczyk, A., Cachon, R., Feron, G., & Yvon, M. (2006). Addition of oxidizing or reducing agents to the reaction medium influences amino acid conversion to aroma compounds by *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, *101*, 1114-1122.
- Kristoffersen, T. (1985). Development of flavor in cheese. *Milchwissenschaft*, *40*, 197-199.
- Langeveld, L. P. M., & Galesloot, T. E. (1971). Estimation of the oxidation-reduction potential as an aid in tracing the cause of excessive openness in cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, *25*, 15-23.
- Ledon, H., & Ibarra, D. (2006). *Method for modifying hygienic, physico-chemical and sensory properties of cheese by controlling the redox potential*. Patent # WO2006106252, L'Air Liquide, France.
- Martin, F., Cachon, R., Pernin, K., De Coninck, J., Gervais, P., Guichard, E., & Cayot, N. (2011). Effect of oxidoreduction potential on aroma biosynthesis by lactic acid bacteria in nonfat yogurt. *Journal of Dairy Science*, *94*, 614-622.
- Martin, F., Cayot, N., Vergoignan, C., Journaux, L., Gervais, P., & Cachon, R. (2010). Impact of oxidoreduction potential and of gas bubbling on rheological properties of non-fat yoghurt. *Food Research International*, *43*, 218-223.
- McSweeney, P. L. H., Caldeo, V., Topcu, A., & Cooke, D. R. (2010). Ripening of cheese: oxidation-reduction potential and calcium phosphate. *Australian Journal of Dairy Technology*, *65*, 178-184.
- Michelon, D., Abraham, S., Ebel, B., DeConinck, J., Husson, F., Feron, G., Gervais, P., & Cachon, R. (2010). Contribution of exofacial thiol groups in the reducing activity of *Lactococcus ssp. lactis*. *FEBS Journal*, *277*, 2282-2290.
- Michelon, D., Tachon, S., Ebel, B., DeConinck, J., Feron, G., Gervais, P., Yvon, M., & Cachon, R. (2013). Screening of lactic acid bacteria for reducing power using a tetrazolium salt reduction method on milk agar. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *115*, 229-232.
- Miyoshi, A., Rochat, T., Gratadoux, J. J., Le Loir, Y., Oliveira, S. C., Langella, P., & Azevedo, V. (2003). Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. *Genetics and Molecular Research*, *2*, 348-359.
- Monnet, C., Schmitt, P., & Divies, C. (1994). Method for assaying volatile compounds by headspace gas chromatography and application to growing starter cultures. *Journal of Dairy Science*, *77*, 1809-1815.
- Moreton, R. S. (1998). *Fermented milk product*. Patent # WO98/27824, Société des produits Nestlé S.A., Switzerland.
- Neijssel, O. M., Snoep, J. L., & Teixeira de Mattos, M. J. (1997). Regulation of energy source metabolism in streptococci. *Journal of Applied Microbiology*, *83*, 12S-19S.
- Neves, A. R., Pool, W. A., Kok, J., Kuipers, O. P., & Santos, H. (2005). Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* – The input from in vivo NMR. *FEMS Microbiology Review*, *29*, 531-554.
- Ouvry, A., Waché, Y., Tourdot-Maréchal, R., Diviès, C., & Cachon, R. (2002). Effects of oxidoreduction potential combined with acetic acid, NaCl and temperature on the growth, acidification, and membrane properties of *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiology Letters*, *214*, 257-261.
- Petrov, V. V., Smirnova, V. V., & Okorokov, L. A. (1992). Mercaptoethanol and dithiothreitol decrease the difference of electrochemical potentials across the yeast plasma and vacuolar membranes and activate their H⁺-ATPase. *Yeast*, *8*, 589-598.

- Riondet, C. (1999). *Effet du potentiel d'oxydoréduction et du pH sur le métabolisme de Escherichia coli: rôle de ces paramètres sur la force proton motrice, sur la survie au choc thermique et sur l'orientation des flux de carbone*. University of Burgundy, France.
- Riondet, C., Cachon, R., Waché, Y., Alcaraz, G., & Diviès, C. (1999). Changes in the proton-motive force in *Escherichia coli* in response to external oxidoreduction potential. *European Journal of Biochemistry*, 262, 595-599.
- Riondet, C., Cachon, R., Waché, Y., Sunyol i Bert, E., Gbaguidi, P., Alcaraz, G., & Diviès, C. (2000). Combined action of redox potential and pH on heat resistance and growth recovery of sublethally heat-damaged *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 476-479.
- Rodrigues, D., Sousa, S., Rocha-Santos, T., Silva, J. P., Sousa Lobo, J. M., Costa, P., Amaral, M. H., Pintado, M. M., Gomes, A. M., Malcata, F. X., & Freitas, A. C. (2011). Influence of l-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. *International Dairy Journal*, 21, 869-876.
- Schreyer, A. (2007). *Régulation électrochimique du potentiel d'oxydoréduction du lait : Impact des composantes du lait et effet sur sa résistance à l'oxydation après traitement*. Laval University, Québec, Canada.
- Schreyer, A., Britten, M., Chapuzet, J.-M., Lessard, J., & Bazinet, L. (2008). Electrochemical modification of the redox potential of different milk products and its evolution during storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 255-264.
- Sugimoto, S., Abdullah Al, M., & Sonomoto, K. (2008). Molecular Chaperones in Lactic Acid Bacteria: Physiological Consequences and Biochemical Properties. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106, 324-336.
- Tachon, S., Michelon, D., Chambellon, E., Cantonnet, M., Mezange, C., Henno, L., Cachon, R., & Yvon, M. (2009). Experimental conditions affect the site of tetrazolium violet reduction in the electron transport chain of *Lactococcus lactis*. *Microbiology*, 155, 2941-2948.
- Talwalkar, A., & Kailasapathy, K. (2004). The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 5, 1-8.
- Topcu, A., McKinnon, I., & McSweeney, P. (2008). Measurement of the oxidation-reduction potential of cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 73, 198-203.
- Urbach, G. (1995). Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *International Dairy Journal*, 5, 877-903.
- Vermeulen, N., Kretzer, J., Machalitz, H., Vogel, R. F., & Gänzle, M. G. (2006). Influence of redox-reactions catalysed by homo- and hetero-fermentative lactobacilli on gluten in wheat sourdoughs. *Journal of Cereal Science*, 43, 137-143.
- Waché, Y., Riondet, C., Diviès, C., & Cachon, R. (2002). Effect of reducing agents on the acidification capacity and the proton motive force of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* resting cells. *Bioelectrochemistry*, 57, 113-118.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M., & T.J., G. (2006). Milk properties. In T. F. G. CRC Press (Ed.), *Dairy Science and Technology* (2nd ed., pp. 159-174). New-York.
- Yamamoto, Y., Gaudu, P., & Gruss, A. (2011). Oxidative stress and oxygen metabolism in lactic acid bacteria. In S. K. & Y. A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research* (pp. 91-102): Academic Press.
- Zhang, Y., & Li, Y. (2012). Engineering the antioxidative properties of lactic acid bacteria for improving its robustness. *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 1-6.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Alcaraz, G.** 1997. Methode for preparing a long-life pasteurised product, particularly a food product. France.
2. **Alwazeer, D., C. Delbeau, C. Divies, and R. Cachon.** 2003. Use of redox potential modification by gas improves microbial quality, color retention, and ascorbic acid stability of pasteurized orange juice. *Int J Food Microbiol* **89**:21-9.
3. **Andisi, V. F., C. A. Hinojosa, A. de Jong, O. P. Kuipers, C. J. Orihuela, and J. J. Bijlsma.** 2012. Pneumococcal gene complex involved in resistance to extracellular oxidative stress. *Infect Immun* **80**:1037-49.
4. **Archibald, F. S., and I. Fridovich.** 1981. Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* **145**:442-51.
5. **Arnau, J., F. Jorgensen, S. M. Madsen, A. Vrang, and H. Israelsen.** 1998. Cloning of the *Lactococcus lactis* adhE gene, encoding a multifunctional alcohol dehydrogenase, by complementation of a fermentative mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**:3049-55.
6. **Arner, E. S., and A. Holmgren.** 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* **267**:6102-9.
7. **Asad, L. M., D. C. Medeiros, I. Felzenszwalb, A. C. Leitao, and N. R. Asad.** 2000. Participation of stress-inducible systems and enzymes involved in BER and NER in the protection of *Escherichia coli* against cumene hydroperoxide. *Mutat Res* **461**:31-40.
8. **Asad, N. R., L. M. Asad, A. B. Silva, I. Felzenszwalb, and A. C. Leitao.** 1998. Hydrogen peroxide induces protection against lethal effects of cumene hydroperoxide in *Escherichia coli* cells: an Ahp dependent and OxyR independent system? *Mutat Res* **407**:253-9.
9. **Bader, M., W. Muse, D. P. Ballou, C. Gassner, and J. C. Bardwell.** 1999. Oxidative protein folding by the electron transport system. *Cell Calcium* **98**:217-227.
10. **Bagramyan, K., A. Galstyan, and A. Trchounian.** 2000. Redox potential is a determinant in the *Escherichia coli* anaerobic fermentative growth and survival: effects of impermeable oxidant. *Bioelectrochemistry* **51**:151-6.
11. **Banerjee, R., D. Becker, M. Dickman, V. Gladyshev, and S. Ragsdale.** 2008. Redox Biochemistry, Michigan.
12. **Barre, O., F. Mourlane, and M. Solioz.** 2007. Copper Induction of Lactate Oxidase of *Lactococcus lactis*: a Novel Metal Stress Response. *Journal of Bacteriology* **189**:5947-5954.
13. **Beal, C., F. Fonseca, and G. Corrieu.** 2001. Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* is related to membrane fatty acid composition. *J Dairy Sci* **84**:2347-56.
14. **Benisty, R., A. Y. Cohen, A. Feldman, Z. Cohen, and N. Porat.** 2010. Endogenous H₂O₂ produced by *Streptococcus pneumoniae* controls FabF activity. *Biochim Biophys Acta* **1801**:1098-104.
15. **Berridge, M. V., P. M. Herst, and A. S. Tan.** 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* **11**:127-152.
16. **Beyer, N. H., P. Roepstorff, K. Hammer, and M. Kilstrup.** 2003. Proteome analysis of the purine stimulon from *Lactococcus lactis*. *Proteomics* **3**:786-97.
17. **Biswas, I., A. Gruss, S. D. Ehrlich, and E. Maguin.** 1993. High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **175**:3628-35.
18. **Bochner, B. R., and M. A. Savageau.** 1977. Generalized Indicator Plate for Genetic, Metabolic, and Taxonomic Studies with Microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **33**:434-444.
19. **Bolduc, M.-P., Y. Raymond, P. Fustier, C. P. Champagne, and J.-C. Vuilleumard.** 2006. Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk. *International Dairy Journal* **16**:1038-1048.

20. **Bolduc, M. P., L. Bazinet, J. Lessard, J. M. Chapuzet, and J. C. Vuilleumard.** 2006. Electrochemical Modification of the Redox Potential of Pasteurized Milk and Its Evolution during Storage. *J Agric Food Chem* **54**:4651-4657.
21. **Bolotin, A., P. Wincker, S. Mauger, O. Jaillon, K. Malarne, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich, and A. Sorokin.** 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* **11**:731-53.
22. **Bonnarme, P., F. Amarita, E. Chambellon, E. Semon, H. E. Spinnler, and M. Yvon.** 2004. Methylthioacetaldehyde, a possible intermediate metabolite for the production of volatile sulphur compounds from L-methionine by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett* **236**:85-90.
23. **Boronat, S., A. Domenech, E. Paulo, I. A. Calvo, S. Garcia-Santamarina, P. Garcia, J. Encinar Del Dedo, A. Barcons, E. Serrano, M. Carmona, and E. Hidalgo.** 2014. Thiol-based H₂O₂ signalling in microbial systems. *Redox Biol* **2**:395-9.
24. **Brasca, M., S. Morandi, R. Lodi, and A. Tamburini.** 2007. Redox potential to discriminate among species of lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol* **103**:1516-24.
25. **Brinster, S., G. Lamberet, B. Staels, P. Trieu-Cuot, A. Gruss, and C. Poyart.** 2009. Type II fatty acid synthesis is not a suitable antibiotic target for Gram-positive pathogens. *Nature* **458**:83-6.
26. **Brooijmans, R., B. Smit, F. Santos, J. van Riel, W. M. de Vos, and J. Hugenholtz.** 2009. Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories* **8**:28.
27. **Brooijmans, R. J. W., B. Poolman, G. K. Schuurman-Wolters, W. M. de Vos, and J. Hugenholtz.** 2007. Generation of a Membrane Potential by *Lactococcus lactis* through Aerobic Electron Transport. *Journal of Bacteriology* **189**:5203-5209.
28. **Brussow, H.** 2001. Phages of dairy bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**:283-303.
29. **Bühler, and Gaster.** 1980. *Mesure redox : bases and problèmes.*
30. **Cachon, R., N. Capelle, C. Divies, and L. Prost.** 2008. Method for culturing microorganisms in reducing conditions obtained by a gas stream. France.
31. **Cachon, R., and J. De Coninck.** 2012. Potentiel d'oxydoréduction (Eh) des matrices alimentaires. *Technique de l'ingénieur*:1-10.
32. **Cachon, R., S. Jeanson, A. Mazen, and D. Divies.** 2002. Characterisation of lactic starters based on acidification and reduction activities. *Le Lait* **82**:281-288.
33. **Cesselin, B., D. Ali, J. J. Gratadoux, P. Gaudu, P. Duwat, A. Gruss, and M. El Karoui.** 2009. Inactivation of the *Lactococcus lactis* high-affinity phosphate transporter confers oxygen and thiol resistance and alters metal homeostasis. *Microbiology* **155**:2274-81.
34. **Chandry, P. S., S. C. Moore, J. D. Boyce, B. E. Davidson, and A. J. Hillier.** 1997. Analysis of the DNA sequence, gene expression, origin of replication and modular structure of the *Lactococcus lactis* lytic bacteriophage sk1. *Mol Microbiol* **26**:49-64.
35. **Chapot-Chartier, M. P., and S. Kulakauskas.** 2014. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb Cell Fact* **13 Suppl 1**:S9.
36. **Chen, J., J. Shen, C. Solem, and P. R. Jensen.** 2013. Oxidative stress at high temperatures in *Lactococcus lactis* due to an insufficient supply of Riboflavin. *Appl Environ Microbiol* **79**:6140-7.
37. **Cocaign-Bousquet, M., C. Garrigues, P. Loubiere, and N. D. Lindley.** 1996. Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek* **70**:253-267.
38. **Collins, M. D. a. J., D.** 1979. The distribution of isoprenoid quinones in streptococci of serological groups D and N. *J Gen Microbiol* **114**:27-33.
39. **Corrieu, G., and F. M. Luquet.** 2008. Bactéries lactiques De la génétique aux ferments, TEC & DOC ed.

40. **Cottrell, J. H.** 1948. Tetrazolium salt as a seed germination indicator. *Ann Appl Biol.* **35**:123-131.
41. **Cretenet, M., G. Le Gall, U. Wegmann, S. Even, C. Shearman, R. Stentz, and S. Jeanson.** 2014. Early adaptation to oxygen is key to the industrially important traits of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* during milk fermentation. *BMC Genomics* **15**:1054.
42. **Dallo, S. F., T. R. Kannan, M. W. Blaylock, and J. B. Baseman.** 2002. Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* **46**:1041-51.
43. **Dave, R. I., and N. P. Shah.** 1998. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *J Dairy Sci* **81**:2804-16.
44. **Davey, L., C. K. Ng, S. A. Halperin, and S. F. Lee.** 2013. Functional analysis of paralogous thiol-disulfide oxidoreductases in *Streptococcus gordonii*. *J Biol Chem* **288**:16416-29.
45. **de Vos, W. M.** 2011. Systems solutions by lactic acid bacteria: from paradigms to practice. *Microb Cell Fact* **10 Suppl 1**:S2.
46. **Delbeau, C.** 2005. Impacts de modifications du potentiel d'oxydoréduction par des gaz sur les aptitudes technologiques des bactéries lactiques. PhD thesis. University of Burgundy, France.
47. **Delgado, M. L., M. L. Gil, and D. Gozalbo.** 2003. Starvation and temperature upshift cause an increase in the enzymatically active cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein in yeast. *FEMS Yeast Res* **4**:297-303.
48. **Dower, W. J., J. F. Miller, and C. W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**:6127-45.
49. **Drew, D., D. Sjostrand, J. Nilsson, T. Urbig, C. N. Chin, J. W. de Gier, and G. von Heijne.** 2002. Rapid topology mapping of *Escherichia coli* inner-membrane proteins by prediction and PhoA/GFP fusion analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:2690-5.
50. **Dupont, K., F. K. Vogensen, H. Neve, J. Bresciani, and J. Josephsen.** 2004. Identification of the receptor-binding protein in 936-species lactococcal bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* **70**:5818-24.
51. **Duwat, P., S. Sourice, B. Cesselin, G. Lamberet, K. Vido, P. Gaudu, Y. Le Loir, F. Violet, P. Loubiere, and A. Gruss.** 2001. Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J Bacteriol* **183**:4509-16.
52. **Even, S., C. Garrigues, P. Loubiere, N. D. Lindley, and M. Cotaign-Bousquet.** 1999. Pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis* is dependent upon glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity. *Metabolic Engineering* **1**:198-205.
53. **Fernandes, L., and J. L. Steele.** 1993. Glutathione content of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* **76**:1233-1242.
54. **Fernandez, M., M. Kleerebezem, O. P. Kuipers, R. J. Siezen, and R. van Kranenburg.** 2002. Regulation of the *metC-cysK* operon, involved in sulfur metabolism in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **184**:82-90.
55. **Fernandez, M., W. van Doesburg, G. A. M. Rutten, J. D. Marugg, A. C. Alting, R. van Kranenburg, and O. P. Kuipers.** 2000. Molecular and functional analyses of the *metC* gene of *Lactococcus lactis*, encoding Cystathionine β -Lyase. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:42-48.
56. **Fletcher, J. M., S. P. Nair, J. M. Ward, B. Henderson, and M. Wilson.** 2001. Analysis of the effect of changing environmental conditions on the expression patterns of exported surface-associated proteins of the oral pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microb Pathog* **30**:359-68.

57. **Foligne, B., Dessein, R., Marceau, M., Poiret, S., Chamailard, M., Pot, Bruno., Simonet, M. and Daniel, C.** 2007. Prevention and treatment of Colitis With *Lactococcus lactis* secreting the immunomodulatory *Yersinia* LcrV Protein. *CGastroenterology* **133**:862-874.
58. **Ganesan, B., Stuart, M. R. and Weimer, B. C.** 2007. Carbohydrate Starvation Causes a Metabolically Active but Nonculturable State in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:2498-2512.
59. **Garcia-Quintans, N., G. Repizo, M. Martin, C. Magni, and P. Lopez.** 2008. Activation of the diacetyl/acetoin pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. diacetylactis CRL264 by acidic growth. *Appl Environ Microbiol* **74**:1988-96.
60. **Garrigues, C., Goupil-Feuillerat, N., Coccagn-Bousquet, M., Renault, P., Lindley, N.D. and Loubiere, P.** 2001. Glucose metabolism and regulation of glycolysis in *Lactococcus lactis* strains with decreased Lactate Dehydrogenase Activity. *Metabolic Engineering* **3**:211-217.
61. **Gaspar, P., A. R. Neves, M. J. Gasson, C. A. Shearman, and H. Santos.** 2011. High yields of 2,3-butanediol and mannitol in *Lactococcus lactis* through engineering of NAD(+) cofactor recycling. *Appl Environ Microbiol* **77**:6826-35.
62. **Gaspar, P., A. R. Neves, A. Ramos, M. J. Gasson, C. A. Shearman, and H. Santos.** 2004. Engineering *Lactococcus lactis* for Production of Mannitol: High Yields from Food-Grade Strains Deficient in Lactate Dehydrogenase and the Mannitol Transport System. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:1466-1474.
63. **Gaspar, P., A. R. Neves, C. A. Shearman, M. J. Gasson, A. M. Baptista, D. L. Turner, C. M. Soares, and H. Santos.** 2007. The lactate dehydrogenases encoded by the *ldh* and *ldhB* genes in *Lactococcus lactis* exhibit distinct regulation and catalytic properties – comparative modeling to probe the molecular basis. *FEBS Journal* **274**:5924-5936.
64. **Gasson, M. J.** 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J Bacteriol* **154**:1-9.
65. **Gaudu, P., G. Lamberet, S. Poncet, and A. Gruss.** 2003. CcpA regulation of aerobic and respiration growth in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology* **50**:183-192.
66. **Gaudu, P., K. Vido, B. Cesselin, S. Kulakauskas, J. Tremblay, L. Rezaiki, G. Lamberret, S. Sourice, P. Duwat, and A. Gruss.** 2002. Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**:263-9.
67. **Gautier, M., S. Lortal, P. Boyaval, F. Girard, R. Lemée, and et al.** 1993. Les bactéries propioniques laitières. *Le lait* **73**:257-263.
68. **Gibson, T. J.** 1984. Studies on the Epstein-Barr virus genome. University of Cambridge.
69. **Gostick, D. O., H. G. Griffin, C. A. Shearman, C. Scott, J. Green, M. J. Gasson, and J. R. Guest.** 1999. Two operons that encode FNR-like proteins in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology* **31**:1523-1535.
70. **Grandvalet, C., J. S. Assad-Garcia, S. Chu-Ky, M. Tollot, J. Guzzo, J. Gresti, and R. Tourdot-Marechal.** 2008. Changes in membrane lipid composition in ethanol- and acid-adapted *Oenococcus oeni* cells: characterization of the *cfa* gene by heterologous complementation. *Microbiology* **154**:2611-9.
71. **Grifantini, R., E. Bartolini, A. Muzzi, M. Draghi, E. Frigimelica, J. Berger, F. Randazzo, and G. Grandi.** 2002. Gene expression profile in *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* upon host-cell contact: from basic research to vaccine development. *Ann N Y Acad Sci* **975**:202-16.
72. **Guedon, E., J. Jamet, and P. Renault.** 2002. Gene regulation in *Lactococcus lactis* the gap between predicted and characterized regulators. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**:93-112.

73. **Guedon, E., B. Sperandio, N. Pons, S. D. Ehrlich, and P. Renault.** 2005. Overall control of nitrogen metabolism in *Lactococcus lactis* by CodY, and possible models for CodY regulation in Firmicutes. *Microbiology* **151**:3895-909.
74. **Guillot, A., D. Obis, and M. Y. Mistou.** 2000. Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress. *Int J Food Microbiol* **55**:47-51.
75. **Hatahet, F., D. Boyd, and J. Beckwith.** 2014. Disulfide bond formation in prokaryotes: history, diversity and design. *Biochim Biophys Acta* **1844**:1402-14.
76. **Higuchi, M., Y. Yamamoto, and Y. Kamio.** 2000. Molecular biology of oxygen tolerance in Lactic bacteria : Functions of NADH oxidases and Dpr in oxidatives stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **90**:484-493.
77. **Higuchi, M., Y. Yamamoto, L. B. Poole, M. Shimada, Y. Sato, N. Takahashi, and Y. Kamio.** 1999. Functions of two types of NADH oxidases in energy metabolism and oxidative stress of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **181**:5940-7.
78. **Hoare, J. P.** 1968. *The electrochemistry of oxygen*. New York : Interscience.
79. **Hodson, C. T., A. Lewin, L. Hederstedt, and N. E. Le Brun.** 2008. The active-site cysteinyls and hydrophobic cavity residues of ResA are important for cytochrome c maturation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **190**:4697-705.
80. **Hoefnagel, M. H., M. J. Starrenburg, D. E. Martens, J. Hugenholtz, M. Kleerebezem, S. Van, II, R. Bongers, H. V. Westerhoff, and J. L. Snoep.** 2002. Metabolic engineering of lactic acid bacteria, the combined approach: kinetic modelling, metabolic control and experimental analysis. *Microbiology* **148**:1003-13.
81. **Holo, H., and I. F. Nes.** 1989. High-Frequency Transformation, by Electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Grown with Glycine in Osmotically Stabilized Media. *Appl Environ Microbiol* **55**:3119-23.
82. **Hols, P., A. Ramos, J. Hugenholtz, J. Delcour, W. M. de Vos, H. Santos, and M. Kleerebezem.** 1999. Acetate Utilization in *Lactococcus lactis* Deficient in Lactate Dehydrogenase: a Rescue Pathway for Maintaining Redox Balance. *Journal of Bacteriology* **181**:5521-5526.
83. **Ignatova, M., I. Leguerinel, M. Guilbot, H. Prevost, and S. Guillou.** 2008. Modelling the effect of the redox potential and pH of heating media on *Listeria monocytogenes* heat resistance. *J Appl Microbiol* **105**:875-83.
84. **Imlay, J. A.** 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* **77**:755-76.
85. **Imlay, J. A.** 2002. How oxygen damages microbes: oxygen tolerance and obligate anaerobiosis. *Adv Microb Physiol* **46**:111-53.
86. **Israelsen, H., S. M. Madsen, A. Vrang, E. B. Hansen, and E. Johansen.** 1995. Cloning and partial characterization of regulated promoters from *Lactococcus lactis* Tn917-lacZ integrants with the new promoter probe vector, pAK80. *Appl Environ Microbiol* **61**:2540-7.
87. **Ito, A., Y. Sato, S. Kudo, S. Sato, H. Nakajima, and T. Toba.** 2003. The screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychrotrophic food-borne pathogens. *Curr Microbiol* **47**:231-6.
88. **Jacob, H. E.** 1970. Redox potential. *Methods Microbiology* **2**:91-123.
89. **Jiang, R., and A. S. Bommarius.** 2004. Hydrogen peroxide-producing NADH oxidase (nox-1) from *Lactococcus lactis*. *Tetrahedron: Asymmetry* **15**:2939-2944.
90. **Jiang, R., B. R. Riebel, and A. S. Bommarius.** 2005. Comparison of Alkyl Hydroperoxide Reductase (AhpR) and Water-Forming NADH Oxidase from *Lactococcus lactis* ATCC 19435. *Advanced Synthesis & Catalysis* **347**:1139-1146.

91. **Jönsson, H., and H. E. Pettersson.** 1977. Studies on the citric acid fermentation in lactic starter cultures with special interest in alpha-aceto-lactic acid. *Metabolic studies. Milchwissenschaft* **32**:587-594.
92. **Khunajakr, N., C. Q. Liu, P. Charoengchai, and N. W. Dunn.** 1999. A plasmid-encoded two-component regulatory system involved in copper-inducible transcription in *Lactococcus lactis*. *Gene* **229**:229-35.
93. **Kieronczyk, A., R. Cachon, G. Feron, and M. Yvon.** 2006. Addition of oxidizing or reducing agents to the reaction medium influences amino acid conversion to aroma compounds by *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology* **101**:1114-1122.
94. **Kinoshita, H., H. Uchida, Y. Kawai, T. Kawasaki, N. Wakahara, H. Matsuo, M. Watanabe, H. Kitazawa, S. Ohnuma, K. Miura, A. Horii, and T. Saito.** 2008. Cell surface *Lactobacillus plantarum* LA 318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin. *J Appl Microbiol* **104**:1667-74.
95. **Komitopoulou, E., N. J. Bainton, and M. R. Adams.** 2004. Premature *Salmonella Typhimurium* growth inhibition in competition with other Gram-negative organisms is redox potential regulated via RpoS induction. *J Appl Microbiol* **97**:964-72.
96. **Kouwen, R. H., A. Van Der Goot, R. Dorenbos, T. Winter, H. Antelmann, M. C. Plaisier, W. J. Quax, J. M. Van Dijl, and J. F. Dubois.** 2007. Thiol-disulphide oxidoreductase modules in the low-GC Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* **64**:984-999.
97. **Kouwen, T. R., and J. M. van Dijl.** 2009. Applications of thiol-disulfide oxidoreductases for optimized in vivo production of functionally active proteins in *Bacillus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**:45-52.
98. **Kouwen, T. R., and J. M. van Dijl.** 2009. Interchangeable modules in bacterial thiol-disulfide exchange pathways. *Trends in Microbiology* **17**:6-12.
99. **Langeveld, L. P. M., and T. E. Galesloot.** 1971. Estimation of the oxidation-reduction potential as an aid in tracing the cause of excessive openness in cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **25**:15-23.
100. **Larsson, J. T., A. Rogstam, and C. von Wachenfeldt.** 2005. Coordinated patterns of cytochrome bd and lactate dehydrogenase expression in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **151**:3323-35.
101. **Lechardeur, D., B. Cesselin, A. Fernandez, G. Lamberet, C. Garrigues, M. Pedersen, P. Gaudu, and A. Gruss.** 2011. Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* **22**:143-149.
102. **Lechardeur, D., B. Cesselin, A. Fernandez, G. Lamberet, C. Garrigues, M. Pedersen, P. Gaudu, and A. Gruss.** 2011. Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotechnol* **22**:143-9.
103. **Lee, E., and C. Manoil.** 1994. Mutations eliminating the protein export function of a membrane-spanning sequence. *J Biol Chem* **269**:28822-8.
104. **Lee, S., S. M. Kim, and R. T. Lee.** 2013. Thioredoxine and thioredoxine target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal* **18**:43.
105. **Lelay, J.** 2014. Compréhension des mécanismes impliqués dans l'activité réductrice et dans les adaptations métaboliques à pH acide de *Bacillus cereus* : implication des thiols exofaciaux. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Avignon.
106. **Li, Y., J. Hugenholtz, T. Abee, and D. Molenaar.** 2003. Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress. *Appl Environ Microbiol* **69**:5739-45.
107. **Llull, D., and I. Poquet.** 2004. New expression system tightly controlled by zinc availability in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:5398-5406.

108. **Lopez de Felipe, F., and J. Hugenholtz.** 2001. Purification and characterisation of the water forming NADH-oxidase from *Lactococcus lactis*. *International Dairy Journal* **11**:37-44.
109. **Lountos, G. T., R. Jiang, W. B. Wellborn, T. L. Thaler, A. S. Bommarius, and A. M. Orville.** 2006. The crystal structure of NAD(P)H oxidase from *Lactobacillus sanfranciscensis* : insights into the conversion of O₂ into two water molecules by the flavoenzyme. *Biochemistry* **45**:9648-9659.
110. **Lubbers, M. W., N. R. Waterfield, T. P. Beresford, R. W. Le Page, and A. W. Jarvis.** 1995. Sequencing and analysis of the prolate-headed lactococcal bacteriophage c2 genome and identification of the structural genes. *Appl Environ Microbiol* **61**:4348-56.
111. **Lun, B. M., M. R. Knox, and A. P. Sims.** 1984. The effect of redox potential, and its interaction with sodium chloride concentration, on the probability of growth of *Clostridium botulinum* type E from spore inocula. *Food Microbiol* **1**:277-287.
112. **Magnani, D., O. Barre, S. D. Gerber, and M. Solioz.** 2008. Characterization of the CopR Regulon of *Lactococcus lactis* IL1403. *Journal of Bacteriology* **190**:536-545.
113. **Martin, F., N. Cayot, C. Vergoignan, L. Journaux, P. Gervais, and R. Cachon.** 2009. Impact of oxidoreduction potential and of gas bubbling on rheological properties of non-fat yoghurt. *Food Research International* **43**:218-223.
114. **Masip, L., K. Veeravalli, and G. Georgiou.** 2006. The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxid Redox Signal* **8**:753-62.
115. **McKay, L. L., and K. A. Baldwin.** 1990. Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **7**:3-14.
116. **Mercade, M., M. Coccagn-Bousquet, and P. Loubiere.** 2006. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulation in *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 or relA mutant at low pH. *Journal of Applied Microbiology* **100**:1364-1372.
117. **Messens, J., J. F. Collet, K. Van Belle, E. Brosens, R. Loris, and L. Wyns.** 2007. The oxidase DsbA folds a protein with a nonconsecutive disulfide. *J Biol Chem* **282**:31302-7.
118. **Meyrand, M., A. Guillot, M. Goin, S. Furlan, J. Armalyte, S. Kulakauskas, N. G. Cortes-Perez, G. Thomas, S. Chat, C. Pechoux, V. Dupres, P. Hols, Y. F. Dufrene, G. Trugnan, and M. P. Chapot-Chartier.** 2013. Surface proteome analysis of a natural isolate of *Lactococcus lactis* reveals the presence of pili able to bind human intestinal epithelial cells. *Mol Cell Proteomics* **12**:3935-47.
119. **Michelon, D.** 2010. Compréhension et caractérisation des mécanismes physiologiques impliqués dans l'activité réductrice de *Lactococcus lactis*. Université de Bourgogne, Dijon.
120. **Michelon, D., S. Abraham, B. Ebel, J. De Coninck, F. Husson, G. Feron, P. Gervais, and R. Cachon.** 2010. Contribution of exofacial thiol groups in the reducing activity of *Lactococcus lactis*. *FEBS Journal* **277**:2282-2290.
121. **Michelon, D., S. Tachon, B. Ebel, J. De Coninck, G. Feron, P. Gervais, M. Yvon, and R. Cachon.** 2013. Screening of lactic acid bacteria for reducing power using a tetrazolium salt reduction method on milk agar. *J Biosci Bioeng* **115**:229-32.
122. **Mills, S., O. E. McAuliffe, A. Coffey, G. F. Fitzgerald, and R. Paul Ross.** 2006. Plasmids of lactococci- genetic accessories or genetic necessities? *FEMS Microbiology Reviews* **30**:243-273.
123. **Miyoshi, A., T. Rochat, J. J. Gratadoux, Y. Le Loir, S. O. Oliveira, P. Langella, and V. Azevedo.** 2003. Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. *Genetic and Molecular research* **2**:348-359.
124. **Modun, B., and P. Williams.** 1999. The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect Immun* **67**:1086-92.

125. **Moini, H., O. Tirosh, Y. C. Park, K. J. Cho, and L. Packer.** 2002. R-alpha-lipoic acid action on cell redox status, the insulin receptor, and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Arch Biochem Biophys* **397**:384-91.
126. **Montanari, C., S. L. Sado Kamdem, D. I. Serrazanetti, F. X. Etoa, and M. E. Guerzoni.** 2010. Synthesis of cyclopropane fatty acids in *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus sanfranciscensis* and their cellular fatty acids changes following short term acid and cold stresses. *Food Microbiol* **27**:493-502.
127. **Moreton, R. S.** 1998. Fermented milk product. France : Nestlé S.A.
128. **Morishita, T., N. Tamura, T. Makino, and S. Kudo.** 1999. Production of menaquinones by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* **82**:1897-1903.
129. **Nelson, D., J. M. Goldstein, K. Boatright, D. W. Harty, S. L. Cook, P. J. Hickman, J. Potempa, J. Travis, and J. A. Mayo.** 2001. pH-regulated secretion of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus gordonii* FSS2: purification, characterization, and cloning of the gene encoding this enzyme. *J Dent Res* **80**:371-7.
130. **Neuhaus, F. C., and J. Baddiley.** 2003. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**:686-723.
131. **Neves, A. R., R. A., C. Shearman, M. J. Gasson, J. S. Almeida, and H. Santos.** 2000. Metabolic characterization of *Lactococcus lactis* deficient in lactate dehydrogenase using in vivo ¹³C-NMR. *Eur. J. Biochem.* **267**:3859-3868.
132. **Neves, A. R., A. Ramos, H. Costa, I. I. Van Swam, J. Hugenholtz, M. Kleerebezem, W. De Vos, and H. Santos.** 2002. Effect of different NADH oxidase levels on glucose metabolism by *Lactococcus lactis* : kinetics of intracellular metabolite pools determined by In vivo nuclear magnetic resonance. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:6332-6342.
133. **Neves, A. R., Ramos A., Shearman C., Gasson M. J. and Santos H.** 2002. Catabolism of mannitol in *Lactococcus lactis* MG1363 and a mutant defective in lactate dehydrogenase. *Microbiology* **148**:3467-3476.
134. **Nicolaes, V., H. El Hajjaji, R. M. Davis, C. Van der Henst, M. Depuydt, P. Leverrier, A. Aertsen, V. Haufroid, S. Ollagnier de Choudens, X. De Bolle, N. Ruiz, and J. F. Collet.** 2014. Insights into the function of YciM, a heat shock membrane protein required to maintain envelope integrity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **196**:300-9.
135. **Nouaille, S., L. Rault, S. Jeanson, P. Loubiere, Y. Le Loir, and S. Even.** 2014. Contribution of *Lactococcus lactis* reducing properties to the downregulation of a major virulence regulator in *Staphylococcus aureus*, the agr system. *Appl Environ Microbiol* **80**:7028-35.
136. **O'Brien, J., I. Wilson, T. Orton, and F. Pognan.** 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* **267**:5421-5426.
137. **O'Connell-Motherway, M., D. van Sinderen, F. Morel-Deville, G. F. Fitzgerald, S. Dusko Ehrlich, and P. Morel.** 2000. Six putative two-component regulatory systems isolated from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris MG1363. *Microbiology* **146**:935-947.
138. **Oblinger, J. L., and A. A. Kraft.** 1973. Oxidation-reduction potential and growth of *Salmonella* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Biotechnology : Journal of Food Science* **38**:1108-1112.
139. **Oktiabr'skii, O. N., and G. V. Smirnova.** 1988. Changes in the redox potential and the number of accessible sulfhydryl groups in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* cultures during transient processes. *Biokhimiia* **53**:2042-50.

140. **Packer, L., E. H. Witt, and H. J. Tritschler.** 1995. alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* **19**:227-50.
141. **Pancholi, V., and G. S. Chhatwal.** 2003. Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int J Med Microbiol* **293**:391-401.
142. **Pancholi, V., and V. A. Fischetti.** 1998. alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J Biol Chem* **273**:14503-15.
143. **Pancholi, V., and V. A. Fischetti.** 1992. A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med* **176**:415-26.
144. **Park, S., and J. A. Imlay.** 2003. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the fenton reaction. *J Bacteriol* **185**:1942-50.
145. **Parker, J.** 1955. Tetrazolium salts as viability indicators: radiation-catalysed reactions. *Nature* **176**:647-648.
146. **Pedersen, M. B., C. Garrigues, K. Tuphile, C. Brun, K. Vido, M. Bennedsen, H. Mollgaard, P. Gaudu, and A. Gruss.** 2008. Impact of aeration and heme-activated respiration on *Lactococcus lactis* gene expression: identification of a heme-responsive operon. *J Bacteriol* **190**:4903-11.
147. **Poyart, C., and P. Trieu-Cuot.** 1997. A broad-host-range mobilizable shuttle vector for the construction of transcriptional fusions to beta-galactosidase in gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **156**:193-8.
148. **Pullianen, A. T., J. Hytonen, S. Haataja, and J. Finne.** 2008. Deficiency of the Rgg regulator promotes H₂O₂ resistance, AhpCF-mediated H₂O₂ decomposition, and virulence in *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **190**:3225-35.
149. **Ramiah, K., C. A. van Reenen, and L. M. Dicks.** 2008. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. *Res Microbiol* **159**:470-5.
150. **Reid, E., J. Cole, and D. J. Eaves.** 2001. The *Escherichia coli* CcmG protein fulfils a specific role in cytochrome c assembly. *Biochem J* **355**:51-8.
151. **Rezaiki, L., G. Lamberet, A. Derré, A. Gruss, and P. Gaudu.** 2008. *Lactococcus lactis* produces short-chain quinones that cross-feed Group B *Streptococcus* to activate respiration growth. *Molecular Microbiology* **67**:947-957.
152. **Rix Melchiorson, C., K. Vaever Jokumsen, J. Villadsen, H. Israelsen, and J. Arnau.** 2002. The level of pyruvate-formate lyase controls the shift from homolactic to mixed-acid product formation in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**:338-344.
153. **Rochat, T., S. Boudebouze, J. J. Gratadoux, S. Blugeon, P. Gaudu, P. Langella, and E. Maguin.** 2012. Proteomic analysis of spontaneous mutants of *Lactococcus lactis*: Involvement of GAPDH and arginine deiminase pathway in H₂O₂ resistance. *Proteomics* **12**:1792-805.
154. **Rybak, J. N., S. B. Scheurer, D. Neri, and G. Elia.** 2004. Purification of biotinylated proteins on streptavidin resin: a protocol for quantitative elution. *Proteomics* **4**:2296-9.
155. **Sambrook, J., and D. W. Russel.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
156. **Sanders, J. W., Leenhouts, K.J., Haandrikman, A.J., Venema; G. and Kok, J.** 1995. Stress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal spheroxide dismutase gene. *Journal of Bacteriology* **177**:5254-5260.

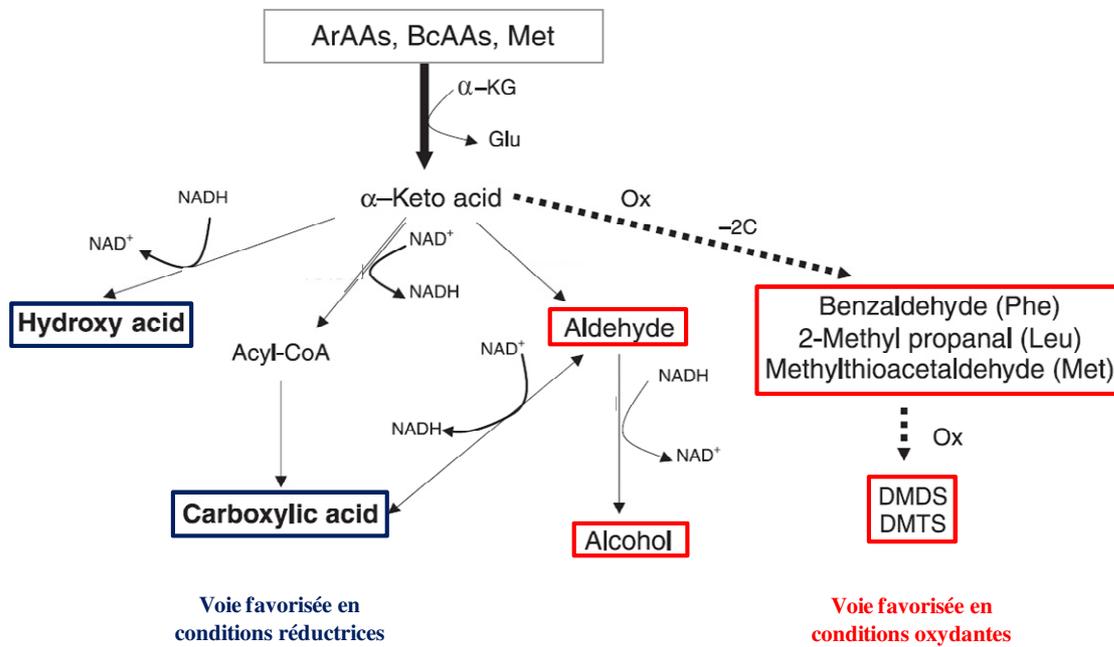
157. **Schleifer, K. H., J. Kraus, C. Dvorak, R. Kilpper-Bälz, M. D. Collins, and W. Fischer.** 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **6**:183-195.
158. **Scott, C., H. Rawsthorne, M. Upadhyay, C. A. Shearman, M. J. Gasson, J. R. Guest, and J. Green.** 2000. Zinc uptake, oxidative stress and the FNR-like proteins of *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett* **192**:85-9.
159. **Sevier, C. S., and C. A. Kaiser.** 2002. Formation and transfer of disulfide bonds in living cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**:836-847.
160. **Silhavy, T. J., D. Kahne, and S. Walker.** 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* **2**:a000414.
161. **Smith, J. J., and G. A. McFeters.** 1997. Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Microbiology Methods* **29**:161-175.
162. **Smith, W. M., G. A. Dykes, A. H. Soomro, and M. S. Turner.** 2010. Molecular mechanisms of stress resistance in *Lactococcus lactis* p. 1106-1118. In A. M. Vilas (ed.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, vol. 2. Formatex Research Center Badajoz, Spain
163. **Smoot, L. A., and M. D. Pierson.** 1979. Effect of oxidation-reduction potential on the outgrowth and chemical inhibition of *Clostridium botulinum* 10755A spores. *Journal of Food Science* **44**:700-704.
164. **Snoep, J. L., M. R. de Graef, A. H. Westphal, A. de Kok, M. J. Teixeira de Mattos, and O. M. Neijssel.** 1993. Differences in sensitivity to NADH of purified pyruvate dehydrogenase complexes of *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Azotobacter vinelandii* and *Escherichia coli* : implications for their activity in vivo. *FEMS Microbiol Lett* **114**:279-83.
165. **Snoep, J. L., M. Joost Teixeira de Mattos, M. J. C. Starrenburg, and J. Hugenholtz.** 1992. Isolation, characterisation, and physiological role of the pyruvate dehydrogenase complex and α -Acetolactate Synthase of *Lactococcus lactis* susp. *lactis* bv. *diacetylactis*. *Journal of Bacteriology* **174**:4838-1841.
166. **Soballe, B., and R. K. Poole.** 2000. Ubiquinone limits oxidative stress in *Escherichia coli*. *Microbiology* **146**:787-96.
167. **Sperandio, B., P. Polard, D. S. Ehrlich, P. Renault, and E. Guedon.** 2005. Sulfur amino acid metabolism and its control in *Lactococcus lactis* IL1403. *Journal of Bacteriology* **187**:3762-3778.
168. **Stiles, M. E.** 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**:331-45.
169. **Stiles, M. E., and W. H. Holzapfel.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* **36**:1-29.
170. **Stillman, T. J., M. Upadhyay, V. A. Norte, S. E. Sedelnikova, M. Carradus, S. Tzokov, P. A. Bullough, C. A. Shearman, M. J. Gasson, C. H. Williams, P. J. Artymiuk, and J. Green.** 2005. The crystal structures of *Lactococcus lactis* MG1363 Dps proteins reveal the presence of an N-terminal helix that is required for DNA binding. *Mol Microbiol* **57**:1101-12.
171. **Sun, G., E. Sharkova, R. Chesnut, S. Birkey, M. F. Duggan, A. Sorokin, P. Pujic, S. D. Ehrlich, and F. M. Hulett.** 1996. Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**:1374-85.
172. **Tachon, S., J. B. Brandsma, and M. Yvon.** 2010. NoxE NADH oxidase and the electron transport chain are responsible for the ability of *Lactococcus lactis* to decrease the redox potential of milk. *Appl Environ Microbiol* **76**:1311-9.

173. **Tachon, S., D. Michelon, E. Chambellon, M. Cantonnet, C. Mezange, L. Henno, R. Cachon, and M. Yvon.** 2009. Experimental conditions affect the site of tetrazolium violet reduction in the electron transport chain of *Lactococcus lactis*. *Microbiology* **155**:2941-8.
174. **Tango, S. A., and A. E. Ghaly.** 1999. Amelioration of lactic acid production from cheese whey using micro-aeration. *Biomass and Bioenergy* **17**:221-238.
175. **Taniai, H., K. Iida, M. Seki, M. Saito, S. Shiota, H. Nakayama, and S. Yoshida.** 2008. Concerted action of lactate oxidase and pyruvate oxidase in aerobic growth of *Streptococcus pneumoniae*: role of lactate as an energy source. *J Bacteriol* **190**:3572-9.
176. **Tengerdy, R.** 1961. Redox potential changes in the 2-keto gluconic acid fermentation. *Journal of biotechnological and Microbiological Technology and Engineering* **3**:241-253.
177. **Vallejo-Cordoba, B., and A. F. González-Córdova.** 2007. CE: A useful analytical tool for the characterization of Maillard reaction products in foods. *Electrophoresis* **28**:4063-4071.
178. **van de Guchte, M., P. Serror, C. Chervaux, T. Smokvine, S. D. Ehrlich, and E. Maguin.** 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**:187-216.
179. **van Niel, E. W. J., K. Hofvendahl, and B. Hahn-Hagerdal.** 2002. Formation and Conversion of Oxygen Metabolites by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 under Different Growth Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:4350-4356.
180. **Van Niel, E. W. J., J. Palmfeldt, R. Martin, M. Paese, and B. Hahn-Hagerdal.** 2004. Reappraisal of the Regulation of Lactococcal L-Lactate Dehydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:1843-1846.
181. **Vanysek, P.** 1994. *Handbook of chemistry and physics*. London, England : CRC Press.
182. **Velly, H., M. Bouix, S. Passot, C. Penicaud, H. Beinsteiner, S. Ghorbal, P. Lieben, and F. Fonseca.** 2015. Cyclopropanation of unsaturated fatty acids and membrane rigidification improve the freeze-drying resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**:907-18.
183. **Vido, K., H. Diemer, A. Van Dorsselaer, E. Leize, V. Juillard, A. Gruss, and P. Gaudu.** 2005. Roles of Thioredoxin Reductase during the Aerobic Life of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* **187**:601-610.
184. **Vido, K., D. Le Bars, M. Y. Mistou, P. Anglade, A. Gruss, and P. Gaudu.** 2004. Proteome analyses of heme-dependent respiration in *Lactococcus lactis*: involvement of the proteolytic system. *J Bacteriol* **186**:1648-57.
185. **Vollmer, W., D. Blanot, and M. A. de Pedro.** 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* **32**:149-67.
186. **Walstra, P., J. T. M. Wouters, and T. J. Geurts.** 2006. *Dairy Science and Technology*, Taylors et Francis ed, New York.
187. **Wang, G., Y. Hong, M. K. Johnson, and R. J. Maier.** 2006. Lipid peroxidation as a source of oxidative damage in *Helicobacter pylori*: protective roles of peroxiredoxins. *Biochim Biophys Acta* **1760**:1596-603.
188. **Weast, R. C. e.** 1985. *CRC Handbook of chemistry and physics*.
189. **Wegmann, U., M. O'Connell-Motherway, A. Zomer, G. Buist, C. Shearman, C. Canchaya, M. Ventura, A. Goesmann, M. J. Gasson, O. P. Kuipers, D. Van Sinderen, and J. Kok.** 2007. Complete Genome Sequence of the Prototype Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Journal of Bacteriology* **189**:3256-3270.
190. **Wegmann, U., K. Overweg, S. Jeanson, M. Gasson, and C. Shearman.** 2012. Molecular characterization and structural instability of the industrially important composite metabolic plasmid pLP712. *Microbiology* **158**:2936-45.
191. **Wiederholt, K. M., and S. E. Withers.** 1994. Glutathione accumulation in lactococci. *Journal of Dairy Science* **77**:1183-1188.

192. **Williams Jr, C. H., L. David Arscott, S. Muller, B. W. Lennon, M. L. Ludwig, P. F. Wang, D. M. Veine, K. Becker, and R. Heiner Schirmer.** 2000. Thioredoxin reductase Two modes of catalysis have evolved. *Eur. J. Biochem.* **267**:6110-6117.
193. **Wisselink, H. W., A. E. Mars, P. van der Meer, G. Eggink, and J. Hugenholtz.** 2004. Metabolic Engineering of Mannitol Production in *Lactococcus lactis* : Influence of Overexpression of Mannitol 1-Phosphate Dehydrogenase in Different Genetic Backgrounds. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:4286-4292.
194. **Wolff, S.** 1994. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzymol* **233**:182-189.
195. **Yamamoto, Y., V. Pargade, G. Lamberet, P. Gaudu, F. Thomas, J. Texereau, A. Gruss, P. Trieu-Cuot, and C. Poyart.** 2006. The Group B *Streptococcus* NADH oxidase Nox-2 is involved in fatty acid biosynthesis during aerobic growth and contributes to virulence. *Mol Microbiol* **62**:772-85.
196. **Yamamoto, Y., C. Poyart, P. Trieu-Cuot, G. Lamberet, A. Gruss, and P. Gaudu.** 2006. Roles of environmental heme, and menaquinone, in *Streptococcus agalactiae*. *Biometals* **19**:205-10.
197. **Yvon, M.** 2006. Key enzymes for flavour formation by lactic acid bacteria. *Australian journal of dairy technology* **61**:89-96.
198. **Zomer, A. L., G. Buist, R. Larsen, J. Kok, and O. P. Kuipers.** 2006. Time-Resolved Determination of the CcpA Regulon of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Journal of Bacteriology* **189**:1366-1381.

ANNEXES

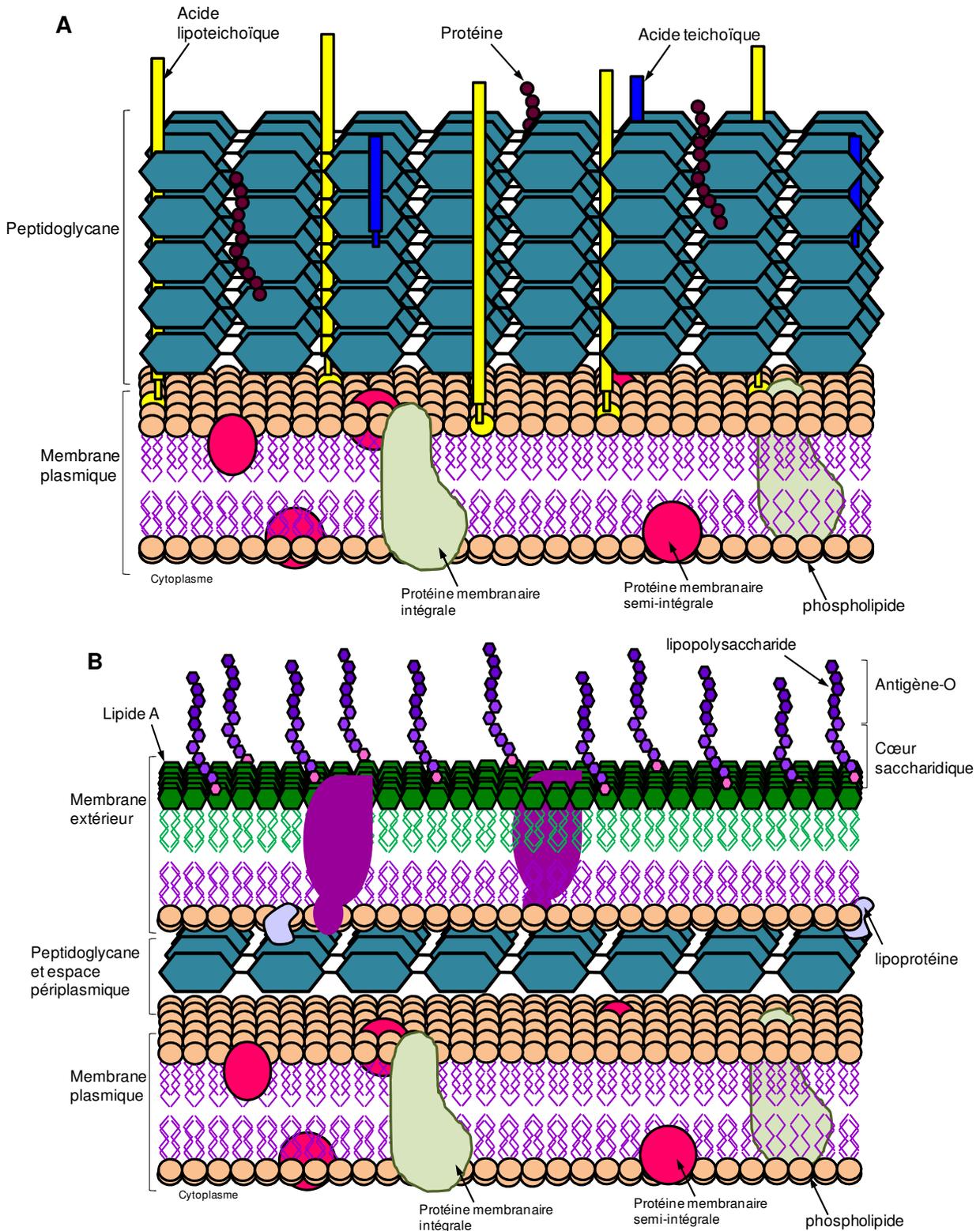
ANNEXE 1 : Production d'arômes au cours du catabolisme des acides aminés chez *L. lactis*



ArAAs, acides aminés aromatiques ; BcAAs, acides aminés branchés, Met, méthionine ; α -KG, α -cétoglutarate ; Glu, glutamate ; Ox, oxydation chimique ; DMDS, dimethyldisulfide ; DMTS, dimethyltrisulfide. (93)

ANNEXE 2 : Comparaison de l'enveloppe des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

A : Paroi des bactéries à Gram positif ; B : Paroi des bactéries à Gram négatif. Figure inspirée de la publication de Silhavy T.J., et *al.*, (160).



ANNEXE 3 : Souches

Souches	Caractéristiques	Source ou référence
<i>E. coli</i>		
TG1	<i>E. coli</i> TG1, <i>SupE hsdΔ5 thiΔ(lac-proAB) F' traD36 proAB+ lacIqlacZΔM15</i> , utilisé comme souche hôte de clonage	(68)
TG1 MalE-0524 ^{Nter}	Am ^r ; TG1 contenant le plasmide pMAL-0524 ^{Nter}	Ce travail
TG1 MalE-0526 ^{Nter}	Am ^r ; TG1 contenant le plasmide pMAL-0526 ^{Nter}	Ce travail
C118	$\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA20 galE galK thi rpsE rpoB argE(am) recA1$	(103)
CC118 0524phoA1	Am ^r ; CC118 contenant le plasmide pHA1-0524phoA1	Ce travail
CC118 0524phoA2	Am ^r ; CC118 contenant le plasmide pHA1-0524phoA2	Ce travail
CC118 0526phoA1	Am ^r ; CC118 contenant le plasmide pHA1-0526phoA1	Ce travail
CC118 0526phoA2	Am ^r ; CC118 contenant le plasmide pHA1-0526phoA2	Ce travail
CC118 AhpFphoA1	Am ^r ; CC118 contenant le plasmide pHA1-AhpFphoA1	Ce travail
CC118 AhpFphoA2	Am ^r ; CC118 contenant le plasmide pHA1-AhpFphoA2	Ce travail
<i>Lactococcus lactis</i>		
MG1363	Dérivé de <i>L. lactis</i> NCDO763, sans plasmide	(64)
$\Delta limg_0524$	Délétion du gène <i>limg_0524</i> dans MG1363	Ce travail
$\Delta limg_0524$, pAK80- <i>limg_0524</i> ^C	$\Delta limg_0524$ contenant le plasmide pAK80- <i>limg_0524</i> ^C	Ce travail
$\Delta limg_0524$, pAK80- <i>limg_0524</i> ΔC ^C	$\Delta limg_0524$ contenant le plasmide pAK80- <i>limg_0524</i> ΔC ^C	Ce travail
$\Delta limg_0526$	Délétion du gène <i>limg_0526</i> dans MG1363	Ce travail
$\Delta limg_0526$, pAK80- <i>limg_0524</i> ^C	$\Delta limg_0526$ contenant le plasmide pAK80- <i>limg_0524</i> ^C	Ce travail
MG1363 P ₀₅₂₄	Ery ^r ; MG1363 contenant le plasmide P ₀₅₂₄ -pTCV- <i>lac</i>	Ce travail
MG1363 P ₀₅₂₆	Ery ^r ; MG1363 contenant le plasmide P ₀₅₂₆ -pTCV- <i>lac</i>	Ce travail
$\Delta limg_ahpF$	Délétion du gène <i>ahpF</i> dans MG1363	Ce travail
$\Delta limg_ahpF$, pRV300- <i>ahpF</i> ^C	$\Delta limg_ahpF$ contenant le plasmide pRV300- <i>AhpF</i> ^C	Ce travail
$\Delta limg_menB$	Délétion du gène <i>menB</i> dans MG1363	(151)
$\Delta limg_menB/\Delta limg_ahpF$	Délétion des gènes <i>menB</i> et <i>ahpF</i> dans MG1363	Ce travail
TIL 46	Dérivé de <i>L. lactis</i> NCDO763, Lac ⁺ Prot ⁺	National Collection of Food Bacteria, Shinfield, Reading, UK
$\Delta limg_0526$	Délétion du gène <i>limg_0526</i> dans TIL 46	Ce travail
$\Delta limg_0526$, pBr322pGosht8- <i>limg_0524</i> ^C	$\Delta limg_0526$ contenant le plasmide pAK80- <i>limg_0524</i> ^C	Ce travail
$\Delta limg_0526$, pRv300- <i>limg_0524</i> ^C	$\Delta limg_0526$ contenant le plasmide pRV300- <i>limg_0524</i> ^C	Ce travail

ANNEXE 4 : Primers

Nom et Utilisation	Sequence (5'→3')
Mutants	
Délétion de <i>lmg_0526</i>	
Δ0526For	GATCGGATCCATACAGTAGCAAACACTGCC
Δ0526intRev	CTGCCTGCTCTGATGACGAACTTTCTGTGCCACAATGTGGGC
Δ0526Rev	GATC <u>TCTAG</u> ATCCCAAACTCATTTCGCCG
Δ0526intFor	GCCCACATTGTGGCACAGAAAGTTCGTCATCAGAGCAGGCAG
0526extFor	GGAGCGCTTGCCTTGGGAAAA
0526extRev	TGTGTAAGGTCAATCGTCGC
Délétion de <i>lmg_0524</i>	
Δ0524For	GATCGGATCCATATTGTCTTATTAATTATGGG
Δ0524intRev	CGTCCATAATAATTAAGCATCTCTTGGCACAGTTGGGC
Δ0524Rev	GATC <u>TCTAG</u> AAAAAATCGCTATTACAGCACC
Δ0524intFor	GCCCAAACTGTGGCAAAGAGATGCTTAATTATTATGGACG
0524extFor	GGGCAGTTATCCTGACTTCAC
0524extRev	TGGCAGTCCAACCTTTGCACC
Délétion de <i>ahpF</i>	
ΔahpfFor	GATCGGATCCGGGCGAGATGCTAGTCAGTTA
ΔahpfintRev	CTGTCAAATCAATTGTCCCTTCACTATCGTCTGCGTCCAC
ΔahpfRev	GATC <u>TCTAG</u> ACTGACCGACTTTATTGCGCT
ΔahpfintFor	GTGGACGCAGACGATAGTGAAGGGACAATTGATTTGACAG
ahpfextFor	GCGGACCCTTCACAAAAAATTTACGGG
ahpfextRev	CGCCACCGGCGCTAATTGATTTTTCGGC
Délétion de <i>lmg_1102</i>	
Δ1102For	GATCGGATCCGGGTGGACAAAATCTTGCTG
Δ1102intRev	CAATGATTCCAAGAAGAAGGACAGGTTCAAATAGTAGTGGCCCC
Δ1102Rev	GATC <u>TCTAG</u> ATTCTTGTGCTTGAATTCCTGC
Δ1102intFor	GGGGCCACTACTATTTGAACCTGTCTTCTTCTTGAATCATTG
1102extFor	CCGGGTATTATACCGTCAA
1102extRev	TTAGTTTAAAACTACGCCCG
Δ1102pRV300-For	GATC <u>CGGCGCG</u> CGGGCCACTACTATTTGAACCT
Δ1102pRV300-Rev	GATC <u>CCCGGT</u> CATCATAATTCAGCATCAACGGCCCA
Fusion transcriptionnelle	
Expression de <i>lmg_0524</i>	
P ₀₅₂₄ Rev	GATC <u>CCCGGT</u> TATTAGGATAAAATTACAATC
P ₀₅₂₄ For	GATC <u>GAAAT</u> CGTTTATGCTTTTGCTATTGC
Orientation de <i>lmg_0524</i>	
0524phoAFor	GATC <u>TCTGAG</u> GATGGAAAACCAACCAACCTTTTCG
0524phoARev1	GATC <u>GGTACC</u> GAGAGGGGAGTATTTTCTGTACG
0524phoARev2	GATC <u>GGTACC</u> GACGAACCAAGTGCATTCCCGAC
Orientation de <i>lmg_0526</i>	
0526phoAFor	GATC <u>TCTGAG</u> GATGGAAAACAACACAAAATTTTGC

0526phoARev1 GATCGGTACCGACATTTTTTTATTTACTGGACG
0526phoARev2 GATCGGTACCGATGTTGAGTTATTTGTCGTTGAGTTG

Orientation de AhpF

AhpFphoAFor GATCCTCGAGGATGATTTTAGATGAAAATCTGCGT
AhpFphoARev1 GATCGGTACCGAAAATTTGTTCAATTAATTCTTGTTG
AhpFphoARev2 GATCGGTACCGAATTTGCAAGACTTACTTCAATTAA

Complémentation

Complémentation de *Ilmg_0524* et *Ilmg_0526*

524-526-cplF GATCAAGCTTGTTTATGCTTTTGCGGGTATTGC
524-526-cplR GATCGTTCGACGCTTTTGAACCTTTTCGGG
524ΔC intRev CTGATTCTCCATTTTTGTTCCAAAGTTGGTTGGTTTTCCAT
524ΔC intFor ATGGAAAACCAACCAACCTTTGGAACAAAATGGAGAATCAG
524-526pBr-cplF GATCGAATTCGTTTATGCTTTTGCGGGTATTGC
524-526pBr-cplR GATCGGATCCGCTTTTGAACCTTTTCGGG
pRv300-24-526GF TGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGAAATGCCAGTACTTCTGTCCGGAATGCACTTGG
24-526-pRv300R CCAAGTGCATTCCTGCAGAGTACTGGCATTTCCTGGGCTGCAGGAATTCGATATCA
24-526-pRv300F GGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCGAAAAATTTATCAAGTCTTTTGAACCTTTTCGGG
pRv300-24-526GR CCCGAAAAAGTTCAAAGACTTGATAATTTTTCCGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCC

Purification de N^{ter}0526

malE-Nter0526For GATCGAATTCATGGAAAACAACAAAAATTTTGCC
malE-Nter0526Rev GATCGTTCGACTTATTACATTTTTTTATTTACTGGAC

Purification de N^{ter}0524

pSumoNter0524For ATGGAAAACCAACCAACC
pSumoNter0524Rev TTATTAGAGGGGAGTATTTTCTTGACG
intein0524For GATCCATATGGAAAACCAACCAACCTTTTGCC
intein0524Rev GATCCTCGAGGAGGGGAGTATTTTCTTGACG
malE-Nter0524For GATCGAATTCATGGAAAACAACCAACCTTTTGCC
malE-Nter0524Rev GATCGTTCGACTTATTAGAGGGGAGTATTTTCTTGACG
malE-Nter0524Rev2 GATCGTTCGACTTATTATTGTTCTTCAGTAACAAAAGG

Complémentation de *ahpF*

ahpF-cplF GATCAAGCTTGGGTACCAGTTGTTAAATCAT
AhpF-cplR GATCGTTCGACGGACTCCAAGAATGAGTTTTA

Operon

524-opFor GGGTTGTTCAATCTTATGGCT
524-opFor2 CAACCAACCTTTTGCCCAAAC
524-opRev TTTTCCCAAGGCAAGCGCTCC
524-525opFor GGCGATAAAACTTTTACATTC
524-525opRev TAAAAAATGAAATAAATCCCC
525-526opFor GCATGGCTTGCTAATAGTGCG
525-526opRev TTTCTGTGCCACAATGTGGGC
526-opFor GGGGATTTTGAACAACCTTAT
526-opRev AATCAATAAATCATTTCTCCC
ahpC-For TCAACAGATGCTTATCTTGG
ahpC-Rev TTATCAATTAACGACTGGC

ANNEXE 5 : Pasmides

Plasmides	Caractéristiques	Source ou référence
pBR322pGhost8	Vecteur thermo-sensible, Am ^r _{E. coli} Tet ^r _{L. lactis}	(17)
pBR322pGhost8-Δ0524	pBR322pGhost8 portant les régions Nter et Cter du gène <i>llmg_0524</i>	Ce travail
pBr322pGhost8-Δ0526	pBR322pGhost8 portant les régions Nter et Cter du gène <i>llmg_0526</i>	Ce travail
pBr322pGhost8-Δ1102	pBR322pGhost8 portant les régions Nter et Cter du gène <i>llmg_1102</i>	Ce travail
pBr322pGhost8-Δahpf	pBR322pGhost8 portant les régions Nter et Cter du gène <i>ahpf</i>	Ce travail
pRV300	Contien le gène <i>LacIM</i> , Am ^r _{E. coli} Ery ^r _{L. lactis}	
pRV300-Δ1102	pRV300 portant les régions Nter et Cter du gène <i>llmg_1102</i>	Ce travail
pRv300-ahpf ^c	pRV300 portant le locus <i>llmg_ahpC-ahpF</i>	Ce travail
pAK80	Ery ^r , contient le gène β-galactosidase sans promoteur	(86)
PAK80- <i>llmg_0524</i> ^C	pAK80 portant le locus <i>llmg_0524-0525-0526</i>	Ce travail
PAK80- <i>llmg_0524</i> ^{C,Δcyst}	pAK80 portant le locus <i>llmg_0524Δcyst-0525-0526</i>	Ce travail
pHA1-YedZ	Am ^r , contient un promoteur inductible à l'arabinose, suivie du gène <i>phoA</i>	(49)
pHA1-524phoA1	pHA1 portant la partie codant pour le domaine N-ter du gène <i>llmg_0524</i>	Ce travail
pHA1-524phoA2	pHA1 portant les parties codantes pour les domaines Nter et transmembranaire du gène <i>llmg_0524</i>	Ce travail
pHA1-526phoA1	pHA1 portant la partie codant pour le domaine N-ter du gène <i>llmg_0526</i>	Ce travail
pHA1-526phoA2	pHA1 portant les parties codantes pour les domaines Nter et transmembranaire du gène <i>llmg_0526</i>	Ce travail
pHA1-AhpFphoA1	pHA1 portant la partie codant pour le domaine Nter du gène <i>ahpF</i>	Ce travail
pHA1-524phoA2	pHA1 portant les domaines Nter et transmembranaire du gène <i>ahpF</i>	Ce travail
P ₀₅₂₄ -pTCV- <i>lac</i>	colande de la région 5' de <i>llmg_0524</i> cloning dans pTCV- <i>lac</i>	Ce travail
P ₀₅₂₆ -pTCV- <i>lac</i>	colande de la région 5' de <i>llmg_0526</i> cloning dans pTCV- <i>lac</i>	Ce travail
pMAL-c4X	vecteur de clonage, Am ^r	New England Biolabs
pMAL-0524 ^{Nter}	Expression de la partie N ^{ter} - <i>llmg_0524</i> ' taggée par MBP	Ce travail
pMAL-0526 ^{Nter}	Expression de la partie N ^{ter} - <i>llmg_0526</i> ' taggée par MBP	Ce travail

ANNEXE 6 : Protéines de surface de *L. lactis* identifiées par la méthode du Shaving

Locus	Description	Coverage	PAI	Cystéine
llmg_1441	fumarate reductase flavoprotein subunit CytoplasmicMembrane	70	12,0	1
llmg_1399	hypothetical protein llmg_1399 Extracellular	47	2,4	0
llmg_0385	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin-type Unknown	40	5,6	0
llmg_2507	Secreted 45 kDa protein precursor Extracellular	36	3,8	1
llmg_0482	hypothetical protein llmg_0482 Unknown	34	2,7	1
llmg_1578	DacB protein Unknown (This protein may have multiple localization sites.)	33	1,8	0
llmg_0904	immunogenic secreted protein precursor homolog Unknown	29	1,6	1
llmg_0229	hypothetical protein llmg_0229 Extracellular	25	2,8	0
llmg_0168	deoxyribonuclease Unknown	20	0,6	0

ANNEXE 7 : Protéines de surface de *L. lactis* identifiées par Western Blot

Locus	Description	Coverage	PAI	cystéine
llmg_1764	MetS protein Cytoplasmic	87	2,4	1
llmg_1942	glutamine ABC transporter permease and substrate binding protein CytoplasmicMembrane	73	5,0	0
llmg_2050	translation elongation factor EF-Tu Cytoplasmic	86	4,8	0
llmg_1982	DNA-directed RNA polymerase beta chain Cytoplasmic	80	4,3	3
llmg_2419	housekeeping protease Unknown	79	4,0	0
llmg_0401	Tyrosine-tRNA ligase Cytoplasmic	70	3,6	0
llmg_0127	phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase. Cytoplasmic	77	3,3	2
llmg_0072	pyruvate dehydrogenase complex E2 component Cytoplasmic	79	3,2	0
llmg_2432	alcohol-acetaldehyde dehydrogenase Cytoplasmic	81	3,1	4
llmg_1734	NADH dehydrogenase CytoplasmicMembrane	74	2,9	0
llmg_2069	PepC protein Cytoplasmic	73	2,8	2
llmg_1792	translation initiation factor IF-2 Cytoplasmic	63	2,7	0
llmg_0389	lysyl-tRNA synthetase Cytoplasmic	75	2,7	0
llmg_2327	putative glycerol uptake facilitator protein CytoplasmicMembrane	23	2,7	0
llmg_0868	Tkt protein Cytoplasmic	83	2,7	0
llmg_2055	hypothetical protein llmg_2055 Cytoplasmic	77	2,6	0
llmg_0007	GTP-dependent nucleic acid-binding protein Cytoplasmic	77	2,6	0
llmg_1119	Pyk protein. Cytoplasmic	78	2,5	1
llmg_1724	30S ribosomal protein S1 Cytoplasmic	80	2,4	0
llmg_1744	signal recognition particle-docking protein Cytoplasmic	73	2,4	0
llmg_1906	AlaS protein Cytoplasmic	80	2,4	2
llmg_1783	3-oxoacyl- Cytoplasmic	58	2,4	4
llmg_1123	purine/cytidine ABC transporter ATP-binding protein CytoplasmicMembrane	78	2,3	0
llmg_2448	PgiA protein Cytoplasmic	74	2,3	0
llmg_1516	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase Cytoplasmic	84	2,3	3
llmg_1981	DNA-directed RNA polymerase, beta' subunit Cytoplasmic	79	2,2	10 (2 CXXC)
llmg_0943	PepDB protein Cytoplasmic	76	2,2	3
llmg_0878	signal recognition particle protein Cytoplasmic	65	2,2	0
llmg_0358	penicillin-binding protein 2B CytoplasmicMembrane	74	2,1	0
llmg_2313	ArcA protein Cytoplasmic	72	2,1	2
llmg_1441	fumarate reductase flavoprotein subunit CytoplasmicMembrane	77	2,0	1
llmg_0214	Polysaccharide ABC transporter ATP-binding protein RgpD CytoplasmicMembrane	75	2,0	3
llmg_0634	pyruvate carboxylase Cytoplasmic	72	2,0	7
llmg_1741	LeuS protein Cytoplasmic	58	2,0	0
llmg_2169	ThrS protein Cytoplasmic	58	2,0	2
llmg_0467	CTP synthase Cytoplasmic	56	2,0	4
llmg_2187	hypothetical protein llmg_2187 Unknown	76	2,0	0
llmg_0519	Trigger factor Cytoplasmic	84	2,0	0
llmg_2425	DNA polymerase II Cytoplasmic	72	2,0	0
llmg_1008	GMP synthase Cytoplasmic	79	1,9	2
llmg_0783	PurB protein Cytoplasmic	73	1,9	1
llmg_0563	GlyA protein Cytoplasmic	74	1,8	0
llmg_0876	metallo-beta-lactamase superfamily protein Cytoplasmic	64	1,8	1
llmg_0511	penicillin-binding protein 1a Extracellular	54	1,8	0
llmg_1049	glycine betaine-binding periplasmic protein precursor CytoplasmicMembrane	36	1,8	1
llmg_1116	toxic anion resistance protein Cytoplasmic	75	1,8	0

llmg_2160	MetK protein Cytoplasmic	63	1,8	1
llmg_0395	thiamine biosynthesis protein thiI Cytoplasmic	55	1,8	3
llmg_0302	Putative Zn-dependent hydrolase Cytoplasmic	69	1,8	2
llmg_0739	maltose ABC transporter substrate binding protein Unknown	70	1,8	1
llmg_0369	ATP-dependent RNA helicase Cytoplasmic	55	1,8	0
llmg_0322	cation transporter CytoplasmicMembrane	47	1,8	3
llmg_0986	ATP-dependent Clp protease Cytoplasmic	67	1,7	0
llmg_0374	recombination protein A Cytoplasmic	80	1,7	0
llmg_2505	hypothetical protein llmg_2505 Cytoplasmic	57	1,7	4
llmg_2289	AckA1 protein Cytoplasmic	71	1,6	0
llmg_0557	peptide chain release factor 1 (RF-1) Cytoplasmic	57	1,6	0
llmg_0124	preprotein translocase secA subunit Cytoplasmic	66	1,6	5
llmg_1048	glycine betaine/proline ABC transporter CytoplasmicMembrane	66	1,6	0
llmg_2292	GTP-binding protein TypA/BipA homolog Cytoplasmic	52	1,6	1
llmg_0217	alpha-L-Rha alpha-1,2-L-rhamnosyltransferase RgpFI Cytoplasmic	65	1,5	2
llmg_0772	hypothetical protein llmg_0772 Cellwall	60	1,5	1
llmg_0929	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase Cytoplasmic	57	1,5	1
llmg_0066	aromatic amino acid aminotransferase Cytoplasmic	60	1,5	0
llmg_0912	MurD protein Cytoplasmic	76	1,5	2
llmg_0357	alkyl hydroperoxide reductase subunit FI Cytoplasmic	69	1,5	5 (2CXXC)
llmg_0360	D-alanine-D-alanine ligase Cytoplasmic	60	1,5	2
llmg_1805	putative phosphoglycerate dehydrogenase Cytoplasmic	54	1,5	0
llmg_2539	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase Cytoplasmic	49	1,5	2
llmg_0507	peptide binding protein Cellwall	58	1,4	1
llmg_2455	ValS protein Cytoplasmic	60	1,4	0
llmg_0517	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase Cytoplasmic	50	1,4	1
llmg_2201	putative adenylosuccinate synthetase Cytoplasmic	63	1,4	4
llmg_0002	beta subunit of DNA polymerase III Cytoplasmic	55	1,4	0
llmg_2484	GlnA protein Cytoplasmic	51	1,3	3
llmg_1692	exodeoxyribonuclease VII, large subunit Cytoplasmic	73	1,3	1
llmg_1117	NagA protein Unknown	35	1,3	3
llmg_0540	Membrane protein oxaA 2 precursor CytoplasmicMembrane	23	1,3	2
llmg_0627	long-chain acyl-CoA synthetase Cytoplasmic	48	1,3	2
llmg_0297	transcription accessory protein TEXI Cytoplasmic	67	1,3	0
llmg_0211	Rhamnosyltransferase RgpAI Cytoplasmic	50	1,3	5
llmg_1951	ATP synthase F0, A subunit CytoplasmicMembrane	31	1,3	1
llmg_2499	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase Cytoplasmic	59	1,2	2
llmg_1534	topoisomerase IV subunit A Cytoplasmic	47	1,2	1
llmg_1909	PepF protein Cytoplasmic	59	1,2	0
llmg_2413	putative zinc metalloprotease CytoplasmicMembrane	45	1,2	0
llmg_0411	heat shock protein groEL Cytoplasmic	67	1,2	0
llmg_2391	hypothetical protein llmg_2391 CytoplasmicMembrane	34	1,2	0
llmg_1089	carbamoyl-phosphate synthase, large subunit Cytoplasmic	50	1,2	12
llmg_1207	50S ribosomal protein L10 Cytoplasmic	55	1,1	0
llmg_1508	putative dihydrootatase Cytoplasmic	51	1,1	2
llmg_1310	hypothetical protein llmg_1310 Cytoplasmic	26	1,1	0
llmg_1332	Hom protein Cytoplasmic	61	1,1	0
llmg_2008	UvrABC system protein A Cytoplasmic	56	1,1	11 (5CXXC)
llmg_0617	EnoA protein Cytoplasmic	56	1,1	1
llmg_1862	cytochrome D ABC transporter ATP binding and permease protein CytoplasmicMembrane	39	1,1	2
llmg_2164	hypothetical protein llmg_2164 Cytoplasmic	61	1,1	0

llmg_1543	ribonucleoside-diphosphate reductase alpha chain Unknown	54	1,1	6 (CXXC)
llmg_1472	putative nicotinate phosphoribosyltransferase Cytoplasmic	54	1,1	2
llmg_1861	cytochrome D ABC transporter ATP binding and permease protein CytoplasmicMembrane	44	1,1	0
llmg_0263	putative methyltransferase Unknown	44	1,1	0
llmg_0021	putative cell division protein CytoplasmicMembrane	44	1,1	0
llmg_1103	hypothetical protein llmg_1103 Unknown	41	1,1	8(4CXXC)
llmg_2226	peptidase, M16 family Cytoplasmic	44	1,1	1
llmg_1586	putative exoribonuclease R Cytoplasmic	49	1,1	2
llmg_2380	50S ribosomal protein L2 Unknown	55	1,0	1
llmg_2428	septation ring formation regulator Cytoplasmic	51	1,0	1
llmg_0071	pyruvate dehydrogenase complex E3 component Cytoplasmic	44	1,0	2
llmg_0774	proline dipeptidase Cytoplasmic	44	1,0	4
llmg_0870	Transporter CytoplasmicMembrane	21	1,0	0
llmg_2556	elongation factor EF-G Cytoplasmic	51	1,0	0
llmg_1946	ATP synthase F1, beta subunit Cytoplasmic	54	1,0	0
llmg_2421	hypothetical protein llmg_2421 Cytoplasmic	51	1,0	1
llmg_1477	glycyl-tRNA synthetase beta chain Cytoplasmic	36	0,9	1
llmg_0253	phosphoglycerate kinase Cytoplasmic	64	0,9	0
llmg_1512	Putative ABC transporter ATP-binding protein CytoplasmicMembrane	48	0,9	1
llmg_0265	putative flavoprotein Unknown	34	0,9	3
llmg_2035	glucose inhibited division protein A Cytoplasmic	47	0,8	3
llmg_0942	poly(A) polymerase Cytoplasmic	43	0,8	1
llmg_0609	putative aminodeoxychorismate lyase Unknown	36	0,8	0
llmg_1685	DNA repair protein recN Cytoplasmic	33	0,8	1
llmg_0588	putative potassium transport system protein kupB CytoplasmicMembrane	22	0,8	4
llmg_1125	putative fibronectin-binding protein-like protein A Cytoplasmic	52	0,8	0
llmg_0494	putative beta-N-acetylglucosaminidase Unknown	20	0,8	2
llmg_1340	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX Cytoplasmic	56	0,8	4 (2CXXC)
llmg_0230	inositol-monophosphate dehydrogenase Cytoplasmic	46	0,8	1
llmg_1948	ATP synthase alpha chain Cytoplasmic	26	0,7	1
llmg_0199	ferrous iron transport protein B homolog I CytoplasmicMembrane	20	0,7	5(CXXC)
llmg_0483	DNA polymerase III alpha subunit Cytoplasmic	36	0,7	2
llmg_1718	excinuclease ABC, C subunit Cytoplasmic	34	0,7	6
llmg_2196	phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain Cytoplasmic	24	0,7	4 (2CXXC)
llmg_1702	glutathione reductase Cytoplasmic	41	0,7	2
llmg_2215	AspS protein Cytoplasmic	36	0,7	1
llmg_1922	exodeoxyribonuclease V alpha chain Cytoplasmic	40	0,7	0
llmg_0003	ATP-dependent nuclease subunit B Cytoplasmic	36	0,7	4 (CXXC)
llmg_1120	L-lactate dehydrogenase Cytoplasmic	29	0,7	1
llmg_0280	N-acetylglucosaminidase Extracellular	29	0,7	0
llmg_2213	hypothetical protein llmg_2213 CytoplasmicMembrane	20	0,7	1
llmg_1060	pyrimidine-nucleoside phosphorylase Cytoplasmic	44	0,7	0
llmg_0326	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase Cytoplasmic	33	0,6	2
llmg_1926	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase Cytoplasmic	28	0,6	0
llmg_2314	ArgS protein Cytoplasmic	35	0,6	0
llmg_0325	multidrug resistance protein D CytoplasmicMembrane	20	0,6	0
llmg_1382	hypothetical protein llmg_1382 Cytoplasmic	25	0,6	0
llmg_2248	putative abortive phage resistance Cytoplasmic	25	0,6	0
llmg_2276	50S ribosomal protein L1 Cytoplasmic	36	0,6	0
llmg_0319	PepN protein Cytoplasmic	34	0,6	3
llmg_0727	PTS system, mannose-specific IID component CytoplasmicMembrane	32	0,6	1

llmg_0074	pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	Unknown	25	0,6	0
llmg_0538	(3R)-hydroxymyristoyl-(acyl-carrier-protein) dehydratase	Cytoplasmic	23	0,6	1
llmg_2364	30S ribosomal protein S5	Cytoplasmic	38	0,6	0
llmg_0915	GTP-binding protein Obg	Cytoplasmic	31	0,5	0
llmg_0403	Glutamyl-aminopeptidase	Cytoplasmic	32	0,5	2
llmg_2328	X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase	Cytoplasmic	20	0,5	1
llmg_0482	hypothetical protein llmg_0482	Unknown	24	0,5	1
llmg_2161	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	Cytoplasmic	20	0,5	3
llmg_1574	chaperone protein dnaK	Cytoplasmic	25	0,4	0
llmg_0231	hypothetical protein llmg_0231	Cytoplasmic	32	0,4	4 (2CXXC)
llmg_2354	RNA polymerase alpha subunit	Cytoplasmic	20	0,4	0
llmg_1086	similar to cation (calcium) transporting ATPase	CytoplasmicMembrane	21	0,4	6
llmg_1493	50S ribosomal protein L21	Unknown	24	0,4	0
llmg_0931	MvaA protein	Cytoplasmic	23	0,4	1
llmg_0886	Gamma-glutamyl phosphate reductase	Cytoplasmic	22	0,3	4
llmg_0296	30S ribosomal protein S4	Cytoplasmic	24	0,3	0

ANNEXE 8 : Protéines de surface de *L. lactis* identifiées par la méthode d'affinité à la streptavidine

Locus	Description	Coverage	PAI	cystéine
llmg_2539	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase Cytoplasmic	65	3,73	2
llmg_1724	30S ribosomal protein S1 Cytoplasmic	85	1,57	0
llmg_2373	50S ribosomal protein L14 Unknown	37	1,50	0
llmg_1948	ATP synthase alpha chain Cytoplasmic	40	1,47	1
llmg_1498	hypothetical protein llmg_1498 Cytoplasmic	23	1,38	1
llmg_2167	fructose-bisphosphate aldolase Cytoplasmic	53	1,21	4
llmg_2161	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase Cytoplasmic	47	1,18	3
llmg_0729	PTS system, mannose-specific IIAB components Cytoplasmic	43	1,05	0
llmg_0071	pyruvate dehydrogenase complex E3 component Cytoplasmic	51	1,03	2
llmg_2069	PepC protein Cytoplasmic	42	1,00	2
llmg_0593	Prohibitin/stomatin like protein CytoplasmicMembrane	26	1,00	0
llmg_1186	hypothetical protein llmg_1186 Unknown	32	1,00	1
llmg_2060	cell division protein ftsZ Cytoplasmic	41	1,00	0
llmg_0356	alkyl hydroperoxide reductase subunit C Cytoplasmic	54	0,90	3
llmg_1120	L-lactate dehydrogenase Cytoplasmic	28	0,89	1
llmg_1119	Pyk protein Cytoplasmic	46	0,86	1
llmg_0126	Phosphocarrier protein HPr Cytoplasmic	40	0,83	0
llmg_1588	TrxB1 protein Cytoplasmic	24	0,83	2 (CXXC)
llmg_2312	ArcB protein Cytoplasmic	40	0,83	1
llmg_2484	GlnA protein Cytoplasmic	43	0,83	3
llmg_0410	heat shock protein groES Cytoplasmic	69	0,67	0
llmg_0127	phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase Cytoplasmic	25	0,67	2
llmg_1493	50S ribosomal protein L21 Unknown	34	0,60	0
llmg_0357	alkyl hydroperoxide reductase subunit F Cytoplasmic	43	0,56	5 (2CXXC)
llmg_2557	30S ribosomal protein S7 Cytoplasmic	30	0,56	0
llmg_0403	Glutamyl-aminopeptidase Cytoplasmic	30	0,54	2
llmg_2380	50S ribosomal protein L2 Unknown	39	0,53	1
llmg_2277	50S ribosomal protein L11 Unknown	21	0,50	0
llmg_2160	MetK protein Cytoplasmic	29	0,48	1
llmg_1116	toxic anion resistance protein Cytoplasmic	29	0,48	0
llmg_1950	ATP synthase F0, B subunit Unknown	23	0,48	0
llmg_1947	ATP synthase F1, gamma subunit Unknown	28	0,46	1
llmg_0727	PTS system, mannose-specific IID component CytoplasmicMembrane	34	0,46	1
llmg_0543	putative DNA/pantothenate metabolism flavoprotein Cytoplasmic	40	0,46	1
llmg_2362	50S ribosomal protein L15 Cytoplasmic	27	0,42	0
llmg_2023	universal stress protein A Cytoplasmic	30	0,42	1
llmg_0868	Tkt protein Cytoplasmic	26	0,29	0

ANNEXE 9 : Composition en acides gras des souches *L. lactis* MG1363 et Δ *ahpF* en milieu M17 glucose suite à un choc au Cu-OOH de 1 heure ou 3 heures en condition d'aération

Chiffre données en pourcentage.

	WT				<i>ΔahpF</i>			
	1 h		3 h		1 h		3 h	
	Ø	Cu-OOH	Ø	Cu-OOH	Ø	Cu-OOH	Ø	Cu-OOH
C14:0	10,0 ± 0,7	8,5 ± 0,4	8,8 ± 0,6	8,2 ± 0,2	9,1 ± 1,2	9,0 ± 0,0	4,2 ± 3,1	5,6 ± 0,2
C16:0	28,7 ± 0,5	28,5 ± 0,5	27,8 ± 0,7	28,5 ± 0,1	28,8 ± 2,9	31,9 ± 0,7	26,1 ± 2,1	30,5 ± 0,3
C16:1 n-7	3,6 ± 0,8	2,7 ± 0,5	2,1 ± 0,5	2,1 ± 0,1	3,6 ± 0,6	4,0 ± 2,1	1,8 ± 0,2	1,3 ± 0,2
C18:0	2,1 ± 0,1	2,7 ± 0,3	2,3 ± 0,5	2,3 ± 0,1	3,1 ± 0,4	3,4 ± 0,2	2,3 ± 0,1	3,4 ± 0,2
C18:1 n-7	37,8 ± 0,9	37,1 ± 0,7	20,6 ± 0,9	20,6 ± 1,1	27,7 ± 4,5	23,5 ± 2,8	14,6 ± 0,2	10,1 ± 1,8
CycC19:0	15,5 ± 0,9	15,5 ± 1,1	33,0 ± 1,0	33,6 ± 1,0	17,5 ± 1,1	23,8 ± 0,9	48,7 ± 5,1	44,8 ± 2,5

Valorisation du travail de thèse

Article Scientifique :

Roussel C., et al., 2015. A CX2CX10CX2C motif involves in binding of zinc ion in two membrane proteins, Llm_g_0524 and Llm_g_0526 in *Lactococcus lactis*, and role of Llm_g_0524 in cumene hydroperoxide resistance. BMC Microbiology (*envoyé*)

Roussel C., et al., 2015. Innovative strategies based on lactic acid bacteria and redox potential for improving processes in the fermented foods industry. Trend in food sciences & technology (*envoyé*)

Cachon R., Gavoye S., **Roussel C.**, Gaudu P., Beuvier E., 2015. Activités réductrices des bactéries lactiques dans les procédés fromagers. Revue Industries Alimentaires & Agricoles

Communications Scientifiques affichées :

Roussel C., Gaudu P., Gervais P., Cachon R., 2015. Mechanisms involved in the reducing activity of *Lactococcus lactis*. Bacterial Electron Transfer Meeting, Vimeiro, Portugal.

Roussel C., Cesselin B., Gaudu P., Gervais P., Cachon R., 2014. Identification of two membrane proteins involved in cell wall architecture in *Lactococcus lactis* TIL46. Communication affichée 24th International ICFMH Symposium, Foodmicrobio, Nantes, France.

Roussel C., Gaudu P., Gervais P., Cachon R., 2013. Are thiol surface proteins involved in the reducing activity in *Lactococcus lactis* TIL46 ? Colloque des jeunes chercheurs, INRA, Jouy-en-Josas, France.

Roussel C., Gaudu P., Gervais P., Cachon R., 2012. Mécanismes physiologiques et composés biochimiques impliqués dans la modification du potentiel d'oxydo-réduction (Eh) chez *Lactococcus lactis*. Communication affichée. 18ème Forum des jeunes chercheurs, Besançon, France.

Roussel C., Gaudu P., Gervais P., Cachon R., 2012. Physiological mechanisms involved in the reducing activity of *Lactococcus lactis*. Communication affichée. 23rd International ICFMH Symposium, Foodmicrobio, Istanbul, Turquie.

Roussel C., Gaudu P., Gervais P., Cachon R., 2012. Identification et compréhension des mécanismes physiologiques impliqués dans l'activité réductrice de *Lactococcus lactis*. Communication affichée. 18ème Colloque du Club des Bactéries Lactiques, Clermont-Ferrand, France.

Communications Scientifiques orales :

Roussel C., Cesselin B., Gaudu P., Gervais P., Cachon R., 2014. Identification de protéines membranaires impliquées dans l'architecture de la paroi cellulaire chez *Lactococcus lactis* TIL46. 20ème Forum des jeunes chercheurs, Besançon, France.

Roussel C., Gaudu P., Gervais P., Cachon R., 2013. Identification des protéines à thiols exofaciaux impliqués dans la modulation du potentiel d'oxydo-réduction chez *Lactococcus lactis* TIL46. 19ème Colloque du Club des Bactéries Lactiques, Bordeaux, France.

Roussel C., Gaudu P., Gervais P., Cachon R., 2013. Identification des protéines à thiols exofaciaux impliqués dans la modification du potentiel d'oxydo-réduction chez *Lactococcus lactis* TIL46. 19ème Forum des jeunes chercheurs, Dijon, France.

Understanding of the physiological and genetic mechanisms involved in the reducing activity of *Lactococcus lactis*

Célia ROUSSEL

Lactic acid bacteria, particularly *Lactococcus lactis* are used in dairy industry. These bacteria are known to have a reducing activity, indicating their ability to lower the redox potential (E_h) of a medium. *L. lactis* MG1363 genome encodes several proteins with a CXXC motif, potentially linked with a redox activity. To understand the role of proteins rich in cysteine located at the surface of *L. lactis*, two approaches were used, one bioinformatics and biochemical another.

For bioinformatic approach, interest was focused on two proteins of unknown function and CX₂CX₁₀CX₂C motif: Llm_g_0524 and Llm_g_0526. Their corresponding genes form an operon temporarily induces in early growth phase. In these two proteins, the pattern chelate a zinc ion via its cysteine residues. The zinc-cysteine complexe is very stable, it suggests a probable role in protein stability. Data suggest that this operon contributes to the cell wall integrity.

The identification of exofacial thiol proteins by a biochemical approach indicates that AhpF is present at the surface of *L. lactis*. The *ahpF* gene deletion causes a strong sensitivity to the cumene hydroperoxide, but no sensibility for hydrogen peroxide. In the mutant Δ *ahpF* incubation with cumene hydroperoxide modified fatty acid proportion, cyclopropanation mechanism thus contributes to the survival in response to oxidative stress.

Understanding the lactococci functions involved in the reduction activity allows a better control of redox potentiel in the fermented food production and thus a better control of foodbornes microorganisms in these products. Food-Redox project is financially supported by the French National Research Agency.

Key-words: *Lactococcus lactis*, reducing activity, surface proteins, CXXC

Compréhension des mécanismes physiologiques et génétiques impliqués dans l'activité réductrice de *Lactococcus lactis*

Célia ROUSSEL

Les bactéries lactiques, en particulier *Lactococcus lactis* sont utilisées en industrie agroalimentaire. Ces bactéries sont connues pour avoir une activité réductrice, désignant leur aptitude à abaisser le potentiel redox (E_h) d'un milieu. Le génome de *L. lactis* MG1363 code plusieurs protéines possédant un motif CXXC potentiellement liées à une activité redox. Pour comprendre le rôle des protéines de surface riches en cystéines, deux approches ont été utilisées.

Par l'approche bioinformatique, notre intérêt s'est porté sur deux protéines de surface de fonctions inconnues et à motif $CX_2CX_{10}CX_2C$: Llmg_0524 et Llmg_0526. Leurs gènes forment un opéron induit temporairement en début de croissance. Dans les deux protéines, le motif chélate un ion de zinc par les résidus cystéines, formant un complexe très stable. Nos données suggèrent que cet opéron contribue à l'intégrité de la paroi cellulaire et que le zinc participe à la stabilité des protéines.

L'identification des protéines à thiols exofaciaux par une approche biochimique indique la présence d'AhpF à la surface de *L. lactis*. La délétion du gène *ahpF* entraîne une forte sensibilité du mutant au cumène hydroperoxyde, mais aucune au peroxyde d'hydrogène. Le cumène hydroperoxyde provoque une modification de la proportion en acide gras chez le mutant Δ *ahpF*, le mécanisme de cyclopropanation contribue à sa survie en réponse à un stress oxydatif.

La compréhension des fonctions impliquées dans l'activité réductrice des lactocoques permettra une meilleure maîtrise du E_h dans la fabrication des produits fermentés et un meilleur contrôle des flores pathogènes et d'altérations. Le projet Food-Redox a été financé par l'ANR.

Mots clés : *Lactococcus lactis*, activité réductrice, protéines de surface, CXXC