ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture Agriculture Alimentation Food Biologie Biology Environnement Environment Santé Health

Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

(AgroParisTech)

Spécialité : Génie Microbiologique

présentée et soutenue publiquement par

Hélène Velly

le 1er Octobre 2014

Etude de l'évolution de l'état physiologique de *L. lactis* TOMSC161 au cours de la fermentation et de son incidence sur la résistance à la lyophilisation et au stockage

Directeur de thèse : **Marielle Bouix**
Co-encadrement de la thèse : **Fernanda FONSECA**

Jury

Mme Marielle BOUIX, Professeur, AgroParisTech	Examinateur
Mme Agnès DELACROIX-BUCHET, Ingénieur de Recherche, INRA	Examinateur
Mme Nathalie DESMASURES, Professeur, Université de Caen Basse-Normandie	Examinateur
Mme Fernanda FONSECA, Chargée de Recherches, INRA	Examinateur
Mme Joëlle REITZ-AUSSEUR, Responsable Biotechnologies, Soredab SA,	Examinateur
Mme Anne-Marie REVOL-JUNELLES, Professeur, ENSAIA	Rapporteur
Mme Anne THIERRY, Chargée de Recherche, INRA	Rapporteur

AgroParisTech - INRA
UMR782, Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires
F-78850 Thiverval-Grignon

ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture Agriculture Alimentation Food Biologie Biology Environnement Environment Santé Health

Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

(AgroParisTech)

Spécialité : Génie Microbiologique

présentée et soutenue publiquement par

Hélène Velly

le 1er Octobre 2014

Etude de l'évolution de l'état physiologique de *L. lactis* TOMSC161 au cours de la fermentation et de son incidence sur la résistance à la lyophilisation et au stockage

Directeur de thèse : **Marielle Bouix**
Co-encadrement de la thèse : **Fernanda FONSECA**

Jury

Mme Marielle BOUIX, Professeur, AgroParisTech	Examinateur
Mme Agnès DELACROIX-BUCHET, Ingénieur de Recherche, INRA	Examinateur
Mme Nathalie DESMASURES, Professeur, Université de Caen Basse-Normandie	Examinateur
Mme Fernanda FONSECA, Chargée de Recherches, INRA	Examinateur
Mme Joëlle REITZ-AUSSEUR, Responsable Biotechnologies, Soredab SA,	Examinateur
Mme Anne-Marie REVOL-JUNELLES, Professeur, ENSAIA	Rapporteur
Mme Anne THIERRY, Chargée de Recherche, INRA	Rapporteur

AgroParisTech - INRA
UMR782, Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires
F-78850 Thiverval-Grignon

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent au CNIEL pour le financement de cette thèse CIFRE, et plus particulièrement à Jean-Pierre Guyonnet pour sa confiance dans ce projet et pour avoir permis sa réalisation. Je ne peux remercier le CNIEL sans également remercier ACTALIA à l'origine de ce projet de thèse passionnant et plus particulièrement Emmanuel Jamet, Sébastien Fraud et Caroline Hoarau pour leurs conseils scientifiques avisés à chaque réunion.

J'exprime ma reconnaissance à Anne-Marie Revol-Junelles, Professeur à l'ENSAIA de Nancy et Anne Thierry, Chargée de Recherche à l'INRA de Rennes, pour avoir accepté d'assumer la charge de rapporteur de cette thèse. Je tiens également à remercier Agnès Delacroix-Buchet, Nathalie Desmasures et Joëlle Reitz-Ausseur de bien vouloir évaluer ce travail et participer à ce jury de thèse en tant qu'examinateur.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Grignon, dirigé successivement par Isabelle Souchon et François Boué que je remercie pour leur accueil agréable au sein du laboratoire.

Je souhaite tout particulièrement remercier ma directrice de thèse, Marielle Bouix, Professeur à AgroParisTech, pour son encadrement, son appui scientifique et son soutien. Je t'exprime ma sincère reconnaissance pour la grande confiance que tu m'as accordée. Je tiens également à te remercier de m'avoir transmis tes connaissances et surtout ta passion pour le génie microbiologique depuis mes débuts en tant qu'élève ingénieur et jusqu'à cette soutenance de thèse.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à ma co-encadrante de thèse Fernanda Fonseca ainsi qu'à Stéphanie Passot pour leur rigueur scientifique et leurs critiques constructives mais aussi leurs encouragements constants. Vos connaissances et conseils scientifiques dispensés au cours de cette thèse ont grandement contribué à mon apprentissage de la recherche et au développement d'un esprit critique. Merci pour votre disponibilité et votre aide précieuse lors de la rédaction des publications et de la thèse.

Je remercie également toutes les personnes qui m'ont aidée dans la réalisation de cette thèse. Un grand merci à Sarrah pour les nombreuses heures passées ensemble devant le cytomètre et pour ton aide. Merci à Eric et Séverine pour leur expertise en biologie moléculaire. Merci également à Jérôme pour ton aide et surtout pour ta persévérance pour les extractions protéiques, Stéphanie pour tes conseils en fermentation et au CINAC, Pascale pour les mesures effectuées en IRTF jusqu'au dernier moment ! Je tiens aussi à remercier les personnes de l'INRA de Jouy-en-Josas qui ont aussi contribué à ce travail : Pierre pour avoir lancé cette grande aventure autour de la biologie moléculaire, Anne-Laure, Eric, Valentin et Didier pour leur appui technique et scientifique et bien évidemment Agnès pour nos échanges scientifiques mais aussi pour ta gentillesse et tes encouragements.

Je remercie Caroline (future princesse de Suède !) et Claire pour leur présence, leur bonne humeur, leur bienveillance et pour avoir pris le temps de m'écouter dans les bons comme dans les mauvais moments.

Un très grand merci à toutes les personnes du laboratoire ayant contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce travail et ayant rendu mon séjour au laboratoire si agréable. Merci à Catherine pour ta bienveillance, Nour pour ta gentilesse, la Baronne pour tes jeux de mots, les gars de l'atelier pour leur dépannage rapide pendant les manips, mais aussi Brigitte, Armelle, Sandra, Francoise, Anne-Sophie, Thomas, David…

Une pensée pour tous les stagiaires rencontrés au cours de ces trois années de thèse et qui ont contribué à la bonne ambiance au sein du laboratoire et plus particulièrement Hélène pour sa participation dans ce travail de thèse mais aussi un certain KB pour m'avoir évité l'hypoglycémie au cours de la rédaction de la thèse!

Un grand merci à toutes les personnes qui ont partagé mon bureau : Clément, Perrine, Séverine, Julie B., Cécile, Grégoire et enfin Julie M. Merci de m'avoir supporté ! Sévérine, ma première coach sportive lors de cette thèse, je n'oublierai pas nos longues journées ensemble devant nos fermenteurs, nos moments de détente, nos longues discussion, nos fou-rires… Cécile, nos séances shopping, cinéma et nos pauses discussion m'ont permis de passer de nombreux bons moments. Et enfin Grégoire, alias Grogoire Rambo Burge, qui m'a supporté pendant la rédaction de la thèse mais que j'ai aussi dû supporter avec son dynamisme débordant, son débit de paroles et son humour parfois douteux ! Merci, l'ambiance n'aurait pas été la même sans toi.

L'équipe de choc ne serait pas complète sans Guillaume qui m'a rendu alcoolique à cause de ses panels et avec qui j'ai partagé cet « agréable moment » qu'est la rédaction de la thèse, et Nadège, ma deuxième coach sportive, merci pour ton amitié et pour ta présence qui a été indispensable pour moi. A quand un spectacle de la licorne qui jongle et de l'écureuil qui joue de la flute de pan ? Tes dessins vont me manquer.

Merci également à Julie G., ma co-équipière au Times'up et Josua pour votre amitié et tous ces bons moments passés ensemble et les futurs à venir. Je n'oublie pas également Yohann, Ana Carolina, Maud, Solenne, Vincent…

J'aimerai également remercier mes parents, mes frères et ma sœur pour avoir toujours été là pour moi et pour votre soutien qui a contribué à l'aboutissement de cette thèse.

Enfin, le plus grand des mercis revient du fond du cœur à Clément, mon chéri. Merci pour ton soutien sans faille, ton réconfort dans les moments difficiles, pour ta patience, surtout lors de la rédaction, et même pour ta contribution dans cette thèse !

Liste des publications et communications

Publication dans des revues à comité de lecture

H. Velly, F. Fonseca, S. Passot, A. Delacroix-Buchet, M. Bouix. Cell growth and resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 following freezing, drying and freeze-dried storage are differentially affected by fermentation conditions. Journal of Applied Microbiology, accepté pour publication. 2014

H. Velly, F. Fonseca, S. Passot, C. Penicaud, H. Beinsteiner, S. Ghorbal, P. Lieben, M. Bouix. Cyclopropanation of unsaturated fatty acids and membrane rigidification improve the freeze-drying resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161. Soumis à Applied Microbiology and Biotechnology.

H. Velly, P. Renaud, A.L. Abraham, V. Loux, A. Delacroix-Buchet, F. Fonseca, M. Bouix. Genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161, isolated from non-scalded curd pressed cheese. Soumis à Genome Announcements.

Communication lors de congrès

Communications affichées

H. Velly, F. Fonseca, A. Delacroix-Buchet, S. Passot, M. Bouix. Amélioration de la résistance à la lyophilisation de *Lactococcus lactis* par la modulation des paramètres de fermentation. Journées des Microbiologistes de l'INRA, 13-15 novembre 2012, L'Isle-sur-la-Sorgue, France.

H. Velly, F. Fonseca, A. Delacroix-Buchet, S. Passot, M. Bouix. How do fermentation conditions impact the freeze-drying and storage resistances of *Lactococcus lactis* ?. Journées de l'Ecole Doctorale ABIES, 26-27 février 2013, Paris, France. Obtention du prix du meilleur poster.

H. Velly, F. Fonseca, A. Delacroix-Buchet, S. Passot, M. Bouix. Influence of fermentation conditions on the survival and acidifying activity of freeze-dried *Lactococcus lactis*. 5th congress of european microbiologists (FEMS 2013), July 21-25, 2013, Leipzig, Germany.

Communication orale

H. Velly, F. Fonseca, A. Delacroix-Buchet, S. Passot, M. Bouix. Propriétés de la membrane et résistance à la lyophilisation de ferments lactiques : Intérêt de la mesure de fluidité membranaire par cytométrie en flux. 17^{e} Congrès Annuel de l'Association Française de Cytométrie, 16-18 Octobre 2013, Strasbourg, France.

Liste des abréviations

μ_{max}	taux de croissance
Aw	activité de l'eau
C14:0	acide tétradécanoïque
C16:0	acide hexadécanoïque
C16:1	acide hexadécénoïque
C17:0	acide heptadécanoïque
C18:0	acide octadécanoïque
C18:1	acide actodécénoïque
CFA	acide gras cyclique (Cyclic Fatty Acid)
CIP	protéines induites par le froid (Cold Induced Protein)
CSP	protéines de stress froid (Cold Shock Protein)
cycC19:0	acide méthyl-octadécanoïque
DHE	dihydroéthidium
DPH	1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène
G/S	teneur en matière grasse sur extrait sec
GC-MS	chromatographie gazeuse couplée à un spectre de masse
H/ESD	humidité sur extrait sec dégraissé
H_2O_2	peroxyde d'hydrogène
HPLC	chromatographie liquide haute performance
HSP	protéines de stress chaud (Heat Shock Protein)
IRTF	infrarouge à transformée de Fourier
L.	Lactococcus
LAB	bactérie lactiques (Lactic Acid Bacteria)
LDH	lactate déshydrogénase
O_2^-	anion superoxyde
OH°	radical hydroxyl
r	anisotropie de fluorescence
ROS	espèce réactive de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)
SFA	acide gras saturé (Saturated Fatty Acid)
ssp.	subspecies
Tcoll	température d'effondrement
$t_{dpH0.7}$	temps nécessaire pour avoir une chute de pH de 0,7 dans le lait
Tg	température de transition vitreuse d'un produit sec
Tg'	température de transition vitreuse d'un produit frais
Tm	température de transition lipidique
t_{spe}	temps spécifique
UFA	acide gras insaturé (Unsaturated Fatty Acid)
UFC	unité formant colonie
X_{max}	biomasse finale

Sommaire

Sommaire

Introduction générale 5
Chapitre I - Synthèse bibliographique 8
I.1. Lactococcus lactis 8
I.1.1. Caractéristiques générales 8
I.1.2. La cellule procaryote à Gram positif 9
I.1.2.1. Le contenu cytoplasmique 10
I.1.2.2. L'enveloppe cellulaire 10
I.1.3. Le métabolisme 15
I.1.3.1. Métabolisme des glucides 15
I.1.3.2. Métabolisme des protéines 17
I.1.3.3. Autres métabolismes 19
I.1.4. La production sous forme de ferments 20
I.1.4.1. Intérêt technologique de *Lactococcus lactis* en production fromagère 20
I.1.4.2. L'intérêt des ferments 21
I.1.4.3. La production de ferments lactiques 21
I.2. La lyophilisation des ferments lactiques 26
I.2.1. Aspects physiques de la lyophilisation 26
I.2.1.1. Les principaux mécanismes de la lyophilisation de concentrés bactériens 26
I.2.2. Les dommages cellulaires provoqués par la lyophilisation 33
I.2.2.1. Dommages causés par la congélation 33
I.2.2.2. Dommages causés par la déshydratation 34
I.2.2.3. Dommages causés pendant le stockage 36
I.2.3. Conduite optimale du procédé de lyophilisation 38
I.2.3.1. Lyophilisation 38
I.2.3.2. Stockage 39
I.2.3.3. Réhydratation 41
I.3. Mécanismes de protection des cellules bactériennes contre la lyophilisation et le stockage à l'état lyophilisé 42
I.3.1. L'addition de molécules protectrices 42
I.3.1.1. Nature des agents protecteurs 42
I.3.1.2. Mécanismes de protection des agents protecteurs 43
I.3.2. Modification de l'état physiologique des cellules bactériennes en amont de la stabilisation 46
I.3.2.1. Réponses aux stress de *Lactococcus lactis* 47
I.3.2.2. Influence des conditions de fermentation sur l'état physiologique des bactéries lactiques et sur leur résistance au procédé de stabilisation 55
I.4. Résumé, objectifs et stratégie 62

Chapitre II - Matériels et méthodes 66
II.1. Microorganisme d'étude 66
II.1.1. Choix de la souche 66
II.1.2. Réalisation de cryotubes 66
II.2. Procédé de production de ferments lactiques concentrés et lyophilisés 66
II.2.1. Préculture 66
II.2.2. Conduite de la fermentation 67
II.2.2.1. Fermenteur, capteurs et régulateurs 67
II.2.2.2. Milieu et conditions de culture 68
II.2.2.3. Suivi de la fermentation 68
II.2.2.4. Arrêt de la fermentation 70
II.2.3. Concentration et lyoprotection 70
II.2.4. Lyophilisation 71
II.2.4.1. Equipement de lyophilisation 71
II.2.4.2. Cycle de lyophilisation 72
II.3. Evaluation de l'état physiologique des cellules bactériennes 73
II.3.1. Propriétés fonctionnelles des ferments 73
II.3.1.1. Mesure de la cultivabilité 73
II.3.1.2. Mesure de l'activité acidifiante 74
II.3.1.3. Evaluation de la résistance aux différentes étapes du procédé de préservation 76
II.3.2. Mesure de l'état d'oxydation des cellules 77
II.3.3. Mesure de la fluidité membranaire 78
II.3.4. Mesure de la température de transition lipidique par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier 80
II.3.5. Analyse de la composition en acides gras 83
II.3.6. Séquençage et annotation du génome 86
II.3.6.1. Extraction de l'ADN 86
II.3.6.2. Séquençage et assemblage 88
II.3.6.3. Annotation 89
II.3.7. Analyse du transcriptome 89
II.3.8. Analyse du protéome 94
II.4. Vérification des caractéristiques physiques de la matrice lyophilisée 98
II.4.1. Mesure de la température de transition vitreuse par analyse enthalpique différentielle 98
II.4.2. Mesure de la teneur en eau 101
II.4.3. Mesure de l'activité de l'eau 101
II.5. Plan d'expérience et traitements statistiques 102
II.5.1. Plan de Box Behnken 102
II.5.2. Analyse de la variance (ANOVA) 103
II.5.3. Comparaison de moyennes 103

II.5.4. Recherche de corrélation 103
Chapitre III - Résultats et discussion 103
III.1. Influence des conditions de fermentation sur la résistance de *Lactococcus lactis* TOMSC161 aux différentes étapes de la lyophilisation et au stockage 103
III.1.1. Contexte et objectifs 103
III.1.2. Publication n° 1 : « Cell growth and resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 following freezing, drying and freeze-dried storage are differentially affected by fermentation conditions » 105
III.1.3. Conclusion 128
III.2. Propriétés de la membrane cytoplasmique de *Lactococcus lactis* TOMSC161 et résistance à la lyophilisation et au stockage 131
III.2.1. Contexte et objectifs 131
III.2.2. Publication N°2 : « Cyclopropanation of unsaturated fatty acids and membrane rigidification improve the freeze-drying resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 » 132
III.2.3. Conclusion 155
III.3. Etat d'oxydation des cellules de *Lactococcus lactis* TOMSC161 et résistance à la lyophilisation et au stockage 157
III.3.1. Contexte et objectifs 157
III.3.2. Genome Announcement : « Genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 » 159
III.3.3. Publication n°3 : « Whole transcriptome and proteome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 reveal an increase of oxidative stress responses in late stationary phase improving their freeze-drying and storage resistance » 163
III.3.4. Le stress oxydatif à l'origine de la sensibilité de *Lactococcus lactis* TOMSC161 à la lyophilisation et au stockage 193
III.3.4.1. Impact de la présence d'un antioxydant sur la résistance à la lyophilisation et au stockage de *L. lactis* TOMSC161 193
III.3.4.2. Impact de la température et de la phase de croissance sur l'état d'oxydation cellulaire de *L. lactis* TOMSC161 aux différentes étapes du procédé de production 195
III.3.4.3. Relation entre état d'oxydation cellulaire et résistance à la lyophilisation et au stockage de *L. lactis* TOMSC161 197
III.3.5. Conclusion 200
III.4. Fonctionnalité du ferment lyophilisé en transformation fromagère 203
III.4.1. Contexte et objectif 203
III.4.2. Méthodologie 203
III.4.3. Résultats 204
III.4.3.1. Caractéristiques des ferments 204
III.4.3.2. Analyses microbiologiques des fromages 205
III.4.3.3. Analyses physico-chimiques des fromages 206
III.4.3.4. Analyses sensorielles des fromages affinés 208
III.4.4. Conclusion 209

Conclusion générale et perspectives 208
Références bibliographiques 214

Introduction

Introduction générale

Les bactéries lactiques sont utilisées empiriquement depuis des millénaires pour la production de produits fermentés d'origine végétale ou animale comme les produits laitiers (yaourts, laits fermentés et fromages). Ces bactéries jouent un rôle fondamental dans la qualité sanitaire et organoleptique de ces produits. Ce n'est qu'à partir du 20ème siècle que les progrès engendrés par la microbiologie et le développement des technologies fromagères industrielles ont conduit la profession à s'intéresser d'avantage à la sélection et à la maîtrise des microorganismes d'intérêt laitier. De plus, les préoccupations de sécurité alimentaire ont conduit à réduire fortement la microflore indigène du lait et les contaminations par l'environnement (amélioration de l'hygiène des équipements et mécanisation). Par conséquent, les professionnels fromagers ont commencé à produire leurs propres ferments et progressivement des entreprises se sont spécialisées dans cette production. Aujourd'hui, l'utilisation, par l'industrie fromagère, de ferments lactiques disponibles sur le marché est de plus en plus conséquente et systématique.

Ces ferments sont produits, récoltés, concentrés, puis stabilisés et conservés sous une forme congelée ou lyophilisée en vue de leur utilisation ultérieure dans les procédés industriels. Au préalable, les producteurs de ferments sélectionnent des souches par rapport à leurs propriétés technologiques fromagères (acidification, protéolyse, lipolyse…) mais aussi en fonction de leur aptitude à croître et à résister au procédé de stabilisation et de conservation. En effet, ces étapes de stabilisation et de conservation génèrent différents stress pour les cellules, ce qui entraîne une dégradation de leur viabilité et de leur activité biologique. Cependant, la conservation de ces bactéries lactiques et de leurs propriétés technologiques est primordiale pour que les industriels disposent de souches stables dans le temps. Ces critères de sélection ont ainsi restreint la diversité des souches bactériennes commercialisées et donc utilisées en fromageries, amenant à une standardisation des fromages.

A l'heure actuelle, l'industrie laitière s'intéresse de plus en plus à la production et à l'utilisation de nouvelles souches ayant des propriétés spécifiques voire même atypiques. Ces souches peuvent ainsi apporter des propriétés organoleptiques différentes et recherchées dans le produit final, et par conséquent donner satisfaction à une demande croissante des consommateurs de plus de diversité et de typicité d'un point de vue organoleptique.

Ainsi, Actalia Produits Laitiers, pôle d'expertise en microbiologie et technologie laitière, étudie depuis plusieurs années de nouvelles souches de lactocoques en technologie fromagère de pâte pressée non cuite. Bien que leur premier rôle soit d'acidifier le lait par la production d'acide lactique, certaines souches ont un rôle spécifique sur la qualité organoleptique du produit fini en termes de texture et d'arômes. Le choix de la souche de lactocoques apparait donc déterminant pour la fabrication de pâtes pressées non cuites. Actalia Produits Laitiers a ainsi caractérisé plusieurs

collections de souches de lactotocoques ayant des propriétés originales, notamment la collection Savoicîme (ODG Emmental de Savoie, Tomme de Savoie et Raclette de Savoie). Toutefois, certaines de ces souches ne sont pas produites industriellement et donc ne sont pas commercialisées en raison de difficultés de production rencontrées au niveau de la croissance (production de biomasse) et/ou au niveau de la stabilisation et du stockage.

C'est dans ce contexte que le projet de thèse DEPHY (Diversité Etat PHYsiologique) a été construit avec le soutien financier du CNIEL, Centre National Interprofessionel de l'Economie Laitière. Pour ce projet, une souche de lactocoques (*L. lactis* ssp. *lactis* TOMSC161, collection Savoicîme) isolée d'une tomme de Savoie de fabrication artisanale a été retenue. Cette souche, technologiquement intéressante en termes de pouvoir acidifiant (pas trop élevé) et de pouvoir texturant (texture fondante), est sensible à la lyophilisation. Afin d'améliorer la résistance de cette bactérie à la lyophilisation, étape critique du procédé de production de ferments, trois stratégies principales qui seront détaillées dans la synthèse bibliographique, peuvent être envisagées : (1) l'optimisation de la conduite du procédé de préservation (lyophilisation et stockage), (2) l'optimisation de la formulation du lyoprotecteur (ajout d'un milieu protecteur avant lyophilisation) et (3) la modification de l'état physiologique des cellules au moment de la récolte et donc en amont de la lyophilisation en agissant sur les conditions de fermentation. Cependant les connaissances sur l'évolution de l'état physiologique des cellules au cours de la fermentation et sur les mécanismes cellulaires impliqués dans la tolérance des bactéries à ce procédé de préservation restent encore insuffisantes. L'objectif scientifique de ce projet relève de la compréhension de l'incidence de l'état physiologique des cellules bactériennes au moment de l'arrêt de la fermentation sur leur résistance à la lyophilisation et au stockage. Cette meilleure compréhension et maîtrise de l'état physiologique des cellules doit permettre de répondre aux objectifs technologiques d'amélioration de la résistance de la souche *L. lactis* TOMSC161 à la lyophilisation, et, d'une façon plus large, de proposer aux professionnels de la filière laitière des outils simples d'évaluation de l'état physiologique pour produire des souches technologiquement intéressantes mais non disponibles actuellement.

Ce mémoire présente en 4 chapitres principaux l'ensemble des travaux effectués dans le cadre de cette thèse.

Dans un premier chapitre, une synthèse bibliographique a été réalisée et présente *Lactococcus lactis*, le procédé de production de ferments et plus particulièrement l'étape de lyophilisation et son impact sur les cellules ainsi que les différentes stratégies de protection des cellules face à la lyophilisation. Ce dernier aspect, point de départ de nos recherches, comprend un état de l'art de l'impact des conditions de fermentation sur l'état physiologique des cellules bactériennes à la récolte et sur leur tolérance à différents procédés de préservation.

Le deuxième chapitre décrit les matériels et méthodes utilisés au cours de cette étude pour la production de ferments concentrés lyophilisés, la vérification de la bonne conduite de ce procédé et pour la caractérisation de l'état physiologique des cellules bactériennes.

Le troisième chapitre comprend 4 parties présentant les différents résultats obtenus au cours de cette thèse. Dans la première partie, l'incidence de différentes conditions de fermentation (température, pH et âge de récolte) sur la croissance et la résistance de *Lactococcus lactis* TOMSC161 à chaque étape du procédé de préservation a été étudiée. Cette première étude a permis de sélectionner des conditions de culture et des temps de récolte menant à la production de ferments présentant des résistances différentes voire extrêmes à la lyophilisation. L'évaluation de l'état physiologique des différents ferments au niveau membranaire (composition en acides gras, fluidité membranaire et température de transition lipidique par IRTF) et l'étude de l'influence des différents descripteurs phsyiologiques membranaires sur la résistance des bactéries à la lyophilisation et au stockage a fait l'objet de la deuxième partie. De plus, cette partie a mis en avant une nouvelle technique de mesure de la fluidité membranaire par cytométrie en flux développée au laboratoire GMPA. La troisième partie a permis d'approfondir l'évaluation de l'état physiologique par des analyses réalisées au niveau du transcriptome et du protéome. A la lumière des résultats obtenus, cette étude a été complétée par des mesures de l'état d'oxydation des cellules aux différentes étapes du procédé de préservation qui ont ensuite été mis en lien avec la résistance des ferments à ce procédé. Au préalable, le séquençage et l'annotation du génome de *L. lactis* TOMSC161 est présenté. La quatrième et dernière partie présente une vérification de la conservation des fonctionnalités fromagères du ferment lyophilisé dans les conditions optimisées lors de cette thèse par la fabrication de tomme de Savoie et leurs analyses (microbiologique, physico-chimique et sensorielle) par ACTALIA.

Enfin, le quatrième chapitre présente une conclusion générale de l'ensemble des résultats obtenus, propose une analyse de façon globale des phénomènes observés et indique les principales perspectives.

Chapitre I
Synthèse bibliographique

Chapitre I - Synthèse bibliographique

I.1. Lactococcus lactis

I.1.1. Caractéristiques générales

Les lactocoques sont des bactéries lactiques à Gram positif, non mobiles, non sporulantes, sans activité catalase, homofermentaires, hétérotrophes et aéro-anaérobies facultatives (Schleifer *et al.*, 1985). Ces bactéries se présentent sous forme de coque de diamètre compris entre 0,5 et 1,5 µm et peuvent être observées sous forme unicellulaire isolée, associées en paires (diploïdes) ou en courtes chainettes (figure I.1).

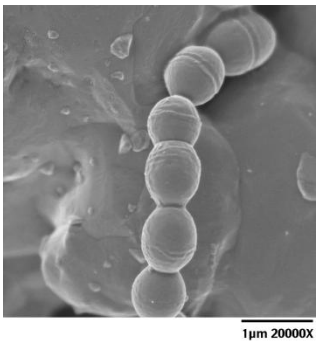


Figure I.1 Image d'une chainette de cellules de *L. lactis* obtenue par microscopie électronique à balayage (d'après http://bioinfo.bact.wisc.edu/themicrobialworld/LactococcusHome.html)

Le genre *Lactococcus* (*L.*) comprend huit espèces : *L. chungangensis*, *L. fujiensis*, *L. garviae*, *L. lactis*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis et L. taiwanensis*. Bien que la plupart des membres du genre *Lactococcus* sont classés GRAS (Generally Recognized As Safe) (Casalta and Montel, 2008), seulement une espèce, *L. lactis*, est utilisée en technologie laitière.

Cette dernière espèce est composée de quatre sous-espèces et un biovar : *L. lactis* ssp. *cremoris*, *L. lactis* ssp. *hordniae*, *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* et *L. lactis* ssp. *tructae* (Schleifer *et al.*, 1985). Les phénotypes de *L. lactis* ssp. *lactis* et *cremoris* sont différenciés sur la base de leur utilisation de l'arginine, de leur température de croissance et de leur tolérance au chlorure de sodium. Les souches du biovar *diacetylactis* se distinguent par leur capacité à métaboliser le citrate pour le convertir en diacétyle.

La température optimale et le pH optimal de croissance de *L. lactis* se situent respectivement entre 28 et 38 °C et entre 5,5 et 6,8 unités de pH. Ces bactéries sont donc mésophiles et neutrophiles (tableau I.1).

Tableau I.1 Température et pH optimal de croissance de différentes souches de *L. lactis*

Souche	Température (°C)	pH	Références
S. lactis	31,5		(Lee and Collins, 1976)
S. cremoris	28 - 31		
S. cremoris		6,3 – 6,9	(Bibal *et al.*, 1988)
S. lactis INIA 12	32	6,8	(Chavarri *et al.*, 1988)
L. lactis subsp. *lactis* ATCC 19435	33 - 35	6	(Akerberg *et al.*, 1998)
L. lactis subsp. *lactis* ATCC 19435	30	5,75	(Hofvendahl *et al.*, 1999)
L. lactis subsp. *cremoris* NIZO B40	30	5,8 – 6,8	(Looijesteijn and Hugenholtz, 1999)
L. lactis subsp. *cremoris* MG 1363		5,5 – 6,5	(Mercade *et al.*, 2000)
L. lactis subsp. *lactis* 1387	37-38	5,75 – 6,25	(Adamberg *et al.*, 2003)

Dans la nature, *L. lactis* se trouve sur les produits végétaux tels que les céréales, haricots, pois, etc., et se retrouve ainsi à la surface des animaux et dans leur tube digestif mais aussi dans le lait par contamination (Salama *et al.*, 1995). Par la suite, des espèces ont été « domestiquées » par l'industrie laitière afin d'élaborer des produits laitiers fermentés tels que le fromage, grâce à leurs propriétés technologiques qui seront détaillées ultérieurement (Passerini *et al.*, 2010).

De plus, *L. lactis* est une bactérie modèle pour la recherche fondamentale et fait l'objet de très nombreuses études depuis plusieurs décennies. Il s'agit ainsi de la première bactérie lactique dont le génome a été entièrement séquencé (Bolotin *et al.*, 2001).

I.1.2. La cellule procaryote à Gram positif

La connaissance de la structure de la cellule bactérienne est d'une importance primordiale pour la compréhension de sa survie dans des environnements variés. Celle-ci, composée essentiellement d'une paroi, d'une membrane, d'un cytoplasme et d'un nucléoïde, est détaillée dans cette partie.

I.1.2.1. Le contenu cytoplasmique

Le cytoplasme des cellules bactériennes contient essentiellement des ribosomes, des corps d'inclusions et le matériel génétique localisé dans le nucléoïde et les plasmides. Il est le siège de toutes les transformations intracellulaires : les réactions de dégradation productrices d'énergie et les réactions de synthèse des constituants cellulaires.

Le nucléoïde

Il occupe une grande partie de l'espace cellulaire et on le distingue par son aspect fibrillaire. Cependant, il n'est pas entouré d'une membrane. Il contient le chromosome bactérien, un filament circulaire, formé d'une double hélice d'ADN fermement empaquetée. Un grand nombre de génomes de souches de *L. lactis* ont été séquencés dont ceux de souches de *L. lactis* ssp. *lactis* telles que IL1403 (Bolotin *et al.*, 2001) et KF147 (Siezen *et al.*, 2010), mais aussi ceux de souches de *L. lactis* ssp. *cremoris* telles que MG1363 (Wegmann *et al.*, 2007), SK11 (Makarova *et al.*, 2006) et NZ9000 (Linares *et al.*, 2010). L'ADN de ces différentes souches de *L. lactis* est caractérisé par une faible teneur en paires de bases guanine-cytosine (G + C), compris entre 34,9 et 35 ,8 %. De plus, le génome de *L. lactis* est constitué de 2 360 à 2 600 kb et code entre 2 300 et 2 600 protéines.

Les plasmides

Une des caractéristiques de *L. lactis* est son riche contenu plasmidique. Un plasmide est une petite molécule d'ADN circulaire capable d'autoréplication. Les plasmides ne contiennent que quelques gènes qui ne servent ni à la survie ni à la reproduction. Cependant, il arrive que ces gènes soient utiles aux bactéries vivant dans un environnement hostile. Dans de nombreux cas, les plasmides confèrent de nouvelles propriétés aux souches telles que le catabolisme du lactose, la production de protéinases, la résistance aux bactériophages, la production de bactériocines ou encore la production d'exopolysaccharides (Mills *et al.*, 2006).

I.1.2.2. L'enveloppe cellulaire

La cellule des bactéries à Gram positif possède une enveloppe rigide, la paroi, qui lui donne sa forme et sa résistance et qui entoure une seconde enveloppe beaucoup plus mince et plus fragile, la membrane cytoplasmique. Ces deux enveloppes sont séparées par l'espace périplasmique (Leclerc *et al.*, 1988) (figure I.2).

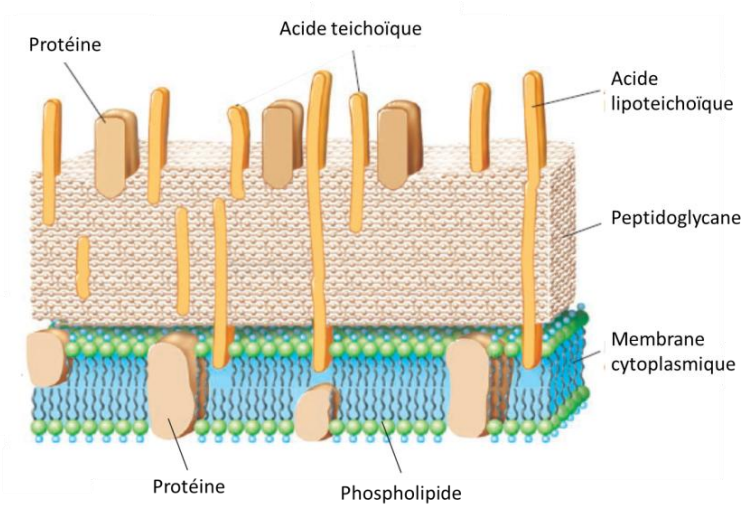


Figure I.2 Schéma de l'enveloppe cellulaire des bactéries Gram positif. Adapté de Madigan *et al.* (2006).

La membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique est une bicouche lipidique de 7 à 9 nm dans laquelle sont ancrées ou associées des protéines (Leclerc *et al.*, 1988). Elle forme une barrière perméable et sélective entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire et est le site d'une série de processus biologiques essentiels : transport passif et actif de molécules, transduction d'énergie, croissance cellulaire et métabolisme (Leclerc *et al.*, 1988). En conclusion, la membrane plasmique est essentielle à la survie des bactéries.

Structure de la membrane

La membrane cellulaire des bactéries est généralement composée de 50 % de protéines, de 30 % de lipides et de 20 % de sucres (Leclerc *et al.*, 1988).

Parmi les lipides membranaires, les phospholipides sont majoritairement présents et plus particulièrement les glycérophospholipides qui contiennent deux chaînes d'acides gras. Ils sont structuralement asymétriques avec un côté polaire (hydrophile) et un côté non polaire (hydrophobe). Compte tenu du caractère amphiphile de ces lipides, les molécules s'organisent spontanément en double couche en solution aqueuse. Les parties hydrophobes se font face et sont protégées du milieu aqueux tandis que les têtes hydrophiles externes y sont immergées.

Chez les bactéries lactiques, les acides gras, qui constituent ces phospholipides, comportent en général de 14 à 20 carbones, peuvent être saturés ou insaturés (cis ou trans) et comporter des ramifications (iso ou antéiso) et/ou un cycle (Denich *et al.*, 2003) (figure I.3). Plus particulièrement,

les acides gras présents chez *L. lactis* sont majoritairement l'acide tétradécanoïque (C14:0), l'acide hexadécanoïque (C16:0), l'acide octadécénoïque (C18:1), et l'acide methyl-octadécanoïque (cycC19:0) et minoritairement l'acide octadécanoïque (C18:0), l'acide tétradécénoïque (C14:1) et l'acide hexadécénoïque (C16:1) (Johnsson *et al.*, 1995; Schleifer *et al.*, 1985).

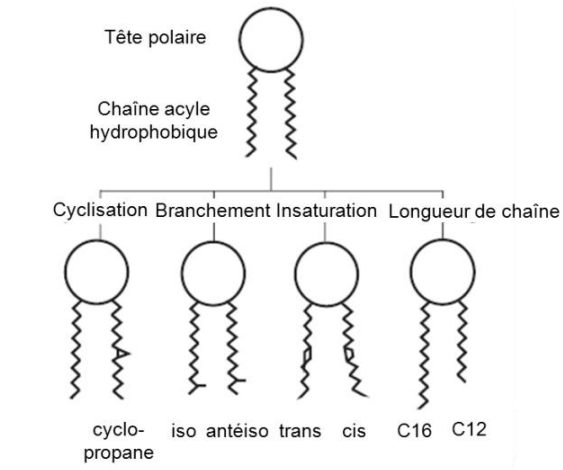


Figure I.3 Schéma des différentes conformations des phospholipides membranaires chez les bactéries. Adapté de Mykytczuk *et al.* (2007).

Les protéines membranaires, quant à elles, sont intercalées dans cette bicouche lipidique et se divisent en deux grandes catégories : les protéines extrinsèques et les protéines intrinsèques. D'une part, les protéines extrinsèques, aussi appelées protéines périphériques, sont faiblement liées à la membrane par des interactions électrostatiques avec les parties polaires des lipides ou des protéines intrinsèques qui émergent hors de la membrane. Elles apparaissent sur l'une des deux faces du double feuillet et n'ont aucun groupement inséré dans la zone hydrophobe. Leur localisation leur permet de participer à des réactions qui s'effectuent à l'interface entre la membrane et le milieu aqueux. D'autre part, les protéines intrinsèques transmembranaires, aussi appelés protéines intégrales, sont associées à la membrane de manière plus étroite par un ensemble d'interactions hydrophobes avec les parties apolaires des lipides. Leur disposition dans la membrane leur permet de participer à des transformations et des réactions qui s'effectuent de part et d'autre de la membrane (Leclerc *et al.*, 1988).

Propriétés biophysiques de la membrane

La structure bimoléculaire de la membrane n'est pas statique, elle est conforme au modèle dit de mosaïque fluide proposé par Singer et Nicolson (1972). En effet, les constituants de la membrane

peuvent se mouvoir librement à l'intérieur de cette structure. Les lipides peuvent ainsi se déplacer autour de leur axe par rotation, latéralement en échangeant leurs positions et transversalement par le passage de molécules lipidiques d'une phase à l'autre qu'on appelle « flip-flop ». En revanche, les protéines se déplacent uniquement latéralement, après leur incorporation ciblée au sein de l'un des deux feuillets membranaires.

Ces mouvements confèrent à la membrane une certaine fluidité qui dépend en grande partie de la structure des acides gras qui composent les phospholipides (Mykytczuk *et al.*, 2007). La fluidité membranaire influence à son tour l'efficacité de plusieurs fonctions cruciales associées à la membrane comme la perméabilité (diffusion passive de molécules hydrophobes) et l'efficacité des fonctions cellulaires assurées par les protéines membranaires par modification des interactions entre protéines ou entre protéines et lipides (Mykytczuk *et al.*, 2007).

D'autre part, la bicouche lipidique peut, en fonction de la conformation spatiale des phospholipides, adopter différents états physiques ou phases (figure I.4) (Beney and Gervais, 2001). A des températures compatibles avec un état physiologique actif, les phospholipides sont dans un état liquide cristallin, c'est-à-dire que les chaînes acyles ont une certaine liberté de mouvement. Dans cette conformation (α), le contact entre les chaînes est moins étroit, les lipides sont plus éloignés les uns des autres et la membrane est plus désordonnée et donc plus fluide. En dessous de la température de transition de phase, abrégée Tm, les phospholipides sont dans un état gel, c'est-à-dire que les chaînes acyles ont un aspect rigide. Dans cette conformation (β), toutes les chaînes hydrocarbonées sont dans un état ordonné, parallèles les unes aux autres, en contact étroit et étirées au maximum. Cette proximité favorise la formation de liaisons faibles de type Van der Waals entre les phospholipides, ce qui limite les mouvements et conduit à une diminution de la fluidité.

Il est important de noter que ces deux propriétés biophysiques de la membrane, qui sont étroitement liées, font souvent l'objet d'un amalgame. En effet, l'état liquide cristallin est associé à un état fluide mais la fluidité de la membrane varie également au sein de cette phase liquide cristallin et apporte donc une information complémentaire sur l'état de la membrane.

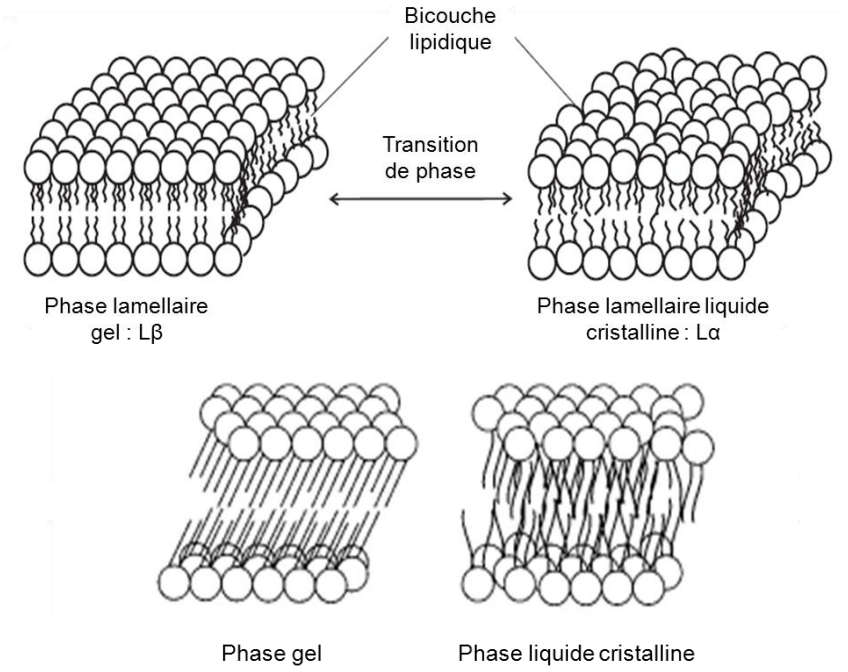


Figure I.4 Organisation des phospholipides dans la bicouche lipidique chez les bactéries. Adapté de Mykytczuk *et al.* (2007).

La paroi

La paroi des cellules à Gram-positif est une couche homogène d'une épaisseur de 20 à 80 nm et est constituée principalement d'un polymère, le peptidoglycane (également appelé muréine) et des chaines d'acides téichoïques (figure I.2). Ce polymère est un véritable exosquelette qui assure la forme et la rigidité bactérienne. La paroi assure ainsi une protection contre la pression osmotique intracellulaire qui est fonction de la différence entre les potentiels hydriques interne et externe (compris entre 5 et 20 atmosphères). Elle joue aussi un rôle déterminant dans la spécificité antigénique des bactéries, permet la fixation des bactériophages grâce à des récepteurs localisés sur le peptidoglycane et participe à la mobilité, toxicité et perméabilité des cellules (Delcour *et al.*, 1999).

Le peptidoglycane ou muréine est un énorme hétéropolymère formant un réseau bidimensionnel de polymères glycosidiques reliés, dans une autre dimension, par des chaînes peptidiques. Les chaînes principales (polymères glycosidiques) sont constituées de l'alternance de deux dérivés de sucre, la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique. Les chaînes latérales sont des peptides constitués d'acides aminés, tels que l'alanine, la lysine et l'acide glutamique, liés au groupe carboxyle de l'acide N-acétylmuramique.

Ce réseau tridimensionnel contient également une grande quantité d'acides téichoïques (connectés au peptidoglycane) et d'acides lipotéichoïques (connectés aux lipides de la membrane

plasmique) où s'attachent des acides aminés tels que la D-alanine et des sucres comme le glucose (Delcour *et al.*, 1999).

Les enveloppes facultatives

Quelques bactéries sont capables de synthétiser de fines couches externes à la paroi cellulaire constituées essentiellement de polysaccharides. Ces polysaccharides excrétés peuvent être plus ou moins libérés dans le milieu. Quand la couche est compacte et propre à chaque bactérie, on parle de capsule. Quand la couche est diffuse, on parle de couche muqueuse ou mucoïdes. Chapot-Chartier *et al.* (2010) ont ainsi montré la présence d'une pellicule de polysaccharides à la surface de plusieurs souches de *L. lactis*. Cette enveloppe cellulaire est une barrière protective contre la phagocytose par des macrophages murins.

I.1.3. Le métabolisme

Le métabolisme est l'ensemble des réactions chimiques qui se déroulent au sein de la cellule et qui permettent aux bactéries d'assurer leur croissance et leur survie. On distingue d'une part l'anabolisme qui représente l'ensemble des voies de biosynthèse des constituants cellulaires, et d'autre part le catabolisme qui représente l'ensemble des voies de dégradation des substrats et de constituants cellulaires pour en libérer de l'énergie, ces réactions étant interconnectées. Dans ce chapitre, nous nous intéressons plus particulièrement au métabolisme des lactocoques dans le lait.

I.1.3.1. Métabolisme des glucides

Les lactocoques ont besoin de glucides, et particulièrement de lactose et de glucose comme source de carbone et d'énergie pour produire de l'ATP. Les lactocoques sont homofermentaires, c'est-à-dire qu'ils convertissent majoritairement le lactose en acide lactique. Cependant, dans certaines conditions (certains sucres, limitation en carbone, condition aérobie…), ces bactéries homolactiques peuvent présenter un métabolisme mixte avec production d'acide lactique mais aussi d'acide acétique, d'acide formique, d'éthanol et de dioxyde de carbone (figure I.5) (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996).

Chez *L. lactis*, le transport des sucres à l'intérieur de la cellule est assuré principalement par deux systèmes (Garrigues *et al.*, 1998) :

- Le système phosphotransférase (PTS) phosphoénolpyruvate dépendant (PEP) qui couple le transport et la phosphorylation du sucre

- Le système perméase énergie-dépendant qui couple la translocation du sucre à celle d'un proton et fait pénétrer les sucres sous forme libre à l'intérieur de la cellule

Lorsque le lactose est transféré à l'intérieur de la cellule par le système PTS-PEP, celui-ci subit simultanément une phosphorylation. Le lactose-6-phosphate est ensuite hydrolysé par la phosphate-β-galactosidase en glucose et en galactose-6-phosphate qui vont rejoindre la glycolyse suivant des voies différentes. Le glucose, après phosphorylation par la glucokinase, emprunte directement la voie de la glycolyse tandis que le galactose-6-phosphate suit la voie du tagatose qui elle-même rejoint la glycolyse au niveau des trioses-phosphates.

Lorsque le transfert du lactose à l'intérieur de la cellule s'effectue via le système perméase, celui-ci est hydrolysé par la β-galactosidase en glucose et en galactose qui rejoignent la voie de la glycolyse par des voies différentes. Le glucose est phosphorylé par la glucokinase et emprunte directement la voie de la glycolyse alors que le galactose est dirigé vers la voie de Leloir avant de rejoindre la glycolyse au niveau du glucose-6-phosphate.

Ces bactéries sont aussi aptes à absorber et métaboliser d'autres sucres. Ainsi, le système de transport principal du glucose de *L. lactis* est le mannose-PTS qui peut transporter le mannose, le lactose, la glucosamine et le fructose.

La glycolyse génère du pyruvate et surtout de l'ATP qui est indispensable aux voies de biosynthèse, mais est aussi à l'origine de l'oxydation d'un cofacteur indispensable au métabolisme, le NAD^+. Les lactocoques étant anaérobies et dépourvus d'une chaîne respiratoire complète, la réduction du NADH en NAD^+ est effectuée par la lactate déshydrogénase (LDH) qui transforme le pyruvate en acide lactique.

Au cours du métabolisme mixte, les sucres qui empruntent la glycolyse continuent à produire du pyruvate mais le flux à travers la LDH est fortement diminué. Le pyruvate est alors transformé en acétyl-CoA par la pyruvate formiate lyase ou la pyruvate déshydrogénase avec formation, respectivement, de formate ou de dioxyde de carbone. La métabolisation ultérieure de l'acétyl-CoA implique soit la phosphotransacétylase (PTA) et l'acétate kinase (ACK) avec formation d'acétate, soit l'alcool désydrogénase (ADHE) avec production d'éthanol (Garrigues *et al.*, 1998).

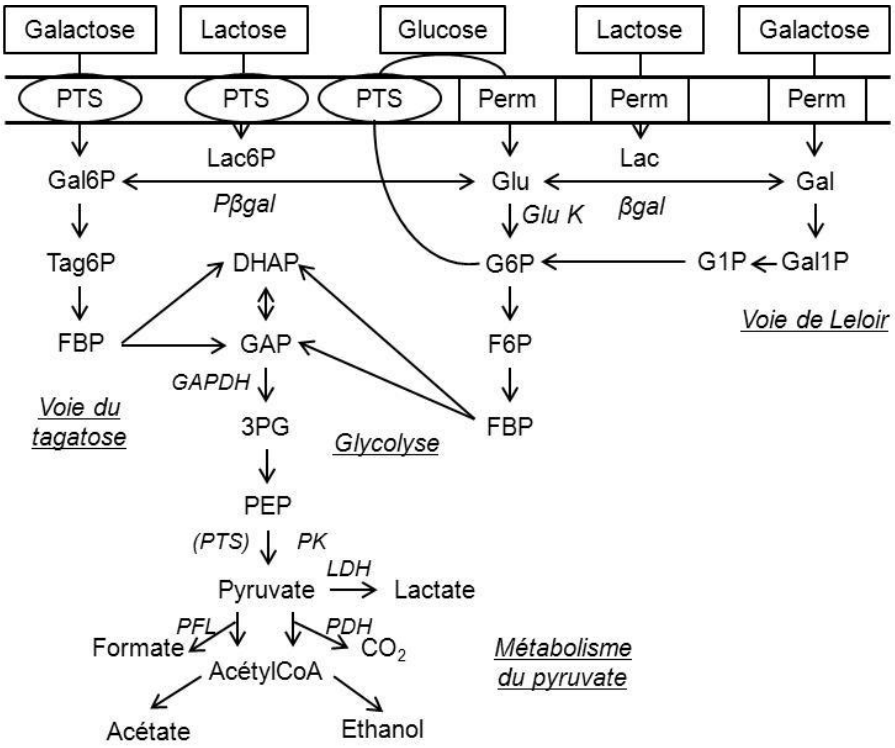


Figure I.5 Voies métaboliques impliquées dans l'entrée et le métabolisme du glucose, du galactose et du lactose chez *Lactococcus lactis*. PTS, système phosphotransférase ; Perm, perméases ; Lac, lactose ; Gal, galactose ; Gal1P, galactose-1-phosphate ; Gal6P, galactose-6-phosphate ; Lac6P, lactose-6-phosphate ; βgal, β-galactosidase ; Pβgal, phospho-β-galactosidase ; Glu, glucose ; GluK, glucokinase ; G1P, glucose-1-phosphate ; G6P, glucose-6-phosphate ; F6P, fructose-6-phosphate ; Tag6P, tagatose-6-phosphate ; FBP, fructose-1,6-diphosphate ; DHAP, dihydroxyacétonephosphate ; GAP, glycéraldéhyde-3-phosphate ; GADPH, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ; 3PG, 3-phosphoglycérate ; PEP, phosphoénolpyruvate ; PK, pyruvate kinase ; LDH, lactate déshydrogénase ; PDH, pyruvate déshydrogénase ; PFL, pyruvate formiate lyase. Adapté de Garrigues *et al.* (1998).

I.1.3.2. Métabolisme des protéines

Comme les autres bactéries lactiques, *L. lactis* est hétérotrophe pour certains acides aminés et donc exigeante d'un point de vue nutritionnel. Les lactocoques ont généralement besoin d'un apport d'acide glutamique, d'histidine, d'isoleucine, de leucine, de méthionine et de valine pour se développer, et plus rarement d'arginine, de thréonine et de tryptophane (Jensen and K. Hammer, 1993; van Niel and Hahn-Hagerdal, 1999). Dans le lait, la concentration de certains acides aminés essentiels comme l'isoleucine, la leucine et la méthionine est très faible ce qui en fait des acides aminés potentiellement limitants pour la croissance (Juillard *et al.*, 1996). Certaines souches de *L. lactis* sont ainsi capables d'hydrolyser la caséine, protéine la plus abondante dans le lait et par conséquent source

principale d'acides aminés nécessaires à sa croissance. Puis, un système protéolytique complexe assure les besoins en acides aminés essentiels à partir de la dégradation des caséines.

Ce système protéolytique est composé d'une sérine-protéase extracellulaire ancrée à la paroi (PrtP) qui hydrolyse les caséines et peptides, de système de transport des peptides et d'un grand nombre de peptidases intracellulaires tels que des endopeptidases qui permettent la dégradation des oligopeptides et des aminopeptidases qui permettent la libération des acides aminés (Juillard *et al.*, 1996; Law and Haandrikman, 1997; Smit *et al.*, 2000; van Kranenburg *et al.*, 2002).

Enfin, certains acides aminés peuvent être convertis en composés d'arômes tels que des alcools, aldéhydes, cétones, esters ou encore en composés soufrés volatils par différentes voies métaboliques (figure I.6) (Smit *et al.*, 2000; van Kranenburg *et al.*, 2002).

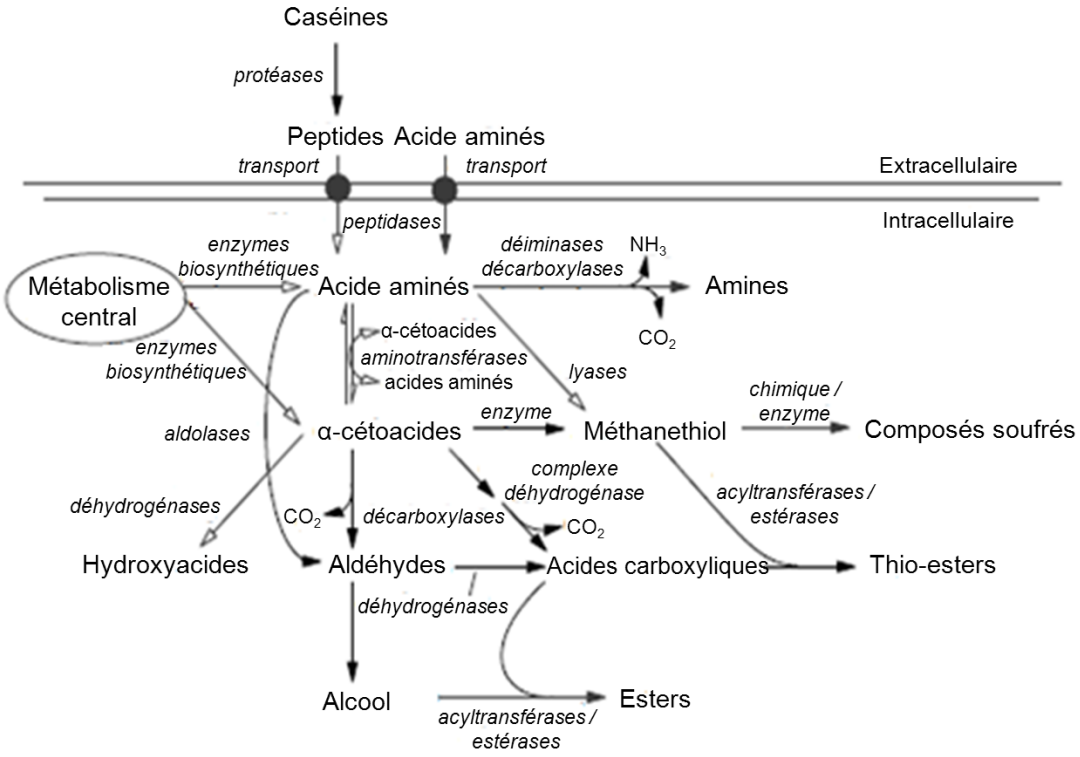


Figure I.6 Résumé des voies métaboliques générales impliquées dans l'entrée et le métabolisme des protéines, des peptides et des acides aminés par les bactéries lactiques. Adapté de van Kranenburg *et al.* (2002).

I.1.3.3. Autres métabolismes

Métabolisme du citrate

L. lactis ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* est capable de métaboliser le citrate. Pour cela, le citrate est tout d'abord transporté à l'intérieur de la cellule bactérienne par le biais d'une perméase protonique (Konings *et al.*, 1989). Puis le citrate est scindé en acétate et oxaloacétate par la citrate lyase. Ce dernier composé est décarboxylé en pyruvate par l'oxaloacétate décarboxylase et est transformé en α-acétolactate. Ce dernier composé est instable et peut être décarboxylé soit chimiquement en présence d'oxygène en diacétyle, soit enzymatiquement par l'α-acétolactate décarboxylase en acétoïne (figure I.7). De plus, la diacétyle réductase va catalyser la réduction du diacétyle en acétoïne. Enfin l'acétoïne peut être, lui aussi, réduit en 2,3-butanediol (Ramos *et al.*, 1994). L'acétate, l'acétoïne, le diacétyle et le 2,3-butanediol sont des composés d'arômes (Magni *et al.*, 1999).

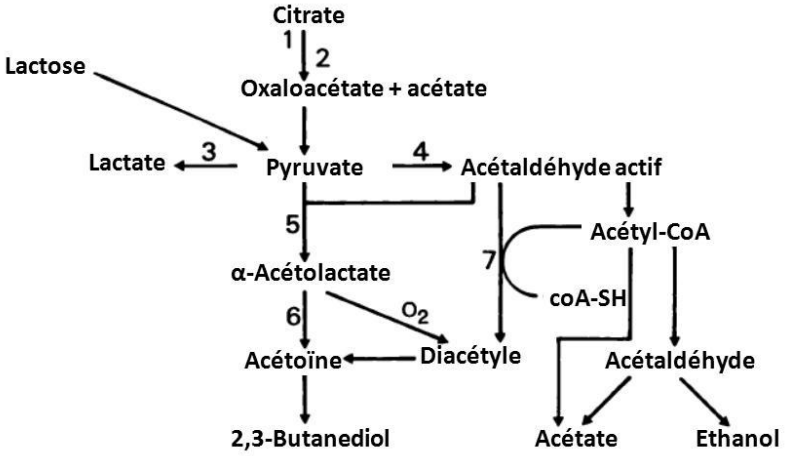


Figure I.7 Métabolisme du citrate chez *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis. 1, perméase ; 2, citrate lyase ; 3, lactate déshydrogénase ; 4, pyruvate décarboxylase ; 5, α-acétolactate décarboxylase ; 7, diacétyl réductase. Adapté de Verhue and Tjan (1991).

Production de bactériocines

Certaines souches de *L. lactis* sont capables de synthétiser des bactériocines, c'est-à-dire des peptides ou des protéines inhibant la croissance d'autres bactéries. La plus connue de ces bactériocines est la nisine qui inhibe la croissance de *Listeria monocytogenes* et de certaines espèces de *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* et d'autres bactéries lactiques (Liu and Hansen, 1990; Ruhr and Sahl, 1985). D'autres bactériocines de *L. lactis* sont aussi bien caractérisées telles que les lactococcines A, B

et M capables d'inhiber la croissance d'autres souches de *Lactococcus* (H. Holo *et al.*, 1991) et des lacticines comme la lacticine 481 qui a une activité contre la plupart des bactéries lactiques (Piard *et al.*, 1992; Ryan *et al.*, 1996) et contre *Clostridium tyrobutyricum* (Piard *et al.*, 1990).

Production d'exopolysaccharides

Certaines souches de *L. lactis* sont aussi capables de produire des exopolysaccharides généralement composés de glucose, rhamnose et galactose (Ayala-Hernandez *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2012; Looijesteijn and Hugenholtz, 1999). Ces exopolysaccharides auraient un rôle de protection des bactéries contre l'environnement extérieur (Cerning, 1990). De plus, ces exopolysaccharides ont un rôle texturant dans la fabrication des produits laitiers fermentés. Cependant, une grande diversité d'exopolysaccharides sont produits par les bactéries lactiques et leurs propriétés fonctionnelles (texturantes) dépendent de caractéristiques structurales telles que la composition chimique, le poids moléculaire, les liaisons entre les saccharides et le degré de ramification (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002).

I.1.4. La production sous forme de ferments

I.1.4.1. Intérêt technologique de *Lactococcus lactis* en production fromagère

De par les activités métaboliques détaillées ci-dessus, la bactérie *L. lactis* possède de nombreuses propriétés technologiques intéressantes, sur la base desquelles elle est sélectionnée comme ferment pour la fabrication de produits laitiers fermentés et notamment le fromage. En effet, cette bactérie contribue à l'acidification du lait, à la coagulation des protéines présentes dans le lait, à la formation de nombreux composés d'arôme, à la texturation, à la conservation et à la sécurité alimentaire du fromage. Par conséquent, *L. lactis* se retrouve dans la plupart des levains laitiers mésophiles. Une étude récente sur la caractérisation de 4379 isolats bactériens de 35 produits laitiers européens incluant 25 fromages a montré que 38 % des isolats correspondent à des lactocoques (Cogan *et al.*, 1997). Plus particulièrement, *L. lactis* est principalement employée pour la fabrication de fromages à pâte fraiche (fromage blanc) et à pâte molle (camembert). Elle est aussi couramment rencontrée dans les fromages à pâte pressée non cuite (tomme, salers, saint-nectaire, castelmagno) ou semi-cuite (fontina) et les fromages à pâte persillée (stilton, gorgonzola) (Bouty and Mouchot, 1981; Champagne *et al.*, 2009; Corroler *et al.*, 1998; Turchi *et al.*, 2013).

I.1.4.2. L'intérêt des ferments

Autrefois, l'ensemencement était conduit de deux façons dans l'industrie laitière : soit selon la technique du « pied de cuve » où le milieu à transformer est ensemencé à partir d'une petite quantité du produit issu de la précédente fermentation, soit en faisant intervenir deux ou plusieurs cultures intermédiaires avant l'étape de fabrication (Beal *et al.*, 2008). Depuis les années 1980, les ferments lactiques sont utilisés sous forme concentrée, congelée ou lyophilisée permettant ainsi une fabrication des produits fermentés par ensemencement direct ou semi-direct (Beal *et al.*, 2008). Cette technique d'ensemencement direct permet aux transformateurs laitiers de mieux répondre aux exigences en matière de standardisation (en limitant les défauts technologiques), de sécurité alimentaire (en réduisant les risques de contamination), de normalisation (normes ISO) et d'innovation (sélection de nouvelles souches ou de mélanges complexes d'espèces pour générer des arômes différents).

I.1.4.3. La production de ferments lactiques

Le procédé de production

La production industrielle de ferments lactiques concentrés se déroule selon les étapes illustrées dans la figure I.8.

Sélection de la souche :
La sélection de la souche s'effectue selon des critères tels que ses propriétés technologiques, sa capacité à croître, sa sensibilité aux phages ainsi que sa résistance aux stress associés aux procédés de production et de stabilisation.

Conservation de la souche :
La souche est conservée à très basse température (-80 °C ou -196 °C) afin d'empêcher toute possibilité de mutation et de disposer d'un produit identique à chaque production. Lors du démarrage d'une nouvelle production, la souche est alors repiquée dans un milieu gélosé spécifique.

Préparation du milieu et traitement thermique :
Le milieu de culture est développé de façon à prendre en compte les exigences nutritionnelles du micro-organisme, le coût des constituants et le savoir-faire du producteur. Il contient généralement une ou plusieurs sources de carbone, d'azote, de minéraux, de vitamines et de facteurs de croissance.

Le milieu de culture doit être traité thermiquement afin de le débarrasser des micro-organismes contaminants, puis refroidi à la température de fermentation. Son pH est ajusté à la valeur optimale pour la souche à cultiver.

Inoculation :

L'inoculation du fermenteur est réalisée soit à partir d'une préculture préalablement réalisée à partir d'un tube de collection, soit par ensemencement direct de cellules congelées ou lyophilisées. Dans le cas d'une utilisation de préculture inoculum, les bactéries sont cultivées dans des milieux de culture de volume croissant jusqu'à ce qu'elles soient transférées dans les cuves de fermentation.

Fermentation :

La fermentation qui permet de générer un grand nombre de cellules est généralement conduite en culture discontinue (batch) et en conditions contrôlées de température, pH, aération et agitation de façon à optimiser les conditions de croissance de la souche.

Récolte des cellules :

Lorsque la concentration maximale en biomasse est atteinte, la culture est stoppée à un temps d'arrêt défini selon des critères variables en fonction des souches, des paramètres suivis au cours de la fermentation et du savoir-faire des producteurs. L'arrêt de la culture est réalisé par refroidissement des cellules de façon à ralentir puis stopper les réactions métaboliques préservant les cellules dans l'état physiologique obtenu à la fin de la culture.

Concentration et protection :

Après récolte, le milieu de culture fermenté est concentré afin d'éliminer la majeure partie de l'eau et d'aboutir à une concentration cellulaire élevée de l'ordre de 10^9 à 10^{11} UFC.g^{-1}. Cette étape de concentration est réalisée par centrifugation ou filtration (microfiltration tangentielle) (Streit *et al.*, 2011). Une étape de lavage des cellules est parfois réalisée pour éliminer les composés résiduels du milieu de fermentation. Des molécules protectrices sont ensuite ajoutées à la suspension bactérienne concentrée afin d'aider les cellules à survivre et à se maintenir dans un état physiologique actif, à l'issue des étapes de stabilisation et de stockage ultérieures.

Stabilisation :

L'étape de stabilisation consiste à réduire l'activité de l'eau afin de stabiliser les structures cellulaires et d'inhiber les réactions de dégradation chimiques et biologiques pour permettre la conservation des ferments sur le long terme. La stabilisation des bactéries concentrées est réalisée par congélation, lyophilisation ou séchage (atomisation, lit fluidisé) (Johnson and Etzel, 1995; Santivarangkna *et al.*,

2009; Strasser *et al.*, 2009; To and Etzel, 1997). Le séchage n'étant envisageable que pour les bactéries thermo-résistantes, la congélation et la lyophilisation sont les principales techniques utilisées pour stabiliser les bactéries lactiques.

Conditionnement et stockage :

Le conditionnement final des concentrés bactériens intervient soit avant, soit après l'étape de stabilisation, en fonction des conditions dans lesquelles celle-ci est réalisée. Il peut également être précédé d'une étape de mélange de plusieurs souches.

Le produit congelé est conditionné soit dans des boîtes aluminium scellées à anneau d'ouverture rapide, soit conditionnés sous forme de billes dans des boîtes en carton paraffiné (type Tetrapak). Ils sont généralement stockés à des températures inférieures à -45 °C.

Le solide obtenu après lyophilisation est, quant à lui, broyé en fine poudre et conditionné dans des sachets métalloplastiques, étanches à l'eau, aux gaz et à la lumière et parfois sous vide ou atmosphère inerte. Ils sont stockés à des températures positives pouvant varier de 4 °C à la température ambiante (Beal *et al.*, 2008).

Le stockage des ferments concentrés et stabilisés est réalisé à température contrôlée, pendant une durée au moins égale à trois mois, selon les spécifications du producteur.

Cette production de ferment se déroule selon une succession d'étapes qui doivent être parfaitement maitrisées dans un triple souci :

- Atteindre de fortes concentrations bactériennes en fin de culture (rendement de production)
- Maintenir une qualité des ferments suffisante après stabilisation pour répondre aux exigences des utilisateurs
- Standardiser les procédures de production afin d'obtenir une reproductibilité élevée

Néanmoins, certaines étapes du procédé et plus particulièrement les étapes de stabilisation et de stockage posent encore des soucis pour l'obtention d'un ferment de haute qualité. En effet ces étapes peuvent engendrer des stress importants qu'il importe d'identifier et de contrôler et fera l'objet dans second chapitre de cette synthèse bibliographique.

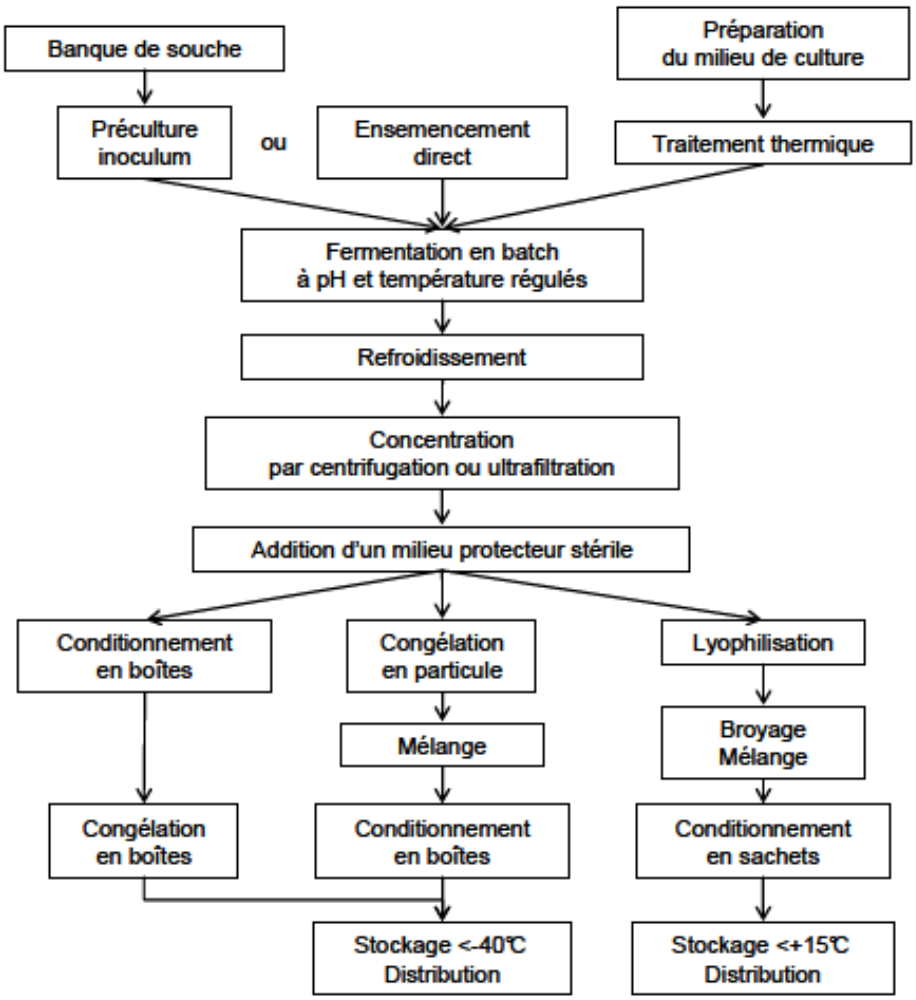


Figure I.8 Schéma de production des ferments lactiques concentrés. D'après Beal *et al.* (2008).

La qualité des ferments

Il convient, tout d'abord, de définir la qualité des ferments. En effet, celle-ci va déterminer leur performances technologiques et est donc généralement définie par deux critères : la concentration en cellules viables et l'activité métabolique. Ainsi un ferment de haute qualité doit être composé d'un nombre élevé de cellules viables et doit présenter une bonne reprise à l'utilisation de la ou des fonctionnalités cibles.

D'une part, la concentration en cellules viables d'un ferment est principalement mesurée par dénombrement sur milieu gélosé sélectif. En raison de la formation de chaînettes par un grand nombre de bactéries lactiques, cette méthode conduit à l'obtention d'une concentration en unités formant colonies (UFC), et non d'un nombre réel de cellules au sein de la population. Malgré le temps

d'incubation nécessaire et une concentration en UFC, cette méthode reste la technique de référence pour juger de la qualité des ferments.

D'autre part, les activités métaboliques évaluées peuvent être de différentes natures telles que l'activité acidifiante, aromatisante, texturante, protéolytique ou gazogène en fonction de la ou des propriétés technologiques recherchées. Différentes méthodes sont ainsi à la disposition des producteurs et utilisateurs de ferments pour évaluer et donc contrôler les différentes fonctionnalités des ferments. Toutefois, l'activité acidifiante est une caractéristique essentielle des bactéries lactiques puisque la production d'acide lactique par les cellules est directement liée à leur métabolisme central et donc à leur état physiologique. Cette méthode apparaît donc pertinente pour évaluer la qualité d'un ferment lactique. Traditionnellement, l'activité acidifiante était estimée, de façon statique, par titration de l'acide lactique (détermination du degré Dornic) ou par pH-métrie. Ces deux méthodes ne donnent cependant qu'une information ponctuelle, à un instant donné, et ne rendent pas compte de la dynamique de la culture. Par conséquent, le suivi du pH en cours de fermentation est une méthode fiable pour caractériser l'activité acidifiante des ferments. Spinnler et Corrieu (1989) ont proposé une méthode de caractérisation de l'activité acidifiante des bactéries lactiques, basée sur la mesure du pH en continu : le système CinAc®. Ce système permet l'acquisition et l'exploitation en temps réel d'un grand nombre de mesures de pH et l'établissement des cinétiques d'acidification correspondantes.

I.2. La lyophilisation des ferments lactiques

De nos jours, le procédé de lyophilisation est très largement utilisé pour transformer les produits thermo-sensibles, tels que les ferments lactiques, à l'état de solution en un solide stable, en vue d'une longue conservation. Par comparaison à la congélation, la lyophilisation permet de réduire considérablement le volume du produit et de stocker les ferments à des températures positives ce qui permet de diminuer les coûts (énergétique et financier). En revanche, la lyophilisation requiert une technologie de fabrication complexe et coûteuse et est une étape critique du procédé de production vis-à-vis de la qualité finale des ferments. En effet, de nombreuses espèces bactériennes présentent un faible taux de survie après lyophilisation (Carvalho *et al.*, 2003c; Savini *et al.*, 2010).
Pour une meilleure maîtrise du procédé, il convient donc d'étudier et de comprendre les mécanismes physico-chimiques intervenant lors de la lyophilisation et les dommages causés aux cellules qui en résultent et qui impactent la qualité des ferments.

I.2.1. Aspects physiques de la lyophilisation

I.2.1.1. Les principaux mécanismes de la lyophilisation de concentrés bactériens

La lyophilisation est un procédé de déshydratation à basse température et à basse pression qui consiste à éliminer, principalement par sublimation, la majeure partie de l'eau contenue dans le produit. Par abaissement de l'activité de l'eau, les vitesses des réactions chimiques ou biochimiques sont fortement ralenties et une conservation à long terme du produit est alors possible.

Le procédé de lyophilisation se déroule en 3 étapes successives (Rey *et al.*, 1999):

- La congélation
- La dessiccation primaire aussi appelée sublimation
- La dessiccation secondaire aussi appelée désorption

Le diagramme d'état de l'eau pure présenté en figure I.9 permet de suivre les différentes étapes du procédé de lyophilisation (Marin *et al.*, 2008). A partir de l'étape de congélation (trajet A) qui se déroule généralement à pression atmosphérique, il est donc nécessaire, en premier lieu, d'abaisser la pression de la vapeur d'eau dans l'enceinte au-dessous du point triple (trajet B). Puis, le passage à l'état vapeur est favorisé par une augmentation de température. La glace est alors sublimée en maintenant la température de celle-ci inférieure à sa température de fusion (trajet C).

Le concentré bactérien est un milieu complexe composé de bactéries, de milieu de culture résiduel et de molécules protectrices, c'est-à-dire d'eau et de solutés (sucres, protéines, sels minéraux..). Les couples pression-température délimitant les phases sont donc déplacés sous l'influence de la présence de ces solutés par abaissement cryoscopique (Loi de Raoult). Cela a pour conséquence d'abaisser le point triple (P, T) par rapport à celui de l'eau pure et donc de réduire la zone de sublimation (figure I.9).

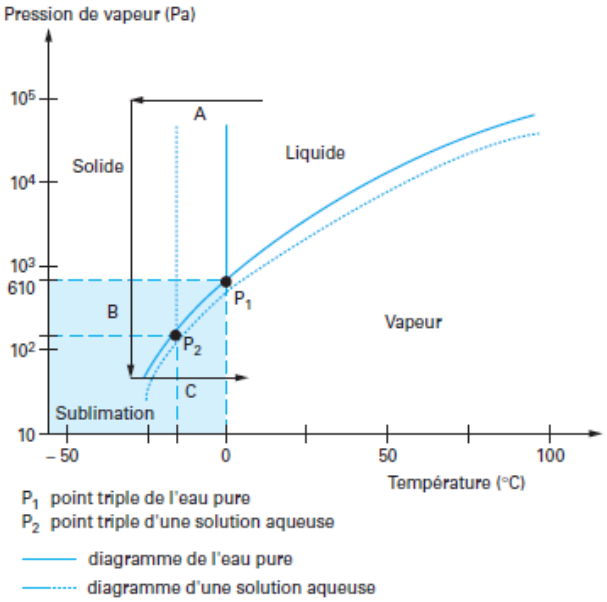


Figure I.9 Diagramme d'état de l'eau pure et d'une solution contenant un soluté. D'après Marin *et al.* (2008).

La congélation

L'objectif de cette première étape est de diminuer la température du produit à une valeur comprise entre -40 et -60 °C afin de congeler l'eau libre du produit. Celle-ci représente, dans la plupart des cas, de 70 à 90 % de l'eau totale du produit.

La figure I.10 montre l'évolution de la température du produit lors de la congélation. Tout d'abord, le produit se refroidit jusqu'en dessous de 0 °C par abaissement cryoscopique à cause de la présence de solutés et passe généralement par un stade de surfusion. Il s'agit d'un état métastable, au cours duquel les constituants restent sous une forme liquide jusqu'à des températures bien inférieures à la température d'équilibre thermodynamique de cristallisation de l'eau (valeur avoisinant les -15 °C pour les concentrés bactériens). La baisse de température du produit prend fin lors de l'apparition des premiers cristaux de glace à la température dite de nucléation (Tn). La formation de ces premiers

cristaux de glace conduit à une remontée de la température du produit jusqu'à la température de fusion commençante (réaction exothermique). A partir de ce point, la formation de la glace commence véritablement avec une faible diminution de la température du produit dans un premier temps (plateau de congélation), suivi par une chute de cette température jusqu'en dessous de la température de transition vitreuse de la matrice.

La transition vitreuse correspond au passage de l'état viscoélastique à l'état solide amorphe. La température à laquelle cette transition a lieu s'appelle la température de transition vitreuse dont l'abréviation est Tg'. Si la température du produit est au-dessous de sa Tg', celle-ci est dans un état solide amorphe ou vitreux. L'intérêt de cet état amorphe vitrifié est que sur le plan cinétique le « verre » est considéré comme une structure stable présentant une viscosité élevée où la diffusion moléculaire est fortement réduite, provoquant un fort ralentissement des réactions biochimiques et physico-chimiques responsables de la dégradation du produit (Crowe *et al.*, 1998; Santivarangkna *et al.*, 2011). Cette température de transition vitreuse est donc très importante et est aujourd'hui incontournable lorsque l'on s'intéresse à l'évolution des produits au cours des opérations de stabilisation.

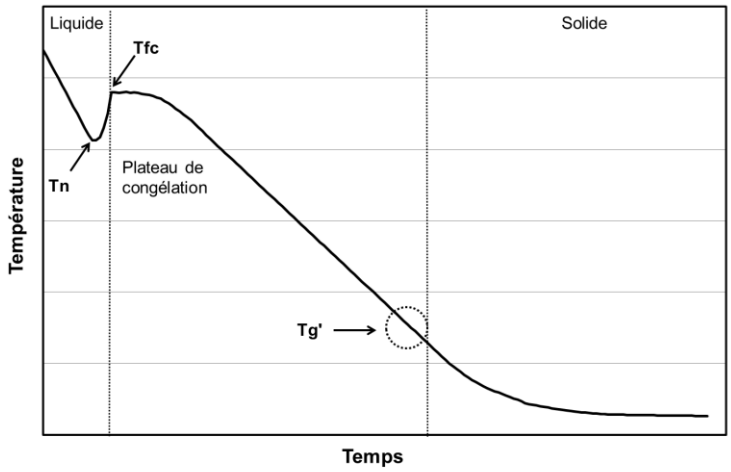


Figure I.10 Profil de température du produit et principaux évènements ayant lieu lors de la congélation d'un concentré bactérien. Tn, température de nucléation ; Tfc, température de fusion commençante ; Tg', température de transition vitreuse.

Parallèlement à ces évènements, une cryoconcentration des solutés est induite à l'extérieur des cellules bactériennes par la formation des cristaux de glace. Du fait des différences de concentration en solutés entre les milieux intra- et extra-cellulaires, la cristallisation commence à l'extérieur des cellules. Cela provoque une augmentation de la pression osmotique extracellulaire amenant à une migration de l'eau intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Selon les hypothèses de Mazur (1977), si la vitesse de congélation est lente, les cellules perdent beaucoup d'eau afin de maintenir l'équilibre

osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule (figure I.11a). Au contraire, si la vitesse de congélation est élevée au point où les cellules ne sont plus capables de perdre de l'eau assez rapidement afin de maintenir un équilibre osmotique, la formation de glace intracellulaire peut avoir lieu afin de restaurer cet équilibre (figure I.11c).

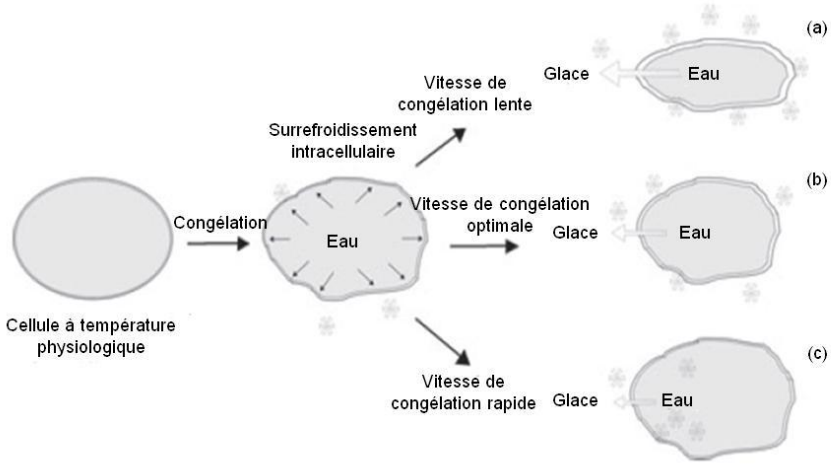


Figure I.11 Schématisation des événements physiques pouvant intervenir lors de la congélation de cellules en fonction de la vitesse de refroidissement. D'après Santivarangkna *et al.* (2008).

Pendant cette cryoconcentration, la température de cristallisation de la glace diminue par abaissement cryoscopique jusqu'à la température de transition vitreuse Tg' où la phase interstitielle a atteint sa concentration maximale en soluté (figure I.12 : trajet B-C). A ce point, toute l'eau congelable est cristallisée et une phase cryoconcentrée contenant une faible quantité d'eau intimement associée à la matière sèche (solutés et cellules) est obtenue. Enfin, la matrice congelée se vitrifie (trajet C-D).

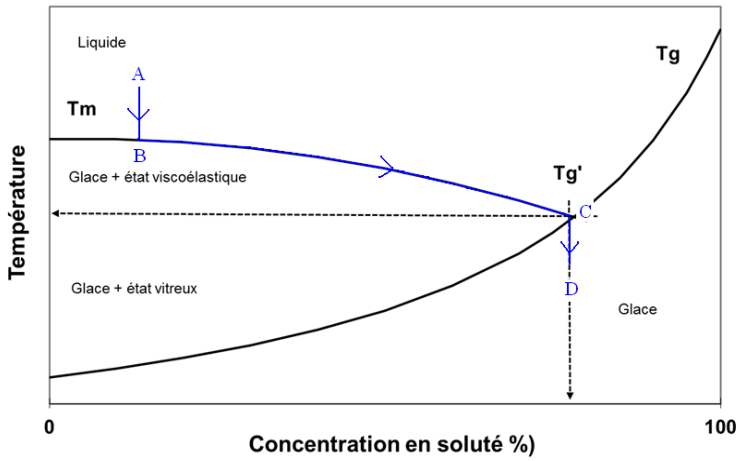


Figure I.12 Diagramme d'état montrant l'évolution du concentré bactérien au cours de la lyophilisation (A à D : congélation). Tg et Tg', température de transition vitreuse ; Tm, température de fusion.

La dessiccation primaire ou sublimation

L'objectif de la deuxième étape est d'éliminer la glace formée par sublimation. Cette étape consiste à placer le produit dans une atmosphère où la pression partielle de vapeur d'eau est inférieure à la pression de vapeur saturante de la glace, tout en lui apportant suffisamment d'énergie pour entretenir la sublimation de la glace (changement d'état endothermique). Pour cela, le produit congelé est mis sous vide par abaissement de la pression de l'enceinte à une valeur comprise entre 10 et 80 Pa. Parallèlement, la température de l'enceinte de lyophilisation est augmentée progressivement jusqu'à une valeur comprise entre -25 et 0 °C pour délivrer assez d'énergie pour sublimer la glace. L'élimination de l'eau par sublimation débute à la surface de l'échantillon et se poursuit ensuite vers le cœur de l'échantillon selon un front de sublimation (figure I.13). Ce front correspond à l'interface séparant la zone interne congelée de la couche externe sèche de l'échantillon.

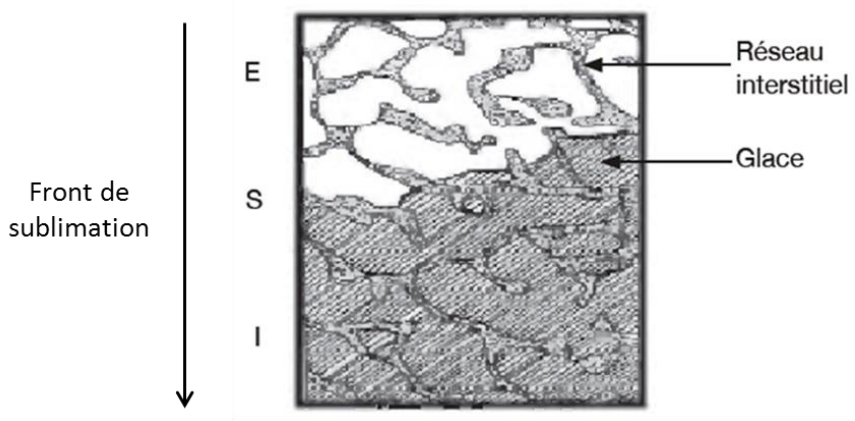


Figure I.13 Représentation schématique d'un produit en cours de lyophilisation. E, zone externe poreuse ; S, interface de sublimation ; I, zone interne congelée. D'aprèsCoulibaly *et al.* (2011).

Durant cette étape, la chaleur apportée doit être suffisante pour permettre de sublimer la glace mais pas trop élevée afin de ne pas réchauffer le produit au-delà de la température de transition vitreuse (Tg') mais également au-delà d'une autre valeur critique appelée température d'effondrement. En effet, les cristaux de glace éliminés par sublimation laissent place à une structure poreuse dans le produit. La conservation de cette structure est indispensable pour obtenir de bonnes propriétés de réhydratation à l'origine de la reprise d'activité des bactéries après lyophilisation et stockage. Tout mécanisme d'affaissement doit donc être évité. Or, l'effondrement significatif du produit a lieu lorsque la mobilité au sein de la phase amorphe est suffisamment élevée pour provoquer un écoulement visqueux. La température d'effondrement ou collapse, notée Tcoll, correspond donc à la température à

partir de laquelle cet écoulement visqueux se produit au sein de la matrice sèche (Fonseca *et al.*, 2004a; Yang *et al.*, 2010).

La température de collapse et la température de transition vitreuse, décrites précédemment, sont ainsi étroitement liées. Si la température du produit est significativement supérieure à la température de transition vitreuse, la viscosité de la matrice diminue fortement et l'effondrement du produit sera d'autant plus important que sa température est élevée. Pour les concentrés bactériens, la température d'effondrement est généralement supérieure de plus d'une dizaine de degrés à la température de transition vitreuse (Fonseca *et al.*, 2004a). Cependant, ces températures dépendent du type de cellule (taille et forme) et de la concentration cellulaire du concentré bactérien (Fonseca *et al.*, 2004b).

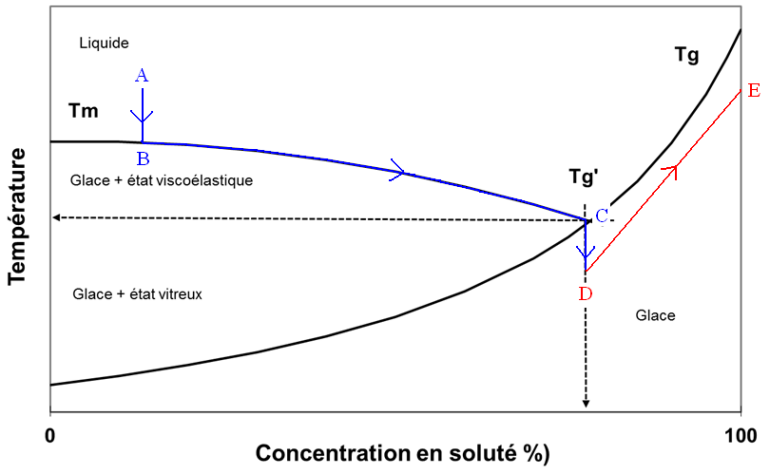


Figure I.14 Diagramme d'état montrant l'évolution du concentré bactérien au cours de la lyophilisation (D à E : séchage). Tg et Tg', température de transition vitreuse ; Tm, température de fusion.

Pour que le produit ne subisse pas de dégradation, il faut donc maintenir la température du produit en dessous de sa température de transition vitreuse (figure I.14 : trajet D-E). Or cette température évolue au cours de la lyophilisation du produit puisqu'elle dépend de la teneur en eau et donc de l'activité de l'eau du produit (isotherme de sorption), éléments clés du procédé de lyophilisation (figure I.15). En effet, l'eau étant un agent plastifiant, cette température de transition vitreuse diminue lorsque la teneur en eau augmente (Jouppila *et al.*, 1997).

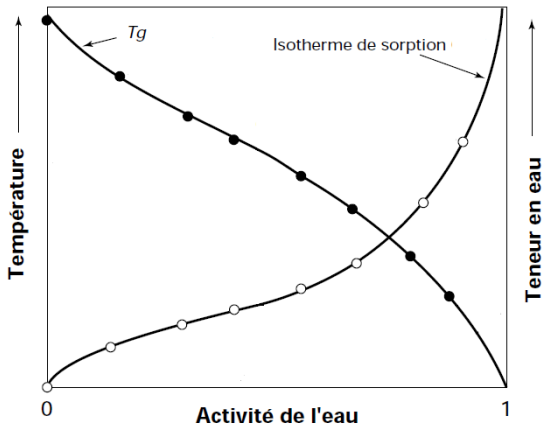


Figure I.15 Schéma des relations entre activité de l'eau, teneur en eau et température de transition vitreuse. Tg, température de transition vitreuse.

La dessiccation secondaire ou désorption

Seule une partie de l'eau est congelable dans les produits biologiques (70 à 90 %) et seule cette fraction subira donc l'étape de sublimation. L'étape de désorption vise donc à éliminer l'eau liée et non congelée qui représente donc entre 10 et 30 % de l'eau initialement présente dans le produit. Une partie de cette étape peut commencer lors de la sublimation et se poursuit lorsque toute l'eau congelée est sublimée par un abaissement de la pression partielle de l'enceinte ou par une élévation de la température du produit au-dessus du point triple car le risque de fusion n'existe plus (plus de glace). Cependant, la température du produit doit, là encore, rester compatible avec le maintien de sa structure et sa thermo-sensibilité. Les cavités laissées par les cristaux après la sublimation de l'eau confèrent la porosité nécessaire à l'évaporation de l'eau située dans l'espace interstitiel (Konstantinidis *et al.*, 2011). Cette eau doit être éliminée jusqu'à un niveau optimal garantissant la stabilité du produit pendant le stockage.

Le retour du produit à la pression atmosphérique en fin de lyophilisation est une opération qui doit se réaliser en absence d'eau. Il est ensuite indispensable de conditionner le produit lyophilisé dans un emballage étanche à la vapeur d'eau (et à la lumière) et de préférence sous atmosphère contrôlée (absence d'oxygène).

En fin de lyophilisation, la faible teneur en eau atteinte, conjuguée à la porosité importante du produit lyophilisé, expliquent sa très forte hygroscopicité et son aptitude à se réhydrater instantanément.

I.2.2. Les dommages cellulaires provoqués par la lyophilisation

Tout au long de la lyophilisation, les cellules bactériennes sont exposées à différents types de stress dont :

- Le stress thermique provoqué par l'abaissement de la température au cours de la congélation
- Le stress mécanique provoqué par les changements d'état de l'eau principalement pendant la congélation
- Le stress osmotique provoqué par la concentration des solutés au cours de la congélation
- Le stress hydrique dû à la rupture des liaisons hydrogène entre les biomolécules (protéines, lipides) et les molécules d'eau de l'enveloppe d'hydratation pendant la désorption
- Le stress oxydatif dû aux faibles teneurs en eau du produit après dessiccation

Ces stress peuvent causer des dommages aux cellules bactériennes au niveau de différentes cibles qui sont principalement les lipides, les protéines et les acides nucléiques. Bien que les mécanismes physico-chimiques d'altération sont complexes et ne sont pas encore complètement élucidés, de nombreuses hypothèses sont proposées sur les effets délétères de la déshydratation et des basses températures sur les cellules bactériennes. Dans ce chapitre, nous nous proposons de recenser les dommages cellulaires provoqués par la lyophilisation.

I.2.2.1. Dommages causés par la congélation

Dommages mécaniques

Comme nous l'avons vu précédemment, la mobilité de l'eau congelable dépend de la vitesse de congélation (Mazur, 1977). Par conséquent, les dommages mécaniques dus à la formation de glace dépendent également de la vitesse de congélation (glace extra- et éventuellement intra-cellulaire). A l'extérieur de la cellule, les cristaux de glace exercent des contraintes mécaniques sur les parois cellulaires et peuvent provoquer leur déformation. Toutefois ces distorsions sont en général réversibles (Souzu *et al.*, 1999). Si des cristaux de glace se forment à l'intérieur de la cellule (vitesse de congélation rapide), ces cristaux peuvent provoquer la destruction mécanique des membranes (perméabilisation) causant la mortalité des cellules (Bank and Mazur, 1973).

Cryoconcentration

La cristallisation de l'eau pure extracellulaire occasionne la concentration des autres molécules de la matrice ce qui entraine une élévation des concentrations extracellulaires en électrolytes et de la

pression osmotique externe. Celle-ci entraine une diminution du volume cellulaire par sortie passive de l'eau intracellulaire (synérèse) (Mazur, 1977). De plus, la modification de l'environnement physico-chimique des cellules peut conduire à un changement de pH et/ou une précipitation des sels pouvant engendrer une dénaturation des composants intracellulaires dont les protéines et les acides nucléiques.

Dénaturation des composants cellulaires

En plus de la dénaturation des biomolécules par cryoconcentration, l'abaissement de la température du produit peut aussi induire des modifications de conformation des phospholipides. Nous avons effectivement mentionné auparavant que les phospholipides passent d'un état liquide cristallin à un état gel en dessous d'une certaine température appelée température de transition lipidique (Tm). Cette diminution de la température du produit peut également provoquer une diminution de la stabilité des interactions hydrophobes responsables de la dénaturation des protéines et plus précisément de la modification de leur conformation (hélice α vers feuillet β) (Bischof *et al.*, 2002).

I.2.2.2. Dommages causés par la déshydratation

Bien que non mentionnée dans la description de la structure cellulaire des procaryotes, l'eau est le composé majeur des structures biologiques et a un rôle très important. Les molécules d'eau contribuent à la stabilité des protéines, des lipides et de l'ADN et confèrent un ordre structural dans les cellules (Potts, 1994). Leur élimination cause ainsi des changements drastiques au niveau des interactions inter- et intra-moléculaires à l'origine de changements de conformation et des propriétés thermodynamiques des biomolécules.

Changement de conformation des protéines

De nombreuses études se sont intéressées à la dénaturation de protéines lyophilisées alors que peu d'études se sont attachées à l'étude de la dénaturation des protéines au sein de cellules lyophilisées. Oldenhof *et al.* (2005) ont montré que les protéines peuvent être dénaturées, avec un changement de conformation d'hélice α en feuillet β, pendant le séchage aussi bien sous forme isolée (cas de la poly-L-lysine) qu'au sein de cellules de *Lactobacillus bulgaricus*. L'élimination des liaisons hydrogène entre l'eau et les parties hydrophiles des protéines peut également être à l'origine de plus forte dénaturation conduisant à l'agrégation des protéines. De plus, ces dénaturations peuvent être irréversibles et inhiber l'activité des enzymes (Prestrelski *et al.*, 1993).

Transition de phase des lipides membranaires

L'eau interagit également avec les parties hydrophiles des phospholipides (têtes polaires) par formation de liaisons hydrogène, créant de ce fait une sphère d'hydratation autour de la membrane. Ces molécules d'eau jouent le rôle de séparateur entre les têtes polaires des phospholipides et, en leur absence, la densité des parties hydrophiles augmente, renforçant les interactions de Van Der Waals entre les chaînes acyles. Ce déséquilibre amène à une augmentation de la température de transition lipidique, Tm (figure I.16) (Crowe *et al.*, 1989b). Par exemple, la température de transition lipidique entre un état frais (hydraté) et un état lyophilisé (sec) passe de 4 à 20 °C pour des cellules de *L. plantarum* (Linders *et al.*, 1997b), de 35 à 40 °C pour des cellules de *L. bulgaricus* et de 0 à 68 °C pour des liposomes de 1-palmitoyl 2-oleyl phosphatidyl choline (Oldenhof *et al.*, 2005).

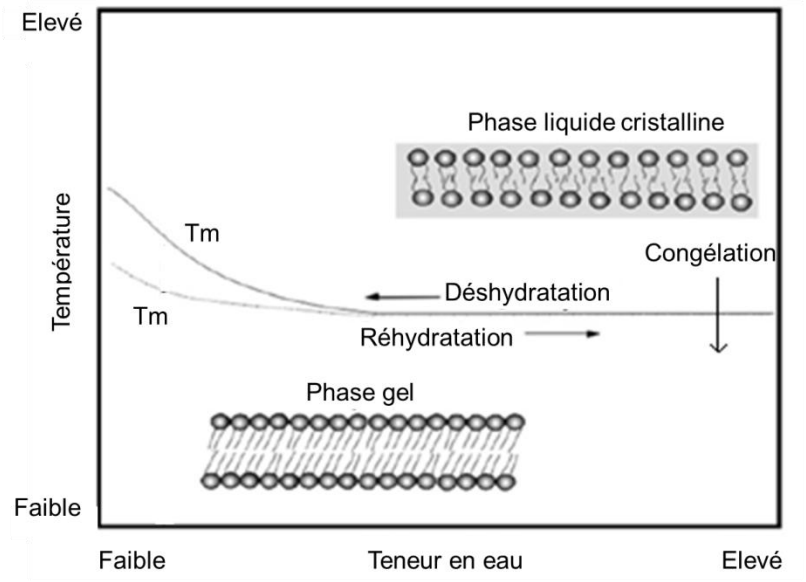


Figure I.16 Diagramme de phase simplifié des phospholipides lors de la lyophilisation. Tm, température de transition vitreuse. Adapté de Santivarangkna *et al.* (2008).

Or, la diversité des phospholipides composant la membrane cellulaire entraine des réarrangements lipidiques intramembranaires lors des transitions de phase. Ce phénomène correspond à un regroupement progressif des phospholipides à l'état gel et des phospholipides à l'état liquide conduisant à des régions de discontinuité moléculaires au sein de la membrane. Par conséquent, des ruptures peuvent se produire entre les domaines solides et liquides provoquant la perméabilisation de la membrane (Wagman, 1960). Ces changements de transition de phase et donc de perméabilisation deviennent un problème lors de l'étape de réhydratation où des fuites de composés cellulaires peuvent avoir lieu (Tm > T concentré bactérien) (Yao *et al.*, 2009).

I.2.2.3. Dommages causés pendant le stockage

Oxydation des composants cellulaires

La toxicité de l'oxygène est généralement attribuée à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH°). Ces espèces chimiques oxygénées très réactives car instables réagissent avec de nombreux composés cellulaires (lipides, ADN, protéines) et provoquent ainsi leur altération (Storz and Imlay, 1999). Les ROS seraient donc à l'origine de dommages irréversibles tels que :

- La peroxydation et la désestérification des lipides pouvant entrainer une modification de la fluidité membranaire (Borst *et al.*, 2000)
- La dénaturation des protéines pouvant conduire à une inhibition de l'activité des enzymes
- Des dommages (cassures ou mutations) au niveau des acides nucléiques (Heckly and Quay, 1981)

Toutes ces altérations (Figure I.17) peuvent ainsi être à l'origine de conséquences drastiques sur le métabolisme général des cellules bactériennes et sur leur survie.

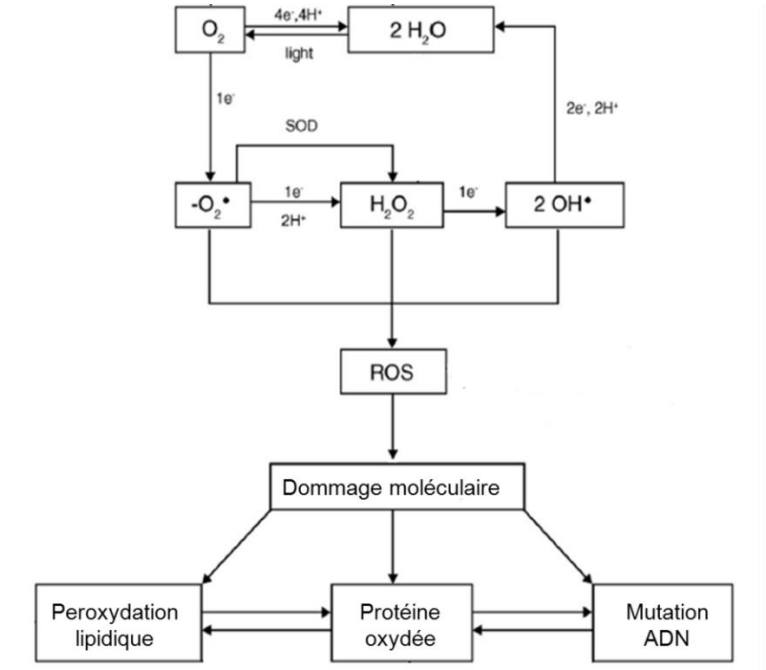


Figure I.17 Sources de ROS et réponse cellulaire des bactéries lactiques face au ROS. Adaptée de Franca *et al.* (2007).

La diffusion de l'oxygène étant facilitée dans les cellules séchées (Ruckold *et al.*, 2001), l'oxydation semble être un phénomène à prendre en compte lors de la lyophilisation et du stockage. Cependant, il est difficile d'évaluer l'état d'oxydation des bactéries lyophilisées puisque les ROS générés et les cibles d'oxydation sont multiples. Kurtmann *et al.* (2009a) ont ainsi mis en évidence une accumulation de ROS à l'intérieur des cellules de *Lactobacillus acidophilus* stockées à l'état lyophilisé. D'autres études ont montré un changement de la composition en acides gras membranaires que les auteurs ont attribué à une oxydation des lipides. Par exemple, une diminution du rapport d'acides gras insaturés sur acides gras saturés a été observé au cours du stockage à 20 °C de cellules lyophilisées de *Lactobacillus bulgaricus* (Castro *et al.*, 1995). De plus, l'oxydation de ces acides gras serait à l'origine de modifications des propriétés de la membrane telles que la fluidité membranaire (Borst *et al.*, 2000). Castro *et al.* (1996) ont suggéré que la diminution de l'activité des pompes à proton de *Lactobacillus bulgaricus* serait due à l'altération de la composition en acides gras pendant le stockage des cellules à l'état lyophilisé, perturbant ainsi les interactions avec les protéines membranaires qui sont essentielles pour leur activité. L'hypothèse de l'existence d'un lien entre les processus d'oxydation et la perte de viabilité et/ou d'activités métaboliques des bactéries est donc pertinente.

Brunissement non enzymatique

Des brunissements ont été observés lors du stockage de ferments à l'état lyophilisé (Kurtmann *et al.*, 2009b). Il s'agit de réactions de Maillard qui sont des réactions de brunissement non enzymatique résultant de l'interaction entre les groupements carbonyles des sucres réducteurs (milieu environnant les cellules) et les groupements amines des protéines et des acides nucléiques de la cellule bactérienne. Ces réactions aboutissent à la formation de pigments (mélanoïdines), de composés aromatiques mais aussi de molécules toxiques pour les cellules telles que l'hydroxyméthylfurfural (Martins *et al.*, 2001). Dans cette optique, Kurtmann *et al.* (2009b) ont démontré l'effet néfaste de l'hydroxyméthylfurfural sur *Lactobacillus acidophilus*. En effet, l'ajout d'hydroxyméthulfurfural dans le milieu de protection accélère la perte de viabilité du ferment au cours du stockage à l'état lyophilisé.

En résumé, la lyophilisation d'un concentré bactérien implique divers phénomènes physico-chimiques et biochimiques qui peuvent être à l'origine d'altérations cellulaires. Tous ces dommages ou une partie de ces dommages peuvent conduire à des pertes de viabilité et/ou de fonctionnalités des bactéries affectant ainsi la qualité globale du ferment.

I.2.3. Conduite optimale du procédé de lyophilisation

Afin d'obtenir des ferments de haute qualité (cultivabilité élevée et bonne reprise de leurs activités métaboliques), il est donc primordial de conduire le procédé de lyophilisation de façon à limiter ces phénomènes de dégradation. Les principaux paramètres opératoires impactant la qualité des ferments sont détaillés dans cette partie.

I.2.3.1. Lyophilisation

Cinétique et température finale de congélation

La vitesse de congélation est un des paramètres les plus importants à prendre en compte (Fonseca *et al.*, 2001a; Schoug *et al.*, 2006). Une vitesse de congélation optimale doit être à la fois assez lente afin d'éviter la formation de glace intracellulaire (stress mécanique) et à la fois assez rapide afin de minimiser les effets de stress osmotique liés aux fortes concentrations en solutés dans la matrice (Mazur, 1977). Cependant, cette valeur optimale varie selon les espèces voire les souches étudiées. Ainsi, une vitesse de congélation élevée (300 °C.min^{-1} au lieu de 3,5 °C.min^{-1}) améliore la cryotolérance de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Fonseca *et al.*, 2001a) alors qu'une vitesse de congélation optimale pour la survie d'*Oenococcus oeni* doit être intermédiaire (40 °C.min^{-1} par rapport à 4 et 130 °C.min^{-1}) (Zhao and Zhang, 2009).

Il est également nécessaire d'abaisser la température du concentré bactérien à une valeur inférieure à la température de transition vitreuse (Tg') de la matrice afin de limiter les réactions de dégradation par formation d'une matrice amorphe (Crowe *et al.*, 1998; Santivarangkna *et al.*, 2011).

En outre, la tolérance des bactéries lactiques au procédé de congélation mais aussi de lyophilisation est généralement espèce et même souche dépendante. Par exemple, les bacilles semblent plus sensibles que les coques au procédé de congélation (Fonseca *et al.*, 2001a) et de lyophilisation (Bozoglu *et al.*, 1987). La meilleure tolérance des coques à la congélation serait due à leur petite taille et leur forme sphérique amenant à un ratio surface d'échange sur volume intracellulaire élevé qui facilite le flux d'eau vers l'extérieur des cellules pendant la congélation (Fonseca *et al.*, 2000; Mazur, 1977).

Température de sublimation et de désorption

Nous avons précédemment indiqué qu'un rétrécissement voire un effondrement de la matrice en cours de sublimation et/ou de désorption peut avoir lieu si la température de la matrice cryoconcentrée dépasse une température dite d'effondrement. La conduite d'un cycle de lyophilisation doit donc être optimisé, en s'appuyant sur la connaissance de cette température d'effondrement mais aussi de la température de transition vitreuse de la matrice cryoconcentrée, afin d'assurer la stabilité physique et biologique du produit (Fonseca *et al.*, 2001b; Passot *et al.*, 2012). Le maintien de la température du produit à une valeur inférieure de 2 à 5 °C à la température d'effondrement pendant toute la durée de la lyophilisation est ainsi préconisé.

Niveau de déshydratation

Les conditions de déshydratation peuvent également modifier la qualité des ferments. Le degré de déshydratation optimal doit correspondre à un compromis entre le ralentissement nécessaire des processus métaboliques à l'origine de la dégradation cellulaire par la réduction de l'activité de l'eau et la préservation d'une quantité d'eau minimale pour préserver les structures et fonctions biologiques indispensables à la reprise d'activité des bactéries après réhydratation (stress hydrique). De plus, les réactions d'oxydation sont favorisées aux très basses valeurs d'activité d'eau (Ruckold *et al.*, 2001). Une activité de l'eau et une teneur en eau optimales semblent se situer respectivement entre 0,1 et 0,25 % et entre de 2 et 5 % et pour les bactéries lactiques (Passot *et al.*, 2012).

I.2.3.2. Stockage

Avec l'objectif constant de produire des ferments de haute qualité, le conditionnement et le stockage des cellules stabilisées par lyophilisation doit permettre de limiter la dégradation du produit en le protégeant des chocs mécaniques et thermiques éventuels, et en limitant les échanges physico-chimiques avec l'environnement extérieur lors du stockage.

Température

De nombreuses études ont montré que la température de stockage est cruciale pour la stabilité des ferments lyophilisés ou séchés (Figure I.18). Plus cette température est élevée, plus le taux de survie des bactéries diminue (Achour *et al.*, 2001; Andersen *et al.*, 1999; Aschenbrenner *et al.*, 2012; Higl *et al.*, 2007).

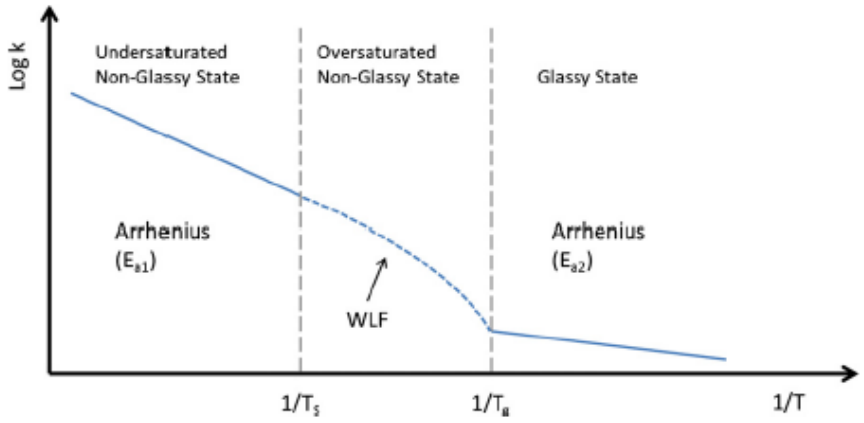


Figure I.18 Evolution de la perte de viabilité de bactéries lyophilisées en fonction de la température de stockage. K, vitesse de réaction ; Ts, température de saturation ; Tg, température de transition vitreuse ; WLF, Williams-Landel-Ferry. D'après Aschenbrenner *et al.* (2012).

Même si la vitrification de la matrice semble fondamentale pour une meilleure survie des cellules à la lyophilisation, c'est aussi une source majeure d'instabilité pendant le stockage. En effet, cette matrice amorphe et instable thermodynamiquement évolue au cours du temps pour tendre vers une organisation cristalline. Or, l'apparition des premiers cristaux a généralement pour conséquence un relargage de l'eau d'hydratation de la matrice initialement amorphe ce qui provoque un abaissement de la température de transition vitreuse (Tg) de la matrice (effet plastifiant) entrainant une accélération de la cristallisation (Bhandari and Howes, 1999). Ce phénomène peut ainsi conduire à un effondrement de la matrice ou encore à une augmentation des vitesses de réactions de dégradation chimique telles que le brunissement non enzymatique (Jouppila *et al.*, 1997; Kurtmann *et al.*, 2009b). Afin de maintenir un état amorphe stable pendant le stockage, il est donc primordial de stocker les ferments lyophilisés à une température inférieure à la température de transition vitreuse.

Humidité

Le taux d'humidité de l'atmosphère joue aussi un rôle clé dans la stabilité des ferments au stockage. Il est généralement observé que le nombre de cellules viables décroit quand l'activité de l'eau et donc la teneur en eau résiduelle du ferment lyophilisé augmentent (Castro *et al.*, 1995; Higl *et al.*, 2007; Passot *et al.*, 2012). Ce phénomène fait de nouveau référence à l'effet plastifiant de l'eau.

Atmosphère

Comme décrit précédemment, le séchage des bactéries les rend vulnérables face à l'oxydation qui peut avoir lieu au cours du stockage. La teneur en oxygène dans l'atmosphère de stockage affecte donc la qualité des ferments. Un conditionnement sous vide ou dans un gaz inerte tel que l'azote permet ainsi d'améliorer la stabilité au stockage des ferments lactiques lyophilisés (Andersen *et al.*, 1999; Bozoglu *et al.*, 1987; Castro *et al.*, 1995).

I.2.3.3. Réhydratation

Avant leur utilisation, les ferments lyophilisés doivent être réhydratés. Cette réhydratation est la dernière étape critique rencontrée par les bactéries. Bien que ce processus de réhydratation est très important pour la reprise de leur activité, différents paramètres tels que le milieu de réhydratation (osmolarité, pH et composition), le temps, la température ou encore le volume de réhydratation peuvent significativement affecter le taux de récupération et donc le taux de survie des ferments lactiques préalablement lyophilisés ou séchés (Costa *et al.*, 2000; Font de Valdez *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 2004; Zhao and Zhang, 2005).

En ce qui concerne le milieu de réhydratation, une hypothèse avancée est qu'il jouerait un rôle dans la réparation des dommages cellulaires en fournissant des nutriments et composés essentiels pour les cellules altérées (Font de Valdez *et al.*, 1985). De plus, il a été suggéré qu'un milieu de réhydratation à forte osmolarité permettrait de contrôler et plus particulièrement de diminuer la vitesse de réhydratation évitant ou du moins limitant un possible choc osmotique (Costa *et al.*, 2000).

Par ailleurs, une réhydratation à une température supérieure à la température de transition lipidique des membranes bactériennes peut prévenir une transition de phase de ces lipides qui peut être à l'origine d'une perméabilisation de la membrane et une fuite des composants cellulaires (*cf.* figure I.16).

I.3. Mécanismes de protection des cellules bactériennes contre la lyophilisation et le stockage à l'état lyophilisé

Afin d'améliorer la qualité des ferments lyophilisés, deux grandes stratégies de protection des bactéries peuvent être mis en place et font l'objet de ce chapitre : l'addition de molécules protectrices et la modification de l'état physiologique des cellules bactériennes en amont du procédé de lyophilisation.

I.3.1. L'addition de molécules protectrices

I.3.1.1. Nature des agents protecteurs

Un grand nombre d'études ont examiné le potentiel rôle protecteur de différentes molécules sur la survie des bactéries lactiques après lyophilisation et stockage. Les molécules identifiées comme étant capables de prévenir significativement les détériorations consécutives à la congélation, à la lyophilisation et au stockage et donc appelées lyoprotecteur, sont :

- Des mono et di-saccharides tels que le tréhalose (Conrad *et al.*, 2000; Leslie *et al.*, 1995), le lactose (Higl *et al.*, 2007), le saccharose (Carvalho *et al.*, 2003b; Siaterlis *et al.*, 2009) et le maltose (Linders *et al.*, 1997a)
- Des polyols tels que l'adonitol (Font de Valdez *et al.*, 1983a), le sorbitol (Carvalho et al., 2003c; Linders *et al.*, 1997a), le mannitol, l'inositol (Andersen *et al.*, 1999) et le glycérol (Desmons *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2006)
- Des acides aminés tels que la cystéine (Font de Valdez *et al.*, 1983b)
- Des sels organiques tels que le glutamate de sodium (Carvalho *et al.*, 2003c), l'aspartate de sodium (Martos *et al.*, 2007), l'ascorbate de sodium (Beal *et al.*, 2001b; Kurtmann *et al.*, 2009a) et l'érythorbate de sodium (Beal *et al.*, 2001b)
- Des polysaccharides et autres polymères tels que la maltodextrine (Oldenhof *et al.*, 2005), l'inuline (Schwab *et al.*, 2007), le dextrane et le polyéthylène glycol (PEG) (Font de Valdez *et al.*, 1983b), la gélatine (Champagne *et al.*, 1996) ou encore l'hydroxyéthylcellulose (HEC), l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC), l'alcool polyvinylique (PVA) et le Ficoll (Wessman *et al.*, 2011)
- Des milieux biologiques complexes tels que l'extrait de levure (Zhao and Zhang, 2005) et le lait écrémé (Huang *et al.*, 2006; Oldenhof *et al.*, 2005)

Cependant ces agents n'ont pas tous la même efficacité contre les effets délétères de la lyophilisation et du stockage des bactéries lactiques. De plus, cette efficacité dépend fortement de la souche étudiée, de la proportion relative entre la concentration bactérienne et les molécules protectrices et du temps de mis en contact (Huang *et al.*, 2006; Strasser *et al.*, 2009). Par exemple, la survie après lyophilisation d'*Enterococcus faecium* et de *Lactobacillus plantarum* a été étudiée en présence de différents lyoprotecteurs. Alors que toutes les molécules étudiées (glucose, saccharose, tréhalose et maltodextrine) permettent une bonne résistance d'*Enterococcus faecium* à la lyophilisation, le tréhalose et le saccharose apparaissent comme plus efficaces que les autres molécules pour la protection de *Lactobacillus plantarum* pendant la lyophilisation (Strasser *et al.*, 2009).

I.3.1.2. Mécanismes de protection des agents protecteurs

Les molécules listées précédemment visent à protéger les cellules des stress subis lors des étapes de stabilisation par différents mécanismes qui ne sont pas encore totalement élucidés et qui dépendent de la nature des lyoprotecteurs. Les principaux mécanismes identifiés sont décrits ci-dessous.

Prévention de la formation de cristaux de glace intracellulaires

Parmi les lyoprotecteurs, certains peuvent pénétrer à l'intérieur des cellules bactériennes et abaisser la température de nucléation prévenant ainsi la formation de glace intracellulaire (Mc Gann, 1978). De plus, ces lyoprotecteurs vont se substituer à une partie de l'eau intracellulaire permettant une déshydratation partielle des cellules. Les lyoprotecteurs non pénétrants, quant à eux, vont induire un efflux de l'eau hors des cellules favorisant, là encore, la déshydratation cellulaire et réduisant ainsi les risques de formations de glace intracellulaire. Tous ces lyoprotecteurs peuvent réduire également la vitesse de croissance des cristaux de glace.

Maintien dans un état solide amorphe

Comme nous l'avons vu précédemment, il est important de garder le concentré bactérien dans un état solide amorphe pour réduire la mobilité moléculaire et ainsi limiter les vitesses de réactions de dégradation. L'utilisation de certaines molécules protectrices peut entrainer une augmentation de la température de transition vitreuse de la matrice et ainsi permettre le maintien de cette matrice dans un état amorphe autour des cellules à des températures relativement élevées lors du procédé de lyophilisation et du stockage. La température de transition vitreuse de la matrice dépend

essentiellement de la nature de la molécule ajoutée et de sa concentration. Le tableau ci-dessous (I.2) regroupe des valeurs de température de transition vitreuse de quelques solutions protectrices.

Tableau I.2 Température de transition vitreuse et d'effondrement de solutions aqueuses contenant différentes substances protectrices. M, masse moléculaire ; Tg', température de transition vitreuse ; Tcoll, température d'effondrement. D'après Beal *et al.* (2008).

Solutions aqueuses (% w/w)	**M (g/mol)**	**Tg' (°C)**	***Tcoll (°C)***
Mélanges binaires			
Glucose 10 %	180	-41	
Lactose 10 %	342	-28	
Tréhalose 10 %	342	-30	
Maltose 10 %	342	-30	*-30*
Saccharose 10 %	342	-32	*-32*
Maltodextrine DE5-8 10 %	≈ 100 000	-9	*-7*
Glycérol 10 %	92	-71	
Bétaïne 12 %	156	-100	
Sodium glutamate 10 %	147	-47	*-46*
Sodium citrate 10 %	714	-43	-40
Sodium ascorbate 10 %	198	-37	-37
Sorbitol 10 %	182	-45	-46
Mannitol 10 %	182	-36	
Mélanges ternaires et quaternaires			
Saccharose 5 % + Maltodextrine DE 5-8 5%		-24	-19
Saccharose 5 % + Sorbitol 5 %		-41	-38
Saccharose 5 % + mannitol 15 %		-40	-14
Saccharose 15 % + ascorbate de sodium 2 %		-32	-32
Saccharose 3 % + ascorbate de sodium 2 % + maltodextrine DE5-8 12 %		-18	-15
Mélange complexe			
Lait écrémé 10 %		-25	

Ce tableau montre que la température de transition vitreuse de la matrice augmente avec la masse molaire de la molécule présente dans la matrice. Ainsi, les maltodextrines, polysaccharides de masse molaire élevée, apparaissent être un protecteur adapté pour renforcer la vitrification de la matrice.

Remplacement de l'eau

Les sucres et plus particulièrement les disaccharides peuvent contribuer à la stabilisation des structures cellulaires et macromoléculaires en remplaçant l'eau par formation de liaisons hydrogène entre les sucres et les résidus polaires des biomolécules (Crowe *et al.*, 1984).

La figure I.19 montre que le tréhalose, par exemple, interagit avec les têtes polaires des phospholipides, évitant un changement de conformation des lipides et donc des transitions de phase de la bicouche lipidique lors de la déshydratation et de la réhydratation des cellules. Plus précisément, ces sucres préviennent l'augmentation de la température de transition entre la phase liquide cristalline et la phase gel en remplaçant l'eau lors de l'élimination de cette dernière. Alors que la lyophilisation de cellules d'*E. coli* provoque une augmentation de la température de transition de phase lipidique de 40 °C, l'ajout de sucre (saccharose ou tréhalose à 100 mM) dans le milieu protecteur permet de maintenir cette température proche de la température de transition lipidique de la membrane des cellules fraiches (Tm =10 °C) (Leslie *et al.*, 1995). Ce phénomène permet ainsi de protéger la membrane des cellules bactériennes de la perméabilisation et donc de la fuite des composants cellulaires lors de la réhydratation.

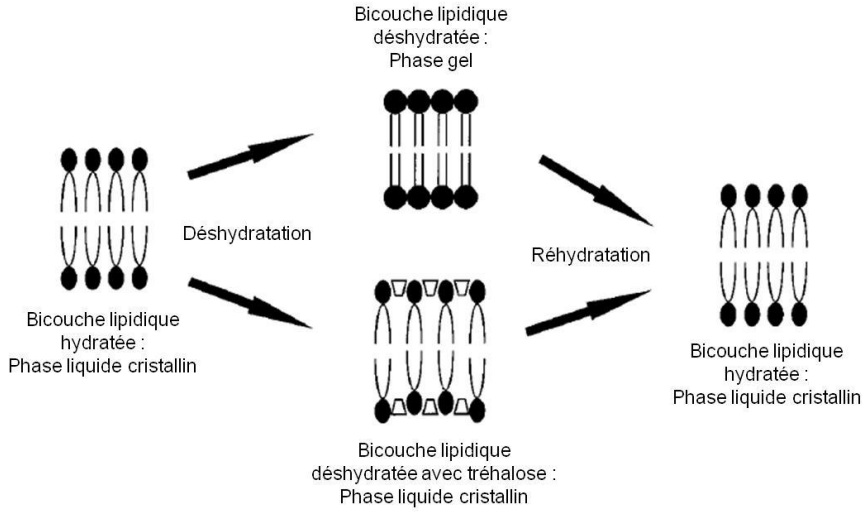


Figure I. 19 Illustration du mécanisme de stabilisation de la bicouche lipidique dans un état sec par le tréhalose. Adapté de Crowe *et al.* (1998).

Par ailleurs, les sucres (agent pénétrant) peuvent aussi prévenir la dénaturation des protéines membranaires et intracellulaires des cellules bactériennes par la formation de ponts hydrogènes qui permettent d'aider au maintien de la structure ternaire des protéines en l'absence d'eau (Leslie *et al.*, 1995).

Limitation des phénomènes d'oxydation

Afin d'assurer une meilleure stabilité des ferments lyophilisés ou séchés au stockage, plusieurs auteurs recommandent l'addition de molécules telles que l'ascorbate de sodium (Kurtmann *et al.*, 2009a; Teixeira *et al.*, 1995) et l'érythorbate de sodium (Beal *et al.*, 2001b) ou encore le mannitol (Andersen *et al.*, 1999) et le sorbitol (Linders *et al.*, 1997a). En effet, toutes ces molécules sont reportées pour avoir des propriétés antioxydantes, c'est-à-dire qu'elles sont capables de limiter les réactions d'oxydation par piégeage des ROS.

L'association des différents mécanismes de protection décrit ci-dessus permettrait ainsi une protection quasi-complète des ferments à la lyophilisation et au stockage. Le choix d'un milieu de protection approprié et plus précisément de la combinaison de différentes molécules protectrices est donc crucial pour améliorer la survie des bactéries à ce procédé de préservation (Huang *et al.*, 2006; Oldenhof *et al.*, 2005).

I.3.2. Modification de l'état physiologique des cellules bactériennes en amont de la stabilisation

Les bactéries présentent des capacités d'adaptation remarquables à certains stress physico-chimiques modérés rencontrés dans leur environnement. La réponse adaptative des bactéries s'opère par le déclenchement de mécanismes cellulaires complexes qui aboutissent à un état de tolérance. Cette pré-adaptation peut également permettre aux bactéries de survivre dans des conditions extrêmes qui sont normalement létales pour les cellules. Dans cette optique, la culture des bactéries lactiques en conditions de stress subléthales peut permettre aux cellules de se pré-adapter à des stress extrêmes comme ceux provoqués par la lyophilisation et ainsi d'améliorer leur résistance à ce procédé de préservation.

I.3.2.1. Réponses aux stress de *Lactococcus lactis*

Dans un premier temps, il est donc important d'identifier et de comprendre les mécanismes de protection et de réparation des dommages cellulaires dus aux différents stress pouvant être rencontrés par *L. lactis* lors de la lyophilisation. Dans ce chapitre, nous proposons ainsi de recenser les réponses adaptatives identifiées chez *L. lactis* face aux stress thermique, osmotique et oxydatif (stress modérés).

Stress thermique

Le stress thermique est l'un des stress majeurs auxquels les bactéries doivent faire face. Celui-ci comprend le stress hypothermique (choc froid) et le stress hyperthermique (choc chaud). Cependant, seul le stress hypothermique, ayant lieu lors de la lyophilisation, est traité dans ce chapitre.
L. lactis est une bactérie mésophile dont la température optimale de croissance se situe autour de 30 °C. Une baisse de température en dessous de cette température optimale de croissance entraine différents changements physiologiques (Phadtare, 2004) comme :

- Une diminution de la fluidité membranaire qui réduit l'efficacité des fonctions associées à la membrane
- Une stabilisation de la structure secondaire de l'ADN et de l'ARN qui inhibe la transcription, la traduction et la réplication
- Une diminution de l'efficacité du repliement des protéines et donc un ralentissement des vitesses de réactions enzymatiques

En réponse à une diminution de la température, *L. lactis* développe donc des réponses adaptatives décrites ci-dessous.

La première réponse des bactéries à une baisse rapide de température consiste en la synthèse de protéines spécifiques, destinées à améliorer ou du moins à maintenir l'efficacité des processus métaboliques de la cellule. Ces protéines sont appelées « cold induced proteins » (CIP) ou protéines induites par le froid. Par exemple, un choc thermique à 10 °C induit la synthèse de 23 CIP chez *L. lactis* MG1363. L'identification de plusieurs de ces CIP suggère une implication de ces protéines dans une variété de processus cellulaires tels que le catabolisme des sucres (Hpr, CcpA, β-phosphoglucomutase), la structuration des chromosomes (HslA), la transduction de signaux (LlrC) et l'adaptation au stress osmotique (OsmC) (Wouters *et al.*, 2001; Wouters *et al.*, 2000).

Parmi ces CIP, des protéines de faible poids moléculaire (7,5 kDa) sont plus fortement induites et donc synthétisées en plus grand nombre. Ces protéines sont regroupées sous le terme de « cold shock proteins » (CSP) ou protéines de choc froid. Alors que 5 CSP (CspA CspB, CspC, CspD et CspE) ont été identifiées chez *L. lactis* MG1363 (Wouters, 1998), seulement 2 CSP (CspD et CspE)

sont présentes chez *L. lactis* IL1403 (Bolotin *et al.*, 2001). De par leur structure, certaines CSP pourraient se lier à l'ADN simple brin ou aux ARNs, déstabilisant ainsi leurs structures secondaires (Figure I.20). Elles agiraient ainsi comme des chaperonnes de l'ARN, facilitant la transcription et la traduction à basse température (Graumann and Marahiel, 1998; Horn *et al.*, 2007; Phadtare, 2004). D'autres CSP seraient capables de réguler l'expression de CIP voire même d'autres membres de la famille des CSP. En effet, il a été montré que la surproduction ou la délétion de CSP modifient le niveau d'expression de certaines CIP (OsmC, HslA, LlrC et 3 autres protéines non identifiées) et de certaines CSP (CpsC induit CspB) chez *L. lactis* MG1363 à 10 °C (Wouters *et al.*, 2001).

Toutes ces protéines d'adaptation au froid ont ainsi une grande variété de fonctions, comme par exemple promoteurs d'autres protéines, régulateurs de la transcription et de la traduction, protéines de résistance générale au stress ou d'amélioration de la dégradation des matières carbonées (Horn *et al.*, 2007).

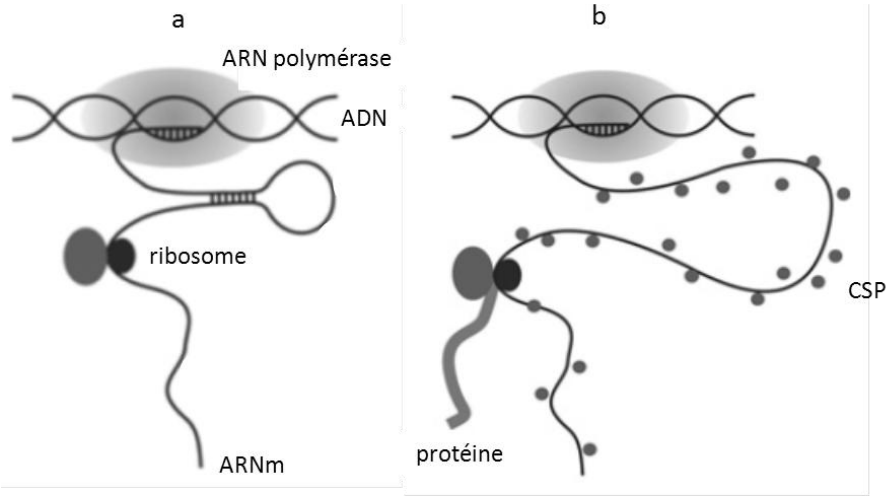


Figure I.20 Représentation schématique des CSP en tant que chaperonne de l'ARN (a : pas de synthèse de CSP et ARN replié en structure secondaire bloquant la traduction en condition de stress froid, b : synthèse de CSP permettant la déstabilisation de la structure secondaire de l'ARN d'où une traduction possible). Adapté de Horn *et al.* (2007).

De cette première réponse découlent d'autres changements du métabolisme cellulaire tels qu'une modification de la composition de la membrane cytoplasmique. Par exemple, une augmentation du ratio de la teneur en acides gras insaturés sur la teneur en acides gras saturés a été observé lors de l'application d'un stress froid (10 °C pendant 2 heures) sur plusieurs souches de *L. lactis* (Broadbent and Lin, 1999).

Etant donné qu'un abaissement de la température entraine une diminution de la fluidité membranaire, la cellule répond donc au stress froid par une adaptation homéovisqueuse de sa membrane (Sinensky, 1974). Pour cela, la cellule met en œuvre une modification de la composition en

acides gras membranaires permettant ainsi de maintenir une certaine fluidité membranaire et de rester en phase liquide cristalline favorable à l'activité cellulaire se déroulant au niveau de la membrane.

Comme évoqué très succinctement auparavant, les propriétés physiques de la membrane varient selon la nature des acides gras membranaires : longueur de la chaîne acyle, degré d'insaturation, conformation des doubles liaisons (cis/trans), cyclisation, branchement et configuration branchée (iso/antéiso) (Denich *et al.*, 2003; Mykytczuk *et al.*, 2007). De manière générale, les interactions hydrophobes, qui s'opposent à l'écartement des phospholipides et donc à l'augmentation de la fluidité, augmentent avec la longueur des chaînes hydrocarbonées des acides gras. Ainsi, la température de transition lipidique est d'autant plus élevée que les chaînes hydrocarbonées sont longues. A l'inverse, la présence d'insaturations en conformation cis crée un changement de direction des chaînes d'acides gras ce qui défavorise la formation d'interactions entre les chaînes. En conséquence, la fluidité de la membrane augmente et la température de transition lipidique diminue lorsque le nombre d'insaturations en position cis augmente (Mykytczuk *et al.*, 2007). Ainsi, les résultats obtenus par Broadbent et Lin (1999) suggèrent une adaptation homéovisqueuse des cellules de *L. lactis* lors de l'application du stress froid avec une probable augmentation de la fluidité membranaire et de la température de transition lipidique.

Ces modifications de la composition en acides gras membranaires sont effectuées, par les bactéries, soit par une biosynthèse de novo d'acides gras, soit par l'altération de la structure des acides gras préexistants afin de répondre plus rapidement à un changement brusque de température (Zhang and Rock, 2008). Il existe trois procédés biochimiques à l'origine de la modification des acides gras préexistants (modifications postsynthétiques) (figure I.21) :

- L'introduction d'une insaturation en position cis par des désaturases (Zhang and Rock, 2008)
- La formation d'acides gras cycliques à partir d'acides gras insaturés en conformation cis (Grogan and Cronan, 1997). Les acides gras cycliques sont formés par l'addition d'un groupe méthyle, provenant de la S-adénosyl-L-méthionine (SAM), à la double liaison carbone-carbone des acides gras insaturés. Cette modification est catalysée par la CFA synthase.
- La transisomérisation cis-trans. Certaines bactéries sont capables de convertir leurs acides gras insaturés de la conformation cis à la conformation trans (Keweloh and Heipieper, 1996; Loffeld and Keweloh, 1996). Cette isomérisation de la double liaison est catalysée par une isomérase.

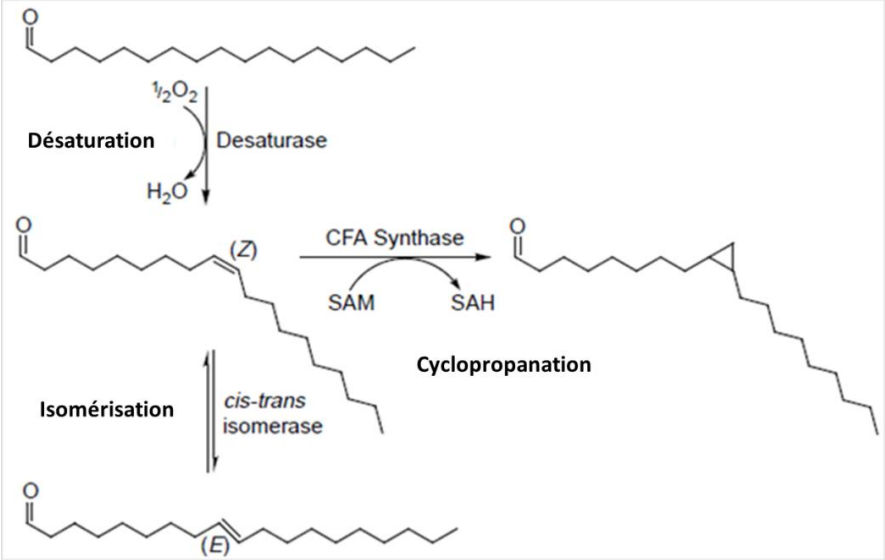


Figure I.21 Schéma des modifications postsynthétiques de la chaine acyle des acides gras membranaires. CFA, acide gras cyclique ; SAM, S-adénosyl-L-méthionine ; SAH, S-adénosyl-L-homocystéine. D'après Cronan (2002).

Stress osmotique

Le stress osmotique correspond soit à une diminution, soit à une augmentation de l'osmolarité de l'environnement de la bactérie qui, en modifiant la disponibilité de l'eau de la cellule, affecte sa croissance voire même sa survie (Csonka, 1989). Comme nous l'avons déjà vu, une brusque augmentation de l'osmolarité du milieu externe a lieu lors de la lyophilisation entrainant un rapide flux d'eau vers l'extérieur de la cellule. Cet efflux d'eau a pour conséquence une diminution de la pression de turgescence indispensable à l'élongation de la cellule durant la croissance, un changement de volume cellulaire et une variation de la concentration cytoplasmique en solutés pouvant amener à une variation de pH (composition ionique). Cette perte en eau intracellulaire va ainsi inhiber certains processus physiologiques comme le transport des nutriments, la réplication de l'ADN ou la biosynthèse des macromolécules (Csonka, 1989).

En réponse à ces phénomènes physiques, la cellule bactérienne va mettre en place un système actif permettant d'équilibrer les pressions osmotiques, sans mouvement d'eau, par accumulation de composés organiques appelés osmoprotecteurs ou solutés compatibles en concentration élevée. En effet, ces molécules sont capables de conférer une très forte osmolarité au cytoplasme sans interférer avec les processus cellulaires (Kets *et al.*, 1996). Ainsi, la principale réponse identifiée chez *L. lactis* à une augmentation de pression osmotique dans le milieu environnant correspond à une accumulation de

glycine bétaïne et/ou de proline (Molenaar *et al.*, 1993; O'Callaghan and Condon, 2000; Obis *et al.*, 2001).

La glycine bétaïne, molécule appartenant à la famille des ammoniums quaternaires, est le principal soluté compatible des bactéries lactiques. Cependant, les bactéries lactiques ne présentent pas de voie de biosynthèse de cette molécule. Son accumulation intracellulaire s'effectue donc par importation depuis le milieu extracellulaire. Un système de transport ABC à haute affinité pour la glycine bétaïne (figure I.22) a été isolé et caractérisé chez deux souches de *L. lactis* : BusA (betaine uptake system A) chez *L. lactis* ssp. *cremoris* NCDO763 (Obis *et al.*, 1999) ou aussi appelé OpuA (osmoprotectant uptake A) chez *L. lactis* NZ9000 (van der Heide and Poolman, 2000) et *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 (Bouvier *et al.*, 2000). Ce transporteur présente la particularité d'être composé de deux protéines : une ATPase (BusAA ou OpuAA) et une protéine intégrale possédant un translocateur et une partie hydrophile se liant au substrat (BusAB ou OpuABC).

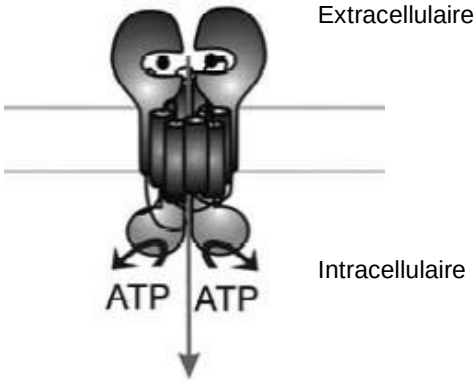


Figure I.22 Schéma d'un transporteur ABC. D'après Poolman (2002).

Chez L. lactis, le mécanisme de régulation de l'entrée de la glycine bétaïne à l'intérieur de la cellule reposerait sur un contrôle de l'activité du transporteur et/ou sur un contrôle de la synthèse de ce transporteur (Obis *et al.*, 2001; van der Heide and Poolman, 2000). Il a été montré que la transcription de l'opéron *busA* (aussi appelé *opuA*), regroupant les gènes codant pour BusAB et BusAA (ou OpuAA et OpuABC) est induite à forte osmolarité (Obis *et al.*, 2001; van der Heide and Poolman, 2000; Xie *et al.*, 2004). Plus précisément, une protéine BusR a été mise en évidence chez *L. lactis* (Romeo *et al.*, 2003). Celle-ci serait impliquée dans la répression de l'opéron *busA* par fixation sur la région promotrice de cet opéron. Cette fixation serait dépendante de la force ionique de l'environnement (Romeo *et al.*, 2007).

Par ailleurs, une diminution de la synthèse totale de protéines d'environ 50 % a été observée chez *L. lactis* MG1363 lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu complété à 2,5 % de chlorure de sodium (choc hypertonique) (Kilstrup *et al.*, 1997). En revanche, la synthèse d'au moins 12

protéines est augmentée. Parmi celles-ci se trouvent des protéines chaperonnes comme les protéines DnaK, GroEL et GroES, généralement impliquées dans la réponse au choc thermique.

Plus généralement, les principales chaperonnes impliquées dans l'homéostasie des protéines chez les bactéries sont : DnaK/DnaJ/GrpE, GroEL/GroES, HtpG, ClpA, ClpB, ClpX et « trigger factor » (Sugimoto *et al.*, 2008). Ces protéines chaperonnes peuvent assurer différentes fonctions telles que le repliement des protéines dans une conformation active, la prévention de la dénaturation des protéines, la désagrégation des protéines endommagées ou encore la dégradation des protéines irréversiblement dénaturées.

Enfin, d'autres études ont également mis en évidence des changements au niveau de l'enveloppe cellulaire de *L. lactis* lors d'un stress osmotique. Une modification de la composition en acide gras membranaires et plus particulièrement une augmentation de la concentration en acides gras cycliques a été observée chez *L. lactis* ssp. *cremoris* NCDO763 en condition de stress hypertonique (NaCl) (Guillot *et al.*, 2000). Par aillleurs, une activation de gènes codant pour la biosynthèse du peptidoglycane (*murF* et *murG*), suggérant une modification de l'enveloppe cellulaire, a également été observée chez *L. lactis* ssp. *lactis* IL1403 lors d'un stress osmotique (Xie *et al.*, 2004).

Stress oxydatif

L. lactis est une bactérie aéro-anaérobie facultative et est donc capable de croître en condition aérobie. L'oxygène étant un bon accepteur d'électrons, celui-ci est transformé en eau, en anion superoxyde (O_2^-) ou en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la NADH oxydase (van Niel *et al.*, 2002). De plus, des ions métalliques comme l'ion ferreux (Fe^{2+}) peuvent catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène en radical hydroxyle (HO°) par la réaction de Fenton. Ces réductions incomplètes de l'oxygène génèrent ainsi différentes espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Tableau I.3) capables d'oxyder certains composants cellulaires. Par exemple, le peroxyde d'hydrogène est capable d'oxyder les résidus cystéines des protéines, inactivant certaines protéines (Storz and Imlay, 1999). Le radical hydroxyle, quant à lui, réagit sur tous les composants cellulaires (lipides, protéines et acides nucléiques).

Tableau I.3 Réactions de réduction de l'O_2 ou d'élimination des ROS chez *L. lactis*

	Antioxydants ou oxydases	Réaction
Formation de ROS	NADH oxydase	$NADH + H^+ + O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O_2$
	NADH oxydase	$NADH + 2\ O_2 \rightarrow NAD^+ + H^+ + 2\ O_2^-$
	NADH oxydase	$2\ NADH + 2\ H^+ + O_2 \rightarrow 2\ NAD^+ + 2\ H_2O$
	Réaction de Fenton	$H_2O_2 + Fe^{2+} + H^+ \rightarrow HO° + H_2O + Fe^{3+}$
Piégeage ou élimination des ROS	SOD	$2\ O_2^- + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
	NADH peroxydase	$NADH + H_2O_2 + H^+ \rightarrow NAD^+ + 2\ H_2O$
	Glutathion peroxydase	$H_2O_2 + 2\ GSH \rightarrow 2\ H_2O + GSSG$
	Pyruvate	Pyruvate + $H_2O_2 \rightarrow$ acétate + $CO_2 + H_2O$

Pour se protéger contre les effets potentiellement destructeurs des ROS, *L. lactis* a développé de nombreux systèmes de défense qui :

- préviennent la formation de ROS,
- les éliminent par dégradation enzymatique ou par piégeage (détoxification),
- ou réparent les dommages cellulaires causés par ces ROS sur les composants cellulaires.

Parmi les systèmes de piégeage de ROS, une superoxyde dismutase à manganèse dont l'expression est induite en conditions d'aérobiose a été identifiée chez *L. lactis* (Sanders *et al.*, 1995). La superoxyde dimustase assure l'élimination enzymatique de l'anion superoxyde dans une réaction qui produit du peroxyde d'hydrogène protégeant ainsi la cellule. En effet, l'anion superoxyde pourrait, en réduisant le fer, former des ions ferreux (Fe^{2+}) disponibles ensuite pour générer des radicaux hydroxyles en réagissant avec le peroxyde d'hydrogène (réaction de Fenton).

Une autre enzyme, la NADH peroxydase, réduit le peroxyde d'hydrogène en eau mais son activité est très faible chez les bactéries lactiques et ne permet pas de réduire l'accumulation intracellulaire de peroxyde d'hydrogène (van Niel *et al.*, 2002).

En réponse à un stress oxydatif (H_2O_2), *L. lactis* est aussi capable d'activer le flux glycolytique produisant du pyruvate qui piège le peroxyde d'hydrogène dans une réaction non enzymatique produisant de l'eau et de l'acétate (van Niel *et al.*, 2002).

L. lactis possède aussi des systèmes réducteurs tels que le système thiorédoxine – thiorédoxine réductase (Vido *et al.*, 2005) ou encore le système incomplet composé d'une glutathion réductase et d'une glutathion peroxydase (Li *et al.*, 2003). Même si *L. lactis* est inapte à synthétiser du gluthation, elle est capable de l'internaliser. Ainsi, l'internalisation de gluthathion jusqu'à 60 mM par *L. lactis* ssp. *cremoris* SK11 induit une augmentation par cinq de la résistance à un stress oxydatif exercé par du peroxyde d'hydrogène (Li *et al.*, 2003).

En effet, le gluthathion et la thiorédoxine sont des molécules antioxydantes de petite taille possédant un ou deux groupements thiol. Ainsi lorsqu'ils sont sous forme réduite, ces thiols peuvent s'oxyder en occasionnant simultanément la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau. Le glutathion peut aussi être utilisé comme co-facteur de la glutathion peroxydase qui assure l'élimination des lipides peroxydés. La glutathion réductase et la thiorédoxine réductase se chargent par la suite de régénérer respectivement les molécules oxydées de glutathion et de thiorédoxine.

La régulation des systèmes de transport de métaux et d'oligoéléments et de leur métabolisme est aussi rapportée comme une réponse au stress oxydatif.

En effet, certains métaux ou oligoéléments participent au processus de défense contre les ROS comme co-facteur de plusieurs enzymes telles que la superoxyde dismutase (manganèse, cuivre ou zinc) et la glutathion peroxydase (sélénium). Chez *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363, l'inactivation de deux gènes, *flpA* et *flpB*, codant pour des protéines fumarate nitrate réductase (FNR) a conduit à l'épuisement du pool intracellulaire de Zn(II) et à l'augmentation de la sensibilité du mutant au peroxyde d'hydrogène (Scott *et al.*, 2000). Les auteurs suggèrent que l'hypersensibilité du mutant au stress oxydatif est due à un manque de Zn(II) qui protégerait les protéines thiols de l'oxydation.

A l'inverse, certains métaux de transition tels que le cuivre et le fer peuvent jouer un rôle important dans le déclenchement de réactions conduisant à la formation d'espèces oxygènes réactives (réaction de Fenton). Ainsi, la régulation du métabolisme du fer a permis d'améliorer la tolérance de *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 au stress oxydatif exercé par l'ion tellurite (formation d'anion superoxyde) en limitant probablement la génération de radicaux hydroxyle (Turner *et al.*, 2007). De plus, il a été montré que certains gènes de résistance au stress oxydatif peuvent être sous le contrôle de régulateurs de la famille Fur (Ferric uptake regulator) tels que le gène *sodA* codant pour la superoxyde dismutase (Sanders *et al.*, 1995). De même, le régulateur CopR (copper-responsive regulator) contrôlerait l'expression de différents gènes dont une nitroréductase induit par le cuivre, le cadmium et l'argent (CinD) (Mermod *et al.*, 2010). Les résultats ont montré qu'un mutant négatif de *L. lactis* IL1403 à CinD s'est révélé plus sensible au stress oxydatif exercé par le N-oxyde de 4-nitroquinoléine que la souche sauvage.

Enfin, les systèmes de réparation des protéines et de l'ADN représentent le mécanisme ultime de réponse au stress oxydatif. Parmi les protéines dont le rôle consiste à réparer les lésions causées par l'oxydation, nous pouvons citer, entre autres, les enzymes protéolytiques (Clp) qui dégradent les substrats oxydés, la méthionine sulfoxyde réductase qui réduit les protéines méthionines sulfoxydes et la protéine RecA qui participerait à la recombinaison homologue de l'ADN et à sa réparation (Duwat *et al.*, 1995). Duwat *et al.* (1995) ont démontré qu'un mutant négatif de *L. lactis* à *recA* est plus sensible à l'oxygène que la souche sauvage. Les auteurs supposent que le gène *recA* serait impliqué

dans la réponse de *L. lactis* au stress oxydatif en tant que système de réparation de l'ADN ou comme régulateur d'autres gènes impliqués dans la réparation de dommage oxydatif. En effet, le gène *recA* est co-transcrit avec le gène *fpg* qui code pour une formamidopyrimidine-ADN glycosylase également impliquée dans la réparation de l'ADN (Duwat *et al.*, 1995).

En résumé, les réponses adaptatives de *L. lactis* aux stress thermique, osmotique et oxydatif impliquent la synthèse de protéines de stress générales ou spécifiques, l'altération de la composition lipidique membranaire ainsi que l'accumulation de solutés compatibles, d'antioxydants... Ces modifications de l'état physiologique permettent ainsi de limiter la dégradation de la structure cellulaire et de l'intégrité fonctionnelle des bactéries.

I.3.2.2. Influence des conditions de fermentation sur l'état physiologique des bactéries lactiques et sur leur résistance au procédé de stabilisation

Pour améliorer la tolérance des bactéries lactiques à la lyophilisation (stress extrêmes), une pré-adaptation peut donc être réalisée en amont de ce procédé comme par exemple par la modulation des paramètres de fermentation. Ce chapitre présente un état de l'art de l'influence des conditions de fermentation sur l'état physiologique des bactéries lactiques et/ou sur leur résistance aux procédés de stabilisation et est résumé dans les tableaux I.4 et I.5.

Le milieu de culture

De nombreuses études ont montré que la composition du milieu de culture, en termes de sources de carbone, d'azote, de minéraux, d'acides gras et de vitamines peut affecter l'état physiologique des bactéries et donc indirectement leur résistance à la stabilisation et au stockage. En effet, la composition du milieu de culture influence le flux métabolique et conduit ainsi à la formation de différents métabolites. Ce milieu peut aussi être, lui-même, un environnement stressant induisant une réponse au stress par les bactéries.

Des résistances différentes au stockage à l'état lyophilisé de plusieurs souches d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus durans* ont été obtenues par croissance sur différents milieux de culture (M17, MRS et milieu Lee) (Carvalho *et al.*, 2003a). Alors que la meilleure survie au stockage d'*E. durans* a été obtenue pour une croissance sur MRS, la majorité des souches d'*E. faecalis* survivent mieux lorsque les cellules sont cultivées sur milieu M17 ou Lee. Plusieurs composants de ces milieux de culture ont été identifiés comme pouvant affecter la survie des cellules et plus particulièrement la source de carbone (glucose, lactose et saccharose). Une étude complémentaire a montré que

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus* présente une meilleure survie à la lyophilisation si les cellules sont cultivées dans un milieu MRS contenant du mannose (comparé à du fructose, lactose ou glucose) (Carvalho *et al.*, 2004). De plus, l'utilisation d'un milieu de culture à base de mannose, fructose ou lactose à la place du glucose induit aussi une meilleure résistance au stockage à température ambiante de cette bactérie.

Afin d'améliorer la résistance des bactéries à la stabilisation, il est également possible de provoquer une pré-adaptation au stress osmotique. L'addition de saccharose ou de glutamate dans le milieu de culture (osmolyte accumulé mais non métabolisé) améliore ainsi la résistance de *Lactobacillus sakei* au stockage après séchage par pulvérisation mais pas après lyophilisation (Ferreira *et al.*, 2005). L'addition de chlorure de sodium dans le milieu de culture permet également d'augmenter la résistance à la lyophilisation de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Koch *et al.*, 2007), la résistance au séchage de plusieurs bactéries lactiques (Kets *et al.*, 1996) et la résistance au stockage à l'état sec de *Lactobacillus rhamnosus* (Prasad *et al.*, 2003) et de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Carvalho *et al.*, 2003b). Cette amélioration de la résistance a été reliée à une accumulation de solutés compatibles tels que la glycine bétaïne et la carnitine présents dans le milieu de culture (Kets *et al.*, 1996).

En revanche, l'application d'un stress osmotique lors de la croissance n'a pas permis d'améliorer la résistance à la lyophilisation de *Lactobacillus coryniformis* (Schoug-Bergenholtz *et al.*, 2012) et a même diminué la résistance au séchage de *Lactobacillus plantarum* (Linders *et al.*, 1998).

Plus récemment, une étude a montré que l'ajout de glutathion dans le milieu de culture a un effet protecteur sur les cellules de *Lactobacillus sanfranciscensis* lors de la lyophilisation (Zhang *et al.*, 2010). Cette amélioration de la résistance a été corrélée à un meilleur maintien de la structure membranaire et à un taux plus élevé d'acides gras insaturés dans la membrane qui pourrait s'expliquer par la prévention de la peroxydation lipidique.

Par ailleurs, la complémentation du milieu de culture avec de l'acide oléique ou Tween 80 peut aussi améliorer la résistance des bactéries à la congélation. L'ajout de ces composés entraine une modification de la composition lipidique des membranes bactériennes et plus particulièrement une augmentation du ratio de la teneur en acides gras insaturés et cycliques sur la teneur en acides gras saturés (Beal *et al.*, 2001a; Fonseca *et al.*, 2001a; Goldberg and Eschar, 1977; Smittle *et al.*, 1974).

A l'inverse, une carence en nutriments peut également être à l'origine d'une amélioration de la tolérance des bactéries aux procédés de stabilisation. Carvalho *et al.* (2003b) ont ainsi montré qu'une meilleure résistance au stockage de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* peut être obtenue par application d'une carence nutritionnelle des cellules pendant 20 minutes dans de l'eau avant

lyophilisation. De même, Wang *et al.* (2011) ont montré qu'une carence en lactose chez *Lactobacillus acidophilus* a conduit à une meilleure tolérance du ferment à la congélation et au stockage à l'état congelé. Cette étude approfondie a mis en évidence une modification de la composition en acides gras membranaires et plus précisément une augmentation de la teneur en acides gras insaturés, cycliques et branchés ainsi que la surexpression de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et le maintien du pH intracellulaire (Wang *et al.*, 2011).

La température et le pH de culture

La capacité des cellules à restaurer leur viabilité et leurs propriétés technologiques à l'issue des traitements de conservation peut également être influencée par la température et le pH de culture.

Lors des étapes de stabilisation, les bactéries subissent un stress thermique froid (congélation et lyophilisation) ou chaud (séchage). Une exposition des cellules à un pré-stress thermique tout au long ou en fin de croissance (refroidissement avant récolte) peut ainsi induire une meilleure tolérance des bactéries lactiques aux procédés de stabilisation. Cette pré-adaptation a été largement étudiée pour la congélation des bactéries lactiques (Baati *et al.*, 2000; Broadbent and Lin, 1999; de Urraza and de Antoni, 1997; Fernandez Murga *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 1998; Panoff *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2005a; Wang *et al.*, 2005b; Wouters *et al.*, 2001; Wouters *et al.*, 1999), et beaucoup moins en ce qui concerne le séchage (Prasad *et al.*, 2003) et la lyophilisation (Broadbent and Lin, 1999; Ziadi *et al.*, 2005) de ces bactéries.

Ainsi, Broadbent et Lin (1999) ont montré qu'une exposition des cellules de *L. lactis* ssp. *lactis* et *L. lactis* ssp. *cremoris* à un stress chaud (respectivement à 42 °C et à 39 °C pendant 25 minutes) ou à un stress froid (10 °C pendant 2 heures) confère une meilleure résistance des cellules à la congélation et à la lyophilisation. L'amélioration de ces résistances a été corrélée à une diminution du ratio de la teneur en acides gras saturés sur la teneur en acides gras insaturés lors du stress froid alors que le stress chaud amène à une augmentation du taux d'acides gras cycliques. De plus, ces stress induisent la synthèse de différentes protéines de stress appelées Heat Shock Protein (HSP) et Cold Shock Protein (CSP) dont DnaK et GroEL.

De même, une augmentation de la teneur en acides gras insaturés et/ou cycliques a été reliée une meilleure tolérance à la congélation de *Lactobacillus acidophilus* (Fernandez Murga *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005a) et à la lyophilisation de *Lactobacillus coryniformis* (Schoug *et al.*, 2008) et de *Lactobacillus bulgaricus* (Li *et al.*, 2009). La surexpression de protéines CSP et HSP a également été corrélée à une augmentation de la survie à la congélation de *L. lactis* (Kim and Dunn, 1997; Wouters *et al.*, 2001) et au stockage à l'état sec de *Lactobacillus rhamnosus* (Prasad *et al.*, 2003). Une étude de Munoz-Rojas *et al.* (2006) a mis en évidence le rôle protecteur des acides gras cycliques contre la

lyophilisation chez *Pseudomonas putida* par la comparaison de la résistance à la lyophilisation d'une souche sauvage et d'un mutant négatif à la CFA synthase. De la même manière, des mutants négatifs à la synthèse de différentes protéines de stress froid ont permis de montrer que certaines de ces protéines (ex : CspD) sont bien à l'origine d'une meilleure tolérance de *Lactococcus lactis* MG1363 à la congélation (Wouters *et al.*, 2000).

Cependant, les bactéries lactiques ne réagissent pas toutes de la même façon au stress thermique. Alors que 2 heures de stress à 10 °C ont suffi pour augmenter la survie à la congélation de *L. lactis* ssp. *lactis*, l'accroissement de la cryotolérance de *L. lactis* ssp. *cremoris*, *Lactobacillus helveticus* et *Streptococcus thermophilus* n'a été obtenue qu'après 5 heures de stress (Kim and Dunn, 1997).

Le pH de fermentation peut aussi avoir une influence sur la résistance des bactéries lactiques aux procédés de stabilisation. Une croissance à pH 5 à 6 ou pH non régulé a permis d'améliorer la tolérance aussi bien à la congélation de *Streptococcus thermophilus* (Beal *et al.*, 2001a), *Lactobacillus acidophilus* (Wang *et al.*, 2005a) et *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Koch *et al.*, 2008; Rault *et al.*, 2010; Streit *et al.*, 2008) qu'à la lyophilisation de *Lactobacillus reuteri* (Palmfeldt and Hahn-Hagerdal, 2000), *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Koch *et al.*, 2008) *Lactobacillus bulgaricus* (Li *et al.*, 2009), *Lactobacillus coryniformis* (Schoug *et al.*, 2008) et *Oenococcus oeni* (Hua *et al.*, 2009). Palmfeldt et Hahn-Hagerdal (2000) ont ainsi montré qu'une diminution du pH de croissance de 6 à 5 a induit une augmentation de la survie à la lyophilisation des cellules de *Lactobacillus reuteri* récoltées après 2,5 heures de phase stationnaire. Alors que Streit *et al.* (2008) ont relié une meilleure tolérance à la congélation de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* à une légère diminution de la teneur en acides gras insaturés et cycliques, l'augmentation de la teneur de ces acides gras a été corrélée à l'amélioration de la résistance à la congélation de *Streptococcus thermophilus* (Beal *et al.*, 2001a) et à la lyophilisation d'*Oenococcus oeni* (Hua *et al.*, 2009), de *Lactobacillus bulgaricus* (Li *et al.*, 2009) et de *Lactobacillus coryniformis* (Schoug *et al.*, 2008).

La phase de croissance

La croissance des bactéries comporte 4 phases : la phase de latence, la phase exponentielle, la phase stationnaire et la phase de déclin. Dans de nombreuses études sur la préservation des bactéries lactiques, la récolte des cellules est fixée en fin de phase exponentielle (Champagne *et al.*, 1996; Foerst *et al.*, 2012; Oldenhof *et al.*, 2005; Strasser *et al.*, 2009) ou en début de phase stationnaire (Beal *et al.*, 2001a; Carvalho *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2006; Kurtmann *et al.*, 2009a; Li *et al.*, 2011; Martos *et al.*, 2007; Schoug *et al.*, 2006) afin d'obtenir une biomasse maximale. De plus, plusieurs études montrent que les cellules bactériennes récoltées en phase stationnaire conduisent à

une meilleure résistance à la stabilisation et au stockage que les cellules récoltées en phase exponentielle.

Par exemple, les cellules de *Oenococcus oeni* récoltées en phase stationnaire présentent une grande survie à la lyophilisation (67,5 %) alors que les cellules récoltées en phase exponentielle présentent seulement 8,2 % de survie cellulaire (Hua *et al.*, 2009). Des résultats similaires sont reportés pour le séchage de *Lactobacillus reuteri* (Schwab *et al.*, 2007), *Lactobacillus rhamnosus* (Corcoran *et al.*, 2004; Prasad *et al.*, 2003) mais aussi pour la congélation de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Rault *et al.*, 2010) et *Lactobacillus acidophilus* (Lorca and Font de Valdez, 1999).

De plus, Hua *et al.* (2009) ont montré une modification de la composition en acides gras d'*Oenococcus oeni* entre la phase exponentielle et la phase stationnaire et plus particulièrement une augmentation de la teneur en acide gras cyclique cycC19:0 au dépend de la teneur en acide gras insaturé C18:1cis qu'ils relient ainsi à une plus forte résistance à la lyophilisation. Cette meilleure tolérance en phase stationnaire peut aussi être attribuée à une modification de la synthèse protéique (Lorca and Font de Valdez, 1999; Prasad et al., 2003). Toutes ces modifications pourraient être induites par différents facteurs tels qu'une carence en nutriment, un faible pH atteint pour les cultures à pH non régulé ou une accumulation de métabolites toxiques.

Cependant, ces résultats ne sont pas généralisables puisque d'autres études ne voient pas d'effet de la phase de croissance sur la tolérance à la congélation de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* (Fonseca *et al.*, 2001a) et à la lyophilisation de *Bifidobacterium animalis* (Saarela *et al.*, 2005).

Effet combiné des différents paramètres de fermentation

Bien que peu étudié, un effet combiné des différents paramètres de croissance peut également impacter la tolérance des bactéries lactiques aux procédés de stabilisation. Par exemple, Ampatzoglou *et al.* (2010) ont montré un effet combiné du pH de croissance et de l'instant de récolte sur la survie à la lyophilisation de *Lactobacillus rhamnosus*. Dans le cas d'une fermentation à pH contrôlé, il est préférable de récolter les cellules en fin de phase exponentielle plutôt qu'en phase stationnaire alors que, pour une fermentation à pH non régulé, la récolte de cellules en phase stationnaire a permis de maximiser la survie à la lyophilisation. Similairement, la survie à la congélation de *Lactobacillus acidophilus* est améliorée pour des cellules récoltées en phase exponentielle lorsque la croissance est à 25 °C alors qu'à 37 °C, la meilleure survie est obtenue pour des cellules récoltées en phase stationnaire (Lorca and Font de Valdez, 1999). D'autres études rapportent aussi l'influence combinée de la température et du pH de fermentation sur la résistance à la lyophilisation de bactéries lactiques (Li *et al.*, 2009; Schoug *et al.*, 2008).

Tableau I.4 Modification de la composition en acides gras et résistance à la stabilisation associée en réponse à des modifications de culture chez les LAB

Technique de préservation	Souche	Conditions testées	Changement composition en acide gras	Résistance	Référence
Congélation	*Lactococcus lactis*	stress froid : 2h à 10°C	diminution ratio SFA/UFA	mieux avec stress froid	(Broadbent and Lin, 1999)
		stress chaud : 25 min à 39 ou 42°C	augmentation cycC19:0 et diminution C18:1cis	mieux avec stress chaud	
	Lactobacillus acidophilus	T : 25, 30, 37 et 40°C	A 25°C : + de C16:0 et C18:2, - C18:1 et C19cyc A partir de 30°C : augmentation cycC19 : 0 et diminution C18:1cis	mieux à T basse	(Fernandez Murga *et al.*, 2000)
	Streptococcus thermophilus	pH : 5.5, 6.0 et 6.5	diminution C16:0 et augmentation cycC19:0 et C20:1 à pH acide	mieux à pH acide	(Beal *et al.*, 2001a)
		milieu : avec ou sans acide oléique	augmentation C18:1 et C20:1 et diminution C14:0, C16:0 et C18:0 en presence acide oleique	mieux avec acide oléique	
	Lactobacillus acidophilus	stress froid : 0 à 8 h à 15 à 37°C	augmentation UFA+cyc/SFA et cycC19:0 quand diminution T et augmentation du temps	mieux à 8h à 26°C	(Wang *et al.*, 2005a)
	Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus	stress acide : 30min à 5.25	légère diminution UFA/SFA et cyc/SFA	mieux à pH acide	(Streit *et al.*, 2008)
	Lactobacillus acidophilus	18h de carence en lactose	augmentation UFA, CFA, BFA et diminution SFA	mieux avec carence	(Wang *et al.*, 2011)
	Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus	MRS ou lactosérum	plus de UFA et CFA avec MRS	mieux avec MRS	(Gautier *et al.*, 2013)
Lyophilisation	*Lactococcus lactis*	stress froid : 2h à 10°C	diminution ratio SFA/UFA	mieux avec stress froid	(Broadbent and Lin, 1999)
		stress chaud : 25 min à 39 ou 42°C	augmentation cycC19:0 et diminution C18:1cis	mieux avec stress chaud	
	Oenococcus oeni	pH initial : 3.2, 3.5, 4.0 et 4.8	augmentation cycC19:0 et diminution C16:0 en milieu acide	mieux à pH acide	(Hua *et al.*, 2009)
		Phase exponentielle et stationnaire	augmentation cycC19 et diminution C18:1cis en phase stationnaire	mieux en phase stationnaire	
	Lactobacillus coryniformis	stress T : 26, 34 et 42°C	SFA/UFA et cyc/UFA plus élevé à 34°C	mieux à T 34 et 42°C	(Schoug *et al.*, 2008)
		stress acide : 4.5, 5.5 et 6.5	SFA/UFA et cyc/UFA plus élevé a pH 5.5	mieux à pH 5.5	
	Lactobacillus bulgaricus	pH : 5.0 à 6.5 et T : 30 à 39°C	En general, augmentation CFA/UFA avec T et pH	mieux à 30°C et pH = 5	(Li *et al.*, 2009)
	Oenococcus oeni	pH : 3.2, 3.5, 4 et 4.8	augmentation C14:0, C19cyc et C17cyc et diminution C16:0 et C18:1cis à pH acide	mieux à pH acide	(Zhao *et al.*, 2009)

Tableau I.5 Modification de la synthèse de protéines et résistance à la stabilisation associée en réponse à des modifications des conditions de culture chez les LAB

Technique de préservation	Souche	Conditions testées	Changement composition en protéines	Résistance	Référence
Congélation	*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*	Stress froid : 5h à 10°C	1 protéine de 6.3kDa surexprimée	mieux avec stress froid	(Kim and Dunn, 1997)
	Lactococcus lactis	Stress froid : 5h à 10°C	1 protéine de 6.3 kDa surexprimée	mieux avec stress froid	(Kim *et al.*, 1998)
	Lactococcus lactis ssp. *cremoris* et *lactis*	Stress froid : 5h à 10°C	1 protéine de 6.3 kDa surexprimée	mieux avec stress froid	(Broadbent and Lin, 1999)
		Stress chaud : 25 min à 42°C ou 39°C	12 et 9 HSPs dont DnaK et GroEL	mieux avec stress chaud	
	Lactococcus lactis	stress froid : 4h à 10°C	22 protéines surexprimées dont 6 protéines de 7 kDa et 30 protéines sousexprimées	mieux avec stress froid	(Wouters *et al.*, 1999)
	Lactobacillus acidophilus	Stress froid : 8h à 26°C	4 protéines surexprimées (Clp protease, pyruvate kinase, putative glycoprotein endopeptidase et une inconnue) et 1 protéine sousexprimée (trigger factor)	mieux avec stress froid	(Wang *et al.*, 2005a)
	Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus*	Stress acide : 30 min à 5.25	11 protéines surexprimées et 10 sousexprimées (de 13 à 82 kDa) Fonction : métabolisme énergétique, synthèse de protéines et nucléotides, réponse aux stress	mieux avec stress acide	(Streit *et al.*, 2008)
	Lactobacillus acidophilus	18h de carence en lactose	12 protéines surexprimées et 18 protéines sousexprimées (de 20 à 78 kDa)	mieux avec carence	(Wang *et al.*, 2011)
Séchage	*Lactobacillus rhamnosus*	Stress chaud : 30 min à 50°C	5 protéines surexprimées (GroEl, DnaK, tagatose-6-phosphate, dehydrogénase glyceraldehyde-3-phosphate, isomérase triosephosphate) et 2 protéines sousexprimées (enzyme glycolitique enolase, ABC-transport)	mieux avec stress chaud	(Prasad *et al.*, 2003)
		Stress osmotique : NaCl (0.6 M)	5 protéines surexprimées (GroEl, DnaK, tagatose-6-phosphate, lactate dehydrogénase) et 2 protéines sousexprimées (enzyme glycolitique enolase, ABC-transport, dehydrogénase glyceraldehyde-3-phosphate, kinase phosphoglycerate, triose phosphate)	mieux avec stress osmotique	
Lyophilisation	*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* et *lactis*	Stress froid : 2h à 10°C	8 et 15 CSPs dont DnaK et GroEL	mieux avec stress froid	(Broadbent and Lin, 1999)
		Stress chaud : 25 min à 42°C ou 39°C	12 et 9 HSPs dont DnaK et GroEL	mieux avec stress chaud	

I.4. Résumé, objectifs et stratégie

Les bactéries lactiques dont *Lactococcus lactis* jouent un rôle primordial dans la fabrication des fromages et autres produits laitiers en produisant de l'acide lactique à partir du lactose mais aussi en contribuant à l'affinage des fromages par la production d'enzymes impliquées dans la protéolyse et la conversion des acides aminés en composés d'arôme mais aussi par la production d'exopolysaccharides, bactériocines… Par conséquent, des efforts considérables de recherche ont été réalisés pour une meilleure connaissance du génome, de la physiologie et du métabolisme de ces bactéries au regard de l'importance de leur propriétés technologiques.

Aujourd'hui, ces bactéries sont produites industriellement et distribuées sous forme de ferments concentrés et stabilisés (congelés ou lyophilisés) afin d'être prêtes à l'emploi pour une inoculation directe du lait. Cependant la production de ferments lactiques comporte plusieurs étapes clés qui peuvent devenir critiques si l'impact des stress technologiques sur la qualité technologique (haute viabilité et activité métabolique) des ferments n'est pas maitrisé. Parmi ces étapes, la lyophilisation apparait comme un point critique du procédé à l'origine de nombreux stress physico-chimiques (stress thermique, osmotique, hydrique et oxydatif) pour les cellules bactériennes. Tous ces stress provoquent des dommages cellulaires au niveau de plusieurs cibles dont la membrane cellulaire entrainant une perte de viabilité et/ou d'activité du ferment.

L'optimisation de la résistance des bactéries lactiques à ce procédé de stabilisation est donc d'une grande importance technologique mais aussi économique et différentes stratégies existent telles que l'optimisation des conditions de lyophilisation et de stockage, l'ajout de lyoprotecteur adapté et/ou la pré-adaptation des cellules bactériennes. De nombreux facteurs peuvent ainsi influencer la qualité finale des ferments lactiques :

- La composition et le pH du milieu de culture, de protection et de réhydratation
- La température de culture, de lyophilisation, de stockage et de réhydratation
- La phase de croissance
- La concentration cellulaire et en lyoprotecteur
- La teneur en eau du ferment lyophilisé
- L'humidité et le gaz de l'atmosphère de stockage

La littérature démontre ainsi qu'il y a des considérations générales à prendre en compte comme la nécessité d'induire une meilleure tolérance des bactéries pendant leur croissance. Cependant, le lien entre l'état physiologique des cellules bactériennes et leur tolérance au procédé de lyophilisation n'est pas complètement élucidé. A l'heure actuelle, les phénomènes observés sont expliqués notamment par des modifications de synthèse protéique et plus particulièrement de protéines de stress et des modifications de la composition en acide gras membranaires. De plus, la préservation des bactéries est

encore basée sur des tests empiriques puisque l'influence d'un grand nombre de ces paramètres dont les conditions de fermentation varie selon les espèces et même selon les souches d'une même espèce.

Ce travail de thèse a ainsi pour objectif de mieux comprendre les modifications cellulaires ayant lieu au cours de la croissance de *L. lactis* TOMSC161 et ayant un impact sur la résistance des bactéries à la lyophilisation. Un deuxième objectif est de proposer des outils simples utilisables par les producteurs de ferments pour caractériser l'état physiologique des cellules au cours du procédé de production.

Pour cela, notre démarche comprend 4 étapes principales. Dans un premier temps, l'influence de différentes conditions de fermentation (température, pH et instant de récolte) sur la résistance de *L. lactis* à la lyophilisation et au stockage (publication n°1) est étudiée dans l'objectif de produire des ferments dans différents états physiologiques et ayant des résistances différentes à ce procédé de préservation. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de l'état physiologique de ces différents ferments au niveau membranaire et plus particulièrement au niveau de la composition en acides gras et de deux propriétés biophysiques de cette membrane que sont la fluidité membranaire et la température de transition lipidique. L'objectif de cette étape est de confirmer que les caractéristiques physico-chimiques de la membrane peuvent être modulées par les conditions de culture, et qu'elles ont un impact sur la résistance des bactéries à la stabilisation (publication n°2). Dans la troisième étape, l'évaluation de l'état physiologique des différents ferments est complétée au niveau du transcriptome et du protéome mais aussi au niveau de l'état d'oxydation des cellules afin d'identifier d'autres mécanismes cellulaires pouvant être impliqués dans la tolérance de *L. lactis* à la lyophilisation et au stockage (publication n°3). Enfin, une vérification de la conservation des propriétés fonctionnelles du ferment lyophilisé dans les conditions optimales est réalisée en fabrication fromagère et fait l'objet de la dernière partie de ces travaux.

Ce travail implique ainsi :

- La production de ferments lactiques lyophilisés et surtout la réalisation de fermentations à différents températures et pH et pour une récolte à différents moments de la phase de croissance.
- Le contrôle de la conduite du procédé de production. Une attention particulière est portée sur les étapes de préservation avec une caractérisation physique de la matrice lyophilisée (température de transition vitreuse, teneur en eau et activité de l'eau).
- L'évaluation de l'état physiologique des ferments par différentes méthodes de caractérisation (figure I.23). Les méthodes employées dans ce travail regroupent des informations issues de différents niveaux d'étude : moléculaire (transcriptomique, protéomique, composition en acide gras, détection de ROS), physique (anisotropie de fluorescence et température de transition lipidique) et fonctionnel (cultivabilité et activité acidifiante).

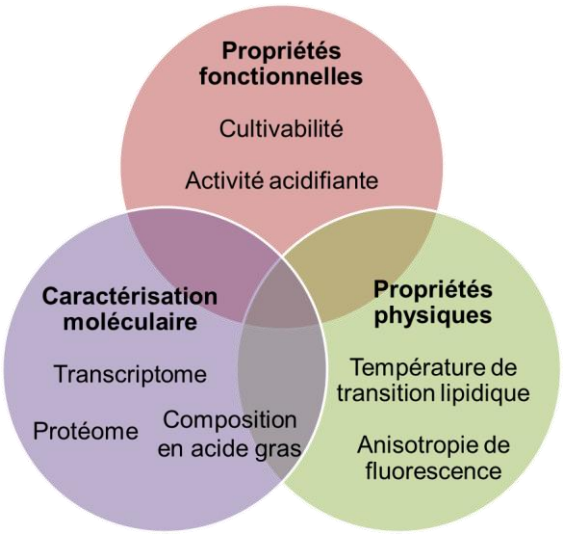


Figure I.23 : Méthodes de caractérisation de l'état physiologique utilisées au cours de ce travail.

Les matériels et les méthodes utilisés sont décrits dans le chapitre suivant.

Chapitre II
Matériels et Méthodes

Chapitre II - Matériels et méthodes

II.1. Microorganisme d'étude

II.1.1. Choix de la souche

Le travail réalisé au cours de cette thèse a porté sur la souche bactérienne *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161, issue de la collection Savoîcime (Annecy, France), en raison de ses propriétés technologiques intéressantes (pouvoir texturant et faible activité acidifiante) et de sa sensibilité au procédé de lyophilisation.

II.1.2. Réalisation de cryotubes

Après isolement de colonies sur milieu gélosé M17 (Biokar Diagnostics ; Beauvais, France), 100 mL de milieu M17 (Biokar Diagnostics), préalablement stérilisés à 115 °C pendant 20 minutes, sont inoculés à partir d'une colonie et incubés à 30 °C pendant 15 heures. Une seconde culture est réalisée en inoculant 1 mL de la préculture et est incubée à 30 °C pendant 8 heures. Après ajout de 15% (v/v) de glycérol (VWR ; Louvain, Belgique), la culture est répartie dans des cryotubes de 2 mL qui sont ensuite transférés et conservés à -80 °C.

II.2. Procédé de production de ferments lactiques concentrés et lyophilisés

II.2.1. Préculture

Après décongélation d'un cryotube pendant 10 minutes à 30 °C, 1 mL est ensemencé dans 100 mL de milieu de culture M17 (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), préalablement stérilisé à 115 °C pendant 20 minutes. La préculture est incubée à 30 °C pendant 4 h 30 (Figure II.1 ; fin de phase exponentielle) avant inoculation dans le fermenteur.

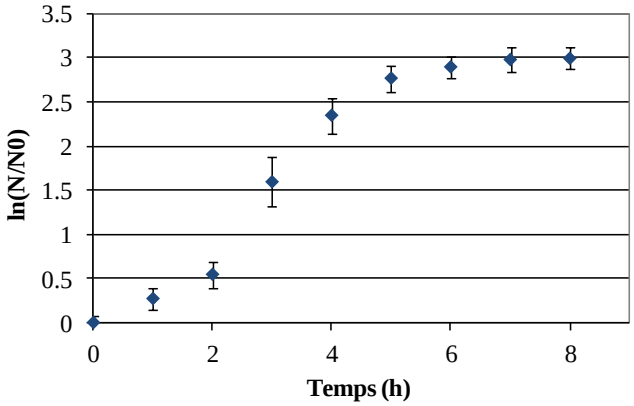


Figure II.1 Suivi de la croissance de *L. lactis* TOMSC161 à 30 °C dans du milieu M17 (par densité optique à 650 nm)

II.2.2. Conduite de la fermentation

II.2.2.1. Fermenteur, capteurs et régulateurs

Les fermentations sont réalisées dans un bioréacteur Biostat® A plus de 5 L (Sartorius Stedim ; Aubagne, France) (figure II.2). Le fermenteur est équipé d'une cuve de 5 L, d'un moteur d'agitation, d'une sonde de pH stérilisable (Easyferm K8 325, Hamilton ; Bonaduz, Suisse) et d'une sonde de température, le tout relié à un ordinateur comprenant un logiciel de contrôle et de suivi en ligne (MFCS/DA, Sartorius Stedim), et d'un logiciel d'acquisition de données (WCidus, INRA ; Grignon, France). La température est régulée par un manteau chauffant et par une circulation d'eau froide dans une gaine située à l'intérieur du fermenteur. Le pH est régulé par ajout automatique dans le fermenteur d'une solution de KOH 15 M (Merck ; Darmstadt, Allemagne) à l'aide d'une pompe péristaltique.



Figure II.2 Photographie du fermenteur Biostat® A plus (Sartorius Stedim ; Aubagne, France)

II.2.2.2. Milieu et conditions de culture

Dans le but de se rapprocher le plus possible des conditions industrielles, le milieu de culture utilisé est seulement composé de 60 $g.L^{-1}$ de lactose (VWR International ; Louvain, Belgique) et de 15 $g.L^{-1}$ d'extrait de levure (BD ; Sparks, MD, Etats-Unis). Après ajustement du pH du milieu à 6,8 avec une solution de KOH à 35 % (m/v), 5 L de milieu sont introduits dans le fermenteur et le tout est stérilisé à 120 °C pendant 20 minutes.

La fermentation est ensuite conduite en culture discontinue avec une inoculation à faible concentration (approximativement 100 $UFC.mL^{-1}$) afin de maximiser le nombre de générations successives. La température et le pH sont régulés à des valeurs de consigne dépendantes des expériences réalisées (22 °C < T < 30 °C ; 5,6 < pH < 6,8) et une vitesse d'agitation de 200 rpm est appliquée pour l'homogénéisation.

II.2.2.3. Suivi de la fermentation

Le suivi de la fermentation est effectué par la mesure en ligne de la masse de neutralisant utilisé et par la mesure de la densité optique. En fonction de ces deux mesures, les profils de fermentations sont établis et leur reproductibilité est évaluée.

Mesure de la densité optique

Afin de suivre la croissance bactérienne, 1 mL de la culture est prélevé toutes les heures et une mesure d'absorbance est réalisée à 650 nm à l'aide du spectrophotomètre DU® 640B (Beckman Coulter ; Villepinte, France).

Consommation en neutralisant

La masse de neutralisant consommée (KOH), pour maintenir le pH du milieu de culture constant, est directement proportionnelle à la quantité totale d'acide lactique produite par les bactéries. La mesure en ligne de la masse de KOH utilisée, permettant le calcul de la concentration en KOH dans le milieu de culture et de sa vitesse de consommation ($dm.dt^{-1}$, en $g.min^{-1}$), est effectuée grâce au logiciel WCidus (INRA ; Thiverval-Grignon, France).

Mesure de la biomasse sèche

La biomasse sèche est déterminée à l'entrée en phase stationnaire et à la récolte. Un volume de 10 mL de la culture est prélevé et filtré sur une membrane de 0,22 µm de diamètre de pore (Sartorius ; Goettingen, Allemagne). Puis, le filtre est séché à 80 °C pendant 24 heures. La mesure de la masse initiale de la membrane et de sa masse après filtration et séchage permet de calculer la masse de biomasse sèche produite. La mesure est réalisée en triplicat et le résultat est exprimé en masse de biomasse sèche par volume de milieu de culture ($g.L^{-1}$).

Analyse des constituants du milieu par HPLC

Les concentrations en lactose, glucose, galactose, acide lactique, acide succinique, et éthanol sont déterminées sur le milieu initial ainsi que sur le milieu prélevé en entrée en phase stationnaire et à la récolte par chromatographie liquide haute performance (Waters Associates, Millipore ; Molshein, France). Le but est de pouvoir établir le profil de fermentation (homolactique ou mixte), de vérifier la non carence en lactose et de calculer le rendement de production de biomasse.

La suspension cellulaire est diluée au demi dans de l'acide trichloroacétique à 21 % (v/v) (Prolabo ; Paris, France) afin de précipiter les protéines. Après centrifugation à 15 000 g pendant 10 minutes et à 4 °C, le surnageant est récupéré et filtré sur une membrane de 0,22 µm de diamètre de pore (Millipore ; Molshein, France) et est conservé à -20 °C. Avant analyse, le filtrat est décongelé et dilué au demi (v/v) dans de l'acide propionique 1% (m/m) (Prolabo ; Paris, France), utilisé comme étalon interne.

Un volume de 20 µL d'échantillon est injecté (injecteur automatique Waters 717 plus, Millipore ; Molsheim, France) sur une colonne échangeuse de cations Aminex Ion Exclusion HPX-87 H (300 x 7,8 mm, Biorad ; Richmond, CA, Etats-Unis) équipée d'une pré-colonne à cation H^+ Micro-Guard (30 x 4,6 mm, Biorad ; Richmond, CA, Etats-Unis). La colonne est maintenue à 35 °C durant la phase d'analyse et la phase mobile (H_2SO_4 0,005 M) circule à un débit fixé à 0,6 $mL.min^{-1}$ grâce à une pompe (pompe 600, Waters Associates, Millipore ; Molsheim, France). Les composés sont détectés par réfractométrie (détecteur réfractométrique différentiel Waters 2414, Millipore; Molsheim, France) et par un détecteur UV à 210 nm (Waters 486, Millipore ; Molsheim, France).
Les résultats sont enregistrés et traités par le logiciel Millenium (Waters Associates Millipore ; Molsheim, France). Les composés sont identifiés par leur temps de rétention et les concentrations sont calculées, en tenant compte de l'étalon interne, à partir d'une gamme d'étalonnage réalisée avec une

solution de référence contenant les molécules à quantifier. Les quantifications sont réalisées en triplicat et les résultats sont exprimés en $g.L^{-1}$.

II.2.2.4. Arrêt de la fermentation

La récolte des cellules a lieu à différents moments de la fermentation en fonction des expériences réalisées (du milieu de la phase exponentielle à la phase stationnaire avancée).

La pesée en continu du neutralisant apporté et les mesures d'absorbance, permettant de suivre la fermentation, sont des outils d'aide à la décision du moment d'arrêt de la culture. En effet, le début de la phase stationnaire est atteinte 1 h 30 après que la vitesse de consommation de base soit maximale (figure II.3).

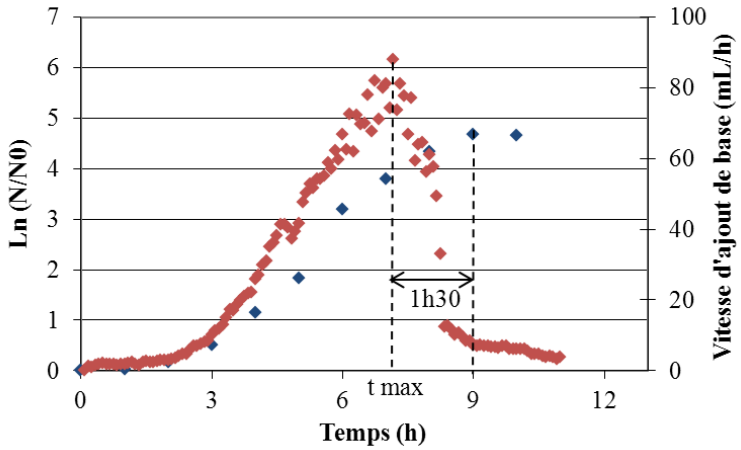


Figure II.3 Suivi de la densité optique (650 nm) (bleu) et de la vitesse de consommation de base (KOH) (rouge) au cours de la fermentation de *L. lactis* TOMSC161 à 30 °C

II.2.3. Concentration et lyoprotection

Au moment voulu, la récolte est effectuée à l'aide d'une pompe péristaltique et la suspension cellulaire est concentrée dix fois par centrifugation (Avanti J-26XP centrifuge, Beckman Coulter ; Fullerton, CA, Etats-Unis) à 17 000 g pendant 20 minutes et à 4 °C. Le surnageant est ensuite éliminé dans son intégralité et le lyoprotecteur est ajouté au culot bactérien à un ratio de 2:1, c'est-à-dire 2 g de lyoprotecteur pour 1 g de culot bactérien.

Le lyoprotecteur est constitué de 60 $g.L^{-1}$ de D-saccharose (VWR ; Louvain, Belgique) et de 140 $g.L^{-1}$ de maltodextrine Glucidex 6D (Roquette ; Lestrem, France) et est stérilisé pendant 20 minutes à 110 °C. Des expériences ont également été réalisées en présence d'antioxydant dans la formule protectrice. Pour cela, une solution d'ascorbate de sodium (Sigma-Aldrich ; Saint-Louis, MO,

Etats-Unis) est préparée, filtrée sur une membrane de 0,22 µm de diamètre de pore (Sartorius, Goettingen, Allemagne) et ajoutée à raison de 10 $g.L^{-1}$ dans la solution lyoprotectrice dans l'heure avant son utilisation.

Le culot, une fois lyoprotégé, est aliquoté à raison de 1 mL par vial avant d'être congelé et lyophilisé.

II.2.4. Lyophilisation

II.2.4.1. Equipement de lyophilisation

Le lyophilisateur utilisé au cours de ces travaux est un équipement Telstar de type LyoBeta (Telstar ; Terrassa, Espagne) qui a été modifié au cours d'un projet européen (Lyopro Project).

La chambre de lyophilisation est une enceinte rectangulaire en acier inoxydable fermée par une porte transparente en Plexiglass et comprenant 3 étagères rectangulaires de 0,17 m² de surface qui sont refroidies ou chauffées par circulation d'un fluide caloporteur sur une gamme de température allant de -50 °C à +80 °C. Seules deux étagères sont utilisées pour déposer les échantillons, la troisième étagère ne servant que de bouclier thermique pour limiter l'apport de chaleur par radiation.

Un condenseur externe, séparé de la chambre de lyophilisation par une vanne et capable de piéger au maximum 35 kg de glace, est refroidi par circulation d'un fluide frigorigène (ou frigorifique) jusqu'à une température de -80 °C. Le refroidissement du fluide caloporteur et du condenseur est assuré par un système de deux compresseurs en cascade. Trois sondes de température de type Pt 100, avec une précision de l'ordre de 0,1 °C, sont installées sur l'équipement : la première à l'entrée du fluide caloporteur dans les étagères, la seconde en sortie du fluide calopoteur des étagères et la troisième en surface du condenseur externe.

La mise sous vide de l'équipement est assurée par une pompe à vide (Telstar ; Terrassa, France) à palettes rotatives fonctionnant dans un anneau d'huile. Le débit de pompage est de 12 $m^3.h^{-1}$ pour une pression totale comprise entre 1 Pa et 1 000 Pa. La pression totale dans l'enceinte est mesurée grâce à un manomètre capacitif de type Baratron 220C (MKS ; Le Bourget, France). De plus, la régulation de la pression est assurée par l'ouverture et la fermeture de la vanne située entre la pompe à vide et le condenseur.

Enfin, le logiciel de supervision SCADA permet l'acquisition des données, la rédaction de protocole de lyophilisation permettant la définition des variables opératoires (température du fluide caloporteur, pression, temps) des trois étapes du procédé de lyophilisation, et la réalisation automatique du protocole choisi.

Deux systèmes de suivi de la cinétique de sublimation sont disponibles sur l'équipement :

- la mesure de la température du produit : trois autres sondes de température de type Pt100 peuvent être insérées dans différents flacons afin de suivre l'évolution de la température du produit au cours du cycle.
- la mesure de la pression par une jauge de type Pirani mesurant la conductivité thermique d'un gaz. L'association des jauges de pression Pirani et Baratron permet de déterminer la fin de l'étape de sublimation. En effet, le manomètre capacitif de type Baratron indique la pression absolue de la chambre de lyophilisation alors que la mesure de pression par la jauge Pirani, étalonnée en présence d'azote sec, est dépendante de la composition gazeuse de l'enceinte. Lors de la sublimation de la glace, la valeur de pression mesurée par la jauge Pirani est supérieure à celle délivrée par la jauge Baratron. Lorsque la sublimation de la glace est terminée et que l'enceinte de lyophilisation est saturée en air sec et donc en azote, les deux valeurs de pressions deviennent pratiquement identiques. La fin de l'étape de sublimation est donc déterminée lorsque la différence entre les deux valeurs de pression devient nulle.

II.2.4.2. Cycle de lyophilisation

Les flacons sont placés sur un plateau en aluminium, congelés à -80 °C puis transférés dans l'enceinte de lyophilisation où les étagères ont été prérefroidie à -50 °C. La température du fluide caloporteur est maintenue à -50 °C pendant 2 heures. Puis, après refroidissement du condenseur, la pression de l'enceinte est abaissée à 20 Pa et la température du fluide caloporteur est augmentée de -50 °C à -20 °C à une vitesse de 0,25 °C.min^{-1} pour initier l'étape de sublimation. Après détection de la fin de sublimation par la comparaison des deux mesures de pression (soit après 40 heures environ), la température du fluide caloporteur est augmentée jusqu'à 25 °C à une vitesse de 0,25 °C.min^{-1} pour initier la dessiccation secondaire et est maintenue à cette consigne pendant 8 heures. A la fin du procédé de lyophilisation, le vide est cassé par injection d'air sec.

Afin d'éviter toute reprise d'eau des échantillons par sorption avec l'humidité ambiante, les flacons sont immédiatement bouchés et conditionnés sous vide dans des sachets aluminium multicouche (dimensions extérieures : 62 x 220 mm, Bernhardt S.A. ; Boulogne-sur-Mer, France). Les échantillons sont ensuite stockés jusqu'à trois mois à 4 ou 25 °C.

Enfin, les échantillons sont conservés à -80 °C jusqu'à analyse afin de limiter toute réaction de dégradation dans le produit.

Des conditions opératoires modérées ont été choisies pour ce travail en raison de la sensibilité des produits biologiques. Un enregistrement du cycle de lyophilisation avec l'évolution des différentes mesures de température et de pression est présenté à la figure II.4.

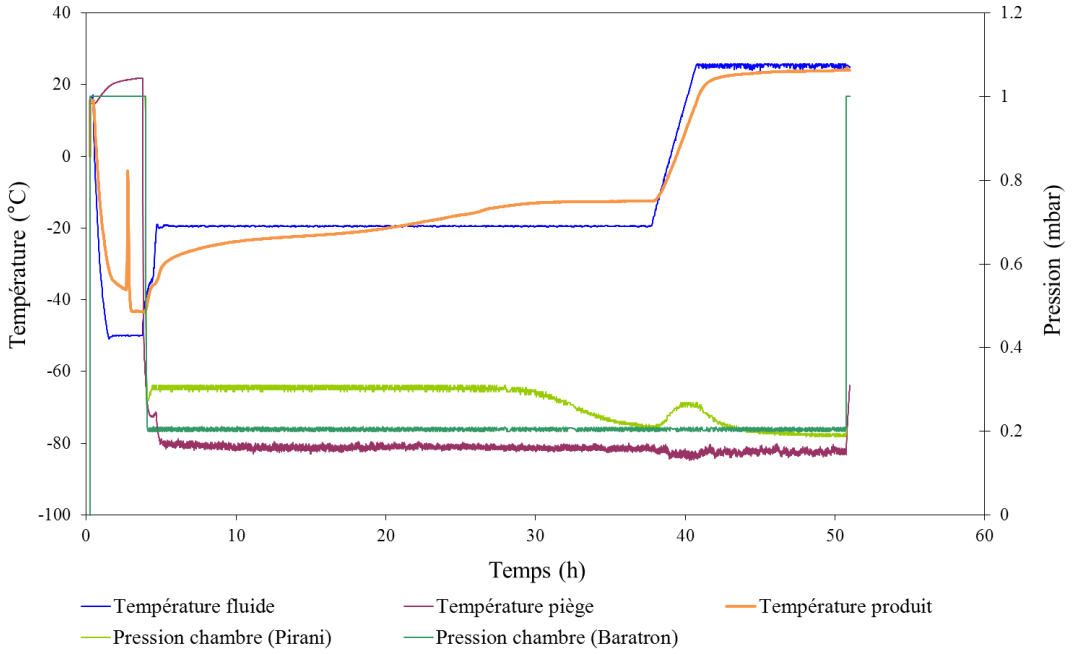


Figure II.4 Suivi de différents paramètres du cycle de lyophilisation (température du fluide, du piège et du produit et pression avec jauges de pression Pirani et Baratron)

II.3. Evaluation de l'état physiologique des cellules bactériennes

II.3.1. Propriétés fonctionnelles des ferments

II.3.1.1. Mesure de la cultivabilité

La concentration bactérienne des ferments est déterminée par dénombrement des colonies sur milieu gélosé M17. Après des dilutions au 1/10 en série dans de l'eau physiologique, un volume de 100 µL de suspension bactérienne est ensemencé en masse dans le milieu M17 agar (Biokar Diagnostics ; Beauvais, France), préalablement stérilisé à 115 °C pendant 20 minutes, de manière à obtenir entre 30 et 300 colonies par boîte de Pétri. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 30 °C pendant 72 heures avant dénombrement des colonies. Les mesures sont réalisées en triplicat et les résultats, exprimés en Unités Formant Colonies par unité de volume (UFC.mL^{-1}), représentent la moyenne des 3 mesures.

II.3.1.2. Mesure de l'activité acidifiante

L'activité acidifiante est la propriété technologique de référence des principales industries utilisatrices des levains lactiques (fabrication de produits laitiers fermentés). Cette activité est mesurée à l'aide du système CinAc® développé au sein de l'UMR GMPA (INRA ; Thiverval-Grignon, France) (Spinnler and Corrieu, 1989) et aujourd'hui commercialisé par AMS (Frépillon, France).

Système expérimental

Le système CinAc® utilisé est constitué de 15 sondes de pH (Ingold ; Paris, France), d'un bain thermostaté, d'une interface électronique qui assure la mise en forme du signal de chaque sonde et permet la conversion numérique/analogique et la gestion des actionneurs, et d'un ordinateur relié à l'interface et fonctionnant avec le logiciel d'exploitation iCinAc (Figure II.5).

Le logiciel iCinAc effectue l'étalonnage des sondes de pH en deux points, la régulation de la température du bain-marie, l'acquisition et le stockage des données de pH et de température pendant une période prédéfinie, le calcul en temps réel de la vitesse d'acidification et de différents descripteurs et les représentations graphiques.

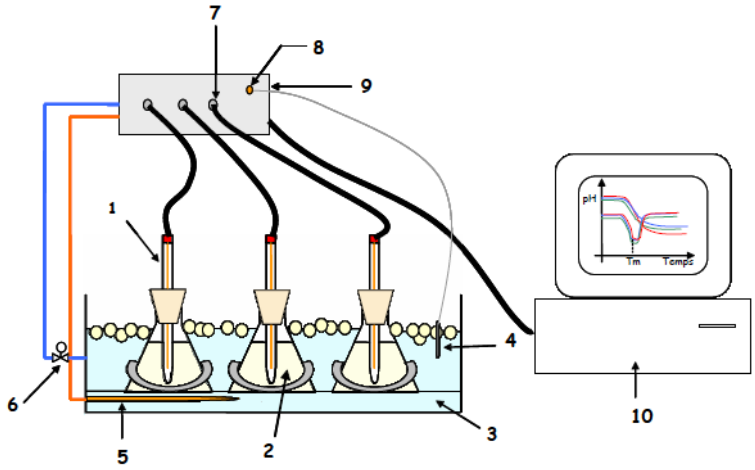


Figure II.5 Schéma simplifié du dispositif CinAc®. 1, électrode de pH ; 2, fiole contenant du lait ensemencé ; 3, bain-marie thermostaté ; 4, sonde de température ; 5, résistance chauffante ; 6, électrovanne d'admission d'eau froide ; 7, transmetteur de pH ; 8, transmetteur de température ; 9, interface électronique ; 10, ordinateur. D'après Wang (2005).

Méthode

La mesure de l'activité acidifiante est effectuée dans du lait écrémé reconstitué à 100 $g.L^{-1}$ à partir de lait en poudre (EPI Ingredients ; Ancenis, France). Le lait est réparti par volume de 80 mL dans des fioles de 120 mL puis stérilisé pendant 15 minutes à 110 °C et stocké à 4 °C avant son utilisation, qui doit intervenir au plus tard 72 heures après la stérilisation.

Les fioles de lait sont placées, 30 minutes avant utilisation, dans le bain-marie pour une mise à la température d'incubation. De plus, les ferments concentrés à tester sont préalablement dilués au dixième dans de l'eau physiologique. Après ensemencement avec 500 µL de ferment, les fioles de lait sont incubées à 30 °C dans le bain-marie thermostaté et l'acquisition des données de pH est réalisée en continu toutes les 5 minutes pendant 24 heures de façon à atteindre un pH inférieur à 4,5. Les essais sont réalisés en triplicat.

Descripteurs de l'activité acidifiante

Le système CinAc® permet le calcul de plusieurs descripteurs de l'activité acidifiante à partir des suivis de pH et de la vitesse d'acidification au cours du temps. Les plus importants sont la vitesse maximale d'acidification (Vm, en $u.pH.min^{-1}$), le temps nécessaire pour atteindre Vm (tm, en min), et le pH correspondant à Vm (pHm, en u.pH). Deux autres descripteurs peuvent également être calculés, il s'agit du temps nécessaire pour atteindre un pH donné (tpHi, en min) et du temps nécessaire pour atteindre un écart de pH donné (tdpHi, en min). Ce dernier descripteur permet de s'affranchir des variations initiales de pH. Ces différents descripteurs permettent donc de caractériser les propriétés acidifiantes des ferments. Le descripteur pHm est relativement constant pour une souche donnée, quelle que soit la concentration cellulaire initiale (Picque *et al.*, 1992). En revanche, les descripteurs Vm, tm, tpHi et tdpHi dépendent de la concentration cellulaire initiale ainsi que de l'état physiologique des bactéries et des conditions de culture telles que le milieu et la température de culture (Beal and Corrieu, 1994). Cependant les descripteurs de temps, tm, tpHi et tdpHi sont plus sensibles aux conditions de production que le descripteur Vm (Picque *et al.*, 1992; Spinnler and Corrieu, 1989).

La souche *L. lactis* TOMSC161 étant faiblement acidifiante (figure II.6), il est difficile d'identifier la vitesse maximale d'acidification après lyophilisation et surtout après 3 mois de stockage à 25 °C. Le descripteur tdpHi apparait donc comme un descripteur pertinent pour évaluer l'activité acidifiante de cette souche. Cependant, le coefficient de variation augmente lorsque le différentiel de pH augmente. Le descripteur tdpH0,7 a donc été retenu en raison de sa bonne répétabilité. Il renseigne, à volume constant, sur l'activité acidifiante globale de la population bactérienne. Plus tdpH0,7 est

faible, plus la reprise d'activité acidifiante est rapide et donc meilleure est l'activité acidifiante du ferment. Cependant, ce descripteur, fortement dépendant de la concentration cellulaire, ne permet pas de déterminer si une baisse d'activité acidifiante est due à une perte cellulaire (mortalité) ou à une perte d'activité de chaque cellule.

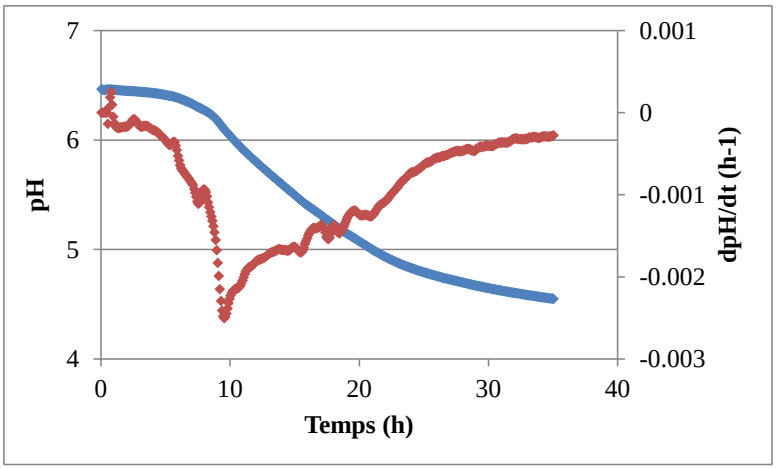


Figure II.6 Courbes d'acidification et de vitesse d'acidification d'une culture pure de *L. lactis* TOMSC161 à 30 °C dans du lait

Pour comprendre la raison de cette perte d'activité acidifiante globale, un descripteur caractérisant l'activité acidifiante spécifique (tspe) a également été calculé afin de s'affranchir de l'influence de la concentration cellulaire. Il permet ainsi d'évaluer l'état physiologique des cellules du ferment. Il s'agit du rapport entre le tdpH0,7 et le logarithme de la concentration en cellules cultivables de l'échantillon (en $\min.(\log(UFC.mL^{-1})^{-1}$).

II.3.1.3. Evaluation de la résistance aux différentes étapes du procédé de préservation

Afin d'évaluer la résistance des bactéries à la lyophilisation et au stockage, la perte cellulaire et la perte d'activité acidifiante ont été quantifiées aux différentes étapes de ce procédé de préservation. Pour cela, des dénombrements et des mesures de l'activité acidifiante sont donc réalisés après centrifugation et lyoprotection, après congélation, après lyophilisation et après un et trois mois de stockage à 4 et 25 °C. Avant d'effectuer ces mesures, les ferments congelés sont dégelés à température ambiante pendant 15 minutes et les ferments lyophilisés sont réhydratés à raison de 1 mL d'eau physiologique par vial et mélangés pendant 5 minutes à température ambiante.

La perte cellulaire est ensuite calculée de la manière suivante :

$$\mathrm{dlog(CFU)_{i+1}} = \mathrm{log(CFU)_i} - \mathrm{log\ CFU_{\ i+1}}$$

avec i et i+1, deux étapes successives du procédé.

De la même façon, les pertes d'activité acidifiante globale et spécifique sont déterminées de la manière suivante :

$$\mathrm{dtpH0.7_{i+1}} = \mathrm{tpH0.7_{i+1}} - \mathrm{tpH0.7_i}$$

$$\mathrm{dtspe_{i+1}} = \mathrm{tspe_{i+1}} - \mathrm{tspe_i}$$

avec i et i+1, deux étapes successives du procédé.

II.3.2. Mesure de l'état d'oxydation des cellules

L'état d'oxydation cellulaire est estimé par la quantification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) grâce au dihydroéthidium (DHE). Plus spécifiquement, ce fluorochrome permet de détecter l'anion superoxyde (O_2^-). En effet, le DHE diffuse passivement à travers la membrane cellulaire et réagit avec l'O_2^- pour former le cation éthidium (E^+), un composé fluorescent dans le rouge ($\lambda_{excitation}$ = 520 nm and $\lambda_{émission}$ = 610 nm) (Gomes *et al.*, 2005). L'éthidium produit se fixe ensuite aux acides nucléiques par intercalation. La formation du complexe DHE/acides nucléiques accentue la fluorescence rouge du DHE lors d'une excitation à 520 nm. Les cellules fluorescentes contiennent donc ce ROS et plus l'intensité de fluorescence est élevée, plus l'accumulation intracellulaire de ce ROS est élevée.

Marquage des cellules

Avant le marquage, la suspension cellulaire est diluée dans du tampon phosphate (0,1 M ; pH = 7,4) de façon à obtenir une concentration finale de 1 à 2.10^6 cellules totales.mL^{-1}. Puis 10 µL de la solution mère de DHE (0,1 mM dans DMSO, stocké à -20 °C) (Invitrogen-Molecular Probe; Eragny-sur-Oise, France) sont ajoutés à 1 mL de suspension cellulaire diluée. Le mélange est ensuite incubé à 30 °C pendant 10 minutes, avant d'être analysé au cytomètre en flux. Les mesures sont réalisées en triplicat sur les ferments congelés, lyophilisés et stockés.

Analyse par cytométrie en flux

Après marquage, l'analyse de fluorescence est réalisée sur un cytomètre en flux (CyFlow Space, Partec; Sainte-Genevieve-des-Bois, France).

Ce système est équipé d'un laser à Argon dont la longeur d'onde d'émission est de 488 nm (bleu) et de quatre filtres optiques pour la détection de la lumière diffusée aux petits angles et collectée dans l'axe du laser (Forward scatter, FSC), la lumière diffusée aux grands angles et collectée perpendiculairement au laser (Side scatter, SSC), un filtre passe-bande (de 530 nm ± 15 nm) pour collecter la fluorescence verte (FL1) et un filtre passe-haut (> 630 nm) pour collecter la fluorescence

rouge (FL2). Chaque faisceau lumineux sélectionné est envoyé sur un photomultiplicateur avant d'être converti en signal numérique. Par ailleurs, ce cytomètre est équipé d'un système de comptage volumétrique qui permet de dénombrer les cellules contenues dans un volume de 200 µL.

Les données de fluorescence sont collectées et analysées par le logiciel d'analyse Flowmax (Partec ; Sainte-Geneviève-des-Bois, France), qui fournit des histogrammes (nombre de cellules en fonction du signal d'un détecteur) et des cytogrammes (courbe du nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence), auxquels sont associés des tableaux statistiques recensant le nombre et le pourcentage de cellules présentes dans chaque zone du cytogramme ainsi que leur moyenne d'intensité de fluorescence. Un réglage préalable des gains et de la compensation est nécessaire pour interpréter correctement les histogrammes et cytogrammes.

Après identification des évènements cellulaires sur la base de leurs caractéristiques de taille (FSC) et de granulosité (SSC), seule la fluorescence issue du détecteur FL2 est étudiée dans le cas présent. Les résultats obtenus sont de deux types :

- Le pourcentage de cellules marquées
- L'intensité de fluorescence moyenne des cellules marquées.

Ces mesures sont réalisées sur les ferments congelés, lyophilisés et stockés.

II.3.3. Mesure de la fluidité membranaire

La fluidité membranaire est déterminée par la technique de polarisation de fluorescence ou encore appelée anisotropie de fluorescence. Cette méthode consiste à exciter une sonde fluorescente à l'aide d'une lumière polarisée et à mesurer l'intensité de fluorescence émise parallèlement et perpendiculairement à la direction du faisceau incident. Le milieu est considéré comme fluide si l'intensité de fluorescence émise parallèlement est proche de celle émise perpendiculairement (Mykytczuk *et al.*, 2007). En revanche, si l'intensité de fluorescence émise parallèlement est plus élevée que celle émise perpendiculairement, cela traduit un milieu visqueux (rotation plus difficile de la sonde dans la bicouche lipidique).

La sonde fluorescente utilisée dans ce travail est le DPH (1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène). Cette molécule a des propriétés hydrophobes lui permettant de s'insérer dans la bicouche lipidique des cellules et, plus précisément, au niveau des chaînes hydrocarbonées des acides gras (cœur de la membrane).

Marquage des cellules

Un prélèvement de 5 mL de la culture est effectué au moment de la récolte des cellules. Avant marquage, la suspension cellulaire est lavée deux fois avec du tampon MES-KOH (acide morpholineéthanesulfonique) (Sigma-Aldrich ; Saint-Louis, MO, Etats-Unis) à pH 6,2 et est centrifugée entre chaque lavage à 12 000 g pendant 90 secondes. Ensuite, le culot cellulaire est resuspendu dans 2 mL de tampon MES-KOH. Un volume de 5 µL de la solution de DPH (6 mM dans tétrahydrofurane) (Invitrogen-Molecular Probe ; Eragny-sur-Oise, France) est ajouté aux 2 mL de suspension cellulaire afin d'obtenir une concentration finale en DPH de 30 µM. La suspension cellulaire est agitée vigoureusement pendant une minute, centrifugée à 12 000 g pendant 90 secondes et le culot est resuspendu dans 2 mL de tampon MES-KOH avant analyse au cytomètre. Les mesures sont réalisées en triplicat.

Analyse par cytométrie en flux

Après marquage, l'analyse de fluorescence est réalisée sur un cytomètre en flux (CyFlow Space, Partec; Sainte-Genevieve-des-Bois, France).

Pour mesurer l'anisotropie de fluorescence, le cytomètre a été équipé d'un laser UV polarisé verticalement et émettant à 375 nm, d'un polariseur vertical et d'un polariseur horizontal, d'un retardateur de polarisation et de deux photomultiplicateurs pour collecter les composantes de la lumière perpendiculaire $I_{\perp}$ (FL3) et parallèle $I_{//}$ (FL4) au faisceau du laser (figure II.7).

L'analyse s'effectue en deux temps. Premièrement, une calibration du cytomètre est réalisée. Les gains des deux photomultiplicateurs FL3 et FL4 sont ajustés pour que les composantes parallèle (I_V) et perpendiculaire (I_H) de la lumière soient égales en lumière non polarisée (anisotropie = 0). Pour cela, le retardateur de polarisation est positionné à 45 ° afin de dépolariser le faisceau du laser et les gains sont ajustés pendant le passage de l'échantillon par une superposition exacte des intensités obtenues en FL3 et FL4. Deuxièmement, la mesure est effectuée en repositionnant le retardateur de polarisation en position 0 (lumière polarisée). La valeur d'anisotropie est calculée selon la formule ci-dessous :

$$r = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}}$$

avec r, la valeur d'anisotropie et $I_{//}$ et $I_{\perp}$, les valeurs d'intensité de fluorescence émise respectivement dans les directions parallèles et perpendiculaires au faisceau incident.

Plus la valeur d'anisotropie est faible, plus la bicouche lipidique est fluide.

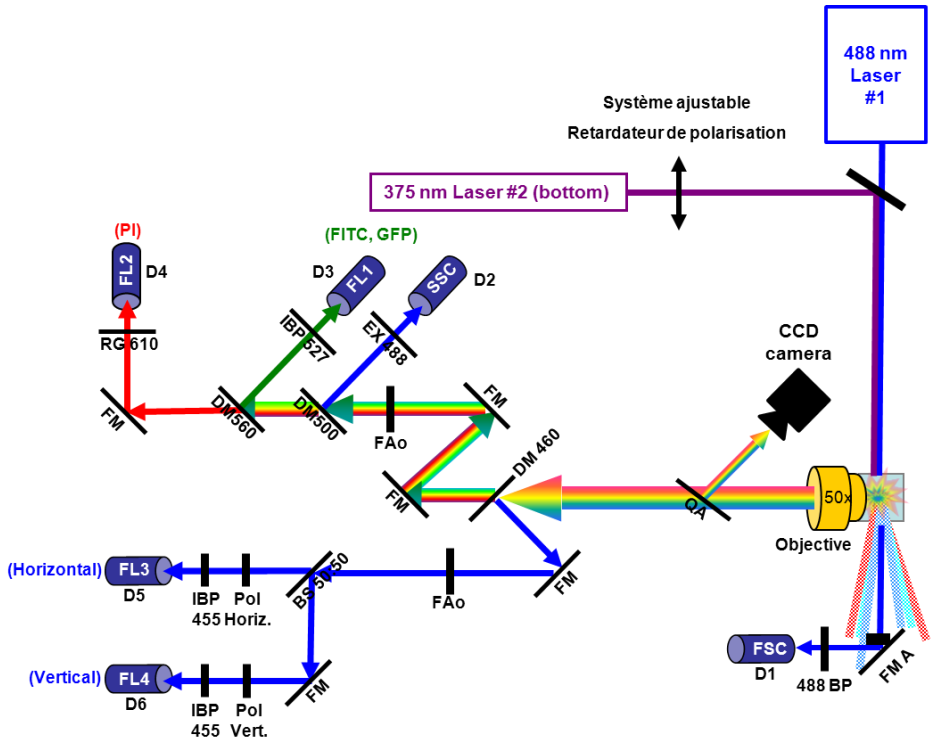


Figure II. 7 Représentation schématique du système optique du cytomètre en flux CyFlow Space (Partec) équipé pour la mesure d'anisotropie de fluorescence

II.3.4. Mesure de la température de transition lipidique par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

L'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) permet de mesurer *in situ* l'état physiologique des cellules (Crowe *et al.*, 1989a). Cette technique repose sur la mesure d'absorption de la lumière infrarouge liée aux mouvements de vibration des molécules. En effet, chaque bande d'absorption correspond à un mouvement de vibration particulier d'un type de liaison donné. Plus particulièrement, la bande d'absorption située aux alentours de 2850 cm^{-1} est attribuée à l'élongation symétrique des deux liaisons C-H des groupements méthylènes (CH_2) majoritairement présents dans les chaînes carbonées des acides gras membranaires. Les changements de conformation de ces chaînes, lors de la transition entre les phases gel et liquide cristallin, conduisent à une augmentation de la longueur d'onde de cette bande d'absorption.

La méthode consiste donc, à partir de spectres infrarouges, à suivre l'augmentation de la valeur de la longueur d'onde du pic attribuée aux lipides en fonction de la température et permet la détermination de la température de transition lipidique.

Système expérimental

L'acquisition des spectres est réalisée avec un spectromètre à Infrarouge Nicolet Magna 750 (Nicolet ; Madison, WI, Etats-Unis) équipé d'un détecteur mercure-cadmium-tellurure (MCT) et d'une cellule de mesure à température variable (Specac Ltd ; Orpington, Kent, Angleterre). La température de l'échantillon est enregistrée séparément en utilisant un thermocouple (ADAM module) situé à proximité de la fenêtre de mesure. Toutes les mesures sont réalisées avec des fenêtres en CaF_2 (Nicolet). Pour l'enregistrement des spectres, l'appareil est continuellement purgé à l'aide d'un générateur d'air sec dépourvu de CO_2 (Balston ; Haverhill, Etats-Unis). Après chaque ouverture de la cellule de mesure, il faut attendre 10 min environ avant de pouvoir effectuer une acquisition, le temps que l'ensemble de la chambre soit à nouveau balayé avec de l'air sec exempt de CO_2. Avant chaque analyse, il est nécessaire de refroidir le détecteur MCT à -196 °C avec de l'azote liquide et d'effectuer l'acquisition d'un « blanc ». Celui-ci est constitué seulement des deux fenêtres de CaF_2. Il permet de vérifier que le détecteur est à -196 °C et que la chambre de mesure ne contient ni eau, ni CO_2.

Méthode

Les analyses sont effectuées sur les ferments concentrés et lyoprotégés, et conservés à -80 °C. Avant analyse, le ferment est décongelé à température ambiante pendant 10 minutes. Le culot cellulaire est ensuite lavé deux fois avec de l'eau physiologique et par centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes et à 4 °C. Après élimination du surnageant, une goutte de culot lavé est déposée et écrasée entre deux fenêtres de CaF_2 et l'ensemble est placé dans la cellule de mesure.

Après une purge du système à l'air sec, la cellule de mesure est chauffée à 40 °C et le programme d'acquisition des spectres est démarré lorsque la température est stabilisée. Pour chaque acquisition de spectre, l'appareil effectue 32 scans entre 4000 et 900 cm^{-1} en 19 secondes, avec une résolution de 4 cm^{-1}. Pendant l'analyse, la température passe de 50 à -50 °C à une vitesse de 2 °C.min^{-1} puis augmente jusqu'à 80 °C à une vitesse de 2 °C.min^{-1}. L'analyse dure ainsi 115 minutes, pendant lesquelles une acquisition automatique de spectre est effectuée toutes les minutes, ce qui correspond à un spectre tous les 2 °C. Les mesures sont effectuées en triplicat.

Détermination de la longueur d'onde du pic d'absorption attribué aux lipides

Le traitement et l'analyse des spectres sont réalisés avec le logiciel Omnic (Nicolet ; Madison, Etats-Unis) et le logiciel ASpIR (Aquisiction de Spectre InfraRouge, INRA ; Grignon, France) en trois étapes résumées sur la figure II.8. Afin de mieux distinguer les différentes bandes d'absorption, la

dérivée seconde de chaque spectre est tout d'abord calculée. Puis les dérivées secondes sont lissées (algorithme de Savitsky-Golay sur 13 points). Enfin, ces dérivées lissées sont inversées.

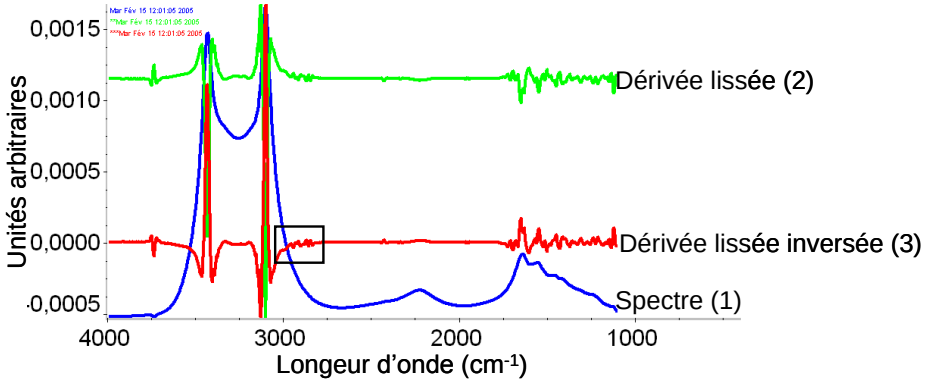


Figure II.8 Représentation d'un spectre (1) correspondant à l'analyse d'un culot cellulaire de *L. lactis* TOMSC161, de sa dérivée seconde lissée (2) et inversée (3)

Le logiciel AspIR peut alors déterminer la longueur d'onde d'absorption du pic situé à environ 2850 cm^{-1}. Un grossissement de la dérivée seconde lissée et inversée du pic d'intérêt obtenu à partir d'un culot cellulaire de *L. lactis* TOMSC161 est illustré à la figure II.9. Dans cet exemple, la longueur d'onde d'absorption du pic correspondant aux vibrations de valence symétrique des groupes CH_2 est déterminée à 2852,5 cm^{-1}.

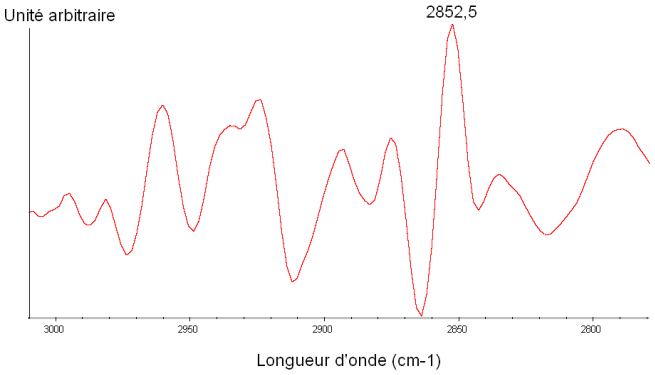


Figure II.9 Représentation entre 3000 cm^{-1} et 2800 cm^{-1} de la dérivée seconde lissée et inversée d'un spectre infrarouge obtenu avec un culot cellulaire de *L. lactis* TOMSC161.

Détermination de la température de transition lipidique

Parallèlement à l'acquisition des spectres, l'enregistrement des données fournies par le thermocouple permet de suivre la température de l'échantillon pendant toute l'analyse, puis de tracer

une courbe de suivi de la température de l'échantillon au cours de l'analyse. Pour chaque mesure, la température de l'échantillon est déterminée au début et à la fin de l'acquisition du spectre. La moyenne de ces deux températures est alors associée à la longueur d'onde du pic attribué aux lipides, issu du spectre concerné.

Par la suite, la courbe reliant la longueur d'onde du pic d'absorption des groupes CH_2 en fonction de la température moyenne est tracée. La dérivée première de cette courbe est calculée et lissée avec un filtre passe-bas selon trois étapes :

- Détermination de la transformée de Fourier de la dérivée
- Elimination des fréquences hautes correspondant au bruit de fond
- Réalisation de la transformée de Fourier inverse.

Enfin, la température de transition lipidique, définie comme étant le maximum de la dérivée première de la courbe représentant la longueur d'onde du pic en fonction de la température, est déterminée. A titre d'exemple, le profil obtenu avec un culot cellulaire de *L. lactis* TOMSC161 est présenté à la figure II.10.

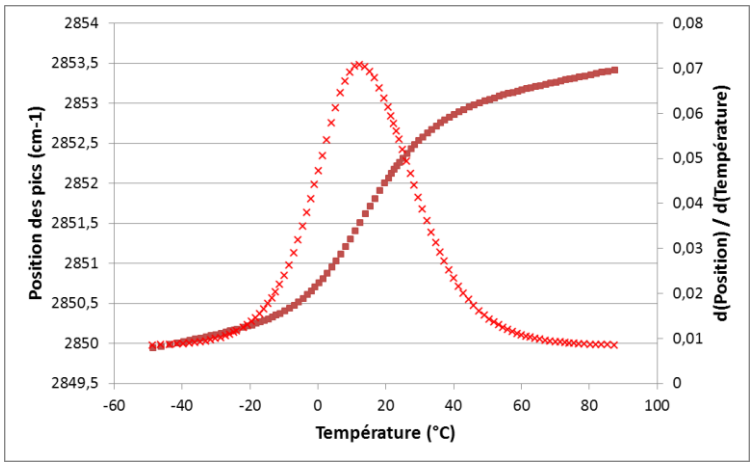


Figure II.10 Variation de la longueur d'onde du pic correspondant aux vibrations de valence symétrique des groupes CH_2 (en cm^{-1}) en fonction de la température (en °C) et de sa dérivée première (en $cm^{-1}.°C^{-1}$), avec un culot cellulaire de *L. lactis* TOMSC161

II.3.5. Analyse de la composition en acides gras

La composition relative en acides gras membranaires de *L. lactis* TOMSC161 est déterminée par la méthode d'analyse des esters méthyliques d'acides gras décrit par Rozes *et al.* (1993) avec des modifications mineures. En effet, la méthylation rend les acides gras volatils et permet leur analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Récolte et préparation des cellules

Un volume de 50 mL de culture est prélevé au moment de la récolte des cellules et est centrifugé à 15 000 g pendant 10 minutes et à 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot est conservé à -80 °C jusqu'à extraction.

Les culots cellulaires sont ensuite décongelés, lavés deux fois avec de l'eau physiologique et centrifugés entre chaque lavage à 15 000 g pendant 10 minutes et à 4 °C.

Méthylation et extraction

La méthylation et l'extraction des acides gras membranaires sont effectuées simultanément sur environ 0,15 g de culot bactérien humide lavé, pesé précisément dans un tube en verre. La méthylation débute par l'addition de 1,5 mL d'une solution aqueuse saturée de méthoxyde de sodium (1M dans du méthanol) (Sigma-Aldrich ; Saint-Louis, MO, Etats-Unis). Le mélange est agité pendant 1,5 minutes à vitesse maximale au vortex. Les acides gras méthylés sont ensuite extraits par ajout de 900 µL d'hexane (VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, France) auxquels sont ajoutés 100 µL d'étalon interne de nonanoate de méthyle (0,4 $mg.mL^{-1}$ d'hexane ; Sigma-Aldrich). Le mélange est agité pendant 5 minutes sur une roue puis décanté pendant 5 minutes dans de la glace. La phase supérieure, dans laquelle se trouvent les acides gras méthylés, est prélevée et centrifugée dans un évaporateur (RC10-22) couplé à un groupe réfrigérant (RCT 90, Jouan ; Saint Herblain, France) pendant 10 minutes à 1 200 rpm pour évaporation de l'hexane. Les acides gras, fixés aux parois du tube en verre, sont ensuite repris dans 1 mL d'hexane, à l'aide d'une pipette Pasteur.

Par échantillon, deux types de vial sont alors réalisés. Le premier contient un insert avec 150 µL d'extrait et un bouchon spécifique pouvant être perforé par la seringue de prélèvement du chromatographe à phase gazeuse. Le second contient le reste de l'extrait et un bouchon permettant la conservation à -80 °C. Les extractions sont réalisées en triplicat.

Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

L'analyse (séparation et identification) des esters méthyliques des différents acides gras est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse (Hewlett-Packard 6890 ; Avondale, PA, Etats-Unis) couplé à un spectromètre de masse (5973 ; Agilent Technologies, Avondale, PA).

La séparation est effectuée sur une colonne capillaire composée de 70 % de cyanopropylpolysilphénylène-siloxane BPX70 (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm ; SGE Analytical Science Pty Ltd. ; Victoria, Australie) avec de l'hélium comme gaz vecteur (débit de 1,2 $mL.min^{-1}$) et une

pression dans la colonne de $1{,}3.10^5$ Pa. L'injection de 1 µL d'extrait est effectuée en mode splitless à une température de 250 °C. La température du four est maintenue pendant une minute à 35 °C, puis est augmentée de 35 à 100 °C à une vitesse de 40 °C.min^{-1}. Elle est alors maintenue pendant une minute à 100 °C, augmentée de 100 à 130 °C à 5 °C.min^{-1}, puis de 130 à 180 °C à 1,5 °C.min^{-1} et enfin de 180 à 240 °C à une vitesse de 5 °C.min^{-1}. La température de détection est de 230 °C.

Les esters d'acides gras méthylés sont d'abord identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des étalons connus. Leur identification est ensuite confirmée en utilisant le détecteur sélectif de masse à une vitesse de balayage de 3,14 scans.s^{-1}, avec les données recueillies dans la gamme de 33 à 500 amu. Les spectres de masse des esters d'acides gras méthylés sont comparés avec la banque de données Wiley 275.L (Hewlett-Packard, Gaithersburg, MD, Etats-Unis).

La quantification des acides gras est calculée sur les ions cibles à l'aide d'un étalonnage externe réalisé avec des dilutions en série de standards commerciaux et en utilisant le C9:0 comme étalon interne. La méthode utilisée ne permet pas un dosage quantitatif des acides gras car les rendements d'extraction et de méthylation ne sont pas connus. Les résultats sont donc exprimés en pourcentage de chaque acide gras par rapport aux acides gras totaux (en %). A partir des concentrations relatives en acides gras, différents ratios sont calculés :

- Teneur en acides gras insaturés sur teneur en acides gras saturés (UFA:SFA)
- Teneur en acides gras cycliques sur teneur en acides gras insaturés (CFA:UFA)
- Teneur en acides gras cycliques sur teneur en acides gras saturés (CFA:SFA)

A titre d'exemple, un chromatogramme issu de l'extraction des acides gras membranaires de *L. lactis* TOMSC161 est présenté à la figure II.11. Chaque pic correspond à un acide gras donné.

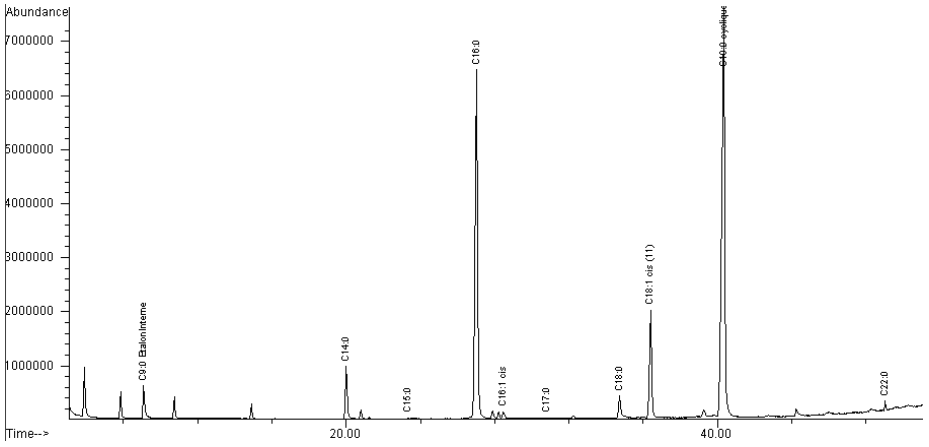


Figure II.11 Chromatogramme caractéristique de la composition en acides gras membranaires extraits de cellules de *L. lactis* TOMSC161

II.3.6. Séquençage et annotation du génome

II.3.6.1. Extraction de l'ADN

Culture

Après isolement de colonies sur milieu gélosé M17 (Biokar Diagnostics ; Beauvais, France), 100 mL de milieu M17 (Biokar Diagnostics), préalablement stérilisé à 115 °C pendant 20 minutes, est inoculé à partir d'une colonie et incubé à 30 °C pendant 15 heures. Une seconde culture est réalisée en inoculant 1 mL de la préculture dans 100 mL de milieu M17 et est incubé à 30 °C pendant 8 heures. La culture est ensuite centrifugée à 15 000 g pendant 10 minutes et à 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot est congelé à -80 °C jusqu'à extraction.

Préparation de l'échantillon

Le culot bactérien est décongelé et re-suspendu dans 1 mL de tampon Tris-EDTA 1X (pH 8) (Sigma-Aldrich ; Saint Louis, MO, Etats-Unis). Un volume de 1,2 mL de cette suspension cellulaire est transféré dans un tube de broyage de 2 mL (Sarstedt ; Marnay, France) auquel est ajouté environ 400 mg de billes de zirconium de diamètre 0,1 mm (Biospec ; Bartlesville, WA, Etats-Unis).

Lyse enzymatique

Après ajout de 50 µL d'une solution composé de lysosyme à 20 $mg.mL^{-1}$ et de tampon TES (Tris 50 mM – EDTA 1 mM – Saccharose 6,7 % ; pH 8) (Sigma-Aldrich), l'échantillon est incubé à 37 °C pendant 1 heure et vortexé toutes les 15 minutes. Puis, 40 µL de protéinase K (14 $mg.mL^{-1}$) (Sigma-Aldrich) et 100 µL de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 20 % (v/v) (Sigma-Aldrich) sont ajoutés et l'échantillon est incubé à 55 °C pendant 1 heure et vortexé toutes les 15 minutes.

Extraction

Un volume de 500 µL d'un mélange composé de phénol, chloroforme et alcool isoamylique (25:24:1 ; pH 8) est ajouté et l'échantillon est agité deux fois au broyeur Fast-Prep FP120 BioSavant (Qbiogene ; Illkrich, France) à une vitesse de 6 $m.s^{-1}$ pendant 45 secondes et avec 5 minutes de repos entre les 2 broyages. L'échantillon est ensuite refroidi dans de la glace pendant 2 minutes et est centrifugé à 12 000 g pendant 30 minutes et à 20 °C. Le surnageant est récupéré et transféré dans un

tube Phase Lock Gel de 2 mL, auquel sont ajoutés 500 µL du mélange composé de phénol, chloroforme et alcool isoamylique (25 :24 :1 ; pH 8). Le mélange est agité vigoureusement et centrifugé à 12 000 g pendant 15 minutes. La phase aqueuse supérieure est récupérée et de nouveau traitée dans les mêmes conditions. Enfin, la phase aqueuse supérieure est récupérée dans un tube de broyage de 2 mL et 500 µL de chloroforme sont ajoutés. Le mélange est de nouveau agité vigoureusement et centrifugé à 12 000 g pendant 15 minutes. La phase aqueuse supérieure est récupérée et un 1/10ème de volume d'acétate de sodium 3 M (Sigma-Aldrich) et 2 volumes d'éthanol absolu, préalablement placé à -20 °C, sont ajoutés. Le mélange est laissé une nuit à -20 °C afin de faire précipiter l'ADN. Le mélange est ensuite centrifugé à 12 000 g pendant 15 minutes et à 4 °C et le surnageant est éliminé. Le culot est lavé 2 fois à l'éthanol 80 % et une fois à l'éthanol 70 % par centrifugation à 12 000 g pendant 15 minutes et à 4 °C. A la dernière centrifugation et après élimination du surnageant, le culot est séché à l'étuve à 42 °C pendant environ 15 minutes. Enfin, le culot est resuspendu dans 200 µL d'eau Milli-Q et est placé à 4 °C le temps que le culot se réhydrate (30 à 60 minutes).

Purification

Un volume de 1 µL de RNAse A à 20 mg.mL^{-1} (Sigma-Aldrich) est ajouté et l'échantillon est incubé à 37 °C pendant 30 minutes. A cette étape, un premier dosage des acides nucléiques est réalisé au Nanodrop (Nanodrop ND1000 Spectrophotometer, Labtech ; Palaiseau, France). L'ADN extrait est purifié avec le kit de DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen ; Venlo, Pays-Bas). D'après le dosage réalisé au Nanodrop, 80 µg de l'ADN extrait sont récupérés, puis 10 µL de tampon AW1 et 250 µL de tampon AW2 sont ajoutés, ainsi que du tampon TE 1X afin d'obtenir un volume final de 100 µL. Après agitation, un volume de 500 µL de l'échantillon est déposé sur une colonne Qiamp Min Elute et est centrifugé à 7 000 g pendant une minute. Puis le tube permettant de collecter l'éluât est jeté et remplacé par un autre tube, et l'ADN extrait est de nouveau purifié sur la colonne avec 500 µL de tampon AW2. Enfin la colonne est centrifugée à 12 000 g pendant 3 minutes afin de sécher complètement la membrane. La colonne est ensuite placée dans un tube Eppendorf de 1,5 mL et 50 µL de tampon AE sont ajoutés afin de récuperer l'ADN. Après 5 min d'attente, la colonne est centrifugée à 12 000 g pendant une minute et l'éluât est récupéré.

Vérification de la qualité de l'ADN

La qualité de l'ADN extrait est validée par deux méthodes différentes.

Premièrement, la mesure au Nanodrop (Nanodrop ND1000 Spectrophotometer, Labtech, Palaiseau, France) permet de quantifier l'ADN extrait par mesure de l'absorbance à 260 nm. Une unité

d'absorbance à 260 nm est égale à 50 ng.µl^{-1} d'ADN double brins en solution. La concentration d'ADN obtenue doit être supérieure à 500 ng.µL^{-1}. Cette mesure permet également d'évaluer la qualité de l'ADN extrait grâce au calcul de deux rapports d'absorbance : 260/280 nm et 260/230 nm. Le rapport des absorbances DO_{260} / DO_{280} doit être compris entre 1,8 et 2 pour considérer l'ADN extrait comme pur. Un rapport DO_{260} / DO_{280} inférieur à 1,8 signifie que l'ADN extrait est probablement contaminé par des protéines et un rapport supérieur à 2,0 signifie que l'ADN extrait est probablement contaminé par de l'ARN. De plus, le rapport des absorbances DO_{260} / DO_{230} doit être compris entre 1,8 et 2,2. Si la valeur de ce rapport est plus faible, cela peut indiquer la présence de contaminants chimiques tels que le phénol.

Deuxièmement, le profil électrophorétique de l'ADN (figure II.12) est également réalisé en gel d'agarose 1 % en conditions non dénaturantes.

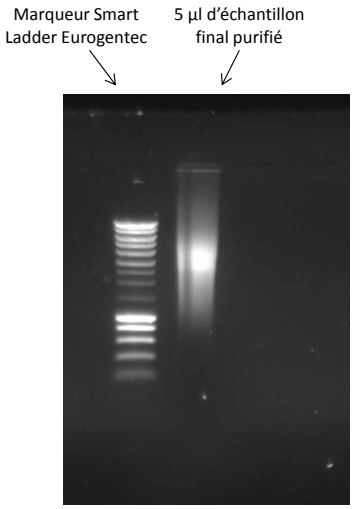


Figure II.12 Photographie du gel d'agarose où a migré l'ADN extrait de *L. lactis* TOMSC161

II.3.6.2. Séquençage et assemblage

La séquence a été générée par Imagif (CNRS ; Gif-sur-Yvette, France). L'ADN est fragmenté à l'aide d'un sonicateur COVARIS (Woburn, MA, Etats-Unis). La banque génomique est ensuite préparée selon le protocole « Truseq DNA sample preparation » d'Illumina (San Diego, CA, Etats-Unis) à l'aide d'un automate SPRIworks (Beckman-Coulter ; Villepinte, France) et du kit de réactif « SPRIworks Fragment Library Kit I » (Beckman-Coulter). Puis la génération des clusters est réalisée sur la cBot d'Illumina à l'aide du kit « TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot-HS » (Illumina). Enfin, le séquençage est réalisé en paired-end (2 x 100 cycles) sur un séquenceur Hi-Seq 1000 (Illumina) à l'aide du kit « TRuSeq SBS Kit v3-HS » (Illumina).

La qualité des séquences obtenues est vérifiée à l'aide du logiciel FastqC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/).

L'assemblage de l'ensemble des séquences obtenues est effectué en utilisant le logiciel Velvet puis finalisé avec le logiciel VelvelOptimizer.

II.3.6.3. Annotation

La prédiction des gènes du génome de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* TOMSC161 a été réalisée en utilisant la plateforme d'annotation AGMIAL (Annotation de Génomes Microbiens d'Intérêt Agro-aLimentaire) développée par MIG (INRA, Jouy-en-Josas, France) (Bryson *et al.*, 2006).

Les composantes principales de cette plateforme d'annotation sont les suivantes :

- Une base de données qui gère les données initiales, les contigs ainsi que les résultats produits par les méthodes d'analyse : les gènes, les différents signaux associés, les protéines codées par les gènes et les résultats des diverses analyses effectuées sur ces protéines.
- Une chaîne de programmes d'analyse. Cette chaîne est constituée de 2 parties, l'une consacrée à l'analyse des séquences nucléiques, l'autre à l'analyse des séquences protéiques.
- Des interfaces (Artémis qui est un logiciel développé au centre Sanger à Cambridge et G-Web) permettant aux biologistes de consulter les données, et éventuellement de les modifier et d'annoter les gènes.

L'annotation automatique d'AGMIAL est basée sur la recherche d'homologie dans les bases de données publiques. Une vérification de l'annotation automatique est ensuite réalisée.

II.3.7. Analyse du transcriptome

L'analyse du transcriptome permet d'étudier l'ensemble des gènes transcrits dans un échantillon biologique étant dans un état physiologique donné. Elle permet ainsi de déterminer les variations d'expression des gènes dans différentes conditions. Cette analyse transcriptomique est ici effectuée par séquençage de l'ARN (RNA-seq).

La méthode RNA-seq a été développée en même temps que les autres méthodes de séquençage haut débit et est résumée sur la figure II.13. Dans cette stratégie, la population d'ARN est transformée en ADN complémentaire double brins qui est fragmenté et un adaptateur est ajouté à chacune des extrémités des différents fragments. Chaque molécule résultante est, avec ou sans amplification, séquencée par haut débit de façon à obtenir des reads. Par la suite, le nombre de

séquences « mappées » par gène est considérée comme proportionnel au niveau d'abondance de transcrits de ce gène. Les données obtenues sont donc des données de comptage.

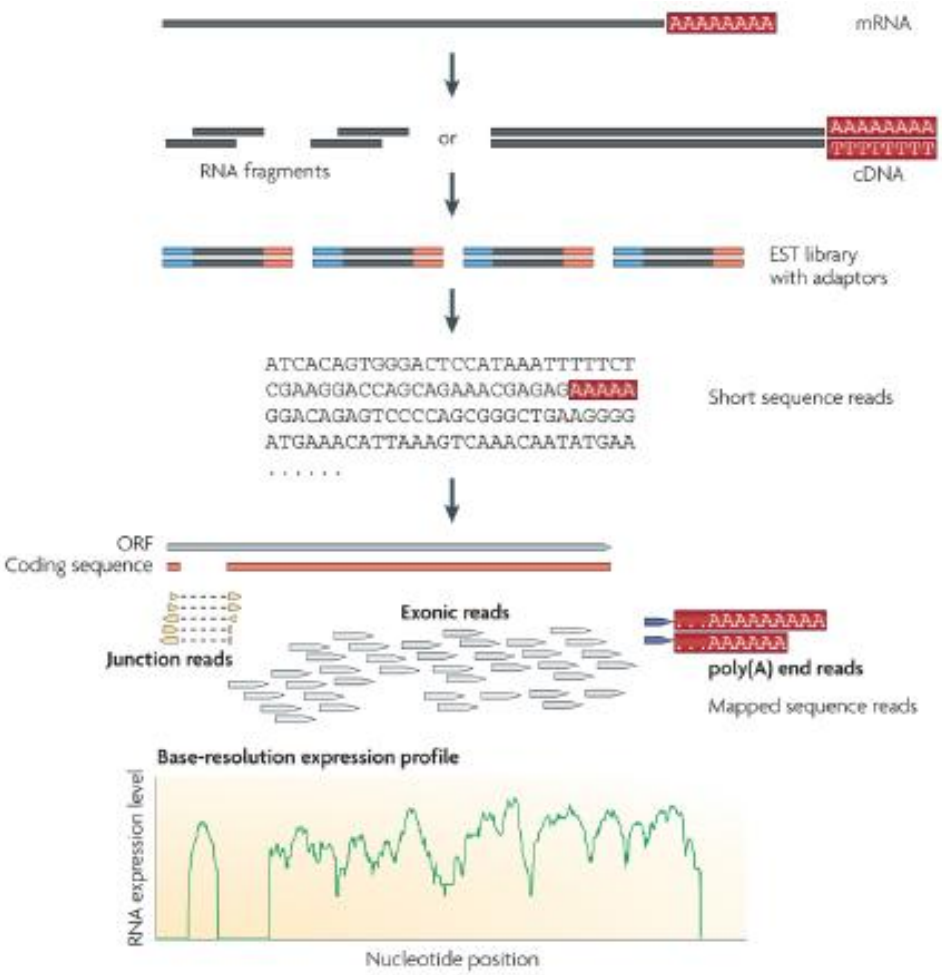


Figure II.13 Schématisation de la méthodologie classique utilisé en RNA-Seq. D'après Philippe (2011).

Récolte et stabilisation des cellules

Un volume de 25 mL de culture est prélevé au moment de la récolte des cellules et 12,5 mL de « killing buffer » (Tris-HCl 20 mM et pH 7,5 ; $MgCl_2$ 5 mM ; NaN_3 20 mM), préalablement refroidi à 4 °C, sont ajoutés afin de stopper toutes réactions métaboliques. Le mélange est centrifugé à 15 000 g pendant 5 min et à 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot est congelé rapidement dans de l'azote liquide et conservé à -80 °C jusqu'à extraction.

Extraction des ARNs

Le culot cellulaire est re-suspendu dans 25 mL de tampon Tris-EDTA (0,1 et 0,0013M ; pH 8,0). Un volume de 700 µL de cette solution ainsi que 700 µL de phénol-chloroforme (5:1, pH 4,7, Sigma-Aldrich ; Saint-Louis, MO, Etats-Unis) sont transférés dans un tube Eppendorf à vis de 2 mL (Polylabo, Servion, Suisse) contenant 1 g de billes de zirconium de 0,1 mm de diamètre (Biospec ; Bartlesville, WA, Etats-Unis) et 50 µL d'acétate de sodium 3M (pH 4,8). Les cellules sont cassées à l'aide d'un broyeur « Fast Prep FP120 BioSavant » (Qbiogene ; Illkrich, France) à une vitesse de 4,5 $m.s^{-1}$ et pendant 30 secondes. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes et à 4 °C. Après élimination du culot contenant les débris cellulaires et les protéines et récupération du surnageant, une seconde étape d'extraction est réalisée par addition de 650 µL de phénol-chloroforme, suivi d'une agitation à 90 g pendant 5 minutes et à 4 °C (Thermomixer confort, Eppendorf) et d'une centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes et à 4 °C. Cette étape est réitérée une seconde fois avec ajout de 650 µL de chloroforme afin d'extraire une quantité maximale d'ARN avec un niveau de pureté élevé. Après centrifugation, les ARNs sont précipités à l'isopropanol (1mL) et en présence d'acétate de sodium 3M (pH 4,8) pendant au moins 2 heures à -80 °C. L'échantillon est ensuite centrifugé à 12 000 g pendant 15 minutes et à 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot contenant les ARNs est récupéré. Ce dernier est lavé deux fois avec 1 mL d'éthanol à 70 % et par centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes et à 4 °C. Le culot contenant les ARNs est ensuite séché au SpeedVac (Savant, Thermo Scientific ; Rockford, IL, Etats-Unis) pendant 3 minutes puis re-suspendu dans 200 µL d'eau stérile. Une première mesure de la concentration en ARNs des échantillons est réalisée au Nanodrop (Nanodrop ND1000 Spectrophotometer, Labtech ; Palaiseau, France).

Elimination de l'ADN résiduel et purification des ARNs

Afin d'éliminer l'ADN résiduel dans l'échantillon, 55 µg d'ARN sont digérés par 7,5 µL de DNase I (Roche ; Boulogne-Billancourt, France) à 37 °C pendant 15 minutes et en présence de 10 µL de tampon 10X (Tris-HCl 250 mM, pH 7,5 ; $MgCl_2$ 50 mM), le volume étant complété à 100 µL par de l'eau stérile. Les ARNs sont ensuite purifiés à l'aide du kit « RNA Cleanup and Concentration Micro Kit » (Norgen ; Thorold, Canada). Lors de cette purification, un volume de 100 µL d'échantillon contenant les ARNs est additionné de 250 µL de « Binding Solution » (fournie avec le kit Norgen) et de 200 µL d'éthanol à 96 %. Ce mélange est homogénéisé pendant 10 secondes au vortex puis est déposé sur la colonne de purification, elle-même placée au dessus d'un tube pour la récupération des éluats. Une centrifugation à 12 000 g pendant une minute, permet l'adsorption des ARNs sur la colonne. La colonne est ensuite rincée en déposant 400 µL de « wash solution » (fournie avec le kit Norgen) puis centrifugée à 12 000 g pendant une minute. Cette étape de lavage est répétée 2

fois. Ensuite, la colonne est placée au-dessus d'un tube collecteur et 25 µL d'eau stérile chauffée à 37 °C sont déposés sur la colonne. Une incubation à température ambiante pendant 5 minutes et une centrifugation à 12 000 g pendant une minute permettent de décrocher les molécules d'ARN de la colonne. L'éluât récupéré est de nouveau déposé sur la colonne, incubé à température ambiante pendant 5 minutes puis centrifugé à 12 000 g pendant une minute afin de maximiser la quantité d'ARN récupéré. Enfin les ARNs ribosomaux sont déplétés à l'aide du kit « Ribo-Zero Magnetic Kit » (Epicentre ; Madison, WI, Etats-Unis) en suivant le protocole fourni par le fournisseur. L'extrait d'ARNs est enfin conservé à -80 °C jusqu'à séquençage.

Vérification de la qualité de l'ARN

La qualité des ARNs extraits est validée par trois méthodes différentes et successives.

Premièrement, la mesure au Nanodrop (NanoDrop Technologies; Wilmington, DE, Etats-Unis) permet, par mesure de l'absorbance à 260 nm, de quantifier les ARNs extraits. Elle est effectuée sur un volume de 2 µL d'échantillon. La concentration en ARN obtenue doit être supérieure à 500 ng.µL^{-1}. La figure II.14 montre, à titre d'exemple, le spectre d'un échantillon d'ARNs extrait de cellules de *L. lactis* TOMSC161.

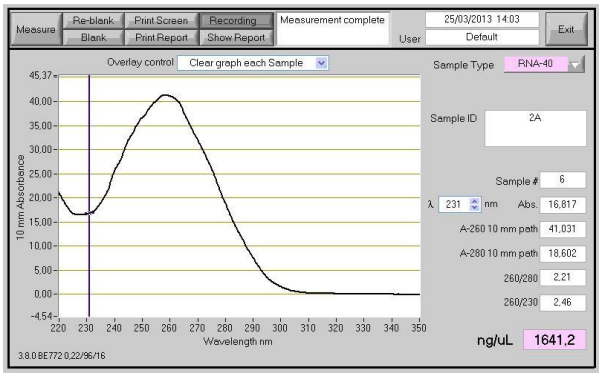


Figure II.14 Spectre d'un extrait d'ARNs de *L. lactis* TOMSC161

Puis, le profil électrophorétique des ARNs en gel d'agarose 2 % en conditions non dénaturantes permet de visualiser chacun des ARN 5S, 16S et 23S. Un extrait non dégradé possède une bande d'ARN 23S plus intense que celle de l'ARN 16S, elle-même plus intense que la bande correspondant à l'ARN 5S.

Enfin, la mesure du « RNA Integrity Number » (RIN) (Schroeder *et al.*, 2006) est effectuée par électrophorèse avec le Bioanalyzer 2100 (Agilent; Palo Alto, CA, USA). Cet appareil permet de mesurer le ratio ARN 23S/ARN 16S, la concentration en ARN (ng.µL^{-1}) ainsi que l'aire des pics. Le

calcul du RIN est réalisé à partir de ces trois données, sachant que des ARN de bonne qualité présentent un RIN supérieur à 9.

La figure II.15 montre un exemple de gel obtenu avec des ARNs extraits de *L. lactis* TOMSC161 avant et après déplétion.

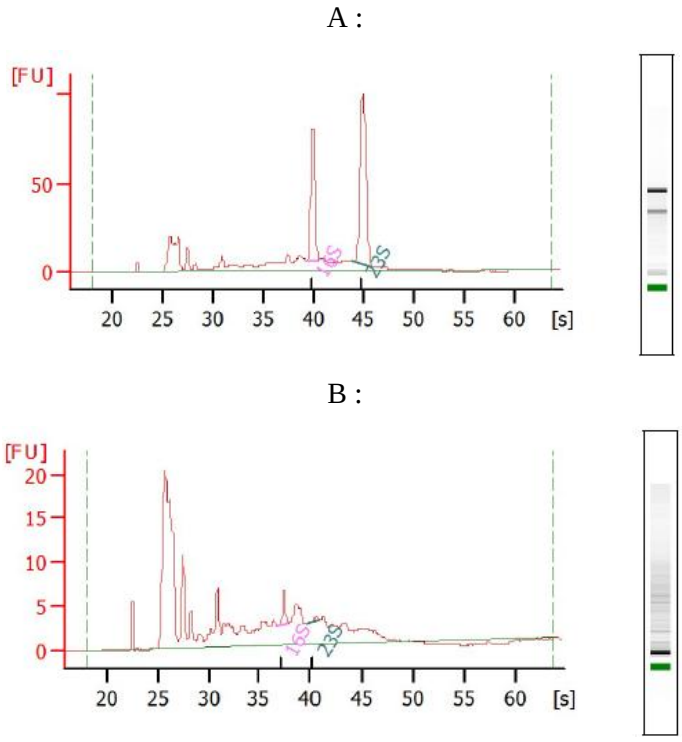


Figure II.15 Gel de migration et spectre issu du Bioanalyser 2100 (Agilent) d'un extrait d'ARN de *L. lactis* TOMSC161 avant (A) et après déplétion (B) des ARN ribosomiques

Séquençage

Le séquençage des ARNs a été générée par Imagif (Gif-sur-Yvette, France). La qualité des ARNs est vérifiée au bioanalyzer (Agilent Technologies ; Santa Clara, CA, Etats-Unis) sur une puce ARN pico. Les ARNs sont ensuite fragmentés à l'aide d'un tampon contenant du zinc et en suivant le protocole indiqué par le fournisseur Ambion (Austin, TX, Etats-Unis). Les ARNs fragmentés sont traités successivement avec la « Antarctic alcaline phosphatase » puis la « polynucleotide kinase » (New England Biolabs ; Ipswich, Angleterre). Puis la génération des clusters est réalisée sur la cBot d'Illumina à l'aide du kit « TruSeq SR Cluster Kit v3-cBot-HS » (Illumina ; San Diego, CA, Etats-Unis). Enfin le séquençage est réalisé en single-end sur un séquenceur Hiseq 1000 (Illumina) à l'aide du kit « TRuSeq SBS Kit v3-HS » (Illumina).

Traitement des données

La qualité des reads obtenus est vérifiée à l'aide du logiciel FastqC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Puis, les reads sont alignés sur le génome de *L. Lactis* TOMSC161 (mapping) en utilisant le logiciel Bowtie 0.12.9 (Langmead *et al.*, 2009) avec les paramètres suivants : alignement des 35 premières paires de bases, un mismatch autorisé et 100 alignements par read. Seuls les reads alignés sur un seul gène sont utilisés pour la suite de l'analyse.

Après l'alignement des reads, les données de comptage brutes des reads sont traitées sous le logiciel R (http://www.r-project.org/index.html). Le but est de comparer, par analyse différentielle, le niveau d'expression de chaque gène (nombre de reads alignés par gène) entre deux conditions.
Tout d'abord, une première filtration est effectuée pour supprimer les gènes pour lesquels les comptages sont faibles quel que soit l'échantillon. Seuls les gènes ayant au moins 50 reads alignés en moyenne sur les deux conditions sont sélectionnés arbitrairement.

Puis les données de comptage sont normalisées en utilisant le package DESeq2 (Anders and Huber, 2010). DESeq effectue une normalisation inter-échantillon qui prend en compte la taille de la librairie et une normalisation intra-échantillon qui prend en compte la taille des gènes.

Enfin, les gènes différentiellement exprimés sont identifiés en utilisant le même package DESeq2. L'analyse différentielle réalisée par DESeq repose sur l'estimation de la relation entre la dispersion des comptages par la loi binomiale négative et leur moyenne. DESeq suppose que la variabilité de l'estimation de la relation entre la disperion et la moyenne n'est pas entièrement due à la variance d'échantillonnage, mais qu'il existe également une variabilité biologique entre les gènes. Le seuil de significativité est fixé à 5 % après ajustement des p-values par la procédure de Benjamini Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995). Cet ajustement permet de prendre en compte les faux positifs par le FDR (False Discovery Rate) qui correspond à l'espérance de la proportion de faux positifs parmi les hypothèses rejetées.

II.3.8. Analyse du protéome

L'analyse protéomique permet d'étudier l'ensemble des protéines présentes dans un échantillon biologique étant dans un état physiologique donné. Les échantillons étudiés ici (cellules bactériennes) sont constitués d'un mélange complexe de protéines. L'analyse protéomique doit donc être capable d'identifier un maximum de protéines pour couvrir et caractériser au mieux le protéome étudié. Pour cela, l'approche en chromatographie liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse en

tandem (MS/MS) représente une méthode largement répandue, dont l'efficacité a été démontrée dans de nombreuses études (Geromanos *et al.*, 2009).

Dans cette stratégie (Figure II.16), les échantillons sont analysés au niveau peptidique ce qui nécessite une digestion préalable du mélange protéique extrait. Les peptides sont ensuite séparés par chromatographie liquide avant d'être analysés par spectrométrie de masse en tandem. Les informations de séquence ainsi obtenues sont ensuite utilisées pour identifier les peptides et donc les protéines présentes dans l'échantillon.

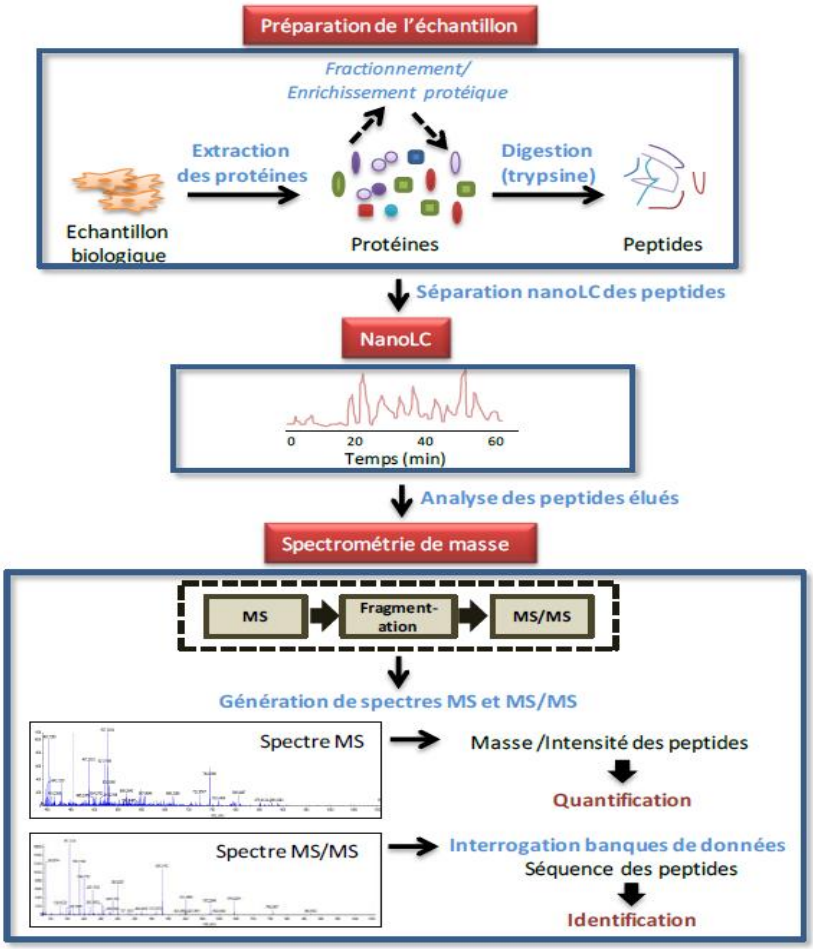


Figure II.16 Schématisation de l'analyse des protéines par nanoLC-MS/MS. D'après Gautier (2012).

Récolte et stabilisation des cellules

Un volume de 500 mL de culture est prélevé et centrifugé à 17 000 g pendant 30 minutes et à 4 °C. Le culot cellulaire est ensuite lavé dans 30 mL de tampon Tris HCl 50 mM (pH 7,8) (Sigma-Aldrich ; Saint Louis, MO, Etats-Unis) et par centrifugation à 15 000 g pendant 10 minutes et à 4 °C.

Le surnageant est éliminé et le culot est congelé rapidement dans l'azote liquide et conservé à -80 °C jusqu'à extraction.

Extraction des protéines

Après décongélation, le culot cellulaire est re-suspendu dans un tampon de broyage composé de tampon Tris HCl 100 mM (pH 7,8) (Sigma-Aldrich ; Saint Louis, MO, Etats-Unis), de DTT 100 mM (Sigma-Aldrich) et d'un cocktail d'inhibiteur P84465 (5 % (v/v) dans du DMSO) (Sigma-Aldrich). La densité optique de la suspension cellulaire doit être comprise entre 35 et 40 (à 600 nm).
Les cellules sont ensuite cassées grâce au désintégrateur de cellules One Shot (CellD ; Sauveterre, France). Pour cela, un volume de 7 mL de suspension cellulaire est placé dans la chambre de broyage puis la désintégration est réalisée à une pression de 2,5 kbar et enfin la totalité du lysat y compris la mousse est récupérée. Une première centrifugation à 3 000 g pendant 20 minutes et à 4 °C est réalisée afin d'éliminer les cellules non cassées et les débris cellulaires. La fraction protéique cytoplasmique et celle associée aux enveloppes sont ensuite séparées par ultracentrifugation à 226 000 g pendant 30 min et à 4 °C. Le surnageant contenant la fraction protéique cytoplasmique est prélevé et le culot contenant la fraction protéique associée aux enveloppes est remis en suspension dans 400 µL de tampon de broyage. Une partie des extraits est utilisée pour le dosage des protéines et le reste est congelé à -80 °C jusqu'à analyse par LC-MS/MS.

Dosage des protéines

Afin de normaliser la quantité de protéines qui sera analysée par LC-MS/MS, la teneur en protéines extraites est déterminée par la méthode de Bradford, selon le protocole fourni avec le réactif « Coomassie protein assay Kit » (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL, Etats-Unis). De plus, la qualité de l'extrait protéique est évaluée par profil électrophorétique sur gel SDS Page en condition dénaturante.

Digestion protéique

Une courte électrophorèse SDS-PAGE (Mini Gel 4-12 % Bis-Tris, Invitrogen ; Carlsbad, NM, Etats-Unis) est réalisée afin de faire migrer les protéines sur 5 cm et le gel est coloré au bleu de Coomassie (Biorad ; Marnes-la-Coquette, France) pour révéler les protéines. Le gel est ensuite découpé au niveau des spots de protéines (2 ou 3 pièces) et analysé par LC-MS/MS à la plateforme PAPPSO (Inra ; Jouy-en-Josas, France).

Les protéines sont soumises à une digestion enzymatique standard avec de la trypsine afin de générer des fragments peptidiques, de taille réduite, accessibles à l'analyse par LC-MS/MS. Pour cela, les pièces de gel sont lavées deux fois avec un mélange d'acétonitrile à 50 % (v/v) et de carbonate d'ammonium (NH_4CO_3) 25 mM et incubées à 56 °C pendant 1 heure en présence de DTT 10 mM. Après refroidissement, le surnageant est éliminé et les pièces de gel sont incubées avec de l'iodoacétamide 55mM à température ambiante et dans le noir. Puis, les pièces de gel sont lavées avec de l'acétonitrile et séchées dans un concentrateur sous vide. La digestion est réalisée à 37 °C pendant 8 heures avec 200 ng de trypsine modifiée (Promega ; Madison, WI, USA) dissoute dans une solution de NH_4CO_3 25 mM. Les peptides trypsiques sont extraits, une première fois, avec une solution d'acétonitrile à 50 % (v/v) et d'acide trifluoroacétique à 0,5 % (v/v) et de nouveau extraits avec de l'acétonitrile pure. Enfin, l'extrait peptidique est séché au concentrateur sous vide et re-suspendu dans 25 µL d'une solution composée d'acétonitrile à 2 % (v/v), d'acide trifluoroacétique à 0,05 % (v/v) et d'acide formique à 0,08 % (v/v).

Analyse des peptides purifiés par nanoLC-MS/MS

L'analyse des peptides trypsiques purifiés est réalisée sur un système HPLC Ultimate 3000 LC (Dionex ; Thermo Fisher Scientific ; Waltham, MA, Etats-Unis) relié à un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap Discovery (Thermo Fisher Scientific) par une source d'ions nano-électrospray (Thermo Fischer Scientific). Pour se faire, le mélange de peptides trypsiques est concentré et dessalé sur une pré-colonne Pepmap 100 C18 (5 µM x 300 µM ; Dionex ; Thermo Fisher Scientific) avec de l'acide formique à 0,1 % à un débit de 7,5 $\mu L.min^{-1}$ pendant 3 minutes. Puis le mélange peptidique est élué sur une pré-colonne reliée à une colonne C18 Biosphere (3 µM x 75 µM ; Nanosperations ; Nieuwkoop, Pays Bas) avec un gradient linéaire de 5 à 35 % d'acétonitrile dans de l'acide formique à 0,1 % à un débit de 300 $nL.min^{-1}$ et sur une période de 40 minutes. L'ionisation des échantillons est effectuée à la sortie de la colonne capillaire à une tension de pulvérisation de 1,8 kV avec un émetteur d'acier inoxydable (30 µm ; Thermo Electron ; Waltham, MA, Etats-Unis). Les ions peptidiques sont analysés à l'aide du logiciel Xcalibur 2.1 avec les étapes d'acquisition de données suivantes : 1. données MS (rapport masse/charge (m/z) sur une gamme de 400 à 1400 m/z et avec une résolution de 70 000) 2. données MS/MS (énergie de collision normalisée de 30 % et résolution de 17 500) pour les 8 ions majoritairement détectés en étape 1. Le temps d'exclusion dynamique est de 40 s.

Base de données de recherche et identification des protéines

Les données brutes produites par le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap sont converties en fichier mzXML avec ReAdW (Seattle Proteome Center ; Seattle, WA, Etats-Unis). L'identification

des protéines est réalisée avec le logiciel X ! Tandem 1 (X!Tandem Cyclone 2011.12.01; http://www.thegpm.org) contre la base de données des protéines de *L. lactis* TOMSC161 et contre une base de contaminants protéiques. Le logiciel X ! Tandem prend en compte les paramètres suivants : (i) la spécificité de la trypsine avec un clivage manqué, (ii) l'acétylation N-terminale du peptide trypsique, (iii) l'alkylation sur le résidu aminé cystéine, (iv) l'oxydation variable de la méthionine et (v) la phosphorylation de la sérine et de la thréonine. La tolérance de la masse a été fixée à 5 ppm pour les ions précurseurs et à 0,5 Da pour les fragments ionisés. Les résultats finaux de la recherche pour l'identification des protéines ont été filtrés selon différents critères d'application : (i) un minimum de deux séquences peptidiques différentes avec E-valeur < 0.05 et (ii) la détection de la protéine avec seuil Log (E-value) < 4. La valeur du taux de faux positif (FRD, FauxDiscoveryRate) est calculée avec le pipeline X ! Tandem contre une base de données de protéines inverses. Le FRD est estimé à 0 % et 0,07 % respectivement pour les protéines et les peptides.

II.4. Vérification des caractéristiques physiques de la matrice lyophilisée

II.4.1. Mesure de la température de transition vitreuse par analyse enthalpique différentielle

L'analyse enthalpique différentielle (AED) est utilisée pour mesurer les températures de transition vitreuse Tg' et Tg, respectivement des ferments frais et lyophilisés. Cette technique se base sur le fait que, lors d'une transformation physique telle qu'une transition de phase (ou changement d'état), une certaine quantité de chaleur est échangée avec l'échantillon pour le maintenir à la même température que la référence. Le sens de cet échange de chaleur entre l'échantillon et la référence dépend de la nature endothermique ou exothermique du phénomène considéré.

Système expérimental

Les mesures de température de transition vitreuse sont réalisées à l'aide d'un calorimètre différentiel à balayage Diamond pour les mesures de Tg' et Pyris 1 pour les mesures de Tg (Perkin Elmer LLC ; Norwalk, CT, Etats-Unis). Chaque équipement est composé de deux chambres de mesure (produit et référence), de deux fours, d'un système de refroidissement et de thermomètres à résistance de platine reliés à un ordinateur qui pilote le système. Le calorimètre Diamond est refroidi à l'azote liquide par le système Cryofil (Perkin Elmer LLC, Norwalk, CT, Etats-Unis) permettant d'atteindre de

très basses températures (jusqu'à -170 °C). Le calorimètre Pyris 1 est refroidi par un groupe froid « Intracoler », permettant d'atteindre des températures de l'ordre de -20 °C.

Selon le principe de compensation de puissance, chaque calorimètre comporte deux boucles de contrôle :

- La première impose au système une variation de température en fonction du temps conformément aux consignes fournies
- La deuxième ajuste la puissance de manière à maintenir l'échantillon et la référence à la même température

Ainsi, lorsqu'une différence de température se produit à cause d'une réaction exothermique ou endothermique dans l'échantillon, la température de la tête de mesure de l'échantillon est maintenue constante alors que la température de la tête de mesure de la référence s'ajuste à l'aide de la puissance de chauffe. Le signal calorimétrique obtenu est proportionnel à la chaleur différentiellement fournie à la référence et à l'échantillon en fonction du temps : dH/dt. Il est enregistré en fonction du temps et de la température moyenne de l'échantillon et de la référence. Au cours de chaque essai de calorimétrie différentielle à balayage, un thermogramme est enregistré (flux de chaleur en fonction de la température) et permet la détermination de la Tg' ou Tg.

Méthode

Des mesures de Tg' et Tg sont effectués respectivement sur les ferments frais et sur les ferments lyophilisés. Pour cela, 10 à 30 mg d'échantillon sont placés dans un creuset en aluminium d'une capacité maximale de 50 µL. Le creuset est ensuite fermé à l'aide d'un couvercle en aluminium serti.

Puis, en fonction de la nature physique de l'échantillon (solution aqueuse ou produit sec), des cycles thermiques différents sont appliqués pour déterminer la température de transition vitreuse (respectivement Tg' ou Tg). Pour l'analyse thermique de solution aqueuse, un cycle de refroidissement et réchauffement est appliqué entre 20 °C et -120 °C à une vitesse de 10 °C.min^{-1}, puis répété au moins une fois sur le même échantillon afin de valider la réversibilité des phénomènes observés. Dans le cas des produits lyophilisés, le programme est constitué d'une succession de phases de refroidissement et de réchauffement et effectué entre 20 et 200 °C à une vitesse de 10 °C.min^{-1}. La première phase du cycle (I : refroidissement – réchauffement) est effectuée afin d'éliminer l'histoire thermique de l'échantillon. La mesure de Tg est obtenue dans une deuxième phase (II : refroidissement – réchauffement) sur un produit amorphe n'ayant pas subi de processus de relaxation.

Chaque essai est réalisé en triplicat au minimum.

Exploitation des courbes obtenues par AED

La transition vitreuse est une transition du second ordre associée à des variations de chaleur spécifique. Cependant, différents phénomènes peuvent être observés sur les thermogrammes établis dans la gamme de températures étudiées.

Dans les milieux biologiques congelés, la transition vitreuse est un phénomène thermique de faible amplitude qui s'étend sur une zone de température assez large. Sur un thermogramme, la région de la transition vitreuse se signale par un ou plusieurs épaulements avant le pic endothermique correspondant à la fusion de la glace. La température de transition vitreuse Tg' correspond à la température pour laquelle une variation de 50 % de l'augmentation de chaleur spécifique est obtenue au niveau de cet épaulement. Cette valeur est considérée comme la température de transition vitreuse standard et est déterminée par l'AED (ASTM, Standard Method E 1356-91) (figure II.17). Elle est similaire à la température correspondant au point d'inflexion de l'épaulement, déterminée par dérivation de la courbe du flux de chaleur en fonction de la température (Levine and Slade, 1988).

Dans les milieux déshydratés, le changement de chaleur spécifique correspondant à la transition vitreuse a souvent lieu à des températures positives (effet plastifiant de l'eau). Il s'étend sur des dizaines de degrés. La valeur de Tg est obtenue par la même méthode (ASTM) que Tg'.

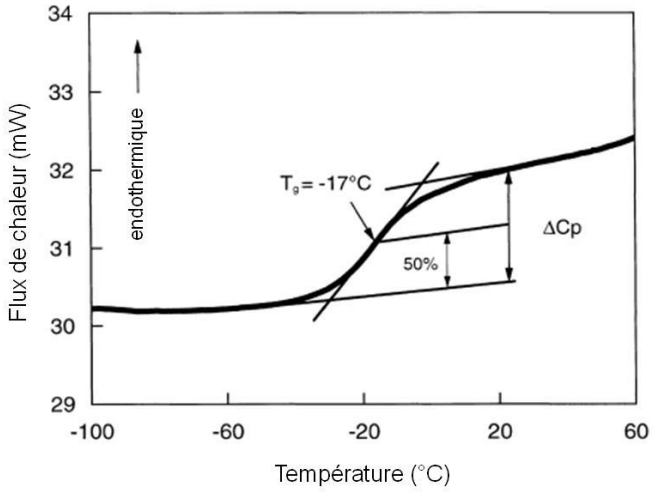


Figure II.17 Evolution du flux de chaleur (dQ/dt) en fonction de la température, mesurée par analyse calorimétrique différentielle. La température de transition vitreuse (Tg) correspond au point d'inflexion de la courbe. D'après Fonseca *et al.* (2001b).

II.4.2. Mesure de la teneur en eau

La méthode de Karl-Fisher est considérée comme la méthode de référence pour la mesure de la teneur en eau de produits secs. Son principe repose sur un dosage coulométrique de la quantité d'iode utilisée pour titrer l'eau au sein du produit et dont la réaction est la suivante :

$$I_2 + SO_2 + 2H_2O \rightarrow 2\,HI + H_2SO_4$$

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un équipement Karl Fisher 756 KF (Metrohm ; Villebon-sur-Yvette, France), spécifique aux échantillons à faible valeur d'humidité résiduelle.

Environ 20 mg de ferment lyophilisé est introduit dans un flacon de 4 mL, pesé (masse initiale de produit, m_0) puis mis en suspension dans 2,2 mL de méthanol (Hydranal, Sigma Aldrich ; Saint-Louis, MO, Etats-Unis) et de nouveau pesé pour obtenir la masse de solvant introduit ($m_{solvant}$). L'échantillon est vortexé pendant 2 minutes et décante ensuite pendant 10 minutes. Pour déterminer la teneur en eau de l'échantillon, environ 0,8 mL de la phase liquide ($m_{introduit}$) de cette solution est alors injecté à l'aide d'une seringue dans l'appareil afin d'en déterminer la masse en eau (m_{KF}). De même, 1 mL de méthanol pur ($m'_{introduit}$) subit le même protocole afin de connaître la masse d'eau (m_{blanc}) présente dans le méthanol avant dissolution.

Une fois ces deux analyses effectuées, la teneur en eau au sein du produit (HR) (%) est donnée par la relation suivante.

$$HR = \frac{\left(\frac{m_{KF}}{m_{introduit}} - A_0\right) \times m_{solvant}}{m_0}$$

$$\text{Avec } A_0 = \frac{m_{blanc}}{m'_{introduit}}$$

Les mesures sont réalisées en triplicat sur les ferments lyophilisés et les ferments stockés 3 mois à l'état lyophilisé.

II.4.3. Mesure de l'activité de l'eau

L'activité de l'eau (a_w) des ferments lyophilisés est une mesure complémentaire de la teneur en eau. Elle est indispensable pour estimer la disponibilité de l'eau dans le produit. Elle est correspond au rapport de la pression de vapeur au dessus de l'échantillon sur la pression de la vapeur d'eau pur à la même température.

L'équipement utilisé est un a_w-mètre LabMaster-a_w (Novasina, Precisa ; Poissy, France) équipé d'un capteur électrolytique et d'une sonde de température.

L'échantillon est placé, à température ambiante, dans une chambre de mesure étanche. L'eau libre humidifie ou assèche l'air à l'intérieur de la chambre jusqu'à atteindre un équilibre. L'appareil mesure les conditions climatiques à l'intérieur de la chambre et convertit les différentes informations pour donner une valeur d'a_w. Les mesures d'a_w sont effectuées en mode cinétique, c'est-à-dire que l'évolution de l'a_w est suivie au cours du temps, jusqu'à obtention de la valeur à l'équilibre (durée d'environ 30 minutes). Les mesures sont réalisées sur les ferments lyophilisés avant et après 3 mois de stockage à 4 °C et 25 °C.

II.5. Plan d'expérience et traitements statistiques

Selon les études et les méthodes utilisées, différents traitements statistiques sont réalisés afin de quantifier et d'analyser les effets des facteurs étudiés.

II.5.1. Plan de Box Behnken

Lors de la première étude (publication n° 1), un plan de Box Behnken a été mis en œuvre afin de déterminer l'influence des paramètres de fermentation sur la croissance et la résistance à la lyophilisation et au stockage de *L. lactis* TOMSC161.

Ce plan est un plan du second degré ou appelé plan pour surface de réponse. Il s'agit d'une matrice d'essai où les variables ne prennent que trois niveaux (-1, 0, 1). Ce plan est composé d'une matrice factorielle à 2 niveaux et de blocs incomplets équilibrés en suivant un arrangement particulier. Ces matrices sont ensuite complétées de trois points au centre du domaine permettant d'estimer la variance due à l'erreur expérimentale. Ce plan répond donc à un critère d'optimisation particulier : l'erreur de prévision des réponses est la même pour tous les points d'une sphère ou hypersphère centrée à l'origine du domaine expérimental, c'est le critère de rotabilité.

Ce plan permet de modéliser une surface de réponse de degré 2 par l'établissement de modèles mathématiques du second degré par la méthode des moindres carrés :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

Les qualités de l'ajustement et de la prévision du modèle sont évaluées à partir d'une analyse de la variance. De plus, le modèle peut être exploité pour déterminer des conditions optimales.

II.5.2. Analyse de la variance (ANOVA)

Des analyses de variance sont effectuées avec le logiciel Statgraphics Plus version 3.0 (Statistical Graphics Corp. ; Rockville, MD, Etats-Unis) pour étudier l'influence de facteurs sur différents descripteurs qui seront détaillés dans la troisième partie de ce manuscript.

Cette méthode statistique (ANOVA) est utilisée pour étudier les différences de moyenne entre populations. Elle permet de comparer les moyennes de différents groupes et de dire si, parmi ces groupes, au moins un d'entre eux diffère des autres. Pour chaque facteur, une valeur de probabilité est calculée. Une valeur de probabilité (p-value) inférieure à 0,05 indique un effet significatif du facteur avec un indice de confiance de 95 %. En revanche, il n'y a pas de différence significative entre deux moyennes si la valeur de probabilité est supérieure à 5 %. Enfin, plus la valeur de probabilité est petite, plus significatif est l'effet du facteur en question.

Cependant, cette méthode ne permet pas d'identifier les groupes statistiquement différents. Il faut ensuite effectuer des comparaisons multiples de moyennes fondées sur les résultats de l'ANOVA.

II.5.3. Comparaison de moyennes

Dans le cas où l'ANOVA montre un effet significatif, l'analyse statistique est complétée par un test de comparaisons multiples de moyennes de Newman-Keuls au seuil déterminé par l'analyse de variance. Ce test permet de quantifier, pour chaque descripteur, les différences significatives entre les niveaux de chaque facteur, à partir des moyennes correspondant à chaque valeur de chaque facteur. Dans une situation avec plusieurs individus, ce test permet de grouper ceux qui ne sont pas considérés comme statistiquement différents.

II.5.4. Recherche de corrélation

La recherche de corrélation entres données quantitatives est réalisée par le calcul du coefficient de Pearson. Il s'agit d'une mesure de la corrélation linéaire entre deux variables. Plus précisément, le coefficient de corrélation de Pearson est une normalisation de la covariance par le produit des écarts-types des variables. Il mesure le degré et la direction de la relation entre les deux variables. Le seuil de significativité de ce test est fixé à 95 %.

Chapitre III
Résultats et Discussion

Chapitre III - Résultats et discussion

III.1. Influence des conditions de fermentation sur la résistance de *Lactococcus lactis* TOMSC161 aux différentes étapes de la lyophilisation et au stockage

III.1.1. Contexte et objectifs

Industriellement, les ferments lactiques sont généralement préservés et distribués sous une forme lyophilisée. Cependant, la lyophilisation induit différents stress pour les cellules bactériennes, conduisant à de faibles taux de survie et des pertes de fonctionnalités. Avec l'objectif de produire des concentrés bactériens lyophilisés de haute qualité, c'est-à-dire avec une viabilité élevée et une bonne reprise des activités métaboliques adaptées à leur utilisation, de nombreux travaux se sont intéressés à l'amélioration de la résistance des bactéries lactiques à la lyophilisation, étape critique de leur procédé de production.

La synthèse bibliographique a ainsi mis en évidence de nombreuses stratégies d'amélioration de la résistance des bactéries lactiques à la lyophilisation dont la modulation des conditions de fermentation et/ou de récolte. Cependant, la plupart de ces études ne se sont intéressées qu'à la modification d'un seul paramètre de fermentation à la fois, ne prenant pas en compte les possibles interactions. De plus, la résistance généralement mesurée lors de ces études concerne seulement la lyophilisation et néglige le stockage ultérieur. La lyophilisation est, elle-même, le plus souvent considérée dans son ensemble alors qu'elle comprend deux étapes unitaires successives, la congélation et le séchage, pouvant avoir un impact différent sur la résistance des ferments. Il apparaît donc indispensable de mieux comprendre l'influence des paramètres de fermentation et de récolte sur la résistance à la congélation, au séchage à basse température et au stockage et d'identifier les étapes critiques de ce procédé de préservation.

Dans ce contexte, l'objectif de ces travaux a été d'étudier les effets combinés de trois paramètres majeurs de la fermentation : la température, le pH et l'instant de récolte, sur la résistance de *L. lactis* TOMSC161 à chaque étape du procédé de lyophilisation et au cours du stockage. Pour cela, un plan d'expérience dont les résultats ont été traités par la méthodologie des surfaces de réponse a été utilisé pour évaluer l'influence des différents paramètres de fermentation et de leurs interactions sur la croissance et sur la tolérance des ferments à ce procédé de préservation. La résistance a été

quantifiée aux différentes étapes du procédé par des mesures de cultivabilité et d'activité acidifiante globale.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une première publication acceptée dans Journal of Applied Microbiology

III.1.2. Publication n° 1 : « Cell growth and resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 following freezing, drying and freeze-dried storage are differentially affected by fermentation conditions »

H. VELLY[1,2,3], F. FONSECA[2,3*], S. PASSOT[3,2], A. DELACROIX-BUCHET[4,5] and M. BOUIX[3,2]

[1]CNIEL, 42 rue de Châteaudun, F-75314 Paris Cedex 09, France

[2]INRA, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA), 1 avenue Lucien Brétignières, F-78850 Thiverval-Grignon, France

[3]AgroParisTech, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA), 1 avenue Lucien Brétignières, F-78850 Thiverval-Grignon, France

[4]INRA, UMR 1319 Microbiologie de l'alimentation au service de la santé (Micalis), Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France

[5]AgroParisTech, UMR 1319 Microbiologie de l'alimentation au service de la santé (Micalis), Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France

*Corresponding author: F. Fonseca, Tel: +33 (0)1 30 81 59 40; Fax: +33 (0)1 30 81 55 97; E-mail address: fonseca@grignon.inra.fr

Abstract

Aims: To investigate the effects of fermentation parameters on the cell growth and on the resistance to each step of the freeze-drying process of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161, a natural cheese isolate, using a response surface methodology.

Methods and Results: Cells were cultivated at different temperatures (22, 30 and 38°C) and pH (5.6, 6.2 and 6.8) and were harvested at different growth phases (0, 3 and 6 hours of stationary phase). Cultivability and acidification activity losses of *L. lactis* were quantified after freezing, drying, 1 and 3 months of storage at 4 and 25°C. *L. lactis* was not damaged by freezing but was sensitive to drying and to ambient temperature storage. Moreover, the fermentation temperature and the harvesting time influenced the drying resistance of *L. lactis.*

Conclusion: *L. lactis* cells grown in a whey based medium at 32°C, pH 6.2 and harvested at late stationary phase exhibited both an optimal growth and the highest resistance to freeze-drying and storage.

Significance and Impact of the Study: A better insight on the individual and interaction effects of fermentation parameters made it possible the freeze-drying and storage preservation of a sensitive strain of technological interest. Evidence on the particularly damaging effect of the drying step and the high temperature storage is presented.

Keywords

Lactic acid bacteria, fermentation, lyophilization, storage, acidification activity

Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are widely used as starters to manufacture fermented food (dairy, meat and vegetable products), probiotic products and in green chemistry applications. Among LAB, *Lactococcus lactis* is extensively used as an industrial starter to manufacture a wide range of fermented dairy products (Champagne *et al.* 2009; Turchi *et al.* 2013). This microorganism has many interesting technological properties such as lactic acid, aromatic compounds and exopolysaccharides production (Ozkalp *et al.* 2007; Gutierrez-Mendez *et al.* 2008; Kristo *et al.* 2011). The strain TOMSC161 is particularly interesting for its cheesemaking properties and is used for producing non-scalded curd pressed cheeses (Tomme de Savoie).

Before being used in industrial applications, the preparation of starter requires production (fermentation, concentration) and preservation (freezing or freeze-drying) techniques that maximize the viability and the activity of bacterial cells during long-term storage.

Freeze-drying is a commonly used technique for the long-term preservation of LAB due to its low storage and transportation costs compared to freezing and its easy handling in countries where the management of low temperatures is not well established. It involves freezing the aqueous solution containing bacteria, followed by primary drying to remove ice by sublimation and, finally, secondary drying to remove unfrozen water by desorption. Even if low temperatures are applied, not all strains survive the process and among those that survive, very poor viability recovery are recurrently reported (Carvalho *et al.* 2003b; Savini *et al.* 2010). It is well known that resistance to freeze-drying and storage varies among strains and *Lactococcus lactis* TOMSC161 is a particularly sensitive one, thus exhibiting significant acidification activity loss following stabilization processes. The freeze-drying process involves two main events that damage bacteria: freezing and drying. Freezing is at the origin of the cryoconcentration of solutes and the formation of ice crystals, which can lead to osmotic stress and cell dehydration. Drying, and especially the removal of unfrozen water associated to cells, can lead to changes in the physical state of membrane lipids and in the structure of sensitive proteins due to breakage of hydrogen bonds (Leslie *et al.* 1995; Castro *et al.* 1997).

Lyoprotectants such as polymers, sugars, amino acids and antioxidant molecules are usually added to limit stress and to enhance LAB resistance to freeze-drying (Carcoba and Rodriguez 2000; Carvalho *et al.* 2002). Moreover, operating conditions such as the cooling rate, the thermal history of the product during drying, the residual moisture content and the subsequent storage conditions, including temperature, water activity and atmosphere, have an impact on bacterial survival (Font de Valdez *et al.*

1985; Schoug *et al.* 2006; Higl *et al.* 2007; Trelea *et al.* 2009; Zhao and Zhang 2009; Passot *et al.* 2012).

Bacterial cells can also be prepared to cope with the different stresses of freeze-drying by varying the growth conditions before stabilization. Fermentation conditions, including medium composition, temperature, pH, harvesting time, gas atmosphere and other pre-adaptation treatments reported for LAB are detailed in Table 1. Most of these studies used a 'one-factor-at-a-time' testing approach, which requires a large number of experiments and may still fail to induce the optimal responses, especially when the factors jointly, not just individually, influence the cell responses. Furthermore, the freeze-drying process is often considered as a "black box" and the storage stability of freeze-dried LAB is hardly ever studied. Finally, the reported experimental procedures were applied in conditions very different from those found in industry using rich growth media and unadapted protective molecules and analyzing the freeze-drying resistance just in terms of survival but not in terms of activity preservation, such as acidification activity, which is an important parameter for industrial applications.

The aim of this work was therefore to investigate the combined effects of three important fermentation parameters, temperature, pH and harvesting time, on the resistance of *Lactococcus lactis* TOMSC161 at each step of the production process of freeze-dried cells. A response surface methodology (RSM) was chosen to study relationships between fermentation parameters and bacterial cultivability and acidification activity losses (Box and Behnken 1960). The experimental design used attempted to reach a better understanding of the impact of fermentation conditions on freeze-drying and storage resistance and to identify the critical steps of the bacterial preservation process. This study was conducted in conditions close to those of an industrial process (simple medium), thus making it possible to recommend fermentation conditions to maximize cell survival and acidification activity after freeze-drying and storage of a strain of technological interest but sensitive to freeze-drying.

Table 1 Overview of studies on the influence of fermentation conditions on the freeze-drying survival of LAB

Studied fermentation conditions	Details	Strain	Optimal conditions for freeze-drying survival	Reference
Medium composition	MRS, M17 or Lee's Broth	*Enterococcus faecalis* *Enterococcus durans*	No effect of medium	(Carvalho *et al.* 2003a)
	Glucose, yeast extract and peptone concentration	*Lactobacillus plantarum* *Lactobacillus rhamnosus*	Glucose and yeast extract	(Siaterlis *et al.* 2009)
	Presence or absence of glutathione	*Lactobacillus sanfranciscensis*	Presence of gluthatione	(Zhang *et al.* 2010)
pH	Uncontrolled pH with initial pH from 3.2 to 4.8	*Oenococcus oeni*	pH = 3.5	(Hua *et al.* 2009)
Thermal shock treatment after fermentation	Cold shock (2h at 10°C), Heat shock (25 min at 39 or 42°C)	*Lactococcus lactis ssp. lactis* *Lactococcus lactis ssp. cremoris*	Cold shock or heat shock	(Broadbent and Lin 1999)
Harvesting time	Exponential or stationary phase	*Lactobacillus reuteri*	Stationary phase	(Schwab *et al.* 2007)
	Mid-exponential or early stationary phase	*Oenococcus oeni*	Early stationary phase	(Hua *et al.* 2009)
	Late exponential or early stationary phase	*Bifidobacterium animalis*	No effect of harvesting time	(Saarela *et al.* 2005)
pH x harvesting time	Uncontrolled or controlled pH (6.8) Late exponential, mid stationary or late stationary phase	*Lactobacillus rhamnosus*	→ Controlled pH x late exponential phase → Uncontrolled pH x late stationary phase	(Ampatzoglou *et al.* 2010)
	pH 5 or 6 and 0.5, 2.5 or 4.5 hours after entering the stationary phase	*Lactobacillus reuteri*	pH = 5 x 2.5 hours after entering the stationary phase	(Palmfeldt and Hahn-Hagerdal 2000)
Temperature x pH	From 30 to 44°C pH: from 5.0 to 6.0	*Lactobacillus coryniformis*	T > 34°C x pH 5.5	(Schoug *et al.* 2008)
	From 30 to 39°C pH: from 5.0 to 6.5	*Lactobacillus bulgaricus*	→ 30°C x pH 5.0 → 37°C x pH 6.5	(Li *et al.* 2009)

Materials and methods

The experimental approach used during this study and the main parameters investigated are summarized in Figure 1.

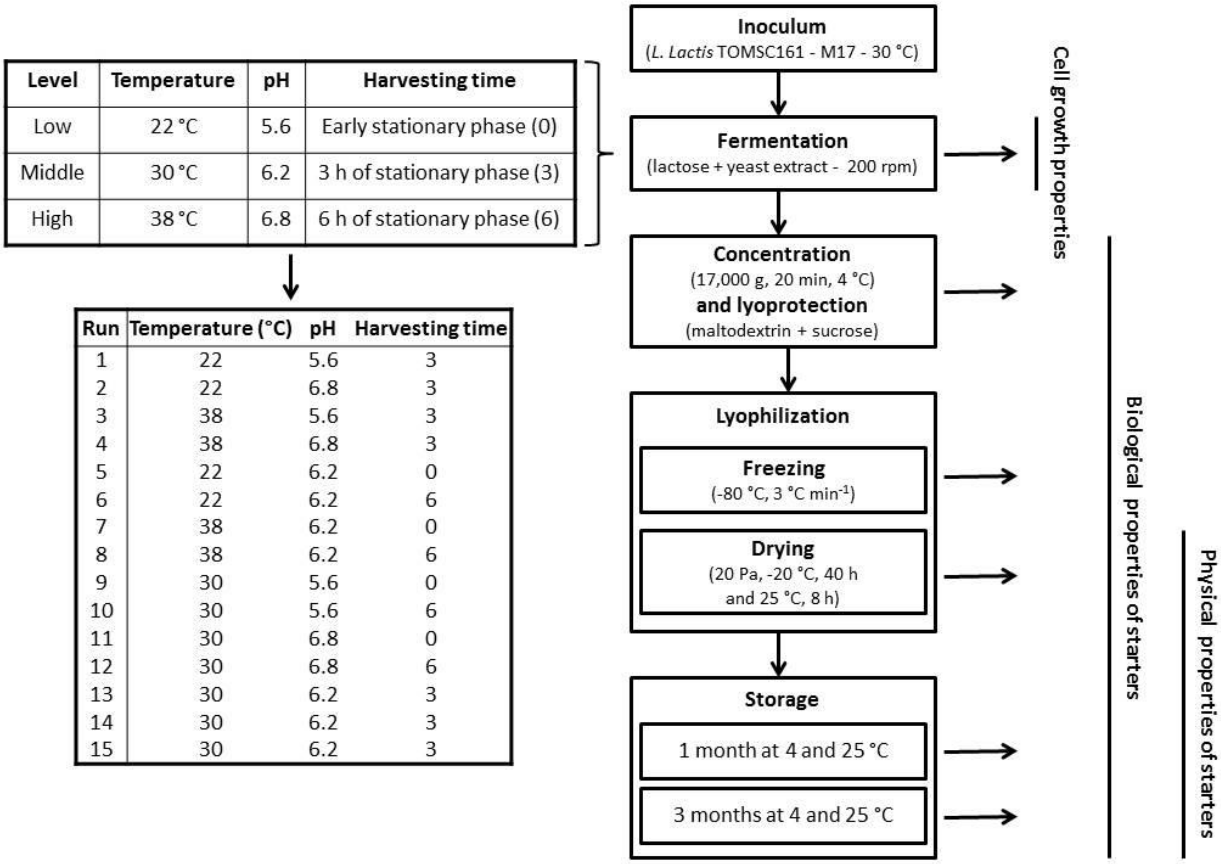


Figure 1 Diagram of the experimental approach applied for quantifying the effect of fermentation conditions (temperature, pH and harvesting time) on the resistance of *Lactococcus lactis* TOMSC161 to the main steps of the preservation process (freezing, drying and storage)

Lyophilized starter production process

Strain and inoculum preparation

Lactococcus lactis subsp. *lactis* TOMSC161 (Savoîcime, France), a natural cheese isolate, was studied because of its sensitivity to freeze-drying. Frozen cells were stored at -80°C in M17 medium (Biokar Diagnostics; Beauvais, France) supplemented with 15% (v/v) glycerol (VWR; Leuven, Belgium). One milliliter of frozen aliquot was precultured in 100 ml of M17 medium at 30°C for 4.5 hours before inoculation in the bioreactor.

Fermentation

The culture medium was composed of 60 g l^{-1} lactose (VWR; Leuven, Belgium) and 15 g l^{-1} yeast extract (BD; Sparks, MD, USA). After adjusting the pH at 6.8 with a 30% KOH solution, the medium was introduced into a 5-l working volume bioreactor (Biostat® A plus, Sartorius-Stedim; Aubagne, France) and sterilized at 120°C for 20 min. The inoculation was done at a low initial concentration of approximately 100 CFU ml^{-1}. An agitation speed of 200 rpm was applied to permit homogenization. Temperature and pH were set at different values that depended on the experimental design (Fig. 1). The pH was controlled by the automatic addition of 15 mol l^{-1} KOH solution (Merck; Darmstadt, Germany) in the bioreactor. The weight of the KOH solution was monitored throughout fermentation, and the consumption rate (dm/dt, in g min^{-1}) was calculated with WCidus software (INRA, Thiverval-Grignon, France). The culture was stopped at three different times of the stationary phase (Fig. 1). The base consumption rate was used to determine the beginning of the stationary phase fixed to 1.5 hours after the maximum acidification rate was reached.

Concentration and lyoprotection

Cells were harvested at different times depending on the experimental design, and concentrated 10 times by centrifugation (Avanti® J-E centrifuge, Beckman Coulter; Fullerton, CA, USA) at 17,000 g for 20 min at 4°C. Concentrated cells were re-suspended in protective medium at a ratio of 1:2 (1 g of concentrated cells for 2 g of protective medium) prior to freeze-drying. The protective solution was composed of 60 g l^{-1} sucrose (VWR; Leuven, Belgium), 140 g l^{-1} maltodextrin (dextrose equivalent = 6; M = 3,000 g mol^{-1}) (Glucidex 6D, Roquette; Lestrem, France) and 9 g l^{-1} NaCl and was sterilized at 110°C for 20 min. The lyoprotected cell suspension was distributed in 5-ml vials (Verretubex; Nogent-Le-Roi, France) with a volume of 1 ml prior to freezing.

Freeze drying and storage

The samples were frozen at -80°C (freezing rate of 3°C min^{-1}) in a cold air chamber and then transferred to a pre-cooled shelf at -50°C in a prototype pilot freeze-dryer built by Telstar (Terrassa, Spain). After a holding step of 2 h at -50°C, the chamber pressure was decreased to 20 Pa and the shelf temperature was increased from -50°C to -20°C at a heating rate of 0.25°C min^{-1} to initiate the sublimation step. After 40 h of sublimation, the shelf temperature was increased to 25°C at a heating rate of 0.25°C min^{-1} to initiate the secondary drying step. After 8 h of desorption, the vacuum was broken by injecting air and the vials were capped. Finally, freeze-dried samples were packed under vacuum in aluminum bags and stored at 4°C and 25°C for 3 months to evaluate the stability of starters.

Experimental design

A standard response surface methodology known as the Box-Behnken design (Box and Behnken 1960) was performed to investigate the linear, interaction and quadratic effects of multiple fermentation parameters (temperature, pH and harvesting time) on cell growth and on freeze-drying and storage resistance. Each independent variable was coded at three levels between -1, 0 and +1, corresponding to the low, middle and high level, respectively. The experimental ranges of the three independent variables were set to 22, 30 and 38°C for the temperature, 5.6, 6.2 and 6.8 for the pH, and early stationary phase, 3 and 6 hours of stationary phase for the harvesting time. In the case of temperature and pH, the middle level was determined according to the literature on optimal temperature and pH conditions for *L. lactis* growth (Hofvendahl *et al.* 1999; Adamberg *et al.* 2003). Low and high levels were chosen to create stressful conditions for *L. lactis* cells, but were still compatible with acceptable growth. Finally, the harvesting time had to be performed in the stationary phase in order to have maximum biomass. The low level corresponded to the early stationary phase and the high level was chosen to avoid carbon (lactose) starvation in the fermentation medium. This experimental design thus involved a three-factor-three-level pattern with 15 design points (13 combinations and three replications of the center point), and the entire design was carried out in random order.

Cell growth properties

Growth kinetics measurement

Cell growth was monitored by measuring the optical density every hour at 650 nm (OD_{650}) in a DU® 640B spectrophotometer (Beckman Coulter; Fullerton, CA, USA). The specific growth rate (μ_{max} in h^{-1}) was calculated according to the following equation (Equation 1):

$$\mu_{max} = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1} \qquad (1)$$

where N is the cell density (OD_{650}) and t is time in hour.

Biomass measurement

Cell dry weight (X_{max}) was determined by filtering 10 ml of culture sample through nitrocellulose filters (pore size: 0.22 µm) and drying the filters at 80°C for 24 h. The results are given as dry weight per volume of culture medium (g l^{-1}). The cell dry weight was measured at the early stationary phase in triplicate.

Substrate and metabolite analysis

Lactose, glucose, galactose, lactic acid, succinic acid, acetic acid and ethanol were quantified using high performance liquid chromatography (HPLC, Waters Associates, Millipore; Molshein, France) following the experimental procedure previously described by Rault *et al.* (2008). All quantifications were performed at least in triplicate. The substrate and metabolite concentrations were measured at the beginning of the fermentation, at the early stationary phase and at the harvesting time as well.

Biological and physical properties of starters

Cultivability measurement

The bacterial cell concentration was determined using the agar plate count method. The frozen cells were thawed for 15 min at room temperature. The freeze-dried cells were rehydrated in 1 ml of saline water (NaCl, 9 g l^{-1}) and stirred for 5 min at room temperature. Cell suspensions were serially diluted in saline water, plated into M17 agar (Biokar Diagnostics) and incubated at 30°C for 48 h in anaerobiosis. The cell count was expressed in CFU ml^{-1} and the measurements were performed in triplicate. The cultivability was measured after concentration and lyoprotection, freezing, drying and after 1 and 3 months of storage at 4°C and 25°C.

The determination of the cultivability loss after each step of the process was calculated using the following equation (Equation 2):

$$\mathrm{dlog(CFU)_{i+1}} = \mathrm{log(CFU)_i} - \mathrm{log\ CFU_{i+1}} \qquad (2)$$

where i and i+1 are two successive steps of the process.

Acidification activity measurement

The Cinac system (AMS; Frépillon, France) was used to measure acidification activity of bacterial suspensions (Spinnler and Corrieu 1989). Acidification was measured in triplicate at 30 °C using reconstituted skim milk with 100 g l^{-1} skim milk powder (EPI Ingredients, Ancenis, France), heat treated at 110°C for 15 min in 120-ml flasks and stored at 4°C before use. The flasks were inoculated with 500 µl of bacterial suspensions. The inoculated milk pH was continuously measured by the Cinac system and led to the determination of the time necessary to obtain a decrease of 0.7 pH units (tpH0.7, in min). The descriptor tpH0.7 was thus used to characterize the acidification activity of bacterial suspensions. The higher the tpH0.7 value was, the longer the latency phase was and the lower the acidification activity was. The acidification activity was measured after concentration and lyoprotection, freezing, drying and after 1 and 3 months of storage at 4°C and 25°C.

As a result, the acidification activity loss was calculated as follows (Equation 3):

$$\mathrm{dtpH0.7_{i+1}} = \mathrm{tpH0.7_{i+1}} - \mathrm{tpH0.7_i} \qquad (3)$$

where i and i+1 are two successive steps of the process.

An increase in the dtpH0.7 value corresponds to an increased loss of acidification activity during the process step considered.

Water activity and water content measurement

The moisture content of the samples was measured after freeze-drying and after 1 and 3 months storage by the Karl Fisher titration method using a Metrohom KF 756 apparatus (Herisau, Switzerland). At least 20 mg of powder were mixed with 2 ml of dry methanol and titrated with Riedel-deHaen reagent (Seelze, Germany) until the end point was reached.

The water activity of the samples was measured after freeze-drying by using a LabMasteraw a_w-meter (Novasina, Precisa, Poissy, France). Three freeze-dried samples were pooled and water activity was measured at 25°C. The instrument was calibrated with saturated pure salt solutions (a_w: 0.04, 0.06 and 0.11) (SAL-T, Novasina).

Statistical analysis

Multiple regression analyses were performed to examine the experimental data obtained by the Box-Behnken design and to quantify the effect of the independent variables (fermentation conditions) on the responses (cell growth and freeze-drying and storage resistance) using Statgraphics® Plus 3.0 (Statistical Graphics Corp., Rockville, USA). A second-order polynomial model was generated using least square method to represent each response variable (μ_{max}, X_{max}, $dlog(CFU)_{i+1}$, $dtpH0.7_{i+1}$).

The 15 runs of the complete Box-Behnken design were used to represent the cultivability loss and the acidification activity loss during one step ($dlog(CFU)_{i+1}$, $dtpH0.7_{i+1}$) as a function of fermentation temperature, fermentation pH and harvesting time using the following equation (Equation 4):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (4)$$

where Y is the response (cultivability loss or acidification activity loss during one process step), X_1, X_2 and X_3 are uncoded independent variables (fermentation temperature and pH and harvesting time), and β_0, β_1, β_2, β_3, β_{11}, β_{22}, β_{33}, β_{12}, β_{13} and β_{23} are intercept, linear, quadratic and interaction constant coefficients, respectively.

Concerning the cell growth properties (specific growth rate and final biomass concentration), only the fermentation temperature and the fermentation pH were included in the model with the following equation (Equation 5):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (5)$$

where Y is the response (specific growth rate and final biomass concentration), X_1 and X_2 are uncoded independent variables (fermentation temperature and pH) and β_0, β_1, β_2, β_{11}, β_{22} and β_{12} are intercept, linear, quadratic and interaction constant coefficients, respectively.

ANOVA tables were also generated to evaluate the significance of each independent variable. A significance level of 5% (p-value lower than 0.05) was considered.
The adequacy of the models developed was tested by calculating the coefficient of determination which is a measure of the percentage of the total variation explained by the model.
To visualize the relationships between the responses and variables, response surface plots were generated from the fitted quadratic polynomial equations (Equations 4 and 5) obtained.
Finally, a numerical optimization technique was applied to determine the optimal fermentation conditions for the various responses involved in the freeze-dried starter production using Matlab® R2010b software (MathWorks; Natick, MA, USA).

Results

Effect of fermentation conditions (temperature and pH) on bacterial growth

Firstly, the substrate and metabolite concentrations were analyzed at the early stationary phase and at the harvesting time for all the studied fermentation conditions. Growth of *L. lactis* TOMSC161 at different temperatures and pH resulted in the same end product formation, namely lactate. This indicates that this strain used only the homolactic pathway within the studied conditions. Moreover, regardless of the fermentation conditions applied, the media always contained residual lactose (> 1 g l^{-1}), thus confirming that the beginning of stationary phase was not due to carbon starvation.
Secondly, the bacterial growth was examined for all the studied fermentation conditions. The results of the multiple regression analyses are summarized in Table 2. They enable to quantify the linear, interactive and quadratic effects of the independent variables (fermentation temperature and pH) on the cell growth responses: specific growth rate (μ_{max}) and final biomass concentration (X_{max}). The coefficients (β) of Equation 5 as well as the p-value of each variable of the models for both responses are presented. It should be noted that the models explain more than 92% of the variability in the response variables according to the coefficients of determination (R^2) of the multiple regressions, thus indicating that the models accurately represent the specific growth rate and the final biomass concentration. Figure 2 shows the three dimensional representation of the quadratic models within the experimental domain, and enables the visualization of both the response surfaces of μ_{max} (Fig. 2a) and X_{max} (Fig. 2b) and the conjugated effect of fermentation temperature and pH.

Table 2 Regression analysis for the specific growth rate and the final biomass concentration (X_1: fermentation temperature; X_2: fermentation pH) (Equation 5)

Term	Estimated coefficient (β)	F-ratio	P-value
Specific growth rate (Y)			
X_1	0.219115	25.70	0.0039
X_2	3.64502	1.07	0.3491
X_1^2	-0.00196615	41.22	0.0014
X_2^2	-0.259259	22.68	0.0120
X_1X_2	-0.0151042	14.82	0.0051
R^2 = 95.42%			
Standard error = 0.019 h^{-1}			
Final biomass concentration (Y)			
X_1	0.81901	5.04	0.0748
X_2	26.7373	38.58	0.0016
X_1^2	-0.0203776	13.69	0.014
X_2^2	-2.09491	4.58	0.0854
X_1X_2	0.0572917	0.66	0.4537
R^2 = 92.62%			
Standard error = 0.68 g l^{-1}			

The specific growth rate (μ_{max}) was influenced by the linear effect of temperature, the quadratic effect of temperature and pH and the interactive effect of temperature and pH (p-value < 0.05) (Table 2). The surface response of the specific growth rate (Fig. 2a) displayed a bell shape form with a maximal value of 0.49 h^{-1} for values of temperature and pH of 32°C and 6.1, respectively. Minimal values of 0.15 and 0.24 h^{-1} were obtained for low values of temperature (22°C) and pH (5.6) and high values of temperature (38°C) and pH (6.8), respectively. The interaction between temperature and pH was clearly visible in Fig. 2a when considering extreme fermentation conditions. At low temperature (22°C) and low pH (pH < 6.2), the specific growth rate sharply increased with pH (from 0.15 to 0.30 h^{-1}, from pH 5.6 to pH 6.2). Conversely, the specific growth rate sharply decreased with pH (from 0.42 to 0.24 h^{-1}) at high temperature (38°C) and high pH (pH varying from 6.2 to 6.8).

The final biomass concentration (X_{max}) was influenced by linear effect of pH and quadratic effect of temperature (p-value < 0.05). Increasing pH also increased the final biomass concentration (Fig. 2b). For example, at 30°C, increasing the pH from 5.6 to 6.8 increased the final biomass by 44% (from 6.8 to 9.8 g l^{-1}). The model predicted an optimal value of final biomass concentration of 9.8 g l^{-1} at 29°C and a pH value of 6.8.

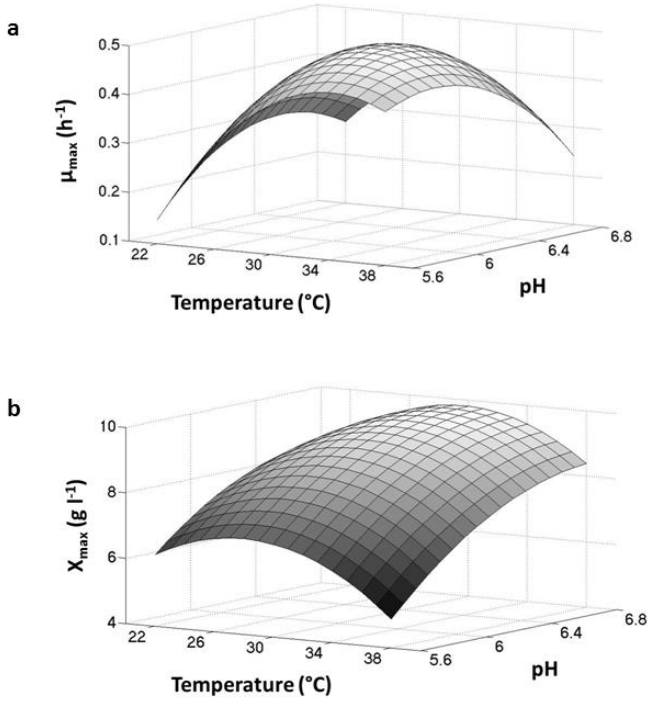


Figure 2 Response surface representations of the effect of fermentation temperature and pH on the specific growth rate (μ_{max}, in h^{-1}) (a) and on the final biomass concentration (X_{max}, in g l^{-1}) (b)

Quantification of the cultivability and acidification activity losses after each step of the freeze-drying process and storage

The cultivability and the acidification activity of the bacteria were determined after each step of the preservation process: (1) after concentration and lyoprotection (initial values); (2) after freezing; (3) after drying (sublimation and desorption); and (4) after 1 and 3 months of storage at 4 °C and 25 °C. Regardless of the fermentation conditions applied (pH, temperature, harvesting time), the concentrated and lyoprotected samples presented the same cultivability ($1.5\ 10^{11} \pm 0.3\ 10^{11}$ CFU ml^{-1}) and acidification activity (400 ± 24 min) before freeze-drying. In Figure 3, the losses of cultivability (Fig. 3a) and acidification activity (Fig. 3b) are displayed after each step of the process. For the sake of clarity, only the data concerning the center point of the Box-Behnken design (runs 13, 14, 15; Fig. 1) were plotted. The same tendencies were observed, regardless of the fermentation conditions applied.
No significant losses of cultivability were observed after freezing, drying and storage at 4°C. In contrast high losses of cultivability were measured after 1 and 3 months of storage at 25°C with loss values of 1.21 ± 0.3 log and 2.43 ± 0.31 log, respectively. A total cultivability loss of 2.75 ± 0.25 log was observed after freeze-drying and 3 months of storage at 25°C.

Acidification activity is an important technological property for industrial application. Low losses of acidification activity were observed after freezing and storage at 4°C. However, significant loss was measured after the drying step with an increase of 112 ± 5 min of the tpH0.7 (*i.e.*, a 30% increase of the tpH0.7 value obtained before freeze-drying). As expected, storage at 25°C resulted in high losses of acidification activity with an increase of 208 ± 17 min and 379 ± 17 min of the tpH0.7 after 1 and 3 months of storage, respectively. The freeze-drying process followed by 3 months of storage at 25°C induced a total loss of acidification activity of 499 ± 6 min (*i.e.*, a 125% increase of the tpH0.7 value obtained before freeze-drying).

Water content and water activity of the freeze-dried starters were identical regardless of the fermentation conditions applied: 0.43 ± 0.05% and 0.024 ± 0.003, respectively. No modification of the water content was observed during storage at 4 and 25°C.

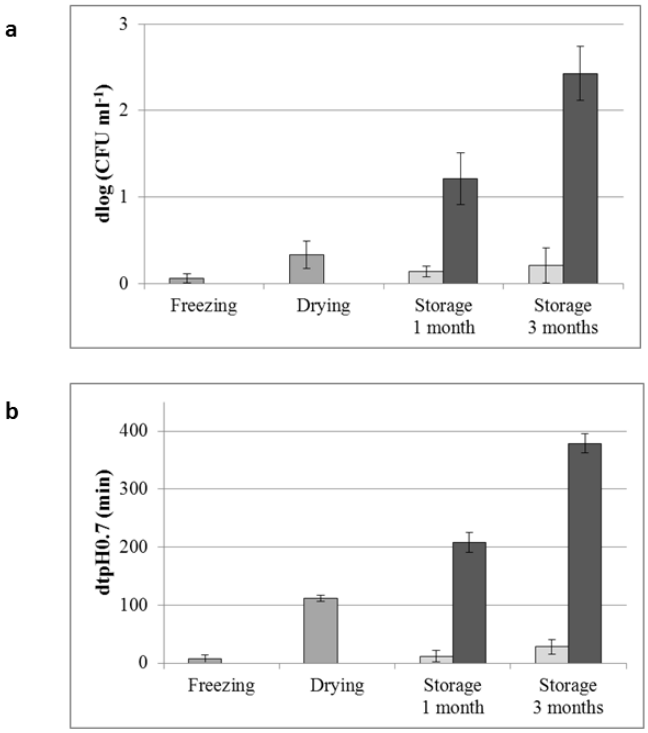


Figure 3 Means of cultivability (a) and acidification activity (b) losses after freezing, drying and after 1 and 3 months of storage at 4 °C (▫) and 25°C (■) for a growth at 30 °C and pH 6.2 and a harvest at 3 hours of stationary phase

Effect of fermentation conditions (temperature, pH and harvesting time) on cultivability and acidification activity losses throughout the starter freeze-drying process

Multiple regression analyses were applied to the 15 runs of the Box-Behnken design to evaluate the linear, quadratic and interactive effects of the fermentation conditions (temperature, pH and harvesting time) on the loss of cultivability and acidification activity ($dlog(CFU)_{i+1}$ and $dtpH0.7_{i+1}$) after each step of the preservation process. Only the acidification activity loss after the drying step was significantly influenced by the culture conditions.

The results of the regression analysis concerning the acidification activity loss during the drying step are summarized in Table 3. The coefficients of Equation 4 are shown in Table 3 and used to plot the corresponding three-dimensional surface responses for the three harvesting times studied (early stationary phase in Fig. 4a; 3 hours of stationary phase in Fig. 4b; 6 hours of stationary phase in Fig. 4c). The high value of R^2 (0.85) indicated that the second order polynomial equation is capable of representing quite well the loss of acidification activity during drying under the given experimental domain. The loss of acidification activity during drying was significantly influenced by temperature and harvesting time (linear effect) (p-value < 0.05).

Table 3 Regression analysis for the acidification activity loss during drying (X_1: fermentation temperature; X_2: fermentation pH; X_3: harvesting time) (Equation 4)

Term	Estimated coefficient (β)	F-ratio	P-value
X_1	-35.6432	10.14	0.0244
X_2	-219.271	0.05	0.8306
X_3	-32.2292	8.75	0.0316
X_1^2	0.326172	2.56	0.1708
X_2^2	13.5417	0.14	0.7242
X_3^2	-2.45833	2.87	0.151
X_1X_2	1.61458	0.38	0.5638
X_1X_3	0.84375	2.6	0.1675
X_2X_3	2.08333	0.09	0.7771
R^2 = 84.87%			
Standard error = 25 min			

The response surfaces are different according to the harvesting time and present an inverted bell shape surface only for a harvest at 6 hours of stationary phase. Increasing the harvesting time resulted in decreasing the loss of acidification activity during drying. For example, increasing the harvesting time from the early stationary phase to 6 hours of stationary phase resulted in a decrease of acidification

activity loss during drying of 50% (from 185 min to 92 min) for a fermentation at 22°C and pH 6.2. The linear effect of fermentation temperature indicates that increasing temperature values were related to reduce losses of acidification activity. However, even if no significant interaction was observed between factors, temperature effect appeared dependent on harvesting time (Fig. 4). For a harvest at early stationary phase and at 3 hours of stationary phase, increasing the temperature also resulted in a decrease in the loss of acidification activity during drying. For example, increasing the temperature from 22 to 38°C resulted in a decrease of acidification activity loss during drying of 52% (from 185 to 88 min) for a fermentation at pH 6.2 and a harvest at the early stationary phase (Fig. 4a). Consequently, high fermentation temperatures (38°C) were the optimal conditions found for a harvest at early stationary phase and at 3 hours of stationary phase. However this linear effect of temperature decreased with increasing harvesting time (Fig. 4b) and changed the optimal fermentation temperature at late stationary phase (6 hours) thus identified by numerical optimization at 32°C (Fig. 4c). Since the fermentation pH did not influence freeze-drying resistance, pH has to be chosen in order to optimize growth parameters. Since low pH (5.6) induced low final biomass concentration and high pH (6.8) led to low specific growth rate, optimal fermentation pH was fixed at 6.2. Fermentation at 32°C, pH 6.2 and a harvest at 6 h of stationary phase therefore made it possible to optimize both the growth parameters and the freeze-drying resistance of *L. lactis* TOMSC161.

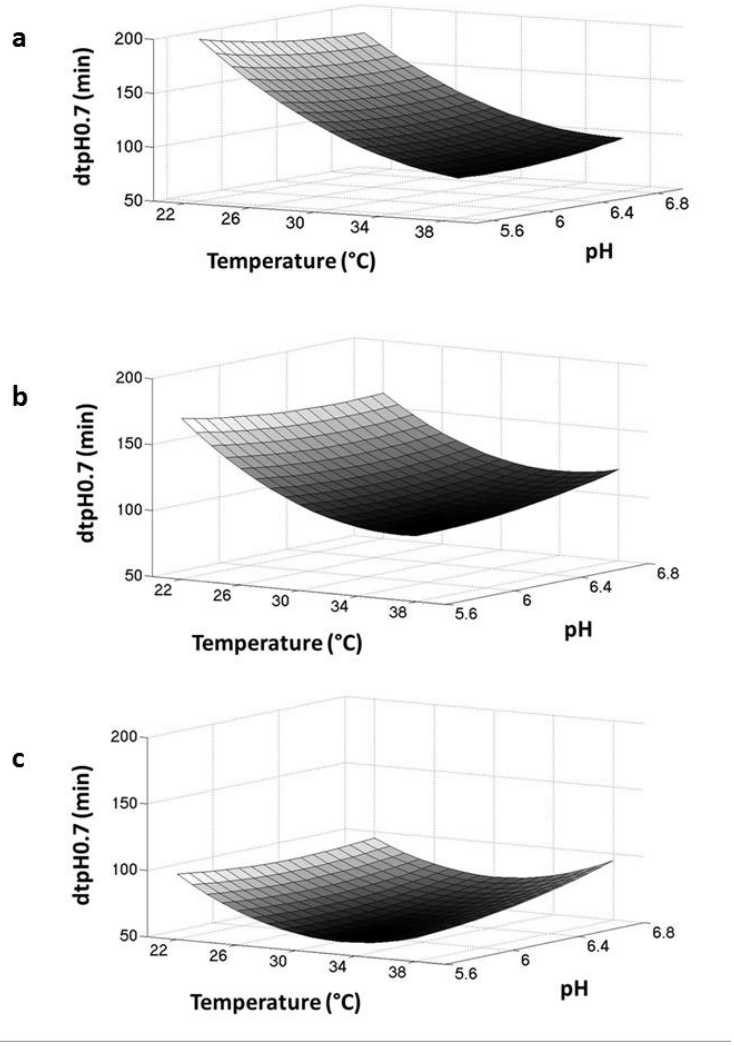


Figure 4 Response surface representation of the effect of fermentation temperature and pH and harvesting time on the acidification activity loss during drying (dtpH0.7) at (a) early stationary phase, (b) 3 hours of stationary phase and (c) 6 hours of stationary phase

To confirm the relevance of the predicted optimized conditions, three experiments were carried out close to the predicted optimized conditions and results were compared to predicted values of the responses using the model Equations 4 and 5. The complementary experiments were therefore conducted at 30°C, pH 6.2 and harvested after 6 hours of stationary phase. When the bacterial cells of *L. lactis* TOMSC161 were produced and lyophilized in these conditions, the specific growth rate, the biomass concentration and the acidification activity loss during dehydration were 0.47 ± 0.01 h^{-1}, 9.6 ± 0.1 g l^{-1} and 71 ± 15 min, respectively. The corresponding predicted values were 0.49 h^{-1}, 9.8 g l^{-1} and 60 min, respectively. Predicted and experimental values were very close, thus confirming the optimized conditions and the relevance of the models proposed.

Discussion

Industrial starter production practices currently focus on the optimization of biomass and activity at the end of fermentation and on the addition of protective molecules to limit degradation during the freeze-drying process and storage. This approach remains empirical and the fermentation parameters are rarely established to maximize the bacterial activity recovery after freeze-drying. However, optimizing the biomass concentration after the fermentation step often resulted in a decrease of the bacterial activity after the freeze-drying step. The objective of this work was thus to better investigate the relationships between the fermentation conditions (temperature, pH and harvesting time), the biomass concentration and the bacterial resistance to the freeze-drying process. It should be emphasized that conditions close to those found in industry were chosen in terms of composition of the fermentation medium and of the nature of the protective molecules added before freeze-drying. Moreover, to the best of our knowledge, this is the first study to investigate the influence of three fermentation conditions on cell growth and on LAB resistance to each step of the production of freeze-dried cells.

Optimal fermentation conditions led to growth kinetics close to those previously reported for other strains of *L. lactis* (Hofvendahl *et al.* 1999). Specific growth rates were similar for *L. lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 cultivated in rich medium (0.62 h^{-1}) and for *L. lactis* ssp. *lactis* TOMSC161 in simple medium close to industrial conditions (0.49 h^{-1}). Fermentation pH strongly influenced the final biomass concentration whereas the loss of acidification activity during freeze-drying was influenced by the fermentation temperature and the harvesting time. Increasing the harvesting time from the early to the late stationary phase did not damage the initial quality of the starter (*i.e.*, final biomass concentration after fermentation, cultivability and acidification activity before freeze-drying) but had a strong impact on reducing the loss of acidification activity during freeze-drying. After 6 hours of stationary phase, the lower acidification activity loss was obtained at 32°C and corresponded to the optimal temperature for bacterial growth within the experimental domain. Similarly, increasing the fermentation temperature decreased the loss of acidification activity during drying but only for a harvest at the early stationary phase and at 3 hours of stationary phase. The positive impact of increasing harvesting time, increasing fermentation temperature or applying a heat shock after fermentation on the freeze-drying resistance of lactic acid bacteria was reported by several authors (Broadbent and Lin 1999; Schwab *et al.* 2007; Schoug *et al.* 2008; Hua *et al.* 2009). These effects may result from physiological changes induced in the bacteria. It was largely reported that modifying fermentation conditions changes physiological responses at the membrane and cytosolic levels and demonstrated that there were correlations between membrane lipid composition of bacteria and their freeze-drying tolerance (Schoug *et al.* 2008; Hua *et al.* 2009; Li *et al.* 2009). In our study, no effect of pH was observed on the resistance of *L. lactis* to freeze-drying and storage. This result differs from

some literature reporting that cells grown under acidic conditions improved the freeze-drying survival (Palmfeldt and Hahn-Hagerdal 2000; Hua *et al.* 2009). For example, Palmfeldt *et al.* (2000) observed that *Lactobacillus reuteri* cells grown at pH 5 yielded a higher freeze-drying survival rate than at pH 6. The different genus studied and protective solutions applied can explain these differences. The efficiency of the protective solution used in our study (mixture of sucrose and maltodextrin) could have indeed lowered or hidden the pH effect. However, in accordance with Palmfeldt work, low pH decreased the final biomass concentration and the specific growth rate of *L. lactis* TOMSC161. Consequently, optimum pH must come out from a compromise between biomass production and survival rate after freeze-drying and storage.

The strain *L. lactis* TOMSC161 did not appear to be sensitive to the freezing step but sensitive to the drying step of the freeze-drying process. Low losses of cultivability (< 0.6 log CFU ml^{-1}) were also previously reported for different strains of *L. lactis* (Broadbent and Lin 1999). The low sensitivity of cocci has been related to its small size and spherical shape resulting in high cell surface area to volume ratio, thus facilitating water efflux from cells during freezing (Mazur 1977; Fonseca *et al.* 2000). Besides, a cold adaptation during the concentration step (centrifugation at 4 °C) could also explain the great survival of *L. lactis* TOMSC161 to the freeze-drying, in accordance with previous work on *L. lactis* (Broadbent and Lin 1999).

Despite the addition of sucrose, an efficient protective molecule, significant loss of acidification activity was observed after rehydration. The removal of the unfrozen water during desorption with the breakage of the hydrogen bonds thus destabilized the biological membrane leading to cell damages. However better resistance to the freeze-drying process was observed compared to the results obtained by Broadbent and Lin (1999). The higher loss of cultivability could be ascribed to the fact that no protective molecule was added before freeze-drying.

This study highlighted drying and storage at 25°C as the two critical steps during preservation. Storage at 25°C appeared as the most important step inducing considerable cultivability and acidification activity losses. Many degradation reactions may occur during storage at high temperatures, including the Maillard reaction and oxidation. Furthermore, sugar crystallization could occur, thus leading to water release, increasing water activity (Jouppila *et al.* 1997), and cell destabilization (Passot *et al.* 2012). However, the high maltodextrin content of the protective solution and the low water content (0.43%) and water activity (0.024) values observed for all freeze-dried starters led to high glass transition temperature (> 100 °C). Consequently, the molecular mobility and the diffusion controlled degradation reactions were limited by embedding bacteria in a solid glassy matrix (Santivarangkna *et al.* 2011; Foerst *et al.* 2012; Tymczyszyn *et al.* 2012). In this case, the high loss of bacterial cultivability and activity during storage at 25 °C could not be explained by Maillard reaction or sugar crystallization but could be ascribed to oxidation reactions. The very low value of water activity of the

freeze-dried matrix would enhance the oxidation reaction, especially in the absence of an antioxidant in the protective medium (Rueckold *et al.* 2001).

This work proved that the Box-Behnken design was useful for optimizing industrial freeze-dried starter production and for improving our knowledge about the influence of fermentation conditions on cell resistance throughout the process with a reduced number of experimental runs. The Box-Behnken design is slightly more efficient for the quadratic model compared to the central composite design that has only 15 runs compared to the 27 runs required for the central composite design. Validation experiments indeed confirmed the success of the process optimization. The optimized fermentation conditions (32°C, pH 6.2 and harvest at 6 hours of stationary phase) made it possible to highly reduce acidification activity loss during freeze-drying and to eliminate cellular and acidification activity loss during storage at refrigerated temperature. *L. lactis* TOMSC161 is therefore robust enough for industrial processing. In a future study, an integrative approach combining membrane fluidity and fatty acid composition measurements, proteomic and transcriptomic methods in extreme conditions in terms of freeze-drying resistance will lead to a better understanding of the cell mechanisms responsible for bacterial degradation during the critical stages of the process: drying and ambient temperature storage.

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (Paris, France). The authors thank Savoîcime for providing the reference strain. They authors also thank Professor Marc Danzart (AgroParisTech, Paris, France) for his support and expertise in statistics.

Conflict of interest

No conflict of interest declared

References

Adamberg, K., Kask, S., Laht, T.M. and Paalme, T. (2003) The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *Int J Food Microbiol* **85**, 171-183.

Ampatzoglou, A., Schurr, B., Deepika, G., Baipong, S. and Charalampopoulos, D. (2010) Influence of fermentation on the acid tolerance and freeze drying survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Biochem Eng J* **52**, 65-70.

Box, G.E.P. and Behnken, D.W. (1960) Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics* **2**, 455-475.

Broadbent, J.R. and Lin, C. (1999) Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization. *Cryobiology* **39**, 88-102.

Carcoba, R. and Rodriguez, A. (2000) Influence of cryoprotectants on the viability and acidifying activity of frozen and freeze-dried cells of the novel starter strain *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CECT 5180. *Eur Food Res Technol* **211**, 433-437.

Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X. and Gibbs, P. (2002) Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. *Biotechnol Lett* **24**, 1587-1591.

Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X. and Gibbs, P. (2003a) Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *J Appl Microbiol* **94**, 947-952.

Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X. and Gibbs, P. (2003b) Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. *Lait* **83**, 203-210.

Castro, H.P., Teixeira, P.M. and Kirby, R. (1997) Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze-drying. *J Appl Microbiol* **82**, 87-94.

Champagne, C.P., Gagnon, D., St-Gelais, D. and Vuillemard, J.C. (2009) Interactions between *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus* strains in Cheddar cheese processing conditions. *Int Dairy J* **19**, 669-674.

Foerst, P., Kulozik, U., Schmitt, M., Bauer, S. and Santivarangkna, C. (2012) Storage stability of vacuum-dried probiotic bacterium *Lactobacillus paracasei* F19. *Food Bioprod Process* **90**, 295-300.

Fonseca, F., Beal, C. and Corrieu, G. (2000) Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *J Dairy Res* **67**, 83-90.

Font de Valdez, G., Savoy de Giori, G., Ruiz Holgado, A.P.d. and Oliver, G. (1985) Rehydration conditions and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Cryobiology* **22**, 574-577.

Gutierrez-Mendez, N., Vallejo-Cordoba, B., Gonzalez-Cordova, A.F., Nevarez-Moorillon, G.V. and Rivera-Chavira, B. (2008) Evaluation of aroma generation of *Lactococcus lactis* with an electronic nose and sensory analysis. *J Dairy Sci* **91**, 49-57.

Higl, B., Kurtmann, L., Carlsen, C.U., Ratjen, J., Forst, P., Skibsted, L.H., Kulozik, U. and Risbo, J. (2007) Impact of water activity, temperature, and physical state on the storage stability of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* freeze-dried in a lactose matrix. *Biotechnol Progr* **23**, 794-800.

Hofvendahl, K., van Niel, E.W.J. and Hahn-Hagerdal, B. (1999) Effect of temperature and pH on growth and product formation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 growing on maltose. *Appl Microbiol Biot* **51**, 669-672.

Hua, L., Zhao, W.Y., Wang, H., Li, Z.C. and Wang, A.L. (2009) Influence of culture pH on freeze-drying viability of *Oenococcus oeni* and its relationship with fatty acid composition. *Food Bioprod Process* **87**, 56-61.

Jouppila, K., Kansikas, J. and Roos, Y.H. (1997) Glass transition, water plasticization, and lactose crystallization in skim milk powder. *J Dairy Sci* **80**, 3152-3160.

Kristo, E., Miao, Z.T. and Corredig, M. (2011) The role of exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in structure formation and recovery of acid milk gels. *Int Dairy J* **21**, 656-662.

Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H. and Crowe, L.M. (1995) Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microb* **61**, 3592-3597.

Li, C., Zhao, J.L., Wang, Y.T., Han, X. and Liu, N. (2009) Synthesis of cyclopropane fatty acid and its effect on freeze-drying survival of *Lactobacillus bulgaricus* L2 at different growth conditions. *World J Microb Biot* **25**, 1659-1665.

Mazur, P. (1977) Role of intracellular freezing in death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* **14**, 251-272.

Ozkalp, B., Ozden, B., Tuncer, Y., Sanlibaba, P. and Akcelik, M. (2007) Technological characterization of wild-type *Lactococcus lactis* strains isolated from raw milk and traditional fermented milk products in Turkey. *Lait* **87**, 521-534.

Palmfeldt, J. and Hahn-Hagerdal, B. (2000) Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. *Int J Food Microbiol* **55**, 235-238.

Passot, S., Cenard, S., Douania, I., Trelea, I.C. and Fonseca, F. (2012) Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria. *Food Chem* **132**, 1699-1705.

Rault, A., Bouix, M. and Beal, C. (2008) Dynamic analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 physiological characteristics during fermentation. *Appl Microbiol Biot* **81**, 559-570.

Ruckold, S., Grobecker, K.H. and Isengard, H.D. (2001) The effects of drying on biological matrices and the consequences for reference materials. *Food Control* **12**, 401-407.

Saarela, M., Virkajarvi, I., Alakomi, H.L., Mattila-Sandholm, T., Vaari, A., Suomalainen, T. and Matto, J. (2005) Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients. *J Appl Microbiol* **99**, 1330-1339.

Santivarangkna, C., Aschenbrenner, M., Kulozik, U. and Foerst, P. (2011) Role of glassy state on stabilities of freeze-dried probiotics. *J Food Sci* **76**, R152-R156.

Savini, M., Cecchini, C., Verdenelli, M.C., Silvi, S., Orpianesi, C. and Cresci, A. (2010) Pilot-scale production and viability analysis of freeze-dried probiotic bacteria using different protective agents. *Nutrients* **2**, 330-339.

Schoug, A., Fischer, J., Heipieper, H.J., Schnuerer, J. and Hakansson, S. (2008) Impact of fermentation pH and temperature on freeze-drying survival and membrane lipid composition of *Lactobacillus coryniformis* Si3. *J Ind Microbiol Biot* **35**, 175-181.

Schoug, A., Olsson, J., Carlfors, J., Schnurer, J. and Hakansson, S. (2006) Freeze-drying of *Lactobacillus coryniformis* Si3 - effects of sucrose concentration, cell density, and freezing rate on cell survival and thermophysical properties. *Cryobiology* **53**, 119-127.

Schwab, C., Vogel, R. and Ganzle, M.G. (2007) Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying. *Cryobiology* **55**, 108-114.

Siaterlis, A., Deepika, G. and Charalampopoulos, D. (2009) Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying. *Lett Appl Microbiol* **48**, 295-301.

Spinnler, H.E. and Corrieu, G. (1989) Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. *J Dairy Res* **56**, 755-764.

Trelea, I.C., Passot, S., Marin, M. and Fonseca, F. (2009) Model for heat and mass transfer in freeze-drying of pellets. *J Biomech Eng-T Asme* **131**.

Turchi, B., Van Tassell, M.L., Lee, A., Nuvoloni, R., Cerri, D. and Miller, M.J. (2013) Phenotypic and genetic diversity of wild *Lactococcus lactis* isolated from traditional Pecorino cheeses of Tuscany. *J Dairy Sci* **96**, 3558-3563.

Tymczyszyn, E.E., Sosa, N., Gerbino, E., Hugo, A., Gomez-Zavaglia, A. and Schebor, C. (2012) Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. *Int J Food Microbiol* **155**, 217-221.

Zhang, J., Du, G.C., Zhang, Y.P., Liao, X.Y., Wang, M., Li, Y. and Chen, J. (2010) Glutathione protects *Lactobacillus sanfranciscensis* against freeze-thawing, freeze-drying, and cold treatment. *Appl Environ Microb* **76**, 2989-2996.

Zhao, G.Q. and Zhang, G. (2009) Influence of freeze-drying conditions on survival of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Int J Food Microbiol* **135**, 64-67.

III.1.3. Conclusion

Premièrement, ce travail a permis de montrer que la souche *L. lactis* TOMSC161 n'a pas la même sensibilité à toutes les étapes du procédé de préservation. Alors que la congélation et le stockage à 4 °C dégradent peu les performances du ferment, les cellules ont montré une sensibilité accrue à l'étape de séchage et au stockage à 25 °C. La meilleure stabilité des ferments à de faibles températures de stockage était un résultat attendu. En revanche, il est intéressant de démontrer que le séchage se révèle être l'étape critique du procédé de lyophilisation de *L. lactis* TOMSC161.

Les différentes conditions appliquées lors de la fermentation (température entre 22 et 38 °C et pH entre 5,6 et 6,8) et les différents instants de récolte (de l'entrée en phase stationnaire et jusqu'à la phase stationnaire avancée) ont été à l'origine d'une modulation de la résistance des cellules au procédé de lyophilisation. Plus particulièrement, les résultats ont montré une influence significative de la température de fermentation et de l'instant de récolte sur la perte d'activité acidifiante au séchage de *L. lactis*, ce dernier descripteur étant un critère clé de performance des ferments lactiques. De plus, le plan d'expérience a eu pour intérêt de mettre en évidence une influence combinée entre la température de fermentation et l'instant de récolte.

A l'issue de cette étude, la meilleure tolérance de *L. lactis* TOMSC161 à la fois à la lyophilisation et au stockage a été obtenue pour une croissance à 30 °C, une récolte en phase stationnaire avancée et un stockage à 4 °C. Bien que l'étude sur la croissance apporte peu de connaissance en elle-même, celle-ci permet de remarquer qu'il est possible d'optimiser à la fois la croissance et les performances du ferment lyophilisé en récoltant les cellules tardivement en phase stationnaire.

En conclusion, ce travail a permis d'identifier les étapes critiques de ce procédé de préservation et les paramètres clés à maîtriser au moment de la fermentation et de la récolte pour produire une forte concentration de cellules viables et actives à l'issue de la lyophilisation en vue de l'obtention de ferments de haute qualité.

D'après la synthèse bibliographique présentée en introduction de ce travail, l'état physiologique des ferments lactiques varie en fonction des conditions de culture et de récolte des cellules et serait donc à l'origine des différences de résistance observées dans cette première étude. Un enjeu majeur est donc la compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la tolérance des bactéries à la lyophilisation. De nombreuses études portant sur l'impact de l'état physiologique des cellules bactériennes au moment de leur récolte sur leur résistance aux procédés de stabilisation (congélation, lyophilisation et séchage) ont ainsi été recensées dans la synthèse bibliographique. Plusieurs de ces études se sont plus particulièrement intéressées aux relations existant entre la

composition en acides gras membranaires et l'aptitude des cellules à tolérer les procédés de stabilisation. Ces travaux ont ainsi mis en évidence le rôle majeur de la membrane cellulaire sur l'aptitude des bactéries à tolérer ces procédés. Nos résultats montrent qu'une modification de la température de fermentation et de l'instant de récolte entrainent une variation de la résistance de *L. lactis* au séchage. Nous avons donc décidé de poursuivre les travaux en caractérisant finement la membrane de *L. lactis* TOMSC161 dans des conditions de culture et de récolte conduisant à des résistances différentes au séchage. Ce travail fera l'objet du deuxième chapitre.

III.2. Propriétés de la membrane cytoplasmique de *Lactococcus lactis* TOMSC161 et résistance à la lyophilisation et au stockage

III.2.1. Contexte et objectifs

Parmi les études qui se sont plus particulièrement intéressées aux relations existant entre les caractéristiques membranaires et l'aptitude des cellules à tolérer les procédés de stabilisation, la plupart se sont principalement appuyées sur des mesures de la composition en acides gras membranaires. Peu d'entre elles se sont intéressées aux propriétés physiques de la membrane cytoplasmique telles que la fluidité membranaire et la transition de phase des lipides, même si la plupart de ces études ont indiqué l'existence d'un lien entre la composition en acides gras et la fluidité membranaire. Il apparait donc primordial de caractériser plus finement les propriétés biochimiques et biophysiques de la membrane des bactéries afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans leur tolérance aux procédés de stabilisation.

C'est dans cette optique que nous nous sommes donc intéressés, dans cette deuxième partie, à une complète caractérisation de la membrane de *L. lactis* TOMSC161 au cours de la fermentation à deux températures différentes. Dans un objectif plus global d'amélioration de la qualité des ferments lyophilisés, cette étude a visé à étudier l'incidence de ces propriétés de la membrane au moment de la récolte sur la résistance à la lyophilisation et au stockage de *L. lactis* TOMSC161. Afin d'y parvenir, des mesures de composition en acides gras membranaires, de fluidité membranaire et de température de transition lipidique ont été réalisées. D'autre part, la lyo-tolérance a été évaluée à partir de mesures de viabilité et d'activité acidifiante spécifique.

Pour les mesures de fluidité membranaire, une méthode cytométrique a été préalablement mise au point au laboratoire sur des souches modèles. Une très bonne corrélation entre les résultats obtenus par cette méthode et ceux obtenus à partir de la méthode de référence par spectrofluorimétrie a été montrée. L'avantage de cette approche par cytométrie en flux est de réaliser les mesures sur chaque cellule individuellement ce qui permet éventuellement de différencier des sous-populations. Cette méthode a ensuite été adaptée à la souche *L. lactis* TOMSC161. La mise au point de cette méthodologie sera valorisée par une publication à laquelle je serai associée.

Enfin, l'étude sur le lien entre les propriétés de la membrane et la résistance de *L. lactis* TOMSC161 a fait l'objet d'une seconde publication soumise à Applied Microbiology and Biotechnology.

III.2.2. Publication N°2 : « Cyclopropanation of unsaturated fatty acids and membrane rigidification improve the freeze-drying resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 »

H. VELLY[1,2,3], M. BOUIX[3,2], S. PASSOT[3,2], C. PENICAUD[2,3], H. BEINSTEINER[2], S. GHORBAL[3,2] P. LIEBEN[2,3] and F. FONSECA[2,3*]

[1]CNIEL, 42 rue de Châteaudun, F-75314 Paris Cedex 09, France

[2]INRA, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA), 1 avenue Lucien Brétignières, F-78850 Thiverval-Grignon, France

[3]AgroParisTech, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA), 1 avenue Lucien Brétignières, F-78850 Thiverval-Grignon, France

*Corresponding author: F. Fonseca, Tel: +33 (0)1 30 81 59 40; Fax: +33 (0)1 30 81 55 97, E-mail address: fonseca@grignon.inra.fr

Abstract

This work aimed at characterizing the biochemical and biophysical properties of the membrane of *Lactococcus lactis* TOMSC161 cells during fermentation at different temperatures, in relation to their freeze-drying and storage resistance.

Cells were cultivated at two different temperatures (22 and 30 °C) and were harvested at different growth phases (from the middle exponential phase to the late stationary phase). Bacterial membranes were characterized by determining the fatty acid composition, the lipid phase transition and the membrane fluidity. Cultivability and acidification activity losses of *L. lactis* were quantified after freezing, drying and 3 months of storage. The direct measurement of membrane fluidity by fluorescence anisotropy was linked to lipid composition, and it was established that the cyclopropanation of unsaturated fatty acids with concomitant membrane rigidification during growth led to an increase in the freeze-drying and storage resistance of *L. lactis*. As expected, cultivating cells at a lower fermentation temperature than the optimum growth temperature induced a homeoviscous adaptation that was demonstrated by a lowered lipid phase transition temperature but that was not related to any improvement in freeze-drying resistance.

Lactococcus lactis TOMSC161 was therefore able to develop a combined biochemical and biophysical response at the membrane level during fermentation. The ratio of cyclic fatty acids to unsaturated fatty acids (CFA:UFA) appeared to be the most relevant parameter associated with membrane rigidification and cell resistance to freeze-drying and storage.

This study increased our knowledge about the physiological mechanisms that explain the resistance of LAB to freeze-drying and storage stresses and demonstrated the relevance of complementary methods of membrane characterization.

Keywords

Lactic acid bacteria, fermentation, fatty acid composition, fluorescence anisotropy, lipid phase transition, acidification activity, lyophilization

Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are of great importance to the food and dairy industries because of both their central role as starters for manufacturing a diversity of fermented products and their potential health benefit (Daly et al. 1998; Leroy and de Vuyst 2004).

Freeze-drying is widely used to provide ready to use highly concentrated starter cultures. This process makes it possible to minimize the degradation reactions and to maintain an adequate physical, chemical and biological stability of the product during long-term storage, even at ambient temperature (Franks 1998; Coulibaly et al. 2011). However, during this low temperature desiccation process, bacteria are exposed to several environmental stresses (thermal, osmotic, water removal and oxidative stresses), which could induce major cellular damages, leading to loss of viability and functional activities (acidification, production of aroma compounds and texturizing agents, etc.) (Coulibaly et al. 2010; Velly et al. 2014). Damages to cellular systems resulting from freeze-drying can be attributed to two major causes: changes in the physical state of cytoplasmic membrane lipids, resulting in a loss of bacterial membrane integrity (Crowe et al. 1989a; Linders et al. 1997; Schwab et al. 2007), and changes in the structure of sensitive proteins (Bischof et al. 2002; Oldenhof et al. 2005).

Extensive evidence has been reported on the correlation between active cell responses to environmental stresses and membrane fluidity (Beney and Gervais 2001; Chu-Ky et al. 2005; Wu et al. 2012). When cells are exposed to changes in culture conditions during fermentation (temperature, pH, pressure, oxygen, nutrients, ethanol), they modulate their membrane composition in order to maintain the lipid bilayer in the liquid crystalline lamellar phase and, more precisely, to maintain an optimal level of fluidity within the lipid bilayer (Johnsson et al. 1995; Drici-Cachon et al. 1996; Guillot et al. 2000; Teixeira et al. 2002; Gautier et al. 2013). This level of fluidity is in fact required to preserve cellular functions that take place at the membrane level (solute transport and diffusion, energy transduction, cellular growth and other metabolic functions). This phenomenon is known as homeoviscous adaptation (Sinensky 1974) and is associated with a modification of the membrane fatty acid composition of bacteria by several processes, including alterations in saturation degree, carbon chain length, branching position, cis/trans isomerization and cyclopropanation, in order to preserve

proper membrane physical properties (Keweloh and Heipieper 1996; Grogan and Cronan 1997; Zhang and Rock 2008).

During the freeze-drying process, bacterial cells are exposed to extreme stresses and are thus unable to modify their membrane properties in order to limit damages. One of the strategies to improve the freeze-drying resistance of bacteria is therefore to limit membrane damages by precisely controlling their physical state before they are stabilized, by modulating their fatty acid composition during the fermentation step. Membrane fatty acid composition of lactic acid bacteria, especially an increase in the cyclopropane fatty acid content, has been previously linked to an improvement of the cell's freeze-drying survival (Broadbent and Lin 1999; Schoug et al. 2008; Hua et al. 2009; Li et al. 2009; Zhao et al. 2009). In these studies, the authors hypothesize that a change in fatty acid composition results in a modification of membrane fluidity but, unfortunately, a complete and simultaneous characterization of membrane biophysical properties is still lacking.

In a previous study, we showed that the freeze-drying resistance of *L. lactis* TOMSC161 was significantly influenced by fermentation temperature and harvesting time (Velly et al. 2014). In this context, the aim of this study was to identify membrane biophysical properties that would make it possible to explain the ability of *L. lactis* TOMSC161 to better tolerate freeze-drying and storage after applying different fermentation temperatures and harvesting times. Fatty acid composition, membrane fluidity and lipid phase transition temperature of *L. lactis* cells were thus characterized at different growth phases and fermentation temperatures. In parallel, the freeze-drying and storage resistance of these starters was quantified after each step of the process by determining cultivability and acidification activity losses. Membrane physical properties were correlated to the freeze-drying and storage resistance of starters, thus allowing a better understanding of the key role of cytoplasmic membrane in freeze-drying and storage resistance of *L. lactis* TOMSC161.

Materials and methods

Lyophilized starter production

Strain and inoculum preparation

Lactococcus lactis subsp. *lactis* TOMSC161 (Savoîcime, France), a natural cheese isolate, was studied because of its sensitivity to freeze-drying. Frozen cells were stored at -80 °C in M17 medium (Biokar Diagnostics; Beauvais, France) supplemented with 15% (v/v) glycerol (VWR; Leuven, Belgium). One milliliter of frozen aliquot was precultured in 100 mL of M17 medium at 30 °C for 4.5 hours before inoculation in the bioreactor.

Fermentation

The culture medium was composed of 60 $g.L^{-1}$ lactose (VWR; Leuven, Belgium) and 15 $g.L^{-1}$ yeast extract (BD; Sparks, MD, USA). After adjusting the pH to 6.8 with a 30% KOH solution, the medium was introduced into a 5-L working volume bioreactor (Biostat® A plus, Sartorius-Stedim; Aubagne, France) and sterilized at 120 °C for 20 min. The inoculation was done at a low initial concentration of approximately 100 $CFU.mL^{-1}$. The fermentation was performed at 22 or 30 °C, pH 6.2, with an agitation speed of 200 rpm to permit homogenization. The pH was controlled by the automatic addition of 15 N KOH solution (Merck; Darmstadt, Germany) to the bioreactor.

Cell growth was monitored by measuring the optical density every hour at 650 nm (OD650) in a DU_ 640B spectrophotometer (Beckman Coulter).

The fermentations were repeated three times at each temperature.

Concentration and lyoprotection

Cells grown at 30 °C were harvested at four different growth phases corresponding to the middle (T1) and late (T2) exponential phases and the early (T3) and late (6 h) (T4) stationary phases, whereas two harvesting times, the early and late stationary phases (T3 and T4), were performed for fermentation at 22 °C (Fig. 1). The cell suspensions were then concentrated 10 times by centrifugation (Avanti® J-E centrifuge, Beckman Coulter; Fullerton, CA, USA) at 17,000 g for 20 min at 4 °C. Concentrated cells were re-suspended in protective medium at a ratio of 1:2 (1 g of concentrated cells for 2 g of sterile protective solution) prior to freeze-drying. The sterile protective solution was composed of 60 $g.L^{-1}$ sucrose (VWR; Leuven, Belgium), 140 $g.L^{-1}$ maltodextrin (dextrose equivalent = 6; M = 3,000 $g\ mol^{-1}$) (Glucidex 6D, Roquette; Lestrem, France), and 9 $g.L^{-1}$ NaCl. The lyoprotected cell suspensions were distributed in 5-mL vials (Verretubex; Nogent-Le-Roi, France) with a volume of 1 mL prior to freezing.

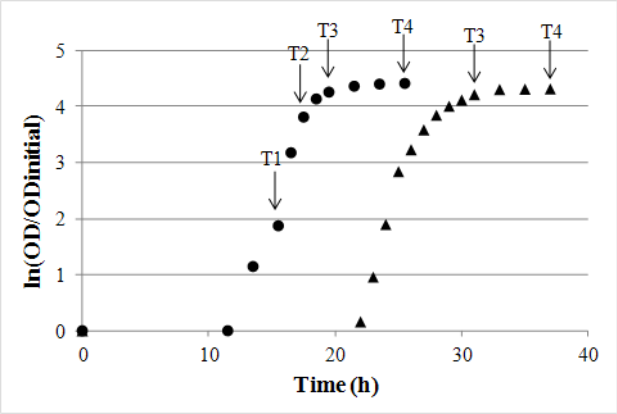


Fig. 1 Growth curves of *L. lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 at 30 °C (circles) and 22 °C (triangles) and indication of the different harvesting times (T1: middle exponential phase; T2: late exponential phase; T3: early stationary phase; and T4: late stationary phase).

Freeze drying and storage

The samples were frozen at -80 °C in a cold air chamber (freezing rate of 3 °C.min^{-1}) and then transferred to a pre-cooled shelf at -50 °C in a prototype pilot freeze-dryer built by Telstar (Terrassa, Spain). After a holding step of 2 h at -50 °C, the chamber pressure was decreased to 20 Pa and the shelf temperature was increased from -50 °C to -20 °C at a heating rate of 0.25 °C.min^{-1} to initiate sublimation. After 40 h of sublimation, the shelf temperature was increased to 25 °C at a heating rate of 0.25 °C.min^{-1} to initiate the secondary drying step. After 8 h of desorption, the vacuum was broken by injecting air and the vials were capped. Finally, freeze-dried samples were packed under vacuum in aluminum bags and stored at 25 °C for 3 months to evaluate the stability of starters.

Biological and physical properties of starters

Cultivability measurement

The bacterial cell concentration was determined using the agar plate count method. The frozen cells were thawed for 15 min at room temperature. The freeze-dried cells were rehydrated in 1 mL of saline water (NaCl 9 g.L^{-1}) and stirred for 5 min at room temperature. Cell suspension was serially diluted in saline water, plated onto M17 agar (Biokar Diagnostics) and incubated at 30 °C for 48 h in anaerobiosis. The cultivability was measured in triplicate after concentration and lyoprotection, after freezing, after drying and after 3 months of storage at 25 °C. The cell count was expressed in CFU.mL^{-1}.

The determination of the cultivability loss after each step of the process was calculated using the following equation (Equation 1):

$$\mathrm{dlog(CFU)_{i+1}} = \mathrm{log(CFU)_i} - \mathrm{log\ CFU_{i+1}} \qquad (1)$$

where i and i+1 are two successive steps of the process.

Specific acidification activity measurement

The Cinac system (AMS, Frépillon, France) was used to measure the acidification activity of bacterial suspension (Spinnler and Corrieu 1989). Acidification was measured in triplicate at 30 °C using reconstituted skim milk with 100 g.L^{1} skim milk powder (EPI Ingredients, Ancenis, France), heat-treated at 110 °C for 15 min in 120-mL flasks, and stored at 4 °C for 24 h before use. The flasks were inoculated with 500 µL of bacterial suspension. The inoculated milk pH was continuously measured by the Cinac system and led to the determination of the time necessary to obtain a decrease of 0.7 pH units (tpH0.7, in min). The descriptor tpH0.7 was used to characterize the acidification activity of bacterial suspensions. The higher the tpH0.7 value was, the longer the latency phase was and the lower the acidification activity was. Moreover, the specific acidification activity t_{spe} (in min.log(CFU.mL^{-1})$^{-1}$) was defined as the ratio of tpH0.7 to the corresponding log of the cell concentration (Equation 2)

(Streit et al. 2007). Consequently, the descriptor t_{spe} gives an accurate and meaningful measurement of the biological activity of LAB, including the physiological state and viability.

$$\mathrm{tspe} = \frac{\mathrm{tpH0.7}}{\log(\mathrm{CFU})} \qquad (2)$$

The specific acidification activity was measured after concentration and lyoprotection, freezing, drying and 3 months of storage at 25 °C.

As a result, the specific acidification activity loss was calculated as follows (Equation 3):

$$\mathrm{dtspe}_{i+1} = \mathrm{tspe}_{i+1} - \mathrm{tspe}_{i} \qquad (3)$$

where and i+1 are two successive steps of the process.

An increase in the dt_{spe} value corresponds to an increased loss of specific acidification activity during the process step considered.

Water activity measurement

The water activity of the samples was measured after freeze-drying using a LabMasteraw a_w-meter (Novasina, Precisa; Poissy, France). Three freeze-dried samples of the same biological replicate were pooled and water activity was measured at 25 °C. The instrument was calibrated with saturated pure salt solutions (aw: 0.04, 0.06 and 0.11) (SAL-T, Novasina).

Glass transition temperature measurement

Differential scanning calorimetry (DSC) was carried out using a power compensation DSC (Pyris 1, Perkin-Elmer LLC; Norwalk, CT, USA) equipped with a mechanical cooling system (Intracooler 1P, Perkin-Elmer). Temperature calibration was done using cyclohexane and indium (melting points at 6.5 °C and 156.6 °C, respectively). Approximately 15 mg of each freeze-dried sample were placed in 50-µL Perkin-Elmer DSC sealed aluminum pans, and an empty pan was used as a reference. Linear cooling and heating rates of 10 °C.min^{-1} were applied. The characteristic glass transition temperature (Tg) of the freeze-dried samples was determined as the midpoint temperature of the heat flow step associated with glass transition with respect to the ASTM Standard Method, E 1356-91. Results were obtained from at least three replicates.

Biochemical and biophysical properties of the bacterial membrane

Fatty acid (FA) composition

The membrane fatty acid composition of bacteria cells was determined using the method described by Rozes et al. (1993) with minor modifications. Extraction was performed on concentrated cells and was triplicated. Concentrated cells were washed twice in saline water at 4 °C. Methylation were performed at 4 °C by adding 1.5 mL of sodium methoxide (1 M in methanol) (Sigma-Aldrich; Saint-Louis, MO,

USA) to 0.15 g of concentrated cells and shaking for 1.5 min. Then, 100 µL of nonanoic acid methyl ester (0.4 $mg.mL^{-1}$ in hexane) (Sigma-Aldrich), the internal standard, were added to each sample. Subsequently, the resulting fatty acid methyl esters (FAMEs) were extracted with 900 µL of hexane. After decanting for 5 min, the upper phase was collected and evaporated to dryness in a vacuum centrifugal evaporator (RC10-22) coupled to a refrigerated trap (RCT 90, Jouan; Saint-Herblain, France) at 1,200 rpm. The FAMEs were then dissolved in 1 mL of hexane, and 100 µL were transferred in vials for GC-MS analysis.

The analysis of FAMEs was performed on a gas chromatograph (HP 6890; Hewlett-Packard; Avondale, PA, USA) coupled to a mass selective detector (Agilent 5973, Hewlett-Packard). The separation was carried out in a capillary column packed with 70% cyanopropylpolysilphenylene-siloxane BPX70 (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm; SGE Analytical Science Pty Ltd.; Victoria, Australia). The carrier gas was helium (constant flow of 1.2 $mL.min^{-1}$) and the initial column pressure was 1.3 x 10^5 Pa. Injection of 1 µL of extracts was done splitless at an injector temperature of 250 °C. The oven temperature was held for 1 min at 35 °C and then increased from 35 to 100 °C at 40 $°C.min^{-1}$, held for 1 min at 100 °C and then increased from 100 to 130 °C at 5 $°C.min^{-1}$, followed by an increase from 130 to 180 °C at 1.5 $°C.min^{-1}$ and, finally, from 180 to 240 °C at 5 $°C.min^{-1}$. A transfer line was set at 280 °C and the MSD source temperature was 230 °C. The FAMEs were first identified by comparison of their retention times with those of known standards (Sigma-Aldrich), and this identification of FAME was confirmed using the mass selective detector at a scan rate of 3.14 scans/s, with data collected in the range of 33 to 500 amu. The mass spectra of the FAMEs were compared with the Wiley 275.L data bank (Hewlett-Packard; Gaithersburg, MD, USA). The quantification of FA was calculated on target ions using external calibration performed with serial dilutions of commercial standards of methylated fatty acids (Sigma-Aldrich), with nonanoic acid methyl ester as the internal standard. Results were expressed as relative percentages of each fatty acid, 100% standing for the sum of the absolute concentrations of all the fatty acids in the sample.

The membrane fatty acid composition was determined before and after freeze-drying and after 3 months of storage at 25 °C.

Membrane lipid phase transition by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy

Infrared absorption measurements were carried out using a Nicolet Magna 750 FTIR spectrometer (Thermo Fisher Scientific; Madison, WI, USA) equipped with a narrow-band mercury/cadmium/telluride (MCT) infrared detector and a Specac variable temperature cell holder cooled by liquid nitrogen (Specac Ltd., Orpington, Kent, UK). The temperature of the sample was recorded separately using an extra thermocouple that was located close to the sample. The optical bench was continuously purged with dry air (Balston; Haverhill, MA, USA). The acquisition parameters were 4 cm^{-1} resolution, 32 co-added interferograms, and a 4,000 to 900 cm^{-1} wavenumber

range. Fresh bacterial pellet was washed twice in saline water. The washed bacterial pellet was then sandwiched between two CaF_2 windows. Samples were mounted onto the Specac cell holder. The temperature dependence of the FTIR spectra was studied by cooling the sample from 50 °C down to -50 °C at a rate of 2 °C.min^{-1} and then by heating the sample from – 50 °C to 80 °C at 2 °C.min^{-1}. Experiments were performed in triplicate. Spectral display and analysis were carried out using OMNIC software (Thermo Fisher Scientific; Madison, WI, USA).

According to Crowe et al. (1989b), membrane phase behavior was monitored by observing the position of the symmetric CH_2 stretching band at approximately 2,850 cm^{-1}. Spectra analysis (determination of peak location and lipid phase transition temperature (Tm)) were performed with ASpIR software (Infrared Spectra Acquisition and Processing, INRA; Grignon, France) according to the previously described protocol (Gautier et al. 2013).

Fluorescence anisotropy by flow cytometry

Membrane fluidity was evaluated on fresh cells by measuring the degree of polarization of the fluorescent probe 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH). This fluorescence probe has hydrophobic properties that allow the molecule to be inserted into the lipid membrane of the cells.

Before staining, cell suspension adjusted to 10^7 cells.mL^{-1} was washed twice with morpholineethanesulfonic acid (MES) buffer at pH 6.2 (Sigma-Aldrich; Saint-Louis, MO, USA) and resuspended in 2 mL of MES buffer. Then, 5 µL of DPH solution (6 mM in tetrahydrofuran) (Invitrogen-Molecular Probe; Eragny-sur-Oise, France) were added to 2 mL of the cell suspension to obtain a final DPH concentration of 30 µM. Cell suspension was vigorously stirred for 1 min, centrifuged and the pellet obtained was resuspended in 2 mL of the MES buffer and used immediately for fluorescence polarization measurements.

Fluorescence polarization was determined by using a flow cytometer (CyFlow Space, Partec; Sainte-Genevieve-des-Bois, France) equipped with a vertically polarized UV laser that emits at 375 nm, a half-wave retarder plate (rotating polarizer) to depolarize the excited light, if necessary, and parallel and perpendicular polarizers just prior to entering the two photomultiplier tubes (Fox and Delohery 1987).The measurement was performed at 20 °C with emission wavelengths at 455 nm.

The fluorescence anisotropy (r) was calculated according to the following equation (Equation 4):

$$r = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}} \qquad (4)$$

where $I_{//}$ and $I_{\perp}$ are the polarized light intensities emitted in the parallel and perpendicular directions with respect to the excitation beam of light, respectively.

For each condition, three samples were analyzed and three measurements per sample were performed.

Statistical analysis

The fermentations were repeated at least three times and data are presented as the mean ± standard error of these biological triplicates combined with the measurement replicates, as described above.
To link the bacterial membrane properties to freeze-drying and storage resistance, a Pearson's correlation coefficient test (XLSTAT software) was performed for all the fermentation conditions studied. This coefficient measures the strength of the linear relationship between two variables, giving a value between -1 and +1. The higher the absolute value of the correlation coefficient between two variables was, the stronger the linear relationship between the two variables was. The following variables were considered for this analysis: the unsaturated fatty acids-to-saturated fatty acids ratio (UFA:SFA); the cyclic fatty acids-to-unsaturated fatty acids ratio (CFA:UFA); the cyclic fatty acids-to-saturated fatty acids ratio (CFA:SFA); the fluorescence anisoptropy (r); the lipid phase transition temperature (Tm); and the cultivability and acidification activity losses after freeze-drying and storage (dlog(CFU) and dtspe, respectively). The significance of results was assessed at a 95% confidence level (p-value < 0.05).

Results

Influence of fermentation conditions (harvesting time and temperature) on cultivability and specific acidification activity losses following freeze-drying and storage

The loss of cultivability and specific acidification activity were quantified after each step of the preservation process: freezing, drying and 3 months of storage (Fig. 2).
Total cultivability and specific acidification activity losses ranged between 2.7 and 5.0 log ($CFU.mL^{-1}$) and between 70 and 163 $min.(\log(CFU.mL^{-1}))^{-1}$, respectively. Cell resistance was different according to the process step considered. Low degradation was observed after freezing, whereas drying induced considerable losses of cultivability and specific acidification activity (Fig. 2a). Cultivability and specific acidification activity losses caused by the drying step ranged between 0.3 and 0.6 log ($CFU.mL^{-1}$) and between 7 and 19 $min.(\log(CFU.mL^{-1}))^{-1}$, respectively. No significant differences in cultivability losses after the drying step were observed between the different studied conditions, whereas fermentation temperature and harvesting time highly impacted the specific acidification activity loss after the drying step. Harvesting at the late stationary phase (T4) led to the lowest specific acidification activity loss after drying and, consequently, after freeze-drying (6.8 $min(\log(CFU.mL^{-1}))^{-1}$ at 30 °C). This loss increased almost three-fold for cells grown at 30 °C and harvested at the middle exponential phase (T1) (19 $min.(\log(CFU.mL^{-1}))^{-1}$). Moreover, degradation was approximately 60% higher for cells grown at 22 °C than at 30 °C and harvested at the early and late stationary phases

(T3 and T4). The cultivability and the specific acidification activity losses for cells grown at 22 °C and harvested at the early and late stationary phases (T3 and T4) were similar to the cultivability and the specific acidification activity losses for cells grown at 30 °C but harvested earlier during the culture (T2 and T3).

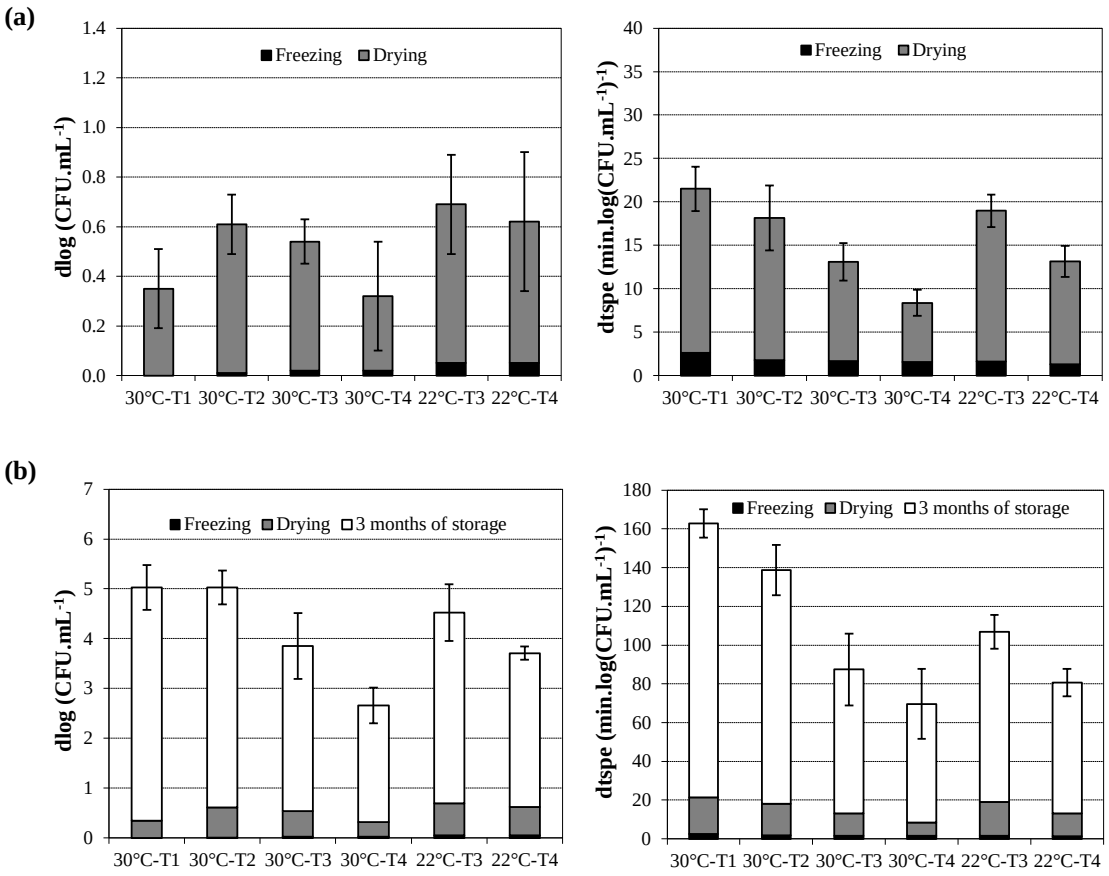


Fig. 2 Cultivability (dlog(CFU)) and specific acidification activity (dtspe) losses of *L. lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 grown at different temperatures and harvested at different growth phases (T1: middle exponential phase; T2: late exponential phase; T3: early stationary phase; and T4: late stationary phase) at each step of the process: freezing and drying (a) and total losses including 3 months of storage (b).

Storage at ambient temperature induced the highest losses and was approximately 10 times higher after 3 months than following freeze-drying (Fig. 2b). The growth phase but not the fermentation temperature impacted the stability of *L. lactis* cells after 3 months of storage at 25 °C. The main decrease in the loss of specific acidification activity was observed between the late exponential phase (T2) and the early stationary phase (T3) for bacteria grown at 30 °C. Loss of specific acidification

activity was two times higher at the exponential phase (T1 and T2) than at the stationary phase (T3 and T4).

Physical properties

The water activity of the freeze-dried bacteria was 0.020 ± 0.002 just after lyophilization and 0.026 ± 0.005 after 3 months of storage. Water activity thus remained constant during the storage period, which means that the cultivability and specific acidification activity losses during storage were not caused by modification of the water activity of the samples. Furthermore, the glass transition temperature of the freeze-dried starters was 179 ± 3 °C, indicating that these starters remained in a glassy state during storage at 25 °C.

Influence of fermentation conditions (harvesting time and temperature) on the biochemical and biophysical properties of the cytoplasmic membrane

In this study, the cytoplasmic membrane of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 obtained after applying different fermentation conditions was characterized by complementary approaches. The fatty acid composition, lipid phase transition temperature and membrane fluidity were determined for two fermentation temperatures (22 and 30 °C) and for different growth phases (from the middle exponential phase to the late stationary phase).

Fatty acid (FA) composition

Fatty acid composition of *L. lactis* in the studied conditions is summarized in Table 1. Regardless of the culture conditions, the fatty acid composition included four saturated fatty acids (SFA): tetradecanoic acid (C14:0), hexadecanoic acid (C16:0), heptadecanoic acid (C17:0) and octadecanoic acid (C18:0); two unsaturated fatty acids (UFA): hexadecenoic acid (C16:1cis) and octadecenoic acid (C18:1cis); and one cyclopropane fatty acid (CFA): methylenoctadecenoic acid (cycC19:0). However, only three fatty acids, C16:0, C18:1cis and cycC19:0, represented more than 90% of the total amount of all fatty acids. These fatty acid profiles were similar to those reported in previously studies on *L. lactis* (Schleifer et al. 1985; Johnsson et al. 1995).

Analysis of the membrane composition of *L. lactis* during growth at 30 °C revealed that the relative content of saturated, unsaturated and cyclopropane fatty acids and, in particular, the relative contents of C18:1cis, cycC19:0 and C16:0 changed depending on the growth phase. Table 1 shows a decrease in C18:1cis content from 25.4% to 6.2% and an increase in cycC19:0 content from 18.6% to 35.2% (from the middle exponential phase (T1) to the early stationary phase (T3)). At the late stationary phase (T4), a decrease in C18:1 content was accompanied by a decrease in cycC19:0 content, as well as an increase in C16:0 content. Consequently, during fermentation, a decrease in UFA content took

place in favor of fatty acid cyclopropanation (increase in CFA content) until the early stationary phase (T1-T3), whereas during the stationary phase (T3-T4), CFA and UFA content decreased in favor of SFA content. Accordingly, the CFA:SFA ratio presented a bell-shaped curve with a maximum value (0.61) at the early stationary phase (T3).

Fermentation temperature also affected the fatty acid composition of *L. lactis* cells. The fatty acid composition measured at 22 °C at the early and late stationary phases (T3 and T4) were similar to FA compositions measured at 30 °C but earlier during the culture (T2 and T3, respectively). This result is clearly demonstrated by the evolution of the cyc19:0 content and the CFA:SFA ratio. Hence, at 22 °C, the modulation of cell membrane lipid composition was slowed down when compared to fermentation at 30 °C.

Table 1 Fatty acid compositions (%) of *L. lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 cells grown at different temperatures and for different growth phases (T1: middle exponential phase; T2: late exponential phase; T3: early stationary phase; and T4: late stationary phase).

	30 °C				**22 °C**	
	T1	**T2**	**T3**	**T4**	**T3**	**T4**
C14:0	2.3 ± 0.1	2 ± 0.1	2 ± 0.1	2.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.1
C16:0	50.5 ± 1.2	48.6 ± 0.2	52.8 ± 0.5	56.4 ± 0.4	51 ± 0.9	52.7 ± 0.6
C16:1cis	1.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1
C17:0	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1
C18:0	1.9 ± 0.1	2.4 ± 0.1	3.0 ± 0.2	3.7 ± 0.2	3.3 ± 0.1	4.2 ± 0.2
C18:1cis	25.4 ± 3.2	17 ± 1.2	6.2 ± 0.4	3.3 ± 0.1	13.4 ± 1.2	6.1 ± 0.4
cycC19:0	18.6 ± 1.3	29.2 ± 0.2	35.2 ± 0.7	33.8 ± 0.4	30.4 ± 1.9	35.1 ± 1.3
C22:0	0	0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0	0.1 ± 0.1
UFA:SFA	0.48 ± 0.04	0.33 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.11 ± 0.01
CFA:UFA	0.71 ± 0.09	1.66 ± 0.04	5.24 ± 0.43	9.37 ± 0.14	2.21 ± 0.30	5.44 ± 0.56
CFA:SFA	0.34 ± 0.03	0.55± 0.01	0.61± 0.02	0.54± 0.01	0.55± 0.04	0.60± 0.03

Furthermore, the fatty acid composition was analyzed after freeze-drying and 3 months of storage but no modification of the fatty acid profile of *L. lactis* was observed in any condition (data not shown).

Membrane lipid phase transition

Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy was used to characterize changes in the membrane lipid phase behavior of *L. lactis* cells during cooling and heating by following the lipid CH_2 symmetric stretching band position around 2,850 cm^{-1} as a function of temperature. An example of this result is

shown in Figure 3. A shift in position of the CH_2 symmetric stretching band from 2,849 to 2,854 cm^{-1} was observed with increasing temperature. This shift in wavenumbers is known to reflect the trans-gauche isomerization in the hydrocarbon chains of lipids that characterizes the gel-to-liquid crystalline phase transition of the bacterial membrane (Crowe et al. 1989b). In the gel phase (low wavenumbers: 2,849 cm^{-1}), all fatty acyl chains are in trans conformation and are able to pack in an ordered manner. In the liquid crystalline phase (high wavenumbers: 2,854 cm^{-1}), the chains adopt a predominantly gauche conformation, allowing a more relatively disordered phase with more space between acyl chains.

The first derivative of the CH_2 symmetric stretching band position as a function of temperature was plotted to determine the lipid phase transition temperature. Lipid phase transition temperatures (Tm) for all conditions studied are presented in Table 2. For cells cultivated at 30 °C, Tm values exhibited an inverted bell-shaped curve with the highest values of 18 °C and 17 °C at the middle exponential phase (T1) and the late stationary phase (T4), respectively. As expected, the decrease in growth temperature (from 30 to 22 °C) clearly induced a decrease in Tm values (Tm values of 9 and 10 °C) for maintaining the membrane in a liquid crystalline state during fermentation.

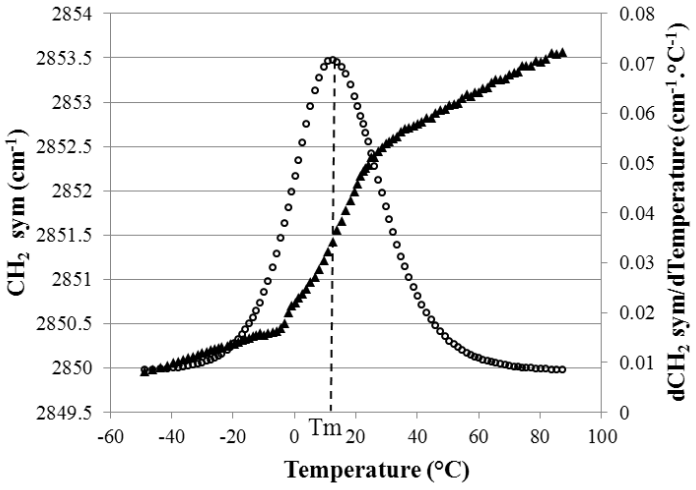


Fig. 3 Wavenumber of the symmetric CH2 stretching peak (CH2sym) vs. temperature plots (filled triangles), and the corresponding first derivatives (open circles) of L. lactis subsp. lactis TOMSC161 cells grown at 30 °C and harvested at the early stationary phase (T3).

Fluorescence anisotropy

The fluorescence anisotropy (r) measured reflects the rotational motion of the DPH probe and is negatively related to the cytoplasmic membrane fluidity. The measurements were performed at 20 °C, *i.e.*, at a temperature higher than the membrane lipid phase transition temperature for all the experimental conditions studied, meaning that the value of r reported in Table 2 corresponded to cell membranes in a liquid crystalline state. The lower the value is, the more fluid the membrane is. As

shown in Table 2, the fluorescence anisotropy of cells grown at 30 °C increased from 0.145 to 0.169 between the middle exponential phase (T1) and the late stationary phase (T4), with a significant increase between the late exponential phase (T2) and the early stationary phase (T3) (from 0.149 to 0.166). Likewise, the fluorescence anisotropy of cells cultivated at 22 °C increased between the early (T3) and the late stationary phase (T4) (from 0.139 to 0.169). These results indicated a rigidification of the cytoplasmic membrane of *L. lactis* TOMSC161 during its growth.

Table 2 Membrane lipid phase transition temperature (Tm) and fluorescence anisotropy (r) values of *L. lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 cells grown at different temperatures and for different growth phases.

	Tm (°C)		**Anisotropy (r)**	
	30 °C	**22 °C**	**30 °C**	**22 °C**
Middle exponential phase (T1)	18 ± 1		0.145 ± 0.002	
Late exponential phase (T2)	13 ± 0.6		0.149 ± 0.003	
Early stationary phase (T3)	13 ± 1	10 ± 0.2	0.166 ± 0.002	0.139 ± 0.005
Late stationary phase (T4)	17 ± 0.5	9 ± 0.1	0.169 ± 0.005	0.169 ± 0.004

Relationships between membrane characteristics and freeze-drying and storage resistance

Lactococcus lactis TOMSC161 cells cultivated at different fermentation temperatures and harvested at different growth phases showed major changes in membrane characteristics (fatty acid composition, lipid phase transition temperature (Tm) and fluorescence anisotropy (r); *i.e.*, membrane fluidity), and freeze-drying and storage sensitivity. To investigate possible relationships between fatty acid composition, membrane biophysical properties, cultivability and specific acidification activity losses after freeze-drying and 3 months of storage, a Pearson correlation test was performed. The results (Pearson coefficients R) are represented in Table 3.

The specific acidification activity loss after freeze-drying was significantly ($p < 0.05$) and positively correlated with the cultivability and acidification activity loss observed after 3 months of storage ($R = 0.707$ and $R = 0.776$, respectively). The lower the specific acidification activity loss after freeze-drying was, the higher the storage stability was.

Interesting relationships were also observed between membrane properties and freeze-drying and storage sensitivity (particularly specific acidification activity loss). Significant negative correlations were observed between the CFA:UFA ratio and the specific acidification activity loss after freeze-drying ($R = -0.855$) and storage ($R = 0.767$), and also between this ratio and the cultivability loss after

storage (R = -0.824). Moreover, the lipid phase transition temperature (Tm) was negatively correlated with the CFA:SFA ratio (R = -0.725) but no relevant relationship could be demonstrated between this membrane physical property and the freeze-drying and storage sensitivity of cells. Fluorescence anisotropy (r) was positively correlated with the CFA:UFA ratio (R = 0.847) and negatively correlated with the UFA:SFA ratio (R = -0.799). Moreover, significant negative correlations were observed between fluorescence anisotropy and specific acidification activity loss following both freeze-drying (R = -0.780) and storage (R = -0.668), and only after storage for cultivability loss (R = -0.706). In other words, the higher the fluorescence anisotropy value was (*i.e.*, higher rigidification of the cytoplasmic membrane), the higher the resistance to freeze-drying and storage were.

Table 3 Pearson coefficient of significant relationships between fatty acid composition (CFA:UFA, UFA:SFA and CFA:SFA), fluorescence anisotropy (r), lipid phase transition temperature (Tm), and freeze-drying (FD) and storage (3m) resistance (dlog(CFU) and dtspe) of *L. lactis* subsp. *lactis* TOMSC161.

	r	Tm	CFA:UFA	UFA:SFA	CFA:SFA	dtspe-FD	dtspe-3m	dlog(CFU)-FD	dlog(CFU)-3m
r	1								
Tm	NS	1							
CFA:UFA	0.847	NS	1						
UFA:SFA	-0.799	NS	-0.889	1					
CFA:SFA	0.511	-0.725	0.505	-0.791	1				
dtspe-FD	-0.780	NS	-0.855	0.818	-0.486	1			
dtspe-3m	-0.668	NS	-0.767	0.880	-0.681	0.776	1		
dlog(CFU)-FD	NS	-0.518	NS	NS	NS	NS	NS	1	
dlog(CFU)-3m	-0.706	NS	-0.824	0.808	-0.498	0.707	0.857	NS	1

NS: non significant

Discussion

Due to its location between the external environment and the intracellular medium, the bacterial membrane is the first target of injury during freeze-drying, which was demonstrated by major losses of membrane integrity (Schwab et al. 2007). Cell resistance to this stabilization process is thus strongly dependent on the physical state of its membrane following fermentation. Some studies have already linked the fermentation conditions and the resulting membrane lipid composition to the improvement of freeze-drying resistance of lactic acid bacteria (Broadbent and Lin 1999; Schoug et al. 2008; Hua et

al. 2009; Li et al. 2009; Zhao et al. 2009). However, to our knowledge, no study has deeply characterized the membrane biochemical and biophysical properties of lactic acid bacteria during fermentation in relation to their freeze-drying and storage resistance. In agreement with previous works (Schwab et al. 2007; Hua et al. 2009; Velly et al. 2014), growing *L. lactis* TOMSC161 at the optimal growth temperature followed by a harvest at the late stationary phase, induced the best cell resistance to freeze-drying and storage.

The analysis of membrane fatty acid composition showed that *L. lactis* TOMSC161 modulated their membrane fatty acid composition with a linear increase over time of the CFA:UFA ratio, from 0.7 at the middle exponential phase (T1) to 9.4 at the late stationary phase (T4) for cells grown at 30 °C (Table 1). In agreement with our results, other authors demonstrated that cells of *Leuconostoc oeni* and *Oenococcus oeni* exhibited a higher proportion of cyclopropane fatty acids in the stationary phase than in the exponential phase (Drici-Cachon et al. 1996; Hua et al. 2009). Furthermore, it is recognized that cyclopropane fatty acids are formed "*in situ*" at the expense of unsaturated fatty acids by conversion of the unsaturated position into a cyclopropane ring due to the transfer of a methyl group from S-adenosylmethionine (SAM) to the double bond catalyzed by the cyclopropane fatty acid (CFA) synthase (Grogan and Cronan 1997). This cyclopropanation is thus considered to be a post-synthetic modification of the bacterial membrane lipid bilayer since the fatty acid substrates are already part of the cell membrane structure. In addition, the fatty acid profile of cells cultivated at 22 °C and harvested at the early (T3) and late (T4) stationary phases corresponded to the fatty acid profile of cells cultivated at 30 °C and harvested earlier and, more precisely, at the late exponential phase (T2) and the early stationary phase (T3), respectively. This delay could be explained by the decrease in enzymatic efficacy of CFA synthase at 22 °C.

To illustrate the dynamic behavior of the bacterial membrane during fermentation and the relationships with the freeze-drying and storage resistance of cells, fluorescence anisotropy and specific acidification activity losses after freeze-drying and storage were plotted as a function of the CFA:UFA ratio for all conditions studied (Fig. 4). The specific acidification activity loss after freeze-drying (triangles) decreased linearly with the increase in the CFA:UFA ratio, which is mainly related to the cycC19:0 and C18:1cis content. After storage (circles), specific acidification activity loss decreased with increased CFA:UFA ratios, with the largest decreases in storage loss observed for CFA:UFA ratio values lower than 6. For CFA:UFA ratios higher than 6, the CFA and UFA contents decreased in favor of the SFA content, and only a slight decrease in specific acidification activity loss following storage was observed. In all cases, the higher this ratio was (*i.e.*, the higher the content of cycC19:0), the better the cell resistance to freeze-drying and storage was.

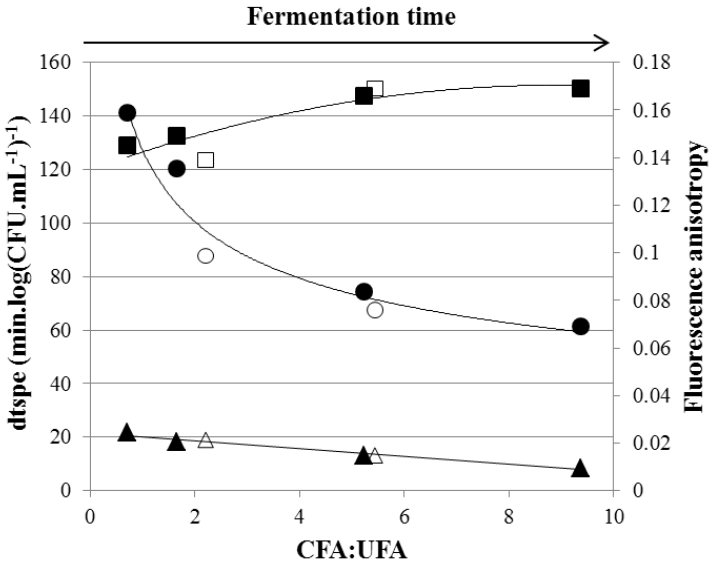


Fig. 4 Correlation between CFA:UFA ratio, fluorescence anisotropy (squares) and acidification activity loss after freeze-drying (triangles) and after 3 months of storage (circles) of L. lactis subsp. lactis TOMSC161 grown at different temperatures (22 °C: open and 30 °C: filled) and for the different growth phases studied.

The protective function of cyclopropane fatty acids against freeze-drying stress was demonstrated for *Pseudomonas putida* by the higher sensitivity of mutants with a knockout in the *cfa synthase* gene, compared to the wild-type cells (Munoz-Rojas et al. 2006). Moreover, several studies reported the beneficial effect of an increase in CFA (Broadbent and Lin 1999; Schoug et al. 2008; Hua et al. 2009; Li et al. 2009; Zhao et al. 2009) and in UFA (Broadbent and Lin 1999) content on the survival of different strains of lactic acid bacteria after freeze-drying. In these studies, the authors hypothesized that these changes in fatty acid composition result in the modification of membrane fluidity. The contribution of unsaturated fatty acids to membrane fluidification has been demonstrated in many studies (Da Silveira et al. 2003; Tymczyszyn et al. 2005; Beranova et al. 2008). On the contrary, the exact physiological functions of cyclopropane fatty acids are still unclear. Some authors have suggested that cyclopropane fatty acids increase membrane fluidity like unsaturated fatty acids, by preventing close packing of lipids in the cell membrane (Smittle et al. 1974; Wang et al. 2005). On the contrary, other authors have proposed that cyclopropane rings restrict the mobility and disorder of the acyl chains compared to *cis* double bonds, decreasing membrane fluidity (Hartig et al. 2005; Loffhagen et al. 2007; Thi Mai Huong et al. 2011). Almost no data exist in the literature on the direct measurement of membrane fluidity for various fatty acid profiles and on the correlation between this measurement and freeze-drying resistance of bacteria. Only Li et al. (2009) reported that *Lactobacillus bulgaricus* cells treated by thermal stress (30 min at 45 °C) presented a higher content of cycC19:0

associated with a more rigid membrane and a higher resistance to freeze-drying when compared to cells cultivated at 37 °C.

To test these hypotheses, two complementary biophysical properties were considered in this study to characterize bacterial membranes. Lipid phase transition temperature describes the gel-to-liquid crystalline transition; *i.e.*, the transition from a rigid to a fluid state that allows cellular functioning. Fluorescence anisotropy directly measures membrane fluidity by quantifying the mobility of a fluorescent probe within the membrane. Growing *L. lactis* TOMSC161 at a low temperature (22 °C) resulted in a decrease in the membrane lipid phase transition (Tm), associated with a change in the CFA:SFA ratio. This decrease in Tm corresponds to a homeoviscous adaptation (Sinensky 1974) necessary to maintain bacteria membrane in the liquid crystalline phase. However, no correlation was observed between this membrane biophysical property and the freeze-drying resistance of *L. lactis* TOMSC161. On the contrary, fluorescence anisotropy (squares) significantly increased with the CFA:UFA ratio, thus indicating a decrease in membrane fluidity with fermentation time, while remaining in a liquid crystalline state (Tm < 20 °C). The biggest fluorescence anisotropy variation took place for CFA:UFA ratio values ranging from approximately 2 to 5.5 when the cycC19:0 content was sharply increased (Table 1). A plateau was observed for CFA:UFA ratio values higher than 6. This property was also strongly related to the improvement of bacterial acidification activity recovery after freeze-drying and storage. Cells harvested at the stationary phase thus exhibited rigidified membranes with concomitant cyclopropanation of unsaturated fatty acids, increase of saturated fatty acids and the highest resistance to freeze-drying and storage. This increased rigidification could be at the origin of higher mechanical resistance of the membrane when bound water is removed during the desorption step.

The strain *L. lactis* TOMSC161 did not appear to be sensitive to the freezing step but very sensitive to storage in the freeze-dried state. It has been proposed that cocci are not sensitive to freezing due to a high cell surface-to-cell volume ratio (small size and spherical shape), which facilitates water efflux from cells during freezing (Mazur 1977; Fonseca et al. 2000). The main causes of alteration during storage are sugar crystallization, diffusion-controlled degradation reactions (non-enzymatic browning) and oxidation reactions (Jouppila et al. 1997; Kurtmann et al. 2009a; Kurtmann et al. 2009b). However, in this study, starters were in a glassy state, thus limiting molecular mobility and diffusion-controlled degradation reactions such as sugar crystallization. Since the oxidation reaction is strongly accelerated at low water activity (aw < 0.2) (Ruckold et al. 2001), it could, in turn, have been the main cause of storage degradation. A decrease in the unsaturated fatty acid content during freeze-drying and spray-drying of LAB was previously ascribed to oxidation reactions and associated with the observed losses of viability (Castro et al. 1995; Teixeira et al. 1996). However, no change was observed in the fatty acid profile of *L. lactis* cells after freeze-drying and 3 months of storage at 25 °C. Consequently, other cellular components of *L. lactis* cells such as DNA or proteins could be oxidized and/or other

physiological characteristics of cells could be involved in the freeze-drying and storage resistance of this strain.

In conclusion, this work linked membrane biophysical properties, fatty acid composition and freeze-drying and storage resistance of *L. lactis* TOMSC161 for the first time. The modulation of membrane lipids for obtaining high ratio of CFA:UFA and the concurrent rigidification made it possible to better resist freeze-drying and storage stress. Furthermore, the direct measurement of membrane fluidity by fluorescence anisotropy appeared to be a rapid and simple tool to determine the optimal fermentation time, making it possible to obtain freeze-drying-resistant cells. In a future study, proteomic and transcriptomic methods will be used to further understand the cellular mechanisms responsible for degradation of *L. lactis* TOMSC161 during freeze-drying and storage.

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (Paris, France). The authors thank Savoîcime for providing the reference strain.

References

Beney L, Gervais P (2001) Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. Appl Microbiol Biotechnol 57(1-2):34-42

Beranova J, Jemiola-Rzeminska M, Elhottova D, Strzalka K, Konopasek I (2008) Metabolic control of the membrane fluidity in *Bacillus subtilis* during cold adaptation. Biochim Biophys Acta-Biomembr 1778(2):445-453 doi:10.1016/j.bbamem.2007.11.012

Bischof JC, Wolkers WF, Tsvetkova NM, Oliver AE, Crowe JH (2002) Lipid and protein changes due to freezing in dunning AT-1 cells. Cryobiology 45(1):22-32

Broadbent JR, Lin C (1999) Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization. Cryobiology 39(1):88-102 doi:10.1006/cryo.1999.2190

Castro HP, Teixeira PM, Kirby R (1995) Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. Appl Microbiol Biotechnol 44(1-2):172-176

Chu-Ky S, Tourdot-Marechal R, Marechal P-A, Guzzo J (2005) Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: effects on membrane fluidity and cell viability. Biochem Biophys Acta 1717(2):118-24 doi:10.1016/j.bbamem.2005.09.015

Coulibaly I, Dubois-Dauphin R, Destain J, Fauconnier M-L, Lognay G, Thonart P (2010) The resistance to freeze-drying and to storage was determined as the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity. Int J Microbiol 2010:625239 doi:10.1155/2010/625239

Coulibaly I, Dubois-Dauphin R, Danthine S, Majad L, Mejoub T, Destain J, Bera F, Wathelet JP, Thonart P (2011) Preservation of industrial's lactic acid bacteria (probiotics) by freeze-drying. Biotechnol Agron Soc 15(2):287-299

Crowe JH, McKersie BD, Crowe LM (1989a) Effects of free fatty acids and transition temperature on the stability of dry liposomes. Biochem Biophys Acta 979(1):7-10 doi:10.1016/0005-2736(89)90516-6

Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM, Anchordoguy TJ, Drobnis E (1989b) Lipid phase transitions measured in intact cells with Fourier transform infrared spectroscopy. Cryobiology 26(1):76-84

Da Silveira MG, Golovina EA, Hoekstra FA, Rombouts FM, Abee T (2003) Membrane fluidity adjustments in ethanol-stressed Oenococcus oeni cells. Appl Environ Microbiol 69(10):5826-5832 doi:10.1128/aem.69.10.5826-5832.2003

Daly C, Fitzgerald GF, O'Connor L, Davis R (1998) Technological and health benefits of dairy starter cultures. Int Dairy J 8(3):195-205 doi:10.1016/s0958-6946(98)00042-9

Drici-Cachon Z, Cavin JF, Divies C (1996) Effect of pH and age of culture on cellular fatty acid composition of *Leuconostoc oenos*. Lett Appl Microbiol 22(5):331-334 doi:10.1111/j.1472-765X.1996.tb01172.x

Fonseca F, Beal C, Corrieu G (2000) Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. J Dairy Res 67(1):83-90

Fox MH, Delohery TM (1987) Membrane fluidity measured by fluorescence polarization using an epics V-cell corter. Cytometry 8(1):20-25

Franks F (1998) Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. Eur J Pharm Biopharm 45: 221-229

Gautier J, Passot S, Penicaud C, Guillemin H, Cenard S, Lieben P, Fonseca F (2013) A low membrane lipid phase transition temperature is associated with a high cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* CFL1. J Dairy Sci 96(9):5591-5602

Grogan DW, Cronan JE (1997) Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 61(4):429-441

Guillot A, Obis D, Mistou MY (2000) Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress. Int J Food Microbiol 55(1-3):47-51 doi:10.1016/s0168-1605(00)00193-8

Hartig C, Loffhagen N, Harms H (2005) Formation of trans fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*. Appl Environ Microbiol 71(4):1915-1922 doi:10.1128/aem.71.4.1915-1922.2005

Hua L, Zhao WY, Wang H, Li ZC, Wang AL (2009) Influence of culture pH on freeze-drying viability of *Oenococcus oeni* and its relationship with fatty acid composition. Food Bioprod Process 87(C1):56-61 doi:10.1016/j.fbp.2008.06.001

Johnsson T, Nikkila P, Toivonen L, Rosenqvist H, Laakso S (1995) Cellular fatty acid profiles of *Lactobacillus* and *Lactococcus* strains in relation to the oleic acid content of the cultivation medium. Appl Environ Microbiol 61(12):4497-4499

Jouppila K, Kansikas J, Roos YH (1997) Glass transition, water plasticization, and lactose crystallization in skim milk powder. J Dairy Sci 80(12):3152-3160

Keweloh H, Heipieper HJ (1996) Trans unsaturated fatty acids in bacteria. Lipids 31(2):129-137 doi:10.1007/bf02522611

Kurtmann L, Carlsen CU, Risbo J, Skibsted LH (2009a) Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate. Cryobiology 58(2):175-180 doi:10.1016/j.cryobiol.2008.12.001

Kurtmann L, Skibsted LH, Carlsen CU (2009b) Browning of freeze-dried probiotic bacteria cultures in relation to loss of viability during storage. J Agric Food Chem 57(15):6736-6741 doi:10.1021/jf901044u

Leroy F, de Vuyst L (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci Tech 15(2):67-78

Li C, Zhao JL, Wang YT, Han X, Liu N (2009) Synthesis of cyclopropane fatty acid and its effect on freeze-drying survival of *Lactobacillus bulgaricus* L2 at different growth conditions. World J Microbiol Biotechnol 25(9):1659-1665 doi:10.1007/s11274-009-0060-0

Linders LJM, Wolkers WF, Hoekstra FA, vantRiet K (1997) Effect of added carbohydrates on membrane phase behavior and survival of dried *Lactobacillus plantarum*. Cryobiology 35(1):31-40 doi:10.1006/cryo.1997.2021

Loffhagen N, Hartig C, Geyer W, Voyevoda M, Harms H (2007) Competition between cis, trans and cyclopropane fatty acid formation and its impact on membrane fluidity. Eng Life Sci 7(1):67-74 doi:10.1002/elsc.200620168

Mazur P (1977) Role of intracellular freezing in death of cells cooled at supraoptimal rates. Cryobiology 14(3):251-272

Munoz-Rojas J, Bernal P, Duque E, Godoy P, Segura A, Ramos JL (2006) Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. Appl Environ Microbiol 72(1):472-477 doi:10.1128/aem.72.1.472-477.2006

Oldenhof H, Wolkers WF, Fonseca F, Passot SP, Marin M (2005) Effect of sucrose and maltodextrin on the physical properties and survival of air-dried *Lactobacillus bulgaricus*: An in situ Fourier transform infrared spectroscopy study. Biotechnol Prog 21(3):885-892 doi:10.1021/bp049559j

Rozes N, Garbay S, Denayrolles M, Lonvaud-Funel A (1993) A rapid method for the determination of bacterial fatty-acid composition. Lett Appl Microbiol 17(3):126-131

Ruckold S, Grobecker KH, Isengard HD (2001) The effects of drying on biological matrices and the consequences for reference materials. Food Control 12(7):401-407

Schleifer KH, Kraus J, Dvorak C, Kilpperbalz R, Collins MD, Fischer W (1985) Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen-nov. Syst Appl Microbiol 6(2):183-195

Schoug A, Fischer J, Heipieper HJ, Schnuerer J, Hakansson S (2008) Impact of fermentation pH and temperature on freeze-drying survival and membrane lipid composition of *Lactobacillus coryniformis* Si3. J Ind Microbiol Biotechnol 35(3):175-181 doi:10.1007/s10295-007-0281-x

Schwab C, Vogel R, Ganzle MG (2007) Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying. Cryobiology 55(2):108-114 doi:10.1016/j.cryobiol.2007.06.004

Sinensky M (1974) Homeoviscous adaptation - a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. P Natl Acad Sci USA 71(2):522-5 doi:10.1073/pnas.71.2.522

Smittle RB, Gilliland SE, Speck ML, Walter WM, Jr. (1974) Relationship of cellular fatty acid composition to survival of *Lactobacillus bulgaricus* in liquid nitrogen. Appl microbiol 27(4):738-43

Spinnler HE, Corrieu G (1989) Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. J Dairy Res 56(5):755-764

Streit F, Corrieu G, Beal C (2007) Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1. J Biotechnol 128(3):659-667 doi:10.1016/j.jbiotec.2006.11.012

Teixeira H, Goncalves MG, Rozes N, Ramos A, San Romao MV (2002) Lactobacillic acid accumulation in the plasma membrane of *Oenococcus oeni*: A response to ethanol stress? Microb Ecol 43(1):146-153 doi:10.1007/s00248-001-0036-6

Teixeira P, Castro H, Kirby R (1996) Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. Lett Appl Microbiol 22(1):34-38

Thi Mai Huong T, Grandvalet C, Tourdot-Marechal R (2011) Cyclopropanation of membrane unsaturated fatty acids is not essential to the acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Appl Environ Microbiol 77(10):3327-3334 doi:10.1128/aem.02518-10

Tymczyszyn EE, Gomez-Zavaglia A, Disalvo EA (2005) Influence of the growth at high osmolality on the lipid composition, water permeability and osmotic response of *Lactobacillus bulgaricus*. Arch Biochem Biophys 443(1-2):66-73

Velly H, Fonseca F, Passot S, Delacroix-Buchet A, Bouix M (2014) Cell growth and resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 following freezing, drying and freeze-dried storage are differentially affected by fermentation conditions. J Appl Microbiol

Wang Y, Delettre M, Guillot A, Corrieu G, Beal C (2005) Influence of cooling temperature and duration on cold adaptation of *Lactobacillus acidophilus* RD758. Cryobiology 50(3):294-307 doi:10.1016/j.cryobiol.2005.03.001

Wu CD, Zhang J, Wang M, Du GC, Chen J (2012) *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality. J Ind Microbiol Biotechnol 39(7):1031-1039 doi:10.1007/s10295-012-1104-2

Zhang Y-M, Rock CO (2008) Membrane lipid homeostasis in bacteria. Nat Rev Microbiol 6(3):222-233 doi:10.1038/nrmicro1839

Zhao WY, Li H, Wang H, Li ZC, Wang AL (2009) The effect of acid stress treatment on viability and membrane fatty acid composition of *Oenococcus oeni* SD-2a. Agric Sci China 8(3):311-316 doi:10.1016/s1671-2927(08)60214-x

III.2.3. Conclusion

Les principaux résultats de caractérisation de la membrane cellulaire de *L. lactis* TOMSC161 au cours de la fermentation (du milieu de la phase exponentielle jusqu'à la phase stationnaire avancée) ont mis en évidence un changement de la composition en acides gras et de la fluidité membranaire et, plus particulièrement, une augmentation de l'acide gras cyclique cycC19:0 au détriment de l'acide gras insaturé C18:1cis et une diminution de la fluidité membranaire. Par ailleurs, cette cyclopropanation apparait plus lente pour les cellules cultivées à 22 °C qu'à 30 °C. Une analyse comparative de ces descripteurs a permis d'établir une forte corrélation entre le ratio de la teneur en acides gras cycliques sur la teneur en acides gras insaturés (CFA:UFA) et la fluidité membranaire prouvant ainsi l'existence d'un lien entre ces deux propriétés de la membrane. En d'autres termes, la cyclopropanation des acides gras insaturés affecte la fluidité membranaire et conduit plus précisément à une rigidification de la membrane de *L. lactis* TOMSC161. De plus, notre étude a permis d'établir un lien entre la composition en acides gras et la température de transition lipidique. Cette température apparait négativement corrélée au ratio de la teneur en acides gras cycliques sur la teneur en acides gras saturés (CFA:SFA). Une augmentation du ratio CFA:SFA, due en partie à la cyclopropanation des acides gras insaturés, se traduit donc par une diminution de la température de transition lipidique. En outre, une différence de température de transition lipidique a été décelée entre les cellules cultivées à 22 et à 30 °C allant dans le sens d'une adaptation homéovisqueuse de ces cellules.

En parallèle, les résultats d'évaluation de la résistance de *L. lactis* TOMSC161 au procédé de préservation ont montré des pertes de fonctionnalité (activité acidifiante) à l'échelle de la cellule aussi bien lors de la lyophilisation qu'au stockage à 25 °C. Des pertes de cultivabilité ont aussi été constatées au stockage. Il ressort de ces résultats qu'une culture à 30 °C et une récolte tardive améliore la performance du ferment après lyophilisation mais aussi après stockage. L'augmentation du ratio CFA:UFA reliée à la rigidification de la membrane cellulaire se révèlent ainsi bénéfiques pour le maintien des performances du ferment après lyophilisation et après stockage. Au-delà de cette analyse, il ressort que la méthode de mesure de la fluidité membranaire par cytométrie en flux est pertinente pour évaluer rapidement « l'état de la membrane » des cellules au cours de la fermentation.

En conclusion, les résultats obtenus dans cette seconde étude apportent des éléments de compréhension sur l'évolution des propriétés biophysiques de la membrane des bactéries au cours de la fermentation et sur les mécanismes biologiques se déroulant au niveau de cette membrane et permettant aux bactéries de mieux résister aux stress ultérieurs provoqués par la lyophilisation et le stockage .

Comme décrit dans la synthèse bibliographique, la membrane est la cible de nombreux dommages pendant la lyophilisation (dommages mécaniques, transition de phase des lipides…) et le

stockage (oxydation des lipides...). La rigidication de la membrane peut expliquer une amélioration de la résistance mécaniques des cellules lors de la déshydratation. Cependant, le comportement au stockage de *L. lactis* TOMSC161 ne semble pas lié aux propriétés de la membrane. En effet, les pertes de cultivabilité et d'activité acidifiante ne proviennent pas d'une oxydation des lipides car aucune modification de la composition en acides gras des cellules n'a été décelée au cours du stockage. La cellule biologique étant un système complexe ne se limitant pas à une membrane cytoplasmique, par conséquent, d'autres mécanismes cellulaires peuvent être à l'origine de la dégradation cellulaire ou bien, au contraire, susceptibles d'améliorer la résistance des cellules bactériennes au procédé de lyophilisation et au stockage. Ainsi, plusieurs études décrites dans la synthèse bibliographique ont mis en évidence l'implication de protéines spécifiques telles que des protéines de stress dans la cryo- ou lyo-tolérance des bactéries lactiques. Par ailleurs, d'autres composants cellulaires peuvent être la cible d'oxydation lors du stockage des bactéries à l'état lyophilisé. Nous avons donc décidé de compléter ces travaux par une caractérisation du transcriptome et du protéome de *L. lactis* TOMSC161 ainsi que de l'état d'oxydation des cellules produites dans les mêmes conditions de culture et de récolte que celles appliquées dans cette deuxième partie. Ce travail fera l'objet de la troisième partie.

III.3. Etat d'oxydation des cellules de *Lactococcus lactis* TOMSC161 et résistance à la lyophilisation et au stockage

III.3.1. Contexte et objectifs

Quelques études se sont intéressées aux relations existant entre le protéome cellulaire et l'aptitude des bactéries lactiques à tolérer les procédés de stabilisation. En général, un stress physico-chimique (thermique, acide, osmotique ou carence nutritionnelle) a été appliqué dans ces études afin d'améliorer la résistance des bactéries lactiques aux procédés de préservation. En revanche, peu de travaux ont étudié l'évolution du protéome au cours de la fermentation en lien avec la résistance des cellules aux procédés de stabilisation et plus particulièrement à la lyophilisation. De plus, les techniques couramment employées (électrophorèse 2D + MALDI-TOF) ne permettent pas une analyse fine des protéines exprimées dans les différentes conditions et ne permettent pas une identification des protéines membranaires.

Dans ce contexte, la troisième partie de cette thèse vise à enrichir la compréhension des processus physiologiques se déroulant au cours de la fermentation chez les bactéries lactiques et plus particulièrement chez *L.lactis* TOMSC161 et permettant d'expliquer l'amélioration de sa résistance à la lyophilisation et au stockage.

Premièrement, un travail de séquençage et d'annotation du génome de *L. lactis* TOMSC161 a été réalisé et a fait l'objet de la soumission d'un « genome announcement ».

Le séquençage de la souche a permis, dans un second temps, une caractérisation des cellules au niveau du transcriptome et du protéome entier par l'utilisation de méthodes de haute technologique (RNA-seq et LC-MS/MS). Une évaluation de la résistance des cellules et de leur état d'oxydation par la détection de ROS intracellulaires a également été réalisée aux différentes étapes du procédé de lyophilisation et au stockage. Le travail présenté concerne seulement l'étude des cellules cultivées à 30 °C et récoltées aux deux temps de la phase stationnaire. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'un article scientifique. Les données protéomiques sont exposées ici en absence/présence de chaque protéine mais feront l'objet d'une quantification relative dans la publication qui sera soumise ultérieurement.

Afin de confirmer ces premières observations, cette étude a été complétée par une évaluation de l'état d'oxydation des cellules produites dans la publication n° 2. Ces mesures ont été réalisées aux

différentes étapes du procédé de préservation. Ces données seront également valorisées prochainement sous la forme d'une autre publication.

III.3.2. Genome Announcement : « Genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 »

H. Velly[1,2], P. Renault[3*], A.-L. Abraham[3], V. Loux[4], A. Delacroix-Buchet[3], F. Fonseca[2] and M. Bouix[2,*]

[1]CNIEL, 42 rue de Châteaudun, F-75314 Paris Cedex 09, France

[2]INRA, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA), 1 avenue Lucien Brétignières, F-78850 Thiverval-Grignon, France

[3]INRA, UMR 14121 Microbiologie de l'alimentation au service de la santé (Micalis), Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France

[4]INRA, UMR 1077 Mathématiques, Informatique et Génome (MIG), Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France

*Corresponding author: P. Renault, Tel: +33 (0)1 34 65 25 27; Fax: +33 (0)1 34 65 25 21; E-mail address: pierre.renault@jouy.inra.fr

Abstract

Lactococcus lactis is a lactic acid bacterium used in the production of many fermented food such as dairy products. Here, we report the genome sequence of *L. lactis* subsp *lactis* TOMSC161, isolated from non-scalded curd pressed cheese. This genome sequence provides information in relation to dairy environment adaptation.

Lactococcus lactis belongs to the group of lactic acid bacteria and is encountered in a wide range of environments such as animals and plant materials and even in a great variety of traditional food products (spontaneous growth) (1, 2). Industrially, this mesophilic and homofermentative bacterium is extensively used as starter in the production of many fermented foods and particularly used in dairy industry for cheesemaking. *Lactococcus lactis*, which has GRAS (generally regarded as safe) status, is involved in the milk acidification by formation of lactate, proteolysis and in the synthesis of aromatic compounds, polysaccharides and bacteriocins contributing therefore to the taste, the texture and the safety of dairy products (3-7) .

L. lactis, which is by far the best characterized LAB with respect to its physiology, metabolic pathways, and regulatory mechanisms, has become the model bacterium for most LAB research in biotechnology. The genome of several *L. lactis* strains have thus been determined, including strains of *L. lactis* subsp. *lactis*, such as IL1403 (8), KF147 (9) and CV56 (10), as well as strains of *L. lactis* subsp. *cremoris*, such as MG1363 (11) and SK11 (12). We report here, the genome of *L. lactis* subsp. *lactis* TOMSC161, a strain isolated from dairy environment and more specifically from a non-scalded

curd pressed cheese and presenting very interesting technological properties (acidifying, proteolytic and texturing activities).

Sequencing was performed by Imagif (CNRS; Gif-sur-Yvette, France), using Hi-Seq paired-end sequencing. A total of 2,0391,131 reads were used for assembly by using Velvet software and VelvetOptimizer software, leading to an average coverage of 730 x. A total of 56 large contigs ranging from 1,013 to 431,322 bp in size were generated and annoted by using AGMIAL, an integrated bacterial genome annotation platform (13).

The genome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 consists of 2,603,548 bp with an average G+C content of 35.09%. It contains 2,686 protein-coding sequences covering 86% of the genome, of which 1,991 were annotated with known biological functions and 695 encode hypothetical proteins. It also harbors 53 tRNA-coding genes and 5 rRNA-coding operons.

Analysis of the genome of *L. lactis* TOMSC161 revealed an adaptation to milk, a nutrient-rich environment. The presence of the complete set of genes involved in lactose and galactose metabolism as well as the presence of a wide variety of substrate transporters (carbohydrates, peptides and amino-acids) and inversely, the reduction of several amino acids biosynthetic capacities (auxotrophic for glutamate and aspartate) demonstrated this adaptation. However, the genome of *L. lactis* TOMSC161 still contains genes involved in the utilization of certain plant sugars (mannose, mannitol, arabinose, ribose, xylose) related to the original habitat of *L. lactis*. Furthermore, the analysis showed the presence of genes involved in exopolysaccharides and bacteriocins (*e.g.* lactococcin) production which are interesting technological features.

The avaibility of the genome sequence of *L. lactis* TOMSC161 will allow the powerful application of transcriptomics and proteomics to investigate metabolic responses and thus physiological processes involved in cell adaptation to different environmental conditions.

Nucleotide sequence accession numbers. The genome sequence and annotation of *L. lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 have been deposited in the EMBL database under accession numbers CBUJ010000001 to CBUJ010000062.

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (Paris, France). The authors thank Savoîcime for providing the reference strain and the MIGALE bioinformatics platform for providing computational resources (INRA, Jouy-en-Josas, France)

References

1. **Cogan TM, Barbosa M, Beuvier E, Bianchi Salvadori B, Cocconcelli PS, Fernandes I, Gomez J, Gomez R, Kalantzopoulos G, Ledda A, Medina M, Rea MC, Rodriquez E.** 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. J. Dairy Res. **64:**409-421.
2. **Salama MS, Musafijajeknic T, Sandine WE, Giovannoni SJ.** 1995. An ecological study of lactic acid bacteria: Isolation of new strains of *Lactococcus* including *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris*. J. Dairy Sci. **78:**1004-1017.
3. **Ayad EHE, Verheul A, de Jong C, Wouters JTM, Smit G.** 1999. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. Int. Dairy J. **9:**725-735.
4. **Ayala-Hernandez I, Hassan A, Goff HD, de Orduna RM, Corredig M.** 2008. Production, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JFR1 and their interaction with milk proteins: Effect of pH and media composition. Int. Dairy J. **18:**1109-1118.
5. **Cocaign-Bousquet M, Garrigues C, Loubiere P, Lindley ND.** 1996. Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. A. Van Leeuw. **70:**253-267.
6. **Daly C, Fitzgerald GF, O'Connor L, Davis R.** 1998. Technological and health benefits of dairy starter cultures. Int. Dairy J. **8:**195-205.
7. **Piard JC, Muriana PM, Desmazeaud MJ, Klaenhammer TR.** 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. Appl. Environ. Microbiol. **58:**279-284.
8. **Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malarme K, Weissenbach J, Ehrlich SD, Sorokin A.** 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. Genome Res. **11:**731-753.
9. **Siezen RJ, Bayjanov J, Renckens B, Wels M, van Hijum S, Molenaar D, Vlieg J.** 2010. Complete genome sequence of Lactococcus lactis subsp. lactis KF147, a plant associated lactic acid bacterium. J. Bacteriol. **192:**2649-2650.
10. **Gao Y, Lu Y, Teng KL, Chen ML, Zheng HJ, Zhu YQ, Zhong J.** 2011. Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CV56, a probiotic strain isolated from the vaginas of healthy women. J. Bacteriol. **193:**2886-2887.
11. **Wegmann U, O'Connell-Motherway M, Zomer A, Buist G, Shearman C, Canchaya C, Ventura M, Goesmann A, Gasson MJ, Kuipers OP, van Sinderen D, Kok J.** 2007. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. J. Bacteriol. **189:**3256-3270.

12. **Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee JH, Diaz-Muniz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J, Unlu G, Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B, Mills D.** 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. P. Natl. Acad. Sci. USA **103:**15611-15616.

13. **Bryson K, Loux V, Bossy R, Nicolas P, Chaillou S, van de Guchte M, Penaud S, Maguin E, Hoebeke M, Bessieres P, Gibrat JF.** 2006. AGMIAL: implementing an annotation strategy for prokaryote genomes as a distributed system. Nucleic Acids Res. **34:**3533-3545.

III.3.3. Publication n°3 : « Whole transcriptome and proteome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 reveal an increase of oxidative stress responses in late stationary phase improving their freeze-drying and storage resistance »

H. VELLY[1,2,3], E. DUGAT-BONY[2,3], S. LAYEC[3,2], F. FONSECA[2,3], S. PASSOT[3,2], S. GHORBAL[3,2] J. DELETTRE[2,3] and M. BOUIX[3,2]

[1]CNIEL, 42 rue de Châteaudun, F-75314 Paris Cedex 09, France

[2]INRA, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA), 1 avenue Lucien Brétignières, F-78850 Thiverval-Grignon, France

[3]AgroParisTech, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA), 1 avenue Lucien Brétignières, F-78850 Thiverval-Grignon, France

Abstract

This work aimed at understanding the cell mechanisms involved in the oxidative stress tolerance of *Lactococcus lactis* TOMSC161 caused by freeze-drying process and subsequent storage.

Cells were cultivated at 30°C and harvested at early and late stationary phase (after 6 h of stationary phase). The physiological state of cells was characterized at the transcriptome and proteome level and the oxidation state of cells was determined by quantification of reactive oxygen species (ROS). Cultivability and acidification activity losses, and oxidation state of cells were quantified after freeze-drying and after 3 months of storage. The oxidation state of *L. lactis* starter was negatively related to its freeze-drying and storage resistance and was lower for cells harvested at late stationary phase when compared to cells harvested at early stationary phase. The transcriptome of *L. lactis* indicated a slowdown in general metabolism as well as in oxygen comsumption and thus in ROS formation whereas the expression of genes involved in oxidative stress responses increased at late stationary phase when compared to early stationary phase.

L. lactis TOMSC161 cells would thus be able to "pre-adapt" to oxidative stress and to decrease their intracellular ROS concentration during the stationary phase made it possible to better resist freeze-drying and storage stresses and especially oxidative stress caused by this preservation process.

Keywords

Lactic acid bacteria, fermentation, lyophilization, RNA-sequencing, LC-MS/MS, reactive oxygen species, acidification activity

Introduction

Stabilization (freezing or freeze-drying), which is the final step of lactic acid bacteria (LAB) starter production, is essential to ensure the delivery of stable starters over time in terms of performance to customers and manufacturers. However, bacterial cells undergo stressful conditions during stabilization process leading to viability and /or functional activities losses of LAB starters (1). More specifically, freeze-drying, which is a low temperature desiccation process, induces cellular damages such as cryoinjury by formation of intracellular ice crystal (2), denaturation of proteins and lipids by removal of water, cold temperature and cryoconcentration (3, 4), and oxidation of DNA, proteins and lipids (5).

Many studies therefore investigated the improvement of the freeze-drying resistance of LAB based on different strategies including the optimization of freeze-drying process parameters (6-9), the use of protectants such as sugars, amino-acids and polymers (10, 11) and the pre-adaptation of cells by modulating growth conditions before freeze-drying (12, 13). For example, this cell pre-adaptation can be achieved by modulating medium composition (14-16), fermentation temperature (17), fermentation pH (18, 19) and/or harvesting time (13, 18, 20). In a previous study (13), we showed that the freeze-drying and storage resistance of *L. lactis* TOMSC161 was significantly influenced by fermentation temperature and harvesting time.

These modifications of growth conditions involve changes of the cells physiological state in order to adapt to the environment. Several reports were thus focused on the characterization of fatty acid composition of different LAB strains in relation to their freeze-drying tolerance. Many reports proposed that the proportion of saturated, unsaturated and cyclic fatty acids influences the survival of LAB after freeze-drying (12, 17, 18, 21-23). For example, a previous study of our group showed that the higher tolerance of *L. lactis* TOMSC161 to freeze-drying and storage was related to a cyclopropanation of unsaturated fatty acids with concomitant membrane rigidification during the growth (22). This rigidification could be at the origin of higher mechanical resistance of cells to dehydration but did not explain the higher storage resistance since no oxidation of the cell fatty acids was observed after 3 months of storage. Consequently other cellular components of *L. lactis* TOMSC161 cells such as DNA or proteins could be oxidized and/or other physiological characteristics of cells could be involved in the freeze-drying and storage resistance of this strain and have to be characterized.

On the one hand, few studies were thus interested in the link between the proteome composition of LAB and their tolerance to stabilization process (17, 24-29). In our knowldege, only the work of Broadbent and Lin (1999) examined the protein synthesis of LAB in relation to their freeze-drying resistance. Authors suggested that the improvement of LAB tolerance can be correlated to the synthesis or at least the overexpression of specific proteins such as heat or cold shock proteins (DnaK,

GroEL). Recent investigations highlighted global changes at the transcript or the protein level of LAB depending on the growth phase (30-33). Consequently, it would now be essential to identify proteins whose expression vary during the growth and which could be involved in the improvement of the freeze-drying resistance of *L. lactis* TOMSC161. This expression analysis can now be performed by transcriptomic and/or proteomic approaches using high-throughput "omics" methods. In fact, whole transcriptome shotgun sequencing (RNA-seq) has recently become an useful method for transcriptomic analysis and provides a far more precise measurement of transcripts level compared to microarray (34). Likewise, liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is now the reference method for proteomic studies. Indeed, this gel-free, label-free, highly sensitive and specific LC-MS/MS approach enables effective separation of complex protein mixtures by eluting peptides and their corresponding fragment ions (35).

On the other hand, oxidation can be considered one of the most deleterious effects to cell, causing cellular damages at both molecular and metabolic levels. Considerable efforts have thus been made to improve knowledge of oxidative stress and oxidative stress resistance and control mechanisms of LAB (36, 37). However, few studies were focused on the link between oxidation stress induced by freeze-drying and subsequent storage and survival of bacteria. It has been indicated that cellular components such as lipids and DNA are oxidized during drying processes and may cause viability losses (38-40). Furthermore, the formation of free radicals during freeze-drying process may provide useful information. Heckly and co-workers found a negative correlation between viability of freeze-dried cultures and the formation of free radicals (41, 42). Hence, the correlations between radicals formation, oxidation reactions and storage stability of freeze-dried starter *L. lactis* TOMSC161 have to be studied.

In this context, we propose to investigate the physiological processes occuring in *L. lactis* TOMSC161 at the proteome and transcriptome level as well as the oxidation state of cells during stationary phase in relation to its freeze-drying and storage resistance. To achieve this, *L. lactis* TOMSC161 cells were grown at 30°C and harvested at early and late stationary phase and were characterized by (i) whole transcriptomic approach, (ii) whole proteomic approach as well as (iii) oxidation state measurement by ROS detection and quantification at the cellular level. In parallel, cells were freeze-dried and resistance was assessed by cultivability and acidification activity measurements. The identification of physiological changes occurring between these two growth phases provided knowledge of cellular mechanisms could be involved in freeze-drying and storage tolerance of *L. lactis* TOMSC161.

Materials and methods

Lyophilized starter production

Strain and inoculum preparation

Lactococcus lactis subsp. *lactis* TOMSC161 (Savoîcime, France), a natural cheese isolate, was studied because of its sensitivity to freeze-drying. Frozen cells were stored at -80°C in M17 medium (Biokar Diagnostics; Beauvais, France) supplemented with 15% (v/v) glycerol (VWR; Leuven, Belgium). One mL of frozen aliquot was precultured in 100 mL of M17 medium at 30°C for 4.5 hours before inoculation in the bioreactor.

Fermentation

The culture medium was composed of 60 $g.L^{-1}$ lactose (VWR; Leuven, Belgium) and 15 $g.L^{-1}$ yeast extract (BD; Sparks, MD, USA). After adjusting the pH at 6.8 with a 30% KOH solution, the medium was introduced into a 5-L working volume bioreactor (Biostat® A plus, Sartorius-Stedim; Aubagne, France) and sterilized at 120°C for 20 min. The inoculation was done at a low initial concentration of approximately 100 $CFU.mL^{-1}$. The fermentation was performed at 30°C, pH 6.2 and with an agitation speed of 200 rpm to permit homogenization. The pH was controlled by the automatic addition of 15 N KOH solution (Merck; Darmstadt, Germany) in the bioreactor. The weight of the KOH solution was monitored throughout fermentation, and the consumption rate ($dm.dt^{-1}$, in $g.min^{-1}$) was calculated with WCidus software (INRA, Thiverval-Grignon, France).

Concentration and lyoprotection

Cells were harvested at early and late stationary phase (Figure 1). Then, the cell suspension was concentrated 10 times by centrifugation (Avanti® J-E centrifuge, Beckman Coulter; Fullerton, CA, USA) at 17,000 g for 20 min at 4°C. Concentrated cells were re-suspended in protective medium at a ratio of 1:2 (1 g of concentrated cells for 2 g of protective medium) prior to freeze-drying. The sterile protective solution was composed of 60 $g.L^{-1}$ sucrose (VWR; Leuven, Belgium), 140 $g.L^{-1}$ maltodextrin (Glucidex 6D, Roquette; Lestrem, France), 9 $g.L^{-1}$ NaCl. The lyoprotected cell suspensions were distributed in 5-mL vials (Verretubex; Nogent-Le-Roi, France) with a volume of 1 mL prior to freezing.

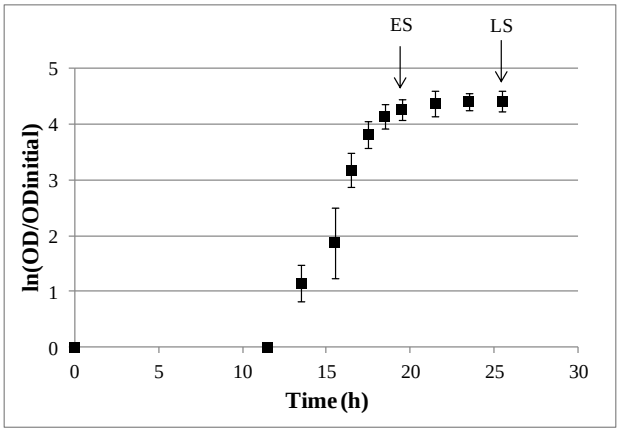


Figure 1 Growth curve of *L. lactis* TOMSC161 grown at 30°C and indication of the two harvesting times (ES: early stationary phase and LS: late stationary phase)

Freeze drying and storage

The samples were frozen at -80°C (freezing rate of 3°C.min^{-1}) in a cold air chamber and then transferred to a pre-cooled shelf at -50°C in a prototype pilot freeze-dryer built by Telstar (Terrassa, Spain). After a holding step of 2 h at -50°C, the chamber pressure was decreased to 20 Pa and the shelf temperature was increased from -50°C to -20°C at a heating rate of 0.25°C.min^{-1} to initiate the sublimation step. After 40 h of sublimation, the shelf temperature was increased to 25°C at a heating rate of 0.25°C.min^{-1} to initiate the secondary drying step. After 8 h of desorption, the vacuum was broken by injecting air and the vials were capped. Finally, freeze-dried samples were packed under vacuum in aluminum bags and stored at 25°C for 3 months to evaluate the stability of starters.

Transcriptomic analysis

Sample preparation

For transcriptomic study, 25 mL of cultures were harvested at early and late stationary phase. Then, one volume of ice-cold K-Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5; 5 mM $MgCl_2$; 20 mM NaN_3) was immediately added to two volumes of each cell suspension and gently mixed. Pellets were collected by centrifugation (15,000 g, 5 min, 4°C) and rapidly frozen in liquid nitrogen before storage at -80°C. For each condition, three repetitions were performed with independent cultures, extraction and RNA-seq analysis.

RNA extraction

For the extraction, frozen pellet was resuspended in 25 mL of 0.1M Tris-HCl (pH 8), 13 mM EDTA. 700 µL were transferred in tubes containing one equal volume of phenol-chloroform (5:1, pH 4.7)

(Sigma-Aldrich; Saint-Louis, MO, USA), 1 g of 0.1 mm zirconium beads (Biospec; Bartlesville, WA, USA) and 50 µl of sodium acetate 3 M (pH 4.8). Then, cells were broken in a Savant FastPrep FP120 apparatus (Qbiogene; Illkrich, France) for 30 seconds at speed 4.5. After centrifugation at 12,000 g for 15 min and at 4°C, total RNA contained in the supernatant was extracted using a classical phenol-chloroform extraction method (43). After RNA extraction, sample was treated with 7.5 µL of RNase-free DNase I (Roche; Boulogne-Billancourt, France) for 20 min at 37°C. Final RNA purification was carried out using the RNA Cleanup and Concentration Micro Kit (Norgen; Thorold, Canada), as instructed by the manufacturer. Then, the rRNA was depleted using the Ribo-Zero Magnetic Kit (Epicentre; Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. Finally, RNA concentration was quantified at 260 nm using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies; Wilmington, DE, USA). RNA integrity was assessed by gel electrophoresis using RNA 6000 NANO chip with the 2100 Bioanalyzer (Agilent; Palo Alto, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

RNA sequencing

The sequencing was performed at Imagif (Gif-sur-Yvette, France). RNA fragmentation was performed using Fragmentation buffer (Ambion; Austin, TX, USA) and fragmented RNAs were treated with Antartic alkaline phosphatase and polynucleotide kinase (new England Biolabs; Ipswich, England) according to the manufacturer's instructions. Finally, RNA-Seq libraries were constructed on cBot (Illumina; San Diego, CA, USA) using TruSeq SR Cluster Kit v3-cBot-HS (Illumina) and a single-end sequencing was performed on Hiseq 1000 (Illumina) using TruSeq SBS Kit v3-HS (Illumina) according to the manufacturer's instruction.

Data analyses

The quality of sequencing reads was checked with FastqC software (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). The read length was 50 bp in average and the sequencing depth ranged from 11 and 17 million reads per sample.

Then, the obtained reads were mapped onto the sequenced genome of *L. lactis* TOMSC161 (GenBank n° CBUJ010000001 to CBUJ010000062) using the Bowtie 0.12.9 mapping software (44) allowing mapping of 35 first bases, one mismatch and 100 alignment by read. Only uniquely mapped reads were used for data analysis. Differential expression analysis was performed by comparing the number of mapped reads for each gene in the three replicates from the two different conditions (early versus late stationary phase). First, the count table was filtered to select only data corresponding to CDS features exhibiting more than 50 mapped reads in average. Then, data were normalized by using R and the package DESeq2 (45). Finally, differentially expressed genes were identified according to the false discovery rate adjusted Benjamini Hochberg p-value (46) implemented within the DESeq2 package

and using a cutoff of adjusted p-value < 0.05. Genes showing an adjusted p-value less than 0.05 were considered to have significantly different transcript levels between the both growth phases and were therefore included in further investigations.

Proteomic analyses

Sample preparation

For proteomic study, 500 ml of early and late stationary-phases cultures were harvested. Cells were washed in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8; Sigma-Aldrich; Saint-Louis, MO, USA), centrifuged (15,000 g, 10 min, 4°C) and the pellet was rapidly frozen in liquid nitrogen before being stored at -80°C. For each condition, three repetitions were performed with independent cultures, extraction and LC-MS/MS analysis.

Protein extraction

For the extraction, frozen pellet was resuspended in a lysis buffer composed of 100 mM Tris-Hcl (pH 7.8; Sigma-Aldrich), 100 mM DTT (Sigma-Aldrich) and cocktail of protease inhibitors diluted 20 times (P84465; Sigma-Aldrich). Then, 7 mL of the cell suspension (approximately 35 units of optical density at 600 nm) was transferred to the precooled chamber of the One shot disrupter (CEllD; Sauveterre, France) and was subjected to a disruption at a pressure of 2.5 kbar. The suspension was collected and centrifuged (3,000 g, 20 min, 4°C) to remove unbroken cells and cellular debris. The supernatant was collected and subjected to ultracentrifugation (226,000 g, 30 min, 4°C) to separate the "cell envelope pellets" from cytosolic proteins. The transparent pellet obtained after ultracentrifugation was resuspended in lysis buffer. Protein samples were quantified using the Bradford method (47) and 1 DE were performed as previously described by Poidevin *et al.* (2014) (48).

Protein identification by LC-MS/MS and Databases searching

Firtsly, short SDS-PAGE runs (precasted 4-12% Bis-Tris Mini Gels, Invitrogen, France) were performed, allowing proteins (10 µg) to migrate and separate on a 5 cm length, and gels were stained with Coomassie blue (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Each 1D electrophoresis lane was cut in 2-3 mm slices. Then, each slice was submitted to in-gel tryptic digestion protein according to a standard trypsinolysis protocol. Gel pieces were washed twice with 50% (v/v) acetonitrile (ACN) and 25 mM ammonium carbonate and incubated in presence of 10 µL of 10 mM DTT for 1 h at 56°C. After cooling, the supernatant was removed and the samples were incubated with 10 µL of 55 mM iodoacetamide at room temperature in the dark. Gel plugs were washed with ACN and then dried in a vacuum speed concentrator. Digestion was performed for 8 h at 37°C with 200 ng of modified trypsin

(Promega; Madison, WI, USA) dissolved in 25 mM NH_4CO_3. The resulting tryptic peptides were first extracted with 50% (v/v) ACN and 0.5% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA), and then extracted with pure ACN. Peptide extracts were pooled, dried in a vacuum speed concentrator and resuspended in 25 µl of precolumn loading buffer (2% (v/v) ACN, 0.05% (v/v) TFA, 0.08% (v/v) formic acid) prior to LC-MS/MS analysis

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis was performed on an Ultimate 3000 LC system (Dionex, Thermo Fisher, Sunnyvale, CA) connected by nano-electrospray ion source to an LTQ-Orbitrap Discovery mass spectrometer (Thermo Fisher), located on the PAPPSO proteomic platform (INRA, Jouy-en-josas, France). Four microliters of the tryptic peptides mixture were loaded onto a trapping column (PepMap 100 C18; 0.3 x 5 mm, 100 A, 5 µm; Dionex) for 3 min with 0.1% formic acid at a flow rate of 7.5 $\mu L.min^{-1}$ for concentration and desalinisation. Then, the peptides were eluted onto the separating PepMap C18 nanocolumn (0.075 x 150 mm, 100 A, and 3 µm; Dionex) with a linear gradient from 5 to 35% of buffer B (0.1% formic acid, 80% ACN) in buffer A (0.1% formic acid, 2% ACN) over a period of 40 min at a flow rate of 300 $nl.min^{-1}$. Then, ionization was performed on liquid junction with a spray voltage of 1.8 kV applied to non-coated capillary probe (PicoTips emitter 360 µm OD, 10 µm ID, New objective). Peptides ions were automatically analyzed using Xcalibur 2.1 with the following data-dependent acquisition steps: (i) full MS scan (*m/z* 400 to 1,400) with a resolution of 70,000, (ii) Zoom Scan (scan of the 8 major ions), (iii) MS/MS on these 8 ions with classical peptide fragmentation parameters (Qz of 0.22, activation time of 50 ms and collision energy of 30%).

The raw mass data produced under Xcalibur 2.1 were converted in mzXML files with ReADW (http://tools.proteomecenter.org/software.php). Protein identification was performed with X!Tandem software (X!Tandem Cyclone 2011.12.01; http://www.thegpm.org) against protein database of *L. Lactis* TOMSC161 (GenBank n° CBUJ010000001 to CBUJ010000062), as well as proteomic contaminant database. The X!Tandem search parameters were as follows: (i) trypsin specificity with one missed cleavage, (ii) the semi tryptic peptide with N-terminal acetylation, (iii) fixed alkylation of cystein, and (iv) variable modification of methionine oxidation. The mass tolerance was fixed to 5 ppm for precursor ions and 0.5 Da for fragment ions. For protein identification, the final search results were filtered with the following criteria: protein log (E-value) lower than 4 and identification with at least two unique peptide sequences detected with a peptide E-value lower than 0.01.

Detection of reactive oxygen species

The intracellular oxidation state was estimated by radical measurement with dihydroethidium (DHE). This oxidative stress sensitive dye has been used for detecting superoxide radical (O_2^-) due to its reported relative specificity for this ROS. Indeed, DHE diffuses passively through the cellular

membrane and reacts with the O_2^- to form ethidium cation (E^+), a red fluorescent compound ($\lambda_{excitation}$ = 520 nm and $\lambda_{emission}$ = 610 nm) (49). The produced ethidium cation is trapped in the nucleus by intercalation into DNA, which results in an increase of cellular red fluorescence. Consequently, the red fluorescent cells contain ROS and the higher the fluorescent intensity is, the higher the ROS intracellular accumulation is.

Firstly, cell suspension was suspended in phosphate buffer (0.1 M, pH = 7.4) to a final concentration of 1-2.10^6 cells.mL^{-1}. Then, a volume of 10 µL of DHE stock solution (0.1 mM in DMSO, stored at -20°C) (Invitrogen-Molecular Probe; Eragny-sur-Oise, France) was added to 1 mL of the cell suspension and the sample was incubated at 30°C for 10 min before analysis. The sample was analyzed using a flow cytometer (CyFlow Space, Partec; Sainte-Genevieve-des-Bois, France) equipped with an air-cooled argon ion laser emitting at 488 nm and 630nm band pass filter to collect the red fluorescence.

This radical measurement was performed in triplicate on cells after freezing, after freeze-drying and after 3 months of storage at 25°C.

Determination of freeze-drying and storage resistance

Cultivability measurement

The bacterial cell concentration was determined using the agar plate count method. The frozen cells were thawed for 15 min at room temperature. The freeze-dried cells were rehydrated in 1 mL of saline water (NaCl 9 $g.L^{-1}$) and stirred for 5 min at room temperature. Cell suspensions were serially diluted in saline water, plated into M17 agar (Biokar Diagnostics; Beauvais, France) and incubated at 30°C for 48 h in anaerobiosis. The cell count was expressed in $CFU.mL^{-1}$ and the measurements were performed in triplicate. The cultivability was measured after concentration and lyoprotection, after freeze-drying and after 3 months of storage at 25°C.

The determination of the cultivability loss after each step of the process was calculated using the following equation (Equation 1):

$$\mathrm{dlog(CFU)_{i+1}} = \mathrm{log(CFU)_i} - \mathrm{log\ CFU\ _{i+1}} \quad (1)$$

Where i and i+1 are two successive steps of the process.

Acidification activity measurement

The Cinac system (AMS; Frépillon, France) was used to measure acidification activity of bacterial suspension (50). Acidification was measured in triplicate at 30°C using reconstituted skim milk with 100 $g.L^1$ skim milk powder (EPI Ingredients, Ancenis, France), heat treated at 110°C for 15 min in 120-mL flasks and stored at 4°C for 24 h before use. The flasks were inoculated with 500 µL of bacterial suspensions. The inoculated milk pH was continuously measured by the Cinac system and

led to the determination of the time necessary to obtain a decrease of 0.7 pH units (tpH0.7, in min). The descriptor tpH0.7 was used to characterize the acidification activity of bacterial suspensions. The higher the tpH0.7 value was, the longer the latency phase was and the lower the acidification activity was. Moreover, the t_{spe} (in $min.log(CFU.mL^{-1})^{-1}$) was defined as the ratio of tpH0.7 to the corresponding log of the cell concentration (51). Consequently, the t_{spe} give an accurate and meaningful measurement of the biological activity of LAB, including the physiological state and viability. The acidification activity was measured after concentration and lyoprotection, freeze-drying and after 3 months of storage at 25°C.

As a result, the acidification activity loss was calculated as follows (Equation 2):

$$dtspe_{i+1} = tspe_{i+1} - tspe_i \quad (2)$$

where and i+1 are two successive steps of the process.

An increase in the dt_{spe} value corresponds to an increased loss of acidification activity during the process step considered.

Results and discussion

1. Effect of harvesting time on the freeze-drying and storage resistance of *L. lactis TOMSC161*

Firstly, the freeze-drying and storage resistance of *L. lactis* TOMSC161 was evaluated for cells harvested at early and late stationary phase. These resistances were determined by measurement of the cultivability and the specific acidification activity before and after freeze-drying, and after 3 months of storage of the starters.

As expected, Table 1 shows cultivability and acidification activity losses of starters after freeze-drying and even more after 3 months of storage at 25°C whatever the harvesting time. The cultivability losses after freeze-drying and storage were lower for cells harvested at late stationary phase compared to cells harvested at early stationary phase (*i.e.* a 41% and 29% decrease, respectively). Similarly, the cells harvested at late stationary phase had a lower acidification activity loss after freeze-drying than cells harvested at early stationary phase (*i.e.* a 36% decrease). However, the acidification activity loss of starters was not significantly different between the two harvesting times after 3 months of storage. The freeze-drying and storage resistance of *L. lactis* TOMSC161 was therefore improved when cells were harvested later in stationary phase. These data confirm previous results on this strain (22) and are in agreement with other studies which showed that harvesting cells of *Lactobacillus reuteri* (20) and *Oenococcus oeni* (18) in stationary phase rather than in exponential phase increased their survival rates after freeze-drying and storage.

Table 1 Cultivability (dlog(CFU)) and acidification activity (dtspe) losses after freeze-drying and 3 months of storage of *L. lactis* TOMSC161 cells harvested at early and late stationary phase

dlog(CFU.mL^{-1})	Early stationary phase	Late stationary phase
Freeze-drying	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.2
3 months of storage	3.3 ± 0.7	2.3 ± 0.4

dtspe (min.log(CFU.mL^{-1})$^{-1}$)	Early stationary phase	Late stationary phase
Freeze-drying	13 ± 2	8 ± 1
3 months of storage	74 ± 18	61 ± 18

Additional results indicated that the detrimental effects of freeze-drying and storage on *L. lactis* were decreased by including ascorbate in the protective medium (data not shown). Previous studies also demonstrated the positive effect of adding an anti-oxidant in the protective medium on the survival of freeze-dried lactic acid bacteria during storage (52). This last observation strongly supported the hypothesis that oxidation processes are at the origin of cultivability and acidification activity losses after freeze-drying and storage of the starters. Consequently, it appeared worthwhile to evaluate the physiological changes of *L. lactis* TOMSC161 cells in terms of oxidation before and after freeze-drying, and after storage.

2. Oxidation state of *L. lactis* TOMSC161 during fermentation and after freeze-drying and storage

To achieve the evaluation of the oxidation state of *L. lactis* TOMSC161, an intracellular quantification of reactive oxygen species (ROS) was performed using fluorescence methodology. More specifically, the dihydroethidium (DHE) probe was used for the detection of superoxide anion (O_2^-) in a reaction producing ethidium cation (E^+), a fluorescent compound. O_2^- is usually considered as a precursor of other reactive oxygen species such as hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical (HO°) in intracellular oxidation chain events. Consequently, this fluorescent methodology is a relevant approach to reflect the overall oxidation state of starters by measuring the percentage and the average fluorescence intensity of stained cells indicating the proportion of cells containing O_2^- and the average level of accumulation, respectively.

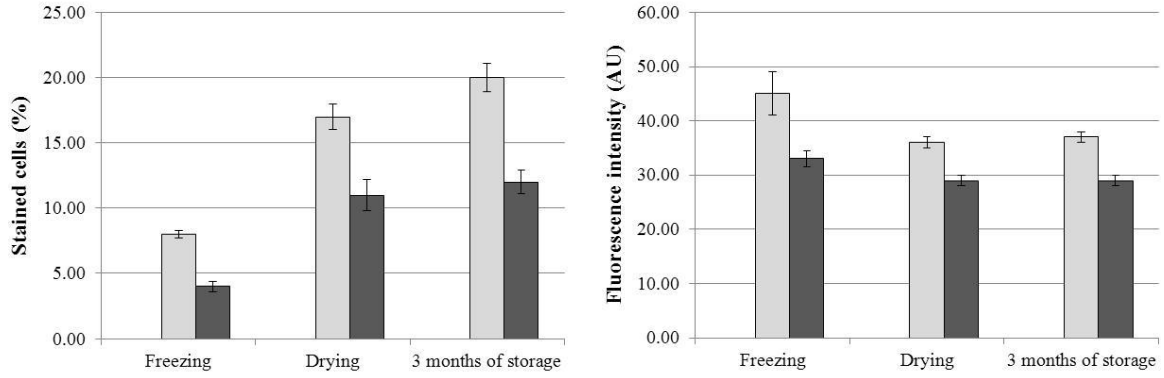


Figure 2 Proportion and average fluorescence intensity of stained cells with DHE after freezing, freeze-drying and 3 months of storage. Light and dark bars represent cells harvested at early and late stationary phase, respectively.

As shown in Figure 2, the percentage of stained cells increased between 2 and 3 times after drying whereas a low increase was observed after 3 months of storage. This increase of oxidized cells at each step of this preservation process could be due to formation of ROS by radiation and/or ROS spread inside the material. The low increase after 3 months of storage could be explained by the method applied which quantifies the ROS at a fixed time. However, ROS can react with the cell components during storage and were thus not detected after 3 months of storage.

Conversely, the average fluorescence intensity of these stained cells decreased after drying whereas no significant difference was observed after 3 months of storage. These results could indicate a spread of ROS within the product during drying.

After each step of the preservation process, the proportion of stained cells was lower (approximately two times) for bacteria harvested at late stationary phase when compared to bacteria harvested at early stationary phase. Moreover, the fluorescence intensity of these stained cells was lower for cells harvested at late stationary phase. Consequently, starter harvested later in stationary phase was less oxidized after freezing, drying and after storage which was correlated with a more resistant starter to the preservation process.

Furthermore, freezing has been reported to not cause cellular oxidation in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (53), the oxidation state of freezing cells would thus reflect the physiological state cells before freezing. As harvesting time was the only production parameter which was modulated, results would therefore indicate that the oxidation state of fresh cells was lower at late than at early stationary phase. This observation suggested therefore an impact of the initial oxidation state of *L. lactis* TOMSC161 cells on the oxidation state of starters after freeze-drying and storage and thus on the resistance of starters to this preservation process. In order to explain these different behaviors and, especially, the initial oxidation state of cells, it appeared interesting to evaluate the physiological

changes of *L. lactis* TOMSC161 cells occurring during the stationary phase at the molecular level by "omic" approaches.

3. Overview of transcriptomic and proteomic changes in *L. lactis* TOMSC161 cells from early to late stationary phase

The transcriptome and the proteome of *L. lactis* TOMSC161 were thus investigated to better understand the physiological changes occurring in this bacterium between early and late stationary phase. For these analyses, genes and corresponding proteins were grouped in functional classification according to their annotated function using the categories proposed by Bolotin *et al.* (2001) (54).

Transcriptome dataset

In this study, RNA-seq was employed to investigate the genes expression profile of *L. lactis* TOMSC161 grown at 30°C and harvested at early and late stationary phase. A total of 2117 genes were identified in the transcriptome of *L. lactis* TOMSC161 by RNA sequencing. This transcriptome dataset led to a high coverage (79%) of the published *L. lactis* TOMSC161 genome sequence (GenBank n° CBUJ010000001 to CBUJ010000062).

Of these, approximately 40% of genes were significantly differentially expressed between both growth phases. Specifically, 424 genes were significantly up-expressed whereas 427 genes were significantly down-expressed in late stationary when compared to the early stationary phase. Figure 3 summarizes more precisely the number of up- and down-expressed genes in late stationary phase by functional category. This figure reveals that the groups with a higher proportion of down-expressed genes in late stationary phase were "amino-acid biosynthesis" (85% of down-expressed genes compared to all differentially expressed genes in this group), "energy metabolism" (74%), "fatty acid and phospholipid metabolism" (70%), "central intermediary metabolism" (69%), "translation" (68%) and "biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers" (67%). Conversely, the functional categories, where a majority of differentially expressed genes was up-expressed in late stationary phase, were "transcription" (85%), "replication" (72%), "cellular process" (70%), "purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides" (70%), "other categories" (64%) and "regulatory functions" (61%).

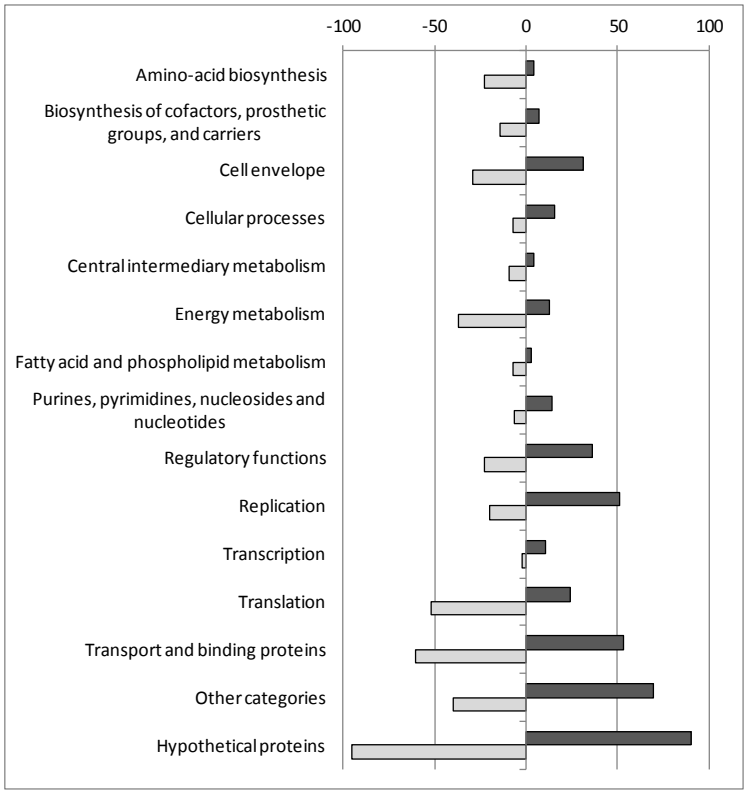


Figure 3 Functional classification of significantly differentially expressed genes at late stationary phase compared with early stationary phase for *L. lactis* TOMSC 161 grown at 30°C. Dark bars indicate the number of up- expressed genes, while light bars represent the number of down-expressed genes in late stationary phase.

Proteome dataset

The investigation of the proteome of *L. lactis* TOMSC161 by LC-MS/MS analysis allowed the identification of a total of 762 proteins in stationary phase whose 544 proteins identified in both growth phases and 152 and 66 proteins produced specifically in early and late stationary phase, respectively. These data are available in Supplementary data (Table 1 and 2).

These specific proteins were grouped by functional category and presented in Figure 4. This figure indicates that the specific proteins to each growth phase are distributed among almost all functional categories. However, the proportion of proteins assigned to each functional category was different in early and late stationary phase. In late stationary phase, a higher proportion of specific proteins categorized in “transcription” (from 3 to 7%) and in “transport and binding proteins” (from 11 to 26%) was observed. Conversely, the proportions of specific proteins involved in “cell envelope” (from 10 to 3%), “energy metabolism” (from 8 to 4%), “purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides

metabolism" (from 8 to 3%) and in "regulatory functions" (from 7 to 3%) were lower in late than in early stationary phase.

In this proteomic analysis, the absence or presence of each protein was determined whereas transcriptomic data were analyzed by differential comparison of the expression level of each gene. It could explain the difference of functional category revealed by these two approaches.

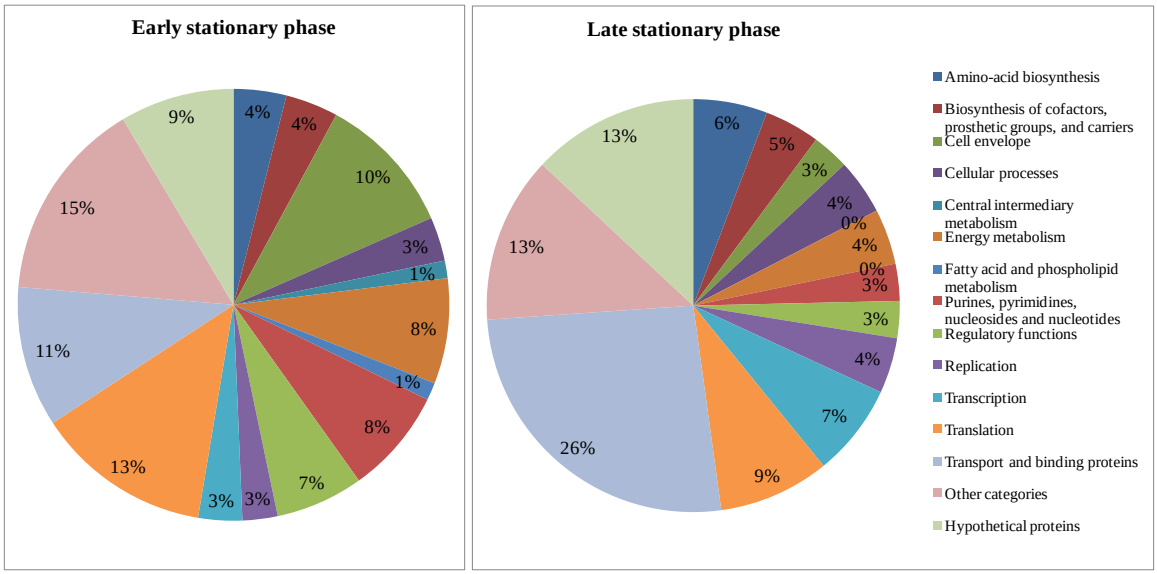


Figure 4 Functional classification of proteins of *L. lactis* TOMSC161 specifically produced in early and late stationary phase

Identification of three major mechanisms affected by the growth phase

In this section, the focus is on the major changes in terms of RNA abundance between early and late stationary phase. Cutoff fold change values equal to or lower than 0.5 and equal to or higher than 2 were therefore used to isolate the genes whose expression was highly affected between these two growth phases. All these differentially expressed genes and the identification of corresponding proteins were listed in Table 2, except for genes encoding hypothetical proteins. The down- and up-expressed genes in late stationary phase have a fold change lower than 0.5 and higher than 2, respectively. This focus allowed the identification of distinct patterns of expression and more specifically changes in general metabolism, consumption of oxygen and in stress responses according to the growth phase.

Table 2 Genes of *L. lactis* TOMSC161 significantly down- or up-expressed in late stationary phase (LS) compared to early stationary phase (ES) and identification of the corresponding proteins

Locus ID	Gene name	Function	RNA expression (fold change)	Protein identification
AMINO-ACID BIOSYNTHESIS				
Aspartate family				
O208_00915	*thrB*	Homoserine kinase	0.46	•
Branched chain family				
O208_00862	*leuC*	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	0.13	
O208_00855	-	Threonine dehydratase	0.14	
O208_00864	*leuB*	3-isopropylmalate dehydrogenase	0.15	
O208_00858	*ilvB*	Acetolactate synthase large subunit	0.22	•
O208_00865	*leuA*	2-isopropylmalate synthase	0.44	
Glutamate family				
O208_00775	*gltD*	Glutamate synthase [NADPH], small chain	0.26	•
Serine family				
O208_01754	*cysM*	Cysteine synthase	2.61	•
BIOSYNTHESIS OF COFACTORS, PROSTHETIC GROUPS, AND CARRIERS				
Thiamin				
O208_00825	*apbE*	Putative thiamine biosynthesis lipoprotein	0.33	• (ES)
O208_00796	*thiM*	Hydroxyethylthiazole kinase	0.38	
O208_00797	*thiD*	Phosphomethylpyrimidine kinase	0.41	
Thioredoxin, glutaredoxin, and glutathione				
O208_02378	*trxB2*	Thioredoxin reductase	6.54	•
CELL ENVELOPE				
Membranes, lipoproteins, and porins				
O208_02264	*lmrP*	Integral membrane protein	2.13	
O208_00024	*lgt*	Prolipoprotein diacylglyceryl transferase	2.18	
O208_01692	*yuaE*	Cell wall-binding protein	3.03	
Murein sacculus and peptidoglycan				
O208_01753	*acmD*	N-acetylmuramidase	2.02	•
O208_02542	*acmB*	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	2.32	
Surface polysaccharides, lipopolysaccharides and antigens				
O208_00802	*dltB*	D-alanyl transfer protein DltB	0.18	• (ES)
O208_00801	*dltA*	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase, subunit 1	0.28	•
O208_02224	*ybaI*	Glycosyl transferase	0.30	•
O208_00058	*tagB*	Teichoic acid biosynthesis protein B	0.46	
O208_00059	*tagF*	Teichoic acid biosynthesis protein F	0.49	
O208_01272	-	Glycosyltransferase	0.50	•
O208_01274	*rgpF*	Lipopolysaccharide biosynthesis protein	0.50	•
O208_00938	*ylfD*	Peptidoglycan hydrolase	2.00	
CELLULAR PROCESSES				
Cell division				
O208_01507	*parA*	ATPase for chromosome partitioning	2.37	• (ES)
Chaperones				
O208_02302	*copZ*	Copper chaperone	2.31	
CENTRAL INTERMEDIARY METABOLISM				
Amino sugars				
O208_00705	*nagA*	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	2.72	•

Degradation of polysaccharides				
O208_02673	*apu*	Glucan 1,4-alpha-maltohydrolase	0.46	
O208_01687	*chiA*	Chitinase	2.03	
Other				
O208_00569	*xylH*	4-oxalocrotonate tautomerase	0.43	
ENERGY METABOLISM				
Aerobic				
O208_00307	*noxD*	NADH dehydrogenase	0.30	•
O208_00843	-	Dehydrogenase	0.50	
ATP-proton motive force interconversion				
O208_01374	*atpD*	ATP synthase, subunit beta	0.28	•
O208_01372	*atpG*	ATP synthase, subunit gamma	0.28	•
O208_01375	*atpC*	ATP synthase, subunit epsilon	0.29	• (ES)
O208_01371	*atpA*	ATP synthase, subunit alpha	0.30	•
O208_01370	*atpH*	ATP synthase, subunit delta	0.31	•
O208_01369	*atpF*	ATP synthase, subunit B	0.34	•
O208_01367	*atpE*	ATP synthase, subunit C	0.39	
O208_01368	*atpB*	ATP synthase, subunit A	0.39	•
Electron transport				
O208_01829	*nifJ*	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	0.30	•
Fermentation				
O208_00827	-	Fumarate reductase, flavoprotein subunit precursor	0.34	•
O208_01617	*ackA*	Acetate kinase	0.34	•
O208_00826	-	Fumarate reductase, flavoprotein subunit precursor	0.36	•
Glycolysis				
O208_01431	*yrjD*	L-lactate dehydrogenase, Hypothetical protein subunit YkgG	0.30	•
O208_01433	*yrjB*	L-lactate dehydrogenase, Fe-S oxidoreductase subunit YkgE	0.35	•
O208_01432	*yrjC*	L-lactate dehydrogenase, Iron-sulfur cluster-binding subunit YkgF	0.35	•
Pentose phosphate pathway				
O208_00101	*gntZ*	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	0.47	•
Sugars				
O208_00065	*glf*	UDP-galactopyranose mutase	0.49	•
O208_00100	*gntK*	Gluconokinase	0.49	
O208_02362	*uxuB*	Fructuronate reductase	3.15	
FATTY ACID AND PHOSPHOLIPID METABOLISM				
O208_02601	*acpP*	Acyl carrier protein	0.40	•
O208_00451	*lplL*	Lipoate-protein ligase A	3.06	
O208_01353	*fadA*	Acetyl coenzyme A acetyltransferase	9.03	•
PURINES, PYRIMIDINES, NUCLEOSIDES AND NUCLEOTIDES				
2'-deoxyribonucleotide metabolism				
O208_01056	*nrdE*	Ribonucleoside-diphosphate reductase	2.24	•
O208_01054	*nrdH*	Ribonucleoside reductase, glutaredoxin subunit	2.89	
Pyrimidine ribonucleotide biosynthesis				
O208_00693	*pyrD*	Dihydroorotate dehydrogenase B (NAD(+)), catalytic subunit	4.34	•
O208_01009	*pyrE*	Orotate phosphoribosyltransferase	4.97	•
O208_00692	*pyrK ou Z*	Dihydroorotate dehydrogenase B (NAD(+)), electron transfer subunit	7.08	•
Salvage of nucleosides and nucleotides				
O208_02557	*prsA*	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	2.17	•
O208_02532	*gmk*	Guanylate kinase	2.64	
REGULATORY FUNCTIONS				
O208_00021	-	Negative transcriptional regulator-copper transport operon	6.49	
O208_00057	*yjfE*	Transcription regulator	0.46	•

O208_00175	*yxcB*	Transcriptional regulator	0.46	
O208_01831	*yecE*	Transcription regulator	0.50	•
O208_02150	*rmaJ*	transcription regulator	2.07	
O208_02260	*yweE*	Transcriptional regulator	2.13	
O208_00833	-	Transcriptional regulator	2.17	
O208_02303	*copR*	Transcriptional regulator	2.18	
O208_01489	*ydeE*	Transcriptional regulator, AraC family	2.43	•
O208_02050	*yohC*	transcription regulator	2.51	
O208_00881	*ymcE*	Transcriptional regulator, XRE family	2.64	
O208_01123	*yddC*	Transcriptional regulator	2.76	
O208_01952	*rmaI*	Transcriptional regulator, MarR family	2.80	
O208_02329	*pyrR*	Uracil phosphoribosyltransferase / Pyrimidine operon regulatory protein PyrR	3.10	•
O208_02021	*rmeB*	Transcriptional regulator, MerR family	3.47	
O208_01608	*yujG*	Two-component system, response regulator	2.09	
REPLICATION				
DNA replication, restriction, modification, recombination, and repair				
O208_01790	*hslA*	DNA-binding protein HBsu	0.36	•
O208_00750	*hsdR*	Type I restriction-modification system, restriction subunit R	0.44	
O208_00338	*repC*	Replication protein	2.09	
O208_00036	*Rep*	Replication protein	2.11	• (ES)
O208_00604	*repB*	Replication protein	2.14	•
O208_01742	*repB*	Replication protein	2.20	
O208_02531	*rpoZ*	DNA-directed RNA polymerase, subunit delta	2.21	• (ES)
O208_02308	-	Adenine-specific methyltransferase	2.33	
O208_00037	*hsdS*	Type I restriction-modification system, specificity subunit S	2.35	
O208_00006	*hsds*	Type I restriction-modification system, specificity subunit S (HsdS)	2.44	
O208_00340	*repB*	Replication protein	2.54	
O208_02743	*repX*	Replication-associated protein	2.60	
O208_02310	-	Replication protein	2.81	
O208_00667	*repB*	Replication protein	2.87	
O208_02744	*repB*	Replication protein	2.99	•
O208_02311	-	Single-stranded DNA-binding protein	3.46	
TRANSCRIPTION				
Degradation of RNA				
O208_02244	*rnz*	Ribonuclease Z	2.14	
RNA processing				
O208_01107	*rheA*	ATP-dependent RNA helicase	2.01	•
TRANSLATION				
Amino acyl tRNA synthetases				
O208_00308	*proS*	Prolyl-tRNA synthetase	0.30	•
O208_00251	*asnS*	Asparaginyl-tRNA synthetase	0.38	•
O208_01869	*tyrS*	Tyrosyl-tRNA synthetase	0.42	•
O208_00380	*ileS*	isoleucyl-tRNA synthetase	0.42	•
O208_01713	*thrS*	Threonyl-tRNA synthetase	0.45	•
O208_00393	*cysS*	Cysteinyl-tRNA synthetase	0.46	•
Degradation of proteins, peptides, and glycopeptides				
O208_01644	*yugD*	peptidase, U32 family large subunit [C1]	0.35	•
O208_01756	*yfcF*	Gamma-glutamyl-diamino acid-endopeptidase	0.45	
O208_00213	*pepO*	Endopeptidase O	0.45	
O208_00332	*pepO*	Neutral endopeptidase O	0.48	•
O208_00309	*yvjB*	Membrane metalloendopeptidase, M50 family	0.49	•
O208_01867	*pepA*	Glutamyl aminopeptidase	0.49	•
O208_00050	*yjgB*	Gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate peptidase I, NlpC/P60 family	2.32	

Ribosomal proteins: synthesis and modification				
O208_01316	*gatB*	Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B	0.27	•
O208_01318	*gatA*	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	0.49	•
O208_01921	*rpsP*	30S ribosomal protein S16	2.51	•
TRANSPORT AND BINDING PROTEINS				
General				
O208_01391	*ysaB*	ABC transporter, permease and substrate binding protein	0.15	•
O208_00634	*yijD*	ABC transporter, ATP-binding protein	0.27	•
O208_00635	*yijC*	ABC transporter, permease protein	0.32	•
O208_02258	*ywfA*	Fibronectin-binding protein	0.39	
O208_01636	*ecsB*	ABC transporter, permease protein	0.45	
O208_01273	-	Putative membrane protein	0.46	
O208_00788	*ynaC*	ABC transporter, ATP-binding/permease protein	2.75	
O208_00324	*yjcA*	ABC transporter, ATP-binding protein	2.98	
Amino acids, peptides and amines				
O208_01109	*optF*	Oligopeptide ABC transporter ATP-binding protein	0.29	•
O208_00772	*bcaT*	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	0.48	•
Carbohydrates, organic alcohols and acids				
O208_02419	*malG*	Maltose ABC transporter permease protein malG	0.27	
O208_02452	*ptnD*	PTS system, mannose-specific IID component	0.38	•
O208_02451	*ptnC*	PTS system, mannose-specific IIC component	0.43	•
O208_00099	*gntP*	Gluconate permease, Bsu4004 homolog	0.46	
O208_02450	*ptnAB*	Mannose-specific PTS system component IIAB	0.49	•
Nucleosides, purines and pyrimidines				
O208_00709	*yngG*	Nucleoside ABC transporter membrane protein	0.42	•
Anions				
O208_01162	*phnB*	Phosphonate ABC transporter permease protein	0.29	•
O208_01063	*yjjF*	Formate/nitrite transporter, FNT family	0.43	
O208_01164	*phnD*	Phosphonates ABC transporter phosphonates-binding protein	0.45	•
Cations				
O208_00805	*mgtA*	Mg(2+) transport ATPase, P-type	0.43	•
O208_00726	*mtsA*	Manganese ABC transporter substrate binding protein	0.44	•
O208_01292	*feoA*	Ferrous iron transport protein B	2.73	
O208_00653	*copB*	Lead, cadmium, zinc and mercury transporting ATPase, Copper-translocating P-type ATPase	2.87	•
O208_02335	*yqfA*	Cation binding protein	2.92	
O208_01127	*fhuD*	Ferrichrome ABC transporter, substrate binding protein	3.14	• (ES)
O208_02301	*copA*	Copper/potassium-transporting ATPase	3.42	
O208_01128	*fhuG*	Ferrichrome ABC transporter, permease protein	4.09	
O208_01129	*fhuB*	Ferrichrome ABC transporter, permease protein	4.72	
O208_00018	*ctpA*	Copper transporting ATPase	5.35	• (LS)
O208_00019	-	Lead, cadmium, zinc and mercury transporting ATPase	5.59	•
O208_01131	*fhuC*	Ferrichrome ABC transporter, ATP-binding protein	6.23	
O208_00020	-	Copper-exporting ATPase	6.42	
Multidrug resistance				
O208_02332	*yqeI*	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein	2.00	
O208_01953	*ypiB*	Multidrug transporter, MF superfamily	2.35	•
Bacteriocin				
O208_00031	-	Lactococcin A ABC transporter permease protein	0.49	• (ES)
OTHER CATEGORIES				
Adaptations and atypical conditions				
O208_01158	*tpx*	Thiol peroxidase	0.41	•
O208_01872	*osmC*	Osmotically inducible protein C	0.50	•
O208_01968	*clpB*	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpB	2.11	•
O208_00257	*uspA*	Universal stress protein A	2.17	•

O208_01604	*dpsA*	Non-heme iron-binding ferritin	2.66	•
Drug and analog sensitivity				
O208_01360	*bar*	Phosphinothricin acetyltransferase	0.34	•
Phage related functions and prophages				
O208_00133	-	Phage protein	0.23	
O208_00130	-	Phage protein, DNA primase	0.36	
O208_00115	-	Phage protein, integrase	0.47	
O208_02222	-	Phage lysin, 1,4-beta-N-acetylmuramidase	0.48	
O208_02094	-	Phage protein, terminase small subunit	0.49	
O208_02090	-	Phage protein	2.27	
O208_02319	-	Phage protein, Cro repressor	2.53	
O208_02323	-	Phage protein	2.56	
Siderophore biosynthesis				
O208_01575	*yveA*	Isochorismatase	0.44	
Other				
O208_00856	*ilvC*	Ketol-acid reductoisomerase	0.15	
O208_01161	*phnE*	Phosphatase	0.18	• (ES)
O208_01317	*ybgD*	Phosphohydrolase (MutT/nudix family protein)	0.39	
O208_00394	*mrnC*	Mini-ribonuclease 3	0.41	
O208_01702	*ytjF*	Phosphohydrolase, MutT/nudix family	0.46	
O208_01444	*yxfB*	SAM-dependent methyltransferase	0.49	
O208_01240	*ycdE*	Zinc-binding dehydrogenase	0.49	
O208_00740	-	Glyoxalase	2.01	
O208_00880	*ymcF*	Internalin	2.02	
O208_01122	*yddD*	Glyoxalase family protein	2.68	
O208_01055	*nrdI*	Ribonucleotide reduction protein NrdI	2.85	
O208_00469	*yaiA*	Glyoxalase family protein	3.03	
O208_00468	*yahD*	Alpha/beta hydrolase	3.05	
O208_00470	*yaiB*	Nitrilotriacetate monooxygenase, component B	3.35	

i) General metabolism

A general negative response was observed on the expression of genes involved in major physiological processes.

In the "energy metabolism" category, almost every differentially expressed gene involved in carbon metabolism (10/11), more specifically related to fermentation, glycolysis, pentose phosphate pathway and sugars metabolisms, was down-expressed in late stationary phase (fold change values between 0.3 and 0.49). This included genes encoding a fumarate reductase, an acetate kinase, a lactate dehydrogenase, a phosphogluconate dehydrogenase, an UDP-galactopyranose mutase and a gluconokinase. Carbon transport was also affected in late stationary phase, since genes linked to "permease" (*malG* and *gntP*) and "PTS system" (*ptnD*, *ptnC* and *ptnAB*) were down-expressed (fold change values between 0.27 and 0.49; "transport and binding protein" category). However, most of the corresponding protein were detected in both growth phases. The expression of the two genes encoding a pyruvate:flavodoxin oxidoreductase and an acetate kinase indicated a mixed acid fermentation in stationary phase. Indeed, the pyruvate oxidoreductase catalyzes the conversion of pyruvate into acetyl phosphate with a concomitant reduction of NAD^+ into NADH (55, 56). Then, the acetate kinase

participates to the transformation of acetyl phosphate into acetate (57, 58). In addition, the presence of LDH indicated that lactic acid formation occurred also in *L. lactis* TOMSC161 cells during stationary phase (56). Furthermore, the transformation of pyruvate into lactate catalyzed by LDH enables the essential recycling of the reduced NADH produced earlier. The down-expression of genes participating to the catabolism of pyruvate (encoding a pyruvate oxidoreductase and several LDH subunits) appears consistent with maintaining an energetic equilibrium. Moreover, the expression of 8 genes organized in an operon and encoding different subunits of the ATP synthase decreased also in late stationary phase (fold change < 0.39). Since ATP synthase allows the elimination of intracellular H^+ accumulated in the cells, its down-expression could be explained by lower acid production in late stationary phase.

Concerning nitrogen metabolism, the expression of 9 genes encoding peptides and amino-acids transporters ("transport and binding protein" category) as well as 6 genes encoding peptidases ("translation category") and 7 genes involved in "amino acid biosynthesis" (*thrB, leuC, leuB, ilvB, leuA* and *gltD*) decreased in late stationary phase (fold change values between 0.13 and 0.49). Furthermore, 5 of the 7 genes involved in amino-acid biosynthesis were organized in an operon and, more particularly, related to the synthesis of branched chain amino-acids. However, only one protein encoding by this operon was identified.

Likewise, the expression of three genes grouped in a same operon and involved in the biosynthesis of thiamin (*apbE, thiM* and *thiD*) decreased in late stationary phase (fold change < 0.41; "biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers"). However, the thiamine biosynthesis lipoprotein was only identified in early stationary phase and the other proteins were not detected in both conditions. These down-expressions could be explained by the fact that the thiamin is a cofactor of the pyruvate oxidoreductase (59).

Several differentially expressed genes involved in the poly- and lipopoly-saccharides biosynthesis ("cell envelope" category") and one gene encoding an acyl carrier protein involved in the "fatty acid biosynthesis" were down-expressed in this growth phase (fold change values between 0.18 and 0.5) even if most of the corresponding proteins were identified in both growth phases.

Finally, the transcript level of many genes (8/9) involved in "translation" decreased (fold change < 0.46).

Consequently, *L. lactis* TOMSC161 cells exhibited a slowdown in general metabolism during stationary phase with the down-expression of different genes involved in transport of nutrients (carbohydrates, peptides, amino-acids and nucleosides), degradation of peptides, biosynthesis of amino-acids, vitamins, polysaccharides and fatty acids, and in energy metabolism.

ii) Consumption of oxygen

In the "energy metabolism" category, the expression of two genes involved in aerobic metabolism decreased in late stationary phase (fold change = 0.3 and 0.5). This down-expression could be related to the down-expression of genes involves in the carbohydrates metabolism, as previously discussed. Indeed, the gene *noxD*, encoding a NADH dehydrogenase, was shown to play also an important role in the regeneration of NAD^+. This enzyme catalyzes the interconversion of NADH to NAD^+ with concomitant interconversion of oxygen (O_2) and reactive oxygen species such as hydrogen peroxide (60).

The expression of this gene and the identification of the corresponding protein revealed the presence and consumption of oxygen by *L. lactis* TOMSC161 in stationary phase. It is now well established that *L. lactis*, which is classified as a facultative anaerobic bacterium, is able to grow under aerobic condition by oxygen consumption thanks to flavoproteins including NADH oxidases, NADH peroxidases and a manganese-containing superoxide dismutase (61).

However, *L. lactis* is not able to fully degrade O_2 because of an incomplete electron transfer chain (62). Consequently, oxygen is reduced to reactive oxygen species (ROS) including superoxide anion (O_2^-), hydroxyl radical (HO°) and hydrogen peroxide (H_2O_2) which are toxic for cells (63). Their toxicity is attributed to oxidation of biomolecules such as proteins, lipids and nucleic acids leading to cellular damage that may become irreversible and cause cell death. *L. lactis* therefore developes various mechanisms to protect from ROS. Consequently, the decrease of transcript level of two genes encoding a thiol peroxidase (fold change = 0.41; "adaptations and atypical conditions" category) and a manganese transporter (fold change = 0.44; "transport and binding proteins" category), whose the proteins were identified in both growth phases, could be explained by the decrease of *noxD* gene expression which the protein (NADH oxidase) participates to the formation of ROS. Indeed, the thiol peroxydase, which could be a glutathione peroxidase (GPx) or a peroxiredoxin (Prx), reduces hydroperoxides with thiol by enzyme substitution mechanisms (64) and thus could possibly act on H_2O_2 in order to detoxify cells. Secondly, the manganese transporter could also participate to detoxify cells since Mn^{2+} acts as a co-factor for several enzymes such as the superoxide dismutase which catalyzes the dismutation of superoxide anion into hydrogen peroxide (65).

iii) Stress responses and especially oxidative stress responses

Conversely, the transcriptome of *L. lactis* TOMSC161 revealed more expression of response to stressful condition in late than in early stationary phase.

Firstly, three genes encoding an universal stress protein (fold change = 2.17; "adaptations and atypical conditions" category), an ATP-dependent Clp protease (fold change = 2.11; "adaptations and atypical

conditions" category) and a copper chaperone (fold change = 2.31; "cellular processes" category) were up-expressed in late stationary phase but only the first two proteins were identified in both growth phases. According to Frees and Ingmer (1999), Clp proteolytic complexes are essential for survival under stress conditions such as oxidative or low temperature stresses (66). They may be involved in the proteolysis of misfolded and damaged proteins. Moreover, previous studies also showed that stress proteins are induced and expressed more highly during stationary phase due to unfavorable conditions such as low nutrients concentration and high concentrations of lactic acid in culture medium (30, 31, 33).

In "cell envelope" category, an increase of the expression of five genes (*lmrP*, *lgt*, *yuaE*, *acmD* and *acmB*) encoding membrane proteins or involved in peptidoglycan biosynthesis was observed in late stationary phase (fold change values between 2 and 3) but few corresponding proteins were identified. As proposed by Cohen *et al.* (2006), the overexpression of these genes may reflect the reinforcement of the cell wall and membrane during stationary phase to maintain the cell morphology (31). Furthermore, two genes involved in "fatty acid and phospholipid metabolism" were up-expressed (fold change = 3 and 9) but only the *fadA* gene encoding an acetyl coenzyme A acetyltransferase is involved in fatty acid biosynthesis. It is thus difficult to draw conclusions with only one differentially expressed gene involved in this pathway.

Regarding "regulatory functions" category, many genes encoding transcriptional regulators (13/16) were up-expressed in late stationary phase (fold change values between 2 and 3.5) but few corresponding proteins were identified. We can hypothesize that these regulators allow the adaptation of cells to stressful conditions by a control of the expression level of genes involved in stress responses (67).

Finally, several genes which are probably involved in oxidative stress showed higher transcript levels in late than in early stationary phase.

The expression of one gene (*trxB2*) encoding a thioredoxin reductase, which protein was present in both growth phases, strongly increased in late stationary phase (foldchange = 6.5; "biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers"). The thioredoxin reductase, which forms a reductive system with thioredoxin, plays a crucial role in maintaining the intracellular redox homeostasis of the cells and protecting them against oxidative stress by reducing reactive oxygen species and maintaining the thiol-disulfide bond balance (68).

Concerning "transport and binding proteins" category, several genes encoding copper, iron and other metal transporters (10) and a non-heme iron-binding ferritin ("adaptations and atypical conditions" category) were over-expressed in late stationary phase (fold change values between 2.6 and 6.4). In addition, the corresponding proteins were translated for most of these genes. The proteins encoded by these genes could be implicated in responses to oxidative stress. Recent studies indeed demonstrated

that the metal ion homeostasis plays a critical role in oxidative stress (69-71). Intact H_2O_2 is not particularly deleterious to cells but it can react with cellular Fe^{2+} via Fenton chemistry to form highly toxic HO°. Similarly, the two oxidation states of copper, Cu+ and Cu^{2+} can also lead to the formation of reactive oxygen species. Thus the control of iron and copper homeostasis by controlling their uptake, accumulation, detoxification, and removal is important for cells survival in aerobic conditions.
In addition, the transcript level of several genes involved in 2'-deoxyribonucleotide metabolism, pyrimidine ribonucleotide biosynthesis and in salvage of nucleosides and nucleotides was increased (fold change between 2.2 and 7; "purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides" category). In this class, proteins were identified for the majority of these genes. Furthermore, a group of 14 genes encoding, inter alia, "replication" proteins, and one gene involved in "transcription" (ATP-dependent RNA helicase) were unexpectedly up-expressed in late stationary phase (fold change values between 2 and 3.5). However, few corresponding proteins were identified and two of them were only detected in early stationary phase. One gene involved in the degradation of RNA (ribonuclease Z; "transcription" category) was also over-expressed in late stationary phase (fold change = 2.1). We speculate that increasing oxidative stress may result in increased DNA damage, requiring an increase of replication, nucleotides synthesis and salvage for repair.
In conclusion, the over-expression of all these genes may reflect a higher protection of cells against oxidative stress due to the accumulation of reactive oxygen species over time.

Conclusion

This study presents the first comparative investigation of freeze-drying and storage resistance of *L. lactis* in relation to the oxidation state of cells and their physiological changes at transcriptomic and proteomic level during fermentation. This study demonstrated an improvement of the freeze-drying and storage resistance of cells harvested later in stationary phase in relation to a decrease of their oxidation state. The gene expression analysis revealed an increase of cells responses to stressful conditions and particularly to oxidative stress during stationary phase which was consistent with the idea of a better pre-adaptation of cells to oxidative stress caused by freeze-drying and storage in late stationary phase than in early stationary phase. Furthermore, the initial oxidation state of cells could also be related to the differential expression of a NADH dehydrogenase. By transcriptomic approach, this study is therefore helpful to understand how *L. lactis* TOMSC161 cells evolved during the stationary phase and to identify cellular mechanisms which could contribute to the ability of *L. lactis* to better tolerate freeze-drying and storage.

Acknowledgments:

This work was supported by the Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (Paris, France). The authors thank Claude Thermes (Imagif, CNRS; Gif-sur-Yvette, France) for RNA-sequencing and Didier Chevret (PAPPSO, INRA; Jouy-en-Josas, France) for protein identification by LC-MS/MS analysis.

References:

1. **Coulibaly I, Dubois-Dauphin R, Danthine S, Majad L, Mejoub T, Destain J, Bera F, Wathelet JP, Thonart P.** 2011. Preservation of industrial's lactic acid bacteria (probiotics) by freeze-drying. Biotechnol. Agron. Soc. **15:**287-299.
2. **Bank H, Mazur P.** 1973. Visualization of freezing damage. J. Cell Biol. **57:**729-742.
3. **Dumont F, Marechal PA, Gervais P.** 2004. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. Appl. Environ. Microbiol. **70:**268-272.
4. **Oldenhof H, Wolkers WF, Fonseca F, Passot SP, Marin M.** 2005. Effect of sucrose and maltodextrin on the physical properties and survival of air-dried *Lactobacillus bulgaricus*: An in situ Fourier transform infrared spectroscopy study. Biotechnol. Prog. **21:**885-892.
5. **Heckly RJ, Quay J.** 1981. A brief review of lyophilization damage and repair in bacterial preparations. Cryobiology **18:**592-597.
6. **Font de Valdez G, Savoy de Giori G, Ruiz Holgado APd, Oliver G.** 1985. Rehydration conditions and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. Cryobiology **22:**574-577.
7. **Higl B, Kurtmann L, Carlsen CU, Ratjen J, Forst P, Skibsted LH, Kulozik U, Risbo J.** 2007. Impact of water activity, temperature, and physical state on the storage stability of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* freeze-dried in a lactose matrix. Biotechnol. Prog. **23:**794-800.
8. **Passot S, Cenard S, Douania I, Trelea IC, Fonseca F.** 2012. Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria. Food Chem. **132:**1699-1705.
9. **Zhao GQ, Zhang G.** 2009. Influence of freeze-drying conditions on survival of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. Int. J. Food Microbiol. **135:**64-67.
10. **Carcoba R, Rodriguez A.** 2000. Influence of cryoprotectants on the viability and acidifying activity of frozen and freeze-dried cells of the novel starter strain *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CECT 5180. Eur. Food Res. Technol. **211:**433-437.

11. **Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P.** 2002. Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. Biotechnol. Lett. **24:**1587-1591.
12. **Li C, Zhao JL, Wang YT, Han X, Liu N.** 2009. Synthesis of cyclopropane fatty acid and its effect on freeze-drying survival of *Lactobacillus bulgaricus* L2 at different growth conditions. World J. Microbiol. Biotechnol. **25:**1659-1665.
13. **Velly H, Fonseca F, Passot S, Delacroix-Buchet A, Bouix M.** 2014. Cell growth and resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 following freezing, drying and freeze-dried storage are differentially affected by fermentation conditions. J. Appl. Microbiol. 1-12
14. **Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P.** 2003. Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. J. Appl. Microbiol. **94:**947-952.
15. **Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P.** 2004. Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Biotechnol. Prog. **20:**248-254.
16. **Siaterlis A, Deepika G, Charalampopoulos D.** 2009. Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying. Lett. Appl. Microbiol. **48:**295-301.
17. **Broadbent JR, Lin C.** 1999. Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization. Cryobiology **39:**88-102.
18. **Hua L, Zhao WY, Wang H, Li ZC, Wang AL.** 2009. Influence of culture pH on freeze-drying viability of *Oenococcus oeni* and its relationship with fatty acid composition. Food Bioprod. Process. **87:**56-61.
19. **Palmfeldt J, Hahn-Hagerdal B.** 2000. Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. Int. J. Food Microbiol. **55:**235-238.
20. **Schwab C, Vogel R, Ganzle MG.** 2007. Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying. Cryobiology **55:**108-114.
21. **Schoug A, Fischer J, Heipieper HJ, Schnuerer J, Hakansson S.** 2008. Impact of fermentation pH and temperature on freeze-drying survival and membrane lipid composition of *Lactobacillus coryniformis* Si3. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **35:**175-181.
22. **Velly H, Fonseca F, Passot S, Penicaud C, Beinsteiner H, Ghorbal S, Bouix M.** 2014. Cyclopropanation of unsaturated fatty acids and membrane rigidification improve the freeze-

drying resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161. Appl. Microbiol. Biotechnol.

23. **Zhao WY, Li H, Wang H, Li ZC, Wang AL.** 2009. The effect of acid stress treatment on viability and membrane fatty acid composition of *Oenococcus oeni* SD-2a. Agric. Sci. China **8:**311-316.
24. **Kim WS, Khunajakr N, Dunn NW.** 1998. Effect of cold shock on protein synthesis and on cryotolerance of cells frozen for long periods in *Lactococcus lactis*. Cryobiology **37:**86-91.
25. **Prasad J, Mc Jarrow P, Gopal P.** 2003. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. Appl. Environ. Microbiol. **69:**917-925.
26. **Streit F, Delettre J, Corrieu G, Beal C.** 2008. Acid adaptation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* induces physiological responses at membrane and cytosolic levels that improves cryotolerance. J. Appl. Microbiol. **105:**1071-1080.
27. **Wang Y, Corrieu G, Beal C.** 2005. Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. J. Dairy Sci. **88:**21-29.
28. **Wang Y, Delettre J, Corrieu G, Beal C.** 2011. Starvation induces physiological changes that act on the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. Biotechnol. Prog. **27:**342-350.
29. **Wouters JA, Frenkiel H, de Vos WM, Kuipers OP, Abee T.** 2001. Cold shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 are involved in cryoprotection and in the production of cold-induced proteins. Appl. Environ. Microbiol. **67:**5171-5178.
30. **Azcarate-Peril MA, Tallon R, Klaenhammer TR.** 2009. Temporal gene expression and probiotic attributes of *Lactobacillus acidophilus* during growth in milk. J. Dairy Sci. **92:**870-886.
31. **Cohen DPA, Renes J, Bouwman FG, Zoetendal EG, Mariman E, de Vos WM, Vaughan EE.** 2006. Proteomic analysis of log to stationary growth phase *Lactobacillus plantarum* cells and a 2-DE database. Proteomics **6:**6485-6493.
32. **Koistinen KM, Plumed-Ferrer C, Lehesranta SJ, Karenlampi SO, von Wright A.** 2007. Comparison of growth-phase-dependent cytosolic proteomes of two *Lactobacillus plantarum* strains used in food and feed fermentations. FEMS Microbiol. Lett. **273:**12-21.
33. **Laakso K, Koskenniemi K, Koponen J, Kankainen M, Surakka A, Salusjarvi T, Auvinen P, Savijoki K, Nyman TA, Kalkkinen N, Tynkkynen S, Varmanen P.** 2011. Growth phase-associated changes in the proteome and transcriptome of *Lactobacillus rhamnosus* GG in industrial-type whey medium. Microbial Biotechnology **4:**746-766.
34. **Wang Z, Gerstein M, Snyder M.** 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nature Reviews Genetics **10:**57-63.

35. **Geromanos SJ, Vissers JPC, Silva JC, Dorschel CA, Li G-Z, Gorenstein MV, Bateman RH, Langridge JI.** 2009. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. Proteomics **9:**1683-1695.

36. **Miyoshi A, Rochat T, Gratadoux J-J, Le Loir Y, Oliveira SC, Langella P, Azevedo V.** 2003. Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. Genet. Mol. Res. **2:**348-359.

37. **Sanders JW, Venema G, Kok J.** 1999. Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. Fems Microbiol. Rev. **23:**483-501.

38. **Castro HP, Teixeira PM, Kirby R.** 1996. Changes in the cell membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. Biotechnol. Lett. **18:**99-104.

39. **Castro HP, Teixeira PM, Kirby R.** 1997. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. J. Appl. Microbiol. **82:**87-94.

40. **Teixeira P, Castro H, Kirby R.** 1996. Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. Lett. Appl. Microbiol. **22:**34-38.

41. **Heckly RJ, Dimmick RL.** 1968. Correlations between free radical production and viability of lyophilized bacteria. Appl. Microbiol. **16:**1081-1085.

42. **Heckly RJ, Dimmick RL, Windle JJ.** 1963. Free radical formation and survival of lyophilized microorganisms. J. Bacteriol. **85:**961-966.

43. **Glatron MF, Rapoport G.** 1972. Biosynthesis of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis*: half-life of its corresponding messenger RNA. Biochimie **54:**1291-1301.

44. **Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL.** 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biology **10**.

45. **Anders S, Huber W.** Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biology **11:** 1-12.

46. **Benjamini Y, Hochberg Y.** 1995. Controlling the False Discovery Rate - a practical and powerful approach to multiple testing. J. Roy. Stat. Soc. B Met. **57:**289-300.

47. **Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72:**248-254.

48. **Poidevin L, Berrin J-G, Bennati-Granier C, Levasseur A, Herpoel-Gimbert I, Chevret D, Pedro MC, Henrissat B, Heiss-Blanquet S, Record E.** 2014. Comparative analyses of *Podospora anserina* secretomes reveal a large array of lignocellulose-active enzymes. Appl. Microbiol. Biotechnol.**:**1-13.

49. **Gomes A, Fernandes E, Lima J.** 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. J. Biochem. Biophys. Methods **65:**45-80.

50. **Spinnler HE, Corrieu G.** 1989. Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. J.Dairy Res. **56:**755-764.

51. **Streit F, Corrieu G, Beal C.** 2007. Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1. J. Biotechnol. **128:**659-667.

52. **Kurtmann L, Carlsen CU, Risbo J, Skibsted LH.** 2009. Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate. Cryobiology **58:**175-180.

53. **Fonseca F, Beal C, Mihoub F, Marin M, Corrieu G.** 2003. Improvement of cryopreservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 with additives displaying different protective effects. Int. Dairy J. **13:**917-926.

54. **Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malarme K, Weissenbach J, Ehrlich SD, Sorokin A.** 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. Genome Res. **11:**731-753.

55. **Charon MH, Volbeda A, Chabriere E, Pieulle L, Fontecilla-Camps JC.** 1999. Structure and electron transfer mechanism of pyruvate : ferredoxin oxidoreductase. Curr. Opin. Struc. Biol. **9:**663-669.

56. **Cocaign-Bousquet M, Garrigues C, Loubiere P, Lindley ND.** 1996. Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. Anton. Leeuw. **70:**253-267.

57. **Ferry JG.** 2011. Acetate kinase and phosphotransacetylase, p. 219-231, Methods in Enzymology: Methods in Methane Metabolism, Pt A, vol. 494.

58. **Goffin P, Muscariello L, Lorquet F, Stukkens A, Prozzi D, Sacco M, Kleerebezem M, Hols P.** 2006. Involvement of pyruvate oxidase activity and acetate production in the survival of *Lactobacillus plantarum* during the stationary phase of aerobic growth. Appl. Environ. Microbiol. **72:**7933-7940.

59. **Kletzin A, Adams MWW.** 1996. Molecular and phylogenetic characterization of pyruvate and 2-ketoisovalerate ferredoxin oxidoreductases from *Pyrococcus furiosus* and pyruvate ferredoxin oxidoreductase from *Thermotoga maritima*. J. Bacteriol. **178:**248-257.

60. **Marty-Teysset C, de la Torre F, Garel JR.** 2000. Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon aeration: Involvement of an NADH oxidase in oxidative stress. Appl. Environ. Microbiol. **66:**262-267.

61. **van Niel EWJ, Hofvendahl K, Hahn-Hagerdal B.** 2002. Formation and conversion of oxygen metabolites by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 under different growth conditions. Appl. Environ. Microbiol. **68:**4350-4356.

62. **Brooijmans RJW, Poolman B, Schuurman-Wolters GK, de Vos WM, Hugenholtz J.** 2007. Generation of a membrane potential by *Lactococcus lactis* through aerobic electron transport. J. Bacteriol. **189:**5203-5209.

63. **Storz G, Imlay JA.** 1999. Oxidative stress. Curr. Opin. Microbiol. **2:**188-194.

64. **Flohe L, Toppo S, Cozza G, Ursini F.** 2011. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. Antioxidants & Redox Signaling **15:**763-780.

65. **Sanders JW, Leenhouts KJ, Haandrikman AJ, Venema G, Kok J.** 1995. Stress response in Lactococcus lactis - Cloning, expression, analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. J. Bacteriol. **177:**5254-5260.

66. **Frees D, Ingmer H.** 1999. ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*. Mol. Microbiol. **31:**79-87.

67. **O'Connell-Motherway M, van Sinderen D, Morel-Deville F, Fitzgerald GF, Ehrlich SD, Morel P.** 2000. Six putative two-component regulatory systems isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. Microbiol.-Uk **146:**935-947.

68. **Vido K, Diemer N, Van Dorsselaer A, Leize E, Juillard V, Gruss A, Gaudu P.** 2005. Roles of thioredoxin reductase during the aerobic life of *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. **187:**601-610.

69. **Mermod M, Mourlane F, Waltersperger S, Oberholzer AE, Baumann U, Solioz M.** 2010. Structure and function of CinD (YtjD) of *Lactococcus lactis*, a copper induced nitroreductase involved in defense against oxidative stress. J. Bacteriol. **192:**4172-4180.

70. **Touati D.** 2000. Iron and oxidative stress in bacteria. Arch. Biochem. Biophys. **373:**1-6.

71. **Turner MS, Tan YP, Giffard PM.** 2007. Inactivation of an iron transporter in *Lactococcus lactis* results in resistance to tellurite and oxidative stress. Appl. Environ. Microbiol. **73:**6144-6149.

III.3.4. Le stress oxydatif à l'origine de la sensibilité de *Lactococcus lactis* TOMSC161 à la lyophilisation et au stockage

III.3.4.1. Impact de la présence d'un antioxydant sur la résistance à la lyophilisation et au stockage de *L. lactis* TOMSC161

Les résultats présentés dans la 3ème publication indiquent que la lyophilisation est à l'origine de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de leur accumulation à l'intérieur des cellules bactériennes par diffusion. Afin de vérifier que ces ROS ont bien un effet délétère sur les cellules, la résistance à la lyophilisation et au stockage de *L. lactis* TOMSC161 a été étudiée en présence ou non d'un antioxydant. Ces essais ont été réalisés sur des cellules cultivées à 30 °C et récoltées en entrée en phase stationnaire, et de l'ascorbate de sodium à 10 $g.L^{-1}$ a été ajouté ou non au milieu protecteur.

Les pertes de cultivabilité et d'activité acidifiante spécifique ont été déterminées après chaque étape du procédé de préservation et sont représentées sur la figure III.1. Il n'y a pas de différence significative de pertes de cultivabilité et d'activité acidifiante spécifique après la congélation et le séchage des ferments en absence et présence d'ascorbate de sodium dans le milieu protecteur. A l'inverse, l'ajout d'ascorbate de sodium dans le lyoprotecteur a permis de limiter les pertes de cultivabilité et d'activité acidifiante spécifique après un et trois mois de stockage à 25 °C. En effet, l'addition de cet antioxydant a réduit de plus de trois fois les pertes de cultivabilité (de 3,31 à 1,09 log) et d'activité acidifiante spécifique (de 74 à 23 min) après trois mois de stockage à 25 °C.

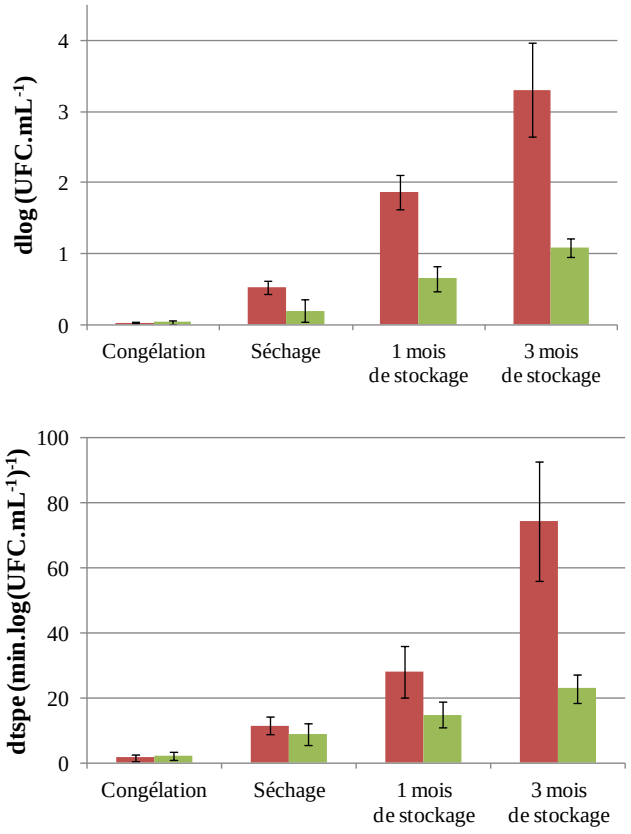


Figure III.1 Pertes de cultivabilité (dlog(UFC)) et d'activité acidifiante spécifique (dtspe) de *L. lactis* TOMSC161 après congélation, lyophilisation, 1 et 3 mois de stockage à 25 °C avec (vert) ou sans (rouge) ascorbate de sodium

En accord avec les travaux de *Kurtmann et al.* (1999), ces résultats prouvent que des réactions d'oxydation ont bien lieu au cours du stockage des cellules à l'état lyophilisé. En ce qui concerne la lyophilisation, bien qu'une formation et une accumulation intracellulaire de ROS ont été montrées dans le précédent travail (*cf.* publication n° 3), aucun effet délétère significatif de ces ROS sur la performance des ferments ne ressort de cette étude. Ceci peut être expliqué par une limitation des réactions d'oxydation provoquées par ces ROS aux faibles températures appliquées dans les premières étapes de la lyophilisation (T < 0 °C). De plus, l'échelle de temps considéré n'est pas la même : 3 jours pour la lyophilisation contre 3 mois pour le stockage. Nous émettons ainsi l'hypothèse que les ROS formées lors de la lyophilisation agiraient sur les cellules bactériennes pendant le stockage.

III.3.4.2. Impact de la température et de la phase de croissance sur l'état d'oxydation cellulaire de *L. lactis* TOMSC161 aux différentes étapes du procédé de production

Dans la 3ème publication, il a été montré un lien entre la diminution de l'expression de gènes impliqués dans la consommation de l'oxygène, l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans les réponses au stress oxydatif au cours de la phase stationnaire et la diminution de la concentration cellulaire en ROS chez *L. lactis* TOMSC161. Cette diminution de l'état d'oxydation est elle-même associée à une amélioration de la résistance des cellules aux étapes de séchage et de stockage.

Afin de confirmer ces résultats, de nouvelles mesures de quantification des ROS intracellulaires ont ainsi été réalisées sur l'ensemble des ferments produits dans les conditions expérimentales étudiées dans la publication n° 2 (culture à 22 et à 30 °C et cellules récoltées entre le milieu de la phase exponentielle et la phase stationnaire avancée : T1 à T4). La figure III.2 présente les résultats de cytométrie en flux et plus précisement le pourcentage et l'intensité moyenne de fluorescence des cellules marquées au DHE pour les différents ferments étudiés. Pour rappel, ces mesures reflètent respectivement la proportion de cellules contenant l'anion superoxyde et le niveau moyen d'accumulation de cet anion au sein d'une cellule.

En ce qui concerne l'impact du procédé de préservation sur l'état d'oxydation des ferments, les mêmes tendances sont retrouvées. Ainsi, le pourcentage de cellules marquées au DHE augmente après séchage mais également après stockage. A l'inverse, l'intensité moyenne de fluorescence des cellules marquées diminue après le séchage. Cette augmentation de l'état d'oxydation des ferments à chaque étape du procédé de préservation serait due à la formation de ROS par radiation et/ou à la diffusion de ces ROS au sein du matériau. De plus, cette diffusion expliquerait la diminution de l'intensité moyenne de fluorescence des cellules marquées après séchage.

En ce qui concerne l'impact des conditions de fermentation sur l'état d'oxydation des ferments, les résultats obtenus confirment les premières observations de la publication n° 3. Quelle que soit l'étape du procédé de préservation, plus les cellules sont récoltées tardivement, plus l'état d'oxydation des cellules (pourcentage et intensité moyenne de fluorescence des cellules marquées au DHE) est faible. La plus grande différence d'oxydation des ferments a été obtenue pour les cellules récoltées entre le milieu et la fin de phase exponentielle. De plus, aucune différence significative de la proportion de cellules marquées au DHE après congélation et séchage n'a été obtenue pour les cellules récoltées entre la fin de phase exponentielle et l'entrée en phase stationnaire. Par ailleurs, la proportion de cellules marquées au DHE est plus faible pour les cellules cultivées à 22 °C que pour les cellules

cultivées à 30 °C quelle que soit l'étape du procédé de préservation, excepté après 3 mois de stockage pour le ferment récolté en entrée en phase stationnaire.

Comme déjà évoqué dans la publication n° 3, l'état d'oxydation des cellules congelées reflèteraient leur état d'oxydation à la récolte. Tous ces résultats suggèreraient donc que l'état d'oxydation du ferment diminue au cours de la fermentation et que cet état d'oxydation est plus faible pour les cellules cultivées à 22 qu'à 30 °C.

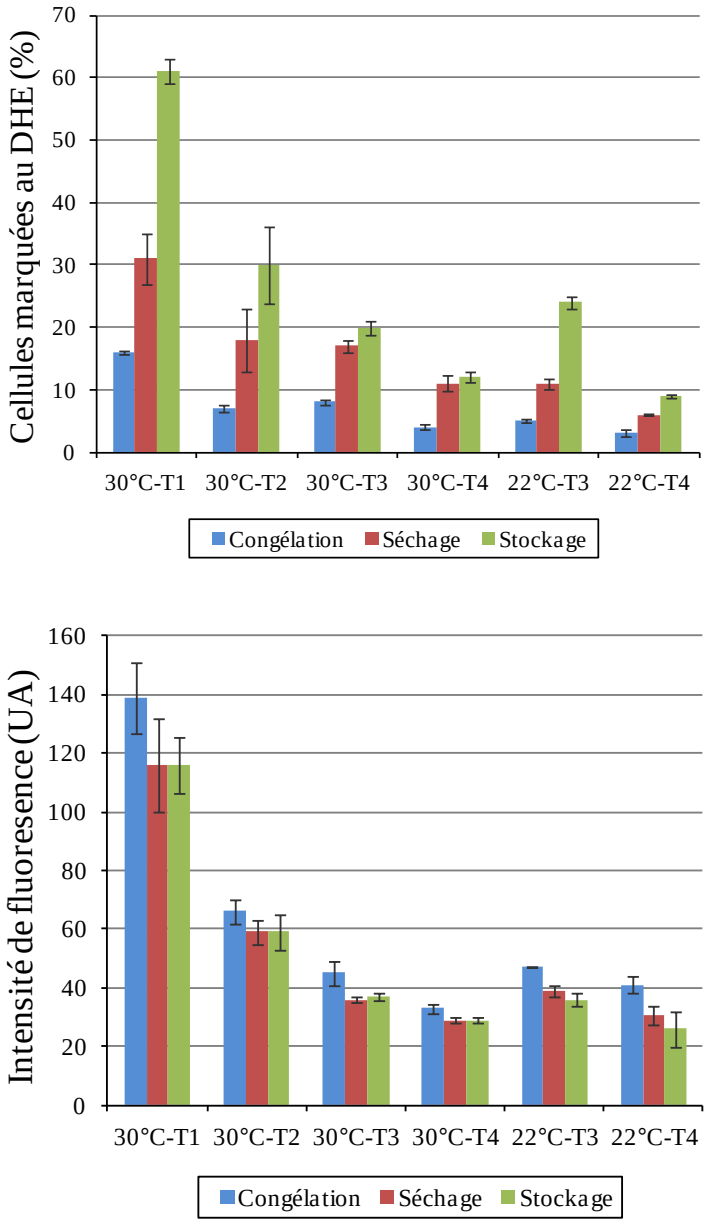


Figure III.2 Proportion et intensité moyenne de fluorescence des cellules marquées au DHE après congélation, lyophilisation et 3 mois de stockage à 25 °C de *L. lactis* TOMSC161 cultivé à 22 ou 30 °C et récolté à différents moments de la fermentation (T1, milieu de phase exponentielle ; T2, fin de phase exponentielle ; T3, entrée en phase stationnaire ; T4, phase stationnaire avancée)

III.3.4.3. Relation entre état d'oxydation cellulaire et résistance à la lyophilisation et au stockage de *L. lactis* TOMSC161

D'après les précédents résultats, les cellules cultivées aux deux températures de croissance et récoltées à différents instants de la fermentation présentent des états d'oxydation et des sensibilités différentes à la lyophilisation et au stockage (*cf.* publication n° 2). Afin d'identifier les possibles relations entre l'état d'oxydation des cellules au cours du procédé de préservation et leur résistance à la lyophilisation et au stockage, un test de corrélation de Pearson a été effectué sur l'ensemble des résultats. La matrice de corrélation est présentée dans le tableau III.1.

Tous les descripteurs sont ressortis positivement corrélés entre eux, à part la variable correspondant à la perte de cultivabilité après lyophilisation qui n'apparaît pas significativement reliée aux autres variables. Ceci peut s'expliquer par une faible perte de cultivabilité de *L. lactis* TOMSC161 après lyophilisation quelles que soient les conditions étudiées.

Tout d'abord, les deux descripteurs de l'état d'oxydation (pourcentage et intensité de fluorescence des cellules marquées au DHE) sont significativement corrélés. Ainsi, plus il y a de cellules contenant l'anion superoxyde et plus sa concentration intracellulaire est importante. Une corrélation positive et significative est également observée entre l'état d'oxydation initial des ferments (après congélation) et leur état d'oxydation après lyophilisation et après stockage. Cette analyse confirme donc de façon statistique les observations présentées auparavant.

Des relations intéressantes sont aussi observées entre la sensibilité à la lyophilisation (perte d'activité acidifiante), la sensibilité au stockage (pertes de cultivabilité et d'activité acidifiante) et l'état d'oxydation (% et IF) des ferments au cours du procédé de préservation. Plus l'état d'oxydation des ferments est élevé avant et après chaque étape, moins le ferment résiste à la lyophilisation et au stockage.

D'après cette analyse, nous pouvons affirmer qu'il existe une relation entre l'état d'oxydation des ferments et leur résistance à la lyophilisation et au stockage. Cependant, l'étude sur l'ajout d'un antioxydant dans le milieu protecteur a révélé une dégradation de la performance des ferments par oxydation seulement au stockage. En effet, les ROS n'auraient pas le temps d'agir pendant la lyophilisation et réagiraient donc avec les composants cellulaires lors du stockage ultérieur.

Il ressort de ce travail qu'il est impératif de limiter les phénomènes d'oxydation au cours de la lyophilisation et du stockage afin de maintenir une concentration élevée de cellules viables et actives. Cette limitation peut s'effectuer de nombreuses façons : la modulation de l'état physiologique des cellules bactériennes en vue d'une pré-adaptation au stress oxydatif (vu dans cette étude), l'ajout

d’antioxydant dans le lyoprotecteur (Kurtmann *et al.*, 2009 et vu dans cette étude) et/ou le conditionnement sous vide ou sous atmosphère modifiée (Andersen *et al.*, 1999, Castro *et al.*, 1995).

Tableau III.1 Coefficient de corrélation entre les descripteurs de l'état d'oxydation des cellules (% : pourcentage de cellules marquées, IF : intensité de fluorescence des cellules marquées) et les descripteurs de résistance à la lyophilisation et au stockage (dlog(UFC) : perte de cultivabilité, dtspe : perte d'activité acidifiante spécifique).

	$\%_{congélation}$	$IF_{congélation}$	$\%_{lyophilisation}$	$IF_{lyophilisation}$	$\%_{stockage}$	$IF_{stockage}$	$dlog(UFC)_{lyophilisation}$	$dtspe_{lyophilisation}$	$dlog(UFC)_{stockage}$	$dtspe_{stockage}$
$\%_{congélation}$	1									
$IF_{congélation}$	**0.938**	1								
$\%_{lyophilisation}$	**0.948**	**0.901**	1							
$IF_{lyophilisation}$	**0.924**	**0.993**	**0.918**	1						
$\%_{stockage}$	**0.937**	**0.970**	**0.936**	**0.972**	1					
$IF_{stockage}$	**0.936**	**0.989**	**0.936**	**0.994**	**0.982**	1				
$dlog(UFC)_{lyohilisation}$	-0.249	-0.201	-0.236	-0.190	-0.191	-0.228	1			
$dtspe_{lyophilisation}$	**0.596**	**0.674**	**0.627**	**0.686**	**0.748**	**0.670**	0.156	1		
$dlog(UFC)_{stockage}$	**0.598**	**0.652**	**0.551**	**0.636**	**0.700**	**0.649**	0.069	**0.707**	1	
$dtspe_{stockage}$	**0.747**	**0.811**	**0.783**	**0.823**	**0.859**	**0.831**	-0.021	**0.776**	**0.857**	1

En gras, valeurs significatives (hors diagonale) au seuil de 0,05 (p-value)

III.3.5. Conclusion

Ce travail a permis d'obtenir des informations supplémentaires sur l'état physiologique des cellules bactériennes issues des différentes conditions déjà étudiées dans la deuxième partie de cette thèse (publication n° 2).

Premièrement, l'analyse des données transcriptomiques a permis de déceler une modification de l'expression d'un certain nombre de gènes entre l'entrée en phase stationnaire et la phase stationnaire avancée à 30 °C. L'analyse comparative des données ont suggéré que les cellules de *L. lactis* TOMSC161 cultivées à 30 °C ont, sans surprise, un métabolisme général moins actif en phase stationnaire avancée qu'en entrée en phase stationnaire avec une diminution de l'expression de gènes impliqués dans le transport de nutriments, la dégradation des peptides, la synthèse de biomolécules (acides aminés et polysaccharides), la traduction et dans le métabolisme énergétique. De plus, les résultats ont suggéré une diminution de la consommation de l'oxygène au cours de la phase stationnaire avec la sous-expression de deux gènes impliqués dans le métabolisme aérobie en phase stationnaire avancée (gènes codant pour une NADH déhydrogénase et pour une pyruvate-flavodoxine oxydoréductase). A l'inverse, cette étude a révélé une surexpression de gènes impliqués dans la réponse aux stress et plus particulièrement au stress oxydatif en phase stationnaire avancée, tels que des gènes codant pour une thiorédoxine réductase, des protéines de transport et de chélation du cuivre et du fer, une protéine de stress général et une protéine chaperonne. Ces réponses viseraient à piéger ou à transformer les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites lors de la consommation de l'oxygène ou bien à dégrader les biomolécules oxydées par ces ROS.

Dans l'objectif de mieux comprendre les observations obtenues au niveau du transcriptome, une évaluation de l'état d'oxydation des cellules par quantification des ROS a été réalisée sur les différents ferments. Il est apparu que l'état d'oxydation des ferments augmente fortement après lyophilisation et faiblement après stockage. En effet les ROS formés et diffusés à l'intérieur des cellules tout au long de la lyophilisation et du stockage auraient surtout le temps de réagir avec les composants cellulaires lors du stockage, expliquant l'effet délétère de l'oxydation sur la performance des ferments après stockage (essai avec ou sans acide ascorbique). Par ailleurs, plus les cellules sont récoltées tardivement, plus leur état d'oxydation est faible quelle que soit l'étape de préservation considérée. Les cellules contiennent moins de ROS ce qui pourrait être expliqué par à une diminution de la consommation de l'oxygène (diminution du métabolisme énergétique).

En prenant en compte l'ensemble des résultats, l'amélioration de la résistance des cellules à la lyophilisation et au stockage serait due à une diminution de l'état initial d'oxydation des cellules et une augmentation de leurs réponses au stress oxydatif (pré-adapatation) au cours de la fermentation.

En conclusion, cette étude a permis d'enrichir les connaissances sur les processus physiologiques spécifiques et plus particulièrement sur le métabolisme aérobie qui affectent l'aptitude

des cellules à tolérer la lyophilisation et le stockage à température ambiante. Enfin, la méthode de quantification des ROS intracellulaires par cytométrie, développée par le laboratoire, est pertinente pour évaluer rapidement l'état d'oxydation des cellules. Cette mise au point, à laquelle j'ai contribué, fera l'objet d'une publication ultérieure.

III.4. Fonctionnalité du ferment lyophilisé en transformation fromagère

III.4.1. Contexte et objectif

La souche *L. lactis* TOMSC161, isolée d'une tomme de Savoie de fabrication artisanale, possède des propriétés fonctionnelles intéressantes pour une utilisation en technologie fromagère de pâte pressée non cuite. En effet, cette souche a un pouvoir acidifiant relativement faible et possède des propriétés texturantes intéressantes (texture fondante). Cependant, cette souche est sensible à la lyophilisation avec une perte trop importante d'activité acidifiante constatée lors de cette étape, même si ce n'est pas la fonctionnalité principale attendue. C'est dans ce contexte qu'une optimisation des conditions de production de la souche *L. lactis* TOMSC161 a été réalisée au cours de cette thèse. Les résultats obtenus ont conduit à mettre en évidence des conditions de fermentation capables d'améliorer les performances des ferments lyophilisés. Ainis, les conditions optimisées de fermentation (30 °C, pH 6,2 et récolte des cellules en phase stationnaire avancée) ont permis de réduire fortement les pertes d'activité acidifiante à la lyophilisation et d'éliminer les pertes de cultivabilité et d'activité acidifiante au stockage à température réfrigérée. Cependant, seules la cultivabilité et l'activité acidifiante ont été quantifiées pour évaluer la qualité du ferment. D'autres fonctionnalités de *L. lactis* TOMSC161 telles que les propriétés texturantes n'ont pas été mesurées lors de cette optimisation.

L'objectif de cette dernière partie est donc de vérifier que la souche *L. lactis* TOMSC161 produite et lyophilisée dans les conditions optimisées a conservé toutes ses fonctionnalités en transformation fromagère.

III.4.2. Méthodologie

Afin de répondre à cela, des tommes de Savoie ont été produites par Actalia Produits laitiers à partir de la souche *L. lactis* TOMSC161 sous forme de ferment frais ou lyophilisé. En parallèle différentes analyses microbiologiques, physico-chimiques et organoleptiques ont été réalisées sur la matrice fromagère à différents moments du procédé et sur les fromages en fin d'affinage.

Le ferment frais a été produit par Actalia dans des conditions traditionnelles (annexe 1) et le ferment lyophilisé a été produit à l'INRA dans les conditions optimisées décrites dans la publication n° 1.

Les tommes de Savoie ont été fabriquées à partir du même lait et dans les mêmes conditions de fabrication (process en annexe 2), seul le mode d'ensemencement de *L. lactis* TOMSC161 (ferment frais ou lyophilisé) diffère entre les deux modalités de fabrication. De plus, chaque modalité de fabrication fromagère a été réalisée en triplicat à partir de cultures indépendantes de *L. lactis* TOMSC161. Il est important de noter que seule la souche *L. lactis* TOMSC161 a été utilisée pour l'apport en bactéries mésophiles afin de pouvoir suivre sa concentration tout au long du procédé de fabrication et de mieux évaluer ses fonctionnalités.

Les contrôles et analyses effectués sur les matrices fromagères au cours de la fabrication des tommes de Savoie sont (annexe 3) :

- Analyses microbiologiques du lait à la réception et à l'emprésurage
- Suivi de la concentration en lactocoques
- Suivi du pH
- Suivi des sucres (lactose et galactose) et des acides (lactate)
- Suivi de la teneur en extrait sec, de la teneur en matière grasse et de l'a_w
- Mesure de la teneur en sel (NaCl) et du niveau de protéolyse (concentration en NH_3) des fromages en fin d'affinage
- Analyses sensorielles des fromages en fin d'affinage. La présentation, la texture et le goût des fromages ont été évalués par un panel d'experts. De plus, un test triangulaire a été réalisé sur un jury non entrainé.

La comparaison du suivi de l'acidification du lait, des analyses microbiologiques et de la composition physico-chimique des matrices fromagères à différents moments de la fabrication ainsi que les tests sensoriels réalisés sur les fromages affinés ont permis d'étudier l'impact de la lyophilisation de *L. lactis* TOMSC161 sur les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques des fromages.

III.4.3. Résultats

III.4.3.1. Caractéristiques des ferments

Avant la fabrication fromagère, la performance des ferments a été évaluée par des mesures d'activité acidifiante réalisées avec le système CinAc®. Pour cela, les laits ont été ensemencés à la même concentration (10^6 UFC/mL) et ont subi un cycle classique de température de fabrication de pâte

pressée non cuite. Des cinétiques d'acidification comparables ont été obtenues avec le ferment frais et le ferment lyophilisé.

L'ensemencement des laits en *L. lactis* TOMSC161 pour la fabrication fromagère peut donc être effectué à la même concentration cellulaire et à la même activité acidifiante quel que soit le mode d'ensemencement.

III.4.3.2. Analyses microbiologiques des fromages

Un dénombrement des flores thermophiles (streptocoques et lactobacilles) et mésophiles (lactocoques) a été réalisé sur les matrices fromagères à l'emprésurage afin de vérifier les ensemencements réalisés. Des concentrations similaires des différentes flores ont été obtenues quelle que soit la modalité de fabrication fromagère (tableau III.2).

Tableau III.2 : Dénombrements de différentes flores dans la matrice fromagère à l'emprésurage

	Caillés fabriqués avec	
	Ferment frais	**Ferment lyophilisé**
Streptocoques thermophiles (logUFC/mL)	6,4 ± 0,1	6,5 ± 0,2
Lactobacilles thermophiles (logUFC/mL)	5,4 ± 0,1	5,4 ± 0,2
Lactocoques mésophiles (logUFC/mL)	6,4 ± 0,1	6,3 ± 0,2

De plus, le dénombrement en lactocoques dans la matrice fromagère a été effectué tout au long de la fabrication. La figure III.3 ne montre pas de différence de concentration en lactocoques dans les matrices fromagères issues des deux modalités de fabrication, excepté une heure après le moulage où une faible différence de concentration est obtenue. Cependant, cette différence n'est pas significative selon le test de Newmann-Keuls (p-value = 0,05).

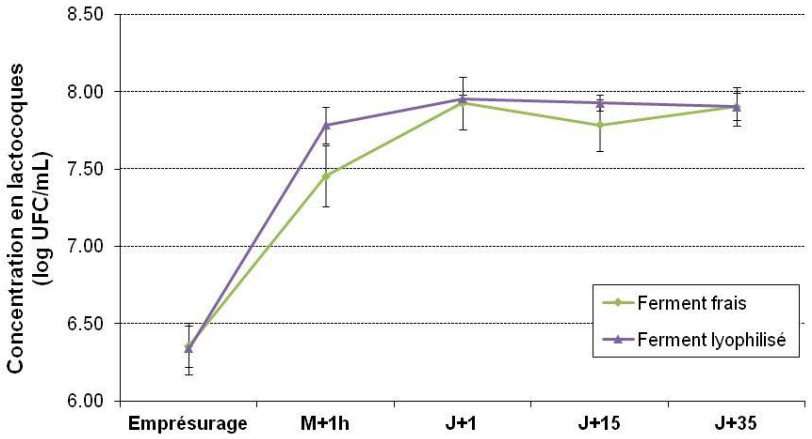


Figure III.3 Suivi de la population en lactocoques dans la matrice fromagère au cours de la fabrication (M, moulage)

III.4.3.3. Analyses physico-chimiques des fromages

Bien que les concentrations en lactocoques dans la matrice fromagère soient similaires entre les deux modalités de fabrication, les bactéries peuvent présenter une activité acidifiante spécifique différente. Ainsi, un suivi du pH a également été réalisé au cours de la fabrication et a montré que les courbes d'acidification sont très proches entre les deux modalités de fabrication (figure III.4). Cependant, il faut savoir que l'acidification de la matrice fromagère est surtout due à l'activité des streptocoques thermophiles et non à celle des lactocoques.

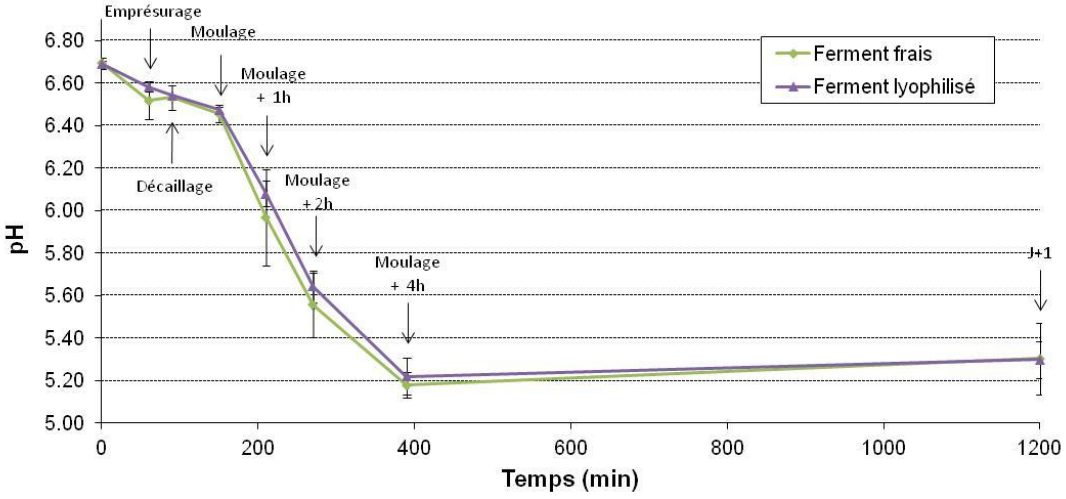


Figure III.4 Évolution du pH dans la matrice fromagère au cours de la fabrication

De plus, les mêmes profils de consommation des sucres (lactose et galactose) et de production d'acide lactique ont été obtenus au cours de l'affinage des fromages quelle que soit la modalité de fabrication (tableau III.3).

Tableau III.3 : Consommation des sucres au cours de la fabrication et de l'affinage des fromages

		Fromages fabriqués avec	
		Ferment frais	**Ferment lyophilisé**
J+1	Galactose (mg/100g)	847 ± 50	877 ± 38
	Lactose (mg/100g)	3 ± 6	0 ± 0
	Lactates totaux (mg/100g)	1107 ± 51	1113 ± 61
J+15	Galactose (mg/100g)	327 ± 71	280 ± 44
	Lactose (mg/100g)	7 ± 6	3 ± 6
	Lactates totaux (mg/100g)	1162 ± 32	1170 ± 11
J+35	Lactates totaux (mg/100g)	1 243 ± 110	1 087 ± 171

Enfin, d'autres caractéristiques physico-chimiques des matrices fromagères ont été mesurées une heure après moulage, après un jour et en fin d'affinage : teneur en matière grasse sur extrait sec (G/S), humidité sur extrait sec dégraissé (H/ESD), activité de l'eau (a_w), concentrations en calcium, en ammoniaque (NH_3) et en sel (NaCl) (tableau III.4).

Tableau III.4 : Caractéristiques physico-chimiques des matrices fromagères (H/ESD, humidité sur extrait sec dégraissé ; a_w, activité de l'eau)

		Fromages fabriqués avec	
		Ferment frais	**Ferment lyophilisé**
Moulage +1h	H/ESD	2,33 ± 0,10	2,21 ± 0,07
J+1	H/ESD	1,83 ± 0,06	1,81 ± 0,10
	Aw	0,994 ± 0,004	0,990 ± 0,001
	Calcium (mg/100g)	673 ± 10	667 ± 16
J+35	H/ESD	1,51 ± 0,09	1,52 ± 0,03
	Aw	0,973 ± 0,002	0,970 ± 0,002
	NH_3 (mg/100g)	28 ± 9	32 ± 1
	NaCl (g/100g)	1,49 ± 0,05	1,41 ± 0,08

Afin de pouvoir comparer les fabrications entre elles, il est important de s'assurer que les fromages produits présentent les mêmes caractéristiques de composition en termes de teneur en sel, de ratio G/S et d'humidité avec l'H/ESD. En effet, ces différents paramètres ont un impact important sur le goût et la texture mais également sur les activités bactériennes et enzymatiques. La teneur en sel, les ratios G/S et H/ESD ne sont pas apparus significativement différents entre les deux modalités de

fabrication. Ceci indique une très bonne répétabilité des fabrications et prouve que les possibles différences sensorielles observées par la suite ne seront pas dues à des différences de fabrication fromagère autres que les deux modalités d'ensemencent de la souche *L. lactis* TOMSC161. Les fromages avaient respectivement un extrait sec de 50 et de 52 % en fin de pressage et en fin d'affinage (35 jours).

De plus, les niveaux de minéralisation (teneur en calcium) étaient également similaires et confirment ce qui a été observé au niveau des courbes d'acidification.

Enfin, les niveaux d'ammoniaque atteints en fin d'affinage ont permis d'apprécier le niveau de protéolyse global des fromages. Les résultats n'ont pas montré de différence significative au niveau de la protéolyse des fromages. En revanche, les fromages sont apparus faiblement protéolysés (28 à 32 mg de NH_3 pour 100 g de fromage). Le niveau de protéolyse habituellement rencontrés en fabrication de tomme de Savoie est de 60 mg de NH_3 pour 100 g de fromage. Cela peut s'expliquer par le fait que les fromages ont été fabriqués avec seulement une souche de lactocoque (*L. lactis* TOMSC161) alors qu'habituellement, un cocktail de souches mésophiles, ayant des caractéristiques amino-peptidasiques variées, est inoculé.

III.4.3.4. Analyses sensorielles des fromages affinés

Un profil sensoriel des différentes tommes de Savoie a été réalisé par un panel expert sur les fromages affinés (35 jours) (annexe 4). Cette évaluation a porté sur différents critères pouvant être regroupés en 3 catégories : aspect visuel, texture et goût du fromage. Chaque critère a été noté entre 0 et 9. Par ailleurs, une note d'appréciation globale de l'aspect visuel, de la texture et du goût des fromages (sur 20) a été donnée. Les résultats sont regroupés dans le tableau III.5.

Les tommes produites à partir des différents ferments n'ont pas montré de différence significative au niveau de leur aspect visuel (humidité du croûtage, développement du feutrage, nombre d'ouvertures et homogénéité de la couleur de la pâte).

Les fabrications avec le ferment lyophilisé sont également très proches des fabrications avec le ferment frais en termes de texture avec aucune différence significative des notes de fermeté, d'élasticité, de fondant et de collant.

Enfin, les tommes de Savoie sont semblables au niveau du goût. Aucune différence significative n'a été décelée par le jury expert en ce qui concerne l'intensité du goût général, de l'acide, du salé, du goût beurré, du piquant, de l'ammoniaqué et de l'amer.

Ces résultats ainsi que les notes d'appréciation ont clairement démontré que les deux types de fromages présentent une qualité organoleptique très proche.

Tableau III.5 Evaluation sensorielle et notes d'appréciation des fromages

		Fromages fabriqués avec	
		Ferment frais	**Ferment lyophilisé**
Evaluation de l'aspect visuel	Humidité du croûtage	3,0 ± 1,2	3,5 ± 1,0
	Développement du feutrage	8,0 ± 0,1	7,9 ± 0,3
	Nombre d'ouvertures	5,1 ± 0,3	5,5 ± 0,5
	Homogénéité de la couleur	6,4 ± 0,6	7,4 ± 0,4
Evaluation de la texture	Fermeté	4,6 ± 0,5	4,3 ± 0,5
	Elasticité	4,4 ± 0,8	4,5 ± 0,8
	Fondant	4,1 ± 0,8	4,1 ± 0,9
	Collant	3,3 ± 0,4	3,3 ± 0,7
Evaluation du goût	Intensité du goût	5,4 ± 0,5	6,3 ± 0,4
	Acide	5,3 ± 0,9	4,8 ± 0,8
	Salé	4,6 ± 0,6	4,1 ± 0,5
	Goût beurré	2,1 ± 0,7	2,8 ± 0,6
	Piquant	1,4 ± 0,4	2,3 ± 0,7
	Ammoniaqué	1,6 ± 0,4	1,8 ± 0,4
	Amer	2,9 ± 0,3	2,3 ± 0,6
Note d'appréciation	Aspect visuel	14,0 ± 1,6	14,0 ± 1,2
	Texture	11,9 ± 0,8	13,3 ± 1,1
	Goût	11,4 ± 0,5	12,0 ± 1,1

Des tests triangulaires ont également été réalisés à partir d'un jury non entraîné et prouvent, là encore, que les deux types de fromages sont semblables d'un point de vue sensoriel. En effet, les jurys non entrainés n'ont pas réussi à différencier les fromages avec 6 réponses justes et 6 réponses fausses.

III.4.4. Conclusion

L'ensemble des analyses réalisées sur les tommes de Savoie issues des deux modalités de fabrication (ferment frais ou lyophilisé) a montré que les fromages sont similaires. Les propriétés acidifiantes mais également les autres caractéristiques technologiques telles que les propriétés texturantes ont bien été conservées malgré l'étape de lyophilisation de *L. lactis* TOMSC161. Ces résultats valident ainsi l'optimisation de la production de *L. lactis* TOMSC161 réalisée au cours de ce travail de thèse.

Conclusion Générale et Perspectives

Conclusion générale et perspectives

Les ferments lactiques jouent un rôle majeur dans le marché industriel des produits fermentés, notamment dans l'industrie laitière où ils interviennent au cours de la fabrication de divers produits laitiers tels que les yaourts, les laits fermentés et les fromages. Leur production à l'échelle industrielle est réalisée par fermentation, suivie d'une stabilisation (congélation ou lyophilisation) permettant de conserver les bactéries à long terme en vue de leur utilisation ultérieure dans les procédés industriels. La lyophilisation de ces bactéries lactiques et plus précisément la préservation de leurs caractéristiques fonctionnelles est essentielle pour que les industriels disposent de souches stables dans le temps. Cependant, les procédés de stabilisation (congélation, lyophilisation) et de stockage induisent différents types de stress pour les cellules bactériennes, entrainant une dégradation de la performance des ferments (cultivabilité et fonctionnalité). Dans un souci de maintien de la qualité technologique des ferments, il apparaît donc impératif pour les industriels d'optimiser et de maîtriser la préservation des cellules bactériennes. Face à cette problématique, ces travaux de thèse ont ainsi été entrepris dans un triple objectif : (1) mieux comprendre l'incidence de l'état physiologique des cellules de *L. lactis* TOMSC161 au moment de la récolte sur leur tolérance à la lyophilisation et au stockage, (2) proposer des leviers au niveau de la conduite de la fermentation afin d'améliorer la résistance de *L. lactis* TOMSC161 au procédé ultérieur de stabilisation et (3) identifier des descripteurs pertinents de l'état physiologique ayant un impact sur l'aptitude des cellules à résister à ce procédé et permettant le développement d'outils simples d'évaluation de ces descripteurs pour les professionnels de la filière laitière.

Au regard de ces objectifs, la première partie de cette thèse concernait l'étude de l'incidence de la température et du pH de fermentation mais aussi de l'instant de récolte sur la résistance à la lyophilisation et à la conservation de *L. lactis* TOMSC161. D'une part, ces résultats ont montré que les étapes critiques, en termes de pertes de cultivabilité et/ou d'activité acidifiante de *L. lactis*, étaient l'étape de séchage du procédé de lyophilisation (dessiccation primaire et secondaire) et le stockage à 25 °C. D'autre part, cette étude a mis en évidence une influence combinée de la température et de l'instant de récolte sur la perte d'activité acidifiante du ferment pendant l'étape de séchage. Cette première étude a ainsi permis d'identifier des conditions de fermentation et de récolte conduisant à une meilleure préservation de cette souche technologiquement intéressante. Plus les cellules sont récoltées tardivement en phase stationnaire, mieux elles résistent au procédé de lyophilisation. En ce qui concerne l'influence de la température de fermentation, celle-ci dépend de l'instant de récolte. Cependant des températures basses amènent à une plus faible résistance des cellules à l'étape de séchage quel que soit l'instant de récolte. La meilleure tolérance des cellules à l'étape de séchage et

donc à la lyophilisation a été obtenue pour une fermentation à la température optimale de croissance (30 °C) et pour une récolte tardive en phase stationnaire (6 heures de phase stationnaire). De plus, un stockage des ferments à température réfrigérée (4 °C) permet une bonne stabilité des ferments (cultivabilité et activité acidifiante) quelles que soient les conditions de fermentation.

En outre, cette étude préliminaire nous a aussi permis d'identifier des conditions de fermentation permettant d'obtenir des ferments ayant des résistances différentes à ce procédé de stabilisation. Les résistances extrêmes de *L. lactis* TOMSC161 à la lyophilisation ont été obtenues pour des cultures à 22 et à 30 °C et pour des récoltes en entrée en phase stationnaire et en phase stationnaire avancée. Il est important de noter que l'ensemble des ferments ont été stabilisés dans les mêmes conditions, au cours d'un seul et même cycle de lyophilisation (niveau de déshydratation semblable). Seule une modification de l'état physiologique pouvait ainsi expliquer les différences de résistance observées.

Afin d'identifier des descripteurs de l'état physiologique contribuant à une meilleure résistance cellulaire, la stratégie employée dans la suite des travaux repose sur la comparaison de ferments présentant des états physiologiques différents (issus des conditions de fermentation identifiées précédemment) et la mise en relation de ces descripteurs phsyiologiques avec les données de résistance au procédé de lyophilisation et de stockage. Pour cela, nous avons cultivé les bactéries à deux températures (22 °C et 30 °C) et récolté les cellules à différents moments de la fermentation (du milieu de la phase exponentielle et jusqu'à la phase stationnaire avancée) afin d'effectuer un suivi au cours de la croissance. Tout d'abord, les résultats de sensibilité des cellules ont conforté ceux obtenus dans la première partie en termes de résistance à la lyophilisation. En revanche, l'ajout de deux instants de récolte supplémentaires (milieu et fin de phase exponentielle) a permis d'établir une influence de l'instant de récolte sur la perte de cultivabilité et d'activité acidifiante au stockage. Plus les cellules sont récoltées tardivement, mieux celles-ci résistent également au stockage.

Dans la publication n° 2, l'état physiologique a été caractérisé au niveau membranaire. Les techniques employées dans cette seconde étude ont renseigné à la fois sur la composition en acides gras, la fluidité membranaire et sur la température de transition lipidique afin de décrire au mieux l'état de la membrane des différents ferments (propriétés biochimiques et biophysiques de la membrane). Les résultats ont montré une évolution de la composition en acides gras au cours de la croissance et, plus précisément, une conversion des acides gras insaturés en acides gras cycliques par cyclopropanation. L'augmentation du ratio de la teneur en acides gras cycliques sur la teneur en acides gras insaturés (CFA:UFA) s'est traduite par une rigidification de la membrane de *L. lactis* TOMSC161 maintenue à l'état liquide cristallin. Enfin, l'analyse statistique des différentes données a indiqué une forte corrélation entre la composition en acides gras, la fluidité membranaire et la résistance à la

lyophilisation et au stockage. Plus il y a de cyclopropanation d'acides gras insaturés, plus la membrane se rigidifie et mieux les cellules résistent à ce procédé de préservation.

Afin de compléter la caractérisation de l'état physiologique des différents ferments, des approches de transcriptomique et de protéomique mais aussi une évaluation de l'état d'oxydation des cellules par quantification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ont été mises en œuvre dans une troisième étude. Les résultats ont montré une implication des mécanismes cellulaires liés au métabolisme aérobie dans la tolérance de *L. lactis* TOMSC161 au stress oxydatif provoqué par la lyophilisation et le stockage. En effet, l'état d'oxydation des cellules est négativement relié à leur résistance à la lyophilisation et au stockage. Par ailleurs, plus les cellules sont récoltées tardivement, plus l'état d'oxydation du ferment après chaque étape du procédé de préservation est faible et donc plus il résiste à la lyophilisation et au stockage. L'analyse transcriptomique réalisée sur les cellules cultivées à 30 °C et récoltées en entrée en phase stationnaire et en phase stationnaire avancée ont suggéré une diminution de la consommation en oxygène et donc de la formation de ROS au cours de la phase stationnaire, ce qui a été confirmé par la quantification des ROS sur les cellules ayant subi une congélation et reflétant l'état d'oxydation des cellules fraîches. De plus, l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif augmente au cours de cette phase stationnaire. La pré-adaptation des cellules au stress oxydatif et la diminution de la quantité de ROS intracellulaire leur permettraient donc de mieux résister au stress oxydatif provoqué par la lyophilisation et le stockage.

Dans une dernière partie, une vérification des fonctionnalités du ferment lyophilisé dans les conditions optimisées dans la première étude a été réalisée en fabrication fromagère. Les analyses microbiologiques, physico-chimiques et sensorielles ont montré que les fromages produits à partir de la souche *L. lactis* TOMSC161 sous forme de ferment frais ou lyophilisé sont semblables. Ainsi, les propriétés technologiques fromagères de cette souche sont conservées malgré l'étape de lyophilisation, validant ainsi le travail d'optimisation réalisé au cours de cette thèse.

L'analyse de l'ensemble des résultats acquis au cours de ce travail de thèse a confirmé l'impact majeur de l'état physiologique de *L. lactis* TOMSC161 au moment de la récolte sur l'aptitude des cellules à tolérer les procédés ultérieurs de lyophilisation et de stockage.

Tout d'abord, les différentes approches de caractérisation de l'état physiologique employées au cours de ce travail ont permis d'offrir une vision globale et à plusieurs échelles d'observation de cet état physiologique. De plus, ces différentes approches se sont révélées complémentaires. En effet, la seule mesure de cultivabilité n'est pas suffisante pour évaluer la performance technologique des ferments après lyophilisation et stockage. Ceci démontre l'intérêt de mesurer une activité biologique telle que l'activité acidifiante, fonctionnalité essentielle des bactéries lactiques. Par ailleurs, alors que l'analyse de la composition en acides gras membranaires n'a pas permis de mettre en évidence une

oxydation de ces derniers après lyophilisation et stockage, l'analyse transcriptomique seule n'a pas non plus permis de montrer une expression différentielle de gènes impliqués dans l'altération de la structure des acides gras membranaires tels que la CFA synthase. Ces différentes observations montrent l'importance de considérer différentes méthodes de caractérisation de l'état physiologique des cellules bactériennes pour estimer la performance des ferments mais également afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans la tolérance des bactéries au procédé de préservation.

Les différentes études ont ainsi permis de mettre en lumière une évolution de l'état physiologique de *L. lactis* TOMSC161 au cours de la fermentation mais aussi une modulation de cet état en fonction de la température de fermentation. L'analyse de l'ensemble des résultats a révélé une variation des propriétés de la membrane cytoplasmique et l'état d'oxydation cellulaire (ROS). La confrontation des données physiologiques à la capacité des cellules à résister à la lyophilisation et au stockage a mis en évidence différents mécanismes qui semblent être impliqués dans la tolérance de *L. lactis* à ces procédés. Les résultats majeurs de ce travail indiquent que plus les cellules ont une membrane cytoplasmique rigide et un état initial d'oxydation faible, mieux celles-ci résistent au procédé de lyophilisation et de stockage. Par une meilleure compréhension de la physiologie des bactéries, ces travaux contribuent ainsi à enrichir les connaissances sur les mécanismes cellulaires affectant l'aptitude des bactéries à tolérer les étapes ultérieures de lyophilisation et de stockage. De plus, ces travaux ont permis l'identification de plusieurs descripteurs pertinents de l'état physiologique ayant un impact sur la tolérance de *L. lactis* à ces procédés : ratio CFA:UFA, fluidité membranaire, proportion de cellules contenant des ROS et niveau d'accumulation intracellulaire de ROS.

Dans l'objectif d'une meilleure maîtrise de la performance des ferments lyophilisés, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont aussi permis d'apporter des connaissances nouvelles sur les possibilités de contrôler l'état physiologique des bactéries par le mode de conduite de la fermentation (température) et de la récolte (instant de récolte). A la température optimale de croissance, il conviendra d'agir sur l'instant de récolte pour garantir une bonne qualité des ferments lyophilisés

Dans cette optique, il serait donc primordial pour les producteurs de ferments de posséder des outils simples permettant de caractériser et donc de maîtriser l'état physiologique des cellules avant récolte. Ce travail est ainsi à l'origine du développement de deux nouvelles méthodes d'évaluation, par cytométrie en flux, d'indicateurs physiologiques pertinents liés à la lyotolérance de *L. Lactis* TOMSC161 : la fluidité membranaire et l'état d'oxydation des cellules (ROS). Ces méthodes se basent sur un marquage des cellules avec un fluorochrome adapté et le passage d'un faible volume de suspension cellulaire en cytométrie en flux pour l'analyse individuelle de cellules. La rapidité, la simplicité et la sensibilité de ces méthodes permettent donc de caractériser l'état physiologique des bactéries au cours de la fermentation. Ces deux méthodes permettent donc d'envisager des

perspectives prometteuses pour des applications industrielles aussi bien en recherche et développement qu'en routine comme outil d'aide à la décision de l'arrêt de la culture.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse permettent d'ouvrir de nombreuses perspectives à court et à moyen terme.

Il s'agira dans un premier temps de poursuivre l'analyse des données issues des techniques « omic ». La quantification des protéines détectées par LC-MS/MS puis l'analyse conjointe des données quantitatives issues de la trancriptomique et de la protéomique permettront de valider ou non les conclusions avancées à partir des seules observations au niveau du transcriptome. Ce travail permettra également d'approfondir la compréhension des mécanismes biologiques de réponse des bactéries aux conditions de fermentation qui leur permettent de s'adapter et de résister aux stress ultérieurs provoqués par la lyophilisation et le stockage. De plus, la comparaison de l'état physiologique des cellules en entrée en phase stationnaire et en phase stationnaire avancée pourra être complétée par la comparaison de l'état physiologique des cellules cultivées à deux températures (22 et 30°C) et récoltées en entrée en phase stationnaire afin de comprendre les différences d'état d'oxydation cellulaire observées. Enfin, l'analyse spécifique des protéines membranaires et l'établissement de liens entre les propriétés de la membrane caractérisées dans la seconde étude et le protéome membranaire permettront également d'accroître la compréhension des phénomènes biologiques, au niveau de la membrane cytoplasmique, impliqués dans le maintien de la survie cellulaire et de l'activité acidifiante des cellules.

Il conviendrait aussi d'intégrer toutes les données issues des différents niveaux d'analyse biologique par des outils mathématiques de modélisation dans une démarche de biologie intégrative afin d'affiner la compréhension globale des processus biologiques mis en place par les bactéries dans les différentes conditions étudiées. En effet, la complexité biologique s'étend au-delà de la simple addition des propriétés déduites des différents niveaux d'analyses. Les fonctions cellulaires vont naître des interactions entre les divers éléments qui la composent.

L'approfondissement des aspects oxydatifs étudiés dans la 3ème partie de cette thèse semble aussi nécessaire et fait déjà l'objet d'autres projets au laboratoire. La mise au point de la mesure du stress oxydatif par cytométrie en flux doit encore être optimisée bien que les analyses issues de ces mesures et présentées dans ce mémoire de thèse semblent cohérentes. Les ROS produits par les cellules bactériennes pouvant être de plusieurs natures, il serait intéressant de mettre au point des méthodes de quantification du peroxyde d'hydrogène et du radical hydroxyle avec des marqueurs spécifiques tels que, respectivement, le dihydrorhodamine 123 (DHR) et le HPF (acide benzoïque 2-[6-(4'-hydroxy)phénoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl). De plus ces espèces sont peu stables et provoquent l'oxydation de nombreuses biomolécules (lipides, protéines et acides nucléiques). Il serait judicieux de s'intéresser à l'état d'oxydation ou de dégradation de ces différentes biomolécules comme par exemple

la mesure de la peroxydation lipidique par la méthode TBARS ou la mesure de dégradation de l'ADN à l'aide d'un bioanalyzer…

L'étude du métabolome des cellules constitue une autre perspective intéressante. En effet, la quantification de certains composés tels que le NADH, NAD^+ et Fe^{2+} pourrait confirmer et/ou enrichir les connaissances sur les mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse au stress oxydatif et donc impliqués dans une meilleure tolérance des bactéries lactiques au procédé de lyophilisation.

Au niveau de l'application industrielle, d'autres pistes d'amélioration sont envisageables. L'une d'elles porte sur la mise en œuvre d'une modulation du milieu de culture avec l'ajout d'acide oléique pour accroître la résistance des cellules à la lyophilisation. Plusieurs études ont déjà montré une amélioration de la cryotolérance des bactéries par l'ajout d'acide oléique dans le milieu de culture qui serait due à l'incorporation de cet acide gras insaturé dans les membranes cellulaires. Cependant, qu'en est-il d'une possible cyclopropanation de cet acide gras pour améliorer la lyotolérance de *L. lactis* ? L'aération de la culture tout au long de la fermentation est une deuxième piste intéressante et pourrait permettre une réelle pré-adaptation des cellules au stress oxydatif.

Enfin, tous les résultats présentés dans ce manuscrit ont été obtenus avec la souche *L. lactis* subsp. *lactis* TOMSC161. Or, quatre autres souches de *L. lactis* ont été isolées de la tomme de Savoie et jugées intéressantes technologiquement. Même si certains mécanismes généraux, tels que la synthèse de protéines de stress ou la modification de la composition en acides gras membranaires ont déjà été observés chez d'autres bactéries lactiques, l'effet souche est très important dans les études de physiologie bactérienne. Il serait intéressant de valider certains résultats et en particulier l'utilisation des descripteurs cytométriques comme aide à l'optimisation de la production pour que les producteurs de ferments puissent proposer ces autres souches à la vente. De plus, afin de pouvoir généraliser les conclusions fournies par ce travail et les méthodes d'évaluation de l'état cellulaire développées au cours de ce travail de thèse, il conviendrait également de confirmer/d'élargir ces résultats à d'autres espèces ou d'autres genres de bactéries lactiques sensibles à la lyophilisation.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

Achour M., Mtimet N., Cornelius C., Zgouli S., Mahjoub A., Thonart P., Hamdi M. (2001). Application of the accelerated shelf life testing method (ASLT) to study the survival rates of freeze-dried *Lactococcus* starter cultures. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **76:** 624-628.

Adamberg K., Kask S., Laht T. M., Paalme T. (2003). The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *International Journal of Food Microbiology*, **85:** 171-183.

Akerberg C., Hofvendahl K., Zacchi G., Hahn-Hagerdal B. (1998). Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **49:** 682-690.

Ampatzoglou A., Schurr B., Deepika G., Baipong S., Charalampopoulos D. (2010). Influence of fermentation on the acid tolerance and freeze drying survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Biochemical Engineering Journal*, **52:** 65-70.

Anders S., Huber W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, **11:** 1-12

Andersen A. B., Fog-Petersen M. S., Larsen H., Skibsted L. H. (1999). Storage stability of freeze-dried starter cultures (*Streptococcus thermophilus*) as related to physical state of freezing matrix. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **32:** 540-547.

Aschenbrenner M., Kulozik U., Foerst P. (2012). Evaluation of the relevance of the glassy state as stability criterion for freeze-dried bacteria by application of the Arrhenius and WLF model. *Cryobiology*, **65:** 308-318.

Ayala-Hernandez I., Hassan A., Goff H. D., de Orduna R. M., Corredig M. (2008). Production, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JFR1 and their interaction with milk proteins: Effect of pH and media composition. *International Dairy Journal*, **18:** 1109-1118.

Baati L., Fabre-Gea C., Auriol D., Blanc P. J. (2000). Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. *International Journal of Food Microbiology*, **59:** 241-247.

Bank H., Mazur P. (1973). Visualization of freezing damage. *The Journal of cell biology*, **57:** 729-42.

Beal C., Corrieu G. (1994). Viability and acidification activity of pure and mixed starters of *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* 404 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 398 at the different steps of their production. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, **27:** 86-92.

Beal C., Fonseca F., Corrieu G. (2001a). Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* is related to membrane fatty acid composition. *Journal of Dairy Science*, **84:** 2347-2356.

Beal C., Marin M., Fonseca F., Corrieu G. (2001b). Procédé de préparation d'une compostion lyophilisée contenant des bactéries lactiques à viabilité et activité bactériennes améliorées lors d'un stockage à température ambiante et composition obtenue. INRA. FR Pat. No. 2829147 B1.

Beal, C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F., Obert J. P. (2008). Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. *In Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments.* Corrieu, G. and Luquet, F-M. (ed). Tec&Doc Lavoisier, Paris, 661-785.

Beney L., Gervais P. (2001). Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57:** 34-42.

Benjamini Y., Hochberg Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate - a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological*, **57:** 289-300.

Bhandari B. R., Howes T. (1999). Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. *Journal of Food Engineering*, **40:** 71-79.

Bibal B., Goma G., Vayssier Y., Pareilleux A. (1988). Influence of pH, lactose and lactic acid on the growth of *Streptococcus cremoris* : a kinetic study. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **28:** 340-344.

Bischof J. C., Wolkers W. F., Tsvetkova N. M., Oliver A. E., Crowe J. H. (2002). Lipid and protein changes due to freezing in dunning AT-1 cells. *Cryobiology*, **45:** 22-32.

Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarme K., Weissenbach J., Ehrlich S. D., Sorokin A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research*, **11:** 731-753.

Borst J. W., Visser N. V., Kouptsova O., Visser A. (2000). Oxidation of unsaturated phospholipids in membrane bilayer mixtures is accompanied by membrane fluidity changes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1487:** 61-73.

Bouty J. L., Mouchot J. C. (1981). Utilization of a freeze-dried culture for direct inoculation in the manufacture of a pressed cheese (Tomme de Savoie). *Revue Laitiere Francaise*, **401:** 19-25.

Bouvier J., Bordes P., Romeo Y., Fourcans A., Bouvier I., Gutierrez C. (2000). Characterization of OpuA, a glycine-betaine uptake system of *Lactococcus lactis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **2:** 199-205.

Bozoglu T. F., Ozilgen M., Bakir U. (1987). Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme and Microbial Technology*, **9:** 531-537.

Broadbent J. R., Lin C. (1999). Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization. *Cryobiology*, **39:** 88-102.

Bryson K., Loux V., Bossy R., Nicolas P., Chaillou S., van de Guchte M., Penaud S., Maguin E., Hoebeke M., Bessieres P., Gibrat J. F. (2006). AGMIAL: implementing an annotation strategy for prokaryote genomes as a distributed system. *Nucleic Acids Research*, **34:** 3533-3545.

Carvalho A. S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F. X., Gibbs P. (2003a). Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *Journal of Applied Microbiology*, **94:** 947-952.

Carvalho A. S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F. X., Gibbs P. (2003b). Effects of addition of sucrose and salt, and of starvation upon thermotolerance and survival during storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Food Science*, **68:** 2538-2541.

Carvalho A. S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F. X., Gibbs P. (2003c). Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. *Lait*, **83:** 203-210.

Carvalho A. S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F. X., Gibbs P. (2004). Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Biotechnology Progress*, **20:** 248-254.

Casalta E., Montel M. C. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, **126:** 271-273.

Castro H. P., Teixeira P. M., Kirby R. (1995). Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **44:** 172-176.

Castro H. P., Teixeira P. M., Kirby R. (1996). Changes in the cell membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. *Biotechnology Letters*, **18:** 99-104.

Cerning J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Fems Microbiology Reviews*, **7:** 113-30.

Champagne C. P., Mondou F., Raymond Y., Roy D. (1996). Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Food Research International*, **29:** 555-562.

Champagne C. P., Gagnon D., St-Gelais D., Vuillemard J. C. (2009). Interactions between *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus* strains in Cheddar cheese processing conditions. *International Dairy Journal*, **19:** 669-674.

Chapot-Chartier M. P., Vinogradov E., Sadovskaya I., Andre G., Mistou M. Y., Trieu-Cuot P., Furlan S., Bidnenko E., Courtin P., Pechoux C., Hols P., Dufrene Y. F., Kulakauskas S. (2010). Cell surface of *Lactococcus lactis* is covered by a protective polysaccharide pellicle. *Journal of Biological Chemistry*, **285:** 10464-10471.

Chavarri F. J., Depaz M., Nunez M. (1988). Optimization of fermentation parameters for the production of concentrated starters from nonbitter *Streptococcus lactis* Inia-12. *Journal of Food Science*, **53:** 1854-1857.

Cocaign-Bousquet M., Garrigues C., Loubiere P., Lindley N. D. (1996). Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, **70:** 253-267.

Cogan T. M., Barbosa M., Beuvier E., Bianchi-Salvadori B., Cocconcelli P. S., Fernandes I., Gomez J., Gomez R., Kalantzopoulos G., Ledda A., Medina M., Rea M. C., Rodriquez E. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, **64:** 409-421.

Conrad P. B., Miller D. P., Cielenski P. R., de Pablo J. J. (2000). Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology*, **41:** 17-24.

Corcoran B. M., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Stanton C. (2004). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, **96:** 1024-1039.

Corroler D., Mangin I., Desmasures N., Gueguen M. (1998). An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the Camembert cheese Registered Designation of Origin area. *Applied and Environmental Microbiology*, **64:** 4729-4735.

Costa E., Usall J., Teixido N., Garcia N., Vinas I. (2000). Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, **89:** 793-800.

Costa N. E., Wang L., Auty M. E., Hannon J. A., Mc Sweeney P. L. H., Beresford T. P. (2012). Rheological, microscopic and primary chemical characterisation of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DPC6532. *Dairy Science & Technology*, **92:** 219-235.

Coulibaly I., Dubois-Dauphin R., Danthine S., Majad L., Mejoub T., Destain J., Bera F., Wathelet J. P., Thonart P. (2011). Preservation of industrial's lactic acid bacteria (probiotics) by freeze-drying. *Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement*, **15:** 287-299.

Cronan J. E. (2002). Phospholipid modifications in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, **5:** 202-205.

Crowe J. H., Crowe L. M., Chapman D. (1984). Infrared spectroscopic studies on interactions of water and carbohydrates with a biological membrane. *Archives of biochemistry and biophysics*, **232:** 400-407.

Crowe J. H., Hoekstra F. A., Crowe L. M., Anchordoguy T. J., Drobnis E. (1989a). Lipid phase transitions measured in intact cells with Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology*, **26:** 76-84.

Crowe J. H., McKersie B. D., Crowe L. M. (1989b). Effects of free fatty acids and transition temperature on the stability of dry liposomes. *Biochimica et biophysica acta*, **979:** 7-10.

Crowe J. H., Carpenter J. F., Crowe L. M. (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, **60:** 73-103.

Csonka L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews*, **53:** 121-147.

Delcour J., Ferain T., Deghorain M., Palumbo E., Hols P. (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Proceedings of the Sixth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, Veldhover, Netherlands, 19-23 September 1999*, **76:** 159-184.

Denich T. J., Beaudette L. A., Lee H., Trevors J. T. (2003). Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods*, **52:** 149-182.

Desmons S., Krhouz H., Evrard P., Thonart P. (1998). Improvement of lactic cell production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **70-2:** 513-526.

de Urraza P., de Antoni G. (1997). Induced cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBB by preincubation at suboptimal temperatures with a fermentable sugar. *Cryobiology*, **35:** 159-164.

Duwat P., Deoliveira R., Ehrlich S. D., Boiteux S. (1995). Repair of oxidative DNA damage in Gram positive bacteria : the *Lactococcus lactis* Fpg protein. *Microbiology-Uk*, **141:** 411-417.

Fernandez Murga M. L. F., Cabrera G. M., Font de Valdez G., Disalvo A., Seldes A. M. (2000). Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Applied Microbiology*, **88:** 342-348.

Ferreira V., Soares V., Santos C., Silva J., Gibbs P., Teixeira P. (2005). Survival of *Lactobacillus sakei* during heating, drying and storage in the dried state when growth has occurred in the presence of sucrose or monosodium glutamate. *Biotechnology Letters*, **27:** 249-252.

Foerst P., Kulozik U., Schmitt M., Bauer S., Santivarangkna C. (2012). Storage stability of vacuum-dried probiotic bacterium *Lactobacillus paracasei* F19. *Food and Bioproducts Processing*, **90:** 295-300.

Fonseca F., Beal C., Corrieu G. (2000). Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Research*, **67:** 83-90.

Fonseca F., Beal C., Corrieu G. (2001a). Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. *Cryobiology*, **43:** 189-198.

Fonseca F., Obert J. P., Beal C., Marin M. (2001b). State diagrams and sorption isotherms of bacterial suspensions and fermented medium. *Thermochimica Acta*, **366:** 167-182.

Fonseca F., Passot S., Cunin O., Marin M. (2004a). Collapse temperature of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* suspensions and protective media. *Biotechnology Progress*, **20:** 229-238.

Fonseca F., Passot S., Lieben P., Marin M. (2004b). Collapse temperature of bacterial suspensions: The effect of cell type and concentration. *Cryoletters*, **25:** 425-434.

Font de Valdez G., Degiori G. S., Holgado A., Oliver G. (1983a). Protective effect of adonitol on lactic acid bacteria subjected to freeze-drying. *Applied and Environmental Microbiology*, **45:** 302-304.

Font de Valdez G., Savoy de Giori G., Pesce de Ruiz Holgado A., Oliver G. (1983b). Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying. *Cryobiology*, **20:** 560-6.

Font de Valdez G., Savoy de Giori G., Ruiz Holgado A. P. d., Oliver G. (1985). Rehydration conditions and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Cryobiology*, **22:** 574-577.

Franca M. B., Panek A. D., Eleutherio E. C. A. (2007). Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, **146:** 621-631.

Garrigues C., Mercade M., Loubiere P., Lindley N. D., Cocaign-Bousquet M. (1998). Metabolic behaviour of *Lactococcus lactis* in response to environmental conditions. *Lait*, **78:** 145-155.

Gautier J., Passot S., Penicaud C., Guillemin H., Cenard S., Lieben P., Fonseca F. (2013). A low membrane lipid phase transition temperature is associated with a high cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* CFL1. *Journal of Dairy Science*, **96:** 5591-5602.

Gautier, V. (2012). Développement de méthodes quantitatives sans marquage pour l'étude protéomique des cellules endothéliales. *Thèse de doctorat*. Centre National de la Recherche Scientifique, France. 203 p.

Geromanos S. J., Vissers J. P. C., Silva J. C., Dorschel C. A., Li G. Z., Gorenstein M. V., Bateman R. H., Langridge J. I. (2009). The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics*, **9:** 1683-1695.

Goldberg I., Eschar L. (1977). Stability of lactic acid bacteria to freezing as related to their fatty acid composition. *Applied and Environmental Microbiology*, **33:** 489-496.

Gomes A., Fernandes E., Lima J. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **65:** 45-80.

Graumann P. L., Marahiel M. A. (1998). A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends in Biochemical Sciences*, **23:** 286-290.

Grogan D. W., Cronan J. E. (1997). Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **61:** 429-441.

Guillot A., Obis D., Mistou M. Y. (2000). Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress. *International Journal of Food Microbiology*, **55:** 47-51.

Heckly R. J., Quay J. (1981). A brief review of lyophilization damage and repair in bacterial preparations. *Cryobiology*, **18:** 592-597.

Higl B., Kurtmann L., Carlsen C. U., Ratjen J., Forst P., Skibsted L. H., Kulozik U., Risbo J. (2007). Impact of water activity, temperature, and physical state on the storage stability of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* freeze-dried in a lactose matrix. *Biotechnology Progress*, **23:** 794-800.

Hofvendahl K., van Niel E. W. J., Hahn-Hagerdal B. (1999). Effect of temperature and pH on growth and product formation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 growing on maltose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51:** 669-672.

Holo H., Nilssen O., Nes I. F. (1991). Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* : Isolation and characterization of the protein and its gene. *Journal of Bacteriology*, **173:** 3879-3887.

Horn G., Hofweber R., Kremer W., Kalbitzer H. R. (2007). Structure and function of bacterial cold shock proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **64:** 1457-1470.

Hua L., Zhao W. Y., Wang H., Li Z. C., Wang A. L. (2009). Influence of culture pH on freeze-drying viability of *Oenococcus oeni* and its relationship with fatty acid composition. *Food and Bioproducts Processing*, **87:** 56-61.

Huang L. J., Lu Z. X., Yuan Y. J., Lu F. X., Bie X. M. (2006). Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* based on response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **33:** 55-61.

Jensen P. R., Hammer K. (1993). Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **59:** 4363-4366.

Johnson J. A. C., Etzel M. R. (1995). Properties of *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 attenuated by spray-drying, freeze-drying, or freezing. *Journal of Dairy Science*, **78:** 761-768.

Johnsson T., Nikkila P., Toivonen L., Rosenqvist H., Laakso S. (1995). Cellular fatty acid profiles of *Lactobacillus* and *Lactococcus* strains in relation to the oleic acid content of the cultivation medium. *Applied and Environmental Microbiology*, **61:** 4497-4499.

Jouppila K., Kansikas J., Roos Y. H. (1997). Glass transition, water plasticization, and lactose crystallization in skim milk powder. *Journal of Dairy Science*, **80:** 3152-3160.

Juillard V., Foucaud C., Desmazeaud M., Richard J. (1996). Utilization of nitrogen sources during growth of *Lactococcus lactis* in milk. *Lait*, **76:** 13-24.

Kets E. P. W., Teunissen P. J. M., de Bont J. A. M. (1996). Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying. *Applied and Environmental Microbiology*, **62:** 259-261.

Keweloh H., Heipieper H. J. (1996). Trans unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids*, **31:** 129-137.

Kilstrup M., Jacobsen S., Hammer K., Vogensen F. K. (1997). Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **63:** 1826-1837.

Kim W. S., Dunn N. W. (1997). Identification of a cold shock gene in lactic acid bacteria and the effect of cold shock on cryotolerance. *Current Microbiology*, **35:** 59-63.

Kim W. S., Khunajakr N., Dunn N. W. (1998). Effect of cold shock on protein synthesis and on cryotolerance of cells frozen for long periods in *Lactococcus lactis*. *Cryobiology*, **37:** 86-91.

Koch S., Eugster-Meier E., Oberson G., Meile L., Lacroix C. (2008). Effects of strains and growth conditions on autolytic activity and survival to freezing and lyophilization of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* isolated from cheese. *International Dairy Journal*, **18:** 187-196.

Koch S., Oberson G., Eugster-Meier E., Melle L., Lacroix C. (2007). Osmotic stress induced by salt increases cell yield, autolytic activity, and survival of lyophilization of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, **117:** 36-42.

Konings W. N., Poolman B., Driessen A. J. M. (1989). Bioenergetics and solute transport in lactococci. *Crc Critical Reviews in Microbiology*, **16:** 419-476.

Konstantinidis A. K., Kuu W., Otten L., Nail S. L., Sever R. R. (2011). Controlled nucleation in freeze-drying: effects on pore size in the dried product layer, mass transfer resistance, and primary drying rate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **100:** 3453-3470.

Kurtmann L., Carlsen C. U., Risbo J., Skibsted L. H. (2009a). Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate. *Cryobiology*, **58:** 175-180.

Kurtmann L., Skibsted L. H., Carlsen C. U. (2009b). Browning of freeze-dried probiotic bacteria cultures in relation to loss of viability during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57:** 6736-6741.

Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, **10:** 1-10

Law J., Haandrikman A. (1997). Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **7:** 1-11.

Leclerc H., Izard D., Husson M. O., Wattre P., Jakubczak E. (1988). *Microbiologie générale*. Doin éditeurs, Paris, 45-84.

Lee D. A., Collins E. B. (1976). Influences of temperature on growth of *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis*. *Journal of Dairy Science*, **59:** 405-409.

Leslie S. B., Israeli E., Lighthart B., Crowe J. H., Crowe L. M. (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology*, **61:** 3592-3597.

Levine H., Slade L. (1988). Thermomechanical properties of small-carbohydrate water glasses and rubbers - kinetically metastable systems at sub-zero temperatures. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions I*, **84:** 2619-2633.

Li B. K., Tian F. W., Liu X. M., Zhao J. X., Zhang H., Chen W. (2011). Effects of cryoprotectants on viability of *Lactobacillus reuteri* CICC6226. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **92:** 609-616.

Li C., Zhao J. L., Wang Y. T., Han X., Liu N. (2009). Synthesis of cyclopropane fatty acid and its effect on freeze-drying survival of *Lactobacillus bulgaricus* L2 at different growth conditions. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **25:** 1659-1665.

Li Y., Hugenholtz J., Abee T., Molenaar D. (2003). Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress. *Applied and Environmental Microbiology*, **69:** 5739-5745.

Linares D. M., Kok J., Poolman B. (2010). Genome sequences of *Lactococcus lactis* MG1363 (Revised) and NZ9000 and comparative physiological studies. *Journal of Bacteriology*, **192:** 5806-5812.

Linders L. J. M., de Jong G. I. W., Meerdink G., van't Riet K. (1997a). Carbohydrates and the dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*: The role of moisture distribution and water activity. *Journal of Food Engineering*, **31:** 237-250.

Linders L. J. M., Wolkers W. F., Hoekstra F. A., van't Riet K. (1997b). Effect of added carbohydrates on membrane phase behavior and survival of dried *Lactobacillus plantarum*. *Cryobiology*, **35:** 31-40.

Linders L. J. M., Kets E. P. W., de Bont J. A. M., van't Riet K. (1998). Combined influence of growth and drying conditions on the activity of dried *Lactobacillus plantarum*. *Biotechnology Progress*, **14:** 537-539.

Liu W., Hansen J. N. (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **56:** 2551-2558.

Loffeld B., Keweloh H. (1996). cis/trans Isomerization of unsaturated fatty acids as possible control mechanism of membrane fluidity in *Pseudomonas putida* P8. *Lipids*, **31:** 811-815.

Looijesteijn P. J., Hugenholtz J. (1999). Uncoupling of growth and exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 and optimization of its synthesis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **88:** 178-182.

Lorca G. L., Font de Valdez G. (1999). The effect of suboptimal growth temperature and growth phase on resistance of *Lactobacillus acidophilus* to environmental stress. *Cryobiology*, **39:** 144-149.

Madigan M., Martinko J. (2006). *Biologie des micro-organismes*. Pearson Education, Inc, Mouguerre, 77.

Magni C., de Mendoza D., Konings W. N., Lolkema J. S. (1999). Mechanism of citrate metabolism in *Lactococcus lactis*: Resistance against lactate toxicity at low pH. *Journal of Bacteriology*, **181:** 1451-1457.

Makarova K., Slesarev A., Wolf Y., Sorokin A., Mirkin B., Koonin E., Pavlov A., Pavlova N., Karamychev V., Polouchine N., Shakhova V., Grigoriev I., Lou Y., Rohksar D., Lucas S., Huang K., Goodstein D. M., Hawkins T., Plengvidhya V., Welker D., Hughes J., Goh Y., Benson A., Baldwin K., Lee J. H., Diaz-Muniz I., Dosti B., Smeianov V., Wechter W., Barabote R., Lorca G., Altermann E., Barrangou R., Ganesan B., Xie Y., Rawsthorne H., Tamir D., Parker C., Breidt F., Broadbent J., Hutkins R., O'Sullivan D., Steele J., Unlu G., Saier M., Klaenhammer T., Richardson P., Kozyavkin S., Weimer B., Mills D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103:** 15611-15616.

Marin M., Rene F. (2008). Lyophilisation. Techniques de l'ingénieur, document F 3 240, 1-9

Martins S. I. F. S., Jongen W. M. F., van Boekel M. A. J. S. (2001). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology*, **11:** 364-373.

Martos G. I., Minahk C. J., Font de Valdez G., Morero R. (2007). Effects of protective agents on membrane fluidity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Letters in Applied Microbiology*, **45:** 282-288.

Mazur P. (1977). Role of intracellular freezing in death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, **14:** 251-272.

Mc Gann L. E. (1978). Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. *Cryobiology*, **15:** 382-390.

Mercade M., Lindley N. D., Loubiere P. (2000). Metabolism of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG 1363 in acid stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, **55:** 161-165.

Mermod M., Mourlane F., Waltersperger S., Oberholzer A. E., Baumann U., Solioz M. (2010). Structure and function of CinD (YtjD) of *Lactococcus lactis*, a copper-induced nitroreductase involved in defense against oxidative stress. *Journal of Bacteriology*, **192:** 4172-4180.

Mills S., Mc Auliffe O. E., Coffey A., Fitzgerald G. F., Ross R. P. (2006). Plasmids of lactococci - genetic accessories or genetic necessities? *Fems Microbiology Reviews*, **30:** 243-273.

Molenaar D., Hagting A., Alkema H., Driessen A. J. M., Konings W. N. (1993). Characteristics and osmoregulatory roles of uptake systems for proline and glycine betaine in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, **175:** 5438-5444.

Munoz-Rojas J., Bernal P., Duque E., Godoy P., Segura A., Ramos J. L. (2006). Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Applied and Environmental Microbiology*, **72:** 472-477.

Mykytczuk N. C. S., Trevors J. T., Leduc L. G., Ferroni G. D. (2007). Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, **95:** 60-82.

O'Callaghan J., Condon S. (2000). Growth of *Lactococcus lactis* strains at low water activity: correlation with the ability to accumulate glycine betaine. *International Journal of Food Microbiology*, **55:** 127-131.

Obis D., Guillot A., Gripon J. C., Renault P., Bolotin A., Mistou M. Y. (1999). Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters. *Journal of Bacteriology*, **181:** 6238-6246.

Obis D., Guillot A., Mistou M. Y. (2001). Tolerance to high osmolality of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *cremoris* is related to the activity of a betaine transport system. *Fems Microbiology Letters*, **202:** 39-44.

Oldenhof H., Wolkers W. F., Fonseca F., Passot S. P., Marin M. (2005). Effect of sucrose and maltodextrin on the physical properties and survival of air-dried *Lactobacillus bulgaricus*: An in situ Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biotechnology Progress*, **21:** 885-892.

Palmfeldt J., Hahn-Hagerdal B. (2000). Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. *International Journal of Food Microbiology*, **55:** 235-238.

Panoff J. M., Thammavongs B., Laplace J. M., Hartke A., Boutibonnes P., Auffray Y. (1995). Cryotolerance and cold adaptation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Cryobiology*, **32:** 516-520.

Passerini D., Beltramo C., Coddeville M., Quentin Y., Ritzenthaler P., Daveran-Mingot M. L., Bourgeois P. l. (2010). Genes but not genomes reveal bacterial domestication of *Lactococcus lactis*. *Plos One*, **5:** 1-12

Passot S., Cenard S., Douania I., Trelea I. C., Fonseca F. (2012). Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, **132:** 1699-1705.

Phadtare S. (2004). Recent developments in bacterial cold-shock response. *Current Issues in Molecular Biology*, **6:** 125-136.

Philippe, N. (2011). Développement de méthodes et d'algorithmes pour la caractérisation et l'annotation des transcriptomes avec les séquenceurs haut débit. *Thèse de doctorat*. Université de Montpellier II, France. 241 p.

Piard J. C., Delorme F., Giraffa G., Commissaire J., Desmazeaud M. (1990). Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ-481. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **44:** 143-158.

Piard J. C., Muriana P. M., Desmazeaud M. J., Klaenhammer T. R. (1992). Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Applied and Environmental Microbiology*, **58:** 279-284.

Picque D., Perret B., Latrille E., Corrieu G. (1992). Characterization and classification of lactic acid bacteria based on their acidification kinetics. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **25:** 181-186.

Poolman B. (2002). Transporters and their roles in LAB cell physiology. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, **82:** 147-164.

Potts M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological Reviews*, **58:** 755-805.

Prasad J., Mc Jarrow P., Gopal P. (2003). Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Applied and Environmental Microbiology*, **69:** 917-925.

Prestrelski S. J., Tedeschi N., Arakawa T., Carpenter J. F. (1993). Dehydration induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophysical Journal*, **65:** 661-671.

Ramos A., Jordan K. N., Cogan T. M., Santos H. (1994). 13C Nuclear magnetic resonance studies of citrate and glucose cometabolism by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **60:** 1739-1748.

Rault A., Bouix M., Beal C. (2010). Cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 is influenced by the physiological state during fermentation. *International Dairy Journal*, **20:** 792-799.

Rey L. (1999). Glimpses into the realm of freeze-drying: Classical issues and new ventures. In Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products. Rey L. and May J.C. (ed). Marcel Dekker, Inc., New York, 231-265.

Romeo Y., Obis D., Bouvier J., Guillot A., Fourcans A., Bouvier I., Gutierrez C., Mistou M. Y. (2003). Osmoregulation in *Lactococcus lactis*: BusR, a transcriptional repressor of the glycine betaine uptake system BusA. *Molecular Microbiology*, **47:** 1135-1147.

Romeo Y., Bouvier J., Gutierrez C. (2007). Osmotic regulation of transcription in *Lactococcus lactis*: Ionic strength-dependent binding of the BusR repressor to the busA promoter. *Febs Letters*, **581:** 3387-3390.

Rozes N., Garbay S., Denayrolles M., Lonvaud-Funel A. (1993). A rapid method for the determination of bacterial fatty acid composition. *Letters in Applied Microbiology*, **17:** 126-131.

Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J., Zoon P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **12:** 163-171.

Ruckold S., Grobecker K. H., Isengard H. D. (2001). The effects of drying on biological matrices and the consequences for reference materials. *Food Control*, **12:** 401-407.

Ruhr E., Sahl H. G. (1985). Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artifical membrane vesicles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **27:** 841-845.

Ryan M. P., Rea M. C., Hill C., Ross R. P. (1996). An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Applied and Environmental Microbiology*, **62:** 612-619.

Saarela M., Virkajarvi I., Alakomi H. L., Mattila-Sandholm T., Vaari A., Suomalainen T., Matto J. (2005). Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients. *Journal of Applied Microbiology*, **99:** 1330-1339.

Salama M. S., Musafijajeknic T., Sandine W. E., Giovannoni S. J. (1995). An ecological study of lactic acid bacteria: Isolation of new strains of *Lactococcus* including *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris*. *Journal of Dairy Science*, **78:** 1004-1017.

Sanders J. W., Leenhouts K. J., Haandrikman A. J., Venema G., Kok J. (1995). Stress response in *Lactococcus lactis*: Cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *Journal of Bacteriology*, **177:** 5254-5260.

Santivarangkna C., Kulozik U., Foerst P. (2008). Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology*, **105:** 1-13.

Santivarangkna C., Kulozik U., Kienberger H., Foerst P. (2009). Changes in membrane fatty acids of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying with sorbitol. *Letters in Applied Microbiology*, **49:** 516-521.

Santivarangkna C., Aschenbrenner M., Kulozik U., Foerst P. (2011). Role of glassy state on stabilities of freeze-dried probiotics. *Journal of Food Science*, **76:** R152-R156.

Savini M., Cecchini C., Verdenelli M. C., Silvi S., Orpianesi C., Cresci A. (2010). Pilot-scale production and viability analysis of freeze-dried probiotic bacteria using different protective agents. *Nutrients*, **2:** 330-339.

Schleifer K. H., Kraus J., Dvorak C., Kilpperbalz R., Collins M. D., Fischer W. (1985). Transfer of Streptococcus lactis and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen-nov. *Systematic and Applied Microbiology*, **6:** 183-195.

Schoug-Bergenholtz A., Wessman P., Wuttke A., Hakansson S. (2012). A case study on stress preconditioning of a *Lactobacillus* strain prior to freeze-drying. *Cryobiology*, **64:** 152-159.

Schoug A., Olsson J., Carlfors J., Schnurer J., Hakansson S. (2006). Freeze-drying of *Lactobacillus coryniformis* Si3 - effects of sucrose concentration, cell density, and freezing rate on cell survival and thermophysical properties. *Cryobiology*, **53:** 119-127.

Schoug A., Fischer J., Heipieper H. J., Schnuerer J., Hakansson S. (2008). Impact of fermentation pH and temperature on freeze-drying survival and membrane lipid composition of *Lactobacillus coryniformis* Si3. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **35:** 175-181.

Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot S., Menzel W., Granzow M., Ragg T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *Bmc Molecular Biology*, **7:** 1-14

Schwab C., Vogel R., Ganzle M. G. (2007). Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying. *Cryobiology*, **55:** 108-114.

Scott C., Rawsthorne H., Upadhyay M., Shearman C. A., Gasson M. J., Guest J. R., Green J. (2000). Zinc uptake, oxidative stress and the FNR-like proteins of *Lactococcus lactis*. *Fems Microbiology Letters*, **192:** 85-89.

Siaterlis A., Deepika G., Charalampopoulos D. (2009). Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying. *Letters in Applied Microbiology*, **48:** 295-301.

Siezen R. J., Bayjanov J., Renckens B., Wels M., van Hijum S., Molenaar D., Vlieg J. (2010). Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147, a plant associated lactic acid bacterium. *Journal of Bacteriology*, **192:** 2649-2650.

Sinensky M. (1974). Homeoviscous adaptation - a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **71:** 522-5.

Singer S. J., Nicolson G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (New York, NY)*, **175:** 720-31.

Smit G., Verheul A., van Kranenburg R., Ayad E., Siezen R., Engels W. (2000). Cheese flavour development by enzymatic conversions of peptides and amino acids. *Food Research International*, **33:** 153-160.

Smittle R. B., Gilliland S. E., Speck M. L., Walter W. M., Jr. (1974). Relationship of cellular fatty acid composition to survival of *Lactobacillus bulgaricus* in liquid nitrogen. *Applied Microbiology*, **27:** 738-43.

Souzu H. (1999). Basic aspects and industrial strategies for the preservation of microorganisms by freezing and drying. In Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products. Rey L. and May J.C. (ed). Marcel Dekker, Inc., New York, 231-265

Spinnler H. E., Corrieu G. (1989). Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. *Journal of Dairy Research*, **56:** 755-764.

Storz G., Imlay J. A. (1999). Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology*, **2:** 188-194.

Strasser S., Neureiter M., Geppl M., Braun R., Danner H. (2009). Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, **107:** 167-177.

Streit F., Delettre J., Corrieu G., Beal C. (2008). Acid adaptation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* induces physiological responses at membrane and cytosolic levels that improves cryotolerance. *Journal of Applied Microbiology*, **105:** 1071-1080.

Streit F., Athes V., Bchir A., Corrieu G., Beal C. (2011). Microfiltration conditions modify *Lactobacillus bulgaricus* cryotolerance in response to physiological changes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **34:** 197-204.

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.

Teixeira P. C., Castro M. H., Malcata F. X., Kirby R. M. (1995). Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* following spray-drying. *Journal of Dairy Science*, **78:** 1025-1031.

To B. C. S., Etzel M. R. (1997). Spray-drying, freeze-drying, or freezing of three different lactic acid bacteria species. *Journal of Food Science*, **62:** 576-585.

Turchi B., van Tassell M. L., Lee A., Nuvoloni R., Cerri D., Miller M. J. (2013). Phenotypic and genetic diversity of wild *Lactococcus lactis* isolated from traditional Pecorino cheeses of Tuscany. *Journal of Dairy Science*, **96:** 3558-3563.

Turner M. S., Tan Y. P., Giffard P. M. (2007). Inactivation of an iron transporter in *Lactococcus lactis* results in resistance to tellurite and oxidative stress. *Applied and Environmental Microbiology*, **73:** 6144-6149.

van der Heide T., Poolman B. (2000). Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97:** 7102-7106.

van Kranenburg R., Kleerebezem M., van Hylckama Vlieg J., Ursing B. M., Boekhorst J., Smit B. A., Ayad E. H. E., Smit G., Siezen R. J. (2002). Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal*, **12:** 111-121.

van Niel E. W. J., Hahn-Hagerdal B. (1999). Nutrient requirements of lactococci in defined growth media. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **52:** 617-627.

van Niel E. W. J., Hofvendahl K., Hahn-Hagerdal B. (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.

Verhue W. M., Tjan F. S. B. (1991). Study of the citrate metabolism of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* by means of C13 nuclear magnetic resonance. *Applied and Environmental Microbiology*, **57:** 3371-3377.

Vido K., Diemer N., van Dorsselaer A., Leize E., Juillard V., Gruss A., Gaudu P. (2005). Roles of thioredoxin reductase during the aerobic life of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, **187:** 601-610.

Wagman J. (1960). Evidence of cytoplasmic membrane injury in the drying of bacteria. *Journal of Bacteriology*, **80:** 558-64.

Wang Y. C., Yu R. C., Chou C. C. (2004). Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology*, **93:** 209-217.

Wang Y., Corrieu G., Beal C. (2005a). Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Journal of Dairy Science*, **88:** 21-29.

Wang Y., Delettre M., Guillot A., Corrieu G., Beal C. (2005b). Influence of cooling temperature and duration on cold adaptation of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Cryobiology*, **50:** 294-307.

Wang, Y. (2005c). Préadaptation et cryotolérance chez *Lactobacillus acidophilus* : effet des conditions opératoires. *Thèse de doctorat*. Institut National Agronomique Paris-Grignon, France. 214 p.

Wang Y., Delettre J., Corrieu G., Beal C. (2011). Starvation induces physiological changes that act on the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Biotechnology Progress*, **27:** 342-350.

Wegmann U., O'Connell-Motherwy M., Zomer A., Buist G., Shearman C., Canchaya C., Ventura M., Goesmann A., Gasson M. J., Kuipers O. P., van Sinderen D., Kok J. (2007). Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Journal of Bacteriology*, **189:** 3256-3270.

Wessman P., Mahlin D., Akhtar S., Rubino S., Leifer K., Kessler V., Hakansson S. (2011). Impact of matrix properties on the survival of freeze-dried bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **91:** 2518-2528.

Wouters J. A., Jeynov B., Rombouts F. M., de Vos W. M., Kuipers O. P., Abee T. (1999). Analysis of the role of 7 kDa cold-shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 in cryoprotection. *Microbiology-Uk*, **145:** 3185-3194.

Wouters J. A., Mailhes M., Rombouts F. M., De Vos W. M., Kuipers O. P., Abee T. (2000). Physiological and regulatory effects of controlled overproduction of five cold shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363. *Applied and Environmental Microbiology*, **66:** 3756-3763.

Wouters J. A., Frenkiel H., de Vos W. M., Kuipers O. P., Abee T. (2001). Cold shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 are involved in cryoprotection and in the production of cold-induced proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, **67:** 5171-5178.

Xie Y., Chou L. S., Cutler A., Weimer B. (2004). DNA macroarray profiling of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 gene expression during environmental stresses. *Applied and Environmental Microbiology*, **70:** 6738-6747.

Yang G., Gilstrap K., Zhang A. L., Xu L. X., He X. M. (2010). Collapse temperature of solutions important for lyopreservation of living cells at ambient temperature. *Biotechnology and Bioengineering*, **106:** 247-259.

Yao A. A., Wathelet B., Thonart P. (2009). Effect of protective compounds on the survival, electrolyte leakage, and lipid degradation of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11 during storage. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **19:** 810-817.

Zhang J., Du G. C., Zhang Y. P., Liao X. Y., Wang M., Li Y., Chen J. (2010). Glutathione protects *Lactobacillus sanfranciscensis* against freeze-thawing, freeze-drying, and cold treatment. *Applied and Environmental Microbiology*, **76:** 2989-2996.

Zhang Y.-M., Rock C. O. (2008). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, **6:** 222-233.

Zhao G., Zhang G. (2005). Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, **99:** 333-338.

Zhao G. Q., Zhang G. (2009). Influence of freeze-drying conditions on survival of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, **135:** 64-67.

Zhao W. Y., Li H., Wang H., Li Z. C., Wang A. L. (2009). The effect of acid stress treatment on viability and membrane fatty acid composition of *Oenococcus oeni* SD-2a. *Agricultural Sciences in China*, **8:** 311-316.

Ziadi M., Touhami Y., Achour M., Thonart P., Hamdi A. (2005). The effect of heat stress on freeze-drying and conservation of *Lactococcus*. *Biochemical Engineering Journal*, **24:** 141-145.

Annexes

Annexe 1 : Conditions de culture de *Lactococcus lactis* TOMSC161 par Actalia

Une préculture de la souche est réalisée sur 10 mL de milieu Elliker et incubée une nuit à 30 °C. Puis 1 mL de préculture sert à ensemencer 200 mL de lait. Cette seconde culture est incubée une nuit à 30 °C. Enfin, 100 mL de cette seconde culture servent à ensemencer 2 L de lait. Cette dernière culture est incubée à 30 °C pendant 19 h pour atteindre un pH de 4,84 et une acidité de 55 ° Dornic. La culture est stockée une nuit à 4 °C avant utilisation pour la fabrication fromagère.

Annexe 2 : Procédé de fabrication de la tomme de Savoie

Les fabrications fromagères ont été réalisées sur la plateforme d'Actalia Produits Laitiers de La Roche-sur-Foron. Le volume de lait transformé est de 120 L par cuve correspondant à la fabrication de 8 tommes qui sont nécessaires pour effectuer l'ensemble des différentes analyses. De plus, chaque fabrication fromagère a été réalisée en triplicat à partir de culture indépendante de *L. lactis TOMSC161*.

Il s'agit d'un procédé classique de production de tomme de Savoie (figure 1) à part que le lait subit une pasteurisation au lieu d'être thermisé et que le ferment mésophile est seulement composé de la souche *L. lactis TOMSC161*. Premièrement, le lait subit une pasteurisation à 72 °C pendant 30 secondes puis est refroidi. Le lendemain, le lait est ensemencé avec le levain cultivé ou le ferment lyophilisé préalablement réhydraté dans du lait à 25 °C pendant 20 min. Un ensemencement en ferments thermophiles et en flore de surface est également réalisé. Le lait est ensuite maturé à 34 °C pendant 45 min afin d'atteindre un pH de 6,55 avant emprésurage. L'emprésurage est réalisé avec de la présure animale (Berthelot, 520 mg) avec un temps de prise de 15 minutes pour une durée de coagulation totale de 30 min. Après durcissement, le décaillage a lieu jusqu'à obtenir un grain de taille « maïs » (3 à 4 mm). Après 45 minutes de brassage, le mélange caillé-sérum est soutiré par gravité à 38 °C dans le répartiteur où le caillé est alors introduit dans les différents moules. Les gâteaux de caillés sont alors pressés par empilement de 3 tommes les unes sur les autres. Le lendemain matin, les fromages sont placés en saumure à 13 °C (densité en NaCl > 1150, 250 $mL.100L^{-1}$ de $CaCl_2$ et 25 $mL.100L^{-1}$ d'acide lactique) et y séjournent 6h. Enfin, l'affinage est réalisé à 12 °C et 95 % d'humidité pendant 35 jours et à raison de 2 à 3 retournements par semaine.

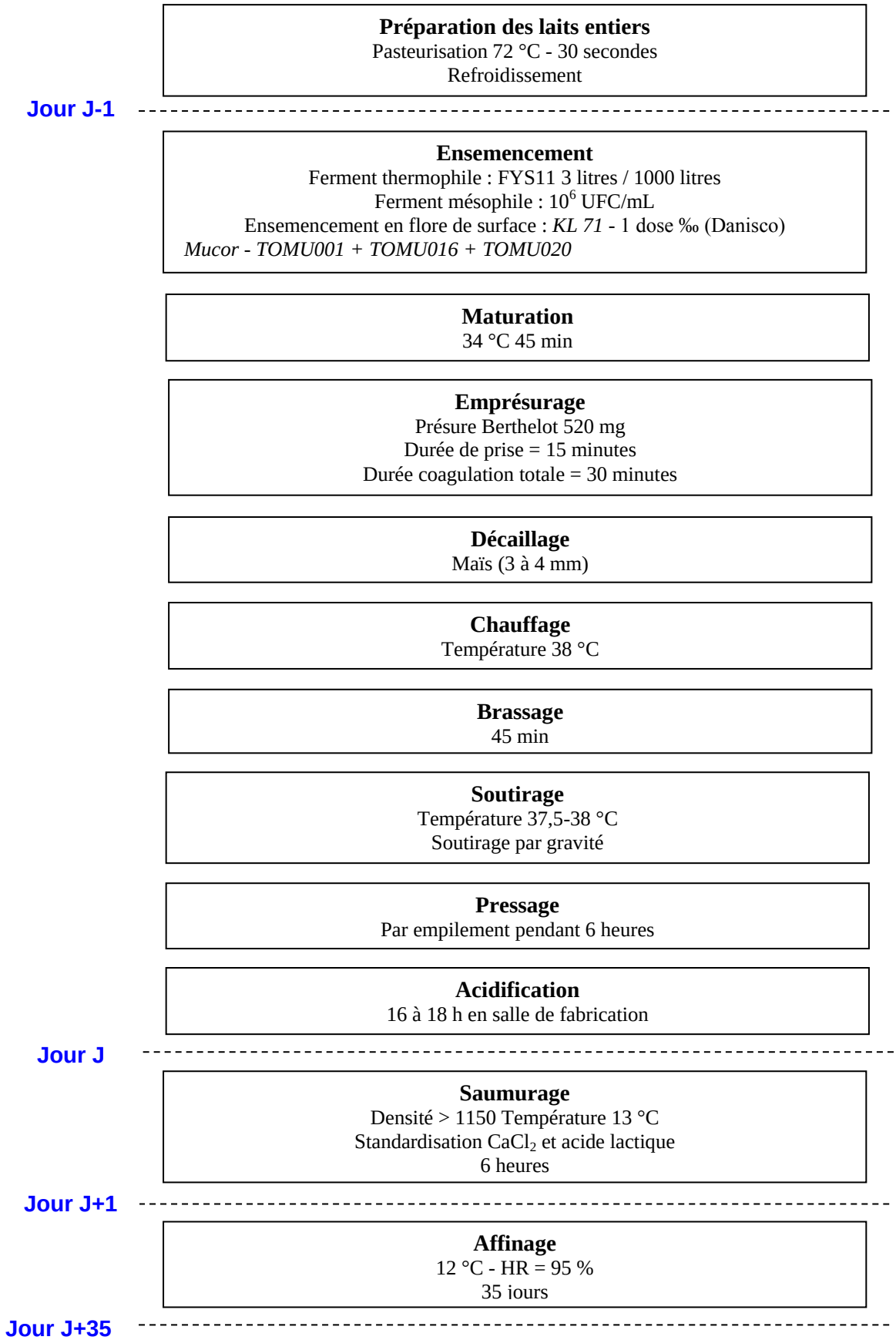


Figure 1 Procédé de fabrication de la tomme de Savoie

Annexe 3 : Analyses microbiologiques et physico-chimiques réalisées sur la tomme de Savoie

Afin d'étudier l'impact du mode d'apport de la souche *L. lactis* TOMSC161 (ferment frais ou lyophilisé) sur la fabrication fromagère, un suivi est réalisé au cours de la fabrication et de l'affinage des différentes tommes de Savoie. Pour cela, des prélèvements sont effectués aux différentes étapes du procédé et différentes analyses récapitulées dans le tableau ci-dessous sont effectuées.

Tableau 1: prélèvements et analyses au cours de fabrication de la tomme de Savoie

Matrice / Stade	Volume prélevé	Analyse	Méthode	Unité
Lait pasteurisé	30 mL	Germes totaux	NF V 08-051	UFC/mL
		Coliformes	NF V 08-050	UFC/mL
Mixte thermophile cultivé	30 mL	Acidité	NF V 04-206	°D
		pH	Pénétrométrie	
		Pouvoir acidifiant	Isotherme	ΔpH, ΔA°D
		Observation microscopique	Interne	%
Lait ensemencé	30 mL	Streptocoques thermophiles	M17 R+L, FIL 149	UFC/mL
		Lactobacilles thermophiles	MRS Difco, FIL 149	UFC/mL
		Lactocoques	Elliker méso	UFC/mL
	30 mL	MSU	Infrarouge	g/L
Lait emprésuré	30 mL	Streptocoques thermophiles	M17 R+L, FIL 149	UFC/mL
		Lactobacilles thermophiles	MRS Difco, FIL 149	UFC/mL
		Lactocoques	Elliker méso	UFC/mL
	100 mL	Stockage		
Moulage + 1h	¼ tomme	Extrait sec	NF EN ISO 5534	g/100g
		Matière grasse	NF V 04-287 B	g/100g
	¼ tomme	Lactocoques	Elliker méso	UFC/g
Moulage + 20h	¼ tomme	Extrait sec	NF EN ISO 5534	g/100g
		Matière grasse	NF V 04-287 B	g/100g
		Aw	Aw-mètre Aqualab	
	¼ tomme	Lactocoques	Elliker méso	UFC/g
	¼ tomme	Lactose	Kit Enzymatique Roche Boehringer Mannheim Réf 10	mg/100g

			176 303	
		Galactose	Kit Enzymatique Roche Boehringer Mannheim Réf 10 176 303	mg/100g
		Lactates L&D	Kit Enzymatique Roche Boehringer Mannheim Réf 11 112 821	mg/100g
		Calcium	Complexométrique	mg/100g
	¼ tomme	Stockage		
J+15	¼ tomme	Galactose	Kit Enzymatique Roche Boehringer Mannheim Réf 10 176 303	mg/100g
		Lactose	Kit Enzymatique Roche Boehringer Mannheim Réf 10 176 303	mg/100g
		Lactates L&D	Kit Enzymatique Roche Boehringer Mannheim Réf 11 112 821	mg/100g
	¼ tomme	Lactocoques	Elliker méso	UFC/g
	¼ tomme	Stockage		
J+35	¼ tomme	Extrait sec	NF EN ISO 5534	g/100g
		Matière grasse	NF V 04-287 B	g/100g
		NaCl	Chloruremètre	%
		Aw (pâte)	Aw-mètre Aqualab	
	¼ tomme	Lactates L&D	Kit Enzymatique Roche Boehringer Mannheim Réf 11 112 821	mg/100g
		NH3	Kit Enzymatique Roche Boehringer Mannheim Réf 11 112 732	mg/100g
	¼ tomme	Lactocoques	Elliker méso	UFC/g
	¼ tomme	Stockage		

Annexe 4 : Analyses sensorielles réalisées sur les tommes affinées

En fin d'affinage, l'objectif est de voir si des différences organoleptiques significatives apparaissent entre les tommes de Savoie issues des différentes fabrications. Pour juger de cela, deux types d'analyses sensorielles sont mises en place : un gradage technique et des tests triangulaires.

Le gradage technique a été réalisé par un jury de techniciens entraînés. Une tomme de chaque cuve a été jugée au niveau présentation (humidité du croûtage et développement du feutrage), aspect à la coupe (nombre d'ouverture et homogénéité de la couleur), texture (fermeté, élasticité, fondant et collant) et goût (intensité, acide, salé, beurré, piquant, ammoniaqué et amer). Une note d'appréciation globale a également été apportée.

Les tests triangulaires ont été réalisés auprès de jurys non entraînés. Ces tests ont pour objectif de déterminer s'il existe une différence perceptible entre des échantillons issus des différentes fabrications. Le principe de ce test est que le dégustateur reçoit une assiette contenant 3 échantillons : 2 issus du même traitement et 1 troisième issu d'un autre traitement. Il doit mentionner le fromage qu'il perçoit comme différent et donner l'intensité ainsi que la nature de cette différence. L'ordre de présentation des échantillons dans l'assiette varie suivant les dégustateurs afin que toutes les combinaisons d'ordre soient représentées et ce, un même nombre de fois. Pour chaque modalité, on comptabilise le nombre de personne ayant retrouvé le fromage effectivement différent parmi les trois fromages. Si ce résultat est significativement différent d'une répartition au hasard des réponses, on considère qu'une différence existe bien entre les fromages issus de deux traitements différents. L'analyse des résultats des tests triangulaires a été effectuée par comparaison du pourcentage de bonnes réponses obtenues avec la loi binomiale (n, 1/3) qui représente la probabilité que la réponse soit juste si elle est donnée au hasard. Le test étant réalisé par 12 dégustateurs, le seuil de significativité est de 8 réponses correctes sur 12 pour conclure à une différence significative entre les fromages dégustés avec un seuil de confiance de 0,95.

Annexe 5 : Supplementary data – publication n° 3

Table 1 Proteins of *L. lactis* TOMSC161 specifically produced in early stationary phase

Locus ID	Gene name	Function
AMINO-ACID BIOSYNTHESIS		
Aromatic amino-acid family		
O208_01387	*aroC*	Chorismate synthase
O208_01396	*aroA*	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase
O208_02372	*aroD*	3-dehydroquinate dehydratase I
Aspartate family		
O208_00808	*metE*	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase
O208_02591	*metC*	Cystathionine gamma-synthase/cystathionine beta-lyase
O208_01932	*dapB*	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase
BIOSYNTHESIS OF COFACTORS, PROSTHETIC GROUPS, AND CARRIERS		
Folic acid		
O208_00651	*folD*	Bifunctional protein FolD
O208_00921	*folP*	Dihydropteroate synthase
O208_00728	*pabB*	Para-aminobenzoate synthetase component I
Riboflavin and cobalamin		
O208_00922	*folE*	GTP cyclohydrolase 1
Thiamin		
O208_01757	*nifZ*	Cysteine desulfurase
O208_00964	*apbE*	Thiamine biosynthesis lipoprotein
CELL ENVELOPE		
Membranes, lipoproteins, and porins		
O208_01286	*ybjB*	Integral membrane protein
O208_00901	*clsB*	Cardiolipin synthase
Murein sacculus and peptidoglycan		
O208_01115	*murF*	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase
O208_01204	*acmA*	N-acetylmuramidase
O208_02348	*asd*	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase
O208_01118	*pbp2B*	Penicillin-binding protein 2B
O208_01523	*pbp2A*	Penicillin-binding protein 2A
O208_01150	*murA*	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase
Surface polysaccharides, lipopolysaccharides and antigens		
O208_00062	-	Major teichoic acid biosynthesis protein C
O208_00517	*ybbE*	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase
O208_00802	*dltB*	D-alanyl transfer protein DltB
O208_01262	-	Glycosyltransferase
O208_01920	*mvaA*	Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase

O208_01267	-	Glycosyl transferase
O208_01270	*ycbB*	Glycosyl transferase

CELLULAR PROCESSES

Cell division

O208_00375	*sepF*	Cell division protein
O208_02384	*gpsB*	Cell division protein
O208_01507	*parA*	ATPase for chromosome partitioning

Chaperones

O208_00160	*dnaJ*	Chaperone protein

Transformation

O208_00180	*recG*	ATP-dependent DNA helicase RecQ

CENTRAL INTERMEDIARY METABOLISM

Degradation of polysaccharides

O208_00812	*amyL*	Alpha-amylase

Phosphorus compounds

O208_02565	*yibC*	Alkaline phosphatase superfamily protein

ENERGY METABOLISM

Aerobic

O208_01124	*yddB*	Oxidoreductase
O208_02020	*ypaI*	Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family
O208_02586	*noxC*	NADH oxidase

Amino acids and amines

O208_02639	*ansB*	L-asparaginase

ATP-proton motive force interconversion

O208_01375	*atpC*	ATP synthase, subunit epsilon
O208_01370	*atpH*	ATP synthase, subunit delta

Electron transport

O208_02670	*cydB*	Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit II

Fermentation

O208_00969	*aldC*	Alpha-acetolactate decarboxylase
O208_02391	*pta*	Phosphate acetyltransferase

Sugars

O208_01652	*galT*	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase
O208_01653	*lacA*	Galactoside O-acetyltransferase
O208_02723	*lacA*	Galactose-6-phosphate isomerase, LacA subunit

FATTY ACID AND PHOSPHOLIPID METABOLISM

O208_02593	*accD*	Acetyl-coenzyme A carboxyl transferase beta chain
O208_02600	*fabD*	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase

PURINES, PYRIMIDINES, NUCLEOSIDES AND NUCLEOTIDES

2'-deoxyribonucleotide metabolism

O208_01160	-	2-prime,3-prime-cyclic-nucleotide 2-prime-phosphodiesterase
Nucleotide and nucleoside interconversions		
O208_02446	*cmk*	Cytidylate kinase
O208_01620	*pyrH*	Uridylate kinase
Purine ribonucleotide biosynthesis		
O208_01959	*purC*	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase
O208_01961	*purQ*	Phosphoribosylformylglycinamidine synthase 1
O208_01980	*purD*	Phosphoribosylamine--glycine ligase
O208_01183	*add*	Adenosine deaminase
O208_02247	*apt*	Adenine phosphoribosyltransferase
Pyrimidine ribonucleotide biosynthesis		
O208_00692	*pyrK*	Dihydroorotate dehydrogenase B (NAD(+)), electron transfer subunit
Salvage of nucleosides and nucleotides		
O208_00387	*prsB*	Ribose-phosphate pyrophosphokinase
O208_02058	*pdp*	Pyrimidine-nucleoside phosphorylase
Sugar-nucleotide biosynthesis and interconversions		
O208_01284	*rmlC*	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase

REGULATORY FUNCTIONS

O208_00057	*yjfE*	Transcription regulator
O208_00102	*gntR*	Transcription regulator
O208_02063	*rgrB*	Transcriptional regulator, GntR family
O208_02517	-	cI-like repressor
O208_02666	*rmaB*	Transcriptional regulator, MarR family
O208_02453	*yrgE*	Regulator of the mannose operon, ManO
O208_00174	*yxcA*	Activator of (R)-2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase
O208_01663	*yueD*	Transcriptional regulator, XRE family
O208_02067	*llrB*	Two-component system regulator
O208_01856	*llrC*	Two-component response regulator

REPLICATION

DNA replication, restriction, modification, recombination, and repair		
O208_00036	*Rep*	Replication protein
O208_02531	*rpoZ*	DNA-directed RNA polymerase, subunit delta
O208_02622	*dnaI*	Primosomal protein DnaI
O208_01832	*ligA*	DNA ligase

TRANSCRIPTION

Degradation of RNA		
O208_00043	-	3-prime-to-5-prime exoribonuclease RNase R
RNA synthesis, modification, and DNA transcription		
O208_00785	*rluB*	Pseudouridine synthase
O208_02250	*greA*	Transcription elongation factor GreA
O208_02166	-	rRNA methyltransferase
O208_00416	*mfd*	Transcription-repair coupling factor

TRANSLATION

Amino acyl tRNA synthetases

O208_00370	-	tRNA-guanosine methyltransferase
O208_01674	*yudI*	tRNA-dihydrouridine synthase

Degradation of proteins, peptides, and glycopeptides

O208_01661	*yueF*	Protease
O208_01583	*yvdA*	Proteinase
O208_01640	*yuhB*	peptidase, U32 family small subunit [C1]

Protein modification

O208_01091	*ppiA*	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase

Ribosomal proteins: synthesis and modification

O208_01540	*rpmC*	50S ribosomal protein L29
O208_01545	*rpsN*	30S ribosomal protein S14 type Z
O208_01552	*rpmD*	50S ribosomal protein L30
O208_01629	*rplK*	50S ribosomal protein L11
O208_01236	*rpsU*	30S ribosomal protein S21
O208_01561	*rplQ*	50S ribosomal protein L17
O208_01299	*rlmN*	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase N
O208_01921	*rpsP*	30S ribosomal protein S16
O208_00995	*rpmA*	50S ribosomal protein L27
O208_01448	*rpsG*	30S ribosomal protein S7

Translation factors

O208_01108	*prfC*	Peptide chain release factor 3
O208_02605	*rbfA*	Ribosome-binding factor A
O208_00399	*infC*	Translation initiation factor 3
O208_02159	*yfjA*	Translation factor

TRANSPORT AND BINDING PROTEINS

General

O208_01105	*era*	GTP-binding protein
O208_02438	-	ABC transporter, ATP-binding protein
O208_01254	*yqeL*	GTP-binding protein
O208_01635	*ecsA*	ABC transporter, ATP-binding protein
O208_00634	*yijD*	ABC transporter, ATP-binding protein
O208_00522	*ptsH*	Phosphocarrier protein HPr

Amino acids, peptides and amines

O208_01755	*yfcG*	Oligopeptide ABC transporter, periplasmic oligopeptide-binding protein
O208_01112	*optB*	Oligopeptide ABC transporter, permease protein

Carbohydrates, organic alcohols and acids

O208_01839	*ptcB*	PTS system, cellobiose-specific IIB component
O208_00073	*tagH*	Teichoic acid export ATP-binding protein
O208_00215	*ysgC*	Exporter for polysaccharides and teichoic acids

Anions

O208_01164	*phnD*	Phosphonates ABC transporter phosphonates-binding protein

O208_02462	*pstC*	Phosphate ABC transporter permease protein
O208_02464	*pstE*	Phosphate ABC transporter substrate binding protein
Cations		
O208_01127	*fhuD*	Ferrichrome ABC transporter, substrate binding protein
Bacteriocin		
O208_00031	-	Lactococcin A ABC transporter permease protein
OTHER CATEGORIES		
Adaptations and atypical conditions		
O208_00993	*phoL*	Phosphate starvation inducible protein
O208_02701	*clpP*	ATP-dependent Clp protease, proteolytic subunit
O208_02680	*ygjB*	General stress protein, Gls24 family
O208_01313	*cspE*	Cold-shock protein
Drug and analog sensitivity		
O208_01360	*bar*	Phosphinothricin acetyltransferase
Phage related functions and prophages		
O208_02324	-	phage repressor
Siderophore biosynthesis		
O208_00042	*yjgF*	Nicotinamidase/isochorismatase family protein
Steroid		
O208_00697	*hepS*	Heptaprenyl diphosphate synthase component II
Other		
O208_01179	*ycjB*	O-sialoglycoprotein endopeptidase
O208_02632	*yhfA*	Phosphatase/phosphohexomutase, HAD superfamily
O208_01348	*sufB*	Iron-sulfur cluster assembly protein SufB
O208_00525	*ybcG*	Nucleoid-associated protein
O208_00163	*yxbA*	ATP-binding protein
O208_00311	*uppS*	Isoprenyl transferase
O208_01001	*ykiF*	Hydrolase, HAD superfamily
O208_00030	*mobC*	mobilization protein
O208_00159	*yxaC*	Hydrolase, HAD superfamily
O208_00646	*rrmJ*	RNA binding methyltransferase
O208_01342	*sufC*	Iron-sulfur cluster assembly ATPase protein SufC
O208_02560	*yicB*	Hydrolase, HAD superfamily
O208_00892	*yljJ*	TPR repeat-containing protein, tetratricopeptide repeat family
O208_00935	*ylfH*	Hydrolase, HAD superfamily
O208_00573	*yfgH*	Hydrolase, HAD superfamily

Table 2 Proteins of *L. lactis* TOMSC161 specifically produced in late stationary phase

Locus ID	Gene name	Function
AMINO-ACID BIOSYNTHESIS		
Aspartate family		
O208_00253	*aspB*	Aspartate aminotransferase
O208_00915	*thrB*	Homoserine kinase
Glutamate family		
O208_00775	*gltD*	Glutamate synthase [NADPH], small chain
Serine family		
O208_02163	*serA*	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
BIOSYNTHESIS OF COFACTORS, PROSTHETIC GROUPS, AND CARRIERS		
Menaquinone and ubiquinone		
O208_02644	*menD*	2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3- cyclohexene-1-carboxylic-acid synthase
Riboflavin and cobalamin		
O208_01032	*ribH*	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase
O208_01036	*ribD*	Diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase
CELL ENVELOPE		
Surface polysaccharides, lipopolysaccharides and antigens		
O208_01924	*yqaG*	Lysophospholipase
O208_00530	*ybaI*	Glycosil transferase
ENERGY METABOLISM		
Aerobic		
O208_01942	*ypjF*	Oxidoreductase
O208_00895	*yljF*	NAD/FAD-utilizing dehydrogenase
Electron transport		
O208_02657	*qor*	Quinone oxidoreductase
PURINES, PYRIMIDINES, NUCLEOSIDES AND NUCLEOTIDES		
Purine ribonucleotide biosynthesis		
O208_01961	*purQ*	Phosphoribosylformylglycinamidine synthase 1
Pyrimidine ribonucleotide biosynthesis		
O208_01951	*thyA*	Thymidylate synthase
REGULATORY FUNCTIONS		
O208_00170	*rcfB*	transcription regulator
O208_01489	*ydeE*	Transcriptional regulator, AraC family
REPLICATION		
Degradation of DNA		
O208_00582	*uvrB*	Excinuclease ABC, subunit B

DNA replication, restriction, modification, recombination, and repair

O208_02623	*dnaB*	Replicative DNA helicase
O208_01802	*dnaE*	DNA polymerase III, subunit alpha

TRANSCRIPTION

Degradation of RNA

O208_00389	*pnp*	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase
O208_02567	*rnc*	Ribonuclease III
O208_02343	*yqgA*	mRNA degradation ribonuclease, metallo-beta-lactamase superfamily

RNA processing

O208_01107	*rheA*	ATP-dependent RNA helicase

RNA synthesis, modification, and DNA transcription

O208_01030	*rluD*	Pseudouridine synthase

TRANSLATION

Degradation of proteins, peptides, and glycopeptides

O208_00364	*pepC*	Aminopeptidase C

Protein modification

O208_00355	*pknB*	Serine/threonine protein kinase
O208_01943	*msr*	Peptide methionine sulfoxide reductase A

Ribosomal proteins: synthesis and modification

O208_01287	*rpmB*	50S ribosomal protein L28
O208_00105	*rpsR*	30S ribosomal protein S18

Translation factors

O208_00408	*yyaL*	GTP-dependent nucleic acid-binding protein, probable translation factor

TRANSPORT AND BINDING PROTEINS

General

O208_00094	-	ABC-type transporter, integral membrane subunit
O208_00893	*yljI*	Permease
O208_01363	*ysdA*	ABC transporter permease protein
O208_02439	-	ABC transporter, permease protein
O208_00227	*ysiB*	Permease

Amino acids, peptides and amines

O208_01137	*metN*	Methionine ABC transporter ATP-binding protein
O208_00772	*bcaT*	Branched-chain-amino-acid aminotransferase

Carbohydrates, organic alcohols and acids

O208_01275	*rgpD*	Polysaccharide ABC transporter, ATP-binding protein
O208_01072	*fruA*	PTS system, fructose-specific IIABC component
O208_01581	*gla*	Glycerol uptake facilitator protein

Anions

O208_02460	*pstA*	Phosphate ABC transporter ATP-binding protein

Cations

O208_00805	*mgtA*	Mg(2+) transport ATPase, P-type
O208_00258	*ytaB*	Magnesium and cobalt efflux protein

O208_01504	-	Putative K+ transporter
O208_02054	*czcD*	Cation transporter
O208_00018	*ctpA*	Copper transporting ATPase
O208_00568	*yfgQ*	Cation-transporting ATPase
Multidrug resistance		
O208_02663	*lmrA*	Multidrug resistance ABC transporter, ATP-binding and permease protein
OTHER CATEGORIES		
Adaptations and atypical conditions		
O208_01158	*tpx*	Thiol peroxidase
O208_01604	*dpsA*	Non-heme iron-binding ferritin
O208_00466	*yahB*	Universal stress protein A
O208_02589	-	General stress response protein
Other		
O208_01342	*sufC*	Iron-sulfur cluster assembly ATPase protein SufC
O208_01380	*ysbD*	DedA protein
O208_00052	*orf*	PlcB, ORFX, ORFP, ORFB, ORFA, ldh gene
O208_01343	*sufD*	Iron-sulfur cluster assembly protein SufD
O208_01577	*yvdG*	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase

Abstract

Lactic acid bacteria, which have a significant industrial importance, are widely distributed in frozen or freeze-dried state for further use in industrial processes such as cheesemaking. However, stabilization processes (freezing or freeze-drying) causes different stresses which can lead to low survival rates and functionality losses of microorganisms. In this context, this thesis aimed at better understanding the impact of the physiological state of *L. lactis* TOMSC161 cells during fermentation on their freeze-drying and storage resistance, and at developing simple but efficient tools to evaluate the cells physiological state during fermentation for industrials.

In the first part of this work, the influence of fermentation parameters (temperature, pH and harvesting time) on the growth and resistance of *L. lactis* TOMSC161 to each step of the freeze-drying process and storage has been investigated While the strain performance was not deteriorated after freezing, *L. lactis* was sensitive to the drying step and to ambient temperature storage. Moreover, the fermentation temperature and the harvesting time influenced the drying resistance of this bacterium. *L. lactis* TOMSC161 cells grown at 32 °C, pH 6.2 and harvested late (at late stationary phase) exhibited therefore both an optimal growth and the highest resistance to freeze-drying and storage at 4 °C.

In the second part, a deep characterization of the *L. lactis* TOMSC161 membrane at a biochemical and biophysical level was analyzed during fermentation at different temperatures and was linked to the freeze-drying and storage resistance of starters. The cyclopropanation of unsaturated fatty acids of *L. lactis* TOMSC161 during fermentation was correlated with a membrane rigidification and allowed an improvement of the cell tolerance to freeze-drying and storage. Conversely, cultivating cells at lower fermentation temperature than the optimum growth temperature induced as expected a homeoviscous adaptation as evidenced by lowered lipid phase transition temperature but did not induce any improvement of resistance to this preservation process.

In the third part, the physiological state characterization of *L. lactis* TOMSC161 cells was completed by investigating at the transcriptomic and proteomic levels as well as the cellular oxidation state. The results proved that the freeze-drying process caused intracellular reactive oxygen species (ROS) formation, responsible of degradation of the starter performance during storage at 25 °C. Furthermore, the cellular oxidation state decreased during fermentation and was explained, in the stationary phase, by a slowdown of the aerobic energy metabolism and the induction of oxidative stress responses. This initial “pre-adaptation” of *L. lactis* TOMSC161 during fermentation allowed improving their tolerance to freeze-drying and storage by a limitation of ROS accumulation through the whole preservation process.

Finally, this work has been concluded by verifying the functionalities of starter freeze-dried in the optimized production conditions defined in this thesis during cheesemaking. Despite the freeze-drying step, the technological properties of *L. lactis* TOMSC161 were preserved, thus validating the performed optimization.

Key words: lactic acid bacteria, fermentation, lyophilization, physiological state, fatty acid, membrane fluidity, lipid phase transition, transcriptome, proteome, oxidation

Résumé

Les ferments lactiques, d'une importance industrielle considérable, sont très largement commercialisés sous forme concentrée, congelée ou lyophilisée en vue de leur utilisation ultérieure dans les procédés industriels tels que les procédés de production de fromage. Cependant, les procédés de stabilisation (congélation et lyophilisation) engendrent différents stress qui peuvent conduire à de faibles taux de survie et des pertes de fonctionnalités des microorganismes. Dans ce contexte, ce travail de thèse vise à mieux comprendre l'incidence de l'état physiologique des cellules de *L. lactis* TOMSC161 au moment de la récolte sur leur tolérance à la lyophilisation et au stockage, et de développer des outils simples mais efficaces d'évaluation de l'état physiologique des cellules au cours de la fermentation pour les industriels.

Dans une première partie, l'influence de différents paramètres de fermentation (température, pH et phase de croissance) sur la croissance et la résistance de *L. lactis* TOMSC161 à chaque étape du procédé de lyophilisation et au stockage a été étudiée. Alors que les performances de la souche ne sont pas dégradées après congélation, *L. lactis* s'est avéré sensible au séchage et au stockage à température ambiante. De plus, la température de fermentation et l'instant de récolte influencent la résistance au séchage de cette bactérie. Ainsi, les cellules de *L. lactis* TOMSC161 cultivées à 32 °C, pH 6,2 et récoltées tardivement (en phase stationnaire avancée) présentent une croissance optimale et la meilleure résistance à la lyophilisation et au stockage à 4 °C.

Dans une seconde partie, une caractérisation approfondie de la membrane de *L. lactis* TOMSC161 aux niveaux biochimique et biophysique a été réalisée au cours de fermentations à différentes températures (22 et 30 °C) et a été mise en lien avec la résistance des ferments à la lyophilisation et au stockage. La cyclopropanation des acides gras insaturés de *L. lactis* TOMSC161 au cours de la fermentation est reliée à une rigidification de la membrane et permet d'améliorer la tolérance des cellules à la lyophilisation et au stockage. A l'inverse, la culture des cellules à une température inférieure à la température optimale de croissance induit une adaptation homéovisqueuse de la membrane, mise en évidence par la température de transition lipidique, mais n'a pas induite une amélioration de la résistance à ce procédé de préservation.

Dans une troisième partie, la caractérisation de l'état physiologique des cellules de *L. lactis* TOMSC161 a été complétée au niveau du transcriptome, du protéome et de l'état d'oxydation cellulaire. Le procédé de lyophilisation provoque la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires qui dégradent la performance des ferments au cours du stockage. Par ailleurs, l'état d'oxydation des cellules diminue au cours de la fermentation et est expliqué, en phase stationnaire, par un ralentissement du métabolisme énergétique aérobie et une induction des réponses au stress oxydatif. Cette « pré-adaptation » initiale des cellules de *L. lactis* TOMSC161 au cours de la fermentation permet, là encore, une amélioration de leur tolérance à la lyophilisation et au stockage par une limitation de l'accumulation de ROS lors de ce procédé de préservation.

Ce travail se conclut par une vérification des fonctionnalités du ferment lyophilisé, dans les conditions de production optimisées lors de cette thèse, en fabrication fromagère. Malgré l'étape de lyophilisation, les propriétés technologiques de *L. lactis* TOMSC161 sont conservées, validant ainsi le travail d'optimisation réalisé.

Mots clé : bactérie lactique, fermentation, lyophilisation, état physiologique, acides gras, fluidité membranaire, transition de phase lipidique, transcriptome, protéome, oxydation