

MATAMOROS Sébastien¹, LEROI Françoise², PREVOST Hervé¹ and PILET Marie-France¹

¹ : UMR INRA 1014 SECALIM, ENITIAA, Nantes

² : Laboratoire de Sciences et Techniques Alimentaires Marines, IFREMER, Nantes

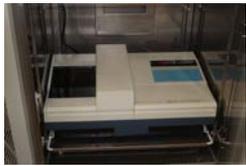
INTRODUCTION :

La souche de *Lactococcus* sp. EU2241 a été isolée à partir de saumon emballé sous atmosphère modifiée. Elle a montré d'excellentes aptitudes à la biopréservation, augmentant la durée de vie de crevettes décortiquées sous vide, de saumon fumé et permettant d'inhiber de 2 logs la croissance de *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* sur du saumon fumé.

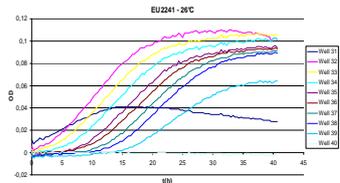
L'objectif de ces travaux est de caractériser le comportement à basse température de cette souche, et d'identifier les mécanismes moléculaires intervenant dans sa capacité à s'adapter aux basses températures.

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet intégré (IP) SEAFOODplus accordé par la commission européenne sous le numéro FOOD-CT-2004-506359

Profil de croissance en fonction de la température

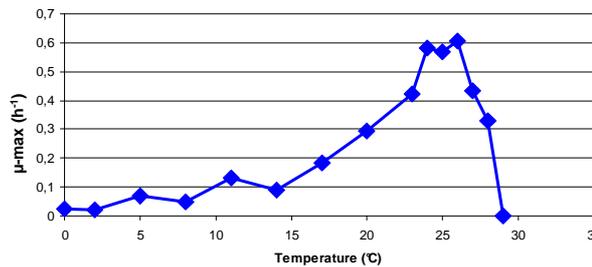


Enregistrement de la croissance à différentes températures en utilisant un appareil de mesure de densité optique Bioscreen C



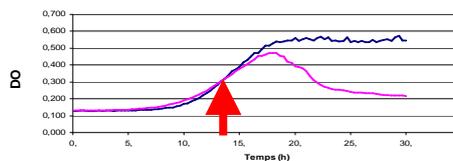
Croissance de la souche EU2241 à 26°C selon la méthode des dilutions successives (Augustin *et al.*, 1999) enregistrée au Biscreen C

Cette méthode permet d'estimer la vitesse maximale de croissance μ_{max} à une température donnée par régression linéaire des intervalles de temps entre les courbes à une DO donnée.



Taux de croissance maximums de la souche EU2241 en fonction de la température

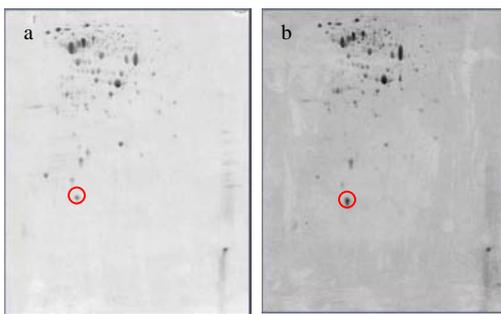
La courbe du taux de croissance en fonction de la température révèle pour la souche EU2241 des caractéristiques inhabituelles pour une bactérie lactique : absence de croissance à 30°C ; très grande proximité entre les températures optimum et maximum de croissance et croissance jusqu'à 0°C.



Effet d'un choc chaud sur la croissance de la souche EU2241. Courbe bleue : croissance à 26°C. Courbe violette : croissance à 26°C suivie d'un passage à 30°C (flèche rouge).

La souche EU2241 est un des premiers exemple de bactéries lactiques incapable de pousser à des températures de 30°C ou plus.

Identification d'une protéine surexprimée à basse température



Électrophorèse bidimensionnelle des protéines totales de la souche EU2241 à 26°C (a) et 5°C (b). Cercle rouge : protéine surexprimée plus de 5 fois à 5°C.

Extraction de la protéine et séquençage par chromatographie liquide et spectrométrie de masse (LC/MS-MS)

Séquence partielle de cold-shock protein (CSP) obtenue par LC/MS-MS

Amorces de PCR

Amplification et séquençage d'un fragment interne d'un gène de CSP

Traitement de la séquence *in silico*, mise en évidence d'une ORF

Séquençage du fragment de PCR inverse (400 pb)

Digestion de l'ADN total par des enzymes de restriction, circularisation (T4 DNA ligase) et PCR inverse

```

1      10     20     30     40     50     60     66
csp_EU2241      HAQGTVKWFAEKGFGFITGADGKQVFNHFSAIQTDFGKTLDEGQAVNYDVEDG
cspE_lactococcus_lac HAQGTVKWFAEKGFGFITTEGNDVFAHFSAIQTDFGKTLDEGQAVTFDVEEGPRGPQAVNIQK
cspC_lactobacillus_p MEHGTVKWFAEKGFGFITRENGSDVFNHFSAIQEDGFKSLDEGQAVNFQVEESDRGPPAANVTKA
csp_Enterococcus_fae METGTVKWFNSDKGFGFITRENGSDVFNHFSAIQEDGFKTLDEGQAVTFEIEEGQRGPPQATNVTKA
Consensus      HaqGTVKWFNa.KGFGFIT.e#G.DVfVHFSAIQtdGFKtL#EGQaVn%#!E#g.rgp.a.n..k.
    
```

Alignement des protéines les plus similaires à la séquence identifiée chez EU2241.

Entourés : régions consensus RNP-1 et RNP-2 de fixation à l'ARN.

CONCLUSION

La souche de *Lactococcus* sp. EU2241 possède un profil de croissance unique à ce jour parmi les bactéries lactiques, ayant à la fois un maximum de croissance très bas pour ce type de bactérie (30°C), et une croissance rapide à basse température. Une clé de cette adaptation se trouve peut être dans les cold-shock protein (CSP) dont un exemplaire a pu être identifié chez *Lactococcus* sp. EU2241. Son rôle exact dans l'adaptation au froid ainsi que la présence d'autres protéines du même type restent à confirmer.