



HAL
open science

Comportement des bactéries lactiques en fonction des protéines d'origine animale ou végétale ou d'un mixte des deux.

Doublet Océane

► To cite this version:

Doublet Océane. Comportement des bactéries lactiques en fonction des protéines d'origine animale ou végétale ou d'un mixte des deux.. Food and Nutrition. 2021. hal-03134947

HAL Id: hal-03134947

<https://hal.inrae.fr/hal-03134947>

Submitted on 8 Feb 2021

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

RAPPORT DE STAGE TN09

Comportement des bactéries lactiques en fonction des protéines d'origine animale ou végétale ou d'un mixte des deux.

Réalisé à :

*UMR 1253, INRAE, Institut Agro, Science et Technologie du Lait et de l'Œuf,
Rennes*

Stage du 01/09/2020 au 12/02/2021

Encadrant UTC : ROSSEZ Yannick

Maîtres de stage : CANON Fanny, GAGNAIRE Valérie, THIERRY Anne



DOUBLET Océane

GB03

Remerciements

Je remercie Yves Le Loir, directeur de l'UMR STLO, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et Éric Guedon de m'avoir permis d'effectuer mon stage dans l'équipe MicroBio.

Je tiens tout particulièrement à remercier Fanny Canon de m'avoir si bien encadrée pendant ces 6 mois de stage. Un grand merci pour sa patience, sa disponibilité et sa confiance. Ses bons conseils et astuces ont rendu ce stage on ne peut plus enrichissant et sa bienveillance et bonne humeur ne l'a rendu que plus plaisant. Les échanges que nous avons pu avoir, qu'ils soient scientifiques ou non furent très agréables et enrichissants. Merci également pour son écoute et son soutien dans les moments de doute.

Merci à Anne Thierry et Valérie Gagnaire pour avoir partagé leurs connaissances et leurs bonnes idées qui ont permis de faire avancer le stage. La rigueur et les conseils qu'elles m'ont apportés me seront utiles aussi bien personnellement que professionnellement.

Merci aux techniciens de laboratoire, Jessica Musset et Sébastien Devault, pour leur aide et leur disponibilité.

Un grand merci aux doctorants pour leur accueil et leur gentillesse lors des pauses de 10h.

Je tiens également à remercier les autres stagiaires du laboratoire pour les moments de partage qui ont ponctué mon stage. Leur bonne humeur, leur gentillesse et leur soutien ont rendu ce stage très agréable. Je pars avec de très beaux souvenirs de ces 6 mois passés avec eux.

Enfin, merci à tous les membres du laboratoire pour leur accueil et leur aide tout au long de ces 6 mois. Ils ont contribué à ce que ce stage se déroule le mieux possible.

Table des matières

I.	Lexique.....	4
II.	Introduction	5
III.	Présentation et organisation d'INRAE et du laboratoire STLO.....	7
IV.	Etat de l'art.....	9
A.	Présentation générale de la fermentation des aliments	9
B.	Bactéries lactiques.....	9
a)	Présentation générale des bactéries lactiques.....	9
b)	Facteurs influençant la croissance des bactéries lactiques.....	9
c)	Système protéolytique des bactéries lactiques :	11
C.	Co-culture.....	12
a)	Définitions : communauté auto-assemblée et co-culture artificielle	12
b)	Interactions positives chez les bactéries lactiques	12
c)	Avantages des co-cultures de microorganismes dans les aliments fermentés	13
D.	Protéines de lait et protéines de lupin : composition générale et structure	13
a)	Les protéines de lait	13
b)	Les protéines de lupin	14
c)	Composition en acides aminés des caséines et des protéines de lupin.....	14
E.	Fermentation d'aliments mixtes composés de lait et de légumineuse	15
V.	Matériel et Méthodes :.....	17
A.	Milieus de culture	17
a)	Préparation des milieux chimiquement définis :	17
b)	Evaluation du pouvoir tampon des milieux de culture	18
c)	Identification des sources de carbone utilisées par les souches en galeries API 50 CHL.....	18
B.	Etude des microorganismes	18
a)	Sélection des souches :	18
b)	Suivi de croissance bactérienne.....	19
c)	Identification d'un/des acides aminés limitant du CDM Lupin.....	20
C.	Analyses biochimiques des échantillons issus des cultures :	21
a)	SDS-PAGE.....	21
b)	Dosage OPA	22
D.	Analyses statistiques.....	22

VI.	Résultats.....	23
A.	Cinétique de croissance et d'acidification des souches donneuses dans les milieux chimiquement définis.	23
	a) Croissance bactérienne des 3 souches donneuses dans les 3 CDM	23
	b) Acidification du milieu par les trois souches donneuses selon le type/la source de protéines .	23
B.	Hydrolyse des protéines du milieu pendant la croissance des souches donneuses	26
	a) Nature des protéines hydrolysées	26
	b) Activité protéolytique des souches donneuses estimée par analyse des groupements aminés libres	27
C.	Analyse en composantes principales	28
D.	Etude de l'impact de la méthionine, acide aminé limitant du lupin, sur la croissance des souches donneuses.....	30
E.	Croissance des souches donneuses et receveuses en co-culture dans les CDM caséines, lupin et mix	31
	a) Niveau de population des souches receveuses en co-culture.....	31
	b) Acidification des trois CDM avec les souches donneuses et receveuses en co-culture.....	31
F.	Mesure de l'activité protéolytique en co-culture des souches donneuses avec les souches receveuses	33
VII.	Discussion.....	35
VIII.	Conclusions et perspectives	38

I. Lexique

ACP = analyse en composantes principales

Arg = Arginine

Asn = Asparagine

BL = bactérie lactique

CDM = chemical defined medium (milieu chimiquement défini)

CEP = Cell Envelope Proteinase

Cys = Cystéine

DTT = dithiothréitol

GOS = α -galactoside

His = Histidine

HL = hydrolysats de lupin

Ile = Isoleucine

LAC = lactose

Leu = Leucine

Met = Méthionine

ND = non déterminé

OPA = O-phthaldialdéhyde

Opp = Oligopeptide

RAF = raffinose

SAC = saccharose

SDS = dodécylsulfate de sodium

Ser = Sérine

T = tryptone

UFC = unité formant colonies

Val = Valine

II. Introduction

Dans un contexte d'augmentation de la population mondiale et de la demande alimentaire associée, il existe de réels enjeux aux niveaux écologique, économique et sociétal à remplacer une part des protéines animales par des protéines végétales dans notre alimentation. Augmenter la part de protéines végétales par rapport à celles d'origine animales guiderait le consommateur vers une transition alimentaire pour consommer plus durablement et sainement. Dans ce contexte, les légumineuses sont particulièrement intéressantes puisqu'elles sont très riches en protéines (jusqu'à 40 % en poids sec de la graine). De plus, les légumineuses permettent de fixer l'azote dans le sol, d'améliorer la biodiversité des sols et d'utiliser moins de ressources en eau. La grande majorité des travaux réalisés sur le remplacement des protéines animales par des protéines végétales sont principalement tournés vers le soja et tendent à laisser de côté d'autres légumineuses toutes aussi riches en protéines, parmi lesquelles se trouve le lupin. Une des contraintes majeures des légumineuses est qu'elles ont une assez mauvaise image auprès des consommateurs occidentaux, qui leur attribuent une mauvaise digestibilité due à la présence de facteurs antinutritionnels et de galacto-oligo saccharides (GOS), un goût et une odeur peu appréciés et une préparation longue pour les cuisiner. Dès lors, leur consommation est encore limitée actuellement. L'étude des mixtes lait-légumineuses est un axe de recherche transversal interdisciplinaire au sein du laboratoire STLO d'INRAE. L'objectif de cette transversalité, appelée LOVE (pour lait œuf et végétaux) et animée par Valérie Gagnaire et Fanny Guyomarc'h, est de proposer des aliments innovants « mixtes », où les composants d'origine animale sont partiellement remplacés par des composants d'origine végétale pour soutenir la durabilité alimentaire. Les activités de recherche associées à LOVE portent en partie sur la fermentation des aliments mixtes, en référence aux fermentations lactiques largement utilisées en industrie agro-alimentaire. Cette fermentation, en particulier la lactofermentation pourrait pallier les inconvénients évoqués plus haut, puisqu'elle peut modifier le profil sensoriel des produits fermentés, réduire la quantité de facteurs antinutritionnels et réduire la quantité de GOS. Elle constituerait donc une bonne solution pour réconcilier les consommateurs et les légumineuses. En revanche, la souche de bactérie qui permettrait d'apporter l'ensemble de ces fonctions à la fois n'existe pas. Il est donc nécessaire d'associer les microorganismes en co-cultures, c'est-à-dire des associations « artificielles » de microorganismes au sens où ceux-ci ne coexisteraient pas nécessairement naturellement. Ces co-cultures sont basées sur la complémentarité métabolique entre souches bactériennes. L'idée est d'associer des fonctions clés comme leur aptitude à fermenter les sources de carbone disponibles dans les matrices mixtes et l'activité protéolytique des souches. Les co-cultures peuvent également permettre d'améliorer les procédés de fabrication et les produits (augmentation de la vitesse de transformation et des quantités de molécules produites ou dégradées). Ces bénéfices nécessitent que les microorganismes en co-culture interagissent positivement. Les bactéries lactiques (BL) sont de parfaites candidates pour favoriser ces interactions puisqu'elles possèdent de nombreuses auxotrophies en acides aminés, vitamines et bases azotées, ainsi que des mécanismes exploitables pour y faire face notamment via leur système protéolytique. Ces recherches font actuellement l'objet de la thèse intitulée : « Favoriser les interactions positives entre bactéries lactiques en co-culture : vers de nouvelles applications alimentaires » menée par Fanny Canon. Un milieu de culture mélangeant source de protéines de lait et de protéines de lupin a été mis au point pour faciliter l'étude des interactions bactériennes en co-cultures. Ces co-cultures combinent des souches possédant une activité protéolytique et donc capables d'hydrolyser des protéines, appelées

souches « donneuses », et des souches non protéolytiques, appelées souches « receveuses », qui dépendent d'une source externe en peptides et acides aminés pour se développer. Les premiers résultats de cette thèse suggèrent qu'il existe une corrélation entre la quantité et la nature des acides aminés et peptides produits, issus de l'activité protéolytique des souches donneuses et leur capacité à stimuler les souches receveuses dans un mixte lait-lupin. L'objectif de mon stage est d'étudier si la nature des protéines présentes dans le milieu de culture impactait, en premier lieu, la croissance des souches donneuses en monoculture, puis si elle impactait les interactions entre souches donneuses et les souches receveuses.

Pour répondre à cette problématique, la stratégie a été la suivante : trois milieux chimiquement définis (CDM) contenant comme source d'azote uniquement soit des protéines de lupin, soit des caséines, soit un mélange des deux sources, ont été préparés. Puis nous avons déterminé si les protéines influençaient la croissance des souches donneuses en monocultures. Enfin, nous avons étudié si la nature des protéines hydrolysées par les donneuses et la quantité des peptides et acides aminés avaient un impact sur la croissance des souches receveuses en co-culture avec les souches donneuses.

Une première partie de ce rapport présente INRAE et le laboratoire STLO. La seconde partie présente l'état de l'art sur les bactéries lactiques, la notion de co-culture ainsi que sur les sources d'azote utilisées, à savoir les protéines de lait et de lupin, et enfin la fermentation de matrices mixtes lait-légumineuse. L'état de l'art a pour objectif de présenter les connaissances clés pour analyser et comprendre les résultats obtenus lors de mon stage ainsi que les expériences qui ont été menées. La troisième partie détaille le matériel et les méthodes utilisés tout au long du projet. La quatrième partie présente les résultats, discutés dans la cinquième partie.

III. Présentation et organisation d'INRAE et du laboratoire STLO

INRAE, l'institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement est né le 1^{er} janvier 2020 de la fusion de l'INRA, Institut national de la recherche agronomique et de l'Irstea, Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture. Il est le premier institut de recherche au monde à caractère spécialisé sur les domaines interdépendants de l'agriculture, de l'alimentation et de l'environnement. L'institut contribue à l'exploration des solutions devenues indispensables pour faire face aux défis mondiaux de ce siècle, en particulier sur le climat, la biodiversité et la sécurité alimentaire. En accentuant le partage des connaissances et de l'innovation, INRAE peut contribuer aux transitions nécessaires : agroécologique, nutritionnelle et énergétique. INRAE emploie plus de 10 000 personnes (chercheurs, ingénieurs, techniciens, personnels administratifs et doctorants) au sein de 14 départements scientifiques spécialisés dans des domaines variés et 18 centres de recherche localisés dans toute la France.

Parmi ces 18 centres de recherche se trouve l'INRAE de Rennes. Il intègre l'UMR STLO (Unité Mixte de Recherche en Science et Technologie du lait et de l'œuf) qui emploie près de 120 personnes, dont 83 permanents, qui travaillent spécifiquement sur le lait et l'œuf. L'unité est dite mixte car elle associe l'INRAE et l'Institut agro, école nationale supérieure des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage. Le STLO est l'un des 4 laboratoires d'INRAE dédié à l'étude du lait et à sa transformation. Il y a aussi l'URTAL (Unité de Recherche Technologie et Analyses Laitières), l'UMRF (Unité Mixte de Recherche sur le Fromage) et l'AFPA (Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux). Le STLO regroupe des compétences variées telle que la biochimie, la microbiologie, le génie des procédés et les sciences des aliments. Il comprend différents corps de métiers : enseignants-chercheurs, chercheurs, ingénieurs, techniciens et personnels administratifs.

Cette unité s'organise en 6 équipes aux domaines d'expertise très différents (microbiologie, nutrition, procédés industriels, physico-chimie des protéines et lipides, ...), qui poursuivent les objectifs suivants :

1. Générer des connaissances sur l'organisation des constituants du lait et de l'œuf
2. Eco-concevoir les principaux procédés appliqués au lait et à l'œuf
3. Maîtriser leurs conséquences fonctionnelles et nutritionnelles
4. Comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans leur transformation ou leur altération

Pour répondre à ces missions, l'UMR STLO développe un partenariat fort avec différentes universités dans toute la France, avec des centres de recherche français et étrangers, mais aussi des industriels.

L'UMR STLO possède également de nombreux dispositifs expérimentaux comme la plateforme lait où des procédés innovants sont réalisés à l'échelle pilote, une tour de séchage par atomisation, une plateforme analytique contenant différentes techniques d'analyse des structures et des interactions des constituants des produits laitiers et des ovoproduits ainsi qu'un centre international de ressources biologiques, dédié aux bactéries d'intérêt alimentaires, le CIRMBIA, qui héberge plus de 4000 souches de 113 espèces différentes.

J'ai effectué mon stage au sein de l'équipe Microbiologie dont l'un des objectifs est de comprendre le fonctionnement des bactéries et des communautés bactériennes en interaction avec la matrice et les

procédés de transformation, pour piloter leur potentiel vers des fonctionnalités ciblées. Par le biais de nouveaux aliments fermentés, cette équipe est à la recherche de la sécurité sanitaire, de caractéristiques techno-fonctionnelles et organoleptiques ainsi que de qualité nutritionnelle. La santé et le bien-être de l'animal et de l'homme sont également au centre des projets.

J'ai intégré cette équipe avec la mission d'étudier l'adaptation des bactéries lactiques en fonction des types de nutriments présents d'origine animale, le lait, ou végétale, le lupin ou d'un mixte des deux. Cette mission s'intègre dans la thèse deCIBELL, menée par Fanny Canon, intitulée « Favoriser les interactions positives entre bactéries lactiques en co-culture : vers de nouvelles applications alimentaires ».

IV. Etat de l'art

A. Présentation générale de la fermentation des aliments

La fermentation existe depuis des millénaires et est utilisée par l'homme depuis plus de 10 000 ans (Huchet, 2016). Ce procédé, peu coûteux est un moyen de conserver les aliments et de diversifier les denrées alimentaires. La fermentation consiste à transformer des matrices alimentaires variées, animales, végétales ou même des mélanges, par l'action de micro-organismes. D'un point de vue biochimique, la fermentation lactique est un procédé métabolique par lequel l'énergie, sous forme d'ATP, est produite à partir de composés organiques qui agissent à la fois comme donneur et accepteur d'électron (Marco et al., 2021).

La fermentation du lait existe depuis environ 7 000 ans (Yang et al., 2014), il s'agit d'un moyen naturel pour augmenter la durée de conservation du lait et de préserver les composantes nutritionnelles de celui-ci. Les bactéries lactiques (BL) ont un rôle essentiel dans la fermentation des produits laitiers. La diversité des produits repose sur la combinaison d'une diversité de technologies de fabrication et de microorganismes, ce qui a donné lieu à de nombreux types de produits laitiers fermentés (Blinda & Ouwehand, 2019).

B. Bactéries lactiques

Cette partie s'applique en particulier aux lactocoques et lactobacilles.

a) Présentation générale des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BL) sont parmi les groupes les plus importants de micro-organismes utilisés dans les fermentations alimentaires. On peut les retrouver dans les produits laitiers fermentés, le saucisson, les produits végétaux fermentés comme dans la choucroute ou les olives par exemple (Tamang et al., 2016).

Il s'agit d'un groupe de bactéries à Gram positif et hétérotrophes, catalase négatives, anaérobies, non sporulantes, en forme de coque ou de bacille, non mobiles. Leur caractéristique principale est la production d'acide lactique à partir de glucides variés, ce qui provoque la diminution du pH du milieu. Les BL sont majoritairement homofermentaires, c'est-à-dire que leur métabolisme contribue à la dégradation des sucres en acide lactique par la glycolyse, au moins à 90%. Certaines espèces de BL sont dites hétérofermentaires : elles produisent en plus du lactate, de l'éthanol ou de l'acétate et du dioxyde de carbone (Blinda & Ouwehand, 2019).

b) Facteurs influençant la croissance des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BL), ont des besoins spécifiques en termes de source de carbone, de source d'azote, de minéraux ainsi que de vitamines. Les conditions environnementales sont également importantes, comme le pH, la température ou encore le taux d'oxygénation du milieu.

Facteurs physico-chimiques influençant la croissance des bactéries lactiques

Le groupe des BL rassemble en majeure partie des espèces mésophiles, c'est-à-dire se développant dans une gamme de température variant de 20°C à 40°C. Le pH et le pouvoir tampon du milieu de fermentation influencent également la croissance des BL. Le pH optimal des BL se trouve entre 6 et 6,5. La présence

d'oxygène dans le milieu impacte plus ou moins les BL selon les espèces. Les BL peuvent passer de la fermentation à un métabolisme aérobie (respiration) lorsque de l'hème est présent dans le milieu (Pedersen et al., 2012). En revanche, l'oxygène peut avoir un effet inhibiteur, voire toxique. La toxicité de l'oxygène s'explique par la production de radicaux superoxydes que les bactéries anaérobies ne peuvent pas détruire car elles ne possèdent pas de catalases ou de peroxydases (Blinda & Ouwehand, 2019). Ces bactéries doivent être cultivées en anaérobie, c'est-à-dire sans oxygène dans le milieu de culture, ou en présence de faibles concentrations en oxygène.

Besoins nutritionnels

Les BL peuvent utiliser différentes sources de carbone comme des sucres simples, à savoir des hexoses ou des pentoses, et des acides organiques, comme les acides pyruviques, succiniques, fumariques, acétiques et lactiques qui sont des intermédiaires du métabolisme. Ils apparaissent notamment dans le cycle de Krebs (Berland et al., 1976). D'autre part, les BL disposent de différentes enzymes capables de dégrader des sucres plus complexes comme la β -galactosidase qui hydrolyse le lactose, le principal sucre du lait. Certaines souches de *Lactococcus lactis* ont montré la capacité à utiliser des GOS incluant stachyose, raffinose, mélibiose (produit de dégradation du raffinose), glucides retrouvés dans de nombreuses légumineuses (Cavanagh et al., 2015), comme dans la graine de lupin (figure1). Comme pour de nombreux autres composés, l'utilisation du raffinose comme source de carbone est souche-dépendante au sein d'une espèce.

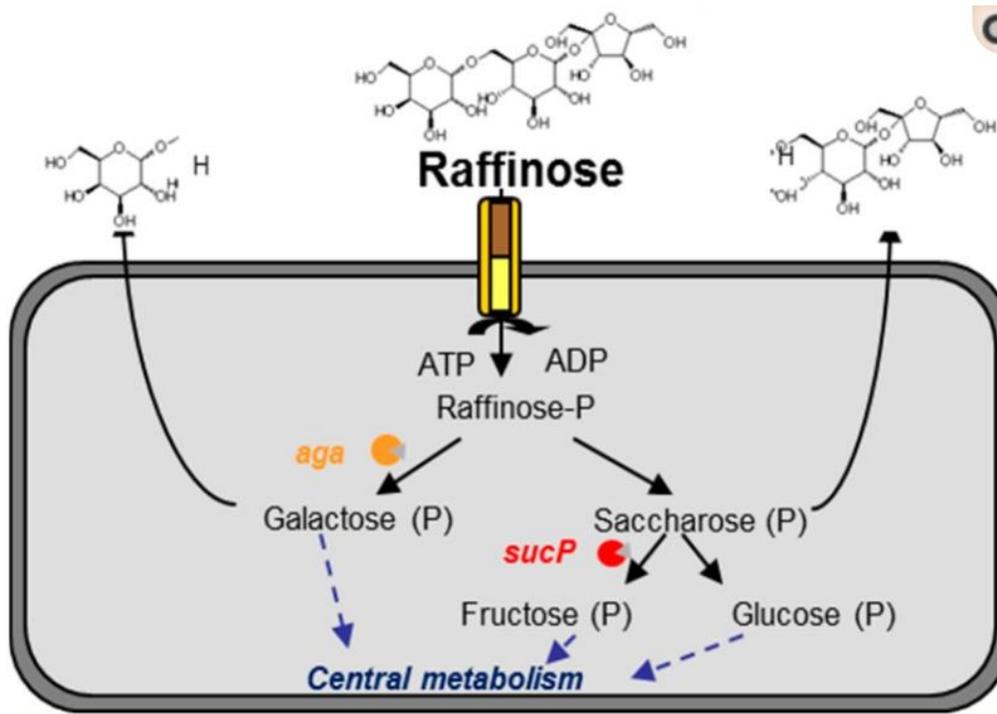


Figure 1: Métabolisme du raffinose de *Lactococcus lactis* (Laroute et al., 2017).

Les BL sont auxotrophes, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas capables de synthétiser tous les acides aminés. Elles ont donc besoin d'une source d'azote organique assimilable, comme des acides aminés ou des peptides, pour assurer leur croissance. Dans l'exemple suivant, ces acides aminés sont considérés comme

essentiels au métabolisme de la souche *L. lactis* IL 1403 dans des conditions de cultures spécifiques: Met, Ser et les acides aminés à chaîne ramifiée Arg, His, Asn, Ile, Leu, Val (Aller et al., 2014). Pour *Lactiplantibacillus plantarum* (anciennement appelé *Lactobacillus plantarum*), un exemple est donné par Teusink et al., 2005, le milieu de culture minimal est composé des acides aminés essentiels qui sont Glu, Ile, Leu, Arg, Met, Phe, Thr et Val. Les besoins en ces acides aminés sont très variables d'une souche à l'autre et dans le tableau 1 sont montrés les besoins de la souche *L. lactis* IL 1403 et de la souche *L. plantarum* WCFS1 :

Tableau 1 : Composition en acides aminés essentiels à la croissance de la souche *Lactococcus .lactis* IL 1403 et de la souche *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1 dans un CDM préparé pour l'analyse et la détection des acides aminés en mg/L de CDM (Aller et al., 2014; Teusink et al., 2005).

Acide aminé	<i>L. lactis</i> IL 1403	<i>L. plantarum</i> WCFS1
Arg	185	125
Asn	74	ND
Glu	70	500
His	60	150
Ile	102	210
Leu	207	475
Met	41	125
Phe	86	275
Thr	76	225
Val	107	325

Enfin, pour assurer leur croissance, les BL ont également besoin d'apport exogène en différents facteurs de croissance (vitamines, minéraux), qui varie selon les espèces et les souches.

c) Système protéolytique des bactéries lactiques :

La capacité des BL à croître dans des matrices, qu'elles soient d'origines animales (laitières dans le cas présent) ou végétales, dépend entre autre du système protéolytique. Comparés aux lactococques, les lactobacilles sont capables d'exprimer un plus grand nombre de peptidases intracellulaires, de perméases aux acides aminés et de multiples systèmes de transport d'oligopeptides (transporteurs Opp) pour compenser leurs auxotrophies (Savijoki et al., 2006). Ils peuvent posséder plusieurs protéases de parois (Sadat-Mekmene et al., 2011).

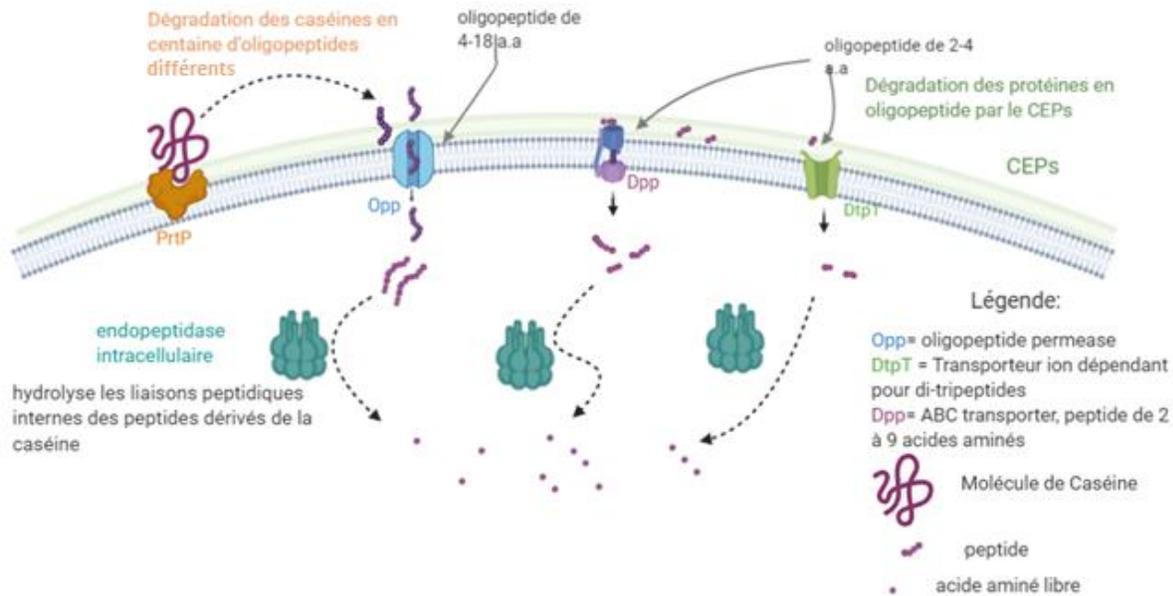


Figure 2 : Schéma du système protéolytique des bactéries lactiques, dans le cas de la dégradation de caséines, d'après Savijoki et al (2006). Les caséines sont des protéines riches en proline. Dans ce cas, les peptidases ont des spécificités de coupures particulières en plus des peptidases dites générales a.a = acide aminé CEP = Cell Envelope Proteinase

C. Co-culture

La plupart des aliments fermentés sont issus de la fermentation par une communauté plus ou moins complexe de microorganismes. Les microorganismes au sein de cette communauté peuvent interagir ensemble. Ces interactions peuvent être directes, c'est-à-dire nécessitant un contact physique, ou indirectes, dans ce cas, elles se font par l'intermédiaire de métabolites présents dans le milieu (Freilich et al., 2011). Ces interactions peuvent être soit positives ou négatives.

a) Définitions : communauté auto-assemblée et co-culture artificielle

Il existe deux types de communautés de microorganismes (Canon et al., 2020). Le premier type est les co-cultures auto-assemblées, spontanées, qui se forment sans l'intervention de l'homme. Cette association résulte de la sélection naturelle. Le second type d'assemblage de microorganismes est les co-cultures artificielles, c'est-à-dire qui sont assemblées par l'Homme. Les microorganismes ont été sélectionnés pour leurs propriétés intéressantes afin d'apporter, dans le cas d'aliments fermentés, les caractéristiques spécifiques attendues en termes de texture, goût et aspect par exemple.

b) Interactions positives chez les bactéries lactiques

Les interactions positives chez les microorganismes entraînent une amélioration de la performance (vitesse de croissance et/ou population maximale atteinte) d'au moins un des partenaires d'interaction. Il existe plusieurs types d'interactions, pour plus de détails, voir la revue de Canon et al. (2020).

Ces interactions positives permettent une spécialisation fonctionnelle, c'est-à-dire une division des tâches réalisées par les microorganismes afin de réaliser des tâches complexes qui requièrent des capacités spécifiques de plusieurs souches. Par exemple, la division des voies métaboliques en plusieurs souches en

co-culture, peut réduire la charge métabolique imposée à chaque souche. Le partage de métabolites primaires ainsi que le partage d'enzyme(s) hydrolytique(s) extracellulaire(s) sont impliqués dans plusieurs interactions positives (Zelezniak et al., 2015). Ce partage de « public goods » favorise les dépendances nutritionnelles sur lesquelles reposent les interactions positives entre microorganismes. Dans le cas de co-cultures artificielles de bactéries lactiques, il est possible de favoriser ces dépendances nutritionnelles au travers du partage de substrats hydrolysés grâce aux d'enzymes extracellulaires d'une souche dite « donneuse », les rendant disponibles pour une souche dite « receveuse » (Canon, 2020).

c) Avantages des co-cultures de microorganismes dans les aliments fermentés

Les co-cultures apportent des avantages dans les aliments fermentés comparées aux monocultures. Parmi ces avantages, on trouve une modification du profil des métabolites produits, qui peut contribuer à l'amélioration des caractéristiques sensorielles, nutritionnelles et/ou digestives des aliments fermentés. Par exemple, des souches de BL ont la capacité de dégrader le mélibiose, le raffinose et le stachyose tandis que d'autres dégradent le lactose, sucres qui peuvent provoquer un inconfort intestinal, alors que d'autres souches peuvent être utilisées pour produire des arômes intéressants. Les co-cultures peuvent entraîner par exemple l'augmentation de la quantité de peptides et d'acides aminés dans les aliments fermentés, ce qui peut contribuer à la croissance d'autres souches qui en monoculture ne pourraient pas pousser (Gobbetti et al., 1994).

D. Protéines de lait et protéines de lupin : composition générale et structure

Le lait de vache est composé à 87,3% d'eau et 12,7% d'extrait sec, qui contient : 3,3 à 4,7% de matière grasse, 4,6% de lactose, 3,2 à 3,5% de protéines ainsi que 0,7% de minéraux, essentiellement du calcium, du phosphate, du chlore, et du potassium (Cayot & Lorient, 1998).

a) Les protéines de lait

Les caséines représentent les protéines majeures du lait, soit environ 80% des protéines, les 20 % restant étant constituées des protéines du lactosérum. Les caséines sont présentes sous la forme de micelles qui ont une taille moyenne d'environ 100 nm de diamètre, formées de 92 à 93% de protéines et 7% de minéraux. La partie minérale est composée principalement de phosphate de calcium, de magnésium et d'un acide organique le citrate (Fox, 2003). La structure des micelles de caséines leur confère des fonctions particulières comme la fixation du calcium ou encore la résistance à la chaleur. Il s'agit d'une structure supramoléculaire hétérogène composée de caséines α_{s1} (33 g/100g), α_{s2} (11 g/100g), β (33 g/100g), et κ (11 g/100g) (Cayot & Lorient, 1998).

Les caséines α_{s1} , α_{s2} et β forment des liaisons avec les ions Ca^{2+} . En effet, elles possèdent des acides aminés phosphorylés, principalement la sérine, et dans une moindre mesure la thréonine, qui leur permettent d'interagir avec les minéraux. Cela conduit à la formation de nanoclusters de phosphates de calcium et permet la cohésion de la structure interne de la micelle de caséines. La caséine κ est responsable de la stabilité de la micelle, en exerçant une couche de répulsion électrostatique en surface des micelles (Dalgleish, 2011). Ces interactions entre les caséines peuvent être modulées par le pH. Le pH du lait se situe aux alentours de 6,5 – 6,8. L'acidification du lait modifie les propriétés physico-chimiques des micelles de caséines. Vers pH 5,5 – 5, il y a libération des minéraux de la micelle vers la phase aqueuse du lait ce qui entraîne une dissociation des caséines (Cayot & Lorient, 1998).

Les caséines sont stables à température élevée, notamment lorsqu'un chauffage de 140°C pendant 15 à 20 min est appliqué, il n'y a pas de dénaturation des caséines (Fox, 2003).

Les autres protéines représentent 20% des protéines du lait. Elles sont majoritairement composées de β -lactoglobuline, d' α -lactalbumine, d'immunoglobulines et de lactoferrine (Fox, 2003). Ces protéines sont solubles pour toutes valeurs de pH mais sont beaucoup plus sensibles à la chaleur que les caséines. A partir de 60°C, il est possible d'observer la formation d'agrégats (Cayot & Lorient, 1998).

b) Les protéines de lupin

Les protéines de lupin sont de deux types, les globulines, appelées conglutines, qui sont protéines globulaires de réserve de la graine de lupin, et les albumines qui ont un rôle de défense de la plante. Elles forment à elles seules 85 à 86% des protéines de la graine de lupin. Elles sont responsables de la plupart des propriétés des graines et sont retrouvées dans la farine et dans d'autres produits intermédiaires dérivés du lupin. Les conglutines sont séparées en quatre types : conglutines α , β , γ et δ . La conglutine α représente environ 35 à 37% des protéines du lupin, elle appartient à la famille des globulines 11S (Svedberg, unité de mesure du taux de sédimentation). La conglutine β est la plus abondante protéine de la graine de lupin, elle représente environ 44 à 45% des protéines et fait partie des globulines 7S. La conglutine γ est également une globuline 7S, elle est soluble dans l'eau et les solutions salées, elle représente 4 à 5 % des protéines du lupin. La δ -conglutine représente environ 3 à 4% des protéines du lupin et est une albumine 2S. Il s'agit d'un dimère. Les monomères sont reliés entre eux par deux ponts disulfures (Duranti et al., 2008).

Les protéines de lupin ont leur taux de solubilité minimale entre pH 4 et pH 6, à pH acide (en dessous de pH 4) et à pH basique, les protéines sont totalement solubles (Rodríguez-Ambriz et al., 2005).

c) Composition en acides aminés des caséines et des protéines de lupin

Les caséines et les protéines de lupin ont une composition en acides aminés qui sont relativement proche comme le montre la figure 3, exceptée pour les acides aminés proline, valine et lysine dont les teneurs sont plus élevées dans la caséine et pour l'acide aminé arginine en quantité plus élevée dans les protéines de lupin. Il est à noter que les acides aminés soufrés méthionine et cystéine sont très peu présents dans la caséine encore plus faiblement dans les protéines de lupin.

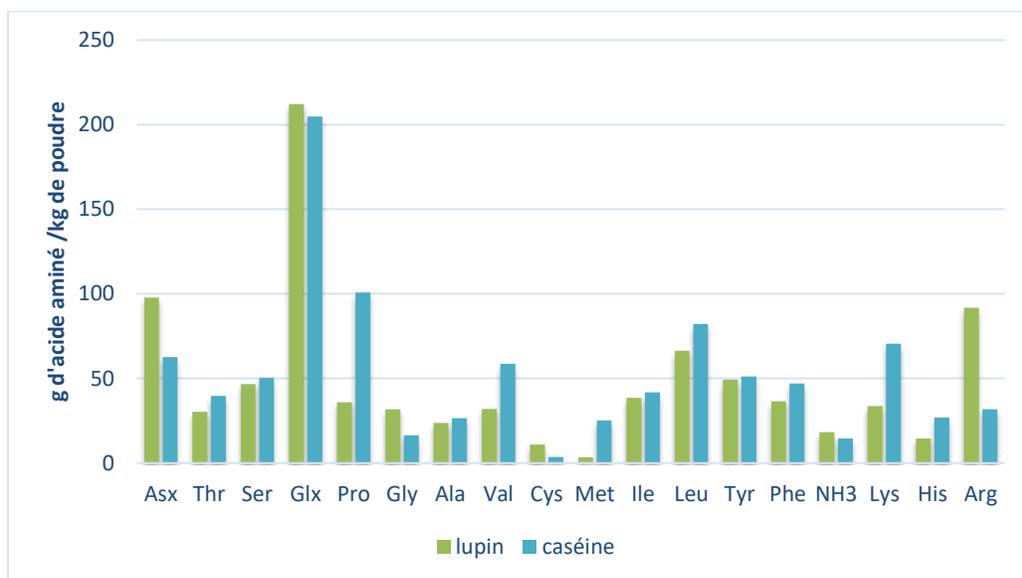


Figure 3 : Composition en acides aminés totaux des caséines et des protéines de lupin en g d'acide aminé par kg de poudre de caséinate pour caséine et d'isolat de lupin pour lupin. Asx = acide aspartique et asparagine Glx = acide glutamique et glutamine.

E. Fermentation d'aliments mixtes composés de lait et de légumineuse

L'intérêt du mélange de protéines d'origine animales tel que le lait et de protéines végétales comme les légumineuses résonne avec l'intérêt grandissant pour les sujets environnementaux et de santé dans un contexte de transition alimentaire. En France, les produits végétaux représentent environ 30% de l'apport protéique : apport déséquilibré, qui devrait tendre vers un équilibre avec un apport protéique animal/végétal de 50/50 environ. Dans cette proportion de 30% d'apport protéique végétal, les légumineuses représentent environ 1% contrairement aux céréales, végétaux les plus consommés dans les pays occidentaux, entre 40 à 70 % (Blind Kempinski, 2020). Le développement de mixtes protéines animales et protéines végétales, c'est-à-dire un mélange où les protéines animales et végétales interagissent pour constituer de nouvelles matrices au moyen de la fermentation, a été proposé comme étant un des moyens pour encourager une transition alimentaire d'animal à végétal (Guyomarc'h et al., 2021a).

Dans de nombreux cas, le mélange de protéines animales et végétales permet d'améliorer la stabilité des protéines végétales notamment du fait du rôle de chaperonne de certaines protéines animales dont les caséines (Guyomarc'h et al., 2021a). Les mixtes de protéines animales et végétales permettent aussi d'améliorer les propriétés texturales des protéines végétales utilisées seules, ce qui font d'eux un levier intéressant pour concevoir des aliments. Le mélange et la co-transformation de protéines animales et végétales conduisent à une diversité de matrices en termes de composition et de texture. La fermentation de ces substrats ajoute une nouvelle dimension à la complexité des aliments, impliquant les activités respectives de chaque souche et leurs interactions possibles. Par exemple, pour la production de yaourt grec, le remplacement d'une partie des protéines de lait de vache par un extrait protéique végétal issu de l'avoine ou du riz a donné des produits avec de bonnes propriétés sensorielles et nutritionnelles (Campos et al., 2018). Par exemple, lorsque l'extrait d'avoine a été utilisé, cela a permis d'améliorer les propriétés

nutritionnelles, c'est-à-dire de réduire le lactose, d'augmenter les teneurs en fibres et en protéines (Campos et al., 2018).

La co-fermentation, c'est-à-dire la fermentation d'aliments mixtes nécessite encore plus d'associer des microorganismes aux propriétés complémentaires, (Guyomarc'h et al., 2021a), capables par exemple d'utiliser le lactose du lait et d'utiliser les GOS des légumineuses.

V. Matériel et Méthodes :

A. Milieux de culture

a) Préparation des milieux chimiquement définis :

La composition des milieux chimiquement définis est présentée dans le tableau 2 et leur préparation dans la figure 4.

Tableau 2 : Composition des milieux chimiquement définis (CDM)

Catégories	Composants	Concentration	
Tampon	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	50 mM/L	
Source de carbone	Lactose	5 g/L	
	Saccharose	5 g/L	
	Raffinose	5 g/L	
Sels minéraux	CaCl ₂	25 mg/L	
	Cl ₂ Co	1 mg/L	
	CuCl ₂ .2H ₂ O	4 mg/L	
	MgCl ₂ .6H ₂ O	25 mg/L	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	1 mg/L	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 mg/L	
	MnSO ₄	100 mg/L	
	FeSO ₄	5 mg/L	
Vitamines	Riboflavine (B2)	3 mg/L	
	Acide nicotinique (B3)	3 mg/L	
	Pantothénate de calcium (B5)	3 mg/L	
	Pyridoxine (B6)	1 mg/L	
	Biotine (B7)	0,5 mg/L	
	Acide Folique (B9)	1 mg/L	
	Cobalamine (B12)	3 mg/L	
	Thiamine HCL	0,5 mg/L	
	Acide para-aminobenzoïque (B10)	1 mg/L	
	Pyridoxal, HCl	1 mg/L	
Bases azotées	Adénosine	10 mg/L	
	Guanine	10 mg/L	
	Uracile	10 mg/L	
	Inosine	10 mg/L	
	Acide orotique	10 mg/L	
	Thymidine	10 mg/L	
Lipides	Tween 80	0,5 g/L	
Sources d'azote	CDM Caséines	Caséinate (1)	5 g/L
	CDM Lupin	Isolat de lupin (2)	5 g/L
	CDM Mix	Caséinate (1)	2,5 g/L
		Isolat de lupin (2)	2,5 g/L

(1) Eurial, Nantes, France, (2) isolat préparé au laboratoire par précipitation isoélectrique pH 4,6 à partir de farine de lupin (Lup'ingrédient, Martigné-Ferchaud, France)

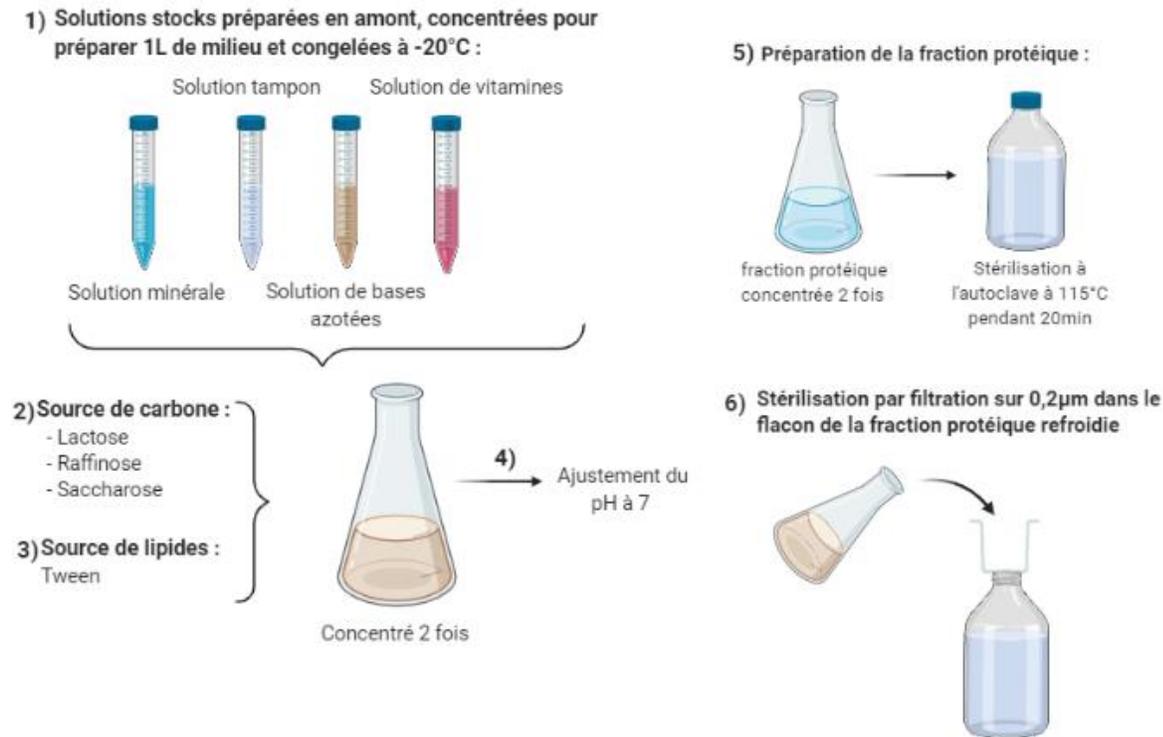


Figure 4 : Schéma présentant les différentes étapes de préparation des milieux chimiquement définis

b) Evaluation du pouvoir tampon des milieux de culture

Afin de déterminer si la nature des protéines modifiait ou non le pouvoir tampon initial de chaque CDM, leur acidification par ajout direct d'acide lactique a été réalisée avec de l'acide lactique 5 M. La diminution du pH par ajout successif d'acide lactique a été suivie à l'aide d'un pH mètre (inolab pH730).

c) Identification des sources de carbone utilisées par les souches en galeries API 50 CHL

Des tests en galeries API 50 CHL ont été réalisés afin d'identifier les sources de carbone utilisées par les souches de bactéries lactiques. Les galeries API 50 CHL ont été réalisées sur les six souches selon les conditions du fournisseur (bioMérieux, Inc., Marcy l'Etoile, France). Un mL de culture a été centrifugé à 8000 g x 10 min à 20°C. Les culots ont été repris dans 10 mL de milieu API 50CHL. Un aliquote de 110 µL de la suspension bactérienne a été déposé dans chaque cupule des galeries, et 200 µL d'huile de paraffine ont été ajoutés afin d'obturer les cupules. Les galeries ont été incubées à 30°C pendant 48 h. Une première lecture a été effectuée après 24 h et une seconde lecture après 48 h. Les résultats ont été analysés sur le site : <https://apiweb.biomerieux.com> .

B. Etude des microorganismes

a) Sélection des souches :

Six souches de bactéries lactiques ont été présélectionnées pour cette étude : deux souches de *Lactiplantibacillus plantarum*, une de *Lactococcus lactis* et une de *Enterococcus faecalis* provenant de la

collection du CIRM-BIA (INRAE Rennes, France) et deux souches de *L. lactis* provenant de la collection NCDO (Berkshire, UK). Les souches ont été sélectionnées selon leur profil protéolytique établi dans le travail de thèse de CIBELL par dosage OPA (cf 3.b) et reporté dans le tableau 3. Le choix des souches receveuses a également été basé sur leur capacité à hydrolyser certains sucres, notamment le raffinose, déterminé d'après des résultats obtenus en utilisant les galeries API 50CHL.

Tableau 3 : Genre et espèce des souches sélectionnées selon leur capacité protéolytique, les sources de carbone utilisées et le milieu de culture utilisé.

Genre	Espèce	Collection et numéro de souche	Origine	Code de la souche	Capacité protéolytique	LAC	SAC	RAF	Milieu de culture
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	NCDO2111	Pois	L_lac_450	NON	-	+	+	M17-glucose
<i>Lactiplantibacillus</i>	<i>plantarum</i>	CIRM-BIA465	ND	L_pla_465	NON	+	+	+	MRS
<i>Lactiplantibacillus</i>	<i>plantarum</i>	CIRM-BIA1524	ND	L_pla_1524	NON	+	+/-	+	MRS
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	CIRM-BIA2412	ND	E_fae_2412	OUI	+	+/-	-	M17-Lactose
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	NCDO2125	Termite	L_lac_2125	OUI	+	-	-	M17-Lactose
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	CIRM-BIA244	ND	L_lac_244	OUI	+	+	-	M17-Lactose

+ correspond à oui et - à non. LAC = lactose, SAC = saccharose, RAF = raffinose, NA= non déterminé, M17 = milieu de culture des lactocoques ayant comme sucre soit le glucose (M17-glucose) = sucre ajouté pour la souche L_lac_450 qui ne sait pas utiliser le lactose et qui est un sucre universellement utilisé par les BL, soit le lactose (M17-lactose) = sucre ajouté pour les souches E_fae_2412, L_lac_2125 et L_lac_244. MRS = milieu de culture des lactobacilles Conditions de conservation et de culture des souches :

Les souches étaient conservées à -20°C dans des cryotubes contenant 50% (m/v) de glycérol et 50% (m/v) de milieu de culture.

Avant d'ensemencer les bactéries dans les différents CDM, chaque souche a été pré-cultivée 3 fois afin d'éliminer l'excédent de glycérol, de standardiser les conditions d'inoculum et d'assurer une croissance optimale des souches dans le CDM. Le premier repiquage a été réalisé à 2% dans du milieu M17 (Terzaghi & Sandine, 1975) avec du lactose ou du glucose à 10% (m/v) ou du milieu MRS pendant 12 h à 30°C, les deux autres repiquages ont été faits à 1% (v/v) dans le CDM Mix pour les souches qui ont une capacité protéolytique ou dans le CDM Mix additionné de tryptone (hydrolysate de caséines commercial) à 0,5 g/L pendant 12 h environ à 30°C.

b) Suivi de croissance bactérienne

Le suivi de la croissance des souches donneuses a été réalisé sur 24 h, en 2 parties décalées de 10 h. Les souches ont été inoculées à 10⁷ unités formant colonies (UFC)/mL dans les trois CDM. Les milieux inoculés ont été répartis dans des tubes Eppendorf pour chaque temps. L'ensemble a été placé à l'étuve à 30°C.

Dénombrements :

La micro-méthode développée par Baron et al.(2006) été utilisée pour dénombrer les bactéries cultivées dans les trois CDM. Les dilutions des cultures aux différents temps ont été réalisées avec de l'eau stérile contenant 1 g/L tryptone + 8,5 g/L NaCl d'un facteur 10 à 10⁶ dans des plaques 96 puits, et les dénombrements ont été réalisés dans des plaques 12 puits. Chaque dénombrement a été réalisé en double dans la masse avec du M17-lactose du M17-glucose ou du MRS selon les souches (tableau 3). Les

plaques ont été incubées à 30°C entre 24 h et 48 h en aérobie ou en anaérobie pour les lactobacilles avec un générateur de CO₂ (BD Biosciences, San Jose, Etats-Unis).

Suivi des cinétiques d'acidification :

Le pH des cultures a été mesuré toutes les 2 h avec un pHmètre (Inolab pH730).

Préparation du milieu de culture sélectif utilisé pour dénombrer la souche L_lac_450

Pour dénombrer la souche *L. lactis* L_lac_450 en co-culture avec d'autres souches de lactocoques qui ont une activité protéolytique, un milieu de culture sélectif a été mis au point pour distinguer chacune des souches en se basant sur leur capacité à utiliser la source de carbone (raffinose ou lactose selon les souches, tableau 3).

Tableau 4 : Composition du milieu sélectif pour isoler la souche L_lac_450, qui est inspiré du milieu M17 traditionnel

Ingrédients	Quantité g/L
Agar	12 g
Acide ascorbique	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g
β-glycérophosphate	19 g
Extrait de levure	1 g

Le pH a été ajusté à 6,9-7 avec du NaOH 5 M. Le milieu a ensuite été autoclavé à 120°C pendant 15 min.

Co-culture:

Les souches donneuses et les souches receveuses ont été inoculées en co-culture dans les CDM caséines et mix pour les souches donneuses L_lac_2125 et L_lac_244 et dans les CDM caséines, mix et lupin pour la souche donneuse E_fae_2412.

Après 0, 6, 14 et 24 h d'incubation à 30°C, le pH a été mesuré et les bactéries ont été dénombrées en utilisant la micro-méthode. Les dénombrements ont été réalisés dans la masse dans des plaques 6 puits et non plus 12 puits avec le milieu de culture adéquat (tableau 3) pour mieux visualiser les souches donneuses et les souches receveuses. Les plaques ont été placées à l'étuve pendant 24 à 48 h à 30°C en anaérobie en utilisant un générateur de CO₂ (BD Biosciences, San Jose, Etats-Unis).

c) Identification d'un/des acides aminés limitant du CDM Lupin

Le CDM Lupin a été supplémenté avec soit une solution de tryptone (10%, m/v) ou une solution de méthionine, de cystéine ou de ces deux acides aminés à 7 g/L, une solution d'hydrolysate de lupin à 24 mg/L ou rien de plus (témoin). Les souches donneuses ont étéensemencées à 10⁷ UFC/mL dans ces différents milieux selon le schéma décrit en figure 5.

L'hydrolysate de lupin a été réalisé à partir d'une suspension de lupin à 10% (m/v) solubilisée à température ambiante et ajustée à pH 7,5 avec NaOH (0,5 M). Une solution de trypsine (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Etats-Unis) possédant une activité de 750 BAEE/mg, a été ajoutée à raison de 1 mg de trypsine pour 1 g de protéine de lupin. Le suivi de l'hydrolyse s'est fait par ajout de soude pour maintenir le pH à 7,5.

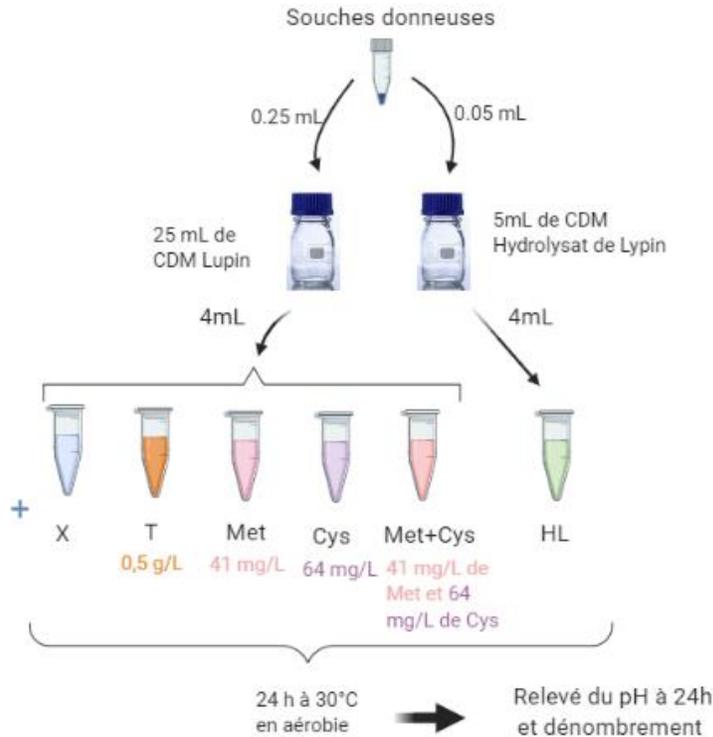


Figure 5 : Schéma expérimental d'identification des acides aminés limitant la croissance des souches donneuses (*E_fae_2412*, *L_lac_2125* et *L_lac_244*) dans le CDM Lupin X = CDM Lupin non supplémenté. Met = méthionine, Cys = cystéine, T= tryptone, HL = hydrolysate de lupin. Les concentrations en Met et Cys sont les concentrations minimales dont les bactéries lactiques ont besoin pour leur croissance. Elles sont issues de la composition d'un milieu chimiquement pour *L. lactis* IL1403 (Aller et al., 2014).

C. Analyses biochimiques des échantillons issus des cultures :

a) SDS-PAGE

L'hydrolyse des caséines et des protéines de lupin par les souches de bactéries dans les trois CDM a été analysée par électrophorèse sur gel contenant 12% d'acrylamide, en présence de SDS selon la méthode décrite par Laemmli (1970).

Les échantillons (conservés à -20°C) des cinétiques réalisées ont été analysés aux temps 6, 14 (milieu de phase exponentielle) et 24, comparés aux 3 CDM non ensemencés.

Les échantillons ont été dilués au demi dans un tampon de dénaturation des protéines contenant notamment du dodécylsulfate de sodium (SDS en anglais, 4% p/m), du glycérol (20% p/v), du bleu de bromophénol (0,2% p/v) et du dithiothréitol (DTT, 0.6% p/v). Ils ont ensuite été chauffés à 100°C pendant 5 min pour permettre l'action du SDS et entraîner le dépliement des protéines et la réduction des ponts disulfures inter et intra moléculaires avec le DTT pour obtenir les protéines sous leur forme monomoléculaire. 10 µL de chaque échantillon ont été ensuite déposés dans les puits du gel, soit l'équivalent de 25µg de protéines, ainsi que 10 µL de marqueur de masse moléculaire (Precision Plus unstained ladder, Bio-Rad, France). La migration des protéines s'est ensuite faite à un voltage constant de 150V jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel, puis après démoulage, les protéines ont été fixées dans le gel par une solution de fixation (40% éthanol, 10% acide acétique), puis colorées au bleu de Coomassie

(Biosafe Coomassie Brilliant Blue G250, Bio-Rad). Les gels ont été numérisés avec le scanner Image III, via le logiciel LabScan (GE Healthcare, France).

b) Dosage OPA

La quantité de composés azotés, c'est-à-dire de peptides ou d'acides aminés libérés présents dans les trois CDM à 6, 14 et 24 h d'incubation a été mesurée en triplicat en utilisant la méthode o-phthalaldéhyde (OPA) de Church et al. (1983) dans des plaques 96 puits. La méthode de dosage consiste à faire réagir l'OPA et le β -mercaptoéthanol sur les amines primaires présentes dans les échantillons en présence de SDS. Le produit obtenu est un composé détectable à 340 nm par spectrophotométrie. Le réactif OPA, préparé extemporanément, contient pour 100 mL de réactif 2,5 mL de SDS à 20% (m/v), 50 μ L de β -mercaptoéthanol, 2,5 mL de solution OPA à 10 g/L. Le volume est ajusté à 100 mL avec une solution de tétraborate de sodium à 0,1 mol/L. Pour déterminer la concentration de groupements amines, une gamme étalon a été faite à partir d'une solution de L-méthionine à 2 mM. Les protéines ont été précipitées avec une concentration finale d'acide trichloroacétique de 2 % (m/m). Les plaques 96 puits ont été centrifugées à 2250 g pendant 10 min à 20°C (centrifugeuse Eppendorf 5810R, Montesson, France). Le dosage des groupements amines dans les échantillons a été réalisé en ajoutant 100 μ L de réactif OPA à 50 μ L d'échantillon par puits. Les plaques ont ensuite été lues en spectrophotométrie à 340 nm après 10 min d'incubation à 20°C. Les résultats ont été obtenus en mg d'équivalent de Met / mL exprimés en mg de NH_2 libre / mL en multipliant par 16 les résultats.

D. Analyses statistiques

Des analyses de variance (ANOVA) à deux facteurs ont été réalisées en utilisant le package « car » de R, version 4.0.3 sur Rstudio (R.C.Team, R. A Language and Environment for Statistical Computing, R foundation for Statistical Computing, 2005, <https://rstudio.com/>). Le niveau de significativité du test a été fixé à $p < 0.05$. Les facteurs étaient : la souche (E_fae_2412, L_lac_2125 et L_lac_244) et le milieu (CDM Caséines, Lupin, Mix). L'ANOVA avait pour objectif de déterminer si les variables étaient affectées selon les facteurs souches et milieux (CDM Caséines, Lupin et Mix). Lorsqu'un résultat significatif a été observé ($p < 0,05$), les moyennes ont été calculées à l'aide d'un test post hoc Tukey du package R « car » qui estime la différence entre les moyennes issues des facteurs souches ou des facteurs milieux.

L'analyse en composante principale (ACP) est une analyse multivariée qui vise à synthétiser l'information apportée par un grand nombre de variables quantitatives. La représentation graphique de l'ACP se fait avec des composantes orthogonales, appelées « composantes principales » (PC), qui sont des combinaisons linéaires des variables initiales. Ces PC sont non corrélées et sont calculées de telle sorte que la variance des individus statistiques projetée sur chaque PC soit la plus haute possible. L'ACP a été effectuée en utilisant le package FactoMineR du logiciel R. Les sept variables utilisées étaient : la valeur absolue de la vitesse d'acidification ($|\text{dpH}|$), la vitesse de croissance bactérienne (μ), le pH minimum en fin de croissance (pHmin), le logarithme de la population maximale atteinte à 24 h, les indices de protéolyse à 6, 14 et 24 h de culture (OPAT6, OPAT14 et OPAT24). Cette analyse a été réalisée sur les 3 réplicas des monocultures des souches E_fae_2412, L_lac_2125 et L_lac_244 dans les 3 CDM.

Les graphiques des croissances bactériennes et de l'acidification des milieux en monoculture ont également été réalisés sur le logiciel R avec le package ggplot2.

VI. Résultats

A. Cinétique de croissance et d'acidification des souches donneuses dans les milieux chimiquement définis.

Le comportement des souches donneuses (E_fae_2412, L_lac_2125 et L_lac_244) en monoculture a été analysé en fonction des milieux de culture (CDM Caséines, Lupin, Mix) selon la vitesse maximum d'acidification, le pH minimum atteint après 24 h de culture, la vitesse de croissance des souches et le logarithme de la population finale. Cette expérience a été réalisée trois fois pour chaque souche dans les trois milieux.

a) Croissance bactérienne des 3 souches donneuses dans les 3 CDM

Les trois souches ont poussé dans les CDM Caséines et Mix, entre $\sim 10^7$ UFC/mL et $\sim 10^9$ UFC/mL en 24h (figure 6). Dans le CDM Lupin, il n'y a pas eu de croissance des souches L_lac_2125 et L_lac_244, qui sont restées à leur niveau d'ensemencement de 10^7 UFC/mL après 24 h de culture (figure 6), tandis que E_fae_2412 a atteint $1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL (figure 6). Dans les CDM Caséines et Mix, la vitesse de croissance des trois souches donneuses était similaire (tableau 5) de même que la population finale atteinte (tableau 5).

b) Acidification du milieu par les trois souches donneuses selon le type/la source de protéines

Le CDM Lupin n'était pas acidifié ou peu par les trois souches donneuses alors qu'il l'était pour les CDM Caséines et Mix (figure 6). La vitesse maximale d'acidification était significativement plus élevée dans le CDM Mix que dans le CDM Caséines. Le pH minimum atteint après 24 h de culture était d'environ 4,20 pour les CDM Caséines et Mix pour les trois souches donneuses, très significativement inférieur à celui du CDM Lupin, égal à ~ 7 pour les deux *L.lactis* et à 6,65 pour E_fae_2412 (tableau 5).

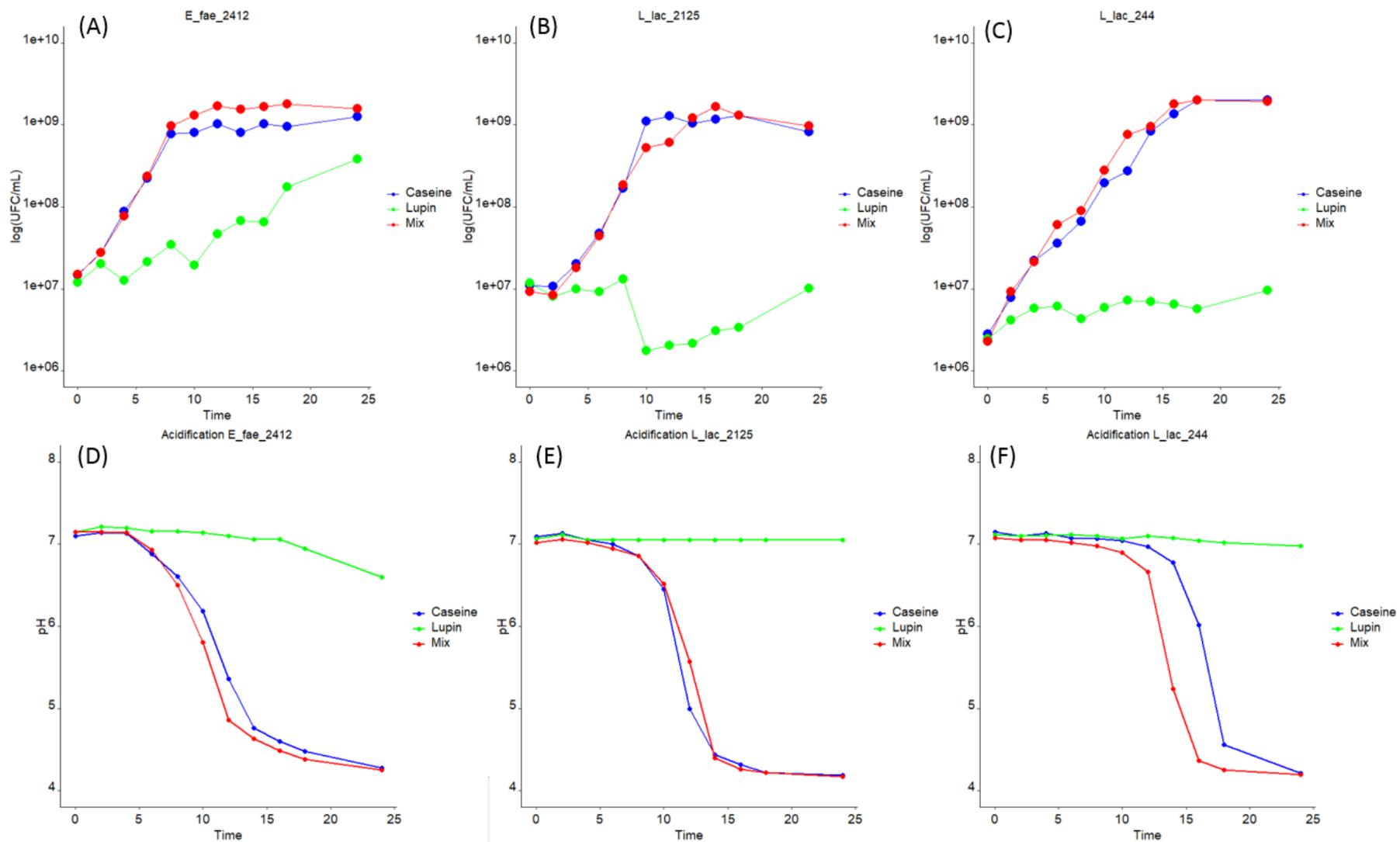


Figure 6 : Croissance des souches donneuses dans les CDM Caséines, Lupin et Mix (A, B, C). Acidification des CDM Caséines, Lupin et Mix par les souches donneuses E_fae_2412, L_lac_2125 et L_lac_244 (D, E, F). Pour améliorer la visibilité, les graphiques correspondent à une un seul réplicat, dont les résultats sont représentatifs.

Tableau 5 : Paramètres moyens des cinétiques d'acidification et de croissance en monoculture des souches donneuses en fonction des trois milieux chimiquement définis. Les valeurs sont les moyennes et écart-types de trois réplicas biologiques des trois souches donneuses. a, b, c, d et e : les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement ($p < 0.05$) pHmin = pH minimum atteint après 24 h de culture, $|dpH|$ = valeur absolue de la vitesse maximum d'acidification, μ = vitesse de croissance bactérienne, ND = non déterminé

Souches donneuses		CDM Caséines	CDM Lupin	CDM Mix
<i>E_fae_2412</i>	μ (h^{-1})	0,42 \pm 0,04 ^a	ND	0,45 \pm 0,04 ^a
	$ dpH $	0,28 \pm 0,01 ^c	ND	0,35 \pm 0,01 ^b
	pHmin	4,28 \pm 0,06 ^c	6,65 \pm 0,06 ^b	4,27 \pm 0,06 ^c
	Log(UFC/ml)	9,24 \pm 0,06 ^a	8,73 \pm 0,06 ^b	9,27 \pm 0,06 ^a
	Population finale	1,80.10 ⁹ \pm 1,37.10 ⁸ ^{ab}	5,53.10 ⁸ \pm 1,37.10 ⁸ ^{de}	1,90.10 ⁹ \pm 1,37.10 ⁸ ^a
<i>L_lac_2125</i>	μ (h^{-1})	0,61 \pm 0,06 ^a	ND	0,51 \pm 0,04 ^a
	$ dpH $	0,5 \pm 0,01 ^a	ND	0,53 \pm 0,01 ^a
	pHmin	4,19 \pm 0,08 ^c	7,01 \pm 0,06 ^a	4,16 \pm 0,08 ^c
	Log(UFC/ml)	8,91 \pm 0,11 ^{ab}	6,86 \pm 0,06 ^c	8,98 \pm 0,06 ^{ab}
	Population finale	8,20.10 ⁸ \pm 2,38.10 ⁸ ^{bcde}	7,70.10 ⁷ \pm 1,37.10 ⁷ ^e	9,60.10 ⁸ \pm 1,68.10 ⁸ ^{cd}
<i>L_lac_244</i>	μ (h^{-1})	0,39 \pm 0,05 ^a	ND	0,48 \pm 0,04 ^a
	$ dpH $	0,55 \pm 0,01 ^a	ND	0,56 \pm 0,01 ^a
	pHmin	4,16 \pm 0,06 ^c	6,97 \pm 0,06 ^{ab}	4,11 \pm 0,06 ^c
	Log(UFC/ml)	9,25 \pm 0,08 ^a	6,885 \pm 0,08 ^c	9,26 \pm 0,08 ^a
	Population finale	1,80.10 ⁹ \pm 1,68.10 ⁸ ^{abc}	7,85.10 ⁷ \pm 1,68.10 ⁷ ^e	1,80.10 ⁹ \pm 1,68.10 ⁸ ^{abc}

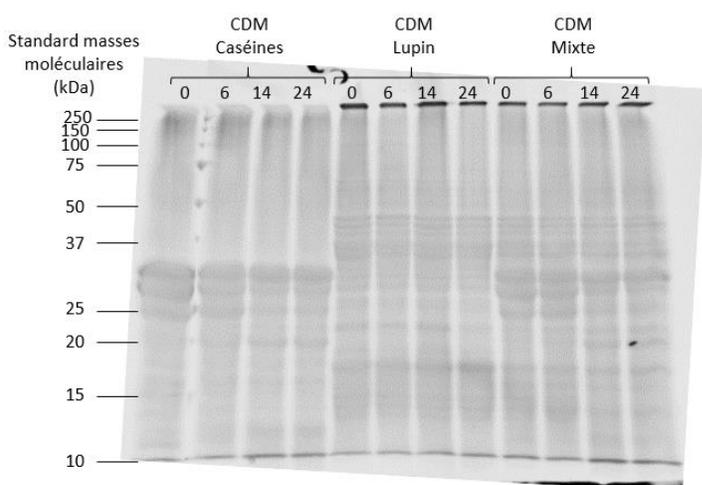
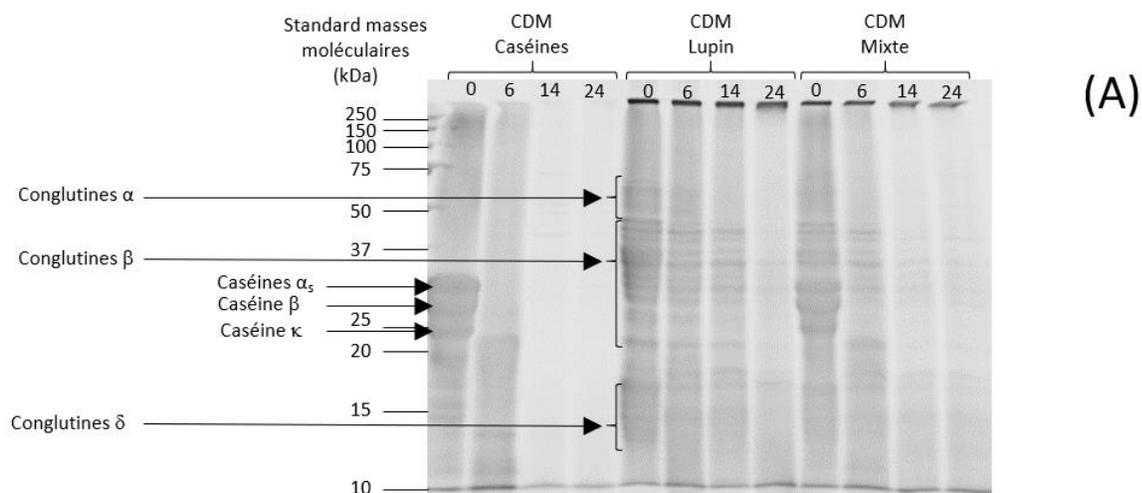
B. Hydrolyse des protéines du milieu pendant la croissance des souches donneuses

L'hydrolyse des protéines au cours de la culture des souches donneuses a été évaluée par deux approches : par électrophorèse, qui donne des informations sur la nature de la protéine et son hydrolyse par les enzymes protéolytiques, mais reste semi-quantitative, et par quantification des groupements aminés libres dosant la libération de peptides et d'acides aminés de la protéine suite à l'hydrolyse de la protéine.

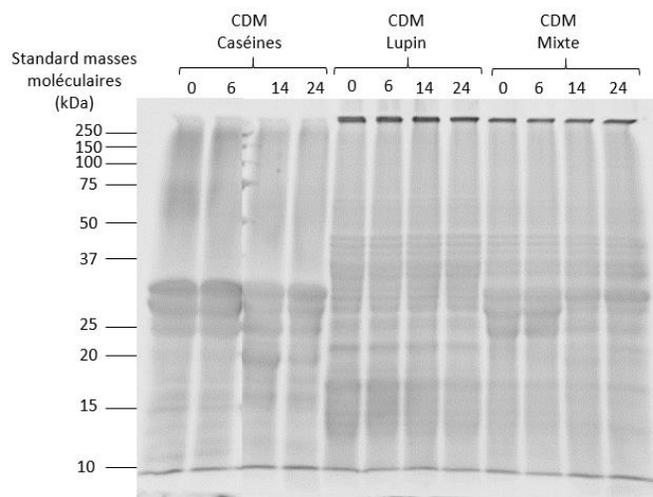
a) Nature des protéines hydrolysées

Les résultats des gels d'électrophorèse témoignent de l'hydrolyse de l'ensemble des protéines de lupin et/ou des caséines par la souche E_fae_2412 pour les CDM Caséines, Lupin et Mix après 24 h. Il apparaît même que les protéines de lupin étaient plus dégradées dans le CDM Mix que dans le CDM Lupin. Pour les souches L_lac_2125 et L_lac_244, il était observé une dégradation des caséines à partir de 14 h dans les CDM Caséines et Mix, mais pas de dégradation des protéines de lupin, ni dans le CDM Lupin ni dans le Mix (figure 7).

La souche E_fae_2412 présentait aussi une activité protéolytique plus élevée que les deux autres souches. Après 14 h, dans les CDM Caséines et Mix, les caséines étaient entièrement hydrolysées et les protéines de lupin dans le CDM Mix étaient en partie hydrolysées. Alors que pour les 2 autres souches, l'hydrolyse des caséines n'était observable qu'à partir de 24 h. (figure 7).



(B)



(C)

Figure 7 : Hydrolyses des caséines, des protéines de lupin et des mixtes caséines-protéines de lupin visualisées sur gels d'électrophorèse SDS PAGE 12 % lors de la croissance de trois souches protéolytiques : (A) *E_fae_2412*, (B) *L_lac_2125* et (C) *L_lac_244*. Les temps d'hydrolyse sont 0 pour le témoin non inoculé incubé dans les mêmes conditions que les cultures et 6, 14 et 24 h pour les cultures. Les principales protéines présentes dans les CDM caséines et CDM lupin sont présentées en partie A de la figure. Le standard de masse moléculaire est le Precision Plus (Bio-Rad).

b) Activité protéolytique des souches donneuses estimée par analyse des groupements aminés libres

L'activité protéolytique des souches donneuses *E_fae_2412*, *L_lac_2125* et *L_lac_244* a été mesurée par le dosage des groupements aminés dans les CDM Caséines, Lupin et Mix après 6, 14 et 24 h d'incubation. L'expérience a été réalisée en triplicat.

Après 24 h d'incubation, la souche *E_fae_2412* a produit presque 4 fois plus de peptides et d'acides aminés libres exprimés en groupements NH₂ que les souches *L_lac_2125* et *L_lac_244* dans les trois CDM, soit 68 mg/L dans le CDM Caséines, 50 mg/L dans le CDM Lupin et 60 mg/L dans le CDM Mix. Les souches

L_lac_2125 et L_lac_244 n'ont produit qu'environ 20 mg/L de groupements NH₂ dans les CDM Caséines et Mix. Comme attendu, dans le CDM Lupin, ces deux souches n'avaient presque aucune activité protéolytique, puisque seulement 0 à 5 mg/L de groupements NH₂ ont été libérés (figure 8).

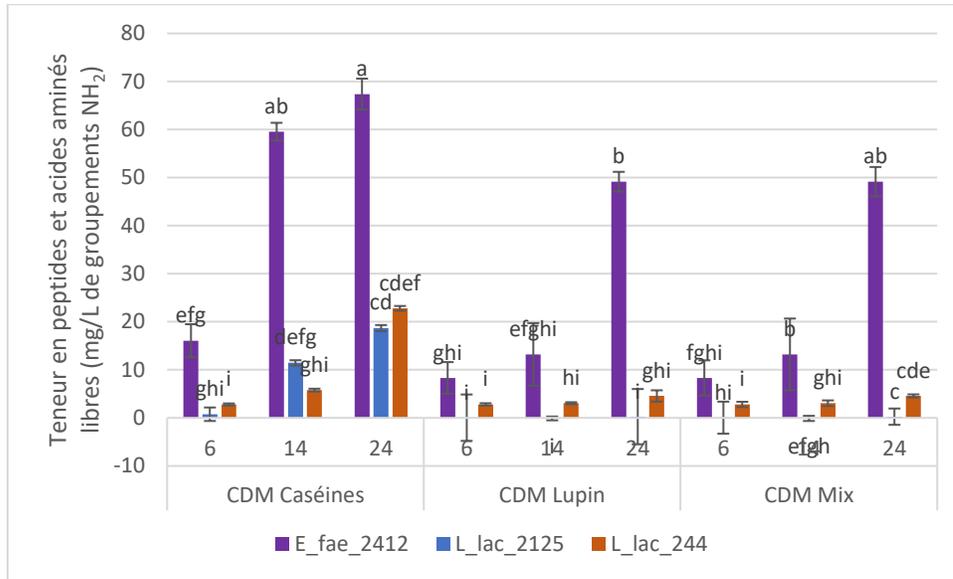


Figure 8 : Teneur en peptides et acides aminés libres en mg/L de groupements de NH₂ produit par les souches donneuses E_fae_2412, L_lac_2125 et L_lac_244 dans les milieux chimiquement définis avec caséines (CDM Caséines), protéines de lupin (CDM lupin) ou mélange des deux (CDM Mix) après 6, 14 et 24 h d'incubation. a, b et c : les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement ($p < 0.05$). L'acide aminé méthionine est utilisé comme standard. L'expérience a été réalisée trois fois.

C. Analyse en composantes principales

Les données des cinétiques et des dosages OPA réalisés sur les CDM Caséines, Lupin et Mix avec les souches donneuses E_fae_2412, L_lac_2125 et L_lac_244 ont été analysées via une analyse en composantes principales (ACP).

Plus de 92% de la variabilité globale est représentée sur les deux premiers axes. L'axe 1 est corrélé positivement à la population finale et négativement au pH atteint après 24 h de culture. La vitesse maximale d'acidification (dpH) et le pH atteint après 24 h sont corrélés. En d'autres termes, plus la vitesse d'acidification par la souche est élevée, plus le pH atteint à 24 h est bas. L'axe 2 est un positivement corrélé aux résultats de dosage OPA (figure 9).

Le graphique des individus témoigne de la répétabilité des expériences réalisées, à travers le positionnement des trois répliques qui sont regroupés (R1, R2 et R3 pour les trois souches donneuses dans les trois CDM).

Le plan factoriel montre que les souches et les milieux sont répartis selon 4 clusters :

- En noir un cluster avec les souches L_lac_2125 et L_lac_244 dans le CDM Lupin
- En rouge, la souche E_fae_2412 dans le CDM Lupin
- En bleu, la souche E_fae_2412 dans les CDM Caséines et Mix

- En vert, les souches 2125 et 244 dans les CDM Caséines et Mix.

L'axe 1 sépare les cultures des clusters bleu et vert du noir selon leur capacité à pousser respectivement dans les CDM Mix et Caséines et pas dans le CDM lupin, avec rouge intermédiaire selon la rapidité et l'intensité de la fermentation dans le CDM lupin (figure 10). Le cluster bleu, situé dans le quadrant supérieur droit, est celui pour lequel la protéolyse est la plus élevée pour E_fae_2412 dans les CDM Mix et caséines, suivi par cette même souche dans le CDM lupin (cluster rouge) et des deux autres souches moins protéolytiques L_lac_2125 et L_lac_244 (cluster vert), voire non protéolytiques dans le CDM lupin (cluster noir).

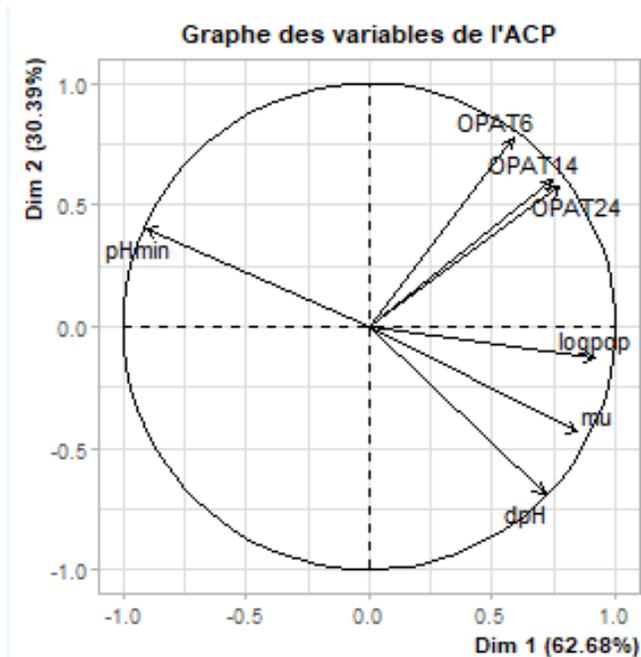


Figure 9 : Carte vectorielle de l'ACP. Sont représentées les variables suivantes : le pH atteint après 24 h de culture (pHmin), la valeur absolue de la vitesse maximum d'acidification des CDM (dpH), la vitesse de croissance bactérienne (μ), le logarithme de la population à 24 h d'incubation (logpop) et les résultats des dosages OPA après 6 h de culture (OPAT6), 14 h (OPAT14) et 24 h (OPAT24)

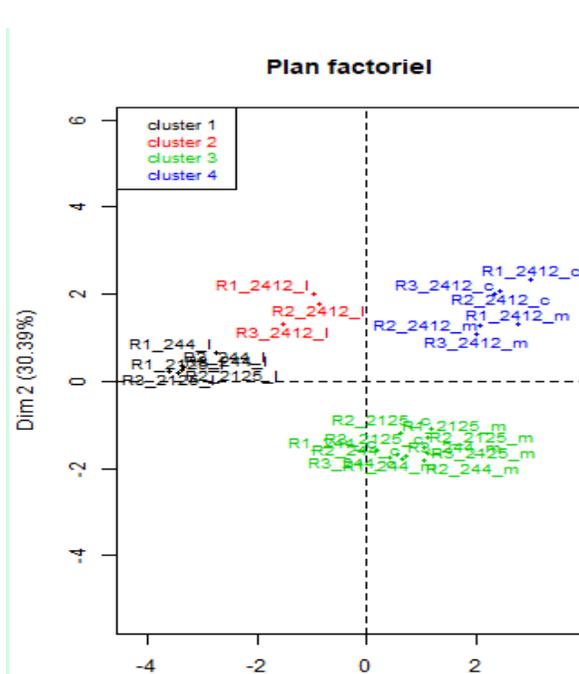


Figure 10 : Plan factoriel. Le cluster rouge correspond à la souche E_fae_1412 dans le CDM Lupin, le cluster bleu correspond à la souche E_fae_2412 dans les CDM Caséines et Mix, le cluster vert correspond aux souches L_lac_2125 et L_lac_244 dans les CDM Caséines et Mix et le cluster noir correspond aux souches L_lac_2125 et L_lac_244 dans le CDM Lupin. R = réplica, c = CDM Caséines, l = CDM Lupin, m = CDM Mix.

D. Etude de l'impact de la méthionine, acide aminé limitant du lupin, sur la croissance des souches donneuses

Les résultats précédents ont montré une absence de croissance et d'activité protéolytique des souches L_lac_2125 et L_lac_244 dans le CDM Lupin. Une hypothèse a été faite selon laquelle la concentration d'un ou plusieurs acides aminés essentiels dans les protéines de lupin serait inférieure aux besoins de ces souches pour leur croissance dans le CDM Lupin. Pour évaluer cette hypothèse, le CDM Lupin a été supplémenté en méthionine (Met), en cystéine (Cys), en un mélange des deux, ou par un hydrolysate trypsique d'isolat de lupin, et tryptone. Le pH et la population finale ont été mesurés dans ces milieux, après 24 h de culture des souches donneuses. Les concentrations de Met et Cys étaient respectivement de 41 mg/L et de 64 mg/L. Ces concentrations ont été choisies selon Aller et al. (2014). Le CDM Lupin supplémenté avec de la tryptone a été choisi comme témoin positif.

La figure 11 montre que dans le CDM Lupin supplémenté en Met, Met+Cys, tryptone, et Cys, uniquement pour la souche L_lac_244, le pH était 1,5 fois plus bas que dans le CDM Lupin seul dont le pH restait stable à environ pH 6,4 pour les trois souches. De même, dans le CDM Lupin supplémenté en Cys, le pH diminuait moins pour les souches E_fae_2412 et L_lac_2125, comparé au pH avec la souche L_lac_244. Avec l'hydrolysate de lupin, le pH diminuait moins qu'avec la supplémentation en Met, Met+Cys et T pour les trois souches, il a atteint pH 6 pour E_fae_2412, pH 5,5 pour L_lac_2125 et pH5,3 pour L_lac_244.

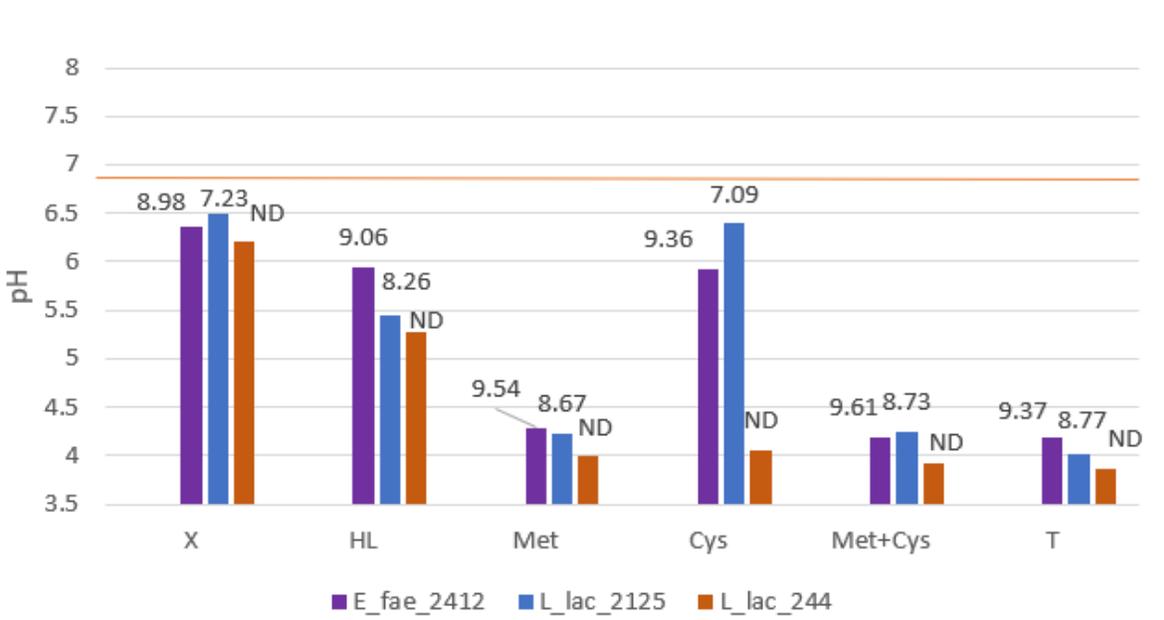


Figure 11 : Acidification et croissance des trois souches donneuses E_fae_2412, L_lac_2125 et L_lac_244, dans le CDM Lupin seul (X) ou supplémenté en méthionine (Met, 41 mg/L), cystéine (Cys, 64 mg/L), méthionine plus cystéine (Met+Cys, 41 mg/L + 64 mg/L), tryptone (T, 0,5 g/L) ou d'un hydrolysate trypsique de d'isolat lupin (HL, 0,5 g/L) après 24 h d'incubation. Les chiffres au-dessus des barres correspondent à la population bactérienne (logUFC/ml) après 24 h d'incubation. ND correspond à non déterminé. La barre orange définit le pH du CDM Lupin et de l'hydrolysate de lupin non inoculé qui est à pH 6,8. L'expérience n'a été répétée qu'une seule fois.

E. Croissance des souches donneuses et receveuses en co-culture dans les CDM caséines, lupin et mix

Les trois souches donneuses (E_fae_2412, L_lac_2125 et L_lac_244) ont été co-cultivées dans les CDM Caséines, Mix, ainsi que Lupin pour la souche donneuse E_fae_2412, seule à pousser dans ce milieu, avec chacune des souches receveuses (L_lac_450, L_pla_465 et L_pla_1524). Le pH et la population ont été mesurés après 0, 6, 14 et 24 h d'incubation. Les résultats aux temps 0 et 6 h n'apparaissent pas car ils sont identiques. Le pH est à environ 7 pour l'ensemble des co-cultures à 0 et 6 h. La croissance des souches est observable à 14 h, à 0 et 6 h les souches receveuses sont à environ 10^6 UFC/mL.

a) Niveau de population des souches receveuses en co-culture

Le niveau de population de chacune des souches donneuses en co-culture avec les souches receveuses était identique à celui obtenu en monoculture (figure 8), il n'apparaît donc pas sur les figures suivantes.

Les trois souches receveuses présentaient une croissance similaire en fonction des souches donneuses dans les CDM Caséines, Lupin (pour E_fae_2412) et Mix. Les trois souches receveuses poussaient de manière similaire dans les CDM Caséines, Lupin et Mix en co-culture en association avec la souche donneuse E_fae_2412, avec une augmentation d'environ 1 log après 14 h de culture (figure 12 D). Les souches receveuses *L. plantarum* en co-culture dans les CDM Caséines et Mix avec la souche L_lac_2125 poussaient moins qu'avec la souche E_fae_2412, il y a toujours environ 1 log d'écart.

En revanche, en association avec la souche donneuse L_lac_244, il n'y avait pas ou peu de croissance des trois souches receveuses dans les CDM Caséines et Mix (figure 12).

b) Acidification des trois CDM avec les souches donneuses et receveuses en co-culture

Les souches receveuses en co-culture avec les trois souches donneuses montraient le même profil d'acidification. Le pH du CDM Lupin avec la souche donneuse E_fae_2412 baissait moins pour les trois souches receveuses que dans les CDM Caséines et Mix : diminution de pH 7 à pH 6 en 24 h dans le CDM Lupin, contre pH 4,5 dans les CDM Caséines et Mix (Figure 12 A). L'acidification était similaire dans les CDM Caséines et Mix pour les trois souches receveuses en co-culture avec les souches donneuses L_lac_2125 et L_lac_244. Le pH diminuait de pH7 à environ pH4,5 en 24 h (figure 12 B et C).

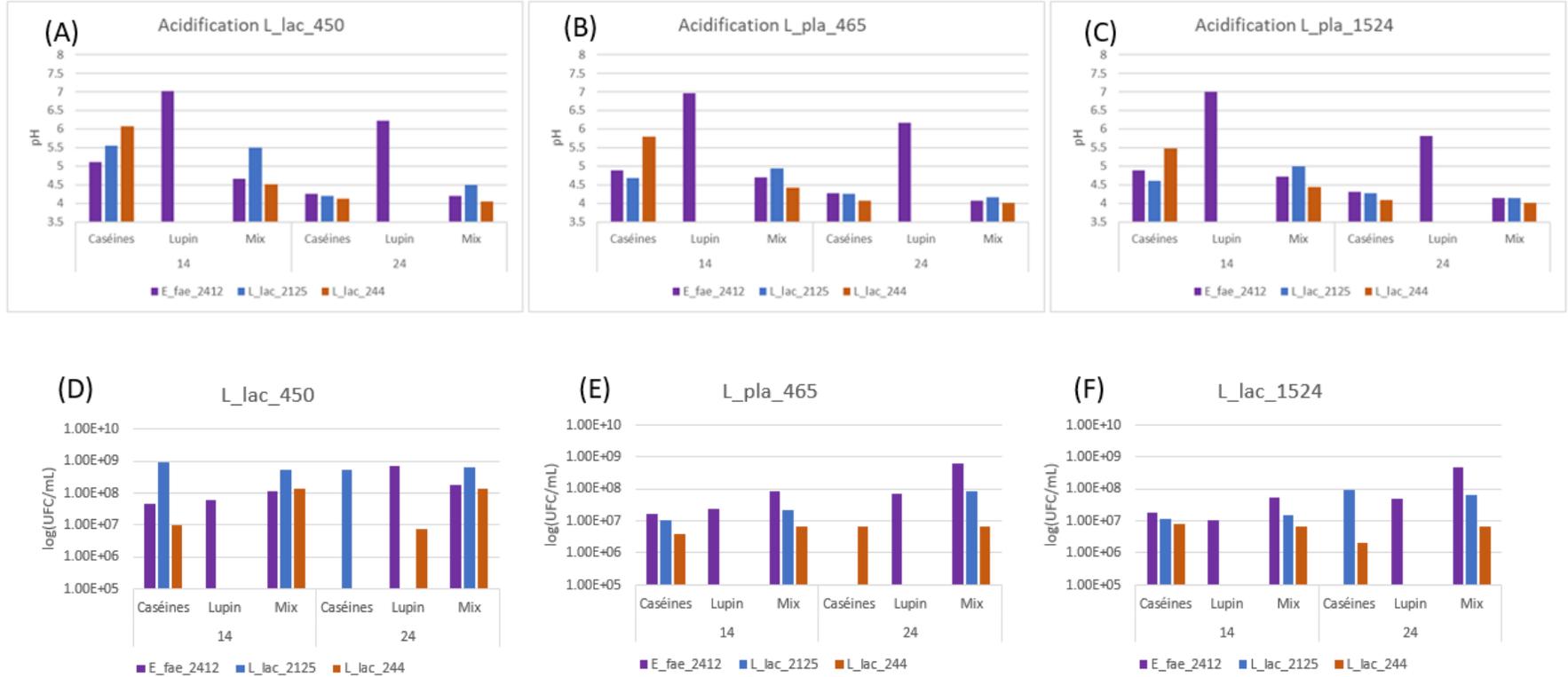


Figure 12 : Acidification des CDM Caséines, Lupin (que pour E_fae_2412) et Mix par les souches donneuses E_fae_2412, L_lac_2125 et L_lac_244 en co-culture avec les souches receveuses L_lac_450, L_pla_465 et L_pla-1524 (A, B, C). (D, E, F) Niveau de population des souches donneuses avec les souches receveuses L_lac_450, L_pla_465 et L_pla_1524 dans les CDM Caséines, Lupin (que pour E_fae_2412) et Mix à 14 et 24 h d'incubation. La souche E_fae_2412 atteignait une population d'environ $4,5 \cdot 10^9$ UFC/mL dans les CDM Caséines et Mix et de $1,5 \cdot 10^9$ UFC/mL dans le CDM Lupin après 24h d'incubation. La souche L_lac_2125 atteignait $1,5 \cdot 10^9$ UFC/mL et la souche L_lac_244 environ $3 \cdot 10^9$ UFC/mL dans les CDM Caséines et Mix après 24 h d'incubation. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus en monoculture. L'expérience n'a été répétée qu'une seule fois. A 0 et 6 h les pH des 3 CDM avec les trois souches donneuses est de 7.

F. Mesure de l'activité protéolytique en co-culture des souches donneuses avec les souches receveuses

La production et la consommation des groupements aminés issues de l'activité protéolytique des souches donneuses ont été calculées dans les milieux de cultures avec les souches donneuses en co-culture avec les souches receveuses dans les CDM Caséines, Lupin (que pour E_fae_2412) et Mix après 6, 14 et 24 h d'incubation.

La souche donneuse E_fae_2412 est celle qui a atteint la production de groupements aminés la plus élevée dans les trois CDM. Elle produisait entre 80 et 120 mg/L de groupements NH_2 en 24 h dans les CDM Caséines et Mix et entre 60 et 80 mg/L de groupements NH_2 dans le CDM Lupin avec les trois souches receveuses. Dans le CDM Lupin, la production de groupements NH_2 démarrait plus tardivement comparée à celle dans les CDM Caséines et Mix.

Avec les souches donneuses L_lac_2125 et L_lac_244, il y avait consommation par les souches receveuses de groupements aminés après 6 h et 14 h d'incubation qui était d'environ -5 mg/L de groupements NH_2 à 6 h et d'environ 0 mg/L après 14 h d'incubation dans les CDM Caséines et Mix. Après 24 h d'incubation, dans les CDM Caséines et Mix, il y avait une production d'environ 5 mg/L d'équivalent de NH_2 par les souches donneuses.

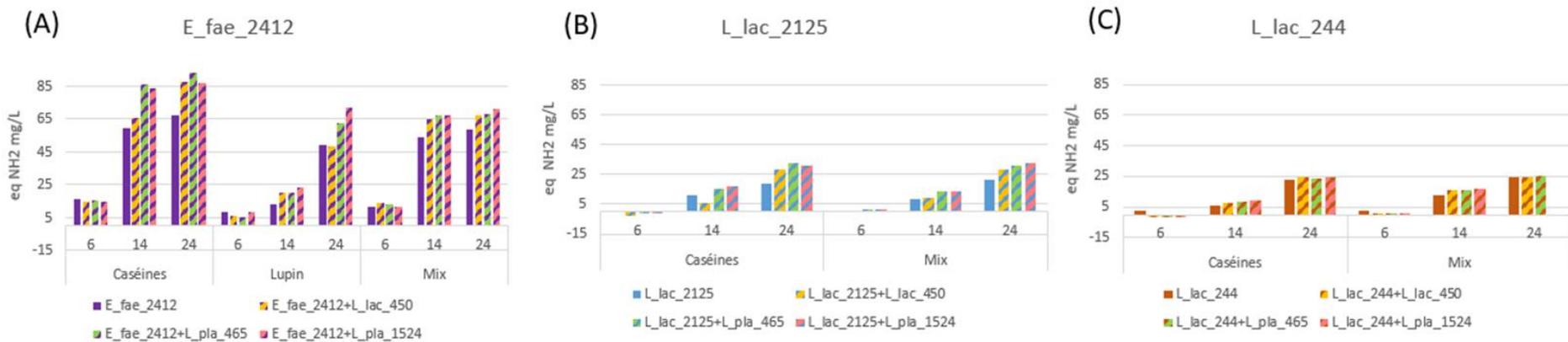


Figure 11: Indices de protéolyse montrant la production et la consommation de groupements NH_2 en mg/L par les souches donneuses *E_fae_2412*, *L_lac_2125* et *L_lac_244* en co-culture directe (CD) (A, B, C) avec les souches receveuses *L_lac_450*, *L_pla_465* et *L_pla_1524* après 6, 14 et 24 h de culture dans les CDM Caséines, Lupin (pour *E_fae_2412*) et Mix. La production de groupements NH_2 des souches donneuses seules est présentée par les résultats des dosages OPA sur les monocultures. Les résultats sont issus d'une unique répétition de l'expérience.

VII. Discussion

Augmenter la part de protéines végétales par rapport aux protéines d'origine animale constitue un enjeu fort pour réussir la transition alimentaire actuelle et consommer plus durablement et sainement. Un des moyens d'y contribuer est de produire des aliments lactofermentés sains, sûrs, et durable à partir d'un mélange de protéines animales et végétales et avec un goût et une texture qui plaisent aux consommateurs. La difficulté de réaliser un tel produit est qu'il n'existe pas une unique souche de bactéries lactiques (BL) qui possède toutes les propriétés permettant d'obtenir le produit idéal. Une solution est d'associer des souches de BL avec des propriétés différentes qui interagissent positivement entre elles. C'est en ce sens que mon projet de stage s'insère dans le cadre de la thèse de CIBELL menée par Fanny Canon. En effet, ce projet de thèse vise à exploiter des fonctionnalités complémentaires des BL sélectionnées pour créer des co-cultures. Il s'agit plus spécifiquement d'associer des souches non protéolytiques avec des souches protéolytiques, qui, quant à elles, pourront leur fournir une source d'azote organique assimilable, c-à-d des peptides et/ou des acides aminés libres. Les premiers résultats de cette thèse suggèrent qu'il existe une corrélation entre la quantité et la nature des acides aminés et peptides produits, issus de l'activité des souches protéolytiques, dites donneuses, et leur capacité à stimuler les souches non protéolytiques, dites receveuses, dans un milieu mixte composé de lait et de lupin. Pour ce faire, trois souches donneuses ont été utilisées, l'une avec une forte activité protéolytique (E_fae_2412), une autre avec une activité protéolytique moyenne (L_lac_2125) et la troisième avec une activité protéolytique plus faible (L_lac_244). Elles fournissent acides aminés et peptides aux souches receveuses, qui n'ont pas d'activité protéolytique, choisies pour leur capacité à utiliser les sources de carbone du lait et du lupin. Cette dépendance nutritionnelle entre deux souches de BL est une des solutions les plus prometteuses pour les co-cultures (Guyomarc'h et al., 2021). Cependant, le fait d'utiliser un mélange de protéines ne présage pas que chaque type de protéines est utilisé dans le milieu. C'est pourquoi, l'objectif de mon stage était de déterminer comment la nature des protéines présentes dans le milieu impacte la croissance de souches de BL protéolytiques et la protéolyse qui en résulte pour des protéines de différentes origines, à savoir les caséines du lait, les protéines du lupin ou un mélange des deux types de protéines. D'autre part, l'objectif était d'étudier comment interagissaient les souches protéolytiques et non-protéolytiques de BL en fonction des deux types de protéines présentes lors de co-cultures directes.

Les souches de BL ont été cultivées sur des milieux chimiquement définis (CDM) pour faciliter l'étude de l'utilisation et de l'hydrolyse des différentes protéines par les souches protéolytiques. Les CDM permettent en effet de changer la nature de la fraction protéique, à savoir caséines, protéines de lupin ou un mélange des deux, tout en apportant tous les autres composés nécessaires à la croissance des BL. La composition des CDM mime la composition en sucres d'un mélange de lait et de lupin utilisé dans le cadre de la thèse de Fanny Canon. Le lactose, le saccharose et le raffinose ont été choisis comme sources de carbone, qui sont celles du lait et du lupin. Le pouvoir tampon des trois CDM a été mesuré et les résultats montrent que ces milieux avaient le même profil d'acidification. Ceci nous permet de conclure que les différences d'acidification observées lors des cultures de BL dans ces différents milieux reflètent bien les capacités de croissance des souches sur les trois CDM.

L'échange de peptides et d'acides aminés entre souches peut se faire par cross-feeding, qui est un phénomène d'interaction selon lequel un microorganisme convertit un substrat en un produit excrété dans le milieu, utilisable par une autre souche (Seth & Taga, 2014). Cette dépendance a été observée entre deux souches de *Lactococcus lactis* dans la fermentation du lait, le partage de l'activité protéolytique extracellulaire a montré qu'elle était importante dans les interactions que cette dépendance ait lieu dans le fromage et les produits laitiers fermentés (Smid & Lacroix, 2013). Elle a également été démontrée durant notre étude dans le CDM Caséines mais pas uniquement. Deux des trois souches donneuses interagissaient avec les trois souches receveuses en leur apportant acides aminés et/ou peptides nécessaires à leur croissance dans les CDM Caséines et Mix (figure 13, figure 14). La souche E_fae_2412, qui possède l'activité protéolytique la plus élevée, permet la croissance des trois souches receveuses dans tous les CDM y compris le CDM Lupin (figures 13, 14) montrant que le système protéolytique de cette souche est capable d'hydrolyser et d'utiliser différentes sources de protéines.

Dans les CDM Caséines et Mix, la croissance et l'activité protéolytique des trois souches donneuses de BL ont été observées, alors que dans le CDM Lupin, il y avait peu ou pas de croissance de ces souches. Les recherches que Fanny Canon a déjà réalisées dans le cadre de sa thèse, ont notamment porté sur le développement d'un CDM Mix et montré que des souches de BL protéolytiques sont capables de s'y développer, ce qui est confirmé avec les résultats obtenus au cours du stage. La plupart des BL poussent également dans le lait et elles sont capables d'utiliser les caséines (Christensen et al., 1999). En revanche, aucune donnée n'était disponible sur l'utilisation des protéines de lupin comme unique source d'azote même si des fermentations ont eu lieu sur le lupin (Schlegel et al., 2019).

Il est connu que l'activité protéolytique peut varier selon la structure des protéines (Law & Kolstad, 1983). Les caséines sont des protéines non structurées lorsqu'elles ne sont pas sous forme de micelles de caséines (Dagleish, 2011). Cette caractéristique peut faciliter l'accès des enzymes des BL et en conséquence leur hydrolyse. En revanche, les protéines de lupin sont globulaires (Duranti et al., 2008), ce qui peut limiter l'accès des enzymes pour les hydrolyser. Les résultats des gels d'électrophorèse (figure 14) témoignent d'une faible, voire d'une absence d'hydrolyse des protéines de lupin dans les CDM pour deux des trois souches donneuses *Lactococcus lactis* CIRM-BIA2125 (L_lac_2125) et CIRM-BIA244 (L_lac_244). Concernant la dernière souche protéolytique testée, *Enterococcus faecalis* CIRM-BIA2412 (E_fae_2412), elle est capable d'hydrolyse partiellement les protéines de lupin dans le CDM lupin et quasi-totalement dans le CDM Mix. Ces résultats sont appuyés par la quantification des groupements aminés, qui permet d'évaluer les quantités de peptides et d'acides aminés libres (figure 15). L'absence de croissance des souches dans le milieu supplémenté en hydrolysats tryptique de lupin confirme que les protéines de lupin n'apportent pas les nutriments nécessaires à la croissance des BL. L'hydrolysats tryptique de caséines est réalisée beaucoup plus facilement que celui de l'isolat de lupin, les caséines sont plus facilement hydrolysées.

Les protéines de lupin contiennent peu de Met (Duranti et al., 2008), ce qui pourrait limiter la croissance des souches donneuses de BL protéolytiques dans le CDM Lupin. Met est un acide aminé essentiel pour la souche *L. lactis* IL 1403 (Aller et al., 2014) et cela semble être aussi le cas pour les souches donneuses *L. lactis* et *E. faecalis*, utilisées dans cette étude, d'après le résultat des expériences de supplémentation (figure 11). Par l'ajout de Met dans le milieu lupin, il a été possible de rétablir la croissance des souches

donneuses dans le CDM Lupin. La croissance des trois souches donneuses est également rétablie par le mélange de protéines de lupin et de caséines dans le CDM Mix, ce qui suggère que la déficience en Met serait compensée par l'ajout de caséines dans le CDM Mix. Les résultats d'électrophorèse (figure 9) montrent qu'il y a une différence d'utilisation des caséines et des protéines de lupin selon les souches donneuses et le milieu, qui peut être due à leur accessibilité dans les CDM. La souche E_fae_2412 présente une activité protéolytique très élevée et est capable d'hydrolyser et d'utiliser les caséines et les protéines de lupin dans les 3 CDM. Dans le CDM Mix, les protéines de lupin sont même davantage hydrolysées que dans le CDM Lupin. On pourrait supposer que les protéines de lupin sont plus accessibles dans le CDM Mix que dans le CDM Lupin, en lien possible avec le rôle de protéines chaperonnes déjà montré pour les caséines (Guyomarc'h et al., 2021b). En revanche, pour les souches qui ont une activité protéolytique plus faible (L_lac_2125 et L_lac_244), les protéines de lupin ne semblent pas être hydrolysées dans les CDM Lupin et Mix.

Plus l'activité protéolytique des souches donneuses est élevée, plus les interactions positives entre souches donneuses et receveuses sont importantes peu importe la source de protéines (figure 12). Cela a été observé avec la souche E_fae_2412 dans les CDM Caséines et Mix. Pour la souche L_lac_2125, les souches receveuses semblent moins stimulées et quasiment pas avec la souche donneuse L_lac_244 alors que les taux d'hydrolyse des protéines sont semblables pour les deux souches (figures 8 et 14). Dans le CDM Lupin, la souche donneuse E_fae_2412, qui est la seule à pousser sur ce milieu, semble fournir les acides aminés et peptides nécessaires à la croissance des souches receveuses, il y a donc interactions entre les souches dans ce milieu.

VIII. Conclusions et perspectives

Cette étude a montré que plus les protéines sont accessibles, plus les souches pourvues d'une activité protéolytique sont en mesure de les hydrolyser et de fournir aux souches receveuses, non protéolytiques, la quantité de peptides et/ou d'acides aminés nécessaires à leur croissance. Il s'est avéré que dans le CDM Lupin, seule la souche E_fae_2412 est capable d'hydrolyser les protéines de lupin et de permettre une croissance des souches receveuses sur ce milieu. Les protéines de lupin ne sont pas hydrolysées par les deux autres souches donneuses, certainement en raison de leur faible accessibilité pour les enzymes protéolytiques. A cela s'ajoute le fait que les protéines de lupin sont limitées en quantité de Met. La simple supplémentation du CDM Lupin avec de la Met a permis la croissance des souches donneuses. Ce déficit en méthionine est corrigé par l'ajout de caséines dans le CDM Mix. Il conviendrait de vérifier par électrophorèse que cette croissance s'accompagne aussi de l'hydrolyse des protéines de lupin. L'intérêt du mélange de protéines de lupin et de caséines ne s'arrête pas là. Il semblerait que l'ajout de caséines dans le milieu rende les protéines de lupin plus accessibles aux enzymes protéolytiques. Des études sur les interactions entre les protéines de lupin et les caséines sont en cours. Une seconde étude sur la nature des peptides et acides aminés produits par les souches donneuses est en cours afin de déterminer si la nature et non la quantité de peptides et/ou d'acides aminés produits par les souches donneuses diffère selon les CDM et si cela impact la croissance des souches receveuses. Des expériences de cultures séquentielles ont commencé à être réalisées. Le principe serait de récupérer les surnageants des monocultures des souches donneuses sur les différents CDM, de normaliser la quantité d'acides aminés et de peptides produits puis de faire pousser les souches receveuses sur second milieu.

L'objectif à terme de cette étude portée sur la lactofermentation de mélanges lait-lupin est de concevoir un aliment fermenté sain, bon avec une bonne texture, qui répond aux attentes des consommateurs. Il serait alors intéressant de réaliser par la suite par exemple un yaourt avec un mélange de protéines de lupin et de caséines avec les souches donneuses et receveuses pour réaliser des études sensorielles et connaître l'acceptabilité de ces mixtes lait-lupin fermentés.

Références

- Aller, K., Adamberg, K., Timarova, V., Seiman, A., Feštšenko, D., & Vilu, R. (2014). Nutritional requirements and media development for *Lactococcus lactis* IL1403. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(13), 5871-5881. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5641-7>
- Baron, F., Cochet, M.-F., Ablain, W., Grosset, N., Madec, M.-N., Gonnet, F., Jan, S., & Gautier, M. (2006). Rapid and cost-effective method for micro-organism enumeration based on miniaturization of the conventional plate-counting technique. *Le Lait*, *86*(3), 251-257. <https://doi.org/10.1051/lait:2006005>
- Berland, B. R., Bonin, D. J., Durbec, J.-P., & Maestrini, S. Y. (1976). Bactéries hétérotrophes aerobies prélevées devant le delta du rhone. III. utilisation potentielle de différents substrats organiques comme source de carbone. *Hydrobiologia*, *50*(1), 3-10. <https://doi.org/10.1007/BF00016835>
- Blind Kempinski, F. (2020, avril 20). Notre futur passe par les légumineuses. *Les Echos Planète*. <https://planete.lesechos.fr/enquetes/notre-futur-passe-par-les-legumineuses-3570/>
- Blinda, S., & C. Ouwehand, A. (2019). Lactic Acid Bacteria for Fermented Dairy Products. In *Lactic Acid Bacteria* (fifth edition). CRC Press.
- Blinda, S., & Ouwehand, A. (2019). Lactic Acid Bacteria for Fermented Dairy Products. In *Lactic Acid Bacteria* (fifth edition). CRC Press.
- Campos, I., Garcia, V. A. dos S., & Silva, C. da. (2018). Production and characterisation of lactose-free Greek yoghurt with partial replacement of milk by vegetable extract. *Journal of Food Processing and Preservation*, *42*(12), e13836. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13836>
- Canon, F., Nidelet, T., Guédon, E., Thierry, A., & Gagnaire, V. (2020). Understanding the Mechanisms of Positive Microbial Interactions That Benefit Lactic Acid Bacteria Co-cultures. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02088>

- Cavanagh, D., Fitzgerald, G. F., & McAuliffe, O. (2015). From field to fermentation : The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiology*, *47*, 45-61.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.001>
- Cayot, P., & Lorient, D. (1998). *Structures et technofonctions des protéines du lait : Arilait recherches*. Tec & Doc - Lavoisier.
- Christensen, J. E., Dudley, E. G., Pederson, J. A., & Steele, J. L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, *76*(1), 217-246.
<https://doi.org/10.1023/A:1002001919720>
- Dalgleish, D. G. (2011). On the structural models of bovine casein micelles—Review and possible improvements. *Soft Matter*, *7*(6), 2265-2272. <https://doi.org/10.1039/C0SM00806K>
- Duranti, M., Consonni, A., Magni, C., Sessa, F., & Scarafoni, A. (2008). The major proteins of lupin seed : Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, *19*(12), 624-633.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.07.002>
- Fox, P. F. (2003). Milk Proteins : General and Historical Aspects. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney (Éds.), *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins : Part A / Part B* (p. 1-48). Springer US.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3_1
- Freilich, S., Zarecki, R., Eilam, O., Segal, E. S., Henry, C. S., Kupiec, M., Gophna, U., Sharan, R., & Ruppin, E. (2011). Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. *Nature Communications*, *2*(1), 589. <https://doi.org/10.1038/ncomms1597>
- Gobbetti, M., Corsetti, A., & Rossi, J. (1994). The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts : Metabolism of amino acids. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *10*(3), 275-279. <https://doi.org/10.1007/BF00414862>

- Guyomarc'h, F., Arvisenet, G., Bouhallab, S., Canon, F., Deutsch, S.-M., Drigon, V., Dupont, D., Famelart, M.-H., Garric, G., Guédon, E., Guyot, T., Hiolle, M., Jan, G., Le Loir, Y., Lechevalier, V., Nau, F., Pezennec, S., Thierry, A., Valence, F., & Gagnaire, V. (2021a). Mixing milk, egg and plant resources to obtain safe and tasty foods with environmental and health benefits. *Trends in Food Science & Technology*, *108*, 119-132. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.010>
- Huchet, J.-B. (2016). Archéontomologie et archéoparasitologie d'une momie égyptienne. *Technè. La science au service de l'histoire de l'art et de la préservation des biens culturels*, *44*, 79-83. <https://doi.org/10.4000/techne.1120>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Laroute, V., Tormo, H., Couderc, C., Mercier-Bonin, M., Le Bourgeois, P., Coccagn-Bousquet, M., & Daveran-Mingot, M.-L. (2017). From Genome to Phenotype : An Integrative Approach to Evaluate the Biodiversity of *Lactococcus lactis*. *Microorganisms*, *5*(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020027>
- Law, B. A., & Kolstad, J. (1983). Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, *49*(3), 225-245. <https://doi.org/10.1007/BF00399500>
- Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., De Vuyst, L., Hill, C., Holzapfel, W., Lebeer, S., Merenstein, D., Reid, G., Wolfe, B. E., & Hutkins, R. (2021). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5>
- Pedersen, M. B., Gaudu, P., Lechardeur, D., Petit, M.-A., & Gruss, A. (2012). Aerobic Respiration Metabolism in Lactic Acid Bacteria and Uses in Biotechnology. *Annual Review of Food Science and Technology*, *3*(1), 37-58. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101255>

- Rodríguez-Ambriz, S. L., Martínez-Ayala, A. L., Millán, F., & Dávila-Ortíz, G. (2005). Composition and Functional Properties of *Lupinus campestris* Protein Isolates. *Plant Foods for Human Nutrition*, 60(3), 99-107. <https://doi.org/10.1007/s11130-005-6835-z>
- Sadat-Mekmene, L., Genay, M., Atlan, D., Lortal, S., & Gagnaire, V. (2011). Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. A review. *International Journal of Food Microbiology*, 146(1), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.039>
- Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), 394-406. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0427-1>
- Schlegel, K., Leidigkeit, A., Eisner, P., & Schweiggert-Weisz, U. (2019). Technofunctional and Sensory Properties of Fermented Lupin Protein Isolates. *Foods*, 8(12), 678. <https://doi.org/10.3390/foods8120678>
- Seth, E. C., & Taga, M. E. (2014). Nutrient cross-feeding in the microbial world. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00350>
- Smid, E. J., & Lacroix, C. (2013). Microbe–microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.11.007>
- Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016). Review : Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>
- Terzaghi, B. E., & Sandine, W. E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29(6), 807-813.
- Teusink, B., van Enckevort, F. H. J., Francke, C., Wiersma, A., Wegkamp, A., Smid, E. J., & Siezen, R. J. (2005). In Silico Reconstruction of the Metabolic Pathways of *Lactobacillus plantarum* : Comparing Predictions of Nutrient Requirements with Those from Growth Experiments. *Applied*

and Environmental Microbiology, 71(11), 7253-7262. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7253-7262.2005>

Yang, Y., Shevchenko, A., Knaust, A., Abuduresule, I., Li, W., Hu, X., Wang, C., & Shevchenko, A. (2014). Proteomics evidence for kefir dairy in Early Bronze Age China. *Journal of Archaeological Science*, 45, 178-186. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2014.02.005>

Zelezniak, A., Andrejev, S., Ponomarova, O., Mende, D. R., Bork, P., & Patil, K. R. (2015). Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(20), 6449-6454. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421834112>