HAL open science

Immobilisation des lactocoques

Mariam Ibrahim, Romain Briandet, Michel-Yves Mistou, Agnès Chrétien, Josselyne Tremblay, Saulius Kulakauskas

To cite this version:

Mariam Ibrahim, Romain Briandet, Michel-Yves Mistou, Agnès Chrétien, Josselyne Tremblay, et al.. Immobilisation des lactocoques. Le Lait, 2004, 84 (1-2), pp.103-114. 10.1051/lait:2003049 . hal-00895534

HAL Id: hal-00895534

https://hal.science/hal-00895534v1

Submitted on 11 May 2020

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.

Copyright

Lait 84 (2004) 103–114
© INRA, EDP Sciences, 2004
DOI: 10.1051/lait:2003049

Revue

Immobilisation des lactocoques

Mariam IBRAHIM[a], Romain BRIANDET[b], Michel-Yves MISTOU[c], Agnès CHRÉTIEN[a], Josselyne TREMBLAY[a], Saulius KULAKAUSKAS[a]*

[a] Unité de Recherches Laitières et de Génétique Appliquée, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France
[b] Unité de Recherche en Bioadhésion et Hygiène des Matériaux, INRA, 91744 Massy Cedex, France
[c]Unité de Biochimie et Structure des Protéines, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

Abstract – Immobilization of lactococci. Bacteria present in dairy products exist predominantly in an immobilized form, as coagulated milk is not a liquid and thus does not allow bacteria to move free. Lactococci may be immobilized by attachment to surfaces, chain formation and by trapping in the extracellular matrix. Use of semi-liquid medium to simulate immobilized growth revealed characteristic properties of non-planctonic lactococcal cultures, which are: limited distribution in the medium, slow growth, a mixture of the stationary and exponentially growing cells, and genetic instability of the culture. These characteristics depend on molecular composition of the cell wall. We have shown that peptidoglycan (PG) breaks, which can be introduced not only by PG hydrolases, but also by defects of PG synthesis machinery (mutation in the *ponA* gene) play a significant role in immobilization (adhesion, sedimentation, chain formation). We also showed that cell wall anchored proteins play a positive role in *L. lactis* adhesion. Our studies contribute to the identification of molecular determinants responsible for the phenomenon of adhesion, formation of biofilms, and more generally for functioning of the lactic acid bacteria in natural and industrial environments. They have equally as objective to define the molecular factors necessary for the establishment of positive biofilms, which would minimize the risks of contamination in dairy industry.

***Lactococcus lactis* / adhesion / biofilm / cell wall / peptidoglycan hydrolase**

Résumé – Dans l'industrie laitière, les bactéries se retrouvent la plupart du temps sous une forme immobilisée, dans la mesure où le lait coagulé ne constitue pas un milieu liquide et ne permet donc pas aux bactéries en croissance des déplacements libres. Notre principal objectif réside dans la modélisation de la croissance immobilisée. Les lactocoques peuvent être immobilisés par un attachement sur les surfaces, la formation de chaînes ou l'emprisonnement au sein d'une matrice extra cellulaire. L'utilisation d'un milieu semi-liquide comme modèle d'immobilisation nous a permis de montrer que les propriétés caractéristiques de la croissance non-planctonique des lactocoques consistent en une distribution limitée dans le milieu, une croissance lente et le mélange de cellules en phases stationnaires et exponentielles, et que l'immobilisation est à l'origine de l'instabilité génétique de la culture. Ces caractéristiques dépendent de la composition moléculaire de la paroi cellulaire. Les cassures de peptidoglycane (PG), qui peuvent être introduites non seulement par des PG hydrolases, mais aussi suite à des défauts de la machinerie de synthèse du PG (mutation du gène *ponA*), sont importantes dans la croissance sous forme immobilisée des

* Auteur correspondant : Saulius.Kulakauskas@diamant.jouy.inra.fr

lactocoques (adhésion, sédimentation, formation de chaînes). Nous avons également montré que les protéines ancrées à la paroi cellulaire jouent un rôle positif dans l'adhésion de *L. lactis*. Nos études contribuent à l'identification des déterminants moléculaires responsables de la mise en place des phénomènes d'adhésion, de la formation des biofilms, et plus généralement à la connaissance du fonctionnement des bactéries lactiques dans les milieux naturels et industriels. Elles ont également pour objectif de définir les bases moléculaires requises pour l'établissement de biofilms positifs, qui pourraient minimiser les risques de contamination dans l'industrie.

***Lactococcus lactis* / adhésion / biofilm / paroi cellulaire / peptidoglycane hydrolase**

1. INTRODUCTION

Malgré le fait que dans les conditions naturelles les bactéries effectuent leur croissance essentiellement sous la forme de communautés immobilisées (les films, les colonies ou les agrégats), leur activité est traditionnellement étudiée à partir de cellules planctoniques isolées. Les premières études moléculaires et génétiques portant sur des communautés bactériennes multicellulaires immobilisées et sur les interactions entre microorganismes à l'intérieur de ces communautés sont apparues seulement dans la dernière décennie. Les études sur les bactéries lactiques (BL) n'ont pas échappé à cette approche « planctonique ». Les BL non motiles peuvent se déplacer en milieu liquide grâce au mouvement Brownien et par sédimentation. Cependant, dans l'industrie laitière, les bactéries se retrouvent la plupart du temps sous forme immobilisée, dans la mesure où le lait coagulé ne constitue pas un milieu liquide et ne permet donc pas aux bactéries en croissance des déplacements libres. L'immobilisation des bactéries est encore plus évidente au sein du fromage.

Une forme de croissance immobilisée réside dans la formation de biofilms, qui peuvent être définis comme une communauté bactérienne contenue dans une matrice de polymères organiques, adhérant sur une surface [8]. Si cette surface est constituée d'autres bactéries, la formation des agrégats peut être aussi considérée comme un biofilm. Le plus souvent, le polymère organique qui maintient les cellules en contact les unes avec les autres au sein du biofilm est un exopolysaccharide (EPS). Les cellules peuvent aussi être maintenues en contact sous forme de longues chaînes par des peptidoglycanes, un complexe polysaccharide de grande taille qui est le principal constituant de la paroi cellulaire. Par conséquent, de longues chaînes bactériennes, comme les agrégats, peuvent présenter des caractéristiques communes avec les biofilms, même si leur formation ne nécessite pas d'adhésion.

Puisque les biofilms de différentes bactéries existent sous diverses formes, leur définition est en évolution constante. Les dernières définitions prennent en considération non seulement des caractéristiques aisément observables (les cellules sont irréversiblement attachées à la surface ou interface, incorporées dans la matrice de substances polymères extracellulaires que ces cellules ont produites, et qui inclut des composants non cellulaires ou abiotiques), mais également d'autres attributs physiologiques de l'organisation des biofilms, comme un taux de croissance diminué et le fait que les bactéries de biofilm expriment des gènes que les bactéries planctoniques ne transcrivent pas [9]. Bien que la question de savoir si les cultures immobilisées de *L. lactis* et autres BL répondent à toutes les exigences de la définition d'un biofilm demande des études plus approfondies, il est absolument évident que les bactéries dans l'industrie laitière sont la plupart du temps dans des milieux non liquides (lait coagulé, fromage) et se développent de façon non-planctonique. Le terme de croissance non-planctonique semble approprié pour faire référence à toute une variété de cultures bactériennes immobilisées,

par opposition aux cultures de bactéries planctoniques où les cellules sont libres et indépendantes les unes des autres dans un milieu liquide.

L'immobilisation des BL a été étudiée grâce à des technologies d'immobilisation cellulaire (utilisation de bactéries incorporées dans l'alginate ou autre matrice polymère pour des applications industrielles ; [22, 24]). Une autre possibilité d'application des BL immobilisées est liée à leur utilisation en tant que biofilms « positifs » [5]. Les biofilms « positifs » sont des biofilms protecteurs susceptibles de modifier les propriétés physico-chimiques des substrats [6], avec pour conséquence positive, une altération de l'implantation de micro-organismes planctoniques indésirables entrant à leur contact. Les biofilms « positifs » de lactocoques producteurs de bactériocine ont été employés avec succès au laboratoire [14]. En outre, une large gamme de produits fondée sur les propriétés de l'association *Bacillus* et *Lactobacillus* est commercialisée pour le traitement des lisiers, des litières, la réduction des odeurs et la prévention contre les bactéries pathogènes (www.cobiotex.fr). Nous nous sommes concentrés sur le modèle *Lactococcus lactis*. En effet, en tant que représentant majeur des bactéries lactiques utilisées dans l'industrie laitière, il est de ce fait le plus étudié et constitue un exemple représentatif pour l'étude de l'influence exercée par les processus d'immobilisation sur la production et les propriétés des produits laitiers.

Nous nous attacherons ici aux cultures non-planctoniques de lactocoques, qui peuvent exister sous plusieurs états : les cellules peuvent être attachées aux surfaces, former des agrégats (chaînes) ou être emprisonnées dans la matrice extra-cellulaire.

2. ATTACHEMENT AUX SURFACES

Quand les lactocoques se développent en milieu liquide, une partie de la population bactérienne adhère aux surfaces du réceptacle, formant les communautés bactériennes multicouches qui ressemblent à un biofilm. L'adhésion est la première étape, absolument nécessaire pour la formation du biofilm. Mais même si l'adhérence est suffisamment efficace pour conduire au recouvrement de la surface par des couches multiples de cellules bactériennes, il a été observé que des cellules fortement adhérentes peuvent ne pas conduire à la structure tridimensionnelle typique d'un biofilm [13]. Il a été proposé d'expliquer les propriétés adhésives des bactéries par les propriétés physico-chimiques globales de la surface des cellules [4]. Il a été établi que la surface lactococcale se compose principalement de protéines et de polysaccharides, et possède un caractère hydrophile [3]. Le rôle exact de chaque composant moléculaire de la surface des lactocoques dans l'adhésion et la formation d'un biofilm n'a pas encore été clairement établi. Dans ce contexte, l'implication dans l'adhérence de deux molécules de la paroi des lactocoques, PrtP et AcmA, a été étudiée, ainsi que l'influence de l'osmolarité du milieu.

2.1. Rôle de la protéase de paroi, PrtP, dans l'adhésion des lactocoques aux surfaces solides

Les protéines ancrées à la paroi cellulaire (PAPC) font partie d'un groupe de composants de la paroi souvent impliqués dans les propriétés adhésives des bactéries virulentes [18]. Trois protéines appartenant à la catégorie de PAPC ont été décrites chez *Lactococcus lactis* : le facteur sexuel CluA codé par un gène porté par le chromosome, la protéase NisP codée par un gène de plasmide et la protéase PrtP, également codée par un plasmide, qui initie la dégradation protéolytique des caséines de lait [18]. Une étude a été menée visant à établir l'influence de la protéase de paroi PrtP sur les caractéristiques hydrophiles/hydrophobes et le comportement bioadhésif de *Lactococcus lactis*. Il a été montré que la protéase PrtP ancrée à la paroi, outre sa fonction princeps, confère aux lactocoques des propriétés physico-chimiques de

surface qui leur donnent un pouvoir adhésif plus grand sur des surfaces hydrophobes [15]. Ces observations suggèrent que l'expression de PrtP peut influencer la croissance des lactocoques dans les produits laitiers non seulement par son activité protéolytique mais également par ses propriétés bioadhésives.

2.2. L'implication des cassures du peptidoglycane dans la formation de biofilms par les lactocoques

Une autre molécule ayant la possibilité d'influencer la formation de biofilms est l'autolysine majeure des lactocoques AcmA. La raison pour laquelle cette protéine peut affecter l'adhérence est double : en premier lieu, on peut supposer qu'AcmA a la capacité d'augmenter les propriétés adhésives de *L. lactis* en jouant, comme c'est le cas pour les autolysines de *Staphylococcus epidermidis* et de *Listeria,* le rôle d'adhésines [12, 21] ; en second lieu, cette protéine a la capacité d'hydrolyser le composant majeur de la paroi, le peptidoglycane (PG ; [10, 23]).

L'apparition de cassures au niveau du PG est un processus naturel qui est impliqué dans la croissance et le renouvellement de la paroi, la séparation des cellules, ou encore la germination des spores [10]. Ces cassures peuvent être catalysées par des PG hydrolases, également appelées autolysines. Ces enzymes ont pour cible soit les chaînes de PG (N-acétyl-muramidases et N-acétyl-glucosaminidases), soit les ponts peptidiques (endopeptidases et amidases ; [10, 23]).

Il a été montré que la souche MG1363*acmA*Δ*1*, mutée dans le gène de l'autolysine majeure des lactocoques, adhère moins efficacement que la souche sauvage MG1363 à quatre supports solides distincts : le verre, le polystyrène, le polytétrafluoroéthylène et l'acier inoxydable [17]. Il a été également montré par microscopie électronique à balayage (MEB) que la souche MG1363 est capable de couvrir une surface d'acier inoxydable par une épaisse couche de cellules, en formant une structure qui ressemble à un biofilm. Cependant, la présence de brèches a été observée, ce qui pourrait indiquer une certaine fragilité du biofilm liée à une faible production d'exopolymères, nécessaires à la consolidation du biofilm. Il a été établi que la forte production d'exopolysaccharides chez les lactocoques résulte de l'activité d'un plasmide qui n'est pas présent dans la souche MG1363 [11, 25]. Néanmoins des ORFs (open reading frames, ou phases ouvertes de lecture) codant pour des enzymes de la synthèse des polysaccharides de la paroi ont été identifiées dans le génome de *L. lactis* par recherche d'homologie de séquences [2]. La présence de brèches dans le biofilm de MG1363 pourrait dépendre de l'expression de ces ORFs.

La souche MG1363*acmA*Δ*1* voit sa capacité à former ce type de biofilm diminuée par rapport à la souche sauvage [17]. AcmA étant une PG hydrolase possédant une activité N-acétyl-glucosamidase, nous pouvons supposer que l'introduction de cassures du PG par cette activité est responsable du phénomène observé.

Comme nous l'avons indiqué, AcmA est une protéine pouvant posséder des propriétés adhésives intrinsèques. Néanmoins, les données montrant que le taux d'adhésion de MG1363 peut être restitué par addition de lysozyme dans le milieu de culture de MG1363*acmA*Δ*1*, ne permettent pas d'étayer cette hypothèse. Le fait que le lysozyme soit différent d'AcmA par sa taille et sa structure, tout en ayant une activité muramidase qui résulte aussi en l'hydrolyse du PG, suggère que c'est bien l'absence d'activité PG hydrolase d'AcmA et non la protéine en elle-même qui est responsable de la baisse d'adhésion de MG1363*acmA*Δ*1*. Si cette supposition est correcte, cela signifie que les cassures du PG introduites par des activités de type muramidase (lysozyme) ou N-acétyl-glucosamidase (AcmA) augmentent l'adhésion.

L'hydrolyse du PG pourrait affecter la liaison aux ions métalliques chargés positivement, à l'origine de répercussions éventuelles au niveau des propriétés physico-chimiques de surfaces des cellules et par conséquent des propriétés adhésives. L'hydrolyse du PG pourrait aussi augmenter l'adhésion bactérienne en permettant l'exposition de molécules de paroi adhésives qui sont normalement enfouies dans la couche de PG. Enfin, l'augmentation de l'adhésion pourrait résulter d'un conditionnement de la surface par des fragments de paroi, libérés par l'hydrolyse du PG.

Mais la diminution simultanée de la capacité à faire des chaînes et de celle à adhérer suggère que la formation des chaînettes peut également représenter un facteur d'anti-adhérence. Les souches portant une mutation dans le gène *acmA* sont viables, mais forment de longues chaînes [7]. Nous avons observé une forte corrélation entre la séparation des cellules et l'adhésion : la souche sauvage MG1363 croît sous forme de cellules individualisées ou de courtes chaînes, alors que le mutant *acmA* non-adhésif forme de longues chaînes. L'addition de lysozyme, qui coupe les chaînes, à des cultures de mutants *acmA*, ou l'introduction d'une mutation dans le gène *ponA*, qui code pour l'un des gènes de synthèse de PG, résulte en un raccourcissement des chaînes et une augmentation simultanée de l'adhésion. Cette corrélation suggère que l'individualisation des cellules peut interférer avec le mécanisme d'adhésion.

L'adhérence bactérienne est la résultante de forces attractives et répulsives (essentiellement van der Waals, électrostatiques et Lewis acide/base). Les travaux de van Oss ont permis de mettre en évidence l'importance des interactions Lewis acide/base (telles que la liaison hydrogène) dans les phénomènes interfaciaux en milieu aqueux [25]. Contrairement aux interactions van der Waals et électrostatiques, ces interactions polaires n'agissent que pour de très faibles distances de séparation entre les cellules microbiennes et la surface solide (distances <10 nm). Ainsi, la rigidité de la chaînette incurvée de MG1363*acmA*Δ*1* ne permet pas à toutes les bactéries d'échanger de telles interactions polaires avec la surface, et les forces attractives exercées sur celles qui adhèrent peuvent ne pas être pas assez fortes pour garder attachée toute la chaîne ; par conséquent, l'ensemble de la chaîne peut être facilement détaché par d'autres facteurs, comme le flux hydrodynamique du milieu liquide. Par conséquent, la rigidité de la chaîne peut être considérée comme un facteur additionnel négatif sur l'adhérence (Fig. 1).

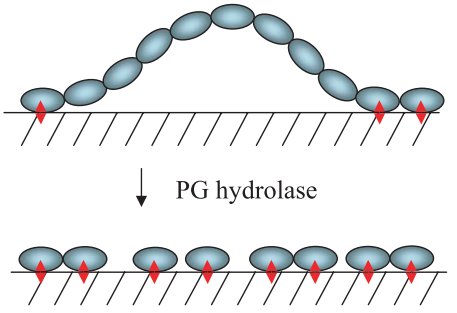

Figure 1. La rigidité de la chaîne bactérienne comme facteur négatif d'adhérence. La rigidité de la chaînette incurvée ne permet pas à toutes les bactéries d'établir avec la surface des interactions polaires Lewis acide/base (♦), qui sont efficaces seulement à des distances courtes (<10 nm). Les forces attractives exercées sur les cellules qui adhèrent peuvent ne pas être assez fortes pour garder attachée toute la chaîne ; par conséquent, l'ensemble de la chaîne peut être facilement détaché par d'autres facteurs, comme le flux hydrodynamique du milieu liquide.

Figure 1. Bacterial chains as a negative adhesion factor. The rigidity of the curved chain does not allow all bacteria to approach surface and to exchange attractive Lewis acide/base interactions (♦), which are efficient only in short distances (<10 nm). The attractive forces of these cells that do adhere are not strong enough to keep all attached chain; consequently, the whole chain can be easily detached by other factors, like hydrodynamic flow of the liquid medium.

En conclusion, les résultats présentés suggèrent que les activités qui conduisent à l'apparition de cassures du PG jouent un rôle positif dans la formation de biofilms de *L. lactis*. De plus, l'augmentation d'adhésion du streptocoque thermophile CNRZ7 formant les chaînettes, après addition de lysozyme, indique que la régulation de l'adhésion par l'hydrolyse du PG pourrait ne pas être la caractéristique exclusive des lactocoques, mais aussi s'étendre aux streptocoques [16, 17].

2.3. Induction osmotique de formation de biofilms de *L. lactis*

Des données récentes ont montré que l'adhérence des lactocoques était liée à la résistance à la pression osmotique. Le mutant OSM31, sélectionné sur la base d'une croissance réduite en conditions d'osmolarité élevée après mutagénèse par transposon, est doté d'une capacité d'adhérence nettement accrue en comparaison avec la souche sauvage. De plus, l'addition d'osmoprotectants diminue ses propriétés adhésives [19]. Bien que le mécanisme moléculaire à l'origine de cette augmentation d'adhérence reste à élucider, l'obtention d'un tel mutant indique que les lactocoques peuvent efficacement couvrir une surface, et que cette capacité est, au moins dans certains cas, régulée par l'osmolarité du milieu. Il est à remarquer que OSM31 montre également une adhérence accrue entre cellules, et forme ainsi efficacement des agrégats. Le mutant OSM31 est donc un outil très valable pour l'étude des potentialités d'immobilisation et de formation des biofilms de BL.

3. CHAÎNES BACTÉRIENNES

Puisque l'hydrolyse du PG est nécessaire pour la séparation des cellules, l'activité de la PG hydrolase *AcmA* est liée non seulement à l'adhérence, mais également à la formation d'un type particulier d'agrégats bactériens – les chaînes. Comme nous l'avons déjà indiqué, les chaînes peuvent être considérées comme une catégorie particulière d'immobilisation, puisque les cellules sont reliées les unes avec les autres et ne peuvent pas se déplacer librement dans le milieu liquide. Nous noterons néanmoins que la croissance sous forme de chaîne ne conduit qu'à une immobilisation partielle des cellules parce qu'il existe une mobilité de la chaîne dans le milieu. Cependant, ce type d'immobilisation affecte la sédimentation des bactéries et résulte en une distribution restreinte dans le milieu. Pour la souche *acmA*, dans des conditions de croissance exponentielle (18 h), nous avons observé un profil de distribution inégal, et en phase stationnaire (24 h), les bactéries formant les chaînes sédimentent plus rapidement (Fig. 2 et [16]). Ces irrégularités de distribution entraînent un retard du taux de croissance de la culture entière de la souche *acmA*, qui peut être ramené au niveau du type sauvage par simple agitation du milieu. Au contraire, il a été montré que des bactéries anaérobies comme les *Streptococcus thermophilus* pouvaient également avoir de meilleures conditions de croissance selon leur capacité à former des chaînes, dans la mesure où une sédimentation accélérée leur donne accès à des couches plus profondes, et donc moins bien oxygénées du milieu [16].

Les chaînes des mutants *acmA* peuvent être rompues par l'addition de PG hydrolase extracellulaire (lysozyme d'œuf de poule ajouté dans le milieu, ou autolysines bactériennes sécrétées ; [16, 17]). Il a également été établi que dans une population bactérienne mixte, l'autolysine AcmA de *L. lactis*, qui hydrolyse spécifiquement le peptidoglycane, peut agir sur les streptocoques. Ces résultats suggèrent que dans ces cultures mixtes, l'autolysine des lactocoques agit comme un médiateur d'interactions entre deux espèces d'un genre différent : la muramidase d'une espèce peut influer sur la capacité à former des chaînes d'une autre espèce. L'autolysine AcmA des lactocoques hydrolyse le PG et pourrait alors influencer la longueur des chaînes et les

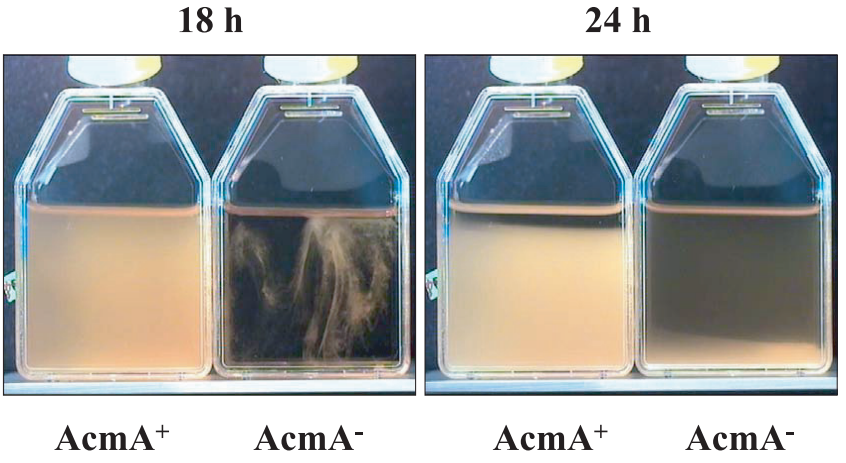

Figure 2. Croissance de *L. lactis* MG1363 et de son mutant *acmA* dans le milieu M17 liquide. Inoculum ~10^3 cellules·mL^{-1}. Des images ont été prises après 18 et 24 h de croissance.

Figure 2. Growth of *L. lactis* MG1363 (wt) and its *acmA* mutant in liquid M17 medium. Inoculum ~10^3 cells·mL^{-1}. Images were taken after 18 and 24 h of growth.

propriétés de sédimentation et d'adhésion des bactéries d'autres groupes phylogénétiques [16, 17]. Il doit être noté également que des bactéries formant de longues chaînes sont souvent trouvées non seulement en laboratoire, mais également dans les environnements naturels et industriels.

4. PIÉGEAGE DANS LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

Comme nous l'avons déjà fait remarquer, les bactéries de l'industrie laitière sont la plupart du temps dans des milieux non-liquides, emprisonnées dans le coagulum de lait. Nous avons développé un système modèle qui permet la croissance de cultures de lactocoques sous une forme non-planctonique. Ce système repose sur l'utilisation d'un milieu semi-liquide, contenant de faibles (0,003 %) concentrations d'agar [16, 17]. Dans ce cas, la viscosité du milieu contraint les bactéries à croître

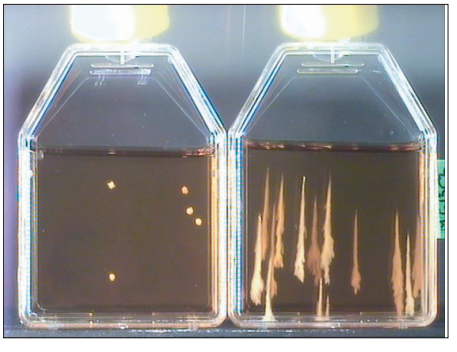

Figure 3. Croissance de *L. lactis* MG1363 et de son mutant *acmA* dans le milieu M17 semi-liquide. Inoculum ~10 cellules/flacon. L'image a été prise après 24 h de croissance.

Figure 3. Growth of *L. lactis* MG1363 (wt) and its *acmA* mutant in semi-liquid M17 medium. Inoculum ~10 cells/flask. Image was taken after 24 h of growth.

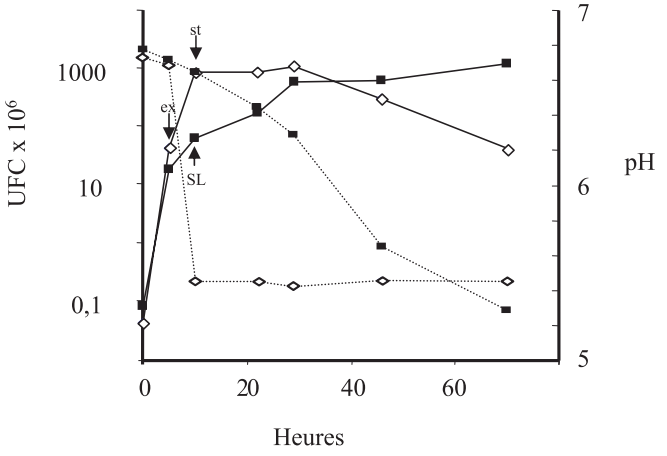

Figure 4. Croissance (——) de *L. lactis* MG1363 dans le milieu M17 liquide (◊) et semi-liquide (■) et acidification (.....) du milieu. Inoculum ~10^5 cellules·mL^{-1}. Les flèches indiquent le temps de l'extraction des protéines pour l'analyse protéomique. Pour chaque mesure dans le milieu semi-liquide un flacon séparé a été employé, et le milieu a été mélangé avant la mesure.

Figure 4. Growth (——) of *L. lactis* MG1363 in liquid (◊) and semi-liquid (■) M17 medium, and acidification (.....) of the medium. Inoculum ~10^5 cells·mL^{-1}. Arrows indicate the time of protein extraction for proteome analysis. For semi-liquid medium, the separate flasks were used for each measurement, and medium was mixed before measurement.

au contact les unes des autres (Figs. 3, 5 et [16]). De ce point de vue, le milieu semi-liquide peut être considéré comme une modélisation d'un lait coagulé ou d'un yaourt.

L'observation de la croissance bactérienne dans ces conditions révèle des caractéristiques qui impliquent cette immobilisation. En premier lieu, la culture bactérienne se développe sous forme d'une grande colonie (Figs. 3, 5 et [16]). La formation de cette colonie dépend de la sédimentation et du mouvement Brownien, qui représentent les principaux moyens de déplacement pour les lactocoques. Le cas le plus évident est représenté par une colonie initiée à partir d'une cellule ; dans ce cas, croissance et sédimentation simultanées résultent en la formation de colonies striées (Fig. 3 et [16]).

En outre, nous avons observé que les cultures en milieux semi-liquides atteignent un nombre de cellules maximal plus tardivement qu'en milieu liquide (Figs. 4, 5). Cette croissance plus lente peut être expliquée par une distribution bactérienne limitée dans le milieu : quand les cellules ne peuvent pas librement se déplacer, la concentration des cellules sous forme de « colonie » conduit à un épuisement local des nutriments du milieu. En raison de l'absence de motilité, leur accès à d'autres domaines du milieu plus riches en aliments est restreint, ce qui implique une croissance plus lente. De manière intéressante, la colonie augmente en volume même après 94 h, mais la quantité de cellules cesse d'augmenter. Ceci peut être expliqué par une croissance et une autolyse simultanées, ce qui a lieu en cas d'immobilisation. Même s'il est évident que la culture immobilisée se développe, comme en témoigne l'augmentation de son volume, le coeur de la structure doit déjà être occupé par des cellules souffrant de l'absence de nutriments, et qui devraient avoir des propriétés

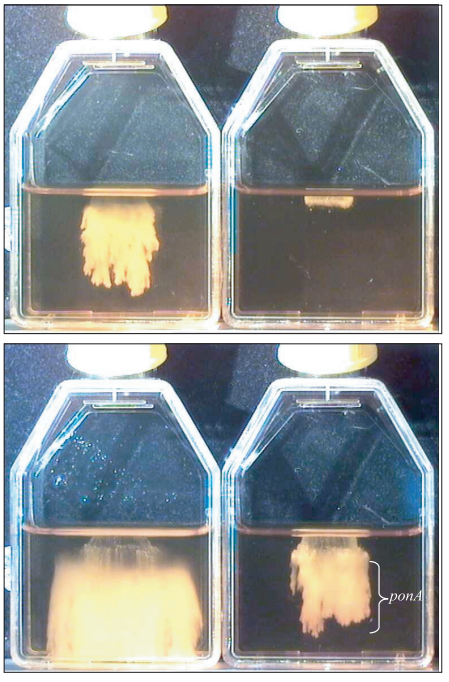

Figure 5. Croissance de *L. lactis* MG1363 et de son mutant *acmA* dans le milieu M17 semi-liquide. Inoculum ~ 10^5 cellules sur la surface du milieu. Des images ont été prises après 24 et 94 h de croissance.

Figure 5. Growth of *L. lactis* MG1363 (wt) and its *acmA* mutant in semi-liquid M17 medium. Inoculum ~10^5 cells on the surface of the medium. Images were taken after 24 and 94 h of growth.

de phase stationnaire. Ces hypothèses sont confirmées par l'analyse du protéome des cellules, collectées après 12 h de croissance en conditions immobilisées. Malgré la croissance de la culture, nous observons l'expression de gènes (*rpsA*, *rpsB*, *arg*S), qui sont normalement exprimés en phase stationnaire dans le milieu liquide (Fig. 6 ; M.-Y. Mistou et A. Sanselme, 2002, communication personnelle).

L'acidification du milieu est un facteur également affecté – en milieu semi-liquide, la baisse de pH est plus lente, puisqu'il faut 48 h pour atteindre la valeur pH 5,7, mais l'acidification finale est plus forte (Fig. 4). Ceci peut être aussi expliqué par l'acidification locale du milieu à l'intérieur de la « colonie », alors qu'en périphérie, le milieu n'étant pas acide, les bactéries peuvent se développer sans restrictions en rapport avec un stress acide. Cette acidification locale du centre de la « colonie » peut être responsable de l'induction du gène *sodA* (Fig. 6), qui est normalement induit en phase stationnaire par l'accroissement de l'acidification [20]. Ainsi, l'une des caractéristiques liées au piégeage des bactéries en milieu semi-liquide est la distribution inégale des bactéries au sein du milieu, ce qui est à l'origine de l'épuisement local du milieu et donc du mélange de cellules en phases stationnaires et exponentielles.

La troisième observation est que l'expansion de la population bactérienne dépend de facteur « mécanique » comme la taille des chaînettes. En fait, nous pouvons facilement supposer que de longues chaînes bactériennes sont emprisonnées dans la matrice extracellulaire (agar) et ainsi sédimentent plus lentement (Figs. 3, 5 et [16]). L'emprisonnement des cellules est également évident quand la colonie est générée à partir d'une cellule – dans ce cas, la colonie est ronde et non pas en strie comme

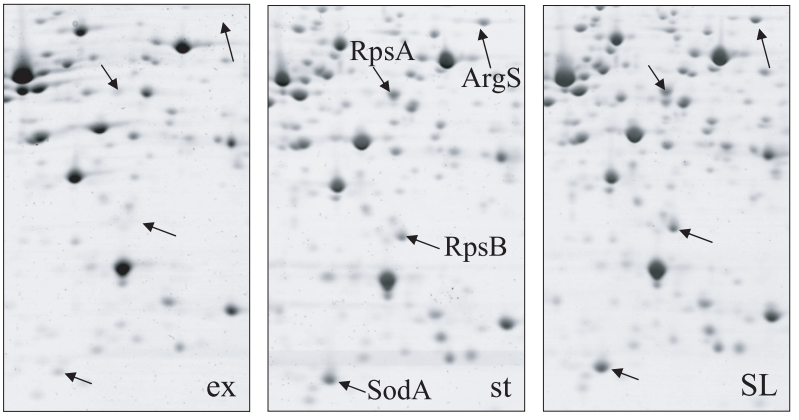

Figure 6. Fragment du gel bidimensionnel chargé par les protéines de la souche MG1363, extraites de cultures en croissance exponentielle (**ex**) et stationnaires (**st**) en milieu semi-liquide (**SL**). Voir également la figure 4 pour les points d'extraction.

Figure 6. Two dimensional gel analysis of cytoplasmic protein extracts of MG1363 cells, proteins, extracted from exponential (**ex**) and stationary (**st**) phase cultures and from semi-liquid medium (**SL**). One portion of the gel is shown. See also Figure 4 for the points of extraction.

dans le cas d'une souche unicellulaire (Fig. 3 et [16]). Ainsi l'expansion de la colonie et l'accès aux nutriments du mutant à longues chaînes sont plus limités. La restriction de croissance, provoquée par une sédimentation lente crée une pression sélective qui a pour conséquence l'apparition de mutants. En cas d'immobilisation provoquée par les longues chaînes, ceci conduit à l'accumulation de mutants à chaînes plus courtes. Nous avons montré que dans le cas de *acmA*, le raccourcissement des chaînes est dû à l'accumulation de mutations dans le gène *ponA* (Fig. 5 et [17]). Des mesures de la perméabilité de la paroi par hybridation in situ par fluorescence nous ont permis de montrer que le double mutant *ponA acmA* présente une augmentation du nombre de cassures du PG en comparaison de la souche parentale *acmA* [1, 17]. Le raccourcissement des chaînes du double mutant *ponA acmA* peut être interprété comme une conséquence de l'apparition de cassures du PG, qui pourrait être due aux perturbations de la synthèse de PG résultant de l'absence de PonA. Le plus remarquable dans ce cas est que l'immobilisation provoque l'accumulation de mutants dans la culture – en fin de culture, nous ne trouvons plus de manière prédominante la souche *acmA* inoculée, mais des mutants secondaires qui sédimentent plus vite (Fig. 5 et [17]).

En outre, ceci suggère que la longueur des chaînes de la souche MG1363*acmA*Δ*1* peut être utilisée comme indicateur phénotypique de l'activité provoquant les cassures du PG. La sédimentation des lactocoques dépend de la longueur des chaînes et peut donc également servir pour la sélection de mutants ayant subi des dégâts de la paroi avec une augmentation des cassures de PG.

5. CONCLUSION

Nous pouvons distinguer trois types d'immobilisation des lactocoques : l'adhérence sur une surface, la formation de chaînes et le piégeage dans la matrice extracellulaire.

Les cellules immobilisées se comportent différemment des cellules planctoniques. La caractéristique commune à tous les types d'immobilisation est une distribution restreinte dans le milieu. Même la formation de chaînes qui résulte en une immobilisation partielle des cellules, limite leur distribution en milieu liquide. D'autre part les chaînes interviennent dans l'adhérence aux surfaces et sur la sédimentation en milieu semi-liquide.

Il s'avère que l'état du PG, et plus particulièrement la présence de cassures introduites soit par l'activité des hydrolases de PG, soit par l'apparition de mutations dans le mécanisme de la synthèse de PG, joue un rôle important dans chacun des trois types d'immobilisation décrits : le mutant *acmA* déficient dans l'hydrolyse de PG a une capacité d'adhérence diminuée, présente une structure en chaînette et possède un profil de sédimentation différent de la souche sauvage. Il est très probable que la formation des chaînes soit liée à tous ces phénotypes. Par conséquent, tout facteur affectant la taille des chaînes, affecte également l'immobilisation. Ces facteurs peuvent être chimiques (addition de lysozyme), génétiques (introduction de mutations) et biologiques (interactions entre bactéries).

La restriction de distribution dans le milieu diminue l'accès aux nutriments, ce qui a comme conséquence une croissance plus lente et un mélange des phases exponentielles et stationnaires de croissance. Ceci est également à l'origine d'une pression de sélection en faveur de l'émergence de cellules ayant la possibilité de déplacements plus rapides. Le résultat de cette pression sélective conduit dans le cas des lactocoques non-motiles, à l'apparition de mutants présentant une sédimentation plus rapide.

À terme, notre modélisation de la croissance immobilisée contribuera à l'identification des déterminants moléculaires directement responsables, ou régulateurs, de la mise en place des phénomènes d'adhésion, de formation des biofilms, et plus généralement à la connaissance du fonctionnement des BL dans les milieux naturels et industriels. Ils ont également pour objectif de définir les bases moléculaires requises pour l'établissement de biofilms positifs, qui pourraient minimiser les risques de contamination dans l'industrie. En outre, le lactocoque est une bactérie Gram-positif qui appartient à la famille des *Streptococcae*, et est ainsi phylogénétiquement proche de la plupart des microbes pathogènes, qui sont retrouvés dans les produits laitiers (listeria, streptocoques, staphylocoques, et entérocoques). Par conséquent les lactocoques peuvent représenter un système modèle pour étudier la croissance immobilisée des microbes pathogènes du lait.

Remerciements : Nous remercions A. Delacroix, M.-N. Bellon-Fontaine, S.D. Ehrlich, P. Serror, V. Juillard et A. Gruss pour les discussions concernant ce travail, L. Kowalczuk pour sa participation aux expériences, et G. Buist pour le don des souches.

RÉFÉRENCES

[1] Bidnenko E., Mercier C., Tremblay J., Tailliez P., Kulakauskas S., Estimation of the state of the bacterial cell wall by fluorescent in situ hybridization, Appl. Environ. Microbiol. 64 (1998) 3059–3062.

[2] Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarme K., Weissenbach J., Ehrlich S.D., Sorokin A., The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403, Genome Res. 11 (2000) 1731–1753.

[3] Boonaert C.J., Rouxhet P.G., Surface of lactic acid bacteria: relationships between chemical composition and physicochemical properties, Appl. Environ. Microbiol. 66 (2000) 2548–2554.

[4] Bos R., van der Mei H.C., Busscher H.J., Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study, FEMS Microbiol. Rev. 23 (1999) 179–230.

[5] Briandet R., Maîtrise de l'hygiène des surfaces par la création de biofilms : Aspects physico-chimiques, Thèse École Nationale Supérieure Agronomique, Rennes, France, 1999.

[6] Briandet R., Herry J.M., Bellon-Fontaine M.-N., Determination of the van der Waals, electron-acceptor and electron-donor character of static microbial biofilms by contact angle measurements, Colloid Surface B 21 (2001) 299–310.

[7] Buist G., Kok J., Leenhouts K.J., Dabrowska M., Venema G., Haandrikman A.J., Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation, J. Bacteriol. 177 (1995) 1554–1563.

[8] Costerton J.W., Cheng K.J., Geesey G.G., Ladd T.I., Nickel J.C., Dasgupta M.T., Marrie J., Bacterial biofilms in nature and disease, Annu. Rev. Microbiol. 41 (1987) 435–464.

[9] Donlan R.M., Costerton J.W., Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, Clin. Microbiol. Rev. 15 (2002) 167–193.

[10] Foster S.J., Popham D.L., Structure and synthesis of cell wall, spore cortex, teichoic acids, S-layers and capsules, in: Sonenshein A.L., Hoch J.A., Losick R. (Eds.), *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells, ASM Press, Washington, D.C., 2002, pp. 21–41.

[11] Gasson M.J., Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing, J. Bacteriol. 154 (1983) 1–9.

[12] Heilmann C., Hussain M., Peters G., Gotz F., Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface, Mol. Microbiol. 24 (1997) 1013–1024.

[13] Huber B., Riedel K., Hentzer M., Heydorn A., Gotschlich A., Givskov M., Molin S., Eberl L., The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility, Microbiology 147 (2001) 2517–2528.

[14] Leriche V., Chassaing D., Carpentier B., Behaviour of *L. monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*, Int. J. Food. Microbiol. 51 (1999) 169–182.

[15] Mercier C., Rôle des composants de la paroi dans la formation de biofilms par les lactocoques, Thèse Université Paris XI, Orsay, France, 2001.

[16] Mercier C., Domakova E., Tremblay J., Kulakauskas S., Effects of a muramidase on a mixed bacterial community, FEMS Microbiol. Lett. 187 (2000) 47–52.

[17] Mercier C., Durrieu C., Briandet R., Domakova E., Tremblay J., Buist G., Kulakauskas S., Positive role of peptidoglycan breaks in lactococcal biofilm formation, Mol. Microbiol. 46 (2002) 235–243.

[18] Navarre W.W., Schneewind O., Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63 (1999) 174–229.

[19] Obis D., Adaptation de *Lactococcus lactis* au stress hyperosmotique, Thèse Université Paris XI, Orsay, France, 2000.

[20] Sanders J.W., Leenhouts K.J., Haandrikman A.J., Venema G., Kok J., Stress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene, J. Bacteriol. 177 (1995) 5254–5260.

[21] Santiago N.I., Zipf A., Bhunia A.K., Influence of temperature and growth phase on expression of a 104-kilodalton Listeria adhesion protein in *Listeria monocytogenes*, Appl. Environ. Microbiol. 65 (1999) 2765–2769.

[22] Selmer-Olsen E., Birkeland S., Sorhaug T., Effect of protective solutes on leakage from and survival of immobilized *Lactobacillus* subjected to drying, storage and rehydration, J. Appl. Microbiol. 87 (1999) 429–437.

[23] Shockman G.D., Barrett J.F., Structure, function, and assembly of cell walls of Gram-positive bacteria, Annu. Rev. Microbiol. 37 (1983) 501–527.

[24] Sun W., Griffiths M.W., Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads, Int. J. Food Microbiol. 61 (2000) 17–25.

[25] Van Oss C.J., Forces interfaciales en milieux aqueux, Masson, Paris, France, 1996.