



HAL
open science

Interactions entre bactéries lactiques dans de nouvelles ressources à base de végétal : comment chaque bactérie module-t-elle l'activité de l'autre ?

Borre Maxime

► To cite this version:

Borre Maxime. Interactions entre bactéries lactiques dans de nouvelles ressources à base de végétal : comment chaque bactérie module-t-elle l'activité de l'autre ?. Microbiologie et Parasitologie. 2023. hal-04128206

HAL Id: hal-04128206

<https://hal.inrae.fr/hal-04128206v1>

Submitted on 14 Jun 2023

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

MASTER SCIENCES, TECHNOLOGIES, SANTE

Mention MICROBIOLOGIE

Parcours

Microbiologie Fondamentale et Appliquée

2022-2023

**Interactions entre bactéries lactiques dans de nouvelles
ressources à base de végétal : comment chaque
bactérie module-t-elle l'activité de l'autre ?**

Mémoire présenté le 26 juin 2023

par Maxime BORRE



**Stage effectué à l'UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, INRAE-STLO-Institut
Agro**

Présentation technique du stage

MASTER 2 MICROBIOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

Année universitaire 2022-2023

Interactions entre bactéries lactiques dans de nouvelles ressources à base de végétal : comment chaque bactérie module-t-elle l'activité de l'autre ?

Auteur : Maxime BORRE

Encadrants : Valérie GAGNAIRE, Gwénaél JAN

Laboratoire : UMR 1253 Sciences et Technologies du Lait et de l'Œuf (STLO)
65 rue de saint Briec
35042 Rennes cedex

Durée du stage : 3 janvier 2023 – 30 juin 2023

Remerciements

Je remercie Yves LE LOIR, directeur de l'UMR STLO et Éric GUEDON, chef de l'équipe MICROBIO, pour leur accueil au laboratoire.

Je remercie Jessica MUSSET et Sébastien DEVAULT pour l'aide à la préparation des expériences et pour leur disponibilité.

Je remercie Céline EVEN pour son accueil et surtout pour m'avoir transmis son savoir, et pour m'avoir encadré dans mon apprentissage des différentes techniques nécessaires pour mener à bien mon stage.

Je remercie mes deux encadrants, Valérie GAGNAIRE et Gwenaël JAN. Valérie, je te remercie pour ta bonne humeur et ton attitude positive à toute épreuve, ta disponibilité permanente même quand tu ne pouvais pas, et pour tes « astuces » qui font toujours la différence. Gwen, je te remercie pour ta bonne humeur et pour rendre les expériences à la fois drôle et enrichissante. Je vous remercie également pour le temps que vous m'avez accordé et pour votre encadrement, que ce soit pour la rédaction et la correction de ce mémoire, ou pour réaliser des expériences avec moi.

Je remercie Julien JARDIN, Séverine CHEVALIER et Marie-Bernadette MAILLARD pour la réalisation des différentes analyses biochimiques et protéomique, et d'avoir été disponible pour mes nombreuses questions.

Je remercie Laurence ADAMANDIDIS pour sa bonne humeur contagieuse et pour nos discussions à la cantine, ainsi que pour mes congés souvent demandés au dernier moment.

Je remercie mes camarades et amis du master MFA pour leur soutien indéfectible. Je remercie Alisa pour m'avoir remonté le moral dès que j'en avais besoin et pour son aide afin de garder le rythme ; Thomas (TOMA) pour ses connaissances en génétique et pour ses compétences exceptionnelles en tant que chasseur de rathalos ; Logan pour m'avoir transmis ses compétences en statistiques et pour sa capacité à feur plus vite que son ombre ; Hugo pour ses connaissances en bactériologie, et pour les bagarres au top ; Adrien pour son aide bibliographique et pour ses crêpes ; Erwan pour son intelligence et pour être la personne la plus drôle que je connaisse ; Malaury pour m'avoir motivé plus que personne à me donner à fond durant ces deux ans, et pour avoir toujours les réponses à nos questions (réponses justes en plus) ; Maëllann pour sa maladresse constante et pour son enthousiasme permanent.

Je tiens à remercier toute l'équipe pédagogique du master pour leurs enseignements précieux, et tout particulièrement Gwennola ERMEL, pour m'avoir soutenu tout au long de ces deux années, et de m'avoir appris qu'un master est bien plus qu'un simple diplôme.

Finalement, je remercie ma famille et mes deux meilleures amies ; Maman, Mamie, Melys, Camille, Amandine, merci à vous pour avoir toujours cru en moi et pour m'avoir toujours encouragé à poursuivre mes rêves.

Table des matières

Remerciements.....	
Table des matières	
Liste des figures et tableaux	
Liste des abréviations utilisées	
Introduction	1
Matériels et Méthodes.....	5
Liste des souches.....	5
Conditions de culture.....	5
Précultures	5
Cinétique sur milieu de culture de laboratoire	5
Suivi de croissance	6
Par densité optique	6
Par dénombrements	6
Microscopie optique	7
Analyses biochimiques	7
Suivi d'acidification.....	7
Analyses des acides aminés libres	7
Analyse des sucres.....	7
Analyse des acides organiques.....	8
Analyses protéomiques	8
Lavage des culots bactériens.....	8
À partir des cultures sur milieux de laboratoire.....	8
Lavage des culots bactérien à partir des cultures sur jus de soja.....	9
Lyse des cellules bactériennes	9
Vérification des lyses cellulaires et des lavages des culots	10
Pré-séparation des protéines bactériennes avant trypsinolyse.....	10
Préparation des échantillons et analyses protéomiques.....	10
Analyse en ElectroSpray (NanoLC/MS/MS)	11
Analyses statistiques	11

Résultats et Discussion.....	11
Détermination des conditions optimales de croissance sur milieu de laboratoire	11
Conditions de croissance de <i>Lactococcus lactis</i> sur M17 + glucose.....	11
Conditions de croissance du <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>lactis</i> sur MRS.....	14
Etude de croissance des souches Lla7116 et Ldl1585 en culture pure et en co-culture sur jus de soja	16
Le jus de soja empêche la croissance de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> Bioprox 1585 en culture pure mais pas en co-culture, tandis que <i>Lactococcus lactis</i> Bioprox 7116 est capable de croître dans les deux cas	16
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> est capable d'hydrolyser les sucres majoritaires du jus de soja, <i>Lactococcus lactis</i> n'est capable de métaboliser que le saccharose comme glucide complexe .	18
Un changement de métabolisme chez <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>Lactis</i> et <i>Lactococcus lactis</i> se produit en co-culture	20
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> est capable de libérer une large variété d'acides aminés dans le jus de soja fermenté, favorisant la croissance de <i>Lactococcus lactis</i>	22
Les protéines de soja sont en concentration trop élevée par rapport aux protéines bactériennes, masquant ces dernières	24
Une analyse protéomique est possible sur une co-culture de deux bactéries lactiques malgré une différence de niveau de population entre les deux.....	25
Conclusion et perspectives	26
Références bibliographiques.....	27

Liste des figures et tableaux

Figures

Figure 1 : Les quatre types d'interactions positives retrouvées au sein des communautés microbiennes et décrites par Canon et al.(13).....	3
Figure 2 : A : Courbes de croissance pour la souche <i>Lactococcus lactis</i> Bioprox 7116 (Lla7116) à 30°C, 37°C et 43°C sur M17+glucose 0,5%. Observations microscopiques à t24, B : 30°C ; C 37°C ; D : 43°C.....	12
Figure 3 : Evolution de la population viable et cultivable de la souche Lla7116 à t0, t8 et t24 de culture sur milieu M17+glucose 0,5% en fonction de la température de culture, 30°C, 37°C et 43°C.	13
Figure 4 : Courbes de suivi d'acidification du M17+glucose 0,5% par la souche Lla7116 à 30°C, 37°C, 43°C.....	13
Figure 5 : A : Courbes de croissance pour la souche <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> Bioprox 1585 (Ldl1585) à 30°C, 37°C et 43°C sur MRS. Observations microscopiques à t24, B : 30°C ; C 37°C ; D : 43°C.	14
Figure 6 : Evolution de la population viable et cultivable de la souche Ldl1585 à t0, t8 et t24 de culture sur milieu MRS en fonction de la température de culture à 30°C, 37°C et 43°C.	15
Figure 7 : Cinétiques d'acidification du M17+glucose 0,5% par la souche Lla7116 à 30°C, 37°C, 43°C.....	15
Figure 8 : Croissance des souches Ldl1585 et Lla7116 sur jus de soja en cultures pures ou en co-cultures à 30°C.	16
Figure 9 : Courbes d'acidification du jus de soja par les souches Lla7116 et Ldl1585 en cultures pures et en co-culture à 30°C.	17
Figure 10 : Concentration en différents sucres dans le jus de soja après 16 heures de fermentation par les souches Ldl1585 et Lla7116 à 30°C.	18
Figure 11 : Concentration en (A) lactate, (B) citrate et acétate après 16 heures de fermentation du jus de soja par les bactéries Ldl1585 et Lla7116 en cultures pures et en co-culture à 30°C.....	20
Figure 12 : Concentration en différents acides aminés après fermentation du jus de soja par Lla7116 et Ldl1585.....	22
Figure 13 : Profil électrophorétique des protéines de soja avant et après 16 h de fermentation du jus de soja par <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> Bioprox 1585, <i>Lactococcus lactis</i> Bioprox 7116 et la co-culture des deux bactéries, à 30°C.....	23
Figure 14 : Nombre de peptides détectés pour chaque souche mélangée à différents ratios par spectrométrie de masse NanoLC-MS/MS.	25

Tableaux

Tableau 1 : Liste des souches bactériennes utilisées, ainsi que leurs conditions de culture.....	5
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des solutions et des paramètres de lavages utilisés pour les essais de lavage de culots bactériens après fermentation du jus de soja à 30°C.....	9

Liste des abréviations utilisées

AAL : acides aminés libres

AI-2 : peptide Autoinducteur-2

ACN : acétonitrile

ADI : arginine déiminase

ADP : adénosine diphosphate

ATP : adenosine triphosphate

APS : persulfate d'ammonium

DO : densité optique

DTT : dithiothreitol

EC : eau citratée

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

HPAEC-PAD : chromatographie ionique couplée à un détecteur d'ampérométrie pulsée

M17 : milieu de culture des lactocoques

MRS : milieu de culture des lactobacilles Man Rogosa Sharpe

Nleu : norleucine

OTC : ornithine transcarbamylase

PBS : tampon phosphate salin

PMSF : Fluorure de phénylméthylsulfonyle

SDS : dodécylsulfate de sodium

SSA : acide sulfosalicyclique

TFA : acide trifluoroacétique

UFC : unité formant colonie

Introduction

Les sociétés occidentales assistent aujourd'hui à une évolution des modes de consommation des aliments. En effet, de plus en plus de consommateurs se tournent vers une alimentation moins riche en protéines animales et plus riche en végétaux. En ce sens, Gaudot *et al.* (1) préconisent un rééquilibrage du ratio entre protéines animales et protéines végétales afin d'atteindre un ratio 50:50 contre un ratio 67:33 à l'heure actuelle. Cette transition a pour origine des considérations variables, comme l'approvisionnement en protéines dans le monde au regard de l'augmentation de la population globale, la mise en avant du bien-être animal et la lutte contre le réchauffement climatique (2). Un lien clair entre le réchauffement climatique et l'élevage est aujourd'hui prouvé scientifiquement (<https://www.fao.org/3/i8098e/i8098e.pdf>) (3). Actuellement, 80% des protéines végétales produites sont destinées à l'élevage, alors que ces cultures produisent 50 fois moins de gaz à effet de serre par rapport à ces élevages (4). Une partie de ces protéines végétales est produite à partir des légumes secs, qui sont connus pour être riches en protéines. Les cultures de légumes secs ont l'avantage d'être résistantes aux changements climatiques et aux sécheresses, car nécessitant peu d'eau, et de participer au cycle de l'azote, en réduisant l'apport d'engrais lors des rotations culturales (5). En plus de ces avantages écologiques, des bénéfices santé entrent également en considération, car la diversification de l'alimentation permet de se maintenir en bonne santé. La consommation de légumes secs semble en effet contribuer à un contrôle positif du poids et de lutter contre l'obésité (6), à lutter contre les maladies cardiovasculaires (7) et à favoriser un bon développement du microbiote intestinal (8). La diversification de l'alimentation se pose notamment en termes de diversification du type de protéines fournies par l'alimentation. Il est en effet possible de diversifier les sources de protéines en utilisant entre autres viande, poisson, lait, œufs, insectes, et végétaux, et parmi ces derniers, les légumes secs sont les plus riches en protéines. Ces aspects ont mené le gouvernement français à encourager la population à consommer plus de légumes secs, et à réduire la consommation de produits à base de viande, par la mise en place du quatrième Plan National de Nutrition et Santé (PNNS4, Ministère de la santé).

Cette évolution amène les industriels à concevoir de nouveaux produits, respectant les attentes de la société, à base de végétaux, analogues de viande, d'œuf et de produits laitiers. Dans le cadre du remplacement des produits laitiers, il s'agit de produits comme des bases tartinables non fermentées, ou des produits fermentés type boissons, yaourts, ou fromages, dont le lait est remplacé complètement ou en partie par un jus végétal à base de céréales (avoine, riz...), de fruits à coques (amandes, noisettes...) ou de légumes secs (soja, pois, lupin, haricot, pois chiche ...). Dans le cas des légumes secs, même si la teneur en protéines est élevée comparativement aux autres jus, le goût des produits est généralement peu apprécié par les consommateurs. Il s'avère en effet que la présence de composés, tels que l'hexanal, sont responsables du goût peu apprécié, caractéristique « de vert », des légumes secs (9, 10), tandis que d'autres composés comme les α -galactosides,

facilement fermentés par le microbiote, peuvent provoquer un inconfort digestif et des flatulences (11). De plus, les différents légumes secs sont variables en termes de composition (12). Les produits fermentés à base de légumes secs actuellement commercialisés (13) le sont par les bactéries classiquement utilisées dans la production de yaourts à base de lait, à savoir *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Si *S. thermophilus* est, dans la plupart des cas, capable de croître en métabolisant le saccharose, un des sucres présents dans les légumes secs (14–16), *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* est plus exigeant en terme de source de carbone et d'énergie (16). De nouvelles espèces de bactéries lactiques sont donc à trouver pour adapter au mieux les cultures capables de se développer sur les jus végétaux et en particulier sur le jus de soja. Néanmoins, il est quasi impossible de trouver une souche bactérienne capable de remplir tous les critères exigés (fermentation des sucres, production de lactate, dégradation des protéines, amélioration des propriétés nutritionnelles du produit,...). C'est pourquoi l'utilisation de plusieurs souches différentes, en co-cultures, est une des réponses à ce problème. Il est nécessaire dans ce cas de favoriser les interactions entre les partenaires de cette co-culture. Il existe différents types d'interactions connues entre microorganismes. En effet, les interactions entre bactéries sont extrêmement répandues dans la majorité des environnements dans lesquels ces bactéries sont retrouvées, et ces interactions peuvent être négatives ou positives pour les partenaires de ces interactions. Une interaction positive est une interaction entre plusieurs partenaires, qui favorise au moins l'un de ces partenaires. Chez les micro-organismes, l'interaction positive se traduit par une « fitness » supérieure, à savoir une meilleure croissance, quand les deux partenaires sont présents dans le même milieu, par rapport à un milieu avec un seul des partenaires. Cela conduit donc à une meilleure croissance, ou le cas échéant, un maintien de la population. Dans le cas des interactions positives, quatre modes d'actions sont connues : le commensalisme, la coopération, le mutualisme et la syntrophie (13) (figure 1).

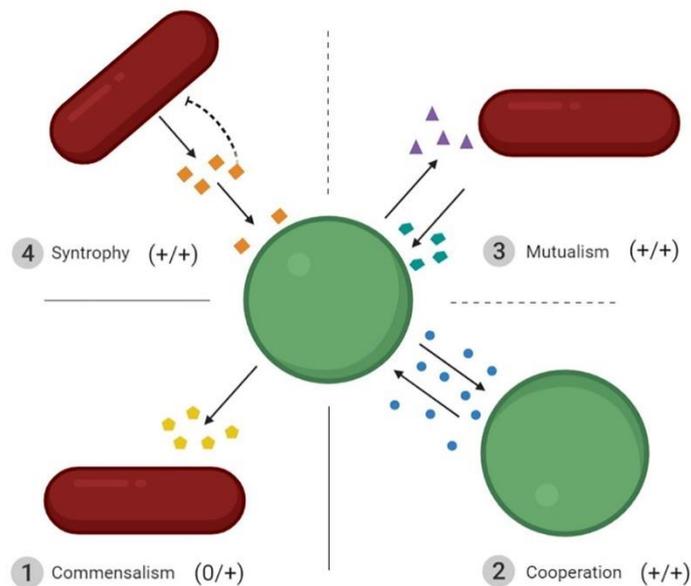


Figure 1 : Les quatre types d'interactions positives retrouvées au sein des communautés microbiennes et décrites par Canon et al.(13).

Le commensalisme (1 figure 1) est une forme d'interaction où un seul des partenaires reçoit un effet positif, tandis que le deuxième n'est pas affecté par le premier. La coopération (2 figure 1), elle, concerne des microorganismes avec le même génotype, où les partenaires échangent les mêmes métabolites entre eux pour améliorer leurs fitness. Le mutualisme (3 figure 1) est très proche de la coopération, mais avec des partenaires dont les génotypes sont différents et qui échangent des métabolites différents. Enfin, la syntrophie (4 figure 1) est une interaction complexe où l'un des partenaires bénéficie des métabolites du deuxième partenaire, et celui-ci va échanger des molécules donnant un avantage au premier partenaire. Il ne s'agit pas de métabolite, mais de molécules pouvant, par exemple, lever une inhibition. Dans le cas de produits fermentés, on retrouve surtout des interactions de type commensalisme, mutualisme et coopération. L'exemple le plus connu et le plus étudié de co-culture de bactéries lactiques est le yaourt, produit dans lequel une co-culture des bactéries lactiques *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*, où les échanges entre les deux partenaires sont bien compris (17). Néanmoins, les interactions sont rarement étudiées en profondeur, malgré une utilisation courante des co-cultures de bactéries lactiques pour la production de produits fermentés autres que les yaourts.

Favoriser les interactions entre les partenaires d'un co-culture peut se baser sur plusieurs mécanismes. Il est tout d'abord possible de jouer sur les auxotrophies des bactéries lactiques, car ces bactéries sont connues pour ne pas être capables de synthétiser tous les acides aminés nécessaires à leur croissance. Ainsi, la plupart des bactéries des genres *Lactococcus* et *Lactobacillus* sont auxotrophes pour des acides aminés tels que la leucine, l'isoleucine, la valine, l'arginine et la méthionine (18, 19). Afin de pallier ce manque de synthèse d'acides aminés, certaines bactéries lactiques possèdent un système protéolytique complexe permettant de protéolyser des protéines présentes dans le milieu et ainsi d'obtenir les acides aminés manquants sous forme de peptides et/ou d'acides aminés libres (20). Cette capacité protéolytique peut alors être utilisée pour créer une co-culture, au sein duquel l'une des bactéries possédant un système adéquat pour un milieu donné peut stimuler la croissance d'une seconde bactérie qui ne posséderait pas les enzymes protéolytiques nécessaires à sa survie dans le milieu ; cette dernière serait alors dépendante de la capacité de la première à excréter les acides aminés nécessaires à sa croissance (21). Cette stratégie a été utilisée dans le cadre de la thèse de F. Canon réalisée dans mon laboratoire d'accueil

pour le stage (22) et a permis de montrer que la quantité de peptides et d'acides aminés libres était une condition nécessaire mais non suffisante pour permettre l'interaction entre deux bactéries lactiques, un autre critère étant la nature des acides aminés, à savoir la présence des acides aminés ramifiés (Isoleucine, leucine et valine) (23, 24). Une deuxième possibilité pour favoriser les interactions au sein d'une co-culture est d'utiliser deux microorganismes dont les métabolismes des sucres sont différents. Dans ce cas, il s'agit d'utiliser la capacité du premier partenaire de la co-culture à hydrolyser un oligoside en sucres plus simple, assimilable par le deuxième partenaire. Ce phénomène est bien connu dans des co-cultures de levures et de bactérie lactiques (25) mais encore peu documenté concernant des co-cultures de deux bactéries lactiques. Ces exemples de mécanismes sont communément appelés « cross-feeding », car il s'agit d'échanges de métabolites, nécessaires à la croissance des microorganismes impliqués dans ces échanges (26). Un troisième mécanisme d'action pour favoriser les interactions dans une co-culture microbienne est le phénomène de quorum-sensing (QS). Bien que peu de recherches sur les systèmes de QS de bactéries dans des matrices alimentaires aient été menées jusqu'à présent, il a été démontré que la molécule AI-2 (autoinducteur-2, molécule de signalisation cellulaire impliquée dans le phénomène de QS) pourrait stimuler la croissance de *Enterococcus faecium* et de *Limosilactobacillus fermentum* (27). Il a également été montré que l'AI-2 permet une meilleure adaptation à un stress acide, notamment en favorisant la formation de biofilm (28, 29), ce qui fait du quorum-sensing une piste intéressante pour obtenir des co-cultures de bactéries résistantes à un milieu acide. En résumé, favoriser les interactions au sein d'une co-culture revient à mettre en interdépendance deux microorganismes, dont les caractéristiques individuelles sont intéressantes pour la conception d'un produit fermenté, mais qui ne sont pas capables de se développer seuls (ou peu).

Afin de produire des analogues aux produits laitiers avec des jus de soja sans ajout d'additifs, il n'est pas possible d'utiliser les bactéries habituellement utilisées dans les yaourts. En effet, bien que *S. thermophilus* soit capable de se développer sur le jus de soja (30), *L. delbrueckii ssp bulgaricus* n'a pas cette capacité, notamment à cause de son impossibilité à utiliser le saccharose (31). Dans le jus de soja, il est nécessaire d'utiliser des bactéries pouvant hydrolyser les sucres majoritaires, qui sont le saccharose, le stachyose et le raffinose (32). Afin de trouver une co-culture de bactéries lactiques capables de fermenter le jus de soja, un criblage de 104 souches incluant 84 souches appartenant à neuf espèces de bactéries lactiques a été réalisé préalablement à mon stage (16). Les résultats obtenus ont montré que deux bactéries lactiques, *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus delbrueckii ssp lactis* étaient capables de fermenter un jus de soja et, associées avec une bactérie propionique, permettaient d'obtenir un produit fermenté à base de jus de soja avec des propriétés immunomodulatrices prometteuses constatées *in vitro* (16). Néanmoins, les conditions optimales de croissance des deux bactéries lactiques, *L. lactis* et *L. delbrueckii ssp lactis*, seules ou en co-culture, et les possibles interactions entre ces souches n'avaient pas encore été étudiées. Cette étude propose donc de déterminer si les deux bactéries interagissent entre elles et si oui, comment chaque

bactérie module l'activité de l'autre. Pour cela, des cinétiques de croissance ont été réalisées en culture pure et en co-culture. L'objectif était de comparer les populations atteintes ainsi que l'intensité de l'acidification, après fermentation entre les cultures pures et la co-culture. Des mesures des teneurs en sucres résiduels, de production d'acides organiques et d'acides aminés libres ont permis de comprendre comment les deux bactéries étudiées interagissaient entre elles. De plus, une approche protéomique a été réalisée afin de connaître le protéome de chaque bactérie en culture pure et de déterminer les changements possibles du protéome liés à la croissance des deux bactéries en co-culture.

Matériels et Méthodes

Liste des souches

Tableau 1 : Liste des souches bactériennes utilisées, ainsi que leurs conditions de culture

Genre	Espèce	Sous-espèce	N° de la souche (abréviation)	Conditions de culture
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>		Bioprox 7116 (Lla7116)	M17+glucose 0,5% 30°C
<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i>	<i>lactis</i>	Bioprox 1585 (Ldl1585)	MRS 43°C

Conditions de culture

Précultures

Les deux souches utilisées, *Lactobacillus delbrueckii* ssp *lactis* Bioprox 1585 (nommée dans le manuscrit par la suite Ldl1585) et *Lactococcus lactis* Bioprox 7116 (Lla7116), ont été cultivées respectivement sur milieu MRS (33)(Difco) et M17 (34)(Difco) contenant du glucose 0,5% comme source de carbone. Pour chacune des souches, les cinétiques de croissance ont été réalisées à partir de cryotubes conservés à -80°C suivis de deux repiquages successifs réalisés à 2% (v/v) dans les conditions classiques de culture : 43°C pour Ldl1585 et 30°C pour Lla7116, le premier sur 8 h et le deuxième sur la nuit.

Cinétique sur milieu de culture de laboratoire

Des cinétiques de croissance ont été réalisées avec les deux souches étudiées afin de déterminer leurs conditions de croissance optimale. Pour cela, les souches ont été inoculées à 2% sur leur milieu respectif et incubés dans une étuve à 30°C, 37°C ou 43°C. Les cinétiques ont été réalisées sur un temps de culture de 24h avec des prélèvements toutes les deux heures.

Cinétiques de croissance sur jus de soja

La cinétique de croissance et d'acidification des deux souches étudiées a également été effectuée en culture pure sur jus de soja (Sojasun UHT, Triballat Noyal) et en co-culture pour étudier les

interactions, à 30°C pendant 24 h avec un prélèvement toutes les deux heures. La matrice jus de soja été inoculée de façon à obtenir une concentration de départ de $2 \cdot 10^6$ unités formant colonies (UFC)/mL pour les cultures pures de Ldl1585 et de Lla7116, tandis que la co-culture sur jus de soja a été inoculée à une concentration de départ de $1 \cdot 10^6$ UFC/mL avec chaque culture bactérienne pour avoir une population totale de $2 \cdot 10^6$ UFC/mL comme pour les cultures pures. Pour chaque point de cinétique, des aliquotes ont été prélevées pour les analyses biochimiques et microbiologiques ultérieures.

Suivi de croissance

Par densité optique

La croissance bactérienne sur milieu de culture de laboratoire au cours du temps a été déterminée à l'aide de mesure de la densité optique (DO) à une longueur d'onde de 650nm à l'aide d'un spectrophotomètre (7310 Spectrophotometer, JENWAY). Les mesures ont été effectuées toutes les 2 heures du point t0 (0h) jusqu'au point t12 (12h) et à 24h à partir d'un mL de culture. Lorsque la DO était supérieure ou égale à 0,8, l'échantillon était dilué au $1/10^{\text{ème}}$ dans le milieu de culture approprié pour chaque souche bactérienne.

Par dénombrements

Des dénombrements ont été réalisés pour les cinétiques sur milieu de culture de laboratoire et sur jus de soja. Les dénombrements pour les cinétiques sur milieu de laboratoire ont été réalisés en duplicatas aux points t0, t8 et t24 en suivant le protocole de la micro-méthode (35). Pour les milieux de laboratoire, 20 μ L de culture ont été mis directement dans 180 μ L d'eau tryptonée stérile contenant 1 g/L tryptone + 8,5 g/L NaCl (ISO 8261 FIL 122), dans une plaque à 96 puits. Une dilution en cascade de 10 en 10 a été ensuite réalisée. Pour les cinétiques sur jus de soja, la 1^{ère} dilution a été réalisée en ajoutant 9 mL d'eau tryptonée au 1 mL de soja fermenté (ou de soja témoin non inoculé) prélevé à chaque temps avant homogénéisation au vortex.

Ensuite, 50 μ L de différentes dilutions ont été déposés en deux séries indépendantes dans une plaque à 12 puits, et a été ajouté 1 mL des milieux gélosés (maintenus en surfusion à 48°C) correspondant : MRS pH 5,4 pour le Ldl1585 ou M17 gélosé + glucose 0,5% (ajouté extemporanément) pour le Lla7116. Les plaques de 12 puits ont été incubées 48 heures à 30°C pour Lla7116 et à 43°C pour Ldl1585, en anaérobiose pour Ldl1585. L'anaérobiose a été créée à l'aide d'un générateur d'anaérobiose (ATCO Biocult), et validée via la présence d'un indicateur d'oxygène (Anaerotest, Merck). Le nombre de CFU/mL a été déterminé selon l'équation suivante :

$$\text{UFC/mL} = \text{Nombre de colonies dénombrées} \times \text{facteur de dilution} \times 20$$

Microscopie optique

Des observations microscopiques optiques ont été réalisées à l'état frais sur le microscope (Olympus X43) aux grossissements $\times 10$, $\times 40$, et à $\times 100$ (sous huile à immersion, en contraste de phase) aux temps t_0 , t_8 et t_{24h} à partir de 2 μL de culture bactérienne.

Analyses biochimiques

Suivi d'acidification

Les mesures de pH ont été réalisées à partir d'un mL de culture sur milieu de laboratoire, à l'aide d'un pH-mètre (pHmètre Inolab) et sur jus de soja, à l'aide d'un pH-mètre pour produits visqueux (pHmètre PH211, HANNA).

Analyses des acides aminés libres

Les acides aminés libres (AAL) présents initialement dans le jus de soja, et lors de la fermentation par Lla7116 et Ldl1585 ont été analysés par chromatographie échangeuse de cations. Les aliquotes (10 ml) ont été centrifugés à 8 500 $\times g$ pendant 20 minutes à 4°C afin de culotter les bactéries et les protéines de soja. Les surnageants obtenus à partir des cultures pures de Lla7116 ou Ldl1585, des co-cultures à t_{16} , et des témoins jus de soja non inoculés à t_0 et t_{16} ont servi pour les analyses des AAL, des sucres et des acides organiques (voir paragraphes suivants). A 950 μL de surnageants, 50 μL d'une solution d'acide 5-sulfosalicylique dihydraté (SSA, 2M) et de norleucine 250 μM ont été ajoutés et incubés dans de la glace pendant une heure pour déprotéiniser les échantillons. Ils ont ensuite été centrifugés à 10 000 $\times g$ pendant 10 minutes à température ambiante. Les surnageants obtenus ont été filtrés à travers d'un filtre 0,20 μm (PVDF-20/13, CHROMAFIL Xtra) avant injection de 100 μl sur colonne échangeuse d'ions dans l'appareil de chromatographie en phase liquide d'échanges de cations de l'analyseur Biochrom 30+, (Biochrom). La séparation se fait par plateaux successifs à 50°C, avec des tampons de pH et de force ionique croissante. En sortie de colonne, les acides aminés sont colorés par réaction avec la ninhydrine (138°C) et détectés à deux longueurs d'ondes (570 nm et 440 nm). Les étalons de calibration composés ainsi : standard d'acides aminés libres 200 μM , norleucine (Nleu) 250 μM , SSA 2,5% (p/v), urée 125 μM , glutamine 2,88 mM.

Analyse des sucres

L'analyse des sucres présents dans les jus de soja fermentés ou non a été réalisée par chromatographie ionique couplée à un détecteur d'ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD). Les échantillons ont été dilués au $\frac{1}{2}$ avec de l'eau ultrapure MiliQ puis transférés dans des cellules centrifugeables de diafiltration Vivaspin 10,000 MWCO PES (Sartorius), et centrifugés à 6 000 $\times g$ pendant 15 minutes à température ambiante. Le perméat est récupéré et deux séries de dilutions ont été réalisées, au $\frac{1}{20^{\text{ème}}}$, et au $\frac{1}{200^{\text{ème}}}$. 2 μl ont été injectés sur la colonne chromatographique échangeuse d'ions CarboPac PA210 4 μm ((4x150 mm), Dionex) de la Chaîne ICS-5000+,

(ThermoFischer) précédée par une pré-colonne de même phase. Les sucres ont été séparés par élution isocratique avec une solution de potassium (KOH) 13 mM, avec un débit de 0,2 mL/min. La détection a été effectuée par ampérométrie pulsée sur électrode d'or. La gamme étalon utilisée était des solutions de standards de sucres (Sigma Aldrich) dont la concentration était croissante et linéaire (2, 5, 10 et 20 mg/L).

Analyse des acides organiques

Pour l'analyse des acides organiques présents dans le jus de soja fermenté, 1 mL des filtrats obtenus précédemment ont été répartis dans des vials 2 mL, et 20 µL d'échantillons ont été analysés par chromatographie en phase liquide haute performance (Thermofisher), avec une colonne HPX-87H. la phase mobile utilisait du H₂SO₄ 5 mM à un débit de 0,4 mL/min à 60°C. Deux détecteurs ont été utilisés, un détecteur UV (Dionex UVD 170U) à 210 nm et un réfractomètre. Les gammes de standards d'acides organiques (Merck/Panreac) ont été préparées en concentration croissante, de 0,03 g/L à 1 g/L et pour l'acide lactique, de 0,03 g/L à 10 g/L.

Analyses protéomiques

Lavage des culots bactériens

Afin de pouvoir récupérer des culots bactériens pour une étude protéomique, il est nécessaire d'éliminer les protéines qu'elles proviennent des milieux de culture ou du jus de soja. Plusieurs méthodes ont été utilisées.

À partir des cultures sur milieux de laboratoire

Des cultures bactériennes de Ldl1585 (MRS, 43°C) et de Lla7116 (M17+Glucose 0,5%, 30°C) ont été centrifugées à 12 000 × g pendant 10 minutes à température ambiante afin de culoter les bactéries. Après élimination des surnageants, les culots ont été repris dans 10 mL de tampon phosphate salin (Phosphate Buffered-Saline (PBS) 1X (NaCl 0,137 M, KCl 0,027 M, Na₂HPO₄ 0,010 M, KH₂PO₄ 0,015 M, pH 7,2). Trois étapes de lavages ont été réalisées dans les mêmes conditions. Après la dernière centrifugation, le surnageant était éliminé et les culots placés à -20°C pour un usage ultérieur.

Lavage des culots bactérien à partir des cultures sur jus de soja

Pour éliminer les protéines de soja plusieurs protocoles ont été testés, comme montré dans le tableau 2.

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des solutions et des paramètres de lavages utilisés pour les essais de lavage de culots bactériens après fermentation du jus de soja à 30°C.

Solution utilisée	Paramètres de centrifugation	Dilution des échantillons	Références bibliographique
Eau citratée (EC) 0,2 M ; pH 7,5	12 000×g ; 10 min ; 20°C	1/10 ^{ème}	(14)
Eau citratée 1M ; pH 8	32 000×g ; 15 min ; 4°C	1/5 ^{ème}	(30)
Carbonate de sodium 0,15 M ; pH 9	12 000×g ; 10 min ; 20°C	1/10 ^{ème}	
Urée 8 M, pH 8,5	12 000×g ; 10 min ; 20°C	1/5 ^{ème}	
Tris 0,1 M + EDTA 1 mM, pH 9	12 000×g ; 10 min ; 20°C		(30)
PBS 1X, pH 7,2	12 000×g ; 10 min ; 20°C		(36)

Pour les tampons, Tris-EDTA et PBS1X les culots a été repris directement dans 35 mL

Les lavages à l'aide des solutions de Tris 0,1M-EDTA 1mM pH 9 et de PBS 1X ont été réalisées à la suite des centrifugations avec les solutions d'eau citratée, de carbonate de sodium et/ou d'urée. Tous les lavages ont été réalisés dans des falcons 50 mL (volume total 35 mL) pour les centrifugations à 12 000 × g, ou dans des pots de centrifugation de 250 mL (volume total 100 mL) pour les centrifugations à 32 000 × g.

Lyse des cellules bactériennes

L'analyse du protéome intracellulaire des bactéries étudiées (*Lactococcus lactis* Lla7116 et *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* Ldl1585, à 16 heures de fermentation) nécessite une lyse des cellules. Pour cela, les culots bactériens ont été repris dans 1 ml de tampon de lyse (Tris 0,1 M, SDS 0,3%, DTT 0,1M, pH 7,5), et puis congelés à -20°C. Après décongélation, 100 µL de PMSF (40 mM), ont été ajoutés pour inhiber l'activité des enzymes protéolytiques, et les suspensions ont été vortexées jusqu'à remise en suspension du culot. Les suspensions bactériennes ont à nouveau été congelées à -20°C, et décongelées à nouveau pour une nouvelle remise en suspension. Cette étape a été réalisée 3 fois. Les suspensions bactériennes ont ensuite été traitées aux ultrasons (Sonicateur Bioblock Scientific VibraCell) pendant 4 minutes. Les lysats obtenus ont ensuite été transférés dans des tubes de 2 mL avec des billes en zirconium de 0,1 mm et broyés pendant 30 secondes à 6000 rpm dans un fastprep (broyeur Precellys Evolution) afin de finaliser la casse des cellules. Les débris cellulaires ont finalement été éliminés par centrifugation à 12 000 × g pendant 10 minutes, à température ambiante. Le surnageant contenant les protéines bactériennes ainsi obtenu a été transféré dans des eppendorfs de 2 mL puis conservés à -20°C pour un usage ultérieur.

Vérification des lyses cellulaires et des lavages des culots

Afin de vérifier l'efficacité des différents protocoles de lavage, des électrophorèses monodimensionnelles SDS-PAGE ont été réalisés selon le protocole de Laemmli (37). Pour cela, les lysats bactériens obtenus dans la partie précédente ont été dilués au 1/5^{ème} ou au 1/10^{ème} avec du tampon dénaturant (Tris 1,25M HCl (pH 6,8), SDS 4%, DTT 0,6%, glycérol 20%, Bleu de Bromophénol 0,01%). Après dénaturation (100°C × 3 min), 20 µl d'échantillons ont été déposés par puits dans un gel prêt à l'emploi Criterion TGX (gradient 4-15% acrylamide) (Bio-RAD) et 5 µl d'un standard de protéines de masses moléculaires apparentes connues (Precision plus Protein unstained standards, 250-10 kD, Bio-Rad). La migration des échantillons a été réalisée à 200V constants pendant 45 minutes avec le tampon de cuve Laemmli 1X (Tris 25 mM, glycine 152 mM, SDS 0,1% (p/v), pH 8,5). Le gel a alors été rincé à l'eau osmosée, 3 fois. Les protéines ont été fixées dans le gel dans un bain contenant 10% acide acétique pur et 40% éthanol, puis colorées (Bio-Safe Coomassie G-250 Stain, Bio-RAD). Le gel a ensuite été rincé à l'eau osmosée, jusqu'à complète décoloration du fond du gel. Les gels ainsi obtenus ont été numérisés et analysés à l'aide d'un système d'acquisition ChemiDOC MP (BioRad).

Pré-séparation des protéines bactériennes avant trypsinolyse

Afin de concentrer les différentes protéines présentes dans lysat bactérien obtenu précédemment, il est nécessaire de les faire migrer sur 1 cm de haut dans un gel SDS-PAGE 12% d'acrylamide (solution 40% acrylamide/bis-acrylamide 29 :1 (BioRad)), Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 10%, APS (persulfate d'ammonium) 10%(p/v) et TEMED 0,15% (v/v) surmonté d'un gel à 4% d'acrylamide (40% acrylamide /bis acrylamide (BioRad), Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 10%, APS 10% et TEMED). Ces gels ont été coulés dans un système d'électrophorèse Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad). 20 µl d'échantillons préalablement dénaturés ont été déposés dans les puits. La migration a été réalisée à 120V, 50 mA jusqu'à ce que le front de migration descende d'environ 1 cm dans le gel inférieur. Les protéines ont été fixées et colorées comme indiqué précédemment.

Préparation des échantillons et analyses protéomiques

Les gels obtenus précédemment ont été découpés au scalpel, afin de récupérer l'intégralité des bandes colorées correspondant aux protéines concentrées de l'échantillon. Le protocole suivi pour réduire, alkyler et hydrolyser les protéines par la trypsine « in-gel » a été décrit par Gaucher *et al* 2019, et Tarnaud *et al* 2020 (36, 38). Brièvement, il s'agit de traiter le morceau de gel à l'aide d'une solution réductrice des ponts disulfure, puis d'une solution d'alkylation des fonction SH libres, avant rinçage. Le morceau de gel est ensuite traité dans une solution de trypsine avant extraction des peptides produits.

Analyse en ElectroSpray (NanoLC/MS/MS)

Les peptides obtenus après trypsinolyse ont été séparés par chromatographie en phase inverse (RP-HPLC) à l'aide d'un système NanoLC Dionex-U3000-RSLC selon le protocole de *Gaucher et al* 2019, et *Tarnaud et al* 2020 (36, 38). Les peptides en sortie de colonne ont été ionisés par une source d'ionisation electrospray. Les spectres de masse ont été obtenus à l'aide d'un spectromètre de masse Qexactive quadripôle/orbitrap (Thermo Scientific) dans une gamme de 250 à 2000 m/z. L'identification des peptides a été effectuée contre la base de données Uniprot (Uniprot.org) (UP000304984 pour le *Lactobacillus delbrueckii* ssp *lactis* et UP000053612 pour le *Lactococcus lactis*). La limite de mesure de masse des peptides a été fixée à 10 ppm pour les spectres MS et à 0,05 Da pour les spectres MS/MS.

Analyses statistiques

L'analyse des écarts de variances et normalité des données ont été réalisées à l'aide du logiciel Rstudios. Les tests statistiques (ANOVA ou Kruskal-Wallis) ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism.

Résultats et Discussion

Cette étude a pour objectif de comprendre les interactions en *Lactococcus lactis* (Lla7116) et *Lactobacillus delbrueckii* ssp *lactis* (Ldl1585) dans le cadre d'une co-culture sur jus de soja. Pour cela, des cinétiques de croissances, accompagnées d'analyses biochimiques et protéomiques ont été réalisées. Pour réaliser ces analyses, nous avons commencé en préambule par déterminer les conditions de croissances optimales des deux souches étudiées sur milieu de laboratoire.

Détermination des conditions optimales de croissance sur milieu de laboratoire

Les cinétiques de croissance ont été réalisées pour chaque bactérie sur milieu de laboratoire à 30°C, 37°C et 43°C. En effet, ces températures correspondent aux températures optimales de croissance de ces deux bactéries : 30°C pour la souche Lla7116 et 43°C pour la souche Ldl1585 et d'une température intermédiaire entre ces deux limites.

Conditions de croissance de *Lactococcus lactis* sur M17 + glucose

Lactococcus lactis Lla7116 était capable de croître sur le milieu M17 + glucose 0,5% à 30°C, 37°C et 43°C de façon similaire comme le montre la Figure 2. En effet, les densités optiques (DO) observées étaient équivalentes entre les trois températures étudiées (figure 2A). Les DO maximales atteintes à 24h étaient ainsi de 2,5 à 30°C, contre 2,2 à 43°C. Les bactéries étaient sous forme de

chainettes de 2 à 4 cellules et avaient la même morphologie, quelle que soit la température (Figure 2B, C, D).

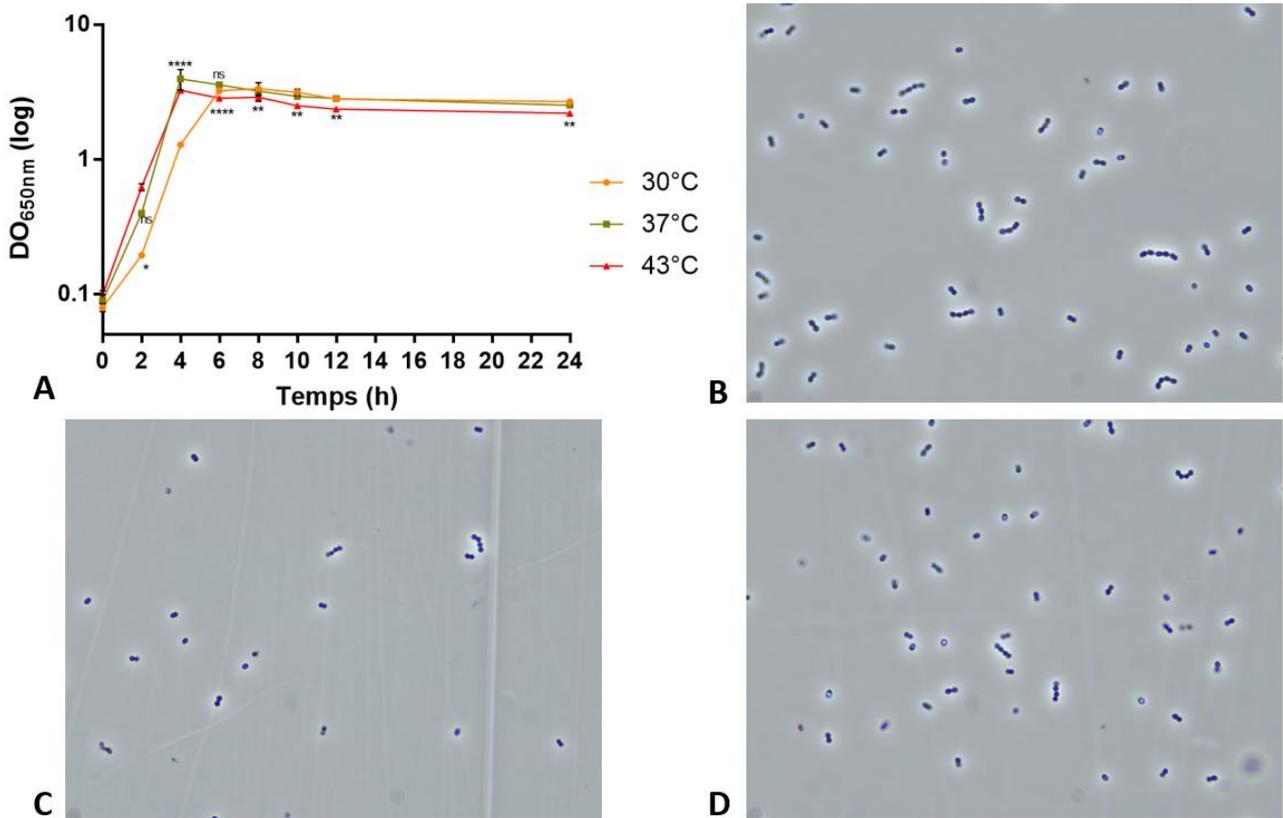


Figure 2 : A : Courbes de croissance pour la souche *Lactococcus lactis* Bioprox 7116 (LLa7116) à 30°C, 37°C et 43°C sur M17+glucose 0,5%. Observations microscopiques à t24, B : 30°C ; C 37°C ; D : 43°C. La souche a été inoculée à 2% (v/v). P-value (n=3) : **** < 0,001 ; ** < 0,01 ; * < 0,05 ; ns : non significatif. Les clichés ont été pris au grossissement x100.

Les dénombrements réalisés montrent que la population de LLa7116 était de même ordre de grandeur, $1,5 \cdot 10^9$ UFC/mL (Figure 3), après huit heures de culture pour les trois températures. En revanche, des différences de populations étaient observées après 24h de culture. La population de LLa7116 atteignait environ $2 \cdot 10^9$ UFC/mL à 30°C, tandis qu'elle n'était que de $4 \cdot 10^7$ UFC/mL à 43°C et intermédiaire à 37°C avec une valeur de $1 \cdot 10^7$ UFC/mL. Ces valeurs sont en accord avec le fait que la température de 30°C est la température de croissance optimale de nombreuses souches de *Lactococcus lactis* (39).

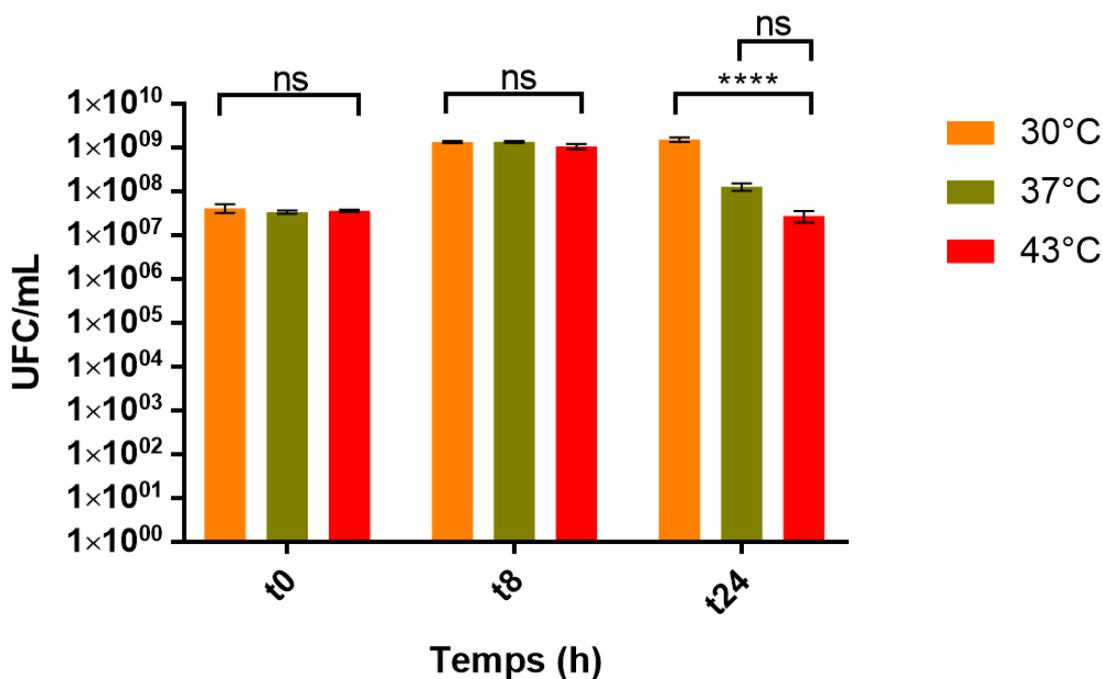


Figure 3 : Evolution de la population viable et cultivable de la souche Lla7116 à t0, t8 et t24 de culture sur milieu M17+glucose 0,5% en fonction de la température de culture, 30°C, 37°C et 43°C. La souche a été inoculée à 2% (v/v). P-value (n=3) : **** < 0,001 ; ns : non significatif

Enfin, les cinétiques d'acidification (Figure 4) montrent qu'un pH, d'environ 5,75, était atteint après six heures de culture à 30°C, tandis que cette valeur de pH était atteinte plus rapidement, après quatre heures de culture à 37 et 43°C, et restait stable jusqu'à 24 h de culture quelle que soit la température.

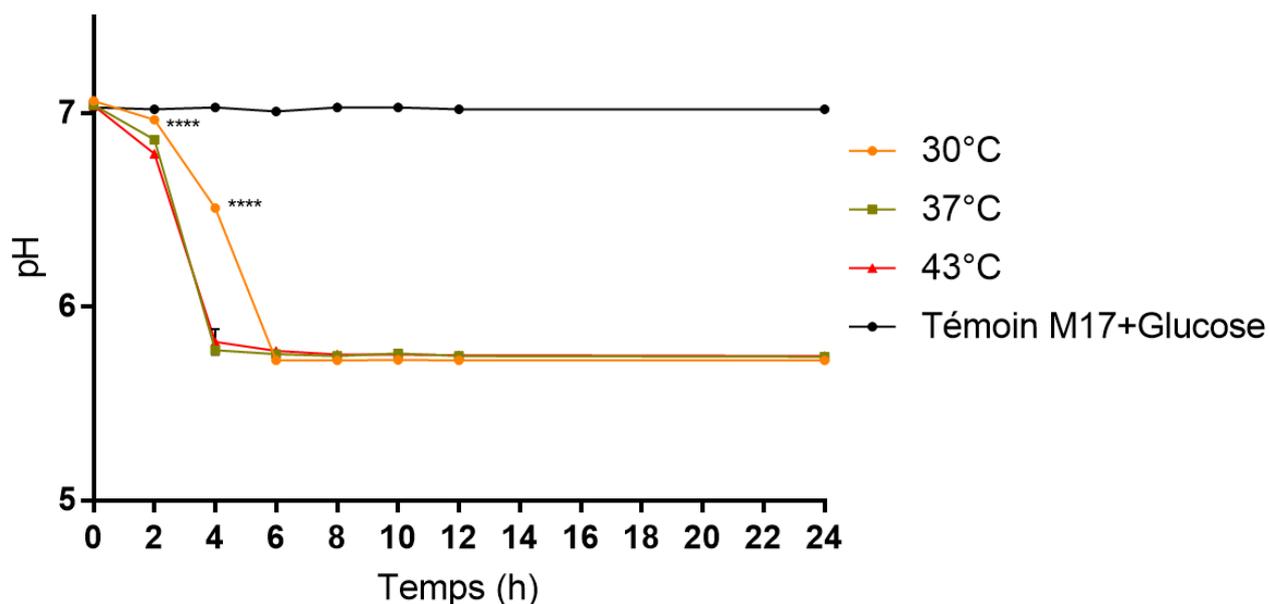


Figure 4 : Courbes de suivi d'acidification du M17+glucose 0,5% par la souche Lla7116 à 30°C, 37°C, 43°C. La souche a été inoculée à 2% (v/v). Le témoin M17+glucose 0,5% a été incubé dans les mêmes conditions que les cultures bactériennes, donc aux trois températures étudiées. P-value (n=3) : **** < 0,001. Seuls les points significativement différents sont indiqués.

Conditions de croissance du *Lactobacillus delbrueckii* ssp *lactis* sur MRS

Lactobacillus delbrueckii ssp. *lactis* Bioprox 1585 (Ldl1585) montre des différences de croissance sur milieu MRS entre les différentes températures étudiées (Figure 5A). En effet, la phase stationnaire était atteinte plus lentement quand la température diminuait avec un temps de 10h à 43°C, de 12h à 37°C, et non atteinte en 12h à 30°C. Les valeurs de densité optique à 24h variaient de la plus faible, DO=5, observée à 30°C à la plus élevée, DO=7, à 43°C et intermédiaire avec DO=6.3 pour 37°C. De plus, Les dénombrements réalisés montrent que la population de Ldl1585 à 24 heures était plus élevée à 30°C par rapport aux deux autres températures (Figure 6). Après huit heures de croissance, la population viable de Ldl1585 était d'environ 1.10^8 UFC/mL à 30°C, et plus haute à 37°C et 43°C, avec une population d'environ 5.10^8 UFC/mL. Après 24 heures de culture, la population viable de Ldl1585 a augmenté à 30°C, jusqu'à 9.10^8 UFC/mL, contre 5.10^8 UFC/mL à 37°C et 9.10^7 UFC/mL à 43°C. La morphologie des bactéries variait en fonction des températures d'incubation. Après 24 heures de culture à 30°C (figure 5B), les bactéries avaient une morphologie en forme de bacille droits, « en bâtonnets ». À 37°C (figure 5C), on observait toujours des bacilles avec la morphologie en bâtonnets, mais certaines bactéries prenaient des formes plus courbées et s'allongaient. Enfin, à 43°C (figure 5D), la majorité des bactéries observées avaient des morphologies très recourbées et étaient plus longues, et on observait des chaînes de bacilles.

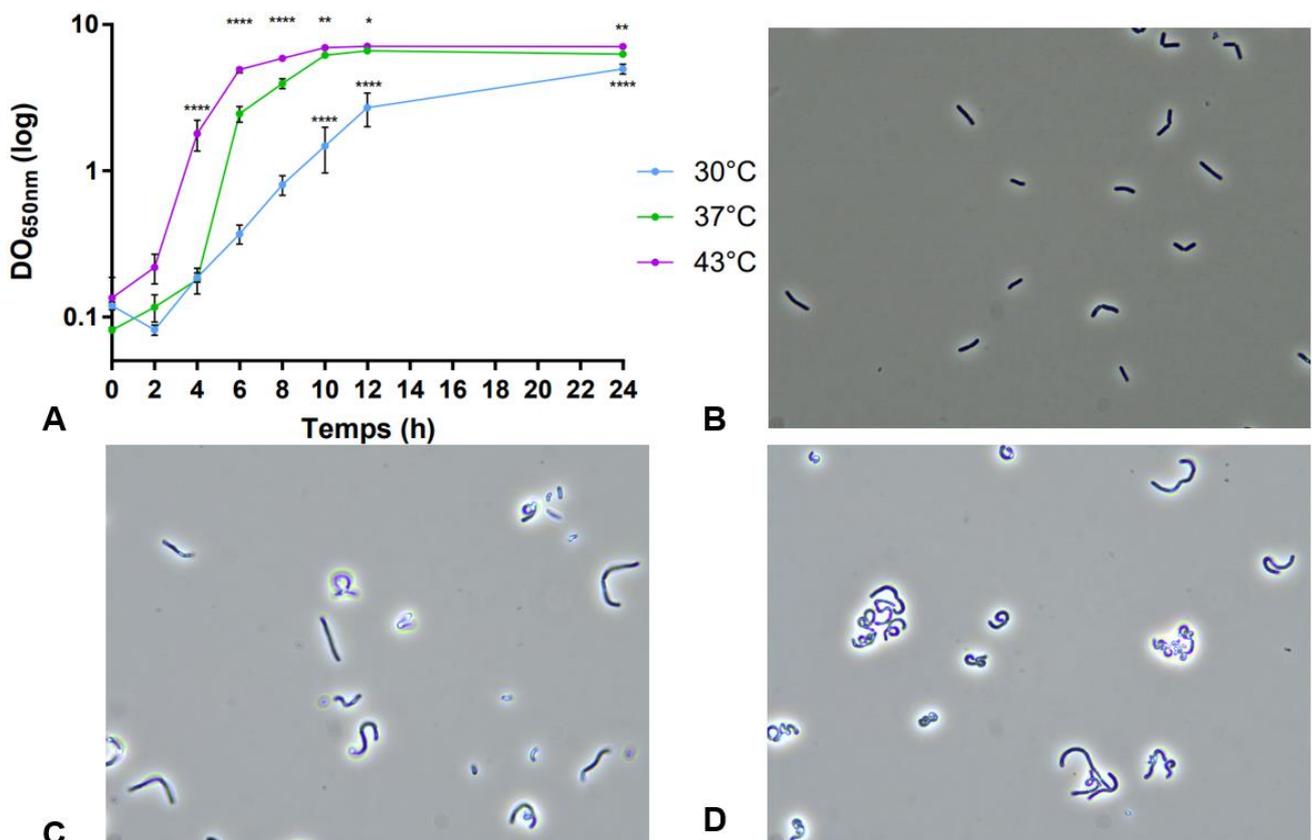


Figure 5 : A : Courbes de croissance pour la souche *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* Bioprox 1585 (Ldl1585) à 30°C, 37°C et 43°C sur MRS. Observations microscopiques à t24, B : 30°C ; C 37°C ; D : 43°C. La souche a été inoculée à 2% (v/v). P-value (n=3) : **** < 0,001 ; ** < 0,01 ; * < 0,05 ; Seuls les points significativement différents sont indiqués. Les clichés ont été pris au grossissement x100.

La population atteinte par Ldl1585 à 24 heures est plus élevée à 30°C par rapport aux deux autres températures (Figure 6). Après huit heures de croissance, La population viable de Ldl1585 était d'environ 1.10^8 UFC/mL à 30°C, tandis qu'on obtenait environ 5.10^8 UFC/mL à 37°C et 43°C. Après 24 heures de croissance, la population viable de Ldl1585 avait augmenté à 30°C, jusqu'à 9.10^8 UFC/mL, contre 5.10^8 UFC/mL à 37°C et 9.10^7 UFC/mL à 43°C.

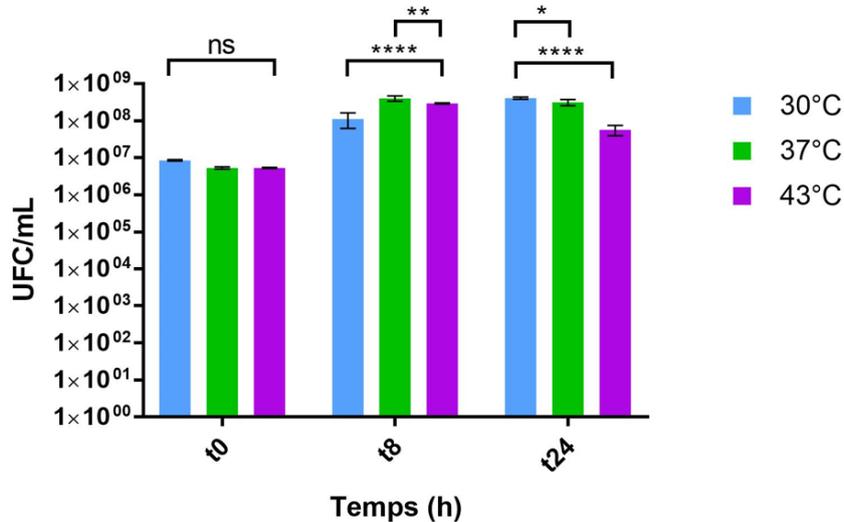


Figure 6 : Evolution de la population viable et cultivable de la souche Ldl1585 à t0, t8 et t24 de culture sur milieu MRS en fonction de la température de culture à 30°C, 37°C et 43°C.

La souche a été inoculée à 2% (v/v). P-value (n=3) : **** < 0,001 ; ** < 0,01 ; * < 0,05 ; ns : non significatif.

Finalement, la cinétique d'acidification (Figure 7) montre des résultats cohérents avec les mesures de densité optique. En effet, après 12 h de culture à 43°C le pH était d'environ 3,9, tandis qu'à ce même temps, le pH atteignait 4,1 à 37°C et 4,75 à 30°C. Le pH à 24 heures était de 4,1 à 30°C, contrairement aux cultures à 37°C et 43°C, pour lesquelles le pH était d'environ 3,9.

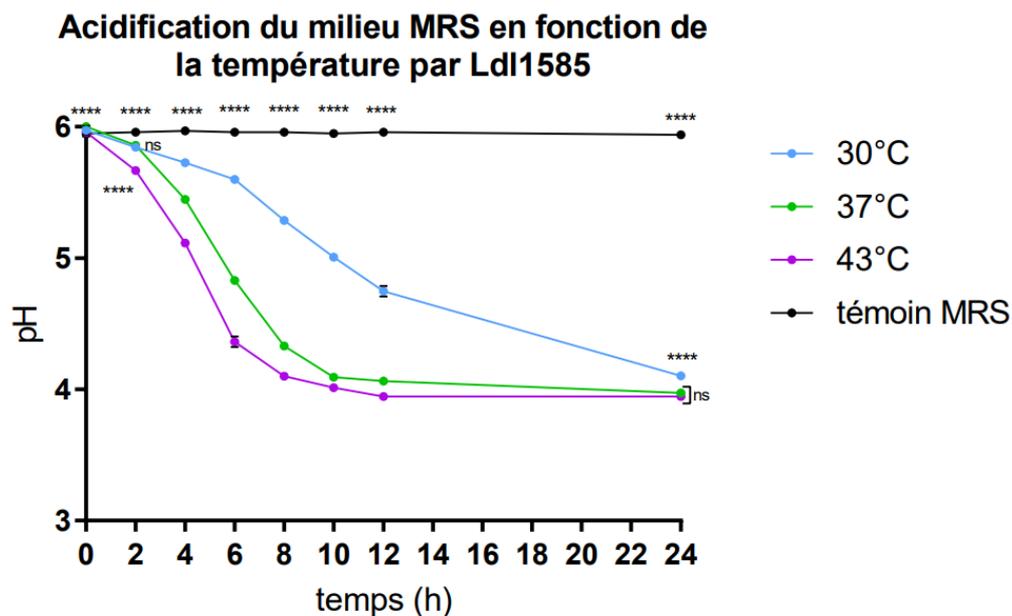


Figure 7 : Cinétiques d'acidification du M17+glucose 0,5% par la souche Lla7116 à 30°C, 37°C, 43°C.

La souche a été inoculée à 2% (v/v). Le témoin MRS a été incubé dans les mêmes conditions que les cultures bactériennes, donc aux trois températures étudiées. P-value (n=3) : **** < 0,001 ; ns : non significatif.

Pour la souche Ldl1585, la température optimale de croissance de 43°C permet une croissance plus rapide, ce qui se traduit par une acidification plus rapide du milieu MRS par rapport aux deux autres températures. La température de 43°C est dans la gamme de température de culture classiquement utilisée pour les lactobacilles (40), tandis qu'une croissance à 37°C est utilisée sur MRS (33). Néanmoins, à 43°C, une baisse de la population viable après 24 heures de culture a été observée, alors que ce phénomène n'a pas été observé à 37°C ou 30°C. Ceci pourrait être dû à une température trop élevée à 43°C, provoquant un stress thermique, en plus d'un stress acide (41–43). Inversement, la température de 30°C permet une croissance et une acidification plus lentes, mais sans perte de viabilité des bactéries (Figure 6).

Pour les deux souches, il s'avère que la température de 30°C était un bon compromis pour obtenir la croissance des deux souches Lla7116 et Ldl1585 avec un minimum de perte de viabilité et des vitesses d'acidification plus faible et comparable entre les deux souches. De plus, la souche Ldl1585 maintient une morphologie de bacille droit « en bâtonnet ». Cette température a donc été choisie pour évaluer des différences de croissance en culture pures et en co-culture sur le jus de soja.

Etude de croissance des souches Lla7116 et Ldl1585 en culture pure et en co-culture sur jus de soja

Le jus de soja empêche la croissance de Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis Bioprox 1585 en culture pure mais pas en co-culture, tandis que Lactococcus lactis Bioprox 7116 est capable de croître dans les deux cas

Afin d'étudier le comportement de Ldl1585 et Lla7116 sur jus de soja, des cultures pures des deux souches étudiées ont été réalisées, à 30°C.

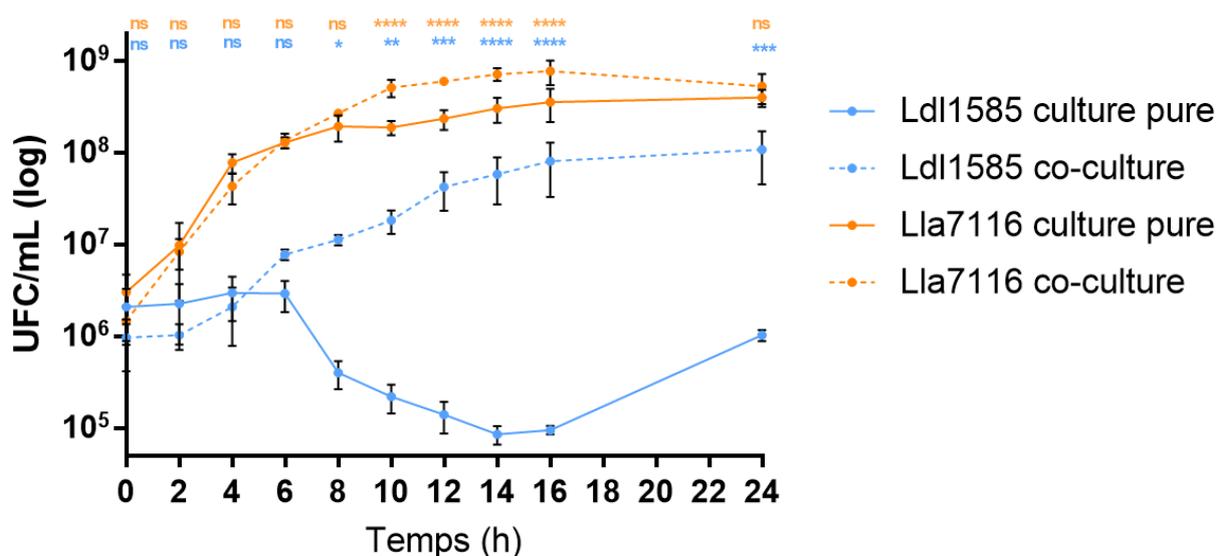


Figure 8 : Croissance des souches Ldl1585 et Lla7116 sur jus de soja en cultures pures ou en co-cultures à 30°C.

Les souches ont été inoculées de façon à être à 10⁶ UFC/mL à t₀. Les analyses statistiques ont été réalisées pour chaque souche séparément. P-value (n=3) : **** < 0,001 ; *** < 0,005 ; ** < 0,01 ; * < 0,05 ; ns : non significatif

Les cinétiques de croissance en cultures pures ou en co-culture montrent des différences de croissance pour la souche Ldl1585 (Figure 8). En effet, elle n'était pas capable de se développer en culture pure, et la population viable avait même tendance à décroître, passant de $2 \cdot 10^6$ UFC/mL à t6 à $1 \cdot 10^5$ UFC/mL à t16. Au contraire, la souche Ldl1585 était capable de croître en co-culture, passant d'environ $8 \cdot 10^6$ UFC/mL à t6 à environ $1 \cdot 10^8$ UFC/mL à t16. Pour la souche Lla7116, une croissance a été observée en culture pure et en co-culture (Figure 8). Le comportement de la souche était similaire entre les deux conditions, avec une population viable à t16 plus élevée en co-culture, environ $1 \cdot 10^9$ UFC/mL et en culture pure, environ $6 \cdot 10^8$ UFC/mL. Pour la culture pure de Lla7116, la croissance était plus lente sur jus de soja par rapport au milieu M17+glucose, la population maximum étant atteinte après environ 14 heures de fermentation sur jus de soja contre après six heures de culture sur M17+glucose 0,5%

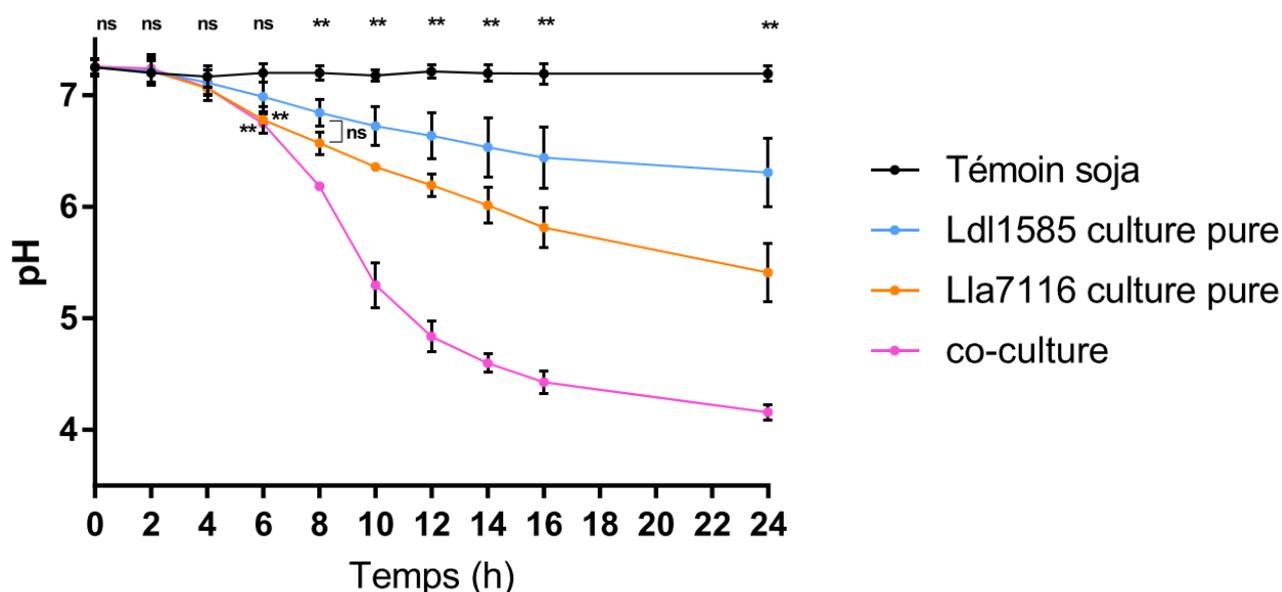


Figure 9 : Courbes d'acidification du jus de soja par les souches Lla7116 et Ldl1585 en cultures pures et en co-culture à 30°C. Les souches ont été inoculées de façon à être à 10^6 UFC/mL à t0. Le témoin soja a été incubé dans les mêmes conditions que les cultures bactériennes. P-value (n=3) : ** < 0,01 ; ns : non significatif

De plus, l'acidification du jus de soja (Figure 9) souligne bien l'interaction positive entre les deux souches. En effet, le pH dans la co-culture à t24 était d'environ 4, tandis qu'il était d'environ 5,5 pour la culture de Lla7116 et de 6,3 pour la culture de Ldl1585. En co-culture, le pH minimum qui était observé sur milieu de laboratoire pour la souche Lla7116 (5,75) a été atteint entre huit et dix heures de croissance, mais la population ne chutait pas après 24 heures de fermentation en co-culture (environ $8 \cdot 10^8$ UFC/mL) malgré un pH bien plus bas qu'en culture pure. Les résultats pour la souche Ldl1585 sont surprenants car cette souche est capable d'hydrolyser les sucres principaux de soja (16). La souche Lla7116, elle, est capable de se développer en culture pure, alors qu'elle n'est capable d'utiliser que le saccharose (16).

Lactobacillus delbrueckii ssp. *lactis* est capable d'hydrolyser les sucres majoritaires du jus de soja, *Lactococcus lactis* n'est capable de métaboliser que le saccharose comme glucide complexe

Les analyses des sucres présents dans le jus de soja avant et après fermentation ont montré que la souche Ldl1585 était capable d'hydrolyser les sucres présents dans le jus de soja (saccharose, raffinose, stachyose) (Figure 10). En effet, les concentrations en raffinose et stachyose dans le jus de soja (respectivement environ 2 mmole/L et environ 5 mmole/L) ont diminués respectivement d'un facteur 4 et de 2 après fermentation par la souche Ldl1585 lorsqu'elle est inoculée à 10^8 UFC/ml en culture pure pour être au même niveau de population qu'en co-cultures (respectivement environ 0,5 mmole/L et environ 2 mmole/L).

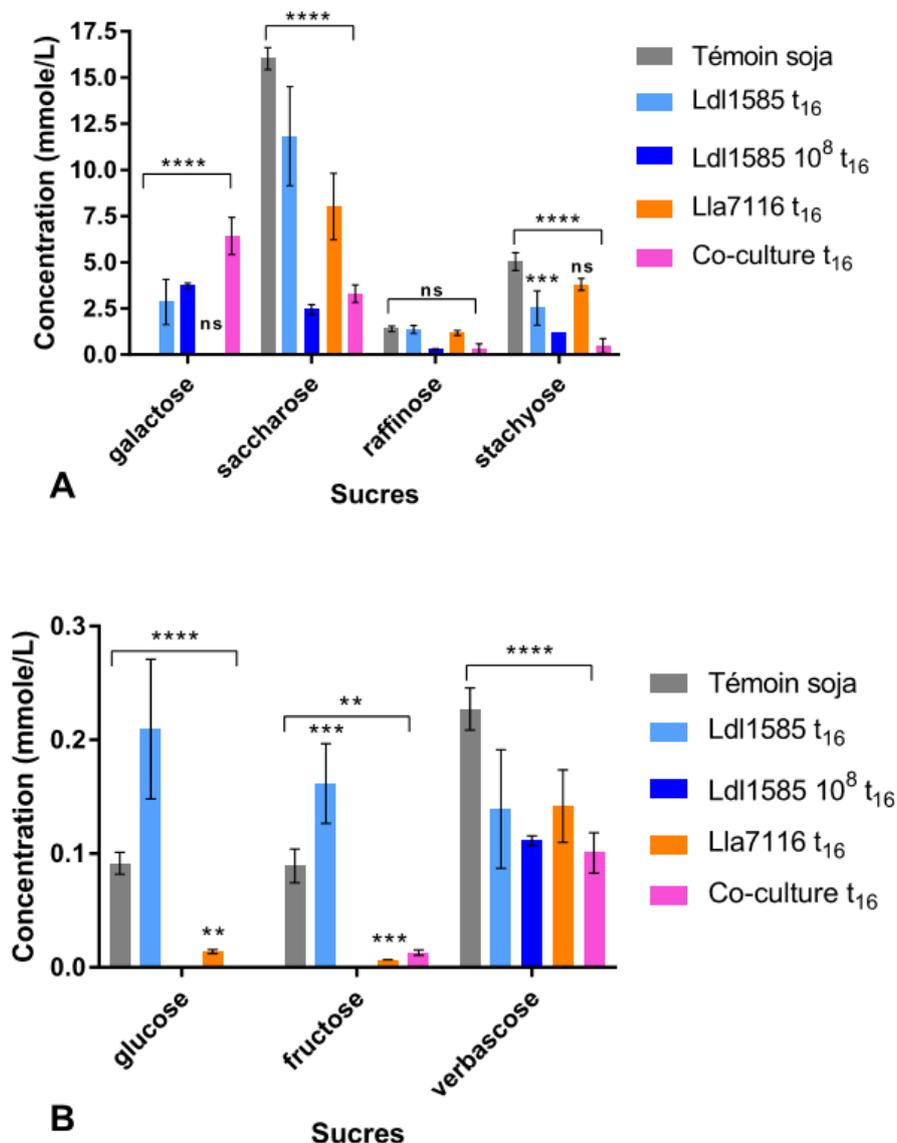


Figure 10 : Concentration en différents sucres dans le jus de soja après 16 heures de fermentation par les souches Ldl1585 et Lla7116 à 30°C.

A : galactose, saccharose, raffinose, stachyose et B : glucose, fructose, verbascose. Les souches ont été inoculées de façon à être à 10^6 UFC/mL à t_0 . Le témoin soja a été incubé dans les mêmes conditions que les cultures bactériennes. P-value (n=3 et co-culture t_{16} n=2) : **** < 0,001 ; *** < 0,005 ; ** < 0,01; ns : non significatif. Une inoculation de Ldl1585 à 10^8 (correspondant à la population de Ldl1585 à t_{16} en co-culture) a été effectuée afin d'observer les effets sur le milieu du Ldl1585 en culture pure.

En effet, les lactobacilles de l'espèce *delbrueckii* possèdent des α -galactosidases, permettant d'hydrolyser les liaisons α -1 \rightarrow 6 des oligosaccharides (44). La souche Ldl1585 a également été capable d'hydrolyser le saccharose présent dans le jus de soja (environ 16 mmole/L), cette concentration était d'environ 12 mmole/L après croissance du Ldl1585 inoculé à 10^6 UFC/mL et d'environ 2,5 mmole/L après croissance du Ldl1585 inoculée à 10^8 UFC/mL. En revanche, la souche Lla7116 n'était pas capable d'hydrolyser le stachyose et le raffinose (respectivement environ 2 mmole/L et environ 5 mmole/L pour le témoin soja ou la culture de Lla7116). Elle était néanmoins capable d'hydrolyser le saccharose, passant de 16 mmole/L dans le jus de soja à 8 mmole/L après 16 heures de fermentation par Lla7116. En effet, les bactéries du genre *Lactococcus* espèces *lactis* ont une faible proportion de souches capables d'hydrolyser les α -galactosides, sept souches positives sur les 30 testées (15). Les bactéries lactiques sont par contre capables d'internaliser le saccharose par un système PTS (phosphotransferase system) spécifique (45). Ainsi, la souche Lla7116 consommerait le saccharose présent dans le jus de soja, tandis que la souche Ldl1585 hydrolyserait le stachyose, le raffinose et le verbascose grâce à son activité α -galactosidase, et le saccharose par une β -fructosidase (15). Ces hydrolyses permettent finalement la production de glucose, fructose, consommés par les deux souches étudiées et de galactose consommé par Lla7116.

Un changement de métabolisme chez *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Lactis* et *Lactococcus lactis* se produit en co-culture

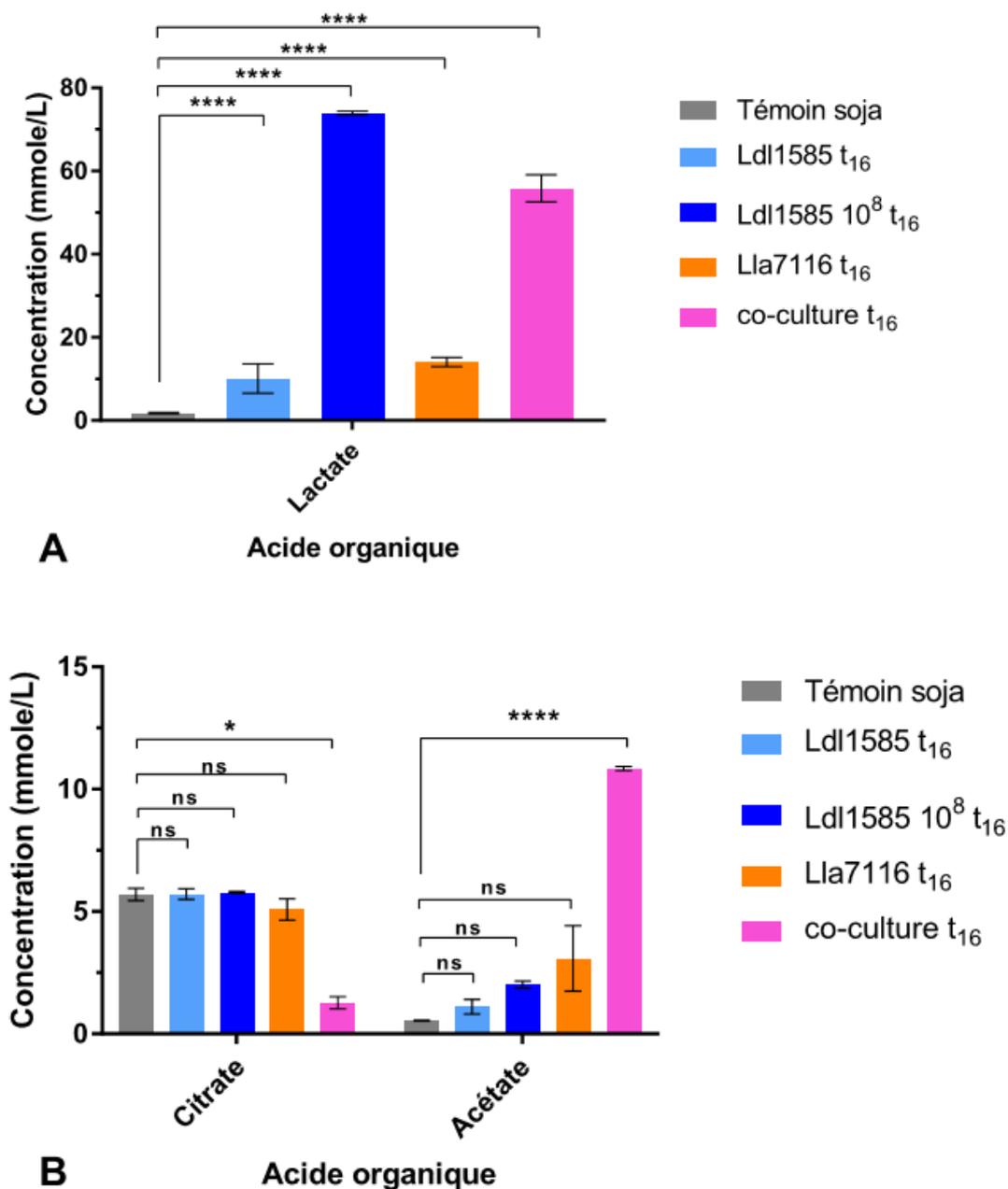


Figure 11 : Concentration en (A) lactate, (B) citrate et acétate après 16 heures de fermentation du jus de soja par les bactéries *Ldl1585* et *Lla7116* en cultures pures et en co-culture à 30°C. Les souches ont été inoculées de façon à être à 10⁶ UFC/mL à t₀. Le témoin soja a été incubé dans les mêmes conditions que les cultures bactériennes. P-value (n=3 et co-culture t₁₆ n=2) : **** < 0,001 ; *** < 0,005 ; ** < 0,01; ns : non significatif. Une inoculation de *Ldl1585* à 10⁸ (correspondant à la population de *Ldl1585* à t₁₆ en co-culture) a été effectuée afin d'observer les effets sur le milieu du *Ldl1585* en culture pure.

C'est notamment le cas pour la souche *Ldl1585*, où la consommation du glucose observée précédemment permettait la production de lactate (environ 75 mmole/L). La souche *Lla7116*, elle, ne produisait que peu de lactate, ce qui pourrait indiquer que la fermentation lactique n'avait peu ou pas lieu ; il a été démontré que *L. lactis* était capable de fermenter le citrate, en lien avec la production de lactate (46). *L. lactis* serait donc capable de faire une fermentation mixte, mêlant fermentation du citrate et fermentation du glucose pour produire du lactate et de l'acétate (47). Au

sein de la co-culture, la présence de Lla7116, qui est aérobie facultative, pourrait permettre de limiter l'oxygène dans le jus de soja, permettant la mise en place d'un environnement favorable à la fermentation lactique pour Ldl1585. En revanche, lors de la co-culture, la consommation de citrate était importante (environ 5,5 mmole/L dans le jus de soja, diminuant à environ 2 mmole/L en co-culture), et la production d'acétate avait largement augmenté (environ 1 mmole/L dans le jus de soja, augmentant à 11 mmole/L en co-culture). Cela pourrait être dû à une activité pyruvate kinase décrite chez *L. delbrueckii* (48), où l'O₂ est utilisé avec le pyruvate pour produire de l'acétylphosphate pour produire de l'ATP et de l'acétate. Cette protéine a été retrouvée dans le protéome de *L. delbrueckii* ssp. *lactis* lors de l'essai d'analyse protéomique (partie analyse protéomique des résultats). De plus, *L. lactis* est capable de convertir le pyruvate en acétoïne, en diacétyl et en 2,3-butanediol (48). L'acétoïne peut être utilisé par le lactobacille pour produire du butanediol, un précurseur de certains acides aminés. Ce métabolisme intervient notamment dans la réponse à une carence en carbone (49). Ces hypothèses s'appliqueraient à la co-culture, où les sources de carbones sont partagées entre les deux bactéries, il pourrait donc y avoir un phénomène de compétition. Ainsi, la fermentation lactique pourrait ne s'établir qu'après un certain temps de fermentation, avec au début de fermentation une croissance de Lla7116 qui permettrait de diminuer de la concentration en oxygène. Pendant ce temps, Ldl1585 produirait de l'acétate à partir du pyruvate, et commencerait la fermentation lactique dès que la concentration en O₂ aurait suffisamment baissé. Ce pyruvate serait fourni par Lla7116, qui utilise le citrate. Il serait possible de réitérer ces expériences en mesurant la teneur en O₂ et CO₂ au cours du temps afin d'affiner cette hypothèse.

Lactobacillus delbrueckii ssp. *lactis* est capable de libérer une large variété d'acides aminés dans le jus de soja fermenté, favorisant la croissance de *Lactococcus lactis*.

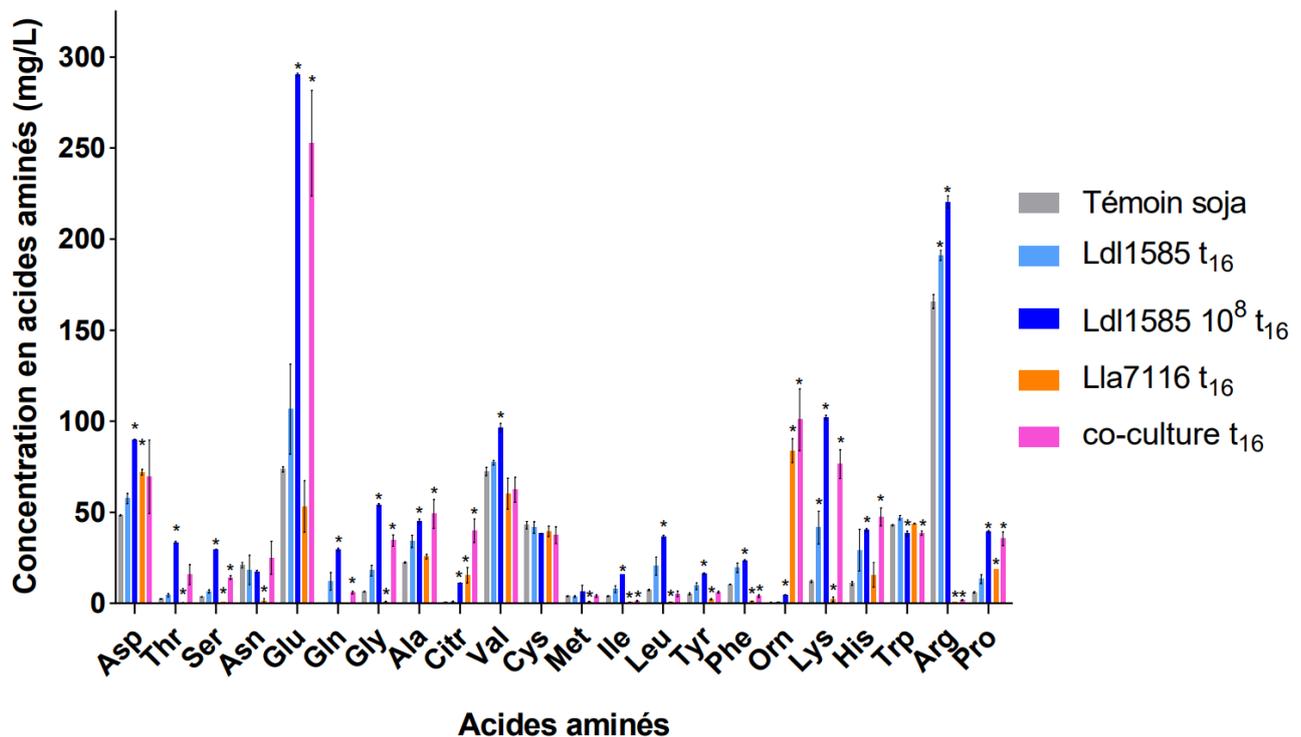


Figure 12 : Concentration en différents acides aminés après fermentation du jus de soja par Lla7116 et Ldl1585. Les souches ont été inoculées de façon à être à 10^6 UFC/mL à t_0 . Le témoin soja a été incubé dans les mêmes conditions que les cultures bactériennes. P-value ($n=3$) : * < 0,05 ; seuls les résultats significatifs sont montrés. Pour le glutamate, la quantité est sous-évaluée. Une inoculation de Ldl1585 à 10^8 (correspondant à la population de Ldl1585 à t_{16} en co-culture) a été effectuée afin d'observer les effets sur le milieu du Ldl1585 en culture pure.

Les bactéries lactiques sont généralement auxotrophes pour certains acides aminés tels que la leucine, l'isoleucine, la valine, l'arginine ou la méthionine. Sur ces cinq acides aminés, seule l'arginine est en quantité élevée dans le jus de soja (figure 12) (environ 170 mg/L). La souche Ldl1585 semblait capable de libérer par protéolyse tous les acides aminés étudiés ; cela est probablement dû au système protéolytique important de cette souche ; en effet, la souche Ldl1585 a été sélectionnée lors d'un criblage précédent car elle était capable de protéolyser des isolats de protéines de soja (16). En revanche, la souche Lla7116 n'était pas capable de protéolyser la majorité de ces protéines. Une confirmation de l'activité protéolytique de la souche Ldl1585 et de l'absence d'activité par Lla7116 est donnée Figure 13 avec le profil électrophorétique des protéines de soja au cours de la fermentation par Ldl1585, Lla7116 ou la co-culture. Sur ce gel, seuls les puits avec la souche Ldl1585 inoculée à 10^8 UFC/ml et en co-culture montrent une diminution de la quantité de quelques protéines de soja, indiquées par ★.

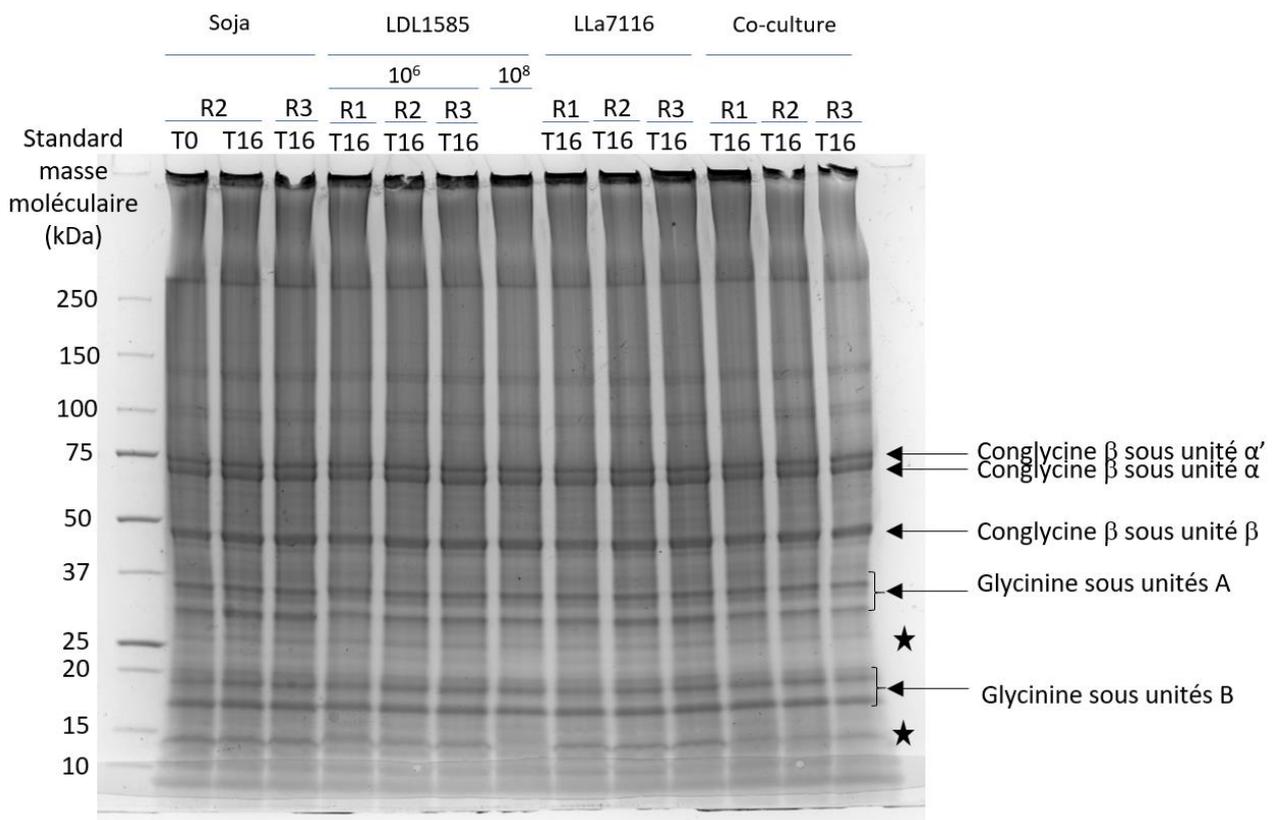


Figure 13 : Profil électrophorétique des protéines de soja avant et après 16 h de fermentation du jus de soja par *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* Bioprox 1585, *Lactococcus lactis* Bioprox 7116 et la co-culture des deux bactéries, à 30°C.

Les protéines (24 µg déposés/puits) ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE 4-15% d'acrylamide (gel Criterion TGX Bio-Rad) selon le protocole de Laemmli (37). R1, R2 et R3 correspondent à des répliques biologiques; T0 et T16 aux temps de fermentation 0 et 16h; 10⁶ et 10⁸ correspondent à la population bactérienne présente dans les cultures pures du lactobacille, exprimée en UFC/mL; ★ : zone d'hydrolyse des protéines par le lactobacille seul ou en coculture. Références des protéines de soja selon Shirovani et al, 2021 (50) et Li et al, 2016 (51).

Néanmoins, la souche LLa7116 est capable de se développer en culture pure car elle utilise les acides aminés présents initialement dans le jus de soja (Figure 12). La présence de peptides dans le jus de soja (52) pourrait être aussi une source d'azote que LLa7116 pourrait utiliser pour se fournir en acides aminés pour lesquels elle est auxotrophe. En co-culture, les peptides issus de la protéolyse des protéines de soja par Ldl1585 pourraient être également utilisés par la souche LLa7116. Les résultats obtenus montrent également une production de citrulline (citr, environ 25 mg/L) et d'ornithine (orn, environ 80 mg/L) dans la culture pure de LLa7116 et dans la co-culture. Ces deux acides aminés sont produits par le système arginine déiminase (53). Ce système permet l'hydrolyse de l'arginine par l'enzyme ADI (arginine déiminase) (retrouvée dans le protéome de *L. lactis* lors de l'essai d'analyse protéomique (partie analyse protéomique des résultats)), qui va donner de la citrulline et de l'ammoniac NH₃; La citrulline est convertie en ornithine et en carbamyl-phosphate par l'enzyme OTC (ornithine transcarbamylase), également retrouvée dans le protéome de LLa7116. L'ornithine va alors être exportée par un antiport arginine-ornithine, tandis que le carbamyl-

phosphate va être converti en NH_3 et CO_2 . Le phosphate va permettre de produire un ATP à partir d'un ADP (54). Cela permet de lutter contre un stress acide en consommant des ions H^+ (49).

Ces différents résultats biochimiques nous permettent de comprendre en partie quels types d'interaction ont lieu entre *L. lactis* et le *L. delbrueckii* ssp. *Lactis*. La souche de Lla7116 fournirait du pyruvate et de l'acétoïne à la souche Ldl1585, en plus de permettre la mise en place d'une anaérobiose au moins partielle, favorable au lactobacille. D'un autre côté, Ldl1585 fournirait des peptides et des acides aminés pour lesquels Lla7116 est auxotrophe. Ldl1585 pourrait également fournir du saccharose et du galactose en hydrolysant le stachyose et le raffinose. Ainsi, l'interaction entre les deux bactéries serait de type mutualisme, cas où les deux bactéries tirent un bénéfice l'une de l'autre. Néanmoins, des analyses complémentaires sont nécessaires pour comprendre plus en profondeur cette interaction. Il serait possible de réitérer les analyses biochimiques en y ajoutant plusieurs temps, comme notamment le t_{10} , qui correspond à la phase de ralentissement de la croissance de Lla7116. Cela permettrait de mieux évaluer comment les souches sont capables de moduler leur métabolisme selon leur stade de croissance. Il serait également possible de rechercher si des acides organiques comme le pyruvate, ou des composés organiques tels l'acétoïne ou le diacétyl, sont produits afin de confirmer l'intervention du métabolisme du citrate. Une analyse de l'indice de protéolyse par dosage des groupements NH_2 libres permettrait de comprendre plus précisément le niveau de protéolyse des protéines de soja par les deux souches étudiées. Enfin, une analyse du protéome de Lla7116 et Ldl1585 en culture pure et en co-culture permettrait de mieux comprendre les changements provoqués par la croissance sur jus de soja, en plus de confirmer ou non les hypothèses faites précédemment.

Les protéines de soja sont en concentration trop élevée par rapport aux protéines bactériennes, masquant ces dernières

Afin d'étudier le protéome des souches de *L. lactis* et de *L. delbrueckii* ssp. *lactis* en culture pure et en co-culture, une première étape a été d'éliminer les protéines de soja restantes après la fermentation par les deux bactéries lactiques. Nous avons en effet vu que peu de protéines de soja étaient hydrolysées par les bactéries pendant la fermentation (Figure 13). Pour cela plusieurs stratégies ont été mises en œuvre. Une première stratégie était de centrifuger le jus de soja avant fermentation afin d'éliminer les protéines insolubles dès le départ. Cela ne changeait en rien la croissance des deux bactéries en co-culture (données non montrées). Pour les lavages, la dilution au 1/5^{ème} du soja fermenté dans de l'eau citratée 1M à 32000 x g, 4°C pendant 15 minutes permettait d'éliminer une majorité des protéines de soja. Le culot obtenu était ensuite lavé dans la solution de Tris-EDTA (0,1M et 1 mM) et au PBS 1X (12000 x g, 10 minutes, température ambiante) permettait d'obtenir un culot bactérien, mais sans pour autant éliminer la totalité des protéines de soja (données non montrées). Ainsi, la réalisation d'une étude protéomique des souches Lla7116 et Ldl1585 en

culture pure ou en co-culture est possible, à condition que la concentration en protéines de soja ne soit pas trop élevée par rapport à la concentration en protéines bactériennes. Après élimination des protéines de soja selon les stratégies décrites ci-dessus, il sera possible de réaliser une étude protéomique, en faisant une liste d'exclusion dédiée aux protéines de soja pour ne focaliser que sur les peptides correspondants aux protéines bactériennes.

Une analyse protéomique est possible sur une co-culture de deux bactéries lactiques malgré une différence de niveau de population entre les deux

Un autre obstacle à l'analyse protéomique de la co-culture entre Lla7116 et Ldl1585 est la différence de population entre les deux bactéries. En effet, les résultats des dénombrements vus précédemment ont montré qu'il y a un log de différence entre le nombre d'UFC/mL de Lla7116 (environ 10^9 UFC/mL) et Ldl1585 (environ 10^8 UFC/mL) en condition de co-culture. Des analyses protéomiques ont déjà été réalisées sur des co-cultures (55), mais le fait que les deux bactéries étudiées soient en concentrations différentes et proches génétiquement pourrait empêcher une analyse du protéome d'une co-culture. Afin de vérifier la faisabilité de cette étude, une analyse protéomique, préliminaire à l'étude sur jus de soja, a été réalisée sur des mélanges de différents ratios de Ldl1585 et Lla7116, obtenus à partir de culture pur sur milieu de laboratoire (MRS pour Ldl1585 et M17+glucose 0,5% pour Lla7116). Ces cultures ont été mélangées pour obtenir les ratio Ldl1585:Lla7116 voulus, puis centrifugées et les culots lavés comme détaillé précédemment (partie lavage des culots bactériens à partir des cultures sur milieux de laboratoire du Matériels et Méthodes).

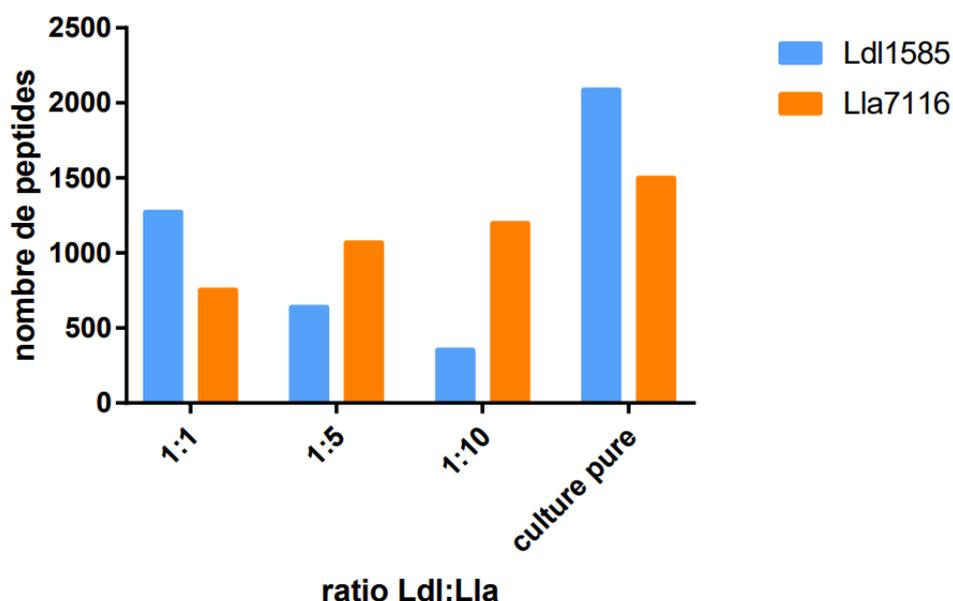


Figure 14 : Nombre de peptides détectés pour chaque souche mélangée à différents ratios par spectrométrie de masse NanoLC-MS/MS.

Seules les protéines pour lesquelles 5 peptides minimum ont été détectés pour une souche et 0 pour l'autre ont été pris en compte. Nombre de protéines totales détectées : 1359, pour Lla7116 : 701, pour Ldl1585 : 658. En appliquant le critère de sélection précédent, nombre de protéines totales attribuées à Lla7116 : 166 et à Ldl1585 : 222.

Les résultats obtenus montrent que des peptides appartenant à des protéines de Ldl1585 étaient détectés peu importe le ratio considéré : environ 1300 peptides avec le ratio Ldl1585:Lla7116 de 1:1, contre 350 peptides pour le ratio 1:10. Pour Ldl1585, 658 protéines ont été prédites, et 1775 peptides ont été détectés aux ratio 1:10, 2486 peptides au ratio 1:5 et 3822 peptides au ratio 1:1. Le nombre de peptides détectés pour des protéines attribuées à Lla7116 augmentait quand sa concentration par rapport à celle de Ldl1585 augmentait. Pour Lla7116, 701 protéines ont été prédites, et 3144 peptides ont été détectés pour le ratio 1:1, 3486 peptides pour le ratio 1:5, 5000 peptides pour le ratio 1:10. L'analyse par spectrométrie de masse en tandem pourrait donc être réalisable et il serait possible d'attribuer des peptides spécifiques appartenant à des protéines de Ldl1585 même si sa teneur est 10 fois plus faible dans la co-culture, par rapport à la teneur en Lla7116.

Conclusion et perspectives

Les résultats obtenus lors de cette étude ont permis de mettre en évidence une interaction positive entre deux souches de bactéries lactiques, *Lactococcus lactis* Bioprox 7116 et *Lactobacillus delbrueckii* ssp *lactis* Bioprox 1585 au cours de la co-fermentation de jus de soja. Une interaction de type mutualisme semble s'établir entre les deux souches, où la première fournirait du pyruvate et de l'acétoïne, et permettrait la mise en place d'une anaérobiose, favorisant la croissance de la deuxième. *L. delbrueckii* ssp *lactis* hydrolyserait les galacto-oligosaccharides présents dans le jus de soja, libérant du galactose, assimilable par *Lactococcus lactis*. *L. delbrueckii* ssp *lactis* fournirait également des acides aminés et des peptides provenant de la protéolyse des protéines de soja. Cette étude permet donc de confirmer l'intérêt d'une co-culture de ces deux bactéries lactiques dans le cadre de la conception de produits fermentés à base de jus de soja. L'impact positif démontré de *Lactococcus lactis* sur *Lactobacillus delbrueckii* ssp *lactis* permet d'obtenir un produit fermenté pauvre en α -galactosides, responsables d'inconforts digestifs. Ces premiers résultats permettent donc de mettre en avant l'utilisation de bactéries lactiques pour fermenter une base végétale, sans aucun ajout d'additif, de texturant ou d'arômes pour créer un produit s'inscrivant dans un contexte de transition alimentaire vers une alimentation plus équilibrée. Les propriétés immunomodulatrices des souches de ferments ayant été établies lors du criblage préliminaire de ces souches (16), ces résultats ouvrent également des perspectives de développement de produits fermentés probiotiques innovants.

Références bibliographiques

1. Gaudot C, Vedeau F, Bardon É. 2019. Diversification de la ressource protéique en alimentation humaine et animale. Etat des lieux et perspectives. Rapport n°18079. Conseil général de l'alimentation de l'agriculture et des espaces urbains.
2. Aiking H, de Boer J. 2020. The next protein transition. *Trends Food Sci Technol* 105:515–522.
3. FAO. 2017. Livestock solutions for climate change. <https://www.fao.org/3/i8098e/i8098e.pdf>.
4. Ritchie H, Roser M, Rosado P. 2020. CO₂ and greenhouse gas emissions. <https://ourworldindata.org/co2-and-greenhouse-gas-emissions>.
5. Didinger C, Thompson H. 2020. Motivating pulse-centric eating patterns to benefit human and environmental well-being. *Nutrients* 12:3500.
6. Ferreira H, Vasconcelos M, Gil AM, Pinto E. 2021. Benefits of pulse consumption on metabolism and health: A systematic review of randomized controlled trials. *Crit Rev Food Sci Nutr* 61:85–96.
7. Saraf-Bank S, Esmailzadeh A, Faghihimani E, Azadbakht L. 2015. Effect of non-soy legume consumption on inflammation and serum adiponectin levels among first-degree relatives of patients with diabetes: A randomized, crossover study. *Nutrition* 31:459–465.
8. Martínez-Villaluenga C, Frias J, Vidal-Valverde C. 2008. α -galactosides: antinutritional factors or functional ingredients? *Crit Rev Food Sci Nutr* 48:301–316.
9. Harper AR, Dobson RCJ, Morris VK, Moggré G. 2022. Fermentation of plant-based dairy alternatives by lactic acid bacteria. *Microb Biotechnol* 15:1404–1421.
10. Roland WSU, Pouvreau L, Curran J, van de Velde F, de Kok PMT. 2017. Flavor aspects of pulse ingredients. *Cereal Chem* 94:58–65.
11. Guillon F, Champ MM-J. 2002. Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *Br J Nutr* 88:293–306.
12. Craig WJ, Fresán U. 2021. International analysis of the nutritional content and a review of health benefits of non-dairy plant-based beverages. *Nutrients* 13:842.
13. Boeck T, Sahin AW, Zannini E, Arendt EK. 2021. Nutritional properties and health aspects of pulses and their use in plant-based yogurt alternatives. *Comp Rev Food Sci Food Safe* 20:3858–3880.
14. Harlé O, Falentin H, Niay J, Valence F, Courselaud C, Chuat V, Maillard M-B, Guédon É, Deutsch S-M, Thierry A. 2020. Diversity of the metabolic profiles of a broad range of lactic acid bacteria in soy juice fermentation. *Food Microbiology* 89:103410.
15. Canon F, Mariadassou M, Maillard M-B, Falentin H, Parayre S, Madec M-N, Valence F, Henry G, Laroute V, Daveran-Mingot M-L, Cocaign-Bousquet M, Thierry A, Gagnaire V. 2020. Function-driven design of lactic acid bacteria Co-cultures to produce new fermented food associating milk and lupin. *Front Microbiol* 11:584163.
16. Illikoud N, do Carmo FLR, Daniel N, Jan G, Gagnaire V. 2023. Development of innovative fermented products by exploiting the diversity of immunomodulatory properties and fermentative activity of lactic and propionic acid bacteria. *Food Res Int* 166:112557.
17. Markakiou S, Gaspar P, Johansen E, Zeidan AA, Neves AR. 2020. Harnessing the metabolic potential of *Streptococcus thermophilus* for new biotechnological applications. *Curr Opin Biotechnol* 61:142–152.
18. Chopin A. 1993. Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12:21–37.
19. Morishita T, Deguchi Y, Yajima M, Sakurai T, Yura T. 1981. Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *J Bacteriol* 148:64–71.
20. Pritchard GG, Coolbear T. 1993. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 12:179–206.

21. Juillard V, Furlan S, Foucaud C, Richard J. 1996. Mixed cultures of proteinase-positive and proteinase-negative strains of *Lactococcus lactis* in milk. *Journal of Dairy Science* 79:964–970.
22. Canon F. 2021. Favoriser les interactions positives entre bactéries lactiques : vers de nouvelles applications alimentaires. Thèse. Institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement, Agrocampus ouest, Rennes.
23. Canon F, Briard-Bion V, Jardin J, Thierry A, Gagnaire V. 2022. Positive interactions between lactic acid bacteria could be mediated by peptides containing branched-chain amino acids. *Front Microbiol* 12:793136.
24. 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. *Front Microbiol* 11:2088.
25. García C, Rendueles M, Díaz M. 2019. Liquid-phase food fermentations with microbial consortia involving lactic acid bacteria: A review. *Food Res Int* 119:207–220.
26. D'Souza G, Shitut S, Preussger D, Yousif G, Waschina S, Kost C. 2018. Ecology and evolution of metabolic cross-feeding interactions in bacteria. *Nat Prod Rep* 35:455–488.
27. Gu Y, Wu J, Tian J, Li L, Zhang B, Zhang Y, He Y. 2020. Effects of exogenous synthetic autoinducer-2 on physiological behaviors and proteome of lactic acid bacteria. *ACS Omega* 5:1326–1335.
28. Moslehi-Jenabian S, Gori K, Jespersen L. 2009. AI-2 signalling is induced by acidic shock in probiotic strains of *Lactobacillus* spp. *Int J Food Microbiol* 135:295–302.
29. Liu L, Wu R, Zhang J, Li P. 2018. Overexpression of luxS promotes stress resistance and biofilm formation of *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9 by regulating the expression of multiple genes. *Front Microbiol* 9:2628.
30. Boulay M, Al Haddad M, Rul F. 2020. *Streptococcus thermophilus* growth in soya milk: Sucrose consumption, nitrogen metabolism, soya protein hydrolysis and role of the cell-wall protease PrtS. *Int J Food Microbiol* 335:108903.
31. Wang HL, Kraidej L, Hesseltine CW. 1974. Lactic acid fermentation of soyben milk. *J Milk Food Technol* 37:71–73.
32. 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. 2021. Mixing milk, egg and plant resources to obtain safe and tasty foods with environmental and health benefits. *Trends Food Sci Technol* 108:119–132.
33. De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J Appl Microbiol* 23:130–135.
34. Sandine WE, Terzaghi BE. 1975. Improved medium for lactic *Streptococci* and their bacteriophages. *Appl Microbiol* 29.
35. 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. *Lait* 86:251–257.
36. Tarnaud F, Gaucher F, do Carmo FLR, Illikoud N, Jardin J, Briard-Bion V, Guyomarc'h F, Gagnaire V, Jan G. 2020. Differential adaptation of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA129 to Cow's Milk versus soymilk environments modulates its stress tolerance and proteome. *Front Microbiol* 11:549027.
37. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
38. Gaucher F, Bonnassie S, Rabah H, Leverrier P, Pottier S, Jardin J, Briard-Bion V, Marchand P, Jeantet R, Blanc P, Jan G. 2019. Benefits and drawbacks of osmotic adjustment in *Propionibacterium freudenreichii*. *J Proteomics* 204:103400.
39. Lee DA, Collins EB. 1976. Influences of temperature on growth of *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis*. *Journal of Dairy Science* 59:405–409.
40. Aghababaie M, Khanahmadi M, Beheshti M, Mirlohi M. 2011. Temperature and pH optimization for the growth of *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* on whey-based medium using response surface methodology.
41. Nannen NL, Hutkins RW. 1991. Intracellular pH effects in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 74:741–746.

42. Yura T, Nagai H, Mori H. 1993. Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 47:321–350.
43. Agyei D, Danquah MK. 2012. In-depth characterization of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 313 for growth and cell-envelope-associated proteinase production. *Biochem Eng J* 64:61–68.
44. LeBlanc JG, Silvestroni A, Connes C, Juillard V, de Giori GS, Piard J-C, Sesma F. 2004. Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk: application of engineered lactic acid bacteria that produce α -galactosidase. *Genet Mol Res* 3:432–440.
45. Neves AR, Pool WA, Kok J, Kuipers OP, Santos H. 2005. Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* — The input from in vivo NMR. *FEMS Microbiol Rev* 29:531–554.
46. Magni C, de Mendoza D, Konings WN, Lolkema JS. 1999. Mechanism of citrate metabolism in *Lactococcus lactis*: Resistance against lactate toxicity at low pH. *J Bacteriol* 181:1451–1457.
47. Lopez de Felipe F, Gaudu P. 2009. Multiple control of the acetate pathway in *Lactococcus lactis* under aeration by catabolite repression and metabolites. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:1115–1122.
48. Condon S. 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol Lett* 46:269–280.
49. Cretenet M, Laroute V, Ulvé V, Jeanson S, Nouaille S, Even S, Piot M, Girbal L, Le Loir Y, Loubière P, Lortal S, Coccagn-Bousquet M. 2011. Dynamic analysis of the *Lactococcus lactis* transcriptome in cheeses made from milk concentrated by ultrafiltration reveals multiple strategies of adaptation to stresses. *Appl Environ Microbiol* 77:247–257.
50. Shirotani N, Bygvraa Hougaard A, Lametsch R, Agerlin Petersen M, Rattray FP, Ipsen R. 2021. Proteolytic activity of selected commercial *Lactobacillus helveticus* strains on soy protein isolates. *Food Chem* 340:128152.
51. Li L, Wang C, Qiang S, Zhao J, Song S, Jin W, Wang B, Zhang Y, Huang L, Wang Z. 2016. Mass spectrometric analysis of N-glycoforms of soybean allergenic glycoproteins separated by SDS-PAGE. *J Agric Food Chem* 64:7367–7376.
52. Chatterjee C, Gleddie S, Xiao C-W. 2018. Soybean bioactive peptides and their functional properties. *Nutrients* 10:1211.
53. Kim SI. 2022. Proteomic analysis of microorganisms. *IJMS* 23:4329.
54. Liu S, Pritchard GG, Hardman MJ, Pilone GJ. 1995. Occurrence of arginine deiminase pathway enzymes in arginine catabolism by wine lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 61:310–316.
55. Orihuel A, Terán L, Renaut J, Vignolo GM, De Almeida AM, Saavedra ML, Fadda S. 2018. Differential proteomic analysis of lactic acid bacteria-*Escherichia coli* O157:H7 interaction and its contribution to bioprotection strategies in meat. *Front Microbiol* 9:1083.

Résumé

Nous consommons de plus en plus de produits végétaux qu'il est possible de fermenter par des bactéries lactiques afin d'obtenir un produit fermenté aux propriétés organoleptiques agréables/améliorées et limitant les flores pathogènes. Parmi eux, les légumes secs sont riches en protéines, sont une ressource fermentable par les bactéries lactiques. Plusieurs souches de bactéries lactiques, sont nécessaires au sein d'une co-culture, afin de répondre à tous les critères exigés. Cette étude propose d'étudier les interactions entre deux bactéries lactiques *Lactococcus lactis* Bioprox 7116 (Lla7116) et *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* Bioprox 1585 (Ldl1585) sur une matrice végétale, le jus de soja et d'évaluer les critères pour les favoriser. Des suivis de croissance et d'acidification ont été réalisés sur milieux de laboratoire et jus de soja, et des études de métabolomiques ciblées (acides organiques, acides aminés libres et sucres dans le milieu fermenté) ont permis de déterminer des pistes de compréhension de la modulation positive des activités des deux souches étudiées. Les interactions observées se basent sur le métabolisme du carbone et sur les auxotrophies des acides aminés. Ldl1585 hydrolyse les galacto-oligosaccharides comme le stachyose et le raffinose, donnant du galactose, assimilable par Lla7116. Ldl1585 protéolyse les protéines du soja, donnant des acides aminés pour lesquels Lla7116 est auxotrophe. Ces résultats permettent d'ouvrir des pistes de compréhension des interactions positives entre bactéries lactiques possibles dans des matrices végétales, afin de produire des aliments végétaux fermentés novateurs dans le cadre d'un changement des modes de consommation.

Mots-clés : bactéries lactiques, fermentation, produit végétal, métabolomique, protéomique

Abstract

We are consuming more and more vegetable products, which can be fermented by lactic acid bacteria, leading to a product with pleasant organoleptic properties and protects foodstuffs from pathogenic flora. Pulses are rich in protein, and can be fermented by lactic acid bacteria. Fermentation generally involves two or more lactic acid bacteria within a co-culture to fulfill all the required criteria. This study investigate the interactions between two lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis* Bioprox 7116 (Lla7116) and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* Bioprox 1585 (Ldl1585) on a vegetable media, soymilk, and requirements to promote them. Growth and acidification studies were monitored on laboratory media and soymilk, and targeted metabolomics (organic acids, free amino acids and sugars in the fermented medium) provided clues to understand the positive modulation of the activities of the two strains studied. The interactions observed are based on carbon metabolism and amino acids auxotrophy. Ldl1585 hydrolyze galacto-oligosaccharides like stachyose and raffinose, releasing galactose which can be assimilated by Lla7116. Ldl1585 proteolyze soy proteins, yielding amino acids for which Lla7116 is auxotrophic. These results give new clues to understand the positive interactions between lactic acid bacteria in vegetables matrices, likely leading to produce innovative fermented plant-based foods in the context of changing consumption patterns.

Key words : lactic acid bacteria, fermentation, soymilk, metabolomics, proteomic