

## Corrélation des variations morphologiques de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* CNRZ 368 avec la prise du lactose

Mustapha MEZIANE <sup>1</sup>✧, Anne LAGRANGE <sup>2</sup>,  
Abdelmajid BELABED <sup>1</sup> & Patrice BRACQUART <sup>2</sup>

(Reçu le 07/06/1996 ; Accepté le 16/07/1996)

استعمال السكريات عند "ستريبتوكوكيس ساليغارييس" وتناسق بين التشكلات البنيوية ونسبة أخذ اللكتوز

يعتبر تخمير لكتوز الحليب بواسطة البكتيريا اللبنية خصوصا "ستريبتوكوكيس" و "لكتوباسيلوس" عملية ذات أهمية كبيرة في الصناعات الحليبية في السنوات الأخيرة انصبت الدراسات في هذا الميدان على تميز نسق أخذ اللكتوز عند "تيرموفيلس" وفي هذه الدراسة حاولنا تحديد نسبة أخذ اللكتوز عند 3 أشكال الجذمة "تيرموفيلس"، وذلك حسب نوعية السكر المستعمل ومدة الحضنة بتواجد اللكتوز المرسوم ب (C14) الشيء الذي مكنا من إظهار تغيرية أخذ اللكتوز حسب نوعية الجذمة ومبعث الطاقة الموجودة في الوسط. إن تأثير الموانع الإستقلابية وفعالية أخذ اللكتوز و المنافسين الاستقلابيين للكتوز يوضح على أن نسق أخذ اللكتوز لاعلاقة له ببنيوية الجذمة. وهذا النسق حيوي من نوع البيرمياز ويستمد طاقته من (ATP).

الكلمات المفتاحية : ستريبتوكوكيس - الجذمة - أخذ اللكتوز - التناغم

### Corrélation des variations morphologiques de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* CNRZ 368 avec la prise du lactose

La présente étude a porté sur la détermination du taux de prise du lactose chez trois variants morphologiques de la souche CNRZ 368 de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, en fonction du glucide de culture et du temps d'incubation en présence du diholoside marqué au <sup>14</sup>C. Ceci nous a permis de mettre en évidence une variabilité de la prise du lactose en fonction à la fois de la source d'énergie préalable et du variant. Par contre, les résultats de l'effet de l'action des inhibiteurs métaboliques, l'énergétique de la prise du lactose, et les compétiteurs métaboliques du diholoside démontrent que le système de prise du diholoside n'est pas en relation avec la morphologie des variants. Il s'agit d'un système actif de type perméase dont l'énergie est fournie par l'ATP.

**Mots clés :** *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* - Variant - Prise du lactose - Adaptation

### Sugars metabolism by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* CNRZ 368

The present study examines the influence of the energy source and time incubation of diholoside <sup>14</sup>C uptake by different variants of species CNRZ 368 of *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Evidence variability has been observed with lactose uptake, energy source and different variants. No correlation was obtained by studies with energy poisons, energetic and competitor uptake lactose between its system uptake and the morphological variants. The lactose is taken by the permease system which requires energy by ATP.

**Key words :** *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* - Variant - Lactose uptake - Adaptation

<sup>1</sup> Université Mohammed 1<sup>er</sup>, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Oujda

<sup>2</sup> Laboratoire de Biochimie appliquée, Université de Nancy I. BP 239. 54506 Vandœuvre-Les Nancy, France

✧ Auteur correspondant

## INTRODUCTION

L'utilisation de substrat par les micro-organismes implique l'existence de systèmes de transport membranaire et de dégradation. Or, la majorité des systèmes de transport membranaire ont été étudiés chez les lactocoques (Bisset & Anderson, 1974 ; Mc Kay *et al.*, 1969 ; 1970 ; Thomas *et al.*, 1980 ; Thompson & Thomas, 1977 ; Thompson, 1978 ; Thompson *et al.*, 1978 ; Thompson, 1979 ; 1980 ; Benthin *et al.*, 1993). Le transport du lactose à travers les membranes des bactéries de ce groupe est, en général, assuré par le système phosphotransférase phosphoénol-pyruvate dépendant (PEP-PTS) (Mc Kay *et al.*, 1969 ; Thomas *et al.*, 1980 ; Benthin *et al.*, 1993). Contrairement aux lactocoques, les données bibliographiques concernant le métabolisme et le transport du lactose par *S. salivarius* subsp. *thermophilus* sont peu nombreuses et contradictoires. Hemme *et al.* (1980), lors d'une étude sur le métabolisme du lactose par 10 souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, ont noté la présence d'une  $\beta$ -galactosidase et d'une phospho- $\beta$ -galactosidase chez l'ensemble des bactéries étudiées. Ces auteurs ont alors suggéré l'existence de deux systèmes de prise du lactose chez ces micro-organismes, un système de type perméase et un de type PEP-PTS. Tinson *et al.* (1982) et Greenberg & Mahoney (1982), quant à eux, n'ont pas retrouvé d'activité phospho- $\beta$ -galactosidase chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus* et ont suggéré que le transport du diholoside fait intervenir un système de type perméase. Tinson *et al.*, (1982) assimilent l'activité phospho- $\beta$ -galactosidase suggérée par Hemme *et al.* (1980) à une activité phosphatase. Ultérieurement, une phosphatase acide a été mise en évidence chez plusieurs souches de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* (Larsen & Parada, 1988). Par ailleurs, le gène codant pour la synthèse de la  $\beta$ -galactosidase chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus* ATCC 19258 a été cloné chez *E. coli* JM 108 (Herman & Mc Kay, 1986).

La mise en évidence d'une activité PTS pour le transport du lactose chez ces micro-organismes par la présence de l'enzyme P- $\beta$ -gal hydrolysant le produit intracellulaire Lactose-6-P n'est pas la meilleure méthode. Une telle approche suppose que la présence d'une P- $\beta$ -gal est une condition nécessaire et suffisante pour un système de type PEP-PTS. D'autres stratégies ont été mises en œuvre pour élucider les mécanismes de transport

du lactose chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Poolman *et al.* (1989 ; 1990) et Mercenier & Lemoine (1990) ont étudié le gène lac S du transport du lactose chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus* A 147. Auparavant, une autre stratégie a été adoptée par Benateya *et al.* (1986) pour l'étude de la perméation du lactose chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus* CNRZ 302. Cette méthode a porté sur l'inhibition sélective des systèmes pouvant intervenir dans le transport du lactose. Ces derniers auteurs avaient abouti à la même conclusion que Poolman *et al.* (1989) concernant le mécanisme de transport du lactose chez ce micro-organisme.

Dans ce travail, on se propose de vérifier l'existence d'une corrélation entre la morphologie cellulaire de trois variants de la souche CNRZ 368 de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* et le système de prise du lactose ou son catabolisme, d'une part, et d'élucider le potentiel énergétique de la prise du diholoside chez les trois variants, d'autre part.

## MATERIEL & METHODES

### • Souches

Trois variants morphologiques ont été isolés à partir de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* CNRZ 368 (Pebay *et al.*, 1987) :

- le variant D12 présente des colonies transparentes à bord irrégulier ;
- le variant D31 montre des colonies circulaires d'opacité constante ;
- le variant OM présente des colonies à centre opaque et à bord transparent.

### • Culture

Les cultures sont réalisées dans le milieu TPPY liquide composé de 7g de tryptose (T), 7g protéose peptone (PP), 2g d'extrait de levure (Y), 20g de lactose ou de glucose 1 litre d'eau distillée (Bracquart, 1981). La culture est inoculée avec 1% d'une préculture d'une nuit dans le lait reconstitué à 10% incubée à 42°C.

### • Prise du lactose

Le lactose (marqué au  $^{14}$  C en position 1 du D-glucose) a été aimablement fourni par Amersham (Angleterre). La radioactivité du lactose était de 2,11 Bq.mmol<sup>-1</sup>. Les dilutions ont été réalisées à 0,2 mM dans des solutions aqueuses

des glucides correspondants non marqués. Pour la détermination des constantes de Michaelis, une gamme de concentration comprise entre 0,02 et 0,3 mM a été effectuée. Pour l'essai de prise du lactose, après arrêt de la croissance de la culture au cours de la phase exponentielle ( $DO = 0,4$ ), les cellules sont centrifugées à 5000 g à 4°C puis lavées deux fois avec un tampon Tris- $H_2SO_4$  50 mM, pH 7. Le culot est remis en suspension dans un volume de tampon à une concentration finale de 1 mg de cellules (poids sec) par ml. On mélange 1 ml de suspension cellulaire et 100  $\mu$ l de tampon Tris- $H_2SO_4$  50 mM, pH 7, puis on incube à 42 °C pendant 10 min. La réaction démarre dès l'addition de 100  $\mu$ l de la solution du lactose marqué. Après l'incubation désirée, 400  $\mu$ l du milieu réactionnel sont prélevées et filtrées sur filtre Millipore, de porosité 0,45  $\mu$ m. Le filtre est lavé deux fois rapidement avec 5 ml de tampon Tris- $H_2SO_4$  50 mM, pH 7, séché sommairement et mis dans une fiole à compter. Un volume de 10 ml de liquide à scintillation A.C.S (Aqueous Counting Scintillant Amersham) est ajouté. Pour chaque essai, une aliquote de 400  $\mu$ l du milieu réactionnel est prélevée pour déterminer la quantité exacte de radioactivité présente initialement. Le comptage est effectué deux fois pendant 5 minutes dans un compteur à Scintillation (Bematic, Kontron). La quantité de lactose absorbé est déterminée par le nombre de coups par minute rapporté à la quantité de radioactivité totale.

#### • Compétiteurs métaboliques

Les 100  $\mu$ l du tampon du milieu réactionnel, lors de l'essai de prise du lactose, sont remplacés par 100  $\mu$ l de compétiteur. Ce dernier est ajouté en même temps que le lactose marqué au  $^{14}C$ .

#### • Inhibiteurs métaboliques

L'inhibiteur métabolique est ajouté 5 min avant l'ajout du lactose radioactif. Les 100  $\mu$ l du tampon du milieu réactionnel lors de l'essai de prise du lactose sont remplacés par 100  $\mu$ l d'inhibiteur métabolique.

#### • Dosage de l'ATP

Pour l'extraction de l'ATP, 100  $\mu$ l de suspension cellulaire ont été mélangés à 900  $\mu$ l de DMSO (19,9 M, 20°C) à 90% dans le tampon acide morpholino-propane sulfonique (MOPS) 10 mM (pH 7,4). Après

agitation au vortex pendant 15 s et repos de 5 min dans la glace, le mélange est additionné de 4 ml de tampon MOPS. Les extraits ainsi obtenus peuvent être congelés à -23°C pour un dosage ultérieur.

Pour le dosage on mélange dans une cuvette LKB en polystyrène 350  $\mu$ l de tampon Tris-acétate 0,1 mM pH 7,75 contenant 3 mM d'EDTA à 50  $\mu$ l de l'échantillon. Après agitation douce à la main, on insère la cuvette dans le bioluminomètre (LKB, 1250 display). Un dispositif de micropipetage automatique injecte 100  $\mu$ l du mélange luciférine luciférase (ATP monitoring reagent, LKB) au contenu de la cuvette.

L'émission de la lumière est intégrée pendant 10 s, elle est mesurée à son maximum évitant ainsi l'interférence des autres nucléotides (Prydz et Froholm, 1964 ; Pradet, 1967). Pour quantifier la concentration en ATP, une courbe d'étalonnage de l'Unité Relative de Luminescence (URL) en fonction de la concentration en ATP pur (LKB) est établie dans des conditions identiques.

## RÉSULTATS

### • Relation de la prise du lactose avec la nature du variant et du glucide de culture

Une variabilité assez importante entre les trois variants pour la prise du diholoside est notée (Figure 1). Les cellules préalablement cultivées sur milieu glucosé sont plus actives que celles provenant du milieu lactosé. On observe un maximum de prise à 5 min d'incubation pour les trois variants quand ils sont préalablement cultivés sur milieu glucosé puis une chute rapide au delà. Le variant OM a une prise maximale de 10,8 nmol de lactose accumulé à l'intérieur de la bactérie par mg de poids sec cellulaire, soit trois fois plus que D12 et deux fois plus que D31. Quand les cellules sont préalablement cultivées en présence de lactose, le maximum de prise du diholoside est observé après 3 min d'incubation. Pour les variants OM et D12, ce maximum ne dépasse pas les taux respectifs du tiers et de la moitié de leurs prises quand ils proviennent du milieu glucosé. Le variant D31 atteint son maximum de prise du lactose marqué après 5 min d'incubation puis chute légèrement. Cependant, ce maximum ne dépasse pas 1 nmol de diholoside absorbé par mg de poids sec cellulaire, soit le cinquième de celui des cellules préalablement cultivées en présence de glucose.

nmol de lactose pris par mg de poids sec cellulaire

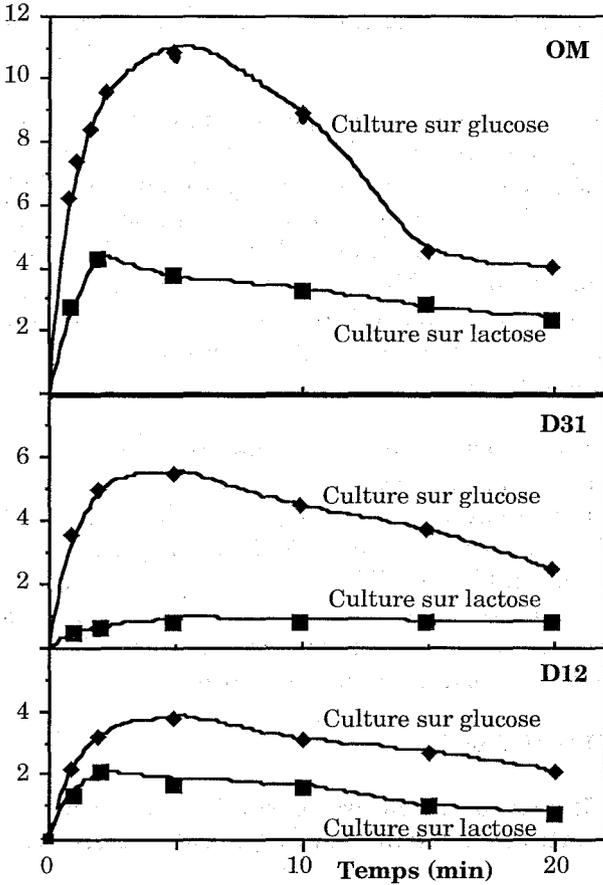


Figure 1. Prise du lactose en fonction du temps et du glucide de culture

• Cinétique de la prise du lactose

La représentation de Lineweaver & Burk (Figure 2) montre que le système de prise du lactose chez les trois variants a les caractéristiques d'une cinétique Michaelienne et permet de déterminer les constantes  $K_t$  et  $V_{max}$  (Tableau 1).

Tableau 1. Paramètres cinétiques de prise du lactose chez les variants OM, D31 et D12 préalablement cultivés sur milieu TPPY contenant du glucose ou du lactose comme source d'énergie ( $K_t$  exprimée en  $\mu M$ , et  $V_{max}$  en nmol de lactose pris par min et par mg de poids sec cellulaire)

Variant	Glucide de culture					
	.....Lactose.....			.....Glucose.....		
Paramètres	OM	D31	D12	OM	D31	D12
$K_t$	34	36	32	38	37	38
$V_{max}$	0,56	0,24	0,32	7,2	4,8	2,4

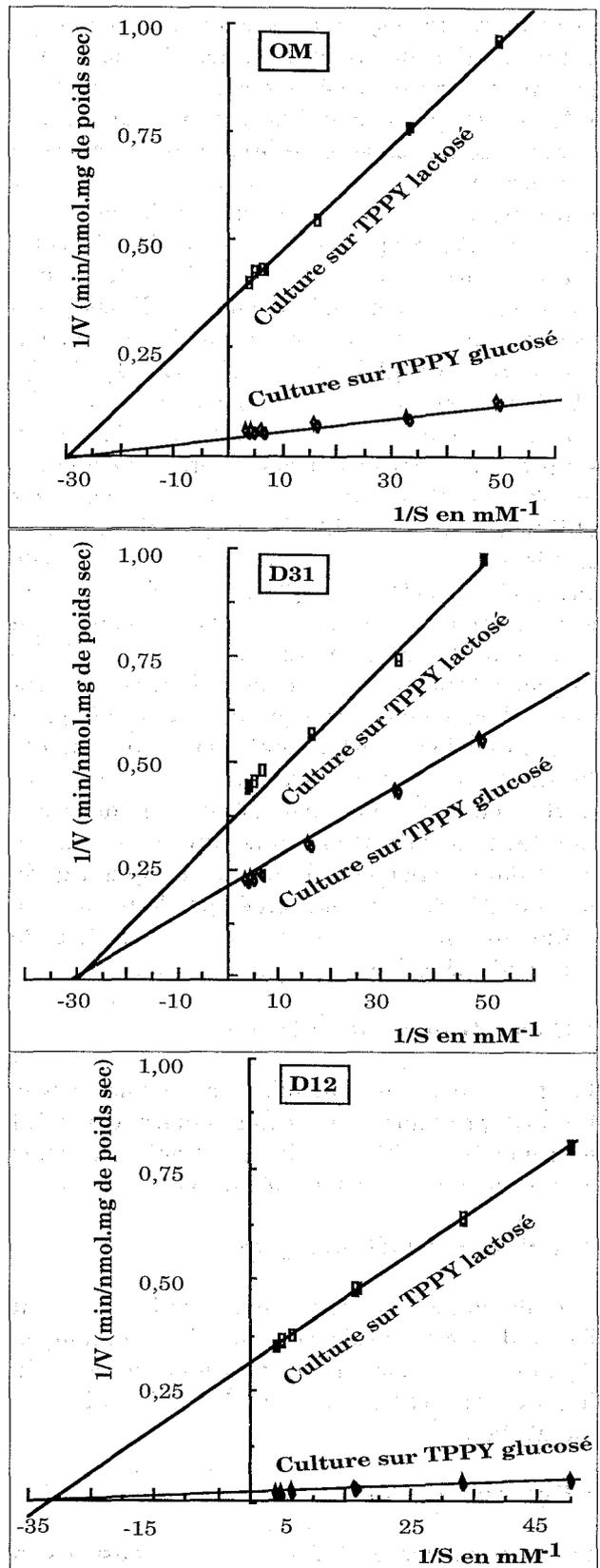


Figure 2. Cinétique de prise du lactose à 1 min par les variants de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* CNRZ 368

L'affinité des trois variants de la souche CNRZ 368 de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* ne dépend ni du glucide de culture ni du type de variant. Par contre, la vitesse maximale de prise du diholoside dépend du type de variant et du glucide de culture. En effet, par rapport à la culture en milieu lactosé, la vitesse maximale est plus importante quand les cellules sont recueillies à partir du milieu glucosé. Le variant OM a une vitesse maximale presque deux fois plus que celles des variants D31 et D12 quelque soit le glucide de culture. Les vitesses maximales de prise du lactose chez les variants D31 et D12 sont comparables quand les cellules proviennent du milieu lactosé. Par contre, la prise est plus active pour OM quand ces bactéries sont récoltées à partir du milieu contenant le glucose comme source de carbone.

### • Action des inhibiteurs

Afin de comprendre le processus énergétique qui intervient dans le transport du lactose, on a utilisé quatre catégories d'inhibiteurs métaboliques classés selon leur cible d'action :

**Ionophores** : ce sont des substances qui dissipent le potentiel électrochimique membranaire et provoquent un découplage du mouvement ionique des protons et du glucide (Kashket & Wilson, 1972; 1973). Parmi les ionophores utilisés dans ce travail :  
\* La valinomycine . Il s'agit d'un antibiotique produit par *Streptomyces fulvissimus* ayant une capacité de transport de potassium  $10^4$  fois plus grande que le sodium (Nicholls, 1982). La forte perméation aux ions potassium intracellulaires qui sont alors excrétés dans le milieu de culture entraîne une entrée massive de protons  $H^+$  ; ceci se traduit par une accumulation de protons à l'intérieur de la cellule réduisant ainsi le gradient de potentiel électrochimique à travers la membrane cellulaire (Kashket & Wilson, 1973). Dans notre cas, cette substance a une action fortement inhibitrice sur la prise du diholoside (Tableau 2). Dans tous les cas, les effets ont été identiques pour les trois variants, avec des valeurs d'inhibition similaires.

\* Le carbonylcyanide-m-chlorophénylhydrazone (CCCP) qui transporte les protons (Cecchini & Koch, 1975) et le 2,4-dinitrophénol (DNP) ont une forte action inhibitrice sur la prise du diholoside chez les trois variants.

**Inhibiteurs de la glycolyse.** L'acide iodoacétique (IAA) est bien connu pour son action inhibitrice spécifique de la phosphoglyceraldéhyde

déshydrogénase (EC.1.2.1.12), enzyme catalysant la phosphorylation du 3-phosphoglyceraldéhyde en 1,3-diphosphoglycérate (Thompson, 1978). L'inhibition de cette voie entraîne un déclin de la concentration intracellulaire en ATP. Une forte action inhibitrice de l'acide iodoacétique est observée. Elle est de 70% pour le variant OM, 75% pour D31 et 65% pour D12. D'autre part, le fluorure de sodium, inhibiteur spécifique de l'énolase (Cimazoni, 1972 ; Belli et al., 1995) bloque la synthèse du phosphoénolpyruvate (PEP) à partir du 2-phosphoglycérate. On n'observe aucune inhibition de la prise du lactose par le fluorure de sodium chez les trois variants de la souche CNRZ 368 de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*.

**Inhibiteurs de l'ATPase membranaire.** Les résultats obtenus en présence de la chlorohexidine et N,N'-dicyclohexyl carbodiimide (DCCD) montrent une inhibition ; l'ATP ase est donc exigée pour le transport actif du lactose chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus*.

**Inhibiteurs de la cytochrome oxydase chez *E. coli*.** L'azoture de sodium ( $NaN_3$ ) et le cyanure de potassium (KCN) sont responsables de cette inhibition chez *E. coli* (Linnane & Wrigley, 1963). Ces substances n'ont pas d'action sur le transport du lactose chez les trois variants ; ceci confirme la voie fermentaire du métabolisme du lactose chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus*.

**Tableau 2. Pourcentage de l'activité résiduelle de prise du lactose en présence d'inhibiteurs métaboliques pour les variants OM, D31 et D12 de *S. salivarius* subsp. *thermophilus***

-culture préalable sur TPPY lactosé  
-Temps de prise 5 min.

Inhibiteurs	Concentration (mM)	Activité résiduelle (%)		
		OM	D31	D12
Valinomycine	0,22	40	32	37
DNP <sup>1</sup>	0,9	38	40	36
CCCP <sup>2</sup>	1	50	52	46
IAA <sup>3</sup>	1	30	25	35
NaF <sup>4</sup>	10	102	100	101
Chlorohexidine	0,24	30	20	33
DCCD <sup>5</sup>	0,002	10	12	20
$NaN_3$ <sup>6</sup>	0,3	100	103	98
KCN <sup>7</sup>	40	97	101	100

<sup>1</sup> = 2,4-dinitrophénol ; <sup>2</sup> = Carbonylcyanide-m-chlorophénylhydrazone ; <sup>3</sup> = Acide iodo-acétique ; <sup>4</sup> = Fluorure de sodium ; <sup>5</sup> = N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide ; <sup>6</sup> = Azoture de sodium ; <sup>7</sup> = Cyanure de potassium.

### • Réserve en ATP chez les cellules non proliférantes

Les trois variants sont incubés en absence de toute source d'énergie à 42°C en tampon Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM, pH7, après les avoir cultivés en milieu TPPY lactosé ou glucosé. Le temps zéro sur la figure 3 est de 30 min après arrêt des cultures en cours de la phase de croissance exponentielle (durée de préparation des suspensions cellulaires).

Au départ, les taux d'ATP résiduels des variants OM, D31 et D12 sont respectivement 2.5, 3.4 et 2.8 fois plus élevés quand ils proviennent du milieu glucosé que quand ils ont été cultivés en présence du lactose. L'évolution de l'ATP résiduel chez les cellules non proliférantes indique :

- Une dégradation de l'ATP 20 à 25 min avant une stabilisation à un niveau plus bas qui diffère d'un variant à l'autre.
- Que l'addition du lactose (en concentration finale de 1 mM) aux cellules, après 30 min d'incubation à 42°C sans glucide, induit une génération d'ATP. Ceci ne peut être possible sans une dégradation du lactose ajouté, donc une prise du diholoside. Après une heure d'arrêt de la culture, les cellules non proliférantes sont encore capables de transporter le lactose pour synthétiser l'ATP.
- Les cellules cultivées sur glucose produisent un taux d'ATP supérieur à celles provenant du milieu lactosé (2,7 fois plus pour les variants OM, 3,1 fois plus pour les variants D31 et 5,7 fois plus pour les variants D12).

### • Action des compétiteurs métaboliques

L'étude de la compétition métabolique vis-à-vis du lactose chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus* permet de préciser les glucides ayant au moins un ou plusieurs systèmes de transport. Dans nos essais, le compétiteur non marqué est 10 fois plus concentré que le marqueur radioactif.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 3. Les glucides étudiés dans le présent travail peuvent être classés en deux catégories.

Le premier groupe est constitué des diholosides qui inhibent fortement la prise du lactose chez les trois variants. Il s'agit de l'ortho-nitrophényl-β-D-galactopyranoside (ONPG), du saccharose, du lactulose et du tréhalose (Tableau 3).

μmol d'ATP/mg de poids sec cellulaire

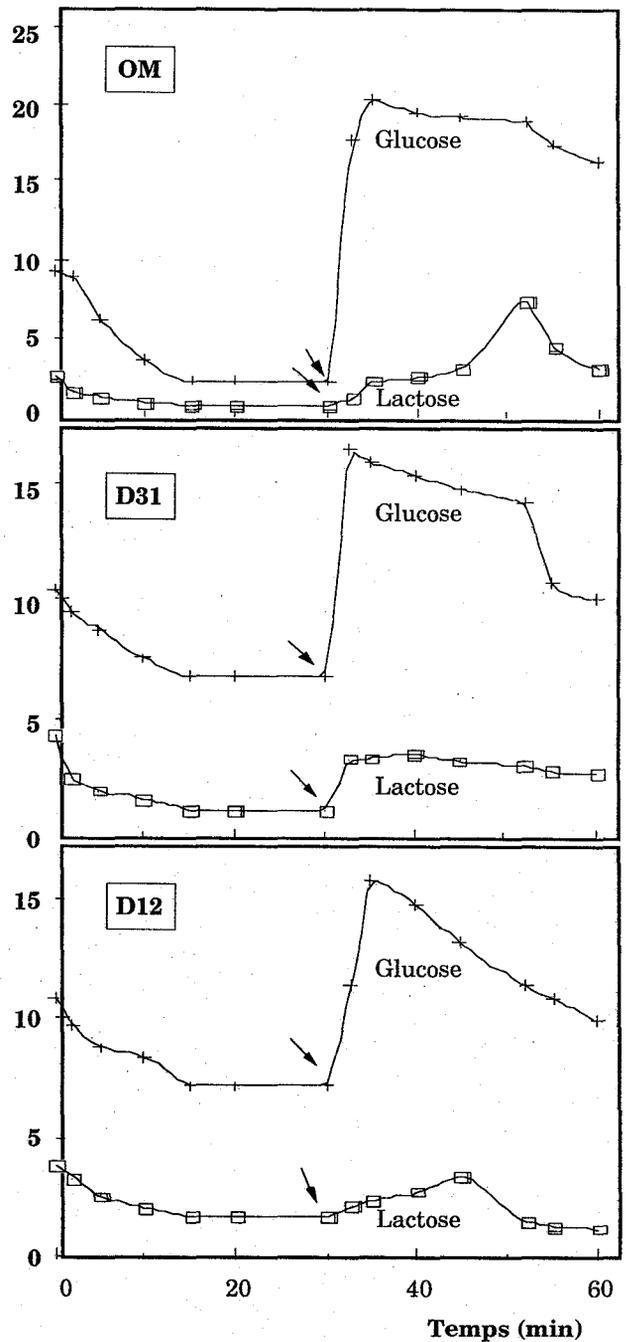


Figure 3. Réserve énergétique en ATP chez les trois variants incubés à 42°C sans source d'énergie (Culture préalable sur glucose ou sur lactose. la flèche indique l'ajout du lactose 1mM)

Le deuxième groupe comprend les oses sans effet sur la prise du lactose et n'interfèrent pas avec le système de perméation de ce diholoside (glucose, galactose, arabinose et xylose).

La prise du lactose est inhibée quand celui-ci est en compétition avec les diholosides ce qui permet de formuler l'hypothèse que leur(s) système(s) de transport doivent être en partie commun au lactose. Une autre hypothèse se basant sur une repression catabolique du système de prise du lactose par le compétiteur ne peut être écartée.

**Tableau 3. Résultats de deux essais exprimés en pourcentage de prise du lactose en présence de compétiteurs à 2 mM par les variants de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* CNRZ 368**

-culture préalable sur TPPY lactosé  
-Temps de prise 5 min

Compétiteurs	Variants					
	OM		D31		D12	
ONPG	70	64	59	67	73	67
Saccharose	45	35	55	45	57	49
Lactulose	70	62	56	52	53	47
Tréhalose	56	64	59	53	64	56
Glucose	96	90	97	105	105	101
Galactose	101	93	102	98	97	93
Arabinose	97	93	107	97	101	95
Xylose	91	95	95	101	101	93

## DISCUSSION

La majorité des systèmes de transport nécessite de l'énergie métabolique ; ainsi, la prise de l'acide glutamique chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus* CNRZ 302 exige la présence du glucose ou du lactose (Bracquart, 1985 ; Bracquart *et al.*, 1989), la prise du lactose ou du glucose chez les lactocoques ne peut avoir lieu sans la présence de PEP (Mckay *et al.*, 1969 ; 1970 ; Thomas, 1976 ; Thompson, 1978 ; 1980). L'ATP fournit le lien décisif entre le transport et la production d'énergie par les réactions faisant intervenir l'ATPase, la perméase et un gradient électrochimique (Konings *et al.*, 1989).

Chez les cellules recueillies sur milieu glucosé, on a constaté une meilleure prise de lactose. Ces résultats confirment les constatations de Poolman *et al.* (1989) qui ont obtenu une augmentation de prise du lactose marqué chez des cellules d'*E. coli* transformées par le gène lac S, quand le glucose est présent.

Par contre, les résultats obtenus infirment les observations de Reddy *et al.* (1973) en absence de prise du lactose chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus* St4 quand cette souche est

préalablement cultivée sur milieu glucosé. De plus, les cellules non proliférantes provenant du milieu glucosé gardent un taux d'ATP important et sont plus actives pour le métabolisme du diholoside que celles provenant du milieu lactosé. Tout se passe comme si le glucose était à l'origine :

1. D'une dérépression des enzymes nécessaires pour le métabolisme du lactose. L'adénosine-3' 5'-monophosphate cyclique (AMP<sub>c</sub>) pourrait être impliquée dans la dérépression. En effet, Ratliff *et al.* (1980) ont noté la présence de fortes concentrations intracellulaires d'AMP<sub>c</sub> chez des cellules de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* et ont suggéré que l'AMP<sub>c</sub> pourrait jouer un rôle dans l'induction enzymatique. Somkuti & Steinberg (1979) ont remarqué que la répression de la synthèse de la β-galactosidase par le glucose est levée par l'apport exogène d'AMP<sub>c</sub>.
2. D'une accumulation accrue d'ATP, qui est aussi un cosubstrat pour la prise du diholoside. à cet égard, Fordyce *et al.* (1984) ont signalé que, dans les conditions minimales de la fermentation du glucose chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, on assiste à une augmentation intracellulaire de PEP qui a un rôle crucial de lien entre le transport et l'étape métabolique du lactose. Or, Thompson & Thomas (1977) et Thompson (1978) ont suggéré que la régulation de la pyruvate kinase n'a probablement pas un rôle aussi important chez les lactocoques qui possèdent un système PEP-PTS et utilisent le PEP pour le transport du diholoside et la génération de l'ATP.

La réduction de la prise du lactose chez les trois variants morphologiques par les ionophores reflète l'implication d'une force motrice protonique dans le processus du transport du diholoside. L'effet inhibiteur du DCCD confirme l'implication d'une ATPase.

Les résultats obtenus convergent pour dire que les trois variants de la souche CNRZ 368 font intervenir un système similaire pour la prise du lactose. C'est une perméase et elle fait intervenir deux principales formes d'énergie : l'ATP et un gradient électrochimique encore appelé force motrice protonique. Ceci corrobore le travail de Poolman *et al.* (1989) qui, par clonage du gène lacS codant pour le système du transport du lactose de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* chez *E. coli* et

l'étude du transport de ce diholoside, ont suggéré que le mécanisme de couplage d'énergie avec le transport de ce diholoside est similaire à celui d'*E. coli*. Benateya et al. (1986 ; 1987) ont signalé que, chez *S. salivarius* subsp. *thermophilus* CNRZ 302, le lactose est assimilé par une perméase nécessitant de l'ATP et un gradient électrochimique.

Par ailleurs, la détermination des paramètres cinétiques de prise du lactose indique que, contrairement à l'activité maximale, l'affinité de la perméase pour le lactose est indépendante du type de variant.

Or, Weil et al. (1990) suggèrent que, si on trouve une affinité identique pour un substrat donné dans deux préparations, on peut supposer qu'elles contiennent la même enzyme. La quantité maximale du diholoside pris et la vitesse maximale de prise sont en relation avec le type de variant. On peut, d'ores et déjà, affirmer que ces différences ne sont pas en corrélation avec des phénomènes de compétition au niveau du site actif de l'enzyme. Konings et al. (1989) ont mis en relation la composition de la membrane cellulaire en lipide et la vitesse maximale de prise de la leucine chez *L. Lactis* subsp. *cremoris*.

La différence dans la vitesse maximale entre les trois variants pourrait aussi être une conséquence d'une différence de perméabilité de la membrane cellulaire aux ions et protons qui peut entraîner :

- Une dépense inégale d'énergie aux dépens de la perméation du lactose et de son métabolisme.
- Une augmentation de l'affinité des enzymes (ATPase) pour leurs substrats. En effet, il est bien connu que les ions  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $K^+$ ,  $Ca^+$  sont impliqués dans différentes activités enzymatiques chez les bactéries lactiques (Archibald, 1986 ; Johnson & Berger, 1942 ; Shankar & Bard, 1955).

Une autre hypothèse reposant sur une différence au niveau de la régulation génétique (induction, répression catabolique) et la production de molécules impliquées dans la perméation ne peut être écartée.

## RÉFÉRENCES CITÉES

Archibald F.S. (1986) Manganese : its acquisition by and function in the lactic acid bacteria. *CRC. Rev. Microbiol.* 13 : 63 - 109

Belli W.A., Buckley D.H. & Marquis R.E. (1995) Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. *Can. J. Microbiol.* 41 (9) : 785 - 791

Benateya A., Bracquart P. & Linden G. (1986 ). Perméation des glucides chez *Streptococcus thermophilus*. 1. Caractérisation du système de prise du lactose . Adaptation au lactose et au glucose. *Microbiol. Alim. Nut.* 4 : 253-264

Benateya A., Bracquart P. & Linden G. (1987). Perméation des glucides chez *Streptococcus thermophilus* : Induction par adaptations et mutagénèse chimique. Communication, Club des Bactéries Lactiques, CAEN.

Benthin S., Nielsen J. & Willadsen J. (1993).2 Uptake systems for fructose in *Lactococcus lactis* Subsp *Cremoris* FD1 produce glycolytic and gluconeogenic fructose phosphates and induce oscillations in growth and lactic acid formation. *Appl and Environn Microbiol.* 59 (10) : 3206 - 3211

Bisset D.L. & Anderson R.L. (1974) Lactose and D-galactose metabolism in group N Streptococci : Presence of enzymes for both the D-galactose and D-tagatose 6-P pathways. *J. Bacteriol.* 117 : 318-320

Bracquart P. (1981) An agar medium for the differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in yoghurt. *J. Appl. Bacteriol.* 51 : 303-305

Bracquart P. (1985). Etude des besoins en acides aminés et leur perméation chez *Streptococcus thermophilus*. Thèse de docteur ès sciences, Nancy I

Bracquart P., Le deaut J.Y. & Linden G. (1989). Uptake of glutamic acid by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* CNRZ 302. *J. Dairy Res.* 56 : 107-116

Cecchini G. & Koch A.L. (1975). Effet of uncouplers on "Downhill"  $\beta$ -galactosidase transport in energy depleted cells of *E. coli*. *J. Bacteriol.* 123 : 187-195

Cimazoni G. (1972) The inhibition of enolase by fluoride *in vivo*. *Caries Res.* 6 : 93-102

Fordyce A.M., Crow V.L. & Thomas T.D. (1984). Regulation of product formation during glucose or lactose limitation in nongrowing cells of *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 : 332-337

Greenberg N.A. & Mahoney R.R. (1982). Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sci.* 47 : 1824-1835

- Hemme D., Wahl D. & Nardi M. (1980). Variations de l'équipement enzymatique de *Streptococcus thermophilus*. *Lait* 60 : 111-129
- Herman R.E. & McKay L.L. (1986). Cloning and expression of the  $\beta$ -D-galactosidase gene from *Streptococcus thermophilus* in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 : 45-50
- Johnson M.J. & Berger J. (1942) The enzymatic properties of peptidases. *Adv. Enzymol.* 2 : 69-89
- Kashket E. R., et Wilson T.H. (1972). Galactoside accumulation associated with ions movements in *Streptococcus lactis*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 49 : 615-620
- Kashket E. R. & Wilson T.H. (1973). Proton- coupled accumulation of galactoside in *Streptococcus lactis*. *Proc. Nat. Sci.* 70 : 2866-2869
- Konings W.N., Poolman B. & Driessen A.J.M. (1989). Bioenergetics and solute transport in lactococci. *CRC Critical Rev. Microbiol.* 16 : 419-476
- Larsen R.F. & Parada J.L. (1988). Acid phosphatases in some cheeses and starters. *Sci aliments* 8 : 285-294
- Linnane A.W. & Wrigley C.W. (1963). Fragmentation of the electron transport chain of *E. coli*, preparation of a soluble formate deshydrogenase-cytochrome b1 complex; *Biochem. Biophys. Acta.* 77 : 408
- McKay L.L., Walter L.A., Sandine W.E. & Elliker P.R. (1969). Involvement of phosphoenolpyruvate in lactose utilization by group N streptococci. *J. Bacteriol.* 99 : 603-610
- McKay L.L., Miller A., Sandine W.E. & Elliker P.R. (1970) Mechanisms of lactose utilization by lactic acid Streptococci: Enzymatic and genetic analyses. *J. Bacteriol.*, 102 : 804-809
- Mercenier A. & Lemoine Y. (1990). Molecular genetics of *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 87 : 61-78
- Nicholls D.G. (1982) Bioenergetics. An introduction to chemiosmotic theory- 190pp. Academic Press
- Pebay M., Guimont C., Bracquart P. & Linden G. (1987) About morphological variability in *Streptococcus thermophilus*. Second symposium on lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Reviews* 46 : p98
- Poolman B., Royer T.J., Mainzer S.E. & Schmidt B.F. (1989) Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus* : a hybrid protein with homology to the melibiose carrier and enzyme III of phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems. *J. Bacteriol.* 171 : 244-253
- Poolman B., Royer T.J., Mainzer S.E. & Schmidt B.F. (1990) Carbohydrate utilization in *Streptococcus thermophilus* : Characterization of genes for Aldolase 1-Epimerase (Mutarotase) and UDP glucose 4-Epimerase. *J. Bacteriol.* 172 : 4037-4047
- Pradet A. (1967) Étude des adénosine-5'-mono, di et triphosphates dans les tissus végétaux. I) Dosage enzymatique. *Physiol. Vég.* 5 : 209-221
- Prydz H. & Froholm L.O. (1964) The use of a recording Beckman DB spectrophotometer for the assay of ATP with luciferin-luciferase reagent. *Acta Chem. Scand.* 18 : 554-556
- Ratliff T.L., Stinson R.S. & Talburt D.E. (1980). Effet of prostaglandin E1 - induced elevation of cyclic AMP on glucose repression in the lactic streptococci. *Can. J. Microbiol.* 26 : 58 - 63
- Reddy M.S., Williams F.D. & Reinbold G.W. (1973). Lactose transport in *Streptococcus thermophilus*. *ADSA, J. Dairy. Sci.* 56 : 634 - 635
- Shankar K., et Bard R.C. (1955). Effect of metallic ions on the growth, morphology, and metabolism of *Clostridium perfringens*. I. Magnesium. *J. Bacteriol.* 69 : 436-443
- Somkuti G.A. & Steinberg D.H. (1979). Adaptability of *Streptococcus thermophilus* : Induction. Purification, and properties. *J. Appl. Biochem.* 1 : 357-368
- Thomas T.D. (1976) Regulation of lactose fermentation in group N streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 474 - 478
- Thomas T.D., Turner R.W. & Crow V.L. (1980). Galactose fermentation by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* : pathway products and regulation. *J. Bacteriol.* 144: 672-682
- Thompson J. (1978) *In vivo* regulation of glycolysis and characterization of sugar:phosphotransferase systems in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 136 : 465-476
- Thompson J. (1979). Lactose metabolism in *Streptococcus lactis* phosphorylation of galactose and glucose moieties in vivo. *J. Bacteriol.* 140 : 774-785
- Thompson J. (1980) Galactose transport systems in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 144 : 683 - 691
- Thompson J. & Thomas T.D. (1977). Phosphoenolpyruvate and 2-phosphoglycerate: Endogenous energy source for sugar accumulation by starved cells of *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 130: 583-595

Thompson J., Turner K.W., et Thomas T.D. (1978).  
Catabolite inhibition and sequential metabolism of  
sugars by *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 133 :  
1163-1171

Tinson W., Hillier A.J. & Jago G.R. (1982) Metabolism of  
*Streptococcus thermophilus* 1.Utilization of lactose,  
glucose and galactose. *Austr. J. Dairy Technol.* 37 :  
8-13

Weil J.H., Bonnet J., Boulanger Y., Chambon R.,  
Dubertret D., Gautheron C., Kedinger C., Lazdunski  
M., Montreuil J., Patte J.C., Rebel G., Rossignol J.M.  
& Wright M. (1990) Biochimie générale. 6<sup>e</sup> édition  
Masson