
JOSÉ LUIS MARTÍNEZ GONZÁLEZ

**UTILISATION DE LA COCULTURE DE *Lactobacillus rhamnosus* RW9595M ET *Lactobacillus rhamnosus* R,
POUR MODULER LE POIDS MOLECULAIRE DE LEURS
EXOPOLYSACCHARIDES PRODUITS**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en microbiologie agricole
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

DÉPARTEMENT DE SCIENCES DES ALIMENTS ET DE NUTRITION
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2008

Résumé

Un procédé de fermentation basé sur une coculture des souches probiotiques *Lactobacillus rhamnosus* R et *Lactobacillus rhamnosus* RW9595M a été utilisé pour coproduire des exopolysaccharides (EPS) de poids moléculaires modulés. Dans cette étude, les deux souches ont été cultivées séparément et en coculture. Les souches ont été cultivées durant 72 h, à 37 °C, sous contrôle de pH à 6.0, et avec une agitation de 100 r.p.m. Deux milieux de culture ont été testés, le milieu minimum basal supplémenté (BMM-S) avec 1.1% (v/v) de tryptone et le perméat de lactosérum supplémenté (PLS) avec 1.1% (v/v) de tryptone, 0.5 mg /L de MgSO₄, 0.05 mg /L de MnSO₄ et 0.1% de Tween 80. La croissance cellulaire des souches et le poids moléculaire ont été mesurés au cours de la fermentation par dénombrement sur gélose et par HPLC-SEC, respectivement. Lorsque les souches ont été cocultivées dans le BMM-S en proportion de 1 :1, 991 ± 30 mg/L d'EPS avec des poids moléculaires de $1.0 \pm 0.21 \times 10^6$, $1.6 \pm 0.16 \times 10^6$ Da, et $1.9 \pm 0.18 \times 10^5$ Da, ont été obtenus. Dans le milieu PLS, les souches ont été cocultivées en proportion de 9:1 (R/RW9595M), 657 ± 90 mg/L d'EPS avec des poids moléculaires de $5.59 \pm 0.82 \times 10^4$ Da, ont été obtenus. La croissance cellulaire individuelle a été mesurée par qPCR-TaqMan pour les essais dans le milieu PLS. La concentration cellulaire maximale pour chaque souche était de 2.05×10^9 UFC/mL pour *Lb. rhamnosus* R, et de 3.67×10^8 UFC/mL pour *Lb. rhamnosus* RW9595M. Ce procédé est simple et économique pour la culture des probiotiques à haute valeur ajoutée en fabrications alimentaires.

Abstract

A fermentation process based on a coculture of probiotics strains of *Lactobacillus rhamnosus* R and *Lactobacillus rhamnosus* RW9595M was used for coproducing exopolysaccharides (EPS) with modulated molecular weights. In this study, the two strains were cultivated separately and in coculture. The strains were cultivated during 72 h at 37 °C, under pH control at 6.0 with an agitation of 100 r.p.m. Two culture media were tested, basal minimum medium (BMM-S) supplemented with 1.1 % (v/v) of tryptone and supplemented whey permeate medium (SWPM) with 1.1% (v/v) of tryptone, 0.5 mg /L of MgSO₄, 0.05 mg /L of MnSO₄ and 0.1 % of Tween 80. The cell growth of the strains and the molecular weight of EPS were measured during fermentation by plate counting and HPLC-SEC, respectively. When the strains were cocultivated in the BMM-S in proportion of 1: 1, 991 ± 30 mg/L of EPS with molecular weights of 1.0 ± 0.21 x 10⁶ Da, 1.6 ± 0.16 x10⁶ Da, and 1.9 ± 0.18 x 10⁵ Da, were obtained. In SWM, the strains were cocultivated in proportion of 9:1 (R/RW9595M), 657 ± 90 mg/L of EPS with molecular weights of 5.59 ± 0.82 x 10⁴ Da, were obtained. The individual cell multiplication was measured by qPCR-TaqMan for the tests in the SWP. The maximum cell concentration for each strain was of 2.05 x10⁹ CFU/mL for *Lb. rhamnosus* R, and of 3.67 x 10⁸CFU/mL for *Lb. rhamnosus* RW9595M. This process is simple and economic for the culture of probiotics with high value added in food production.

Remerciements

Ce mémoire constitue un travail expérimental pour l'obtention d'un grade académique où diverses personnes ont été impliquées de différentes façons. Je veux remercier mon directeur de recherche, le professeur Denis Roy pour sa confiance et sa qualité humaine. Entre autre, je remercie spécialement la professeure Gisèle LaPointe pour ses opinions et sa générosité. Je vous prie de garder ma gratitude et mon respect. Merci pour m'avoir montré le monde de la génétique microbienne et pour m'avoir fait découvrir une partie de l'univers de la science. Merci également au Dr. Steve Labrie pour sa collaboration dans le domaine de la biologie moléculaire et pour ses explications. Je profite aussi de cet espace pour remercier le professeur Joseph Makhoul, car c'est lui qui m'a fait connaître Gisèle et Denis. Mes meilleurs remerciements aussi au Professeur Étienne Dako de l'Université de Moncton, pour ses très bons commentaires et ses suggestions.

Merci pour les opinions et la collaboration de mes collègues du laboratoire de génomique microbienne : Amel, Emilie, Julie, Marie H. L., Marie F., Marianne B.F., Marianne A., Mélanie, Patricia, Rachel, Sadjia, Zahira, Eric et Fabien.

En plus, mes meilleurs remerciements aux techniciens: Céline Paquin, Jocelyn Giasson, Alain Gaudreau, Bernard Béliveau et Pascal Dubé.

Je veux aussi remercier au service de sécurité et prévention, pour m'ouvrir la porte de la faculté à minuit, durant mes expériences de fermentation, aux employés de la bibliothèque scientifique, de science sociale, et de la filmothèque pour leur gentillesse, aux employés des divers services de maintenance et d'entretien pour toujours nous fournir des services, pour travailler pour nous.

Finalement, je veux remercier la « Nature » pour nous laisser ouvertes ses portes à notre curiosité.

Dedicace

*Para mis padres, Antonia y Ángel,
Y mis hermanas Beti y Daura,*

*Pasada la lluvia,
Con olor a tierra húmeda
Llegó el monzón imprevisto,
Pasadas las horas,
Vomitó la tierra híbrido árbol
Con raíces de Cedro y Ceiba,
Amen la semilla que brote de ella.*



José Luis Martínez González.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Remerciements.....	v
Dédicace.....	vi
Table des matières.....	vii
Liste des Tableaux.....	x
Liste des Figures.....	xi
Liste des abréviations et symboles utilisées.....	xiii
Introduction.....	xiv
CHAPITRE I.....	1
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	1
1.1 Définition d'exopolysaccharides.....	2
1.2 Exopolysaccharides des bactéries lactiques.....	2
1.2.1 Utilisation des EPS produits par des bactéries lactiques.....	3
1.3 Composition et structure des EPS.....	5
1.3.1 homopolysaccharides.....	5
1.3.2 Hétéropolysaccharides.....	5
1.4 Biosynthèse des EPS.....	6
1.5 Conditions de production des EPS.....	8
1.5.1 Composition du milieu.....	9
1.5.2 pH.....	10
1.6 Méthodes d'extraction et de quantification des EPS.....	11
1.6.1 Propriétés des EPS.....	12
1.6.2 Poids moléculaire et la viscosité.....	13
1.7 Dégradation des EPS.....	14
1.7.1 Enzymes de dégradation d'EPS.....	15
1.7.2 Cultures mixtes.....	15
1.8. <i>Lb. rhamnosus</i> R et RW9595M: Biomasse et production d'EPS.....	16
1.8.1 Structure de l'EPS produit par <i>Lb. rhamnosus</i> R et RW9595M.....	17
1.8.2 Fonction probiotique de <i>Lb. rhamnosus</i> RW9595M.....	19
1.9 PCR quantitative en temps réel (qPCR).....	19
1.9.1 Principe.....	19
1.9.2 Types de techniques pour la détection.....	20
1.9.2.1 Agents se liant à l'ADN double brin.....	20
1.9.2.2 Sondes d'hydrolyse avec séquence spécifique.....	21
1.9.2.3 Sondes TaqMan [®] MGB Probes.....	22

1.9.3 Stratégies de quantification et d'analyses de données	23
1.9.3.1 Efficacité de l'amplification de la qPCR	24
1.9.3.2 Quantification absolue	25
1.9.3.3 Quantification relative	26
1.9.3.4 La quantification par la méthode comparative $2^{-\Delta\Delta C}$	27
1.9.4 Gène <i>clpL</i> : cible spécifique.....	27
CHAPITRE II.	30
HYPOTHESE ET OBJECTIFS	30
2.1 Hypothèse.....	31
2.2 Objectifs	31
CHAPITRE III.....	32
MATERIEL ET METHODES	32
3.1 Cultures bactériennes	33
3.1.1 Conservation des souches	33
3.1.2 Préparations des pré-cultures	33
3.2 Préparation du milieu BMM.....	33
3.2.1 Stérilisation.....	34
3.3 Préparation du perméat de lactosérum supplémenté.....	34
3.4 Conditions des fermentations.....	34
3.4.1 Dénombrements microbiens	35
3.4.2 Isolement et purification d'EPS.....	35
3.4.3 Dosage d'EPS par la méthode phénol-acide sulfurique.....	36
3.5 Analyses du poids moléculaire d'EPS par HPLC-SEC.....	37
3.6 Techniques de biologie moléculaire.....	38
3.6.1 Extraction d'ADN.....	38
3.6.2 Séquençage du gène <i>clpL</i>	38
3.6.3 PCR.....	39
3.6.4 Purification des produits PCR et réaction de séquence	40
3.6.5 Analyses des séquences	40
3.6.6 Conception des amorces et des sondes TaqMan.....	41
3.6.7 Spécificité des amorces: Essai de la courbe de dissociation.....	41
3.6.8 PCR quantitative en temps réel (qPCR).....	42
3.6.8.1 Traçage de la courbe absolue et estimation de l'efficacité	43
3.6.9 Quantification de l'ADN bicaténaire par la méthode de PicoGreen®.....	43
CHAPITRE IV.	45
RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	45
CULTURES SUR LE MILIEU BMM SUPPLÉMENTÉ.....	45
4.1 Cinétiques de production de biomasse et d'EPS à partir des monocultures.....	46
4.2 Cinétiques de production de biomasse et d'EPS à partir des cocultures.....	48
4.3 Analyse par HPLC-SEC de la cinétique du poids moléculaire d'EPS produits durant les monocultures et les cocultures.....	49
4.4 Discussion.....	54

CHAPITRE V.....	56
RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	56
CULTURES SUR LE MILIEU PLS SUPPLÉMENTÉ.....	56
5.1 Calibration des courbes absolues par la PCR-TaqMan.....	57
5.1.1 Spécificité de l'essai.....	57
5.1.2 Courbes de calibration.....	57
5.2 Cinétiques de production de biomasse et d'EPS à partir des monocultures et de la coculture sur le milieu PLS.....	60
5.3 Analyse par HPLC-SEC de la cinétique du poids moléculaire d'EPS produits durant les monocultures et la coculture.....	64
5.4 Discussion.....	69
CHAPITRE VI.....	74
6.1 Conclusion.....	75
Références.....	77
ANNEXES.....	87
Annexe I. Diagramme de traitements d'échantillons.....	88
Annexe II. Diagramme de l'extraction et de la purification des polysaccharides.....	89
Annexe III. Liste des composantes du milieu de croissance BMM pour la production d'EPS.....	90
Annexe IV. Protocole d'Extraction d'ADN génomique.....	91
Annexe V. Analyse des séquences du gène <i>clpL</i>	93
Annexe VI. Mise au point des essais de la PCR quantitative en temps réel.....	99
Annexe VII. Courbes de calibration du poids moléculaire par HPLC-SEC.....	102
Annexe VIII. Données des cinétiques de croissances et production d'EPS.....	103

Liste des Tableaux

Tableau 1. Méthodes de quantification relative par PCR en temps réel.....	26
Tableau 2. Paires d'amorces utilisées pour le séquençage.	39
Tableau 3. Paires d'amorces et de sondes TaqMan-MGB utilisées pour la qPCR.....	41
Tableau 4. Volumes pour la conception de la courbe standard Picogreen	44
Tableau 5. Distribution de poids moléculaire des EPS à partir des monocultures et coculture dans le milieu BMM-S.....	50
Tableau 6. Distribution de poids moléculaire des EPS obtenus à partir des monocultures et cocultures dans le milieu PLS.....	65
Tableau 7. Pourcentages de la similarité obtenus entre les séquences cibles et les séquences de référence dans Genbank	94
Tableau 8. Courbe de calibration absolue pour <i>Lb. rhamnosus</i> RW9595M.....	101
Tableau 9. Courbe de calibration absolue pour <i>Lb. rhamnosus</i> R.....	101
Tableau 10. Courbe de calibration absolue pour <i>Lb. rhamnosus</i> R et RW9595M.....	101
Tableau 11. Données de la cinétique de croissance et de la production d'EPS pour <i>Lb. rhamnosus</i> RW9595M dans milieu le BMM-S.	103
Tableau 12. Données de la cinétique de croissance et de la production d'EPS pour <i>Lb. rhamnosus</i> R dans le milieu BMM-S.....	103
Tableau 13. Données de la cinétique de croissance et de la production d'EPS pour la coculture de <i>Lb. rhamnosus</i> R et RW9595M dans le milieu BMM-S.....	103
Tableau 14. Données de la cinétique de croissance et de la production d'EPS de <i>Lb. rhamnosus</i> RW9595M dans le milieu PLS.....	104
Tableau 15. Données de la cinétique de croissance et de la production d'EPS de <i>Lb. rhamnosus</i> R dans le milieu PLS.....	104
Tableau 16. Données de la cinétique de croissance et de la production d'EPS de la coculture de <i>Lb. rhamnosus</i> R et RW9595M dans le milieu PLS.. ..	104
Tableau 17. Données de la quantification pour la coculture de <i>Lb. rhamnosus</i> R et RW9595M.....	105

Liste des Figures

Figure 1. Diagramme généralisé de la conversion de lactose, de galactose et de glucose vers d'EPS et vers la glycolyse des bactéries lactiques.....	7
Figure 2. Structure de l'EPS produit par les souches <i>Lb.rhamnosus</i> RW9595M et <i>Lb.rhamnosus</i> R.....	17
Figure 3. Structure de la Sonde TaqMan-MGB (illustration tirée sur le guide pour la quantification relative.	22
Figure 4. Cinétique de croissance et de production d'EPS de <i>Lb. rhamnosus</i> RW9595M dans le milieu BMM-S.....	47
Figure 5. Cinétique de croissance et de production d'EPS de la souche <i>Lb. rhamnosus</i> R dans le milieu BMM-S.....	47
Figure 6. Cinétique de croissance et de production d'EPS de la coculture de <i>Lb. rhamnosus</i> R et RW9595M dans le milieu BMM-S..	48
Figure 7. Profils chromatographiques par HPLC-SEC des EPS isolés à partir de la monoculture de <i>Lb. rhamnosus</i> RW9595M dans le milieu BMM-S.....	51
Figure 8. Profils chromatographiques par HPLC-SEC des EPS isolés à partir de la monoculture de <i>Lb. rhamnosus</i> R dans le milieu BMM-S.	52
Figure 9. Profils chromatographiques par HPLC-SEC des EPS isolés à partir de la coculture de <i>Lb. rhamnosus</i> R et RW9595M dans le milieu BMM-S.....	53
Figure 10. Courbe de calibration de <i>Lb. rhamnosus</i> RW9595M en utilisant la sonde spécifique clpL-RW TaqMan-MGB.....	58
Figure 11. Courbe de calibration de <i>Lb. rhamnosus</i> R en utilisant la sonde spécifique clpL-R TaqMan-MGB.....	58
Figure 12. Courbe de calibration pour une monoculture et coculture de <i>Lb. rhamnosus</i> R et RW9595M dans une essaie de qPCR en utilisant la sonde universelle clpL RW/R TaqMan-MGB.....	59
Figure 13. Cinétique de croissance et de production d'EPS de <i>Lb. rhamnosus</i> RW9595M dans le milieu PLS.	61
Figure 14. Cinétique de croissance et de production d'EPS de <i>Lb. rhamnosus</i> R dans le milieu PLS.	61

Figure 15. Cinétique de croissance et de production d'EPS de la coculture <i>Lb. rhamnosus</i> R et RW9595M dans le milieu PLS.....	62
Figure 16. Cinétique de nombre de cellule individuelles dans la coculture des souches <i>Lb. rhamnosus</i> R et RW9595M dans le milieu PLS.	63
Figure 17. Profils chromatographiques par HPLC-SEC des EPS isolés à partir de la monoculture de <i>Lb. rhamnosus</i> RW9595M dans le milieu PLS.	66
Figure 18. Profils chromatographiques par HPLC-SEC des EPS isolés à partir de la monoculture de <i>Lb. rhamnosus</i> R dans le milieu PLS.....	67
Figure 19. Profils chromatographiques par HPLC-SEC des EPS isolés à partir de la coculture <i>Lb. rhamnosus</i> R et RW9595M dans le milieu PLS.	68
Figure 20. Séquençage du gène <i>clpL</i>	93
Figure 21. Schème des dilutions en série pour la qPCR.	99
Figure 22. Sensibilité de l'amplification de la qPCR avec la sonde TaqMan-MGB spécifique pour <i>Lb. rhamnosus</i> RW9595M.....	99
Figure 23. Sensibilité de l'amplification de la qPCR avec la sonde TaqMan-MGB spécifique pour <i>Lb. rhamnosus</i> R.	100
Figure 24. Analyse de la courbe de dissociation.....	100
Figure 25. Courbe standard de temps de rétention obtenus pour le pullulan par la technique de HPLC-SEC.....	102
Figure 26. Chromatogrammes représentatifs du standard pullulan.	102
Figure 27. Les cinétiques de production d'EPS en monoculture et en coculture des souches <i>Lb. rhamnosus</i> R et RW9595M.....	105

Liste des abréviations et symboles utilisées

µg: microgrammes.

µL: microlitre.

ATCC: American Type Culture Collection.

BMM: Basal minimum medium.

Ct: cycle seuil (threshold cycle).

Da: Dalton.

EPS: Exopolysaccharides.

Fig.: Figure.

H: heures.

HPLC-SEC: chromatographie d'exclusion stérique (SEC).

LAB: Lactic Acid Bacteria.

Lb. rhamnosus: *Lactobacillus rhamnosus*.

Log.: Logarithme base 10.

mg: milligrammes.

MGB: Minor Groove Binder.

nM: nanomoles.

PLS: Perméat de Lactosérum Supplémenté.

qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction.

Introduction

Les bactéries lactiques (LAB) sont caractérisées par leur capacité à fermenter les sucres en acide lactique. En plus de la production d'acide lactique, les LAB peuvent utiliser une petite proportion de sucre fermentescible pour la biosynthèse des exopolysaccharides (EPS). Ces dernières années, l'industrie laitière a commencé à utiliser des bactéries lactiques produisant des exopolysaccharides parce qu'elles améliorent les caractéristiques rhéologiques des laits fermentés, des yogourts ou des fromages (Bouzar *et al.* 1997, Cerning *et al.* 1988). Cette production d'EPS permet d'éviter l'utilisation d'additifs épaississants, de réduire la matière grasse dans les produits et même la teneur en solides du lait, pour une même fermeté ou viscosité du produit. (Duboc et Mollet, 2001, Jolly *et al.* 2002). Dans la production de fromage Karish et Mozzarella, l'ajout des souches productrices d'EPS en culture mixte avec des souches non productrices, augmente l'humidité du fromage. La présence d'EPS perturbe la continuité du réseau protéique du lait constitué de caséines, dans lequel les interactions protéine-EPS contribuent à la rigidité (Petersen *et al.* 2000, Hassan *et al.* 2004). Dans ce contexte, les exopolysaccharides sécrétés par les LAB forment un réseau additionnel entre les caséines, évitent la synérèse, favorisent la stabilité et l'augmentation de la viscosité ou de l'élasticité et améliorent la texture des produits (Dabour *et al.* 2005, Ruas Madiedo *et al.* 2005b). Cependant, l'accumulation d'EPS de poids moléculaire élevé dans le lactosérum du fromage est indésirable parce qu'elle diminue l'efficacité des procédés membranaires utilisés pour son traitement. De cette manière, l'efficacité des processus de concentration du sérum et de séchage serait diminuée, ce qui résulterait en des pertes en rendement du produit et en des pertes économiques pour les producteurs fromagers (Bhaskaracharya *et al.* 2000, Laws *et al.* 2001, Petersen *et al.* 2000). Cependant, l'utilisation de bactéries lactiques permettrait l'exploitation du perméat de lactosérum par fermentation pour produire des exopolysaccharides comme des bioingrédients fonctionnels et la quantité d'EPS produits serait fortement dépendante du rendement du procédé (Frengova *et al.* 2000, Jolly *et al.* 2002, Champagne *et al.* 2005).

Dans la recherche d'alternatives au profit d'EPS produits par des souches probiotiques, nous proposons une nouvelle approche pour l'obtention d'EPS de faible poids moléculaire et un haut rendement en biomasse de probiotiques à partir d'une coculture des souches avec des caractéristiques intéressantes en industrie fromagère. *Lactobacillus rhamnosus* RW9595M a été choisie comme souche à cause de ses propriétés technologiques (viscosité, arômes), nutritionnelles (fibre alimentaire, probiotique) et sa forte production d'EPS (Macedo *et al.* 2002b). En plus, la souche *Lactobacillus rhamnosus* R dégrade les EPS produits, durant la fermentation prolongée lorsque certains enzymes intracellulaires sont libérés par lyse cellulaire (Pham *et al.* 2000). En conséquence, un procédé de coculture a été conçu, en utilisant *Lb. rhamnosus* R, et *Lb. rhamnosus* RW9595M. Pour ce défi, nous avons proposé de caractériser les cinétiques de production d'EPS en utilisant la technique du HPLC-SEC pour le suivi du poids moléculaire et une approche moléculaire comme la PCR en temps réel, pour la quantification individuelle des souches dans un processus de coculture. En plus, la valorisation d'un sous produit fromager le perméat de lactosérum supplémenté comme milieu de culture, est mis en œuvre.

Un procédé de fermentation simple des conditions initiales contrôlées, une biomasse viable élevée, une production d'EPS avec des poids moléculaires variés, un milieu de culture économique et l'association entre deux bactéries probiotiques correspondent aux facteurs clés considérés pour le contrôle de la qualité d'EPS dans un produit, en particulier, le fromage. Ce procédé pourrait être une alternative pour le contrôle des propriétés rhéologiques, diminuant ainsi les effets néfastes mentionnés précédemment des EPS sur les traitements des sous-produits et des produits finis.

Le sommeil de la raison engendre des monstres.

Francisco de Goya

(Extrait de la légende d'une gravure de Caprices)

CHAPITRE I.

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Définition d'Exopolysaccharides

La surface des cellules microbiennes est une source riche en contenu de molécules de polysaccharides tels que les peptidoglycanes, les lipopolysaccharides, les acides teichoïques. Ces polysaccharides font partie de la structure membranaire ou de la paroi cellulaire qui confèrent des caractéristiques uniques aux microorganismes. Cependant, en plus de ces substances, certains polysaccharides sont associés ou dissociés de la surface de la cellule. Ces polysaccharides extracellulaires ou exopolysaccharides (EPS) peuvent participer à la structure externe de la surface des cellules microbiennes en formant une capsule. De manière alternative, les EPS sécrétés en une couche mucoïde par le microorganisme ne sont plus attachés à la cellule et normalement, ne contribuent pas à la structure microbienne. Les autres éléments de la surface cellulaire ne sont pas altérés si les exopolysaccharides sont absents (Sutherland, 1990, 2001). Les cellules productrices d'EPS qui se développent sur des surfaces solides sont facilement caractérisées par leur morphologie comme étant des colonies mucoïdes. Dans les milieux liquides, la présence d'EPS rend le milieu plus visqueux ou forme une structure gélatineuse. Les EPS, dans leur environnement normal, jouent un rôle dans la protection de la cellule microbienne contre la déshydratation, la phagocytose, l'attaque par des bactériophages, les antibiotiques, les composés toxiques (par exemple les ions de métaux toxiques, des composés sulfureux, de l'éthanol), la prédation par des protozoaires, le stress osmotique, l'adhérence aux surfaces solides et la formation de biofilm (Degeest et De Vuyst, 1999).

1.2 Exopolysaccharides des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (LAB) sont caractérisées par leur capacité à fermenter les sucres en acide lactique. En plus de la production d'acide lactique, les LAB peuvent utiliser une petite proportion de sucre fermentescible pour la biosynthèse des EPS. Les exopolysaccharides des LAB, une fois suspendus ou dissous dans une solution, peuvent agir comme des agents texturants ou stabilisants, augmentant premièrement la viscosité du

produit final, et en second lieu, en évitant la synérèse ou la perte d'eau par la formation d'une structure entre l'EPS avec d'autres constituants du lait, tels que les protéines et les micelles pour renforcer la rigidité du réseau caséique et augmenter l'humidité du produit fini. Par conséquent, les EPS peuvent diminuer la synérèse et améliorer la stabilité du produit. Ces propriétés de bio-épaississement et de gélification ont suscité un grand intérêt dans l'industrie laitière, à cause de l'emploi d'EPS produits par des microorganismes de grade alimentaire (Generally Recognized as Safe, GRAS), comme les LAB, lesquelles sont traditionnellement employées pour la fermentation des aliments. Ces bactéries peuvent être ajoutées à une grande variété de produits alimentaires, comme les yogourts, les produits laitiers fermentés, le kéfir et le fromage. En plus, quelques exopolysaccharides sont produits par des souches probiotiques comme les *Lactobacillus*, et les *Bifidobacterium*, pouvant aussi contribuer à la santé humaine en stimulant efficacement le système immunitaire (Chabot *et al.* 2001). Cela est possible parce que les EPS resteront plus longtemps dans l'appareil gastro-intestinal, de ce fait, augmentant la colonisation par les bactéries probiotiques. En outre, les EPS contribuent aussi à maintenir la santé humaine de quatre manières différentes: 1) comme une fraction non digestible, 2) par leur activité antiulcéreuse, 3) ou anti-tumorale et 4) pour abaisser la concentration en cholestérol dans le sang (Welman et Maddox, 2003a, Degeest *et al.* 2001). Par conséquent, les EPS des LAB ont un potentiel pour être utilisés dans les fermentations lactiques afin d'améliorer la texture des produit laitiers, ainsi que pour leur exploitation comme ingrédients fonctionnels dans les aliments avec des bénéfices économiques de même que pour la santé humaine (Degeest et De Vuyst, 1999).

1.2.1 Utilisation des EPS produits par des bactéries lactiques

L'utilisation des EPS produits par des bactéries lactiques mésophiles (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* et *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*) et thermophiles (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, et *Streptococcus thermophilus*) a été principalement profitable pour l'amélioration des propriétés rhéologiques, comme la faible viscosité et la rupture du gel ainsi que pour les problèmes de synérèse dans le yogourt et le

fromage. Par exemple, Hassan *et al.* (2004), ont utilisé deux cultures pour la fabrication de fromage de Karish: une première culture de *Streptococcus thermophilus* et une souche de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* non productrice d'EPS, et une deuxième culture avec des souches de *S. thermophilus* non productrice d'EPS et une souche de *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* productrice d'EPS. Le fromage fait avec la souche non-productrice était plus rigide et a récupéré sa forme, alors que le fromage fait avec les EPS était déformable. Des résultats semblables ont été obtenus par Petersen *et al.* (2000) dans la fabrication du fromage Mozzarella. Ils ont remarqué que des cultures productrices d'EPS peuvent améliorer les propriétés physiques du fromage telles que l'élasticité et la rigidité. Ces propriétés ont été attribuées à la formation d'un dense réseau de protéines-EPS, qui réduit la rigidité indésirable et qui a un impact important sur le développement des caractéristiques rhéologiques. Si bien que la présence d'EPS modifie la texture et la stabilité dans le fromage en augmentant la capacité de rétention de l'eau (l'humidité). Cependant, l'accumulation d'EPS dans le lactosérum du fromage est indésirable parce qu'elle ralentit l'efficacité de la membrane filtrante, cela diminuerait le processus de concentration du sérum et le processus de séchage (Petersen *et al.* 2000). Une autre considération importante dans l'utilisation des EPS est l'exigence de la fabrication de fromages avec différentes textures. En plus, les EPS peuvent être partiellement perdus dans le lactosérum et ne peuvent pas être maintenus dans le lait caillé, ceci est dû aux interactions de la chaîne de polysaccharides avec les protéines du lactosérum (Perry *et al.* 1997), cela affecte le rendement en produit fini pour les producteurs (Broadbent *et al.* 2003). La haute densité de charge dans les constituants des EPS interagit électrostatiquement avec la charge nette positive des micelles de la caséine en augmentant la rétention des protéines provoquant ainsi l'instabilité du système. Cependant, si un sucre de charge neutre ne faisait pas d'interactions avec les ions chargés de la caséine, cela formerait une couche stable et l'humidité pourrait être maintenue. En définitive, ces facteurs limitant l'utilisation d'EPS, exigent une modulation des chaînes de polysaccharides dans les produits finis afin d'adapter leur utilisation à la technologie fromagère et pour profiter des bénéfiques probiotiques des bactéries lactiques.

1.3 Composition et structure des EPS

La composition et la structure des EPS semblent être énormément influencées par les conditions de fermentation, la composition du milieu de culture ainsi que par les techniques de purification et de quantification des EPS. Cependant, les EPS produits par des LAB peuvent être divisés en deux groupes selon les chaînes de sucre répétitives dont ils sont composés: homopolysaccharides par exemple: cellulose, dextrine, pullulane, alternane et levane et hétéropolysaccharides par exemple: alginate, gellane et xanthane (Michaud *et al.* 2003).

1.3.1 Homopolysaccharides

Les homopolysaccharides consistent en des unités répétitives d'un seul type de monosaccharides (D-glucose ou D-fructose) et ils se composent de quatre sous-groupes:

- a) α -D-glucanes: composés particulièrement de résidus α -1,6 glucose ou quelques résidus β -1-3 glucose. Les degrés de branchements sont variables. Les principales souches productrices de ce type d'EPS sont: *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* et ssp. *dextranicum*, *Streptococcus mutans* et *Streptococcus sobrinus*.
- b) β - D-glucanes: composés de résidus β -1,3 glucose avec des branchements en β -1,2. Ils sont produits par *Pediococcus* et *Streptococcus*.
- c) Fructanes : composés de résidus β -2,6 D- fructose. Ils peuvent avoir de branchements β -2,1, un exemple de ce type d'EPS est le levane de *Streptococcus salivarius*.
- d) Autres : composés d'unités de sucres structurellement identiques et répétées avec des liens glycosidiques différents comme le polygalactane.

1.3.2 Hétéropolysaccharides

Ils sont produits par des bactéries lactiques mésophiles et thermophiles. Composés de différentes unités monosaccharidiques répétitives, ils peuvent être une combinaison de plusieurs sucres et d'autres groupes non-sucrés comme le groupe carboxyléthyl ou phosphate (Sutherland, 1990, 2001). Les sucres les plus fréquemment retrouvés sont le

glucose et le galactose de même que le rhamnose. Ces polysaccharides jouent un rôle important dans la rhéologie et la texture des produits laitiers. Récemment, une tentative a été faite pour dissocier les EPS des LAB mésophiles selon leur composition en monomères. Quatre groupes principaux ont été distingués (Ruas-Madiedo *et al.* 2005a):

- (i) EPS contenant seulement le galactose,
- (ii) EPS contenant le galactose et le glucose,
- (iii) EPS contenant le galactose, le glucose, et le rhamnose,
- (iv) Autres (sucres aminés et acides).

1.4 Biosynthèse des EPS

La biosynthèse des EPS bactériens est complexe et implique l'action simultanée d'un grand nombre de gènes (Laws *et al.* 2001). Les gènes qui codent pour les enzymes et les protéines régulatrices nécessaires pour la synthèse des EPS, sont d'origine plasmidique chez les souches lactiques mésophiles par exemple *Lactococcus lactis* (Kleerebezen *et al.* 1999) et chromosomique chez les souches thermophiles comme par exemple *S. thermophilus* (Faber *et al.* 1998, 2001b) et *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Gassem *et al.* 1997). L'habilité de produire des EPS par les bactéries lactiques thermophiles est considérée comme étant instable. Cela est dû à la délétion et à la réorganisation qui résultent de l'instabilité génétique dans les chromosomes (Laws *et al.* 2001). La voie biosynthétique des EPS peut être composée de quatre séquences de réactions séparées:

1. Les réactions du transport de sucre dans le cytoplasme,
2. Les réactions de la synthèse de sucres 1- phosphate,
3. Les réactions de l'activation et de l'ajout des sucres (polymérisation),
4. Les processus impliqués dans l'exportation des EPS.

L'intermédiaire principal qui unit les voies anaboliques de la production d'EPS et les voies cataboliques de la dégradation du sucre semble être le glucose-6-phosphate, dans lequel le flux du carbone bifurque entre la formation de fructose-6-phosphate vers les produits de la glycolyse, la biomasse et la formation d'adénosine triphosphate (ATP) et vers la biosynthèse de sucres nucléotidiques et les précurseurs d'EPS (Welman et Maddox, 2003a). Ceci a été démontré par Ramos *et al.* (2001). Au cours de la synthèse d'EPS chez

Lactococcus lactis, ils ont observé qu'une proportion de glucose employée dans la voie catabolique doit être convertie en glucose-6-phosphate pour la synthèse d'EPS. La source de carbone joue aussi un rôle important dans la composition du polymère puisque les voies cataboliques que la bactérie utilise vont dépendre de la source de carbone présente dans le milieu. Par exemple, si la source de carbone est le lactose, il sera d'abord acheminé à l'intérieur de la cellule par des protéines du système PTS (dépendant phosphotransférase), puis hydrolysé en galactose et glucose. Le galactose peut suivre la voie métabolique de la glycolyse ou être converti en sucre nucléotidique. Ensuite, il est incorporé dans la chaîne de l'EPS, tandis qu'une partie du glucose est phosphorylé et lié à un nucléotide monophosphate pour former l'uridine diphosphate-glucose. Les sucres nucléotidiques sont aussi incorporés à l'unité répétitive des chaînes polysaccharides (Welman et Maddox, 2003a, b). La Figure 1 montre les différentes voies cataboliques et anaboliques des sucres chez les bactéries lactiques.

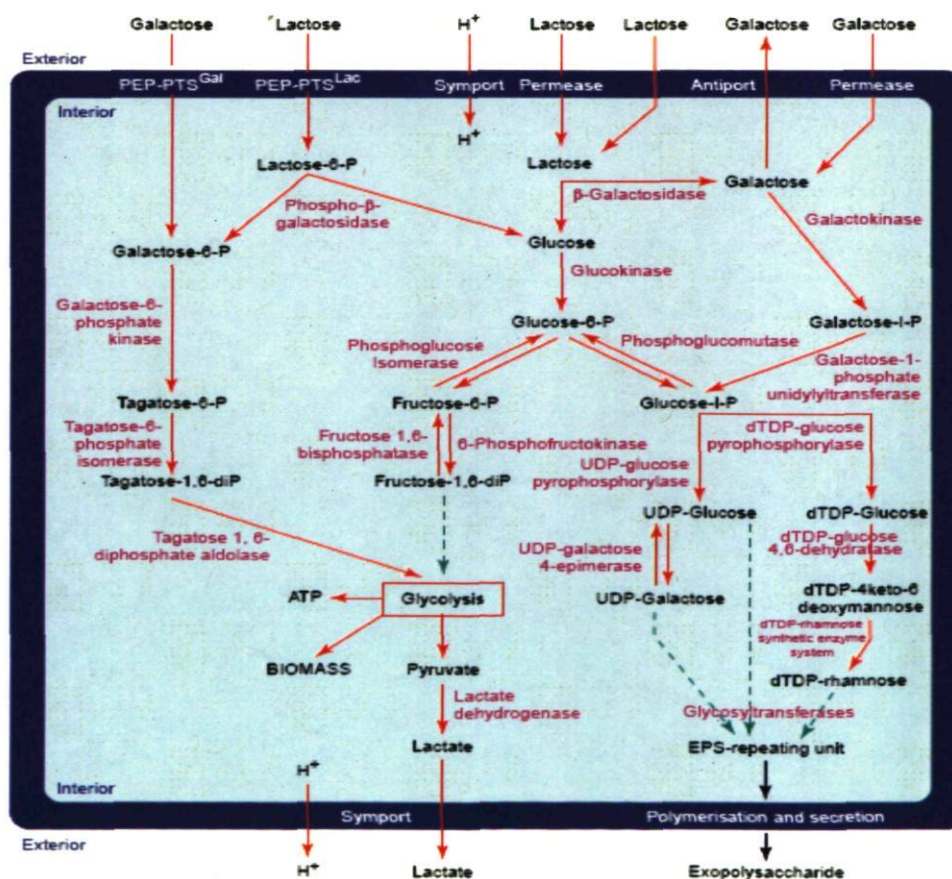


Figure 1. Diagramme généralisé de la conversion de lactose, de galactose et de glucose vers d'EPS et vers la glycolyse des bactéries lactiques (Welman et Maddox, 2003a).

1.5 Conditions de production des EPS

La production des EPS par les LAB peut différer considérablement d'une souche à l'autre. Leur biosynthèse et leur sécrétion peuvent avoir lieu durant des phases de croissance différentes (Lebeer *et al.* 2007a, b; Degeest et de Vuyst 1999, Degeest *et al.* 2001). En outre, les conditions de croissance comme la composition du milieu de culture, la température, le pH, l'oxygène et la vitesse d'agitation peuvent influencer la quantité mais aussi la composition et la taille des EPS, (Cerning, 1990, Vaningelgem *et al.* 2004). Cependant, des résultats contradictoires ont été rapportés concernant l'influence de ces paramètres sur la production des EPS. Les souches mésophiles semblent produire des quantités maximales d'EPS dans des conditions non optimales pour la croissance, telles que des conditions de basse température. La production d'EPS à partir des bactéries lactiques thermophiles semble être associée à la croissance. Dans ce dernier cas, la biosynthèse d'EPS commence en général simultanément avec la croissance de la cellule, en montrant un taux maximum quand la culture est dans sa phase exponentielle de croissance, indiquant une cinétique primaire de production de métabolite (Jolly *et al.* 2002). Une comparaison des données de la littérature concernant les rendements d'EPS produits par les LAB doit être faite avec réserve car des techniques de quantification et des milieux de culture différents sont utilisés. Ceci peut avoir une forte influence sur les résultats. En général, des concentrations d'EPS de 50 à 600 mg/L dans des conditions optimales de production ont été obtenues. Par contre, les productions maximales de 1.14 g/L par *S. thermophilus* LY03 (Degeest et de Vuyst, 1999), de 1.37 g/L par *Lb. sakei* 0-1 (Van den Berg *et al.* 1995) et de 2.77 g/L par *Lb. rhamnosus* RW-9595M (Macedo *et al.* 2002b) ont été rapportées. Un effet synergique entre les souches thermophiles *S. thermophilus* et *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a été observé dans deux études différentes. Une souche productrice d'EPS *S. thermophilus* CNRZ 1066 en combinaison avec une souche non-productrice *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 398 a produit une quantité d'EPS (800 mg/L), beaucoup plus élevée que la souche productrice seule (Cerning *et al.* 1990). De plus, la production de la souche *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 a été plus élevée en culture mixte avec une souche non-productrice de *S. thermophilus* qu'en culture pure (Faber *et al.* 2001).

La souche *Lb. rhamnosus* R dans le milieu BMM avec contrôle du pH a commencé à produire les EPS seulement à la fin de la phase exponentielle de croissance (Pham *et al.* 2000). De plus, la production d'EPS a continué pendant la phase stationnaire de croissance dans le cas des cultures dans le glucose, tandis que la production d'EPS a diminué dans la culture avec l'ajout de lactose. L'EPS produit par cette souche peut être considéré comme un métabolite secondaire ou produit mineur indirect de la glycolyse. Ainsi, la mise en coculture prolongée de *Lb. rhamnosus* RW 9595M et *Lb. rhamnosus* R (deux souches productrices des mêmes EPS) pourrait entraîner une compétition entre les deux souches et induirait l'expression rapide des gènes de phase stationnaire chez *Lb. rhamnosus* R. Cette expression pourrait conduire *Lb. rhamnosus* R à la lyse cellulaire et à la libération des enzymes dans le milieu en créant une activité hydrolase sur les EPS sécrétés et par conséquent une possible diminution du poids moléculaire de l'EPS et de la viscosité du milieu.

1.5.1 Composition du milieu

La plupart des espèces de *Lactobacillus* sont auxotrophes, car elles sont incapables de produire des acides aminés et des vitamines (Lebeer *et al.* 2007a). C'est pour cela que différents milieux de culture ont été employés pour étudier la production qualitative et quantitative des EPS ainsi que pour déterminer l'influence des nutriments sur la croissance des souches productrices, et sur la biosynthèse et la génétique des EPS (Cerning *et al.* 1990, Laws *et al.* 2001, Welman et Maddox, 2003a). Les milieux utilisés le plus souvent sont le lait écrémé, le lactosérum, un milieu minimum défini et un milieu chimiquement défini. Il est bien établi que les conditions de culture et la composition (non seulement la source de carbone) des milieux de culture influencent le rendement en EPS et les caractéristiques moléculaires des bio-polymères. Par conséquent, le choix d'un milieu approprié pour la production d'EPS a une grande importance, étant donné que certains de leurs constituants pourraient interférer dans l'analyse d'EPS (Ruas-Madiedo *et al.* 2005a). Les milieux semi définis éliminent les constituants qui interfèrent avec la quantification des EPS et les milieux chimiquement définis contiennent une source de carbone, des acides aminés, des vitamines, des acides nucléiques et des sels qui ont été développés pour

faciliter les analyses d'EPS (Laws *et al.* 2001, Ruas-Madiedo *et al.* 2005a). Dans ce sens, Pham *et al.* (2000) ont utilisé le BMM (Basal Medium Minimal) pour l'étude de la dégradation des EPS chez *Lb. rhamnosus* R. Les constituants de ce milieu sont listés dans l'annexe III. Le BMM est favorable aux lactobacilles (Escalante *et al.* 1998), et le glucose est un substrat de carbone primaire dans des milieux nutritifs synthétiques pour la synthèse d'EPS (Simova *et al.* 2004).

1.5.2 pH

Chez les bactéries lactiques, les changements du pH jouent un rôle important dans la biosynthèse, la production et possiblement dans la dégradation des EPS. L'importance du contrôle du pH durant la fermentation réside dans la stabilité du système. Un pH stable élimine une variable à prendre en compte dans l'interprétation des résultats. Aussi, un pH stable permet de prolonger la phase logarithmique et la phase stationnaire de croissance du microorganisme, ce qui provoque une baisse de la synthèse des peptidoglycanes et des acides teichoïques, en favorisant la production de polymères exocellulaires (Gassem *et al.* 1997) de même que le catabolisme de la source de carbone. Les changements du pH extracellulaire peuvent affecter non seulement la synthèse d'EPS mais également la distribution de produits finaux et l'activité de certains enzymes (pyruvate kinase, lactate déshydrogénase, pyruvate formate-lyase) impliqués dans le métabolisme des bactéries lactiques. Ceci a été observé par Torino *et al.* (2001) lors de la culture de *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807, la production d'EPS a été supérieure à un pH de 5 (549 mg/L) qu'à un pH de 6.2 (49 mg/L). De tels changements de pH ont conduit à une conversion du métabolisme de la bactérie homofermentaire à hétérofermentaire. Ceci peut s'expliquer par l'accumulation dans le cytoplasme de la partie anionique d'acides organiques dissociés (par effet du pK de l'acide lactique par exemple) qui ont également un effet négatif sur la physiologie cellulaire (Van de Guchte *et al.* 2002). Cependant, Dupont *et al.* (2000) ont observé qu'avec ou sans contrôle de pH, la quantité d'EPS restait la même chez la souche *Lb. rhamnosus* RW9595M. Aussi, chez *Lb. rhamnosus* R, on a observé que le pH contrôlé a permis l'activité des glucohydrolases, ce qui réduit le poids moléculaire d'EPS durant la

fermentation (Pham *et al.* 2000). Ceci peut s'expliquer par l'influence que le pH du milieu a sur le rendement d'EPS et cela dépendra du pH optimum des glycohydrolases (Laws *et al.* 2001). L'optimum de pH pour la production d'EPS sera le pH pour lequel les effets opposés de la production et de la dégradation seront équilibrés.

1.6 Méthodes d'extraction et de quantification des EPS

La présence de constituants complexes dans les milieux de culture tels que les composés de faible poids moléculaire et des polysaccharides de grand poids moléculaire (glucomannane et peptone) pourraient être considérés comme des composés contaminants, car ils sont inclus dans les calculs de composition en monomères et du rendement (Ruas-Madiedo *et al.* 2005a). Pour cette raison la méthode employée pour l'isolement et la purification d'EPS dépendra de la composition du milieu de culture utilisé pour sa production (Laws *et al.* 2001). En général, le procédé de purification le plus simple comporte la dialyse de l'eau du milieu cultivé (après l'enlèvement des cellules par centrifugation), suivie par la lyophilisation. Cependant, la précipitation avec l'éthanol peut être employée pour concentrer les EPS avant la dialyse pour leur isolement des cultures lactiques (culture de yogourt: *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *S. thermophilus*) et mésophiles (*Lactococcus* et *Lactobacillus*), (Petry *et al.* 2000, Deggest *et al.* 2001). Dans les milieux complexes, les méthodes de purification utilisées impliquent la précipitation avec l'acide trichloroacétique (TCA) et l'enlèvement des protéines par centrifugation suivie de la concentration des EPS par la précipitation avec l'éthanol (Dupont *et al.* 2000, Pham *et al.* 2000). D'ailleurs, la chromatographie d'exclusion stérique préparative a été employée comme étape finale de purification des EPS quand des échantillons très purs ont été exigés (Van den Berg *et al.* 1995, Faber *et al.* 2001a). Après les étapes d'isolement, la quantification du rendement en EPS est nécessaire. Pour la détermination du rendement, trois approches sont fréquemment utilisées. Pour la première, il s'agit d'une poudre lyophilisée d'EPS, son poids étant l'indication la plus simple du rendement en EPS (De Vuyst *et al.* 1998, Frengova *et al.* 2000, Degeest *et al.* 2001a). La deuxième approche exprime la production d'EPS en milligrammes équivalents de dextrane par millilitre.

Cette unité a été définie par García-Garibay et Marshall (1991) comme la quantité de polymère qui produit la même turbidité à 720 nm qu'un milligramme de dextrane. Cependant, des valeurs obtenues par ces méthodes sont influencées par le degré de pureté de la fraction d'EPS isolée. La troisième méthode a été largement utilisée, les sucres réducteurs libérés après l'hydrolyse acide des oligosaccharides, des polysaccharides, et leurs dérivés (éthers méthyliques) donnent une couleur jaune-orange une fois traités avec du phénol et de l'acide sulfurique. Cette approche est connue comme la méthode phénol-sulfurique (Cerning *et al.* 1990, Gancel *et al.* 1994, Mozzi *et al.* 1996, Bouzar *et al.* 1997, Dupont *et al.* 2000, Frengova *et al.* 2000, Petry *et al.* 2000, Bergmaier *et al.* 2000, Torino *et al.* 2005). Cependant, la méthode phénol-sulfurique mesure les sucres réducteurs provenant des hydrates de carbone présents dans la fraction d'EPS, y compris les hydrates de carbone de bas poids moléculaire qui peuvent être présents. Bien que les méthodes colorimétriques de quantification soient, en principe, les meilleurs marchés et les plus simples, les techniques les plus précises pour la quantification de la teneur en EPS des fractions d'isolement sont celles dans lesquelles la méthode analytique est jointe à une méthode de séparation. Ainsi, la chromatographie à perméation de gel (aussi appelée chromatographie d'exclusion stérique) à l'aide d'un système HPLC (HPLC-SEC) permet la séparation des polymères d'EPS par une exclusion de la taille. La détection simultanée des molécules d'EPS par l'indice de réfraction (RI) peut être employée pour mesurer la production d'EPS dans la crête d'élution d'EPS correspondante. Un détecteur ultraviolet en ligne additionnel peut fournir des informations sur la présence de protéines dans l'échantillon (Ruas-Madiedo *et al.* 2002, 2005a).

1.6.1 Propriétés des EPS

Les polysaccharides produits par différentes LAB montrent des variations dans la composition, la charge, l'arrangement spatial, la rigidité et l'habilité à interagir avec des protéines ou avec d'autres constituants (Duboc et Mollet, 2001, Jolly *et al.* 2001). Une corrélation entre la concentration d'EPS et la viscosité a déjà été établie (Frengova *et al.* 2000). Cette corrélation est particulièrement importante parce qu'elle fournit une base pour une stratégie visant à produire des polysaccharides fonctionnels, qui se comporteront d'une

façon relativement prévisible quand ils seront incorporés aux produits alimentaires (Welman et Maddox, 2003a). Il est évident qu'en obtenant une viscosité élevée, le poids moléculaire devrait être élevé et la chaîne devrait être relativement rigide (Jolly *et al.* 2002). Ceci a été démontré par Faber *et al.* (2001a), qui ont obtenu deux EPS différents avec les mêmes unités répétitives mais avec différents poids moléculaires. L'EPS qui avait un haut poids moléculaire était plus visqueux. La viscosité pourra aussi être en rapport avec les liens entre les unités de polysaccharides (Tuinier *et al.* 2001). Les liens β (1,4) montrent plus de rigidité que les liens α (1,4) et les β (1,3) montrent, quant à eux, plus de flexibilité que ceux en α (1,6) et en β (1,6). Van den Berg *et al.* (1995) ont prouvé que les EPS neutres ont contribué à la viscosité mais pas à l'élasticité. En particulier, les polysaccharides négativement chargés ont contribué à l'élasticité, mais pas à la viscosité. D'autre part, Pham *et al.* (2000) ont observé pendant la dégradation d'EPS, que la réduction du poids moléculaire avait un effet sur la variation de la viscosité de la macromolécule de faible poids moléculaire pouvant être produite par l'hydrolyse de macromolécule de poids moléculaire élevé par l'action des glycohydrolases.

1.6.2 Poids moléculaire et la viscosité

La capacité des EPS de conférer une viscosité aux produits fermentés, est déterminée par le poids moléculaire du biopolymère. Turnier *et al.* (2001) proposent une relation mathématique où la viscosité est fonction du poids moléculaire et du rayon hydrodynamique de l'EPS. Dans ce cas, le poids du polymère, et donc la composition de la chaîne, est d'une importance primordiale pour l'efficacité de l'épaississement un polysaccharide. Le poids moléculaire des EPS produits par les bactéries lactiques change selon le type de souches et dépend aussi du type de polymère. Le poids moléculaire d'un EPS peut être déterminé par la chromatographie par perméation de gel en HPLC ou un système rapide de chromatographie liquide (FPLC).

1.7 Dégradation des EPS

Certaines polysaccharases ont été obtenues à partir des bactéries et elles se caractérisent en fonction de la source productrice et de leur niveau élevé de spécificité envers le substrat. Les phages sont aussi responsables de la présence des enzymes de dégradation chez les bactéries (Hanlon *et al.* 2001). Ces particules virales ont des polysaccharases qui font partie de leur structure. Après l'infection, les bactéries lysées contiennent normalement des quantités variables de ces enzymes solubles. Cependant, l'induction des polysaccharases par les phages est faible (Sutherland, 1990). Ainsi, Pham *et al.* (2000) ont démontré que les EPS peuvent être dégradés par la présence des enzymes excrétés dans le milieu de culture après une fermentation prolongée. Ce phénomène a été observé pour la première fois par Macura et Townsley (1984) quand ils ont cultivé *Lactococcus cremoris* la viscosité du lait écrémé a diminué par l'effet de la dégradation enzymatique des EPS. Mozzi *et al.* (1996) ont rapporté une diminution de la viscosité du milieu et de la quantité d'EPS durant une fermentation de 72 h avec une culture de *Lactobacillus casei*. Ainsi, Degeest et De Vuyst (1999) suggèrent que la dégradation d'EPS de *S. thermophilus* se produit à partir d'une quantité critique de biomasse. Cette dégradation est due à l'activité des glycohydrolases. Ils ont remarqué qu'une réduction du rendement en EPS au cours d'une fermentation prolongée semble dépendre de la souche. Cerning *et al.* (1988), ont déterminé la présence des glycohydrolases en mesurant le contenu d'EPS dans un échantillon traité à 90 °C pendant 10 minutes comparé à des échantillons non traités. La concentration en EPS est 40% plus élevée dans l'échantillon traité thermiquement due à l'inactivation des enzymes. Gancel et Novel (1994) ont observé dans une culture de *S. thermophilus*, deux étapes de dégradation. La première agit dans la phase stationnaire et diminue la quantité totale de polysaccharide et la seconde apparaît dans la phase de croissance de la souche affectant la quantité nette d'EPS. Pham *et al.* (2000) ont étudié la relation entre les enzymes de dégradation, la diminution de la viscosité et le poids moléculaire d'EPS durant un temps d'incubation prolongé chez *Lb. rhamnosus* R. Cette étude a mis en évidence la présence des glycohydrolases intracellulaires. Ils ont supposé un effet possible des glycohydrolases sur la diminution de la viscosité dans le milieu, mais

aussi comme un clivage sur la masse moléculaire des EPS. Dans ce cas, Michaud *et al.* (2003), ont proposé certaines associations parmi des gènes impliqués dans la biosynthèse des EPS et des gènes qui codent pour les polysaccharases. En fait, la biosynthèse des EPS peut être dépendante du polysaccharide produit par la même bactérie. Ces gènes pourraient être impliqués dans le contrôle du poids moléculaire des EPS régulant la viscosité du milieu pour favoriser la diffusion des métabolites ou pour la libération des EPS.

1.7.1 Enzymes de dégradation d'EPS

Les enzymes glycohydrolases ou glucosidases et polysaccharides lyases sont fréquemment associés à la dégradation d'EPS chez les bactéries lactiques (Macura et Townsley, 1984, Cerning *et al.* 1988, Cerning, 1990, Gancel *et al.* 1994, Sutherland, 1990a; Dupont *et al.* 2000). Ces enzymes peuvent être localisés extra-cellulaire, en petite fraction periplasmique ou intra-cellulaire (cytosolique). Pham *et al.* (2000) ont mis en évidence la présence de six enzymes glycohydrolases: α -D-glucosidase, β -D-glucosidase, α -D-galactosidase, β -D-galactosidase, β -D-glucuronidase et α -L-rhamnosidase, qui sont libérés durant la phase de l'activité lytique de la souche *L. rhamnosus* R. Deux enzymes, α -D-glucosidase et β -D-glucuronidase, ont été partiellement purifiés. Quelques de ces enzymes sont des endo-enzymes, responsables de la formation des fragments de taille décroissante et d'autres sont des exo-enzymes qui hydrolysent des résidus de D-glucose ou des oligosaccharides successivement depuis la fin de la chaîne.

1.7.2 Cultures mixtes

Dans la nature, les communautés microbiennes sont associées réciproquement ou coopérativement (Rao *et al.* 2005). Ces associations peuvent présenter une exclusion par compétition, où une population cellulaire de haute densité est réduite par compétition avec une autre communauté. Cette compétition est attribuée à une perte de nutriments (Mc Kellar *et al.* 2000). La coculture a été considérée comme une compétition entre deux microorganismes ou plus, pour les nutriments dispersés dans un milieu de culture (Pilyugin

et al. 2004). Ce phénomène de coculture peut être utilisé pour une dégradation de polymères. Ceci a été démontré par Reardon *et al.* (2002) dans une étude d'un modèle cinétique de la dégradation des hydrocarbures aromatiques par *Pseudomonas putida* F1 et *Burkholderia* ssp. JS150, au moyen de la libération d'enzymes capables de dégrader les polymères. Dans cette étude, ils ont considéré que les effets de composés dans un mélange de substrats de carbone homologues sur la biodégradation d'un produit chimique peuvent être liés à l'induction des enzymes responsables de la dégradation. Ce phénomène de coculture a aussi été profitable pour augmenter la production d'EPS dans une étude réalisée par Simova *et al.* (2004), laquelle a permis d'observer une augmentation de la production d'EPS de 1.050 g/L à 19.3 g/L, dans une culture mixte de *Rhodotorula rubra* GED10, *S. thermophilus* 13a et *L. bulgaricus* 2-11, en indiquant que l'association entre deux souches, affecte non seulement la stimulation mutuelle du métabolisme mais également la stimulation du métabolisme d'un troisième microorganisme. De l'autre côté, les cultures mixtes pourraient sécréter certaines molécules inhibitrices, comme les bactériocines (Barrette *et al.* 2000), en inhibant la croissance d'une des souches associées qui ne pourrait pas participer correctement dans la dégradation d'EPS. Ainsi, la présence de compétition chez les microorganismes peut induire l'expression rapide de gènes de la phase stationnaire chez une des deux souches en culture (Duffy *et al.* 1995).

1.8. *Lb. rhamnosus* R et RW9595M: Biomasse et production d'EPS

Les souches *Lb. rhamnosus* RW9595M et *Lb. rhamnosus* R, proviennent de la collection de cultures du laboratoire de Génomique Microbienne de l'Institut des nutraceutiques et des aliments fonctionnels (INAF) de l'Université Laval (Sainte Foy, Québec, Canada). Ce sont respectivement une souche variante qui a été isolée à partir de sous-culture de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC-9595 (Manassas, VA, USA) de même que d'une culture commerciale de l'Institut Rosell (Montréal, Québec, Canada; Dupont *et al.* 2000). Dans le milieu minimum basal (BMM), *Lb. rhamnosus* RW9595M a démontré des concentrations très élevées en EPS produits (1275 mg/L, à 32 °C, pH 6.0), avec du lactose

ou du glucose (Dupont *et al.* 2000), et dans un milieu de perméat de lactosérum supplémenté la production maximale obtenue était de 2350 mg/L, à 37 °C, pH 6.0 à 18 h de culture (Macedo *et al.* 2002a, Bergmaier *et al.* 2003). Une production de 1750 mg/L d'EPS a été obtenue après 7 h de fermentation dans un système de cellules immobilisées et 1808 mg/L ont été également obtenues par une culture continue de 9 jours (Bergmaier *et al.* 2003). Aussi, Macedo *et al.* (2002b) ont testé la production d'EPS dans un milieu perméat de lactosérum avec des extraits de levure, des sels, des vitamines, des minéraux et contenant 7 % de lactose à 37 °C, pH 6.0, et ils ont obtenus 2767 mg/L d'EPS. Pham *et al.* (2000), ont rapporté que *Lb. rhamnosus* R présente une dégradation de 80% de l'EPS produit lorsqu'elle est cultivés dans le BMM à 37 °C, pH 6.0 dans du glucose ou du lactose durant 72 h.

1.8.1 Structure de l'EPS produit par *Lb. rhamnosus* R et RW9595M

Les structures primaires et les propriétés d'EPS produits par les deux souches *Lb. rhamnosus* R et *Lb. rhamnosus* RW9595M, ont été identifiées comme étant similaires pour les deux souches (Van Calsteren *et al.* 2002). La structure primaire de l'EPS est formée d'une molécule de pyruvate, de deux molécules de D-glucose, une molécule de D-galactose et quatre molécules de rhamnose (Fig. 2). La structure élucidée pour *Lb. rhamnosus* RW9595M et *Lb. rhamnosus* R est unique parmi les structures connues chez les bactéries lactiques, parce que les quatre résidus de rhamnose diffèrent avec le maximum de résidus retrouvés dans les autres structures. Par exemple, Landersjo *et al.* (2002) ont reporté une structure composée de quatre molécules de galactose, d'une molécule de glucose et d'une molécule de rhamnose à partir de *Lb. rhamnosus* ATCC 53103.

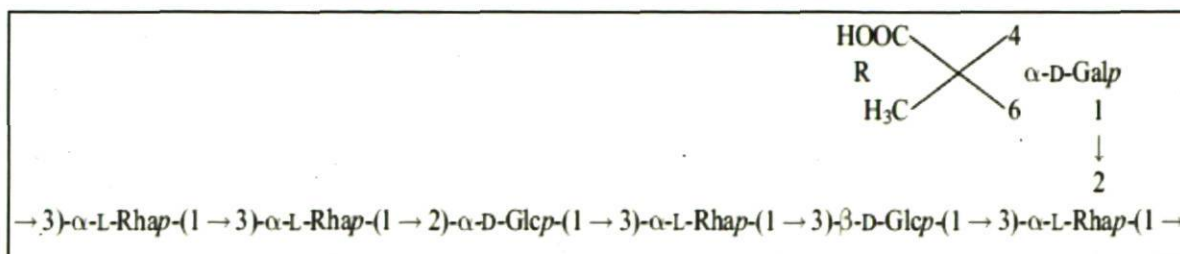


Figure 2. Structure de l'EPS produit par les souches *Lb.rhamnosus* RW9595M et *Lb. rhamnosus* R (Van Calsteren *et al.* 2002).

1.8.2 Fonction probiotique de *Lb. rhamnosus* RW9595M

Les probiotiques sont des microorganismes vivants associés à des effets favorables pour les humains et les animaux. Ces effets bénéfiques peuvent être le maintien d'une microflore intestinale équilibrée, la réduction des symptômes associés à une mauvaise digestion, la résistance aux micro-organismes pathogènes d'origine entérique et l'immunomodulation (FAO and WHO, 2006; Roy, 2005).

Les diverses espèces de *Lactobacillus* en plus d'être essentielles à l'industrie laitière par leur capacité de fermenter les hydrates de carbone pour donner de l'acide lactique comme produit final, elles sont aussi considérées comme des probiotiques. Les *Lactobacillus* sont des bactéries lactiques reconnues pour réguler la flore microbienne intestinale et pour aider à conserver un état gastro-intestinal plus sain (Roy *et al.* 1997). *Lb. rhamnosus* RW-9595M produit des EPS qui stimulent les cytokines pro-inflammatoires chez les splénocytes de souris, ainsi que dans les cellules mononucléaires du sang périphérique de plusieurs donneurs en bonne santé. Dans des conditions de stimulations *in vitro*, les EPS concentrés et fractionnés se sont montrés capables de stimuler la production d'interleukines TNF, IL-6, IL-12p40 après 6 h ou 24 h de culture. Après 24 h, 48 h et 72 h de culture, les EPS ont provoqué la production d'interféron gamma par des splénocytes de souris. L'EPS de *L. rhamnosus* RW9595M semble aussi aider une réponse immunitaire de type Th1. Les cytokines Th1, IL-12 et IFN semblent avoir un rôle prépondérant dans l'immunité cellulaire qui conduit à la résistance à la plupart des agents infectieux et pour réduire les manifestations de l'allergie (Provencher *et al.* 2003, Chabot *et al.* 2005). Les bénéfices potentiels de *L. rhamnosus* et ses allégations comme probiotiques chez l'homme et les animaux, respectivement, stimulent une utilisation croissante de ces microorganismes.

En parallèle, la production de fromages fonctionnels pourrait offrir certains avantages comme véhicule porteur des bactéries probiotiques. Les fromages qui ont des pH plus élevés que les laits fermentés peuvent fournir un milieu plus stable pour maintenir la survie à long terme des probiotiques. En outre, la matrice et la teneur élevée en graisses du fromage, peuvent protéger les probiotiques pendant le passage de l'appareil gastro-intestinal. Cependant, la majeure partie des travaux sur la production de fromages probiotiques a été menée à bien avec des bifidobactéries seules ou des cultures mélangées de bifidobactéries

et de *Lb. acidophilus* tandis que, *Lb. rhamnosus* a été rarement employé (Roy 2005). Les bactéries probiotiques n'altèrent pas le produit, peuvent augmenter le développement d'arômes dans les fromages frais et confère un caractère fonctionnel aux produits (Champagne *et al.* 2005).

1.9 PCR quantitative en temps réel (qPCR)

La technique basée sur l'amplification en chaîne par polymérisation (PCR) en temps réel est employée couramment pour l'étude de l'expression de gènes ainsi que pour la détection et la quantification microbienne (Furet *et al.* 2004, Kofla *et al.* 2007, Malorny *et al.* 2004, Rousselon *et al.* 2004) En comparaison à d'autres techniques conventionnelles telles que l'hybridation et les techniques PCR de base, la PCR en temps réel a non seulement une meilleure sensibilité, de même qu'une meilleure reproductibilité, mais elle est également plus rapide à exécuter avec un risque minimum de contamination. Elle facilite aussi la détection et la quantification des microorganismes en faibles concentrations (Espy *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2006).

1.9.1 Principe

La PCR en temps réel est une technologie de biologie moléculaire qui permet l'amplification logarithmique de copies courtes des bases d'ADN d'une plus longue molécule bicaténaire d'ADN. Elle est basée sur la détection et la quantification d'un émetteur ou reporteur fluorescent pendant le processus d'amplification (en temps réel) et l'augmentation du signal d'émission fluorescent est directement proportionnelle à la quantité des amplicons produits durant la réaction (Poitras et Houde, 2002). Ce reporteur fluorescent s'attache sur l'amplicon sans l'endommager et de cette manière, à chaque cycle l'amplification, il peut continuer la réaction. Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis de la réaction, donc plus il y a de matrice à amplifier au départ de la réaction PCR, moins élevé sera le nombre de cycles requis pour atteindre un point où le signal d'émission de

fluorescence sera statistiquement significatif, ce point plus élevé que le bruit de fond, est ainsi défini comme étant le cycle seuil (ou Ct). La nature de l'amplification est exponentielle, ce qui la rend attrayante pour des analyses quantitatives. Théoriquement, il existe une relation quantitative entre la quantité de la séquence cible de départ et la quantité du produit amplifié. Afin de recueillir ces données quantitatives avec précision, chacun des échantillons doit être analysé dans sa phase exponentielle d'amplification qui est la phase la plus reproductible en PCR (Applied Biosystems Guides 2004, a et b). Par conséquent, la quantification n'est pas affectée par l'épuisement des réactifs comme lors de la phase plateau, ce qui explique pourquoi le système en temps réel est si reproductible (Poitras et Houde, 2002). La valeur du Ct peut être traduite en un résultat quantitatif en le comparant avec les valeurs du Ct générées avec des matrices de quantification connues.

1.9.2 Types de techniques pour la détection

Des réactifs fluorescents utilisés pour la PCR quantitative en temps réel (qPCR) peuvent être classés en trois catégories: les agents se liant à l'ADN double brin tel que le SYBRGreen I, les sondes fluorescentes de séquences d'ADN spécifiques tels que les sondes TaqMan, les balises moléculaires (sonde d'hybridation en épingle à cheveux ou Molecular Beacons) et l'hybridation de deux sondes et les amorces d'ADN avec des séquences spécifiques, telles que les amorces Amplifluor, les amorces scorpion, le Light Upon Extension (LUX) primer et l'universal template. Ces types de détection pourraient avoir une sensibilité équivalente. Cependant, ces technologies présentent des différences au niveau de la spécificité. Parmi ces réactifs fluorescents, le SYBRGreen I et la sonde TaqMan sont le plus utilisés dans les applications de qPCR (Querci *et al.* 2007).

1.9.2.1 Agents se liant à l'ADN double brin

Les molécules qui se lient à l'ADN double brin peuvent être divisées en deux classes: les agents intercalants comme le bromure d'éthidium et le SYBRGreen. Leur émission fluorescente augmente lorsque qu'ils sont liés à l'ADN bicaténaire. Le SYBRGreen I, est l'agent le plus fréquemment utilisé, ses avantages sont:

- ✓ Il est facile à utiliser sans la complication que nécessite la conception de sondes fluorescentes,
- ✓ Il est économique en comparaison avec la technologie des sondes,
- ✓ Il peut être employé avec tout un ensemble d'amorces PCR. Étant donné que le SYBRGreen I se fixe à n'importe quelle molécule d'ADN double brin, sa spécificité repose entièrement sur ses amorces.

Cette technologie présente aussi certains désavantages:

- ❖ L'incapacité de distinguer l'ADN double brin de différents segments parce que le colorant s'intercale avec tout l'ADN double brin. Donc, il est impossible de discriminer durant la réaction, les différents amplicons spécifiques dans des expériences de multiplexage.
- ❖ La formation d'amorces dimères (mis-priming), qui peuvent affecter la sensibilité de détection, générant de faux positifs ou une surestimation de la quantification.
- ❖ L'amplification erronée de segments d'ADN non ciblés. L'émission de fluorescence peut être fautive par les différentes longueurs moléculaires de l'ADN amplifié. Ainsi, une conception précise d'amorce et l'optimisation des conditions de la PCR sont cruciales quand ces agents intercalants sont employés.

1.9.2.2 Sondes d'hydrolyse avec séquence spécifique

La sonde TaqMan (Hydrolysis probes TaqMan) est une chaîne linéaire d'oligonucléotide, avec une extrémité fluorochrome exonucléasique 5' appelée émetteur (reporter, ex. FAM : 6-carboxyfluorocein) et une extrémité 3' suppresseur de l'émission de fluorescence (quencher ex. TAMRA : 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine). La technologie TaqMan est basée sur l'activité exonucléasique 5'-3' de la Taq-polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée sur le segment cible de l'ADN (essai 5' nucléase PCR). Après la dénaturation de l'ADN, la sonde TaqMan s'hybride à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Après l'étape de dénaturation, la sonde TaqMan s'hybride sur la matrice cible d'ADN, ensuite durant l'extension de la PCR, la Taq-polymérase hydrolyse la liaison de la sonde sur la matrice d'ADN, les nucléotides de la sonde se détachent et l'émetteur est libéré dans la solution (Poitras et Houde, 2002,

Applied Biosystems Guides 2004 a et b). Ceci a comme résultat une augmentation de l'intensité de la fluorescence de l'émetteur due à sa séparation du suppresseur (quencher). Étant donné que les sondes libres en solution demeurent intactes, aucune fluorescence n'est émise et l'augmentation d'intensité de fluorescence est proportionnelle avec la quantité des amplicons générés.

1.9.2.3 Sondes TaqMan[®] MGB Probes

Applied Biosystems a mis sur le marché une technologie spéciale avec des sondes appelées TaqMan[®] MGB probes. Ces sondes sont un oligonucléotide conjugué parce qu'il est composé par trois éléments structurels : un émetteur fluorescente-5' (i.e. FAM[™] ou VIC[®]), un suppresseur non fluorescent en son extrémité 3' lié a une molécule stabilisant la température d'hybridation (Minor Groove Binder, MGB). Cette technologie augmente la température de fusion (T_m) de la sonde sur la matrice cible d'ADN, ce qui lui confère plus de stabilité d'hybridation, augmentant sa spécificité devant un mésappariement (Kutyavin *et al.* 2000). Profitant de cette propriété de stabilité de la sonde TaqMan[®] MGB, elle est idéale pour être utilisée dans des essais de la PCR 5' nucléase, tels que les analyses de l'expression de gènes, les essais de discriminations alléliques ou multiplex, et grâce à leur pouvoir discriminant, pour l'identification et la quantification de souches microbiennes (Applied Biosystems Guide, 2004b).

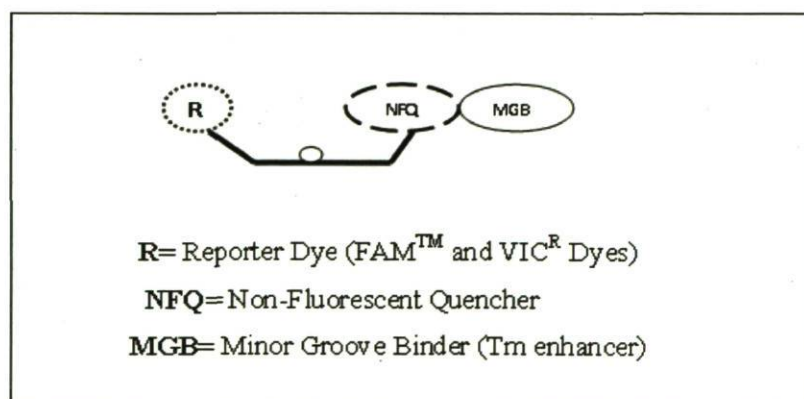


Figure 3. Structure de la Sonde TaqMan-MGB (illustration tirée sur le guide pour la quantification relative (Applied Biosystems Guide, 2004b).

1.9.3 Stratégies de quantification et d'analyses de données

Il y a trois approches à la quantification:

1. La quantification par la courbe absolue.
2. La quantification par la courbe relative
3. La quantification par la méthode comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Établir la stratégie de quantification est la principale étape pour la planification d'un essai de la PCR en temps réel (Peirson *et al.* 2003). La quantification est la mesure des quantités des oligonucléotides durant chaque cycle d'amplification de la PCR et ces oligonucléotides amplifiés peuvent être obtenus à partir des cibles de départ constitués d'ADN, d'ADNc ou d'ARN. À la fin de chaque réaction, l'intensité enregistrée de fluorescence (R_n) est employée pour estimer les résultats de la quantification, par le logiciel du système utilisé. Ainsi la définition du cycle seuil (C_t) est le cycle auquel une augmentation significative de ΔR_n est d'abord détectée. Alors, R_n (normalized reporter), est la valeur de l'intensité de la fluorescence émies, par l'émetteur divisé par l'intensité de la fluorescence d'une référence passive. La référence passive est un colorant qui fournit une référence interne à laquelle le signal du colorant de l'émetteur peut être normalisé pendant l'analyse de données. La normalisation est nécessaire pour corriger les fluctuations provoquées par des changements de concentration ou de volume dans la réaction (Huggett *et al.* 2005). Un colorant passif de référence est inclus dans tous les kits de réactif du PCR. Le ΔR_n est déterminé à partir de la différence entre R_{n+} et R_{n-} , où R_{n+} est la valeur de R_n d'une réaction contenant tous les composants (l'échantillon d'intérêt) et le R_{n-} est la valeur de R_n détectée pour la ligne de base (réaction sans matrice ADN ou ARN). Alors ΔR_n est un indicateur de l'importance du signal produit par la PCR et il est indispensable pour estimer le C_t .

1.9.3.1 Efficacité de l'amplification de la qPCR

L'efficacité de l'amplification de la réaction est un paramètre important pour l'estimation quantitative précise de l'augmentation. Ce paramètre peut être défini comme le nombre ou le taux de l'augmentation d'un amplicon, généralement il est exprimé comme une valeur de pourcentage. Si un amplicon particulier double en quantité pendant la phase géométrique de son amplification PCR, alors l'analyse de PCR a une efficacité de 100 %. C'est-à-dire que la quantité de produits de la réaction après n cycle est égale au nombre initial des molécules multiplié par 2^n : $N_n = N_0 2^n$

Où:

- n = est le nombre de cycles de la réaction
- N_n = est la quantité des produits à la fin de la réaction.
- N_0 = est la quantité du substrat au commencement de la réaction
- 2 = est le facteur d'efficacité optimum de la réaction.

Cette formule est valide en considérant que durant chaque cycle, l'amplification des molécules double. Cependant, les erreurs de manipulation pendant le pipetage, les impuretés d'ADN ou d'ARN, les fluctuations du processus d'hybridation des fragments d'ADN, entre autres, sont des facteurs qui affectent les résultats de l'amplification. Pour cette raison, il est primordial de faire des calculs appropriés de l'efficacité en examinant ces facteurs pour déterminer la qualité de l'essai du PCR quantitatif, Rebrikov *et al.* (2006), définissent l'efficacité du PCR de deux différentes façons, en considérant les fluctuations de l'efficacité:

$$N_n = N_0 E^n \quad \text{où } 1 < E < 2 \quad \text{b) } N_n = N_0 (1 + E)^n \quad \text{où } 0 < E < 1$$

Où E : est la valeur de l'efficacité et elle est égale ou différente à 2.

Ces deux manières expriment de différentes façons les résultats, par exemple la formule B exprime les résultats en pourcentages. Il y a trois principales méthodes pour déterminer l'efficacité 1) la méthode par des dilutions en série, 2) l'analyse individuelle du graphique du taux d'accumulation de la fluorescence dans la région exponentielle, 3) et le modèle mathématique pour décrire l'accumulation à partir de la dérive d'une courbe sigmoïdale.

Cependant la méthode de dilution en série est la plus utilisée par sa facilité. Cette méthode consiste à déterminer les valeurs de Ct, celles-ci sont obtenues à partir des dilutions des quantités connues d'ADN (C_{ADN}). Ensuite, on fait un graphique du $\log C_{ADN}$ vs. Ct, lequel donne une relation linéaire, dont l'équation est: $Y = -ax + b$

Alors, la pente du graphique $\log C_{ADN}$ vs Ct, est utilisé généralement pour estimer l'efficacité d'amplification d'une PCR en temps réel, elle est exprimée par l'équation :

$$E = [10^{(-1/a)} - 1] \times 100$$

Où a est la valeur de la pente. Une pente de - 3.32 indique une PCR avec une efficacité de 100% ($\log_2 10 = 3.3219$). Des pentes plus négatives que - 3.32 (ex. -3.9) indiquent que les réactions ont moins de 100% d'efficacité. Les pentes plus positives que -3.32 (par exemple de -2.5) peuvent indiquer des problèmes dans la qualité de l'échantillon (Rebrikov *et al.* 2006, Applied Biosystem guide).

1.9.3.2 Quantification absolue

La quantification absolue est la méthode qui détermine la quantité absolue d'une séquence cible en acides nucléiques dans un échantillon inconnu. Elle utilise des dilutions sérielles des standards de concentration connue pour générer une courbe standard et interpoler ces valeurs aux quantités inconnues des échantillons. La courbe standard est une relation linéaire entre la concentration d'ARN ou ADN et les valeurs de Ct produites par la qPCR. La conception de la courbe standard varie selon les essais. Gueimonde *et al.* (2004) ont quantifié des souches de *Bifidobacterium* dans les fèces humaines. Pour les courbes standards, ils ont dilué les cultures pures de *Bifidobacterium* dans une gamme de 10^4 - 10^9 cellules/mL et à partir de ces dilutions, l'ADN extrait qui était utilisé pour la qPCR. Le graphique de la courbe standard était fait en traçant les valeurs de Ct obtenues contre les UFC/mL déterminées par dénombrement sur plaque de la culture pure initiale pour chaque souche. Alors, ils ont estimé la concentration de cellules de *Bifidobacterium* dans les fèces, par comparaison des valeurs de Ct obtenus avec la courbe standard, ils ont aussi utilisé des dilutions sérielles d'ADN de cultures pures de *Lactobacillus thermotolerans* pour quantifier sa présence dans les fèces du poulet.

1.9.3.3 Quantification relative

L'essai de quantification relative est utilisé pour analyser les changements de l'expression des gènes cibles d'un échantillon comparé à un autre échantillon utilisé comme référence ou standard externe, appelé normalisateur. Dans cette méthode, les résultats sont exprimés comme le rapport de la valeur de l'échantillon sur la valeur du normalisateur. La quantité d'échantillon ciblé est déterminée par une courbe standard et divisé par la quantité de normalisateur ciblé dans la qPCR. Wong *et al.* (2005) ont résumé clairement les divers types de modèles mathématiques employés pour calculer l'expression normalisée des gènes dans les essais de quantification relative. Donc, en fonction du modèle utilisé, les résultats peuvent différer. Le tableau ci-dessous reproduit les méthodes présentées précédemment par Wong *et al.* (2005).

Tableau 1. Méthodes de quantification relative par PCR en temps réel tiré de Wong *et al.* (2005).

Methods (Reference)	Amplification Efficiency Correction	Amplification Efficiency Calculation	Amplification Efficiency Assumptions	Automated Excel-Based Program
Standard Curve (31)	no	standard curve	no experimental sample variation	no
Comparative C_t ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (21)	yes	standard curve	reference = target	no
Pfaffl <i>et al.</i> (26)	yes	standard curve	sample = control	REST ^a
Q-Gene (23)	yes	standard curve	sample = control	Q-Gene ^b
Gentle <i>et al.</i> (7)	yes	raw data	researcher defines log-linear phase	no
Liu and Saint (22)	yes	raw data	reference and target genes can have different efficiencies	no
DART-PCR (30)	yes	raw data	statistically defined log-linear phase	DART-PCR ^c

C_t , cycle threshold, DART-PCR, data analysis for real-time PCR; REST, relative expression software tool.
^awww.gene-quantification.info
^bwww.BioTechniques.com
^cnar.oupjournals.org/cgi/content/full/31/14/e73/DC1

1.9.3.4 Quantification par la méthode comparative $2^{-\Delta\Delta C_t}$

La méthode comparative de C_t est semblable à la méthode de la courbe standard relative, sauf qu'elle utilise des formules arithmétiques pour réaliser le même résultat que pour la quantification relative. (Livak *et al.* 2001, Suzuki *et al.* 2004). Kawada *et al.* (2004) ont déterminé les pourcentages des souches individuelles en cocultures, en utilisant une version simplifiée de cette méthode. Cette simplification consiste à normaliser le nombre de copies de la souche spécifique contre le nombre de copies de la coculture. Par exemple, N est égal au nombre de copies spécifiques de *Lb. rhamnosus* R ou de *Lb. rhamnosus* RW9595M relativement au nombre de copies *Lb. rhamnosus* R et de *Lb. rhamnosus* RW9595M ensemble dans la coculture. Le nombre de copies N est calculé selon la formule suivante:

$$N = 2^{\Delta C_t} = E+1^{(C_t(RW) - C_t(Mixte))}$$

Où: E, est égal à l'efficacité de la sonde. Si l'efficacité est 100% E est égal à 2.

ΔC_t est la soustraction des valeurs de C_t générées par la sonde spécifique moins les valeurs de C_t générées par la sonde mixte à un point du temps de la fermentation.

1.9.4 Gène *clpL* : cible spécifique

Les EPS excrétés par *Lb. rhamnosus* peuvent jouer un rôle crucial sur les activités du maintien de l'intégrité intestinale. Les activités sont l'adhérence à la muqueuse intestinale, une activité antagonique exercée contre des entéropathogènes, une modulation du système immunitaire, et une amélioration de la muqueuse gastrique et intestinale endommagées (Chabot *et al.* 2001). La présence d'EPS chez *Lb. rhamnosus* peut être dûe aux mécanismes que ces bactéries probiotiques utilisent pour survivre ou pour coloniser la muqueuse intestinale sous des conditions néfastes d'acidité du tractus gastro-intestinal. Ces probiotiques doivent aussi résister à une variété de stress liés aux procédés industriels et à l'entreposage (Lipinski, *et al.* 2003). Cependant, les mécanismes que les bactéries

probiotiques utilisent pour leur survie ou la colonisation du mucus intestinal sont encore mal compris. (Lebeer *et al.* 2007a, b). Les bactéries ont développé, pour l'adaptation et la survie, un système complexe de réponses aux changements environnementaux. L'acquisition de matériel génétique par l'intermédiaire d'éléments transposables est l'une des stratégies que les bactéries peuvent utiliser pour augmenter leur tolérance au stress. L'apparition de la résistance multi drogue parmi les bactéries pathogènes étant l'une des conséquences bien connues d'une telle transmission (Suokko *et al.* 2005, Frees *et al.* 2004). Par suite d'un stress, un ensemble particulier de protéines appelée *Clp family*, en plus des chaperonnes moléculaire et des protéases, sont produites (Varmanen *et al.* 2003).

Les chaperonnes moléculaires peuvent fonctionner dans des conditions physiologiques normales et de stress en empêchant le pliage prématuré ou en aidant le pliage approprié des protéines, alors que les protéases ATP-dépendantes dégradent celles qui ne peuvent pas être correctement pliées (Squires *et al.* 1992). Les gènes *clp* sont omniprésents chez les procaryotes et des eucaryotes (Sokolenko *et al.* 2002, Hoskins *et al.* 2002.)

Les éléments constitutifs de la famille de Clp-ATPase sont classifiés en se basant sur la présence d'une ou de deux domaines de liaison. La classe de protéine Clp 1 a deux sites de liaison, le ATP-1 et ATP-2 et, elles sont relativement importantes, avec une taille d'environ de 70 to 110 kDa. La taille de l'espace de séparation varie entre la région ATP-1 et ATP-2, de même que des régions spécifiques telles que ClpA, ClpB, ClpC, ClpD, ClpE et ClpL qui sont la base pour subdiviser cette famille des protéines Clp 1-ATPase. Les protéines de Clp de la classe 2, sont de taille plus petite comme les ClpX et ClpY, contenant seulement un site de liaison ATP (Frees *et al.* 2004). Chez *E. coli*, ces protéines sont composées par un ensemble de sous-unité de protéase-ATPase (ClpA, ClpB, ClpC, ClpE, ClpX) et une sous-unité protéolytique, ClpP (Suokko *et al.* 2005). La sous-unité ClpL- ATPase est présente dans ClpL chez *Lactococcus lactis*, ClpL chez *Bos taurus*, et ClpE chez *Bacillus subtilis* (Prof. Denis Roy travail en rédaction).

Soukko *et al.* (2005) ont caractérisé deux gènes *clpL* chez *Lb. rhamnosus* E-97800. Dans ce travail ils ont identifié deux gènes, appelés *clpL1* et *clpL2*, qui codent pour les protéines membres de la super famille d'ATPase AAA+. Tous les deux gènes, *clpL1* et *clpL2* sont induits par la chaleur. Cependant, le gène *clpL2* présente des éléments mobiles qui peuvent être déclenchés pendant l'incubation prolongée à température élevée. Ces corps mobiles,

selon cette étude, ne sont pas sur des plasmides, et il est possible que le gène *clpL2* peut être acquis par transfert horizontal. L'aspect le plus intéressant de ce travail, est la présence des deux systèmes de régulation des chaperonnes de choc thermique, la CtsR et la HrcA. Cette dernière, la HrcA a été remarquée pour la première fois dans la régulation de l'expression de la famille de gènes qui code la Clp/HSP100 de ATPase chez les organismes à Gram positif.

CHAPITRE II.

HYPOTHESE ET OBJECTIFS

2.1 Hypothèse:

À la fin d'une coculture prolongée de *Lb. rhamnosus* RW9595M et *Lb. rhamnosus* R productrices du même produit d'EPS, on obtiendra une diminution des poids moléculaires d'EPS comme conséquence de l'activité des enzymes libérées par lyse cellulaire de *Lb. rhamnosus* R.

2.2 Objectifs:

1. Caractériser le comportement de la dégradation d'EPS durant une fermentation prolongée avec des monocultures et une coculture de *Lb. rhamnosus* RW9595M et *Lb. rhamnosus* R, sous des conditions de contrôle du pH dans un milieu minimum basal *BMM*.
2. Caractériser le comportement de la dégradation d'EPS durant une fermentation prolongée avec des monocultures et une coculture de *Lb. rhamnosus* RW9595M et *Lb. rhamnosus* R, sous des conditions de contrôle du pH dans un milieu à base de perméat de lactosérum supplémenté (PLS).
3. Déterminer le poids moléculaire d'EPS par HPLC-SEC, durant la fermentation dans les milieux *BMM* et *PLS*.
4. Estimer la concentration cellulaire de deux souches individuellement durant la coculture par la méthode de quantification absolue par PCR en temps réel.

CHAPITRE III.

MATERIEL ET METHODES

3.1 Cultures bactériennes

Les souches *Lb. rhamnosus* R et RW9595M ont été obtenues de la collection de culture du professeur Denis Roy de l'Institut des nutraceutiques et des aliments fonctionnels (INAF), de l'Université Laval, (Sainte Foy, Québec Canada). Ces souches ont été isolées à partir d'un produit commercial de l'Institut Rosell (Montréal, Québec, Canada) et de *Lactobacilles rhamnosus* ATCC9595 respectivement. Cette dernière est une productrice très faible d'EPS.

3.1.1 Conservation des souches

Les souches *Lb. rhamnosus* R et RW9595M ont été pré-cultivées dans un bouillon MRS (Lactobacilli, MRS broth, EMD Germany) pendant 24 h, à 37 °C. Ensuite, les cultures ont été conservées à -80 °C dans une suspension de 7 % (v/v) de lait écrémé en poudre réhydraté et 10% (v/v) de glycérol.

3.1.2 Préparations des pré-cultures

Deux pré-cultures différentes étaient préparées à partir d'un vial lait-glycérol congelé pour chaque fermentation. Au départ, 200 µL (1%, v/v), d'un vial cryogénique décongelé ont été ajoutées à 20 mL de bouillon MRS (EMD) stérile et incubé à 37 °C pendant 16 h, suivi d'une deuxième préculture qui a été faite, dans les mêmes conditions. Cette dernière culture était inoculée à 1% (v/v) pour chaque fermentation.

3.2 Préparation du milieu BMM

Le BMM est un milieu minimal basal chimiquement défini, qui contient les vitamines, les sels, les acides aminés et les bases nucléotidiques pour la croissance des espèces de *Lactobacillus* (Morishita *et al.* 1981) et la production d'EPS. Ce milieu BMM est choisi pour limiter les interférences dans le dosage des EPS. Les ingrédients du milieu BMM sont décrits dans l'annexe III. Les constituants du milieu sont pesés avec une balance analytique et dissous un à un dans l'eau déionisée. Les sels et les vitamines ont été préparés séparément pour en faciliter la dissolution. Pour préparer le BMM supplémenté (BMM-S), le BMM a été

complété avec 25 mL de tryptone (40%) avant l'utilisation pour obtenir une concentration finale de 1.1 % de tryptone dans le milieu. La solution de tryptone pancréatique (EMD, Germany) à 40 % a été préparée en ajoutant 40 g de tryptone à 100 mL l'eau déionisée et stérilisée à l'autoclave pendant 15 minutes à 121 °C

3.2.1 Stérilisation

La stérilisation du fermenteur et du milieu de culture a été faite automatiquement, les conditions étaient: 120 °C pendant 15 minutes. Les vitamines ont été stérilisées par filtration.

3.3 Préparation du perméat de lactosérum supplémenté

La poudre de perméat de lactosérum (PL) a été fournie par Parmalat, Ontario Canada, elle contient 2.5 % de protéines, 80% de lactose, et 15 % d'humidité. Le perméat de lactosérum supplémenté (PLS) a été obtenu par réhydratation d'une poudre de perméat de lactosérum (8% w/v). Le pH était ajusté à 4.9 avec du HCl 6 N et le PL a été soumis à un traitement thermique à 121 °C pendant 15 minutes et par la suite, refroidi à 4 °C. Pour séparer les protéines précipitées, la suspension était filtrée avec des pré-filtres de 90 mm diamètre (Glass fibre AP25 Millipore). Le milieu de perméat de lactosérum supplémenté a été complété en ajoutant de 0.5 g/L MgSO₄ · 7 H₂O, de 0.05 g/L de MnSO₄ · H₂O et de 1 mL de Tween-80 et une deuxième fois stérilisée à 121 °C pendant 15 min. Il a été conservé à 4 °C et complété avec 25 mL de tryptone (40%) avant l'utilisation pour obtenir une concentration finale de 1.1 % de tryptone dans le milieu. Pour chaque fermentation, un litre de PLS frais a été préparé.

3.4 Conditions des fermentations

Les cinétiques de croissance et de production d'EPS de *Lb. rhamnosus* RW9595M et *Lb. rhamnosus* R ont été réalisées en culture pure et en coculture, en expérimentant deux milieux de culture, un milieu BMM (Morishita *et al.* 1981) supplémenté avec 1.1 % (v/v) de tryptone et un autre milieu PLS-S. Toutes les expériences ont été effectuées à un volume d'un litre dans un bioréacteur Bioflo III, (New Brunswick) de 1.5 litre, durant 72 h à 37° C, avec

agitation à 100 r.p.m. et avec un pH constant à 6.0 par addition d'une solution de NH_4OH .7N. Chaque expérience a été effectuée en trois répétitions. Pour les essais de monoculture dans le milieu BMM-S et dans le PLS-S, la concentration d'inoculum au départ de la fermentation était de 1 % (10 mL) pour chaque souche. Pour les essais en coculture, l'inoculum utilisé dans le milieu BMM-S étaient de 0.5 % (5 mL) pour chaque souche, tandis que les essais avec PLS, la proportion d'inoculum était de 0.1 % (1 mL) pour *Lb. rhamnosus* RW9595M et 0.9 % (9 mL) pour *Lb. rhamnosus* R. Dans tous les cas, le temps de fermentation était de 72 h et la prise de 25 mL d'échantillon a été faite à chaque 12 h. Des 25 mL de volume, 20 mL ont été utilisés pour le dosage et la purification d'EPS, 1 mL pour l'extraction d'ADN (par duplicata), 1 mL pour le compte viable (UFC/mL), (voir l'annexe I). Les lectures de densité optique (D.O.) ont été faites avec un spectrophotomètre (4040 LKB Biochrom, Novaspec II) à 600nm, pour les essais avec le BMM-S seulement.

3.4.1 Dénombrements microbiens

Un compte total dans le milieu MRS-agar (15% agar) (EMD chemicals, États-Unis) a été fait pour chaque temps d'échantillonnage. À partir des échantillons prélevés stérilement, des dilutions successives ont été faites dans une solution d'eau peptonée 0.1 % - NaCl 0.9 %. Chaque dilution en duplicata a été transférée à des boîtes de Pétri qui contiennent du MRS-agar. Ensuite, elles ont été incubées à 37 °C pendant 48 h en aérobiose. Les colonies formées ont été comptées et les moyennes ont été calculées pour obtenir les unités formant des colonies (UFC/mL).

3.4.2 Isolement et purification d'EPS

La purification d'EPS était effectuée selon la méthode décrite par Cerning *et al.* (1994), avec une légère modification. Pour chaque temps de prélèvement de 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h et 72 h, un échantillon de 20 mL de la culture a été immédiatement soumis à un traitement thermique de 100 °C en bain Marie pour 15 min. Ensuite, les cellules ont été

séparées par centrifugation à 12.000 x g pendant 30 min à 4 °C. Les EPS étaient précipités à partir du surnageant avec trois volumes de 95% d'éthanol à 4 °C pour 24 h et collectés par une deuxième centrifugation à 12,000 x g pour 20 min à 4 °C. Le culot d'EPS a été re-suspendu dans 20 mL d'eau dé-ionisée et placé dans une membrane à dialyse (MWCOs 3500 Da, Fisher, Scientific) durant deux jours à 4 °C, avec une agitation douce pour éliminer les sucres résiduels du milieu de culture et avec deux changements d'eau dé-ionisée par jour. Pour éliminer les protéines, le produit dialysé était lyophilisé et re-suspendu avec 10 mL d'une solution de TCA 10% (acide trichloracétique). Le précipité a été séparé par centrifugation à 12.000 x g pendant 20 min à 15 °C. Le culot a été lavé deux fois avec TCA 10% et le surnageant a été mis à dialyser pendant trois jours avec trois changement de l'eau dé-ionisée et après lyophilisé et re-suspendu dans l'eau dé-ionisée (voir annexe II). Le sucre total était mesuré par dosage avec la méthode au phénol-acide sulfurique (voir la section suivante).

3.4.3 Dosage d'EPS par la méthode phénol-acide sulfurique

Cette méthode consiste en l'hydrolyse des polysaccharides par acide sulfurique qui donne la formation de 5-hydroxyméthyl-furfural, qui en présence de phénol, produit une coloration orangée (Dubois *et al.* 1955). Chaque échantillon d'EPS lyophilisé a été dilué 10x et 1 mL de cette dilution a été placée dans un tube à essai en ajoutant 1 mL de phénol 5 % et complété avec 5 mL d'acide sulfurique concentré. Les tubes ont été agités et refroidis pendant 15 minutes dans l'eau à température pièce. La mesure de l'intensité de la couleur a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à 490 nm. Par chaque essai, une courbe standard a été tracée à partir de la solution standard de glucose avec des concentrations entre 20-120 mg/L. Les quantités d'EPS sont exprimées en milligrammes d'équivalent glucose par litre (mg/L) calculées selon la formule:

$$\text{EPS (mg/L)} = [C_{490\text{nm}}(\text{mg/L})] \times (\text{V.dialyse} / \text{V.surnageant}) \times \text{facteur de dilution}$$

3.5 Analyses du poids moléculaire d'EPS par HPLC-SEC

La structure de la molécule d'EPS produite pour les souches *Lb. rhamnosus* R et RW9595M contient des résidus de pyruvate dans ses unités répétitives (Van Calsteren *et al.* 2002). La nature acide de cet élément procure à cet EPS une molécule polaire semblable à d'autres polysaccharides comme la gomme xanthane. La gomme xanthane présente des changements de conformation moléculaire de désordonnée à ordonnée en fonction de la force ionique de la solution où elle se trouve, cette transition détermine la stabilité de la molécule. Une autre particularité de cette gomme est son poids moléculaire de $\sim 2 \times 10^6$ Da (Laneuville, 2004). Dues à ces caractéristiques physicochimiques de la gomme xanthane légèrement similaire à notre molécule d'EPS, elle a été choisie comme modèle pour la mise au point de la technique au HPLC-SEC. Dans notre approche, on a utilisé la gomme xanthane Keltrol F (lot no. 9D2192K, KELCO Co. San Diego, C), la phase mobile était composée d'une solution de NaNO_3 - NaN_3 , (0.1 M-0.05%) qui a démontré de bons résultats dans les essais avec la gomme xanthane (Laneuville, 2004). Le poids moléculaire d'EPS a été déterminé par chromatographie à perméation de gel dans un Injecteur automatique Waters 717+, une pompe Waters 600-MS (System Controller Waters 600-MS) et avec un détecteur refractomètre différentiel 2142 LKB BROWMA en utilisant une colonne de gel TSK-GEL G40000PW_{XL} 7.8 mm x 80cm de polymère (TosoHaasGmbH, Zettchring, Stuttgart, Germany) à 40 °C. La phase mobile a été utilisée à un débit de 0.5 mL/min durant 30 minutes. Un volume de 50 μL d'EPS d'échantillon a été injecté. Pour chaque expérience, une courbe de calibration a été tracée en utilisant une série de molécules de polysaccharides standard (Pullulan, Shodex P-82, polymaltotriose), de chaîne linéaire de 5.9×10^3 Da, 1.18×10^4 Da, 2.28×10^4 Da, 4.73×10^4 Da, 1.12×10^5 Da, 2.12×10^5 Da, 4.04×10^5 Da, 7.88×10^5 Da. Les résultats des temps de rétention étaient analysés par le logiciel Waters Millennium 3.2 Chromatography Manager (Waters, Canada). Les valeurs présentées sont données à titre d'équivalent pullulan.

3.6 Techniques de biologie moléculaire

3.6.1 Extraction d'ADN

La méthode pour l'extraction d'ADN de Vincent *et al.* (1998), a été adaptée avec la technologie phase-lock pour faciliter la purification et éliminer les difficultés générées par les concentrations d'EPS présents dans les cultures. Pour la mise au point de la technique de quantification par PCR en temps réel, les deux souches *Lb. rhamnosus* RW9595M et *Lb. rhamnosus* R ont été cultivées dans le PLS pendant 24 h à 37 °C, afin de simuler les conditions des essais de production d'EPS. Pour les expériences de séquençage, l'ADN génomique de chaque souche a été extrait à partir des cultures pures dans le milieu MRS à 37 °C pour 24 h. Les étapes à suivre pour l'extraction et la purification d'ADN sont détaillées dans l'annexe IV.

3.6.2 Séquençage du gène *clpL*

Les séquences publiées dans GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) avec les numéros d'accès AY659979 et AY659978 du gène *clpL* ont été confirmées pour les deux souches *Lb. rhamnosus* RW9595M et *Lb. rhamnosus* R. Ce séquençage a été fait dans le but de s'assurer de cibler un site polymorphique pour notre stratégie de PCR en temps réel quantitative, qui nous permet de discriminer les deux souches dans une culture mixte en même temps qu'une cible commune et deuxièmement, nous assurer aussi que le codon de terminaison localisé en position 1054 du gène *clpL* de *Lb. rhamnosus* R, était bien présent. En conséquence, les séquences des nucléotides de AY659979 et AY659978 (GenBank), correspondant au gène *clpL* étaient alignées et comparées avec le logiciel *Phylogenetic and molecular evolutionary analyses MEGA 4 version 4.0* (Tamura, Dudley, Nei, et Kumar, 2007), et différentes paires d'amorces de cible commune étaient choisies dans les régions conservées du gène *clpL*. Les amorces étaient analysées par le logiciel *Oligo-Analyzer Version 3.0* (www.idtdna.com). Le tableau 2 montre ci-dessous les amorces sélectionnées pour le séquençage.

Tableau 2. Paires d'amorces utilisées pour le séquençage.

Gène / Position	Amorce sens	Amorce anti-sens	Taille de l'amplicon	T _m °C
<i>clpL-Lb.rh</i> -130- 494	AGGTCCTTACACGCAGGTT	TGCGTGCCTGCTTCCAGAT	624 pb	57
<i>clpL-Lb.rh</i> 409 -995	GCGATTGTGAAGGGCAATGT	TCCAGTTCCACCTTGTCAC	586 pb	58 - 60
<i>clpL-Lb.rh</i> 801-1456	TCTGGAAGGCGTCAAGAAC	TATATTCGGACATATCTAC	655 pb	55

(*) Dans ce cas le T_m était à 58 °C chez *Lb. rhamnosus* RW9595M, et à 60 °C chez *Lb. rhamnosus* R

3.6.3 PCR

Tous les PCR ont été effectués sur thermocycleur Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400, (Norwalk, CT, USA) avec un volume de réaction de 50 µL composé par: 5 µL de 10x ThermoPol buffer (New England Biolabs, Pickering, Ontario Canada); 4 µL de dNTP (A, T, G, et C) à 10 mM (Roche, Canada); 2 µL de chaque amorce à 10 µM/µL (IDT, Coralville IA USA); 0.25 µL de Taq-polymérase à 1.25 U (New England Biolabs, Pickering, Ontario Canada); 35.5 µL de l'eau grade biomol. (Q-Millipore -stérile) et 1 µL d'ADN (25 ng/µL). Les conditions des cycles de la PCR étaient, un cycle à 94 °C pendant 1 min, pour la dénaturation de la matrice d'ADN; 35 cycles pour la dénaturation à 94 °C pendant 30 s ; pour l'hybridation des amorces à 57 °C pendant 30 s pour l'amorces *clpL-Lb.rh* -130- 494, (ou 58/60 °C pour l'amorces *clpL-Lb.rh* 409 -995, ou 55 °C pour l'amorces *clpL-Lb.rh* 801-1456); et 72 °C pendant 1 min pour la prolongation d'ADN. En finissant avec un cycle d'élongation finale de 72 °C pendant 5 min. Ensuite, les produits de la PCR ont été rapidement refroidis à 4 °C jusqu'à l'analyse. Les amplicons de la PCR ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2 % (Invitrogen Life Technologies, Carlsbed, CA, USA) dans 0.50x TAE Buffer contenant 40 mM de Tris-acétate, 1mM EDTA et ensuite, coloré avec du bromure d'ethidium et visualisé par photographie-UV sur un système d'analyses d'images Chemigenius² (Bio-Imaging System, Sygene, USA) en utilisant le logiciel Genesnap 6.00.26 (Sygene, USA).

3.6.4 Purification des produits PCR et réaction de séquence

Les fragments d'ADN produits par la PCR ont été purifiés à partir du gel d'agarose avec le kit Perfectprep® Gel Cleanup (Eppendorf, Hamburg, Germany). Ensuite, ils ont été quantifiés sur gel d'agarose 2 % dans 0.50x TAE Buffer. Les quantités des fragments ont été comparées avec l'échelle de poids moléculaire Low Mass Ladder (Invitrogen, USA). Les réactions de séquence ont été faites avec une modification du guide de BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA U.S.A.). Pour diminuer les coûts, le volume de la réaction PCR fut de 10 µL composé par: 0.5 µL de BDT ready Mix, 2 µL de tampon de séquençage (5x), 1 µL d'amorce (1.5 µM) et 6.5 µL d'ADN à 40 ng/mL et les conditions des cycles étaient: un cycle à 96 °C pendant 1 min; 25 cycles de 96 °C pendant 10s; 50 °C pendant 5s; 60 °C pendant 4 min, et ensuite refroidis à 4 °C. Ces fragments ont été purifiés avec le DyeEx 2.0 Spin kit (Qiagen, Canada), et après séchés au speed-vac (5301, Eppendorf, Germany), à 30 °C durant 25 min et ensuite resuspendus dans 10 µL de formamide (Applied Biosystems, CA, USA). Dans un thermocycleur, les fragments ont été dénaturés à 95 °C pendant 2 min et immédiatement refroidis sur la glace durant 5 min et postérieurement, ont été injectés dans le séquenceur.

3.6.5 Analyses des séquences

Les séquençages du gène *clpL* ont été exécutés dans un séquenceur ABI Prism 3100 et les alignements ont été analysés et édités avec les logiciels Sequencing Analysis Software v 5.1 (Applied Biosystems, CA, USA) et BioEdit Sequence Alignment Editor v 5.0.9 (Hall, T.A 1999), respectivement. En fonction du type de séquençage réalisé dans la position 801 et 1456 du gène *clpL* chez *Lb. rhamnosus* RW9595M et *Lb. rhamnosus* R, huit sites polymorphiques identifiés ont été proposés pour différencier les deux souches pendant la coculture. Le gène *clpL* présente une copie par cellule et des sites conservés entre les deux souches, ce qui nous permet de les utiliser comme un contrôle uniforme pour la quantification. Entre autres, la région localisée à la position -130 à 1000 du gène *clpL* chez *Lb. rhamnosus* RW9595M et *Lb. rhamnosus* R, a été utilisée pour la conception de la sonde contrôle, dû à la présence des régions conservées entre les deux souches. Les séquences de

nucléotides obtenues ont été comparées avec celles de Genbank (No. de référence AY659978 et AY659979) par la méthode Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), dont les pourcentages de similarité sont montrés dans l'annexe V.

3.6.6 Conception des amorces et des sondes TaqMan

Les amorces et les sondes TaqMan-MGB ont été conçues avec le logiciel Primer Express v.2 (Applied Biosystems, CA, USA) à partir des séquences obtenues par séquençage du gène *clpL* chez *Lb. rhamnosus* RW9595M et *Lb. rhamnosus* R. Dans le tableau 3, les séquences de chaque sonde sont présentées avec les paires d'amorces correspondantes. Tous les oligonucléotides étaient achetés chez Applied Biosystems (Foster City, CA. USA). Trois différentes sondes TaqMan-MGB ont été conçues, une pour cibler en commun les deux souches appelées arbitrairement sondes universelles (ou mixte) *clpL* RW/R, une deuxième sonde capable de cibler spécifiquement la souche *Lb. rhamnosus* RW9595M (sonde *clpL*-RW), et une troisième sonde spécifique pour la souche *Lb. rhamnosus* R (sonde *clpL*-R).

Tableau 3. Paires d'amorces et de sondes TaqMan-MGB utilisées pour la qPCR

Gènes	Amorces Sens	Amorces Antisens	Sonde Taqman-MGB
<i>clpLRW/R</i>	Position 281 CGGTGATTGGCCGTGATC	Position 339: CGTCCGCCGACTCAAAATT	Position 302-318: AAATTCAGGAACTGCC-FAM
<i>clpL-R</i>	Position 1134 : CGCAACCCCGAATGATG	Position 1196: GCATTCCGGTTTCCAAGCT	Position 1158-1171: AGCTGTCGAACGTT-FAM
<i>clpL-RW</i>	Position 1134: CGCAACCCCGAATGATG	Position 1196: GCATTCCGGTTTCCAAGCT	Position 1157-1171: CAGCTGTTGAACGTT-FAM

3.6.7 Spécificité des amorces: Essai de la courbe de dissociation

Une courbe de dissociation a été réalisée avec la finalité de déterminer la température de dissociation spécifique pour chaque paire d'amorces. Cet essai de spécificité des amorces est basé sur la détection des amplicons avec le SYBRGreen durant la PCR en temps réel. Dans cette réaction, le SYBRGreen détectera n'importe quel ADN comme des amorces dimères, des mésappariements ou quelques produits contaminants dans la PCR. En conséquence, on a

procédé pour exécuter la PCR en temps réel avec l'ADN de chaque souche extrait selon le protocole de l'annexe IV. Les conditions de la réaction ont été réalisées en accord avec les instructions du guide *Absolute Quantification : Getting Started Guide.*, Applied Biosystems, 2005. La qPCR avec SYBR®Green a été faite en duplicata et elle était composée par 12.5 µL SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), 1.125 µL des amorces sens à 20 µM (concentration final 900 nM), 1.125 µL des amorces antisens à 20 µM (concentration final 900 nM), 7.25 µL l'eau, et 3 µL ADN. Le volume total de la réaction était de 25 µL, et les cycles de la réaction étaient : 1 cycle à 95 °C pendant 10 min, 40 cycles à 95 °C pendant 15s, 60 °C pendant 1 min, et ajoutant 1 cycle pour la dissociation à 95 °C pendant 15 s, 60 °C pendant 1 min et 95 °C pendant 15s. Les courbes de dissociation ont été tracées dans un graphique par le logiciel *Sequence Detection Software v.1.2.3* (Applied Biosystems, CA, USA).

3.6.8 PCR quantitative en temps réel (qPCR)

L'ADN a été extrait à partir de 1 mL de chaque dilution (courbes standard), ou de 1 mL d'échantillon à partir des monocultures ou cocultures (expériences), et soumis à des amplifications dans le 7500 Real-Time PCR Systems, (Applied Biosystems, CA, USA). La qPCR a été effectuée dans une plaque de 96 puits à un volume de 25 µL contenant: 12.5 µL Taqman® Universal PCR Master Mix, 1.125 µL des amorces sens à 20 µM (concentration final 900 nM), 1.125µL des amorces antisens à 20 µM (concentration final 900 nM), 0.625 µL 10 µM (concentration final 200 nM) des sondes Taqman-MGB, 8.625 µL d'eau, et 1 µL d'ADN. Les cycles de la réaction consistent en 1 cycle à 95 °C pendant 10 min pour activer l'enzyme AmpliTaq Gold®, 40 cycles à 95 °C, 15s pour la dénaturation et 60 °C, 1 min pour l'élongation et l'hybridation. Toutes les amorces, les sondes Taqman-MGB et le Master Mix ont été achetés chez Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Pour cet essai, la valeur de Ct est définie comme le nombre auquel la fluorescence devient détectable au-dessus du bruit de fond et elle est inversement proportionnel au logarithme de la quantité initiale de la matrice d'ADN dans la réaction. Le Ct était détecté et enregistré par le logiciel *Sequence Detection Software v.1.2.3* (Applied Biosystems, CA, USA).

3.6.8.1 Traçage de la courbe absolue et estimation de l'efficacité

Pour le traçage de la courbe standard, une culture pure en 20 mL en PLS a été préparée pour chaque souche de *Lb. rhamnosus* R et RW9595M et ces cultures ont été diluées en série 6 fois dans le PLS (Fig. 21 de l'annexe VI). La concentration cellulaire des cultures et des dilutions a été déterminée par dénombrement sur plaque de MRS-agar et les résultats étaient donnés en UFC/mL. La courbe standard absolue a été tracée pour chaque sonde (sonde clpL RW, sonde clpL R, et sonde universel clpL RW/R) en utilisant les valeurs de la concentration cellulaire (UFC/mL) et les valeurs de Ct générées depuis l'amplification des quantités connus d'ADN correspondant aux dilutions. À partir de ces données, des courbes de calibration ont été tracées correspondant aux monocultures de chaque souche de *Lb. rhamnosus* RW9595M ou de *Lb. rhamnosus* R. L'efficacité a été calculée pour chaque essai avec la formule suivante : $E = [10^{(1/\text{pente})} - 1] \times 100$. La courbe standard pour la sonde mixte a été obtenue selon Gueimonde *et al.* (2004). Les résultats de Ct obtenus séparément des deux souches (en utilisant la sonde mixte), ont été tracés contre le nombre de cellules par dilutions dans une régression multilinéaire. Pour mesurer la viabilité d'essai de la courbe pour la sonde mixte, nous avons aussi tracé une courbe standard individuelle pour chaque souche.

3.6.9 Quantification de l'ADN bicaténaire par la méthode de PicoGreen®

Afin de valider l'extraction d'ADN de chaque dilution des cultures pures, l'ADN extrait a été quantifié par la méthode picogreen (Molecular Probes, USA). Pour cet essai, il s'agit de faire réagir l'échantillon d'ADN avec un réactif fluorescent intercalant comme le picogreen, mesurer son émission et estimer la concentration comparée avec une courbe standard (BMG labtechnologies, Allemagne). Le jour de l'expérience, une dilution de picogreen 1:200 dans une solution de 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5 (TE) a été préparée. Pour générer une courbe standard de 1 ng/mL à 1 µg/mL, il faut diluer la solution d'ADN de 2 µg/mL dans le tampon TE, dans une plaque de 96 puits (ou alternativement, dans les tubes à essai en plastique). La réaction Picogreen était faite avec : 99 µL de TE (1x) plus 1 µL (ADN

échantillon) et 100 μL de picogreen. La lecture était faite dans un spectrophotomètre Biophotometer (Eppendorf,USA). L'essai a été vérifié par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1 % et observé à l'aide du Gel Chemigenius2 (Syngene, États-Unis).

Tableau 4. Volumes pour la conception de la courbe standard Picogreen

[ADN]_{final} échantillon	ADN (ng) échantillon	Volume TE 1x (μL)	Volume ADN Standard à 2$\mu\text{L}/\text{mL}$	Volume picogreen
1000 ng/mL	200	0	100 μL	100 μL
750 ng/mL	150	25	75 μL	100 μL
500 ng/mL	100	50	50 μL	100 μL
250 ng/mL	50	75	25 μL	100 μL
100 ng/mL	20	90	10 μL	100 μL
50 ng/mL	10	95	5 μL	100 μL
20 ng/mL	4	98	2 μL	100 μL
0 ng/mL	0	100	0 μL	100 μL

CHAPITRE IV.

RÉSULTATS ET DISCUSSION:
CULTURES SUR LE MILIEU BMM SUPPLÉMENTÉ

4.1 Cinétiques de production de biomasse et d'EPS à partir des monocultures

Dans ces expériences, nous avons voulu, premièrement, nous assurer de la potentialité de la souche *Lb. rhamnosus* RW9595M à produire des EPS dans une culture batch. Notre finalité était de connaître les conditions optimales de la culture et de production d'EPS dans un milieu minimum basal supplémenté, dont les constituants n'interfèrent pas dans le dosage des EPS produits, en plus de respecter les exigences en nutriment (Vaningelgem *et al.* 2004, Lebeer *et al.* 2007a). Bien que la souche *Lb. rhamnosus* RW9595M soit bien connue par une production élevée d'EPS, un milieu BMM-S avec tryptone à 1.1 % a été utilisé dans une culture batch à 37 °C, une agitation de 100 r. p. m. et avec un pH constant à 6.0 par addition de NH₄OH 7N. Après 24 h de fermentation, une biomasse maximale de 1.12×10^9 UFC/mL a été obtenue tandis que la production d'EPS était de 1,690 mg eq. glucose/L. La phase de déclin commence après 24 h avec une chute bien accentuée de 6.31×10^8 UFC/mL à 9.35×10^7 UFC/mL aux temps 48 h, 60 h et 72 h. Cependant la production d'EPS continue et elle n'est pas affectée par la diminution du nombre de cellules. Dans notre cas, la biomasse n'augmente pas plus que d'environ 2.5 unités logarithmes: de -10^7 UFC/mL à -10^9 UFC/mL, même avec la supplémentation de 1.1 % de tryptone dans le milieu BMM (Fig. 4).

Pour les cinétiques de la souche *Lb. rhamnosus* R, les essais ont été faits sous les mêmes conditions de fermentation que pour la souche *Lb. rhamnosus* RW9595M. Comme on peut l'observer, la souche *Lb. rhamnosus* R manifeste un maximum de biomasse après 24 h avec 1.18×10^9 UFC/mL, et un déclin à 9.77×10^8 UFC/mL après 48 h, qui équivaut à une réduction de 17 % de la biomasse dans un intervalle de 24 h. Cependant après cette diminution, on observe une augmentation de 9% de la biomasse durant les 12 h suivantes. À 60 h de fermentation, on observe la production d'EPS la plus élevée à 497 mg eq. glucose/L. À 72 h, la biomasse entre complètement dans la phase de mort cellulaire et la concentration d'EPS décline à 285 mg eq. glucose/L ce qui équivaut à une réduction 42.6 % par rapport à la concentration maximale (Fig. 5).

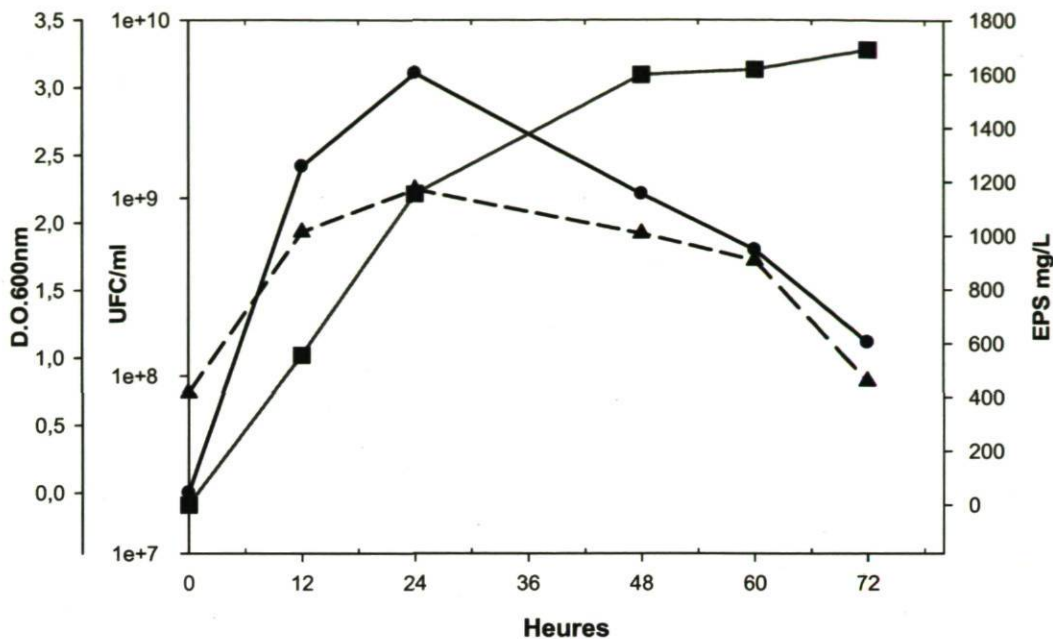


Figure 4. Cinétique de croissance et de production d'EPS de *Lb. rhamnosus* RW9595M dans le milieu BMM-S. (▲) UFC/mL (●) D.O._{600nm} (■), concentration d'EPS en mg eq. glucose/L. Dans l'annexe VIII se montrent les données et les écarts-type des trois répétitions.

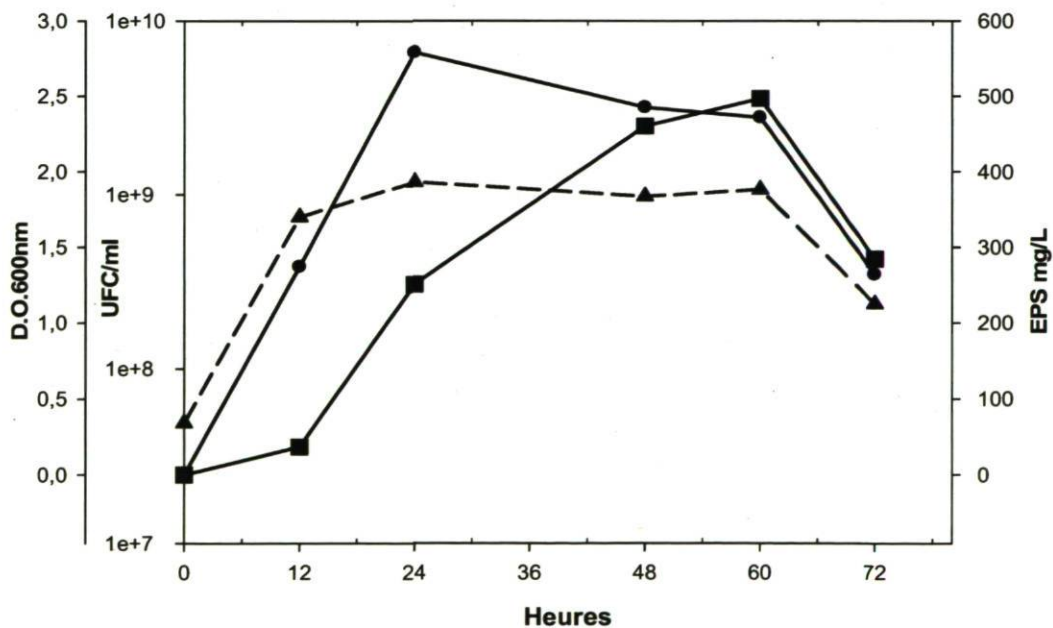


Figure 5. Cinétique de croissance et de production d'EPS de la souche *Lb. rhamnosus* R dans le milieu BMM-S. (▲) UFC/mL (●) D.O._{600nm} (■), concentration d'EPS en mg eq. glucose/L. Dans l'annexe VIII se montrent les données et les écarts-type des trois répétitions.

4.2 Cinétiques de production de biomasse et d'EPS à partir des cocultures

La coculture, avec les souches *Lb. rhamnosus* R W9595 et *Lb. rhamnosus* R, a été effectuée en conservant les paramètres et les conditions de contrôle des fermentations en culture pure, ceci avec la finalité d'utiliser les résultats des cultures pures comme référence. La coculture a été faite avec un inoculum de 0.5% (v/v) pour chaque souche, ce qui donne une concentration totale de 1 % (v/v) d'inoculum au départ de la fermentation dans un volume final de 1 L de milieu. La biomasse a atteint son maximum après 24 h de fermentation et elle était de 1.91×10^9 UFC/mL. Par la suite, la phase de déclin commence à être prononcée, entre 24 h et 60 h, pour arriver à une diminution importante à la fin des 72 h (4.33×10^7 UFC/mL). Par contre, la production d'EPS est plus élevée à 48 h (1447 mg eq. glucose/L), et alors, après 72 h, la concentration d'EPS est rendue à 919 mg.eq. glucose/L, en exhibant une diminution de la concentration d'environ de 36.5 % par rapport à la concentration maximale (Fig. 6).

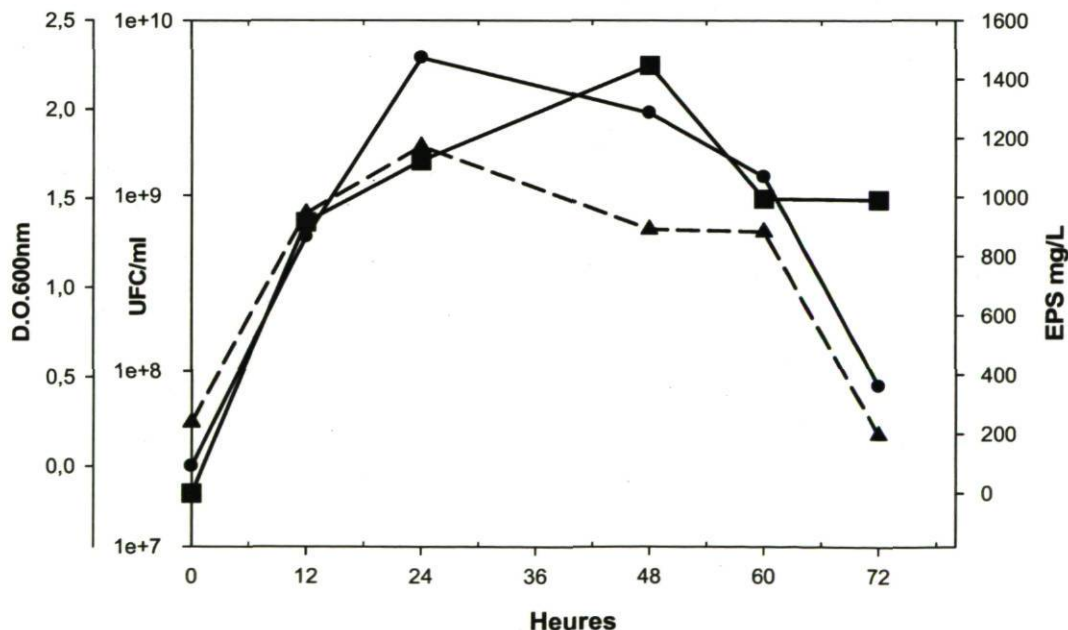


Figure 6. Cinétique de croissance et de production d'EPS de la coculture de *Lb. rhamnosus* R et RW9595M dans le milieu BMM-S. (▲) UFC/mL (●) D.O._{600nm} (■), concentration d'EPS en mg eq. glucose/L. Dans l'annexe VIII se montrent les données et les écarts-type des trois répétitions.

4.3 Analyse par HPLC-SEC de la cinétique du poids moléculaire d'EPS produits durant les monocultures et les cocultures

Les cinétiques du poids moléculaire d'EPS ont été faites par HPLC-SEC, dans le but d'estimer les divers poids moléculaire produits pendant la croissance cellulaire au cours des essais de culture et de coculture. Grâce aux paramètres décrits (voir matériel et méthodes), un protocole HPLC-SEC a été mis au point pour l'obtention de pics chromatographiques bien définis. Pour tous les essais, une courbe de calibration des temps de rétention, en utilisant le standard de pullulan, a été utilisée pour estimer le poids moléculaire. Chaque standard a été injecté en mélange de trois pour tester la capacité de définition et de séparation des pics chromatographiques. Les résultats des temps de rétention et les pics du standard Pullulan sont présentés dans la Fig. 25 et 26 de l'annexe VII. Dans le tableau 5, sont présentées les moyennes statistiques des temps de rétention et les poids moléculaires du EPS produit dans chaque culture, ces données ont été calculées à partir de la courbe de calibration.

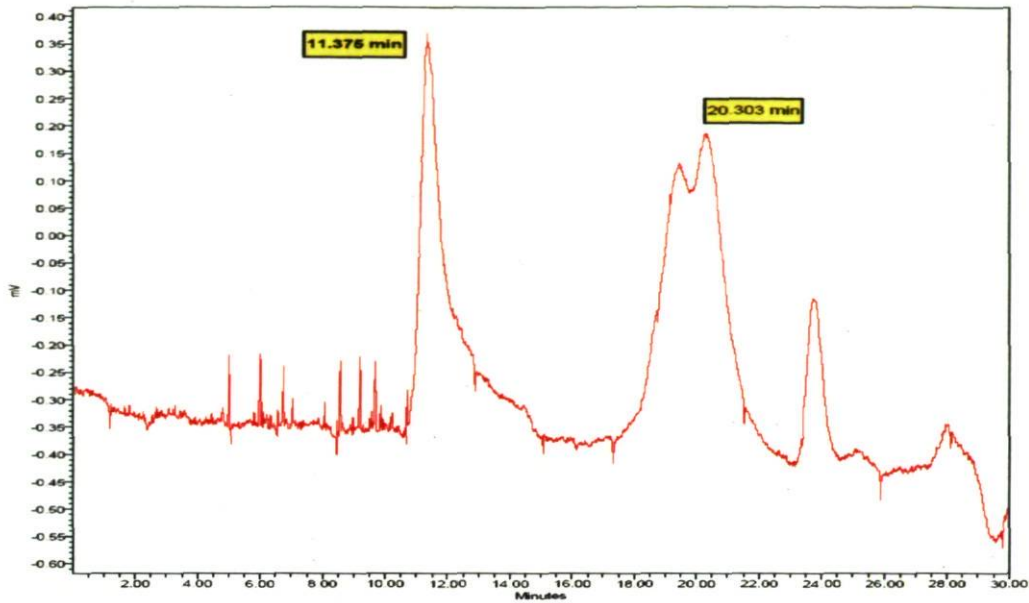
La Fig. 7 montre les chromatogrammes de pics de l'EPS produits par la souche *Lb. rhamnosus* RW9595M. Durant les 72 h de culture, le poids moléculaire d'EPS reste stable autour d'une moyenne de 1.67×10^6 Da. Par contre, dans les cultures de la souche *Lb. rhamnosus* R, le poids moléculaire a été de 9.16×10^4 Da (16.36 minutes) après 12 h, ensuite une diminution à 5.82×10^4 Da a été observée après 48 h, en arrivant après 72 h à un poids moléculaire à 5.48×10^4 Da, ce qui caractérise la légère diminution du poids moléculaire pendant la durée de la fermentation (Fig. 8). Dans le cas de la coculture, un pic dominant bien défini à 11.4 minutes avec un poids moléculaire de 1.69×10^6 Da est observée après 12 h de fermentation. Si on observe minutieusement, dans la Figure 10 (marquée dans un cercle), on trouve un petit pic à 15 minutes, qui pourrait être présent dans la région des pics produits par la souche *Lb. rhamnosus* R. Après 48 h, deux fractions différentes, une de 1.71×10^6 Da et l'autre de 8×10^5 Da apparaissant dans la région des 15 minutes sont encore présentes (Fig. 9b). À la fin des 72 h, quatre fractions sont présentes, la première de 1.38×10^6 Da, la deuxième de 7.54×10^5 Da, la troisième de 4.7×10^5 Da et enfin un dernier pic de 1.9×10^5 Da moins perceptible, mais toujours

présent (Fig. 9c). De plus, d'autres petites fractions entre $\sim 1 \times 10^3$ Da et $\sim 1 \times 10^4$ Da sont toujours observées dans toutes les cultures ainsi que l'apparition d'un pic semblable à ceux observé à la Fig. 8 pour *Lb. rhamnosus* R.

Tableau 5. Distribution de poids moléculaire des EPS à partir des monocultures et la coculture dans le milieu BMM-S. FI, FII, correspondent aux deux fractions d'EPS dominantes.

Mono- ou coculture de <i>Lb.</i> <i>rhamnosus</i>	Temps de Prélèvement (Heures)	Temps de Rétention (minutes)		Poids Moléculaire (Da)	
		FI*	FII*	FI*	FII*
RW9595M	12	11.37	20.30	1.74×10^6	8.69×10^3
	24	11.40	19.37	1.71×10^6	1.51×10^4
	48	11.61	19.45	1.52×10^6	1.43×10^4
	72	11.43	19.22	1.70×10^6	1.65×10^4
R	12	16.33	20.40	9.16×10^4	8.16×10^3
	48	17.10	20.41	5.82×10^4	8.12×10^3
	72	17.20	20.39	5.48×10^4	8.23×10^3
RW9595M+R	12	11.42	19.33	1.69×10^6	1.64×10^4
	24	11.76	19.23	1.71×10^6	1.64×10^4
	48	11.42	12.10	1.69×10^6	$8,00 \times 10^5$
			19.40		1.46×10^4
	72	11.63	12.20	1.38×10^6	1.07×10^6
13.01			6.02×10^5		
		15.01		1.9×10^5	

a)



b)

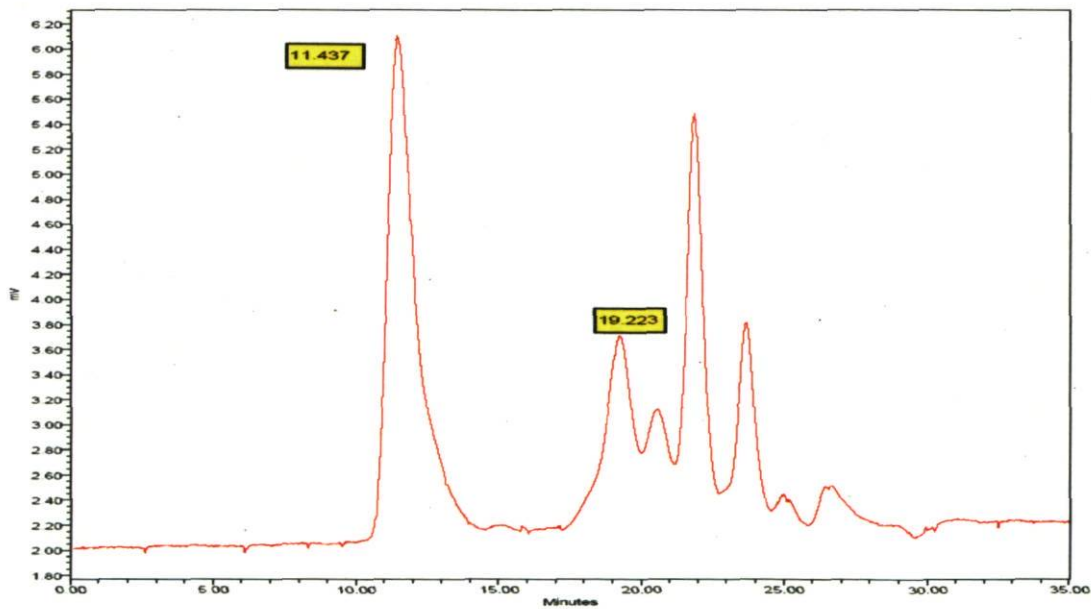


Figure 7. Profils chromatographiques par HPLC-SEC des EPS isolés à partir de la monoculture de *Lb. rhamnosus* RW9595M dans le milieu BMM-S. Les Figures (a) et (b) illustrent la stabilité du poids moléculaire d'EPS durant les étapes initiale et finale de la fermentation (11.4 min correspond à un poids de $\sim 1 \times 10^6$ Da). **a)** prélèvement à 12 h initial **b)** 72 h final de la fermentation.

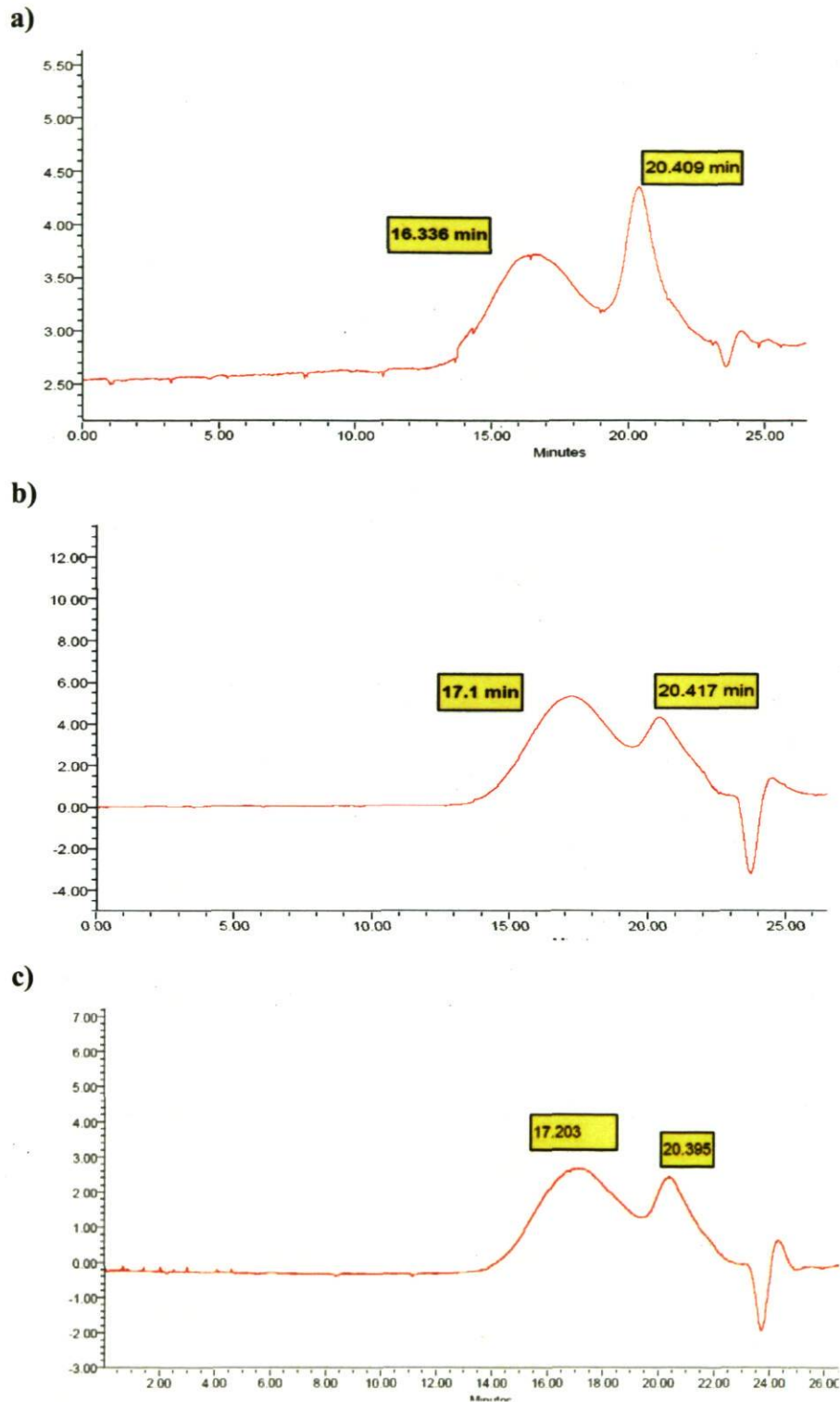


Figure 8. Profils chromatographiques par HPLC-SEC des EPS isolés à partir de la monoculture de *Lb. rhamnosus* R dans le milieu BMM-S. Les Figures (a), (b) et (c) illustrent la variation du poids moléculaire d'EPS : $\sim 1 \times 10^5$ Da (16.3 min de rétention) à 12 h et de $\sim 1 \times 10^4$ Da (17.2 min de rétention) à 48 h et 72 h de fermentation, respectivement.

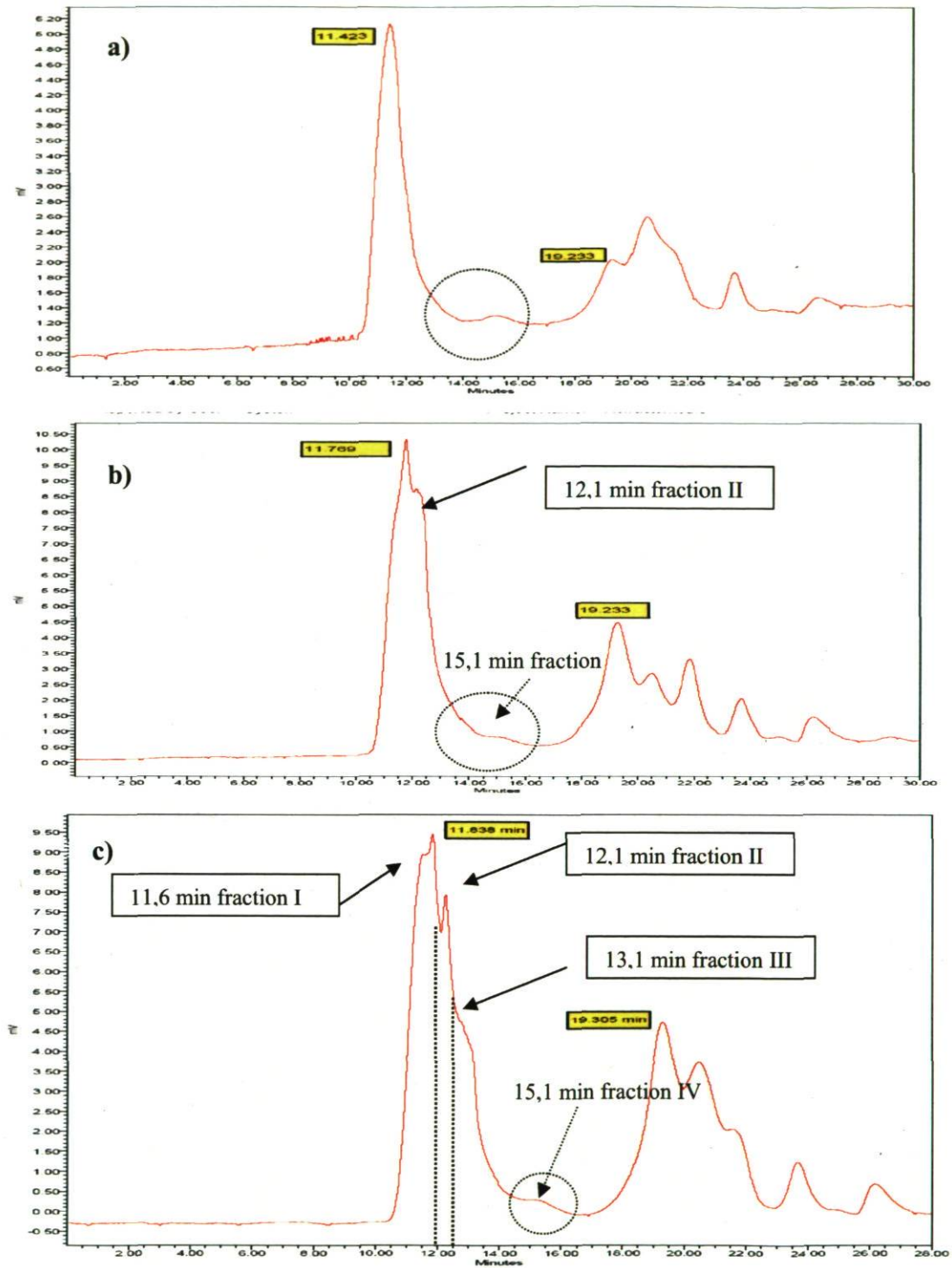


Figure 9. Profils chromatographiques par HPLC-SEC des EPS isolés à partir de la coculture de *Lb. rhamnosus* R et RW9595M dans le milieu BMM-S. Les Figures (a), (b) et (c) montrent les échantillons des 12 h, 48 h et 72 h respectifs à la cinétique de la culture. Dans la Figure (c) identifiée par une ligne verticale ou un cercle, les quatre différentes fractions d'EPS sont montrées: 1.71×10^6 Da (11.6 min), 8×10^5 Da (12.1 min), 4×10^5 Da (13.1min), 1.4×10^5 Da (15.1min).

4.4 Discussion

En premier lieu, ces essais prouvent que le système de la coculture pour la production de diverses fractions d'EPS à partir des deux souches productrices est réalisable. Pour relever ce défi, une approche de HPLC-SEC a été mise au point. En plus, un milieu minimum basal supplémenté avec tryptone 1.1 % a été testé dans des conditions de monoculture comme référence pour la conception d'un modèle de coculture. Nos résultats de la production d'EPS avec *Lb. rhamnosus* RW9595M, démontrent qu'elle est une souche stable et hautement productrice d'un EPS de poids moléculaires de 1.34×10^6 Da avec une concentration finale d'EPS dans le milieu fermenté, de 1690 mg eq. glucose/L obtenue sous des conditions prolongées de fermentation à pH 6. De plus, la production de la biomasse n'est pas directement reliée à la production d'EPS. Le milieu BMM supplémenté a un effet sur l'augmentation de la densité en biomasse (1.12×10^9 UFC/mL) en comparaison avec la densité cellulaire obtenue dans les essais avec BMM sans tryptone. Ces résultats sont en accord à ceux reportés antérieurement (Dupont *et al.* 2000, Macedo *et al.* 2002a, b, Bergmier *et al.* 2003). D'autre part, la monoculture de la souche *Lb. rhamnosus* R soumise à des conditions semblables de fermentation prolongée, dégrade 42.6% du total de la concentration d'EPS produits (de 496 mg eq. glucose/L à 285 mg eq. glucose/L. Pham *et al.* (2000) ont démontré que la souche *Lb. rhamnosus* R présente un phénomène de dégradation du poids moléculaire de ses EPS produits (1.4×10^6 Da à 2.5×10^4 Da) après une fermentation prolongée de 72 h à pH 6.0 en utilisant le milieu BMM et que cette dégradation a un effet sur le dosage d'EPS. Selon ces auteurs, la dégradation est causée par l'activité des glycohydrolases libérées par l'autolyse de la souche *Lb. rhamnosus* R. Dans notre étude, le poids moléculaire le plus élevé obtenu pour la souche *Lb. rhamnosus* R était de 9.16×10^4 Da, tandis que durant la phase de déclin, le poids moléculaire diminue légèrement à 5.48×10^4 Da. En comparant nos résultats avec ceux obtenus par Pham *et al.* (2000), et en se basant sur le poids moléculaire, il est possible de suggérer que la dégradation d'EPS est présente dès le début de la fermentation dans le milieu de culture supplémenté avec tryptone.

Ce phénomène de diminution du poids moléculaire d'EPS, a été testé en coculture faite avec les souches *Lb. rhamnosus* RW9595M et *Lb. rhamnosus* R.

Dû au fait que les interactions microbiennes peuvent être bénéfiques (protocoopération) ou antagonistes (compétition), il est important d'établir des combinaisons adéquates d'inoculum, (Vinderola *et al.* 2002). En conséquence, la coculture a été inoculée avec 5 mL (0.5 %) de chaque préculture avec une densité cellulaire initiale en concentrations similaires pour les deux souches (2.09×10^7 UFC/mL et 1.03×10^7 UFC/mL), dans un milieu BMM supplémenté dans une fermentation prolongée de 72 h. La coculture a produit des fractions de poids moléculaire élevée prédominantes ($1.61 \pm 0.16 \times 10^6$ Da) et une gamme de petites fractions de poids moléculaire inférieur (1.9×10^5 Da, $\sim 1 \times 10^4$ Da, $\sim 1 \times 10^3$ Da). Le pic à 11.6 minutes ($\sim 1 \times 10^6$ Da), est fortement semblable aux produits par *Lb. rhamnosus* RW9595M. Tangiblement, des pics de 12.1 min. et 13.1 min. sont aussi bien définis, ces pics ne se trouvent pas dans les profils des monocultures. Également, le dosage d'EPS dans la coculture met en évidence un phénomène de dégradation d'EPS mais, avec une diminution de 31.5% de la concentration d'EPS (1447 mg eq. glucose/L à 991 mg eq. glucose/L). Ceci nous amène à supposer que la dégradation d'EPS de poids moléculaire élevé de la souche *Lb. rhamnosus* RW9595M a été effectuée par l'action des glycohydrolases libérées par la lyse de *Lb. rhamnosus* R. Alors, il est essentiel d'établir une méthode moléculaire qui nous permet de quantifier la souche dominante durant la coculture. En conclusion, cette coculture peut avoir un avantage biotechnologique pour la conception de nouveaux produits laitiers où les molécules d'EPS peuvent jouer un rôle sur les propriétés rhéologiques (Welman et Maddox 2003a, Hassan *et al.* 2004, Ruas Madiedo *et al.* 2005b).

CHAPITRE V.

RÉSULTATS ET DISCUSSION: CULTURES SUR LE MILIEU PL SUPPLÉMENTÉ

5.1 Calibration des courbes absolues par la PCR-TaqMan

5.1.1 Spécificité de l'essai

Les amorces et des sondes TaqMan-MGB spécifiques et conservées pour les deux souches utilisées dans ce travail ont été conçues à partir des séquences du gène *clpL* pour les souches *Lb. rhamnosus* R et RW9595M et comparées avec celles dans Genbank par Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Les séquences obtenues sont montrées dans le tableau 7 (annexe V), et les similarités étaient de 99 % et 100 %. Aucun mésappariement n'a été trouvé dans les tests de la courbe de dissociation, lorsque la PCR-TaqMan a été faite en utilisant la sonde spécifique pour la souche *Lb. rhamnosus* RW9595M. Les mêmes résultats ont été obtenus avec la sonde spécifique de la souche *Lb. rhamnosus* R (Fig. 22-24, annexe VI).

5.1.2 Courbes de calibration

Pour les essais de quantification absolue, des courbes de calibration ont été tracées avec des quantités connues d'ADN de *Lb. rhamnosus* R ou RW9595M avec une série de dilutions de 10^3 UFC/mL à 10^9 UFC/mL. Les résultats des courbes de calibration en utilisant les sondes spécifiques, sont montrés dans les figures 10 et 11. Afin d'estimer le nombre de cellules dans la coculture, une régression multilinéaire a été tracée avec les données de la fluorescence (Ct) obtenues à partir des monocultures (voir graphique 12c). L'efficacité de l'amplification était de 96.9 % et de 99 % pour les sondes *clpL*- RW- et *clpL*-R, respectivement. Dans le cas de la sonde universelle, l'efficacité a été calculée à partir des cultures pures, correspondant à 81.5% pour la culture pure de la souche RW9595M et 91.6% pour la souche R (voir Fig. 12a, b). Dans tous les cas, la quantification et la détection ont été linéaires dans l'intervalle de la concentration d'ADN testée. Les valeurs de Ct générées sont montrées dans les tableaux 8-10 de l'annexe VI.

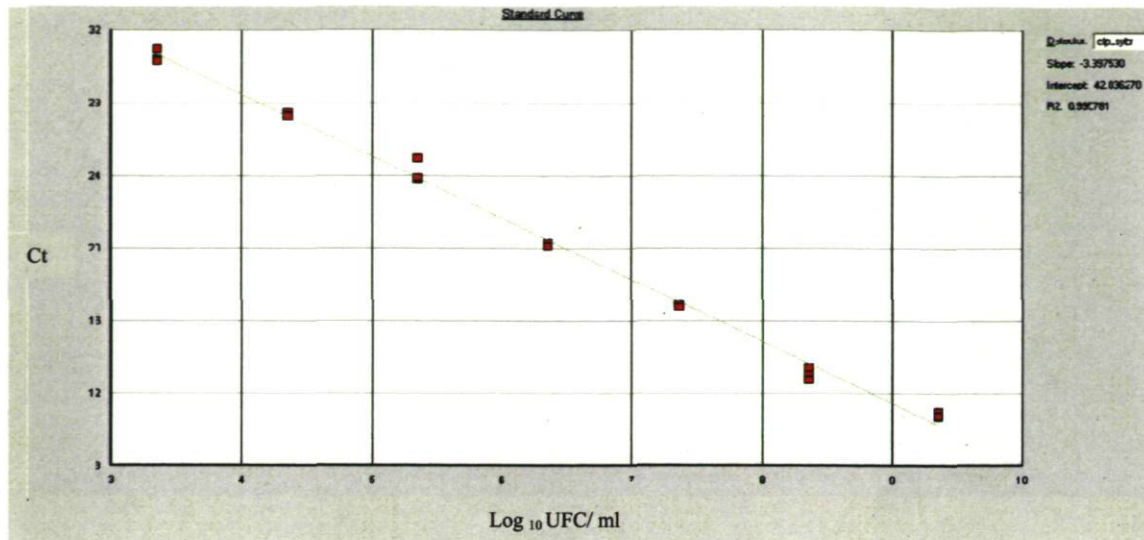


Figure 10. Courbe de calibration de *Lb. rhamnosus* RW9595M en utilisant la sonde spécifique clpL-RW TaqMan-MGB. Les valeurs de Ct obtenues par la qPCR (Tableau 8 de l'annexe 6) étaient tracées contre des concentrations cellulaires connues en intervalle en série entre 2.26×10^9 UFC/mL à 2.26×10^3 UFC/mL d'une culture pure. Les valeurs de la pente, le coefficient de corrélation et l'efficacité étaient: $y = -3.397530 \log x + 42.036270$, $R^2 = 0.995781$, Efficacité = $[10^{(1 / 3.397530)} - 1] \times 100 = 97\%$, respectivement.

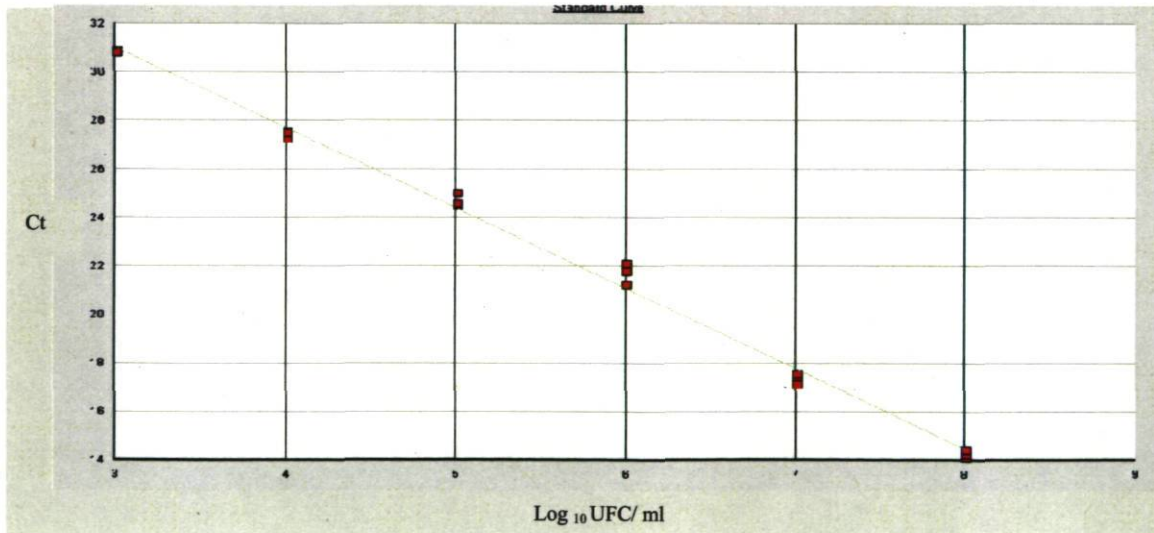
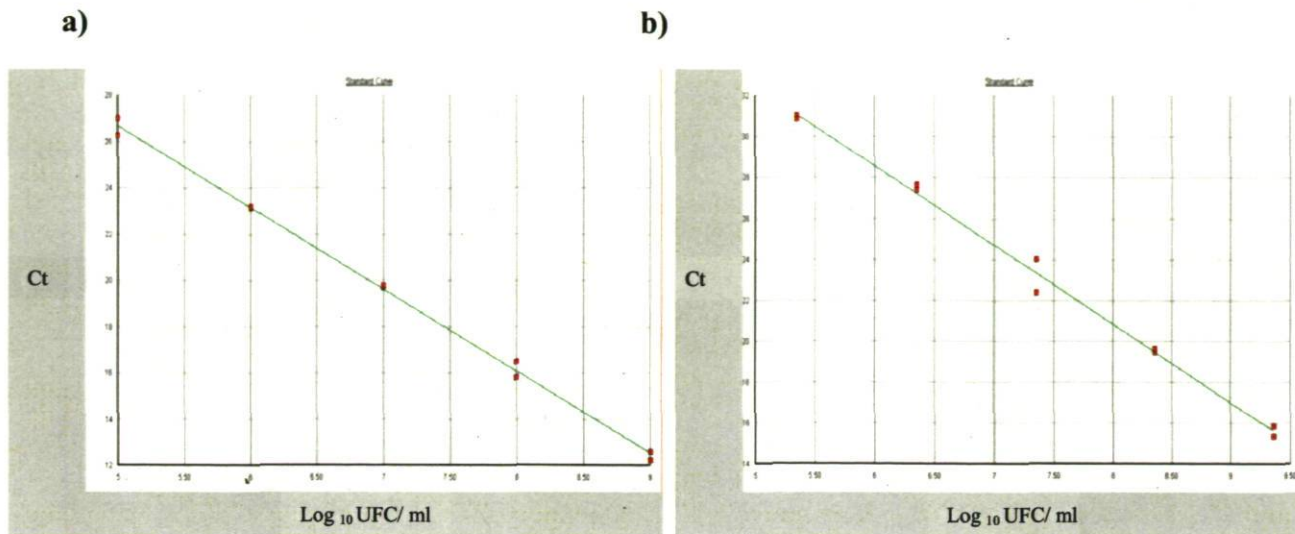


Figure 11. Courbe de calibration de *Lb. rhamnosus* R en utilisant la sonde spécifique clpL-R TaqMan-MGB. Les valeurs de Ct obtenues par la qPCR (Tableau 9 de l'annexe 6) étaient tracées contre les concentrations cellulaires connues en intervalle en série entre 1.03×10^9 UFC/mL à 1.03×10^3 UFC/mL d'une culture pure. Les valeurs de la pente, le coefficient de corrélation et l'efficacité étaient: $y = -3.318645 \log x + 40.999367$, $R^2 = 0.994729$, Efficacité = $[10^{(1 / 3.318645)} - 1] \times 100 = 99\%$, respectivement.



$$y(\text{RW}) = -3.863415 \log x + 51.761, R^2 = 0.99$$

$$\text{Efficacité} = [10^{(1/3.863415)} - 1] \times 100 = 81.5\%$$

$$y(\text{R}) = -3.540351 \log x + 44.836, R^2 = 0.99$$

$$\text{Efficacité} = [10^{(1/3.540351)} - 1] \times 100 = 91.6\%$$

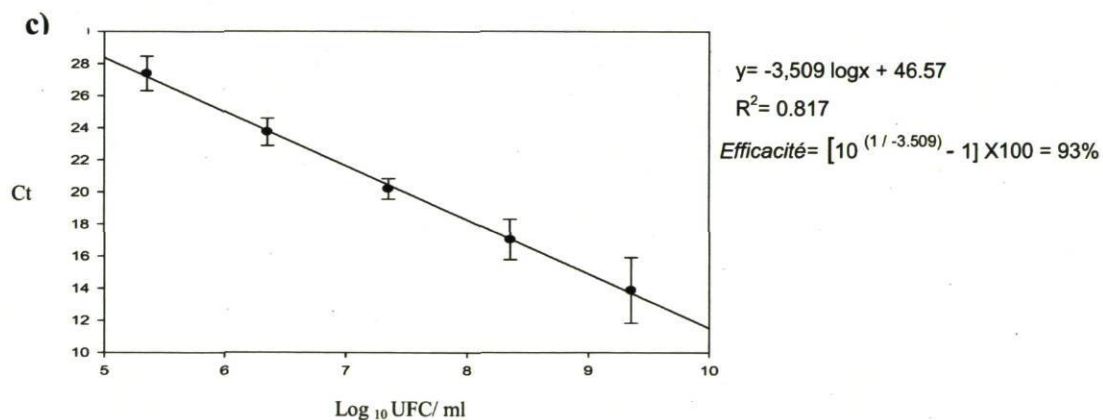


Figure 12. Courbe de calibration pour une monoculture et coculture de *Lb. rhamnosus* R et RW9595M dans une essai de qPCR en utilisant la sonde universelle clpL RW/R TaqMan-MGB. Le Ct était mesuré (Tableau 10 de l'annexe 6) et tracé dans un graphique comme une fonction linéaire d'une base 10 logarithmique des concentrations de cellules connues et diluées en série à partir d'une culture pure de **a)** *Lb. rhamnosus* RW9595M et **b)** *Lb. rhamnosus* R. **c)** Pour une courbe standard mixte, une régression multilinéaire a été tracée à partir des valeurs de Ct obtenues des cultures pures de chaque souche contre les concentrations cellulaires correspondantes. Les valeurs de la pente, le coefficient de corrélation et l'efficacité sont indiqués en dessous de chaque graphique.

5.2 Cinétiques de production de biomasse et d'EPS à partir des monocultures et de la coculture sur le milieu PLS

La coculture et les monocultures des souches *Lb. rhamnosus* RW9595M et *Lb. rhamnosus* R ont été réalisées dans le milieu de PLS supplémenté par fermentation prolongée de 72 h, le pH a été maintenu constant à 6.0. Tous les essais de monoculture et coculture ont été faits en triplicata. Six prélèvements de 25 mL de milieu fermenté ont été pris. De ce volume, 20 mL ont été utilisés pour l'extraction et dosage d'EPS et 1 mL a été utilisé pour l'extraction d'ADN. Le nombre de cellules a été estimé par le compte de cellules viables en plaque et par l'approche moléculaire de la quantification absolue par la PCR-TaqMan. Toutes les données des comptes viables et des concentrations d'EPS obtenus sont montrées dans l'annexe VIII.

Les résultats de la biomasse produite en monoculture de *Lb. rhamnosus* RW9595M montrent aux 24 h, une concentration cellulaire maximale de 4.38×10^9 UFC/mL par compte en plaque, tandis que pour la qPCR, la concentration maximale est de 4.27×10^9 UFC/mL. Après 72 h, durant la phase de déclin de la fermentation, on observe que le compte en plaque est de 5.26×10^6 UFC/mL et de 13.1×10^6 UFC/mL par la qPCR (Fig. 13). La production d'EPS était de 1498 mg eq. glucose/L après 72 h.

Pour la monoculture de la souche *Lb. rhamnosus* R à 48 h de culture, la concentration maximale était de 1.93×10^{10} UFC/mL pour le compte en plaque et de 2.68×10^9 UFC/mL par l'approche PCR-TaqMan (Fig. 14). La production maximale d'EPS était d'environ 460 mg eq. glucose/L et s'est maintenue constante à partir de 48 h de fermentation. Aucune réduction de la concentration n'a été observée pendant les 72 h de la fermentation.

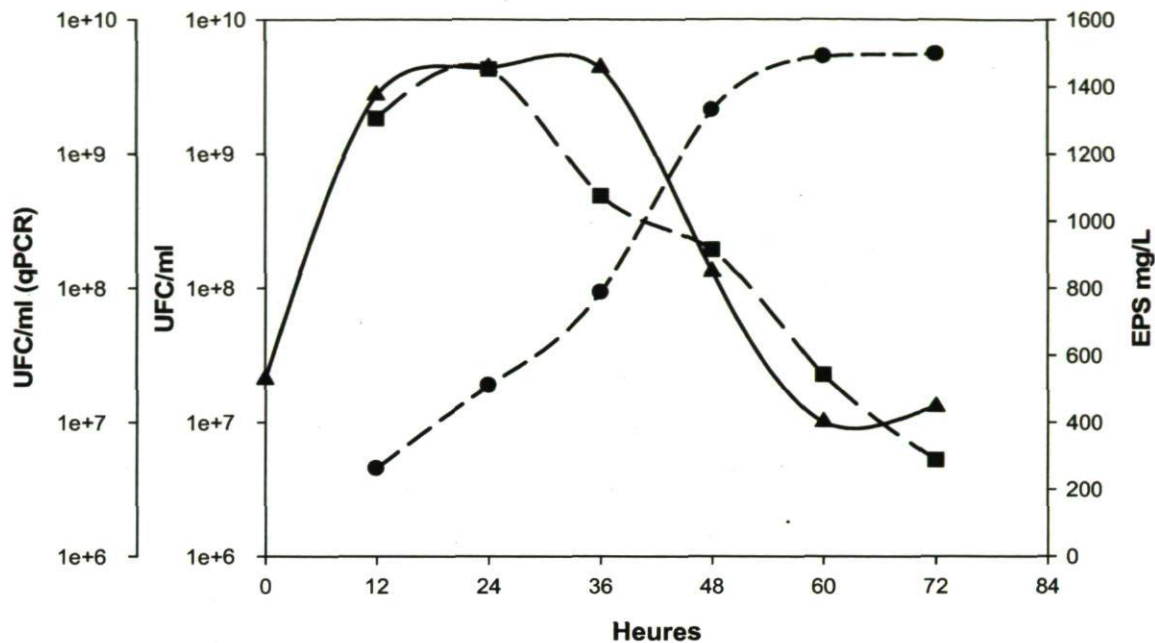


Figure 13. Cinétique de croissance et de production d'EPS de *Lb. rhamnosus* RW9595M dans le milieu PLS. (▲) log UFC/mL, (■) log UFC/mL obtenu par PCR-TaqMan, (●) concentration d'EPS en mg eq. glucose/L. Dans l'annexe VIII se montrent les données et les écarts-type des trois répétitions.

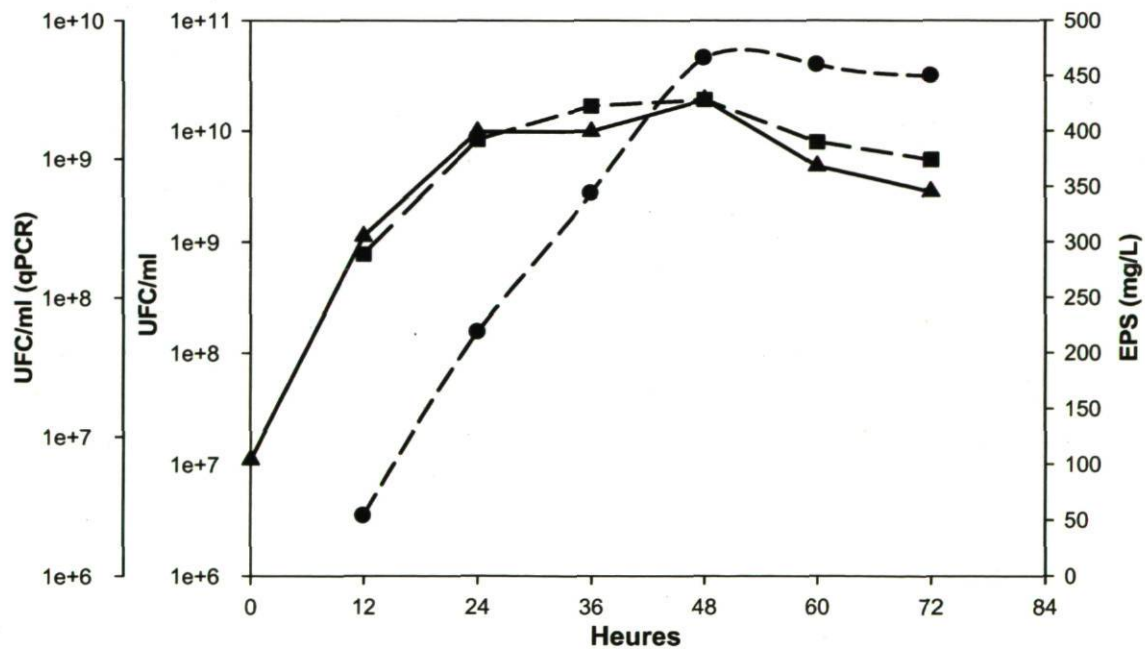


Figure 14. Cinétique de croissance et de production d'EPS de *Lb. rhamnosus* R dans le milieu PLS, (▲) UFC/mL, (■) UFC/mL obtenu par PCR-TaqMan, (●) concentration d'EPS en mg eq. glucose/L. Dans l'annexe VIII se montrent les données et les écarts-type des trois répétitions.

Les cocultures ont été inoculées avec 1 mL (3.5×10^7 UFC/mL) pour la souche *Lb. rhamnosus* RW9595M et de 9 mL (1.149×10^7 UFC/mL), pour la souche *Lb. rhamnosus* R et les conditions étaient identiques à celles utilisées pour les monocultures. Dans les premières 12 h de la culture, le nombre de cellules totales par les deux approches est estimé à environ 1×10^9 UFC/mL. Cependant après 36 h, le compte en plaque augmente d'une unité logarithmique, 1.18×10^{10} UFC/mL, tandis que par le PCR-TaqMan, la concentration augmente de manière moins distinctive, 6.13×10^9 UFC/mL. Après 60 h et 72 h, le compte en plaque a diminué à 3.75×10^9 UFC/mL, cependant, avec la quantification par PCR, on observe une augmentation d'une unité logarithmique 4.48×10^{10} UFC/mL. Le comportement cinétique de la biomasse produit (Fig. 15) dans les premières 48 h d'évolution de la croissance, est similaire pour les deux approches. Néanmoins, dans la phase finale, une surestimation est observée pour la PCR-TaqMan. De plus, la concentration d'EPS augmente de manière progressive au cours du temps, pour atteindre la concentration maximale d'EPS de 657 mg eq. glucose/L à la fin des 72 h de fermentation.

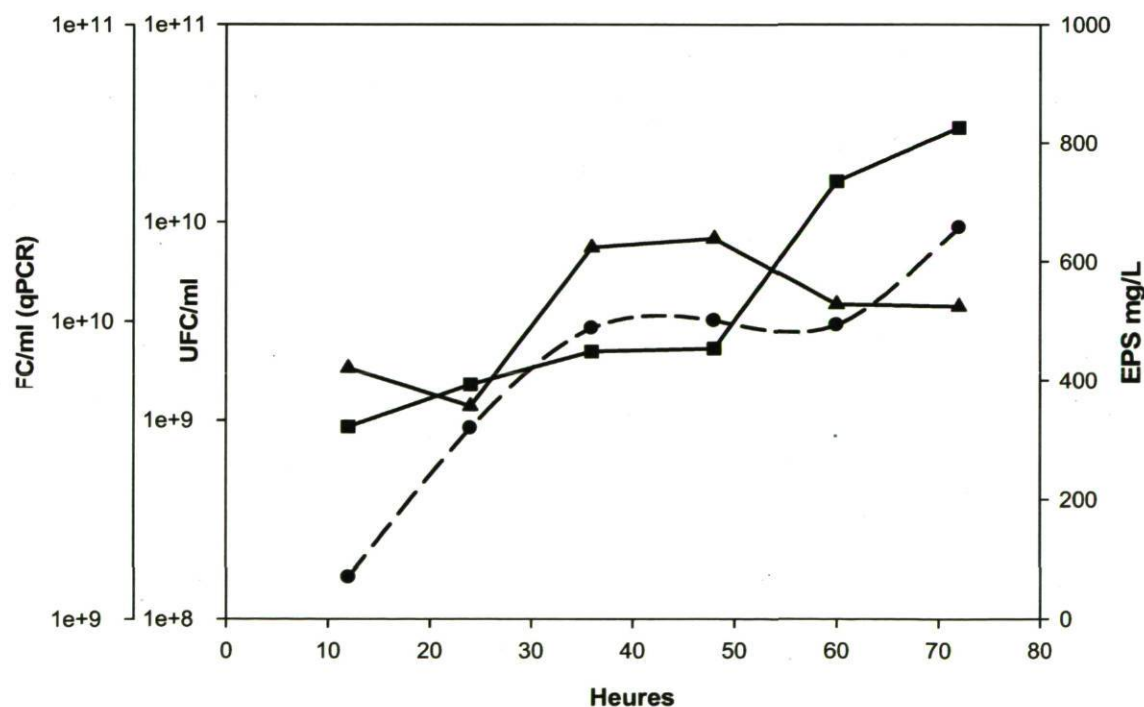


Figure 15. Cinétique de croissance et de production d'EPS de la coculture *Lb. rhamnosus* R et RW9595M dans le milieu PLS. (▲) UFC/mL total, (■) UFC/mL total obtenu par PCR-TaqMan, (●) concentration d'EPS en mg eq. glucose/L. Dans l'annexe VIII se montrent les données et les écarts-type des trois répétitions.

Les réactions d'amplification d'ADN par PCR-TaqMan ont aussi été faites, afin de quantifier la souche dominante dans la coculture. L'estimation d'UFC/mL a été calculée depuis les courbes absolues tracées pour chaque souche de *Lb. rhamnosus*. En fonction de ces résultats, on a tracé les graphiques de la figure 16. Les deux souches ont augmenté de manière logarithmique au cours des 36 premières heures de la fermentation, en atteignant une concentration cellulaire maximale de 3.67×10^8 UFC/mL pour la souche RW9595M et de 2.05×10^9 UFC/mL pour la souche R. Ensuite à 60 h de fermentation, les comportements de croissance diffèrent pour les deux souches. *Lb. rhamnosus* RW9595M a déclenché subitement une mort cellulaire (1.67×10^8 UFC/mL), tandis que *Lb. rhamnosus* R est restée dans une phase stationnaire (1.98×10^9 UFC/mL). D'une façon surprenante, dans les 12 dernières heures de la coculture, le compte d'UFC/mL des deux souches a augmenté (2.01×10^8 UFC/mL pour la souche RW9595M et de 2.05×10^9 UFC/mL pour la souche R).

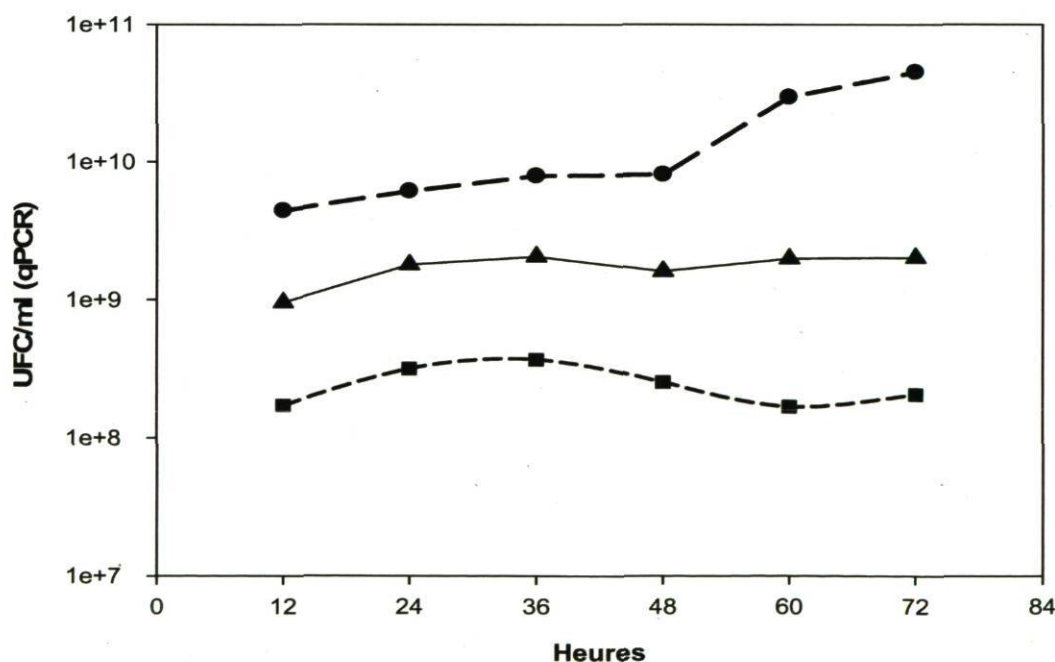


Figure 16. Cinétique de nombre de cellule individuelles dans la coculture des souches *Lb. rhamnosus* R et RW9595M dans le milieu PLS. L'estimation des UFC/mL a été tracée pour chaque souche à partir de la courbe absolue de la PCR-TaqMan, (●) UFC/mL de la coculture obtenu avec la sonde universelle (▲) UFC/mL de *Lb. rhamnosus* R obtenu avec la sonde spécifique. (■) UFC/mL *Lb. rhamnosus* RW9595M obtenu avec la sonde spécifique. Dans l'annexe VIII se montrent les données et les écarts-type des trois répétitions.

5.3 Analyse par HPLC-SEC de la cinétique du poids moléculaire d'EPS produits durant les monocultures et la coculture

L'évolution de la variation des poids moléculaires d'EPS produits durant 72h de fermentation dans les monocultures et la coculture a été suivie par HPLC-SEC. Dans tous les cas, une courbe de calibration standard avec pullulan comme référence a été faite. L'intervalle dynamique de la courbe standard était de 6×10^3 Da à 8×10^6 Da. Pour estimer le poids moléculaire des échantillons, les temps de rétentions obtenus étaient interpolés avec la courbe standard. Les résultats des poids moléculaires obtenus par les monocultures de *Lb. rhamnosus* R, *Lb. rhamnosus* RW9595M et la coculture sont résumés dans le tableau 6.

Le profil chromatographique de la monoculture de *Lb. rhamnosus* RW9595M après les 12 premières heures a montré deux pics de poids moléculaire de 1.4×10^6 Da et de 6.04×10^3 Da. Après 36 h et jusqu'aux 72 dernières heures, le pic de poids moléculaire plus élevé a une forme bimodale, ce qui donne deux fractions de poids moléculaire de 1.4×10^6 Da et de 1.0×10^6 Da. Au cours de la fermentation, ces pics ont augmenté en hauteur, ce qui indique une augmentation de la concentration, tandis que la concentration du pic de 6.04×10^3 Da a diminuée (Fig. 17).

Dans le cas de la monoculture de *Lb. rhamnosus* R, un pic à 5.92×10^3 Da a été détecté après 12 h de fermentation. Après 24 h, un pic divisé en deux fractions à 1.24×10^6 Da et l'autre à 4.82×10^5 Da a été détecté. Au cours des fermentations, ces pics de poids moléculaire élevé augmentent leurs concentrations, tandis que le pic à 5.92×10^3 Da a montré une diminution (fig. 18).

Les chromatogrammes de la coculture sont présentés à la Figure 19. Après de 12 h de fermentation, un pic à 5.84×10^3 Da a été observé avec une concentration élevée. Ce pic a commencé à diminuer en concentration après 24 h, et est devenu bimodal au cours de la fermentation prolongée. Après 24 h, un pic de 6.33×10^4 Da a aussi été détecté. Après 36 h, ce pic augmente en concentration et après 48h, il commence à diminuer. Après 72 h, trois pics ont été détectés (5.26×10^4 Da, 1.17×10^4 Da, 5.59×10^3 Da) et les trois ont présenté des concentrations faibles.

Tableau 6. Distribution de poids moléculaire des EPS obtenus à partir des monocultures et cocultures dans le milieu PLS. FI, FII, FIII, correspondent aux trois fractions d'EPS dominantes. (---) représente l'absence des pics.

Mono- ou Cocultures <i>Lb. rhamnosus</i>	Temps de prélèvement (heure)	Temps de Rétention (minutes)			Poids Moléculaire (Da)		
		FI	FII	FIII	FI	FII	FIII
RW9595M	12	11.10	-----	20.39	1.45 x10 ⁶	-----	6.04 x10 ³
	24	11.15	-----	20.38	1.40 x10 ⁶	-----	6.07 x10 ³
	36	11.22	11.49	20.41	1.35 x10 ⁶	1.146 x10 ⁶	1.16 x10 ⁴
	48	11.27	11.62	20.48	1.30 x10 ⁶	1.062 x10 ⁶	1.15 x10 ⁴
	60	11.27	11.69	20.42	1.30 x10 ⁶	1.019 x10 ⁶	1.15 x10 ⁴
	72	11.41	11.65	20.50	1.21 x10 ⁶	1.019 x10 ⁶	1.18 x10 ⁴
R	12	-----	-----	20.43	-----	-----	5.92 x10 ³
	24	11.36	12.96	19.17	1.24 x10 ⁶	4.82 x10 ⁵	1.24 x10 ⁴
	36	11.40	13.09	19.17	1.21 x10 ⁶	4.47 x10 ⁵	1.24 x10 ⁴
	48	11.41	13.12	19.18	1.20 x10 ⁶	4.39 x10 ⁵	1.24 x10 ⁴
	60	11.40	13.10	19.15	1.21 x10 ⁶	4.44 x10 ⁵	1.26 x10 ⁴
	72	11.43	13.08	19.18	1.19 x10 ⁶	4.49 x10 ⁵	1.23 x10 ⁴
RW9595M+R	12	-----	-----	20.45	-----	-----	5.84 x10 ³
	24	16.40	-----	20.50	6.33 x10 ⁴	-----	5.68 x10 ³
	36	16.85	-----	20.52	4.88 x10 ⁴	-----	5.59 x10 ³
	48	16.33	19.22	20.48	6.61 x10 ⁴	1.20 x10 ⁴	5.72 x10 ³
	60	16.85	19.30	20.55	4.88 x10 ⁴	1.15 x10 ⁴	5.51 x10 ³
	72	16.72	19.28	20.52	5.26 x10 ⁴	1.17x10 ⁴	5.59 x10 ³

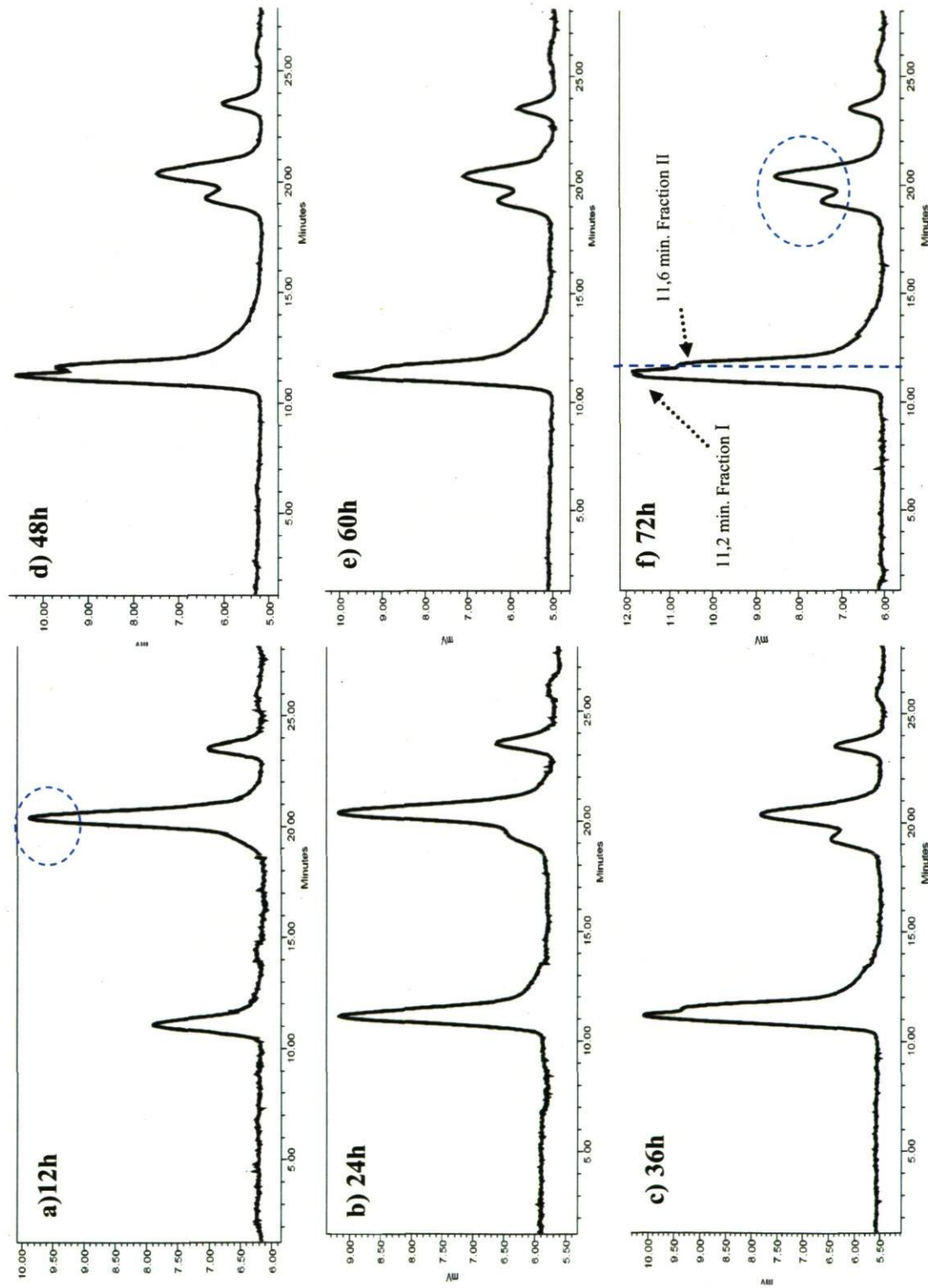


Figure 17. Profils chromatographiques par HPLC-SEC des EPS isolés à partir de la monoculture de *Lb. rhamnosus* RW9595M dans le milieu PLS. De (a)-(f) cinétique du poids moléculaire d'EPS pendant les 72 h de fermentation. La ligne verticale de (c) à (f), représente la division de deux fractions d'EPS avec un poids d'environ 1×10^6 Da. Les cercles illustrent la diminution de la concentration des fractions de molécules d'environ de 1×10^3 Da.

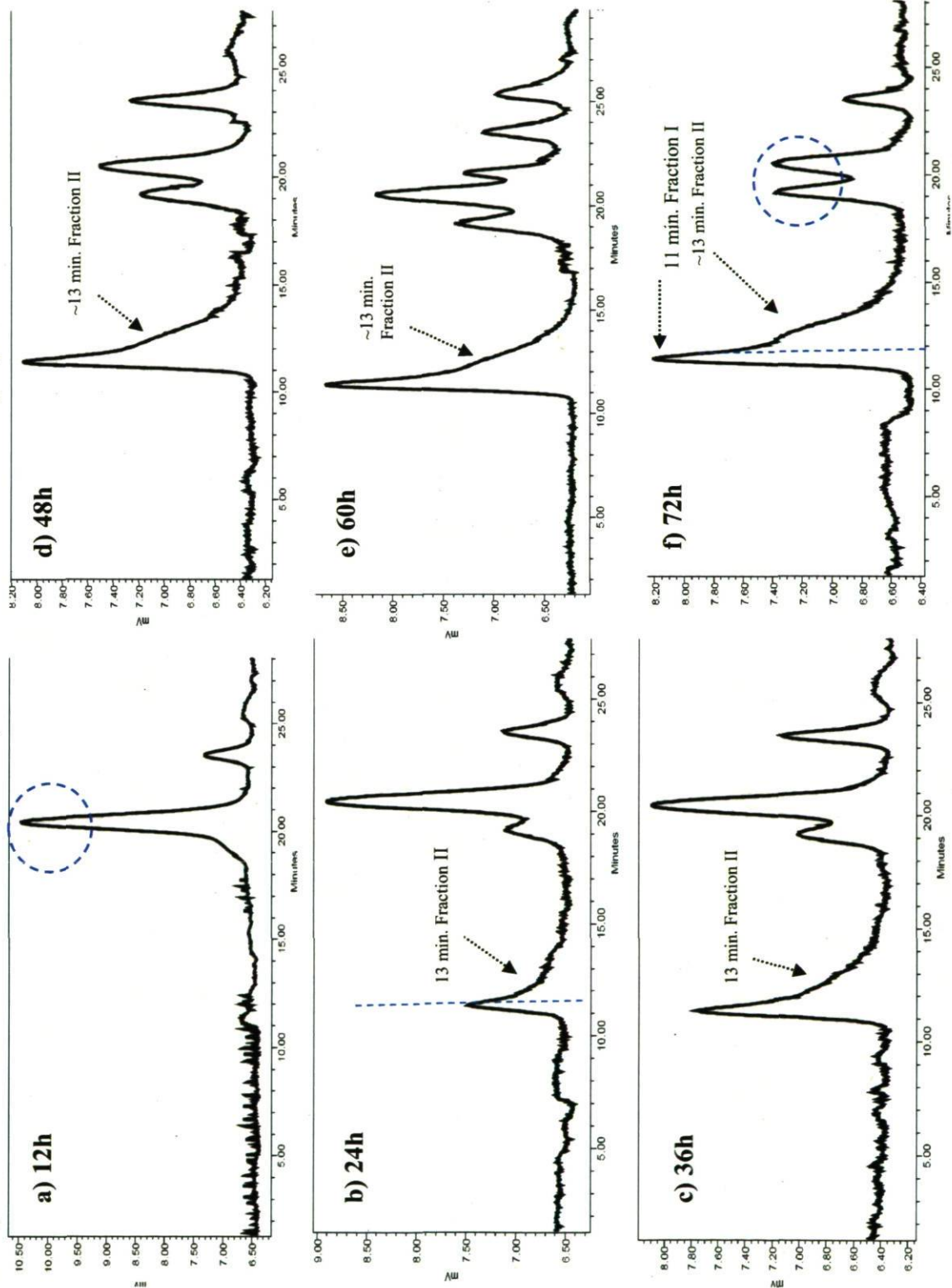


Figure 18. Profils chromatographiques par HPLC-SEC des EPS isolés à partir de la monoculture de *Lb. rhamnosus* R dans le milieu PLS. De (a) à (f) cinétique du poids moléculaire d'EPS pendant les 72 h de fermentation. La ligne verticale de (c) à (f), divise deux fractions d'EPS avec un poids d'environ 1×10^6 et 5×10^5 Da. Les cercles illustrent la diminution de la concentration des fractions de molécules d'environ de 1×10^3 Da.

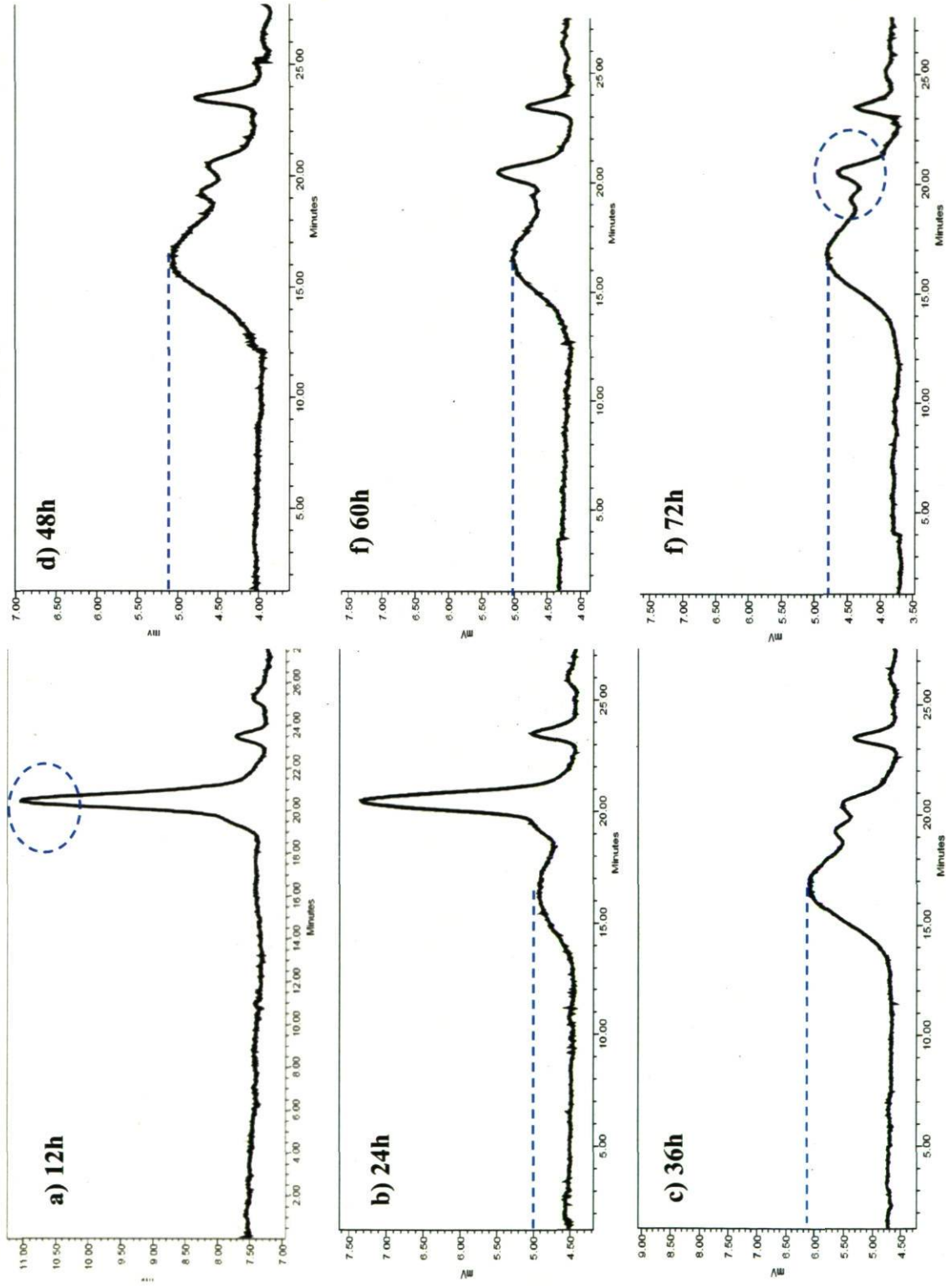


Figure 19. Profils chromatographiques par HPLC-SEC des EPS isolés à partir de la coculture *Lb. rhamnosus* R et RW9595M dans le milieu PLS. De (a)-(f) cinétique du poids moléculaire d'EPS pendant les 72 h de fermentation où se présente une seule fraction dominante de $\sim 6.61 \times 10^4$ Da. Les cercles illustrent la diminution de la concentration des fractions de molécules d'environ de 1×10^3 Da

5.4 Discussion

Ce travail a démontré, que dans un procédé de coculture prolongée de 72 h, des poids moléculaire d'EPS de plus ou moins 1×10^4 Da, ont été obtenus. Pour ce système, nous avons utilisé comme milieu de culture une solution de PL supplémenté avec une source additionnelle d'azote et de sels de sulfate ainsi qu'un taux élevé de cellules de *Lb. rhamnosus* R par rapport à *Lb. rhamnosus* RW9595M au départ de la fermentation.

Des conditions appropriées pour la croissance cellulaire, la production d'EPS, la valorisation d'un sous-produit laitier et l'association entre deux souches, ont dû être mise en place. La croissance optimale et la coproduction d'EPS est survenue après 48 h de culture dans le milieu PLS. Les monocultures de *Lb. rhamnosus* R et RW9595M, ont aussi été caractérisées dans ces conditions. Selon nos résultats, *Lb. rhamnosus* RW9595M produit 1498 mg eq. glucose/L d'EPS avec un poids moléculaire de 1.4×10^6 Da, en accord avec les résultats observés avec le milieu BMM-S. Ces résultats coïncident aussi avec ceux précédemment décrits dans la littérature (Champagne *et al.* 2007, Bergmaier *et al.* 2003, Macedo *et al.* 2002a, b, Dupont *et al.* 2000). Dans le milieu PLS, *Lb. rhamnosus* R produit 450 mg eq. glucose/L d'EPS avec des poids moléculaires varient, entre 1.2×10^6 Da à 4.9×10^5 Da. Ces profils étaient différents de ceux obtenus lorsque le milieu BMM-S a été utilisé, dans lequel le poids moléculaire d'EPS était 9.16×10^4 Da. Curieusement, aucune diminution de la concentration d'EPS n'a été observée quand la souche a été cultivée dans le PLS. Ces variations de poids moléculaire ont déjà été observées au cours de la croissance de *S. thermophilus* 534b par Vaningelgem *et al.* (2004). Dans le lait enrichi, *S. thermophilus* 534b produit des EPS de haut poids moléculaire (1990 kDa), tandis que quand elle était cultivée dans du lait, les EPS étaient de plus petit poids moléculaire (59 kDa). En plus, ces auteurs ont montré que la nature de la source d'azote (extrait de levure, peptone ou hydrolysate de lactalbumine) et des vitamines, peut affecter le poids moléculaire d'EPS. En parallèle, Lebeer *et al.* (2007a, b) ont analysé *in vitro* la formation de biofilm chez *Lb. rhamnosus* GG, ils ont démontré que la production d'EPS dépend de la composition du milieu de culture, mais la formation d'EPS n'est pas un facteur qui détermine la formation de biofilm. Ils ont aussi déterminé que la faible concentration en

biomasse n'est pas le seul facteur pour l'induction du biofilm. Les milieux de cultures utilisés dans notre travail, BMM-S et PLS, ont été supplémentés avec des solutions de sels de $MnSO_4$ et $MgSO_4$. En reprenant le travail de Lebeer *et al.* (2007a), ils ont particulièrement observé que la présence des ions Mn^{2+} dans le milieu de culture, a exercé une inhibition sur la formation de biofilm par un effet électrostatique mais parallèlement, ce cation divalent stimule fortement la croissance cellulaire. Paradoxalement, les ions de Mg^{2+} stimulent la croissance, et aucun effet sur la formation de biofilm n'a été observé. Selon nos résultats, le rendement en biomasse cellulaire était aussi élevé dans les monocultures et coculture, en utilisant les milieux, BMM-S ou PLS, mais des profils chromatographiques distincts ont été observés pour les EPS produits. En analysant les profils des chromatogrammes d'EPS des monocultures de *Lb. rhamnosus* R dans le BMM-S et le PLS (Fig. 8 et 18) l'effet sur la variation de poids moléculaire d'EPS peut être lié à la composition des milieux testés. Cependant, dans le cas des monocultures de *Lb. rhamnosus* RW9595M, le profil chromatographique ne varie pas dans les deux milieux testés. (Fig. 7 et 17).

Pour la coculture, deux réponses différentes pour le profil chromatographiques d'EPS ont été observées dans le milieu PLS (Fig. 19) contrairement à ce qui été observé dans le milieu BMM-S (Fig. 9). Dans ces deux cas, la source de sucre fermentescible était différente, dans le cas du BMM nous avons testé le glucose, tandis que le PLS est riche en lactose. Pham *et al.* (2001), ont caractérisé la dégradation d'EPS chez *Lb. rhamnosus* R. Ils ont évalué l'effet du glucose et du lactose dans le milieu BMM et déterminé que la réduction d'EPS était plus prononcée avec le lactose. Cependant, il faut prendre en considération que nous avons aussi modifiée les rapports de taux d'inoculation en cherchant un profil d'EPS de petits poids moléculaires.

Pour la fermentation dans le BMM-S, l'inoculum de la coculture était d'un volume 0.5 % v/v d'une préculture de 16h pour chaque souche, tandis que pour la coculture dans le PLS, nous avons inoculé 0.1 % (v/v) et 0.9 % (v/v) d'une préculture de 16 h, de *Lb. rhamnosus* RW9595M et de *Lb. rhamnosus* R, respectivement. Vinderola *et al.* (2002), ont mis en évidence que dans un système de culture mixte, certains facteurs comme la combinaison du

taux d'inoculum gouverne l'interaction entre les souches et peut affecter la synthèse d'un produit.

Pour comprendre ces interactions, nous avons quantifié les cellules durant la coculture, ce qui nous permettra d'établir un contrôle du procédé. L'approche de la PCR en temps réel a démontré être une méthode efficace pour le dénombrement bactérien dans des niches complexes ou dans des cultures mixtes (Zhang *et al.* 2006, Sadeque *et al.* 2005, Gueimonde *et al.* 2004, Lyons *et al.* 2000). Dans ce travail, nous avons aussi prouvé que la qPCR-TaqMan, est une approche avec une spécificité et une sensibilité élevées pour la quantification différentielle des souches en coculture. Le nombre total de cellules a été déterminé avec la procédure de la courbe absolue par qPCR-TaqMan, comprenant une paire d'amorces universelles et des sondes TaqMan-MGB spécifiques. Les coefficients de corrélation des régressions linéaires indiquent un bon rapport entre les quantités de UFC/mL et les quantités de fluorescence (Ct) pour les deux sondes TaqMan-MGB spécifiques conçues pour *Lb. rhamnosus* R et RW9595M ($r^2 = 0.99$ dans les deux cas). La linéarité de la courbe standard et le fait que la qPCR-TaqMan a opéré avec une efficacité de 97 % (sonde RW-clpL) et de 99 % (sonde R-clpL), de même que la limite de détection du qPCR-TaqMan estimée à 1×10^4 UFC/mL avec l'ADN extrait selon les conditions décrites dans cette étude, confirment que l'essai est adéquat pour le calcul du nombre de cellules dans la culture. Cependant, dans les essais avec les monocultures en utilisant la sonde universelle, nous avons trouvé des surestimations de la viabilité cellulaire par la qPCR-TaqMan par rapport au compte viable. Nocker *et al.* (2006) ont discuté que la variation du nombre de cellules dans la quantification par PCR en temps réel, est due à l'ADN restant dans le milieu de culture lorsque la viabilité des cellules a baissé. Nous avons observé que durant nos expériences, l'extraction d'ADN était assez compliquée pour les essais de la monoculture de *Lb. rhamnosus* RW9595M, à cause de la concentration élevée d'EPS dans le tube qui entravent la récolte des cellules.

Dans le cas de *Lb. rhamnosus* R et la coculture, l'extraction était moins fastidieuse. Néanmoins, les sondes TaqMan-MGB sont très stables pour les quantifications complexes (Yuanrong *et al.* 2006, Yoshida *et al.* 2003, 2004). Nos données d'estimation des quantités de cellules ont été capables de mesurer des petites variations dans l'intervalle d'une unité logarithmique (voir tableau 16 de l'annexe VIII), de telle façon que des phases de

croissance bien définies ont été tracées pour chacune des deux souches dans la coculture (Fig. 16). La phase exponentielle de croissance se situe dans les 36 premières heures pour les deux souches.

Ensuite les phases stationnaire et de mort cellulaire se déroulent simultanément dans la coculture, *Lb. rhamnosus* RW5959M décline et *Lb. rhamnosus* R reste stationnaire. D'une façon surprenante, dans les 12 dernières heures de la coculture, le compte cellulaire des deux souches, a augmenté. En accord avec ce comportement nous suggérons que *Lb. rhamnosus* R est la plus dominante, et que *Lb. rhamnosus* RW959M est capable de se développer modérément lorsqu'elles sont cocultivées dans une proportion une de 9:1 v/v, respectivement.

Kreth *et al.* (2005) ont démontré que la compétition et la coexistence entre *S. mutans* et *S. sanguinis* dépendent forcément du milieu de culture et de la séquence de l'inoculation. Ils ont aussi mentionné que «L'occupation d'une niche par un microorganisme exclue les autres, mais en même temps, si une colonisation simultanée de deux microorganismes est faite, cela donne une association temporelle et spatiale de compétition et de coexistence». Dans cette circonstance, il est clair que quand deux microorganismes ou plus cohabitent dans une même niche écologique, ils développent de multiples mécanismes moléculaires de survivance et d'adaptation, résultant des effets pléiotropiques (Van de Guchte *et al.* 2002, Lebeer *et al.* 2007b). Malheureusement, ce travail n'a pas mis en évidence l'autolyse chez *Lb. rhamnosus* R durant la monoculture dans le PLS. En considérant que nous avons choisi la séquence du gène *clpL* pour la conception de sondes, et que c'est une protéase-chaperonne exprimée pour la tolérance au stress, reste à faire une étude au niveau moléculaire pour nous expliquer si la production d'EPS chez *Lb. rhamnosus* R est un mécanisme de survie ou d'adaptation.

Filoche *et al.* (2004) ont noté que dans une culture mixte de *Lactobacillus plantarum*, *Actinomyces gerencseriae* et *S. mutans*, la formation de biofilm dans les monocultures n'est pas nécessairement un indicateur de leur survivance dans une communauté. La formation de biofilm (Lebeer *et al.* 2007a), l'expression de gènes *clp* (Frees *et al.* 2004), le stress (Van de Guchte *et al.* 2002), le quorum sensing (Lebeer *et al.* 2007b), la lyse, la persistance des souches variantes dans une culture et la mort cellulaire induite (suicide bactérie), (Lewis, 2000) sont des processus intra et extra cellulaires fortement liés entre

eux, et qu'il reste encore à reprendre une étude qui peut nous amener à la compréhension, pour savoir si la production d'EPS chez *Lb. rhamnosus* R est un mécanisme de survie ou d'adaptation dans la vie de ce microorganisme. Bien que notre travail ne cherche pas à connaître ces effets, nous avons mis en évidence que les procédés de coculture entre deux souches de *Lb. rhamnosus* ont un effet sur le poids moléculaire d'EPS coproduits. Nos résultats se traduisent par la mise au point d'un nouveau procédé simple avec de multiples applications dans l'industrie laitière.

CHAPITRE VI

CONCLUSION

6.1 Conclusion

Un système de coculture a été conçu avec une souche autolytique productrice d'EPS *Lb. rhamnosus* R et une autre souche hautement productrice d'EPS, *Lb. rhamnosus* RW9595M, pour coproduire des EPS de poids moléculaires divers avec une haute productivité en biomasse dans une fermentation prolongée de 72 h. Ce procédé de diminution du poids moléculaire des EPS peut être profitable pour obtenir des variétés d'EPS utilisables dans la fabrication de produits laitiers (Dabour *et al.* 2005) ou pour solutionner des problèmes reliés à la haute densité d'EPS (Champagne *et al.* 2007). Ce nouveau procédé est plus simple et plus économique que les méthodes traditionnelles. Il a nécessité la création d'une association entre deux souches dans un système de fermentation en batch avec des conditions initiales contrôlées, un taux plus élevée d'inoculum de *Lb. rhamnosus* R de même que la croissance de *Lb. rhamnosus* RW9595M pour moduler les poids moléculaires d'EPS coproduits.

Dans ce travail, nous avons aussi testé la sensibilité élevée des sondes TaqMan-MGB dans l'essai de la 5' nuclease PCR, capable de différencier deux souches identiques dans un système de fermentation mixte, en démontrant ses capacités de performance pour la discrimination des quantifications bactériennes.

Entre autres, nous démontrons que *Lb. rhamnosus* RW9595M est une souche hautement productrice d'EPS très stable dans les conditions testées. Tandis que la production d'EPS chez *Lb. rhamnosus* R démontre une dépendance envers la composition du milieu et du rapport entre les deux souches dans la coculture. Cette caractéristique nous donne une idée de la capacité d'adaptation des souches, bien qu'il reste encore à comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la communication cellulaire et la production d'EPS.

En plus, ce travail valorise l'utilisation du PLS comme milieu de culture, ce qui donne une alternative profitable en termes industriel et commercial à ce sous-produit fromager. Notamment, ce travail peut être exploité dans la fabrication fromagère, pour la modulation rhéologique des fromages par l'effet de l'ajout d'EPS.

Par ailleurs, des interactions entre les cellules bactériennes, les protéines de lait (degré de dénaturation, les protéines du réseau, et les interactions), la microstructure (gel, le pH et la force ionique), l'EPS (poids moléculaire, la concentration), resteront encore à être élucidés pour établir des conditions optimales de ce nouveau procédé pour la fabrication d'une nouvelle ingrédient prometteur. En conclusion, ce travail met en valeur une nouvelle approche biotechnologique pour la culture des probiotiques de haute valeur commerciale pour la transformation alimentaire.

Références

1. Applied Biosystems (2004a). Absolute quantification getting started guide for the 7300 /7500 system. All rights reserved.
2. Applied Biosystems (2004b). Guide to performing relative quantification of gene expression using real-time quantitative PCR. All rights reserved.
3. Barrette, J., Champagne, C. P., Roy D., Rodrigue N. 2000. Production of mixed cultures containing strains of *Latococcus lactis*, *Leuconostoc cremoris* and *Lactobacillus rhamnosus* on commercial starter media. *Journal of Industrial Microbiology and Technology* 25:288-297.
4. Bhaskaracharya, R.K., Shah N.P. 2000. Texture characteristic and microstructure of skim milk mozzarella chesses made using exopolysaccharide or non-exopolysaccharide producing starter cultures. *Australian Journal of Dairy Technology* 55:132-138.
5. Broadbent, J.R., McMahon, D. J., Welker, D. L., Oberg, C. J., Moineau, S. 2003. Biochemistry, Genetics, and Applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: A Review. *Journal of Dairy Science* 86:407–423
6. Bouzar, F., Cerning, J., Desmazeaud, M. 1997. Exopolysaccharide production and texture promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yoghurt production. *Journal of Dairy Science* 80: 2310-2317.
7. Cerning, J. 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS, Microbiology Reviews* 87: 113-130.
8. Cerning J., Bouillanne C., Desmazeaud M.J. 1988. Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnology Letters* 10: 255-260.
9. Cerning, J., Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., Topisirovic, M. 1994. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* cg11 and partial structure analysis of the polymer. *Applied Environmental Microbiology*, November; 60(11): 3914–3919.
10. Chabot S., Yu H.L., De Leseleuc L., Cloutier D., Van Calsteren M.R., Lessard M., Roy D., Lacroix M., Oth D. 2001. Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immuno competent cells, and IFN-gamma mouse splenocytes. *Lait* 81: 683-687.
11. Champagne C. P. Gardner N. J., Roy, D. 2005. Challenges in the addition of probiotic cultures to Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45:61–84.

12. Champagne, C., Gardner N.J., Lacroix, C. **2007**. Fermentation technologies for the production of exopolysaccharides synthesizing *Lactobacillus rhamnosus* concentrated cultures. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10 (2): 211-220.
13. Dabour N., Kheadr E.E., Fliss I., LaPointe G. **2005**. Impact of ropiness and capsular exopolysaccharide-producing strains of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on reduced-fat Cheddar cheese production and whey composition. *International Dairy Journal* 15: 459–471.
14. Degeest B., de Vuyst L. **1999**. Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharides production in a complex medium. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2863- 2870.
15. Degeest, B, Janssens, B., De Vuyst, L. **2001**. Exopolysaccharide (EPS) biosynthesis by *Lactobacillus Sakei* 0-1: production kinetics, enzyme activities and EPS yields. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 470-477.
16. De Vuyst, L., Vanderveken, F., Van de Ven, S., Degeest, B. **1998**. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis" *Journal of Applied Microbiology* 84: 1059-1068
17. Duboc, P., Mollet, B. **2001**. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal* 11: 759–768.
18. Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. **1951**. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* 168: 167.
19. Duffy, G., Ellison, A., Anderson, W., Cole, M., Stewart, G.S. **1995** Use of bioluminescence to model the thermal inactivation of *Salmonella typhimurium* in the presence of competitive microflora. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3463–3465.
20. Dupont, I., Roy, D., LaPointe, G. **2000**. Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 24: 251–255.
21. Escalante, A., Rodarte, C.W., García Garibay, M., Farres, A. **1998**. Enzymes involved in carbohydrates metabolism and their role on exopolysaccharides production in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Applied Microbiology* 84: 108-114.
22. Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D. C., Wengenack, N. L., Rosenblatt, J. E., Cockerill, F. R., Smith, T. F. **2006**. Real-Time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews* 19: 165-256.

23. Faber, E.J., Zoonb, P., Kamerlinga, J.P., Johannes, K., Vliegenthart, F.G. **1998**. The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. *Carbohydrate Research* 310: 269-276.
24. Faber, E.J., Kamerling, J.P., Vliegenthart, F.J. **2001a**. Structure of the extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 291. *Carbohydrate Research* 331: 183–194
25. Faber, E. J., Van Den Haak, M. J., Kamerling, J. P., Vliegenthart, J. F.G. **2001b**. Structure of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S3. *Carbohydrate Research* 331: 173–182.
26. Faber, E.J., Van Kuik, J.A., Johannis P., Johannes, K., Vliegenthart F. G. **2002**. Modeling of the structure in aqueous solution of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* 766. *Biopolymers* 63: 66-76.
27. FAO and WHO, **2006**. Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation, FAO, Food and nutrition paper, No. 85: ISSN 0254. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture /Organisation mondiale de la santé.
28. Filoche., S.K., Anderson, S.A., Sissons, C.H. **2004**. Biofilm growth of *Lactobacillus* species is promoted by *Actinomyces* species and *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiology Immunology*, 19: 322–326.
29. Frengova, G.I, Simova, E.D., Beshkova, D.M., Simov, Z.I. **2000**. Production and monomer composition of exopolysaccharides by yogurt starter cultures. *Canadian Journal of Microbiology* 46: 1123–1127.
30. Frees, D., Chastanet, A., Qazi, S., Sørensen, K., Hill, P., Msadek T., and Ingmer H. **2004**. Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* *Molecular Microbiology* 54: 1445–1462.
31. Furet, J.-P., Quenee, P. **2004**. Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* 97: 197-207.
32. Garcia-Garibay, M., and V. M. E. Marshall. **1991**. Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal Applied Bacteriology*. 70:325-328
33. Gancel F., Novel G. **1994**. Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* cultures. 1. Conditions of production. *Journal of Dairy Science* 77: 685-688.

34. Gasse, M.A., Schimdt, K.A. Frank, J.F. **1997**. Exopolysaccharides production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Food Science*, 62: 171-173.
35. Gueimonde, M., S. Tolkkio, Korpimäki, T., Salminen, S. **2004**. New real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4165-4169.
36. Hall, T.A. **1999**. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
37. Hanlon, G. W., Denyer, S. P., Olliff, C. J., Ibrahim, L. J. **2001**. Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2746–2753.
38. Hassan, A.N., Corredig, M., Frank, J.F., El Soda, M. **2004**. Microstructure and rheology of an acid-coagulated cheese (Karish) made with an exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strain and its exopolysaccharide non-producing genetic variant. *Journal of Dairy Research* 71: 116–120.
39. Hoskins, J.R., Sharma, S., Sathyanarayana, B.K. Wickner, S. **2002**. Clp ATPases and their role in protein unfolding and degradation. *Advances in protein chemistry* 59: 413-429.
40. Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A. **2005**. Real-time RT-PCR normalisation, strategies and considerations. *Genes and Immunity* 6: 279–284.
41. Jolly, L., Vincent, S. J.F., Duboc, P., Neeser, J.R. **2002**. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 367–374.
42. Kawada, M., A. Yoshida, **2004**. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in relation to periodontal status assessed by real-time PCR. *Oral Microbiology and Immunology* 19: 289-292.
43. Kleerebezem, M., Van Kranenburg, R. Tuinier, R., Boels, I. A., Zoon, P., Looijesteijn, E., Hugenholtz, J., de Vos, W.M. **1999**. Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*: from genetic engineering to improved rheological properties. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 357–365.
44. Kofla, G. and M. Ruhnke **2007**. Development of a new real-time TaqMan PCR assay for quantitative analyses of *Candida albicans* resistance genes expression. *Journal of Microbiological Methods* 68: 178-83.
45. Kreth, J., Merritt, J., Shi, W., Fengxia, Q. **2005**. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *Journal of Bacteriology* 187: 7193–7203.

46. Kutyavin, I. V., Afonina, I. A. **2000**. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research* 28: 655-661.
47. Landersjo, C., Yang, Z., Huttunen, E., Widmalm, G. **2002**. Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103). *Biomacromolecules* 3: 880-884.
48. Laws A., Gu, Y. Marshall, V. **2001**. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances* 19: 597-625.
49. Lebeer, S., Verhoeven, T. L. A., Perea Velez, M., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C. J. **2007a**. Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied Environmental Microbiology* 73: 6768-6775.
50. Lebeer, S., De Keersmaecker, S.C.J, Verhoeven,T.L.A., Fadda,A. A., Marchal,K., Vanderleyden, J., **2007b**. Functional analysis of *luxS* in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation. *Journal of Bacteriology* 189: 860-871.
51. Laneuville Ballester, S.I. **2004**. Étude de l'interaction associative entre la β - lactoglobuline et le xanthane natif ou le xanthane traité aux hautes pressions hydrodynamiques. Thèse Université Laval Notice No. a1582333, Bibliothèque virtuelle.
52. Lewis K. **2000**. Programmed Death in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 64, No. 3. p. 503-514.
53. Lipinski, T., Jones, C., Lemercinier, X., Korzeniowska-Kowal, A., Strus ,M., Rybka, J., Gamian, A., Heczko, P.B., **2003**. Structural analysis of the *Lactobacillus rhamnosus* strain KL37C exopolysaccharide. *Carbohydrate Research* 338: 605-609.
54. Livak K.J., Schmittgen T.D. **2001**. Analysis of relative gene expression data using Real- Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. *Methods* 25: 402-408.
55. Lyons, S. R, Griffen, A. L, Leys E. J. **2000**. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 3: 2362-2365
56. Macedo, M.G., Lacroix, C., Champagne, C.P. **2002a**. Combined Effects of Temperature and Medium Composition on Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in a Whey Permeate Based Medium. *Biotechnology Progress*, 18, 167-173.

57. Macedo, M.G., Lacroix, C., Gardner, N.J., Champagne, C.P. **2002b**. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeates. *International Dairy Journal* 12: 419-426.
58. Macura, D., Townsley, P.M. **1984**, Scandinavian ropy milk-indentification and characterization of endogenous ropy lactic Streptococci and their extracellular excretion. *Journal of Dairy Science* 67: 735-744.
59. Malorny, B., Paccassoni, E., Fach P., Bunge, C., Martin A., Helmuth, R. **2004**. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 7046-7052.
60. McKellar, R, Xuewen, L. **2000**. Modeling microbial responses in food. CRC series in contemporary food science. Bibliothèque Université Laval. QW85M689.2004.
61. Michaud, P., Da Costa, A., Courtois, B., Courtois, J. **2003**. Polysaccharides lyases recent developments as biotechnological tools. *Critical Reviews Biotechnology* 23: 233-266.
62. Morishita, T., Y. Deguchi, M. Yajima, T. Sakurai, and T. Yura. **1981**. Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthesis pathways. *Journal of Bacteriology*, 48:64-71.
63. Mozzi, F., de Giori, G.S., Oliver, G., de Valdez, G.F. **1996**. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* in milk under different growth conditions. *Milchwissenschaft* 51: 670-673.
64. Nocker, A, Camper, A.K. **2006**. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1997-2004.
65. O'Sullivan, E., Condon, S. **1997**. Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4210-4215.
66. Peirson, S. N., Butler, J.N. **2003**. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Research*, 31: e73.
67. Petersen, B.L., Dave, R.I., McMahon, D.J., Oberg, C.J., Broadbent, J.R. **2000**. Influence of capsular and ropy exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* on mozzarella cheese and cheese whey. *Journal of Dairy Science* 83: 1952-1956.
68. Perry D.B., McMahon D., Oberg C.J. **1997**. Effect of exopolysaccharide-producing cultures on moisture retention in low fat mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 80: 799-805.

69. Petry, S., Furlan, S., Crepeau, M., Cerning, J., Desmazeaud, M. **2000**. Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3427–3431.
70. Pham, P.L., Dupont, I., Roy, D., LaPointe, G., Cerning, J. **2000**. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2302–2310.
71. Pilyugin S.S., Reeves, G.T., Narang, A. **2004**. Predicting stability of mixed microbial cultures from single species experiments: 1. phenomenological model. *Mathematical Biosciences* 192: 85–109.
72. Poitras E., Houde, A. **2002**. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* 2: 2-11.
73. Provencher, C., LaPointe, G., Sirois, S., Van Calsteren, M.R., Roy, D. **2003**. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of priming glycosyltransferase genes of the exopolysaccharide locus in strains of the *Lactobacillus casei* group. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 6: 3299–3307.
74. Querci, M., Jermini M., Van den Eede, G. **2007**. Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés, module 10 PCR quantitative pour la détections d'OGM. F. Weighardt. European Commission, Joint Reserch Centre. OMS. <http://biotech.jrc.it/home/documents/Manual%20FR/Avant-propos.pdf>
75. Ramos, A., Boels, I. C., De Vos, W. M., Santos, H. **2001**. Relationship between glycolysis and exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 33–41.
76. Rao, D., Webb, J. S., and Kjelleberg, S. **2005**. Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicate*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1729–1736.
77. Reardon, K.F, Douglas C. M., Rogers, J, DuTeau, N, Kee-Hong K. **2002**. Biodegradation kinetics of aromatic hydrocarbon mixtures by pure and mixed bacterial cultures. *Environmental Health Perspectives* 110: 1005–1011.
78. Rebrikov, D. V., Trofimov, D. **2006**. A review of approaches to data analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42, 455-463.
79. Ruas-Madiedo, P., de los Reyes-Gavilan, C.G. **2005a**. Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 88:843-856.

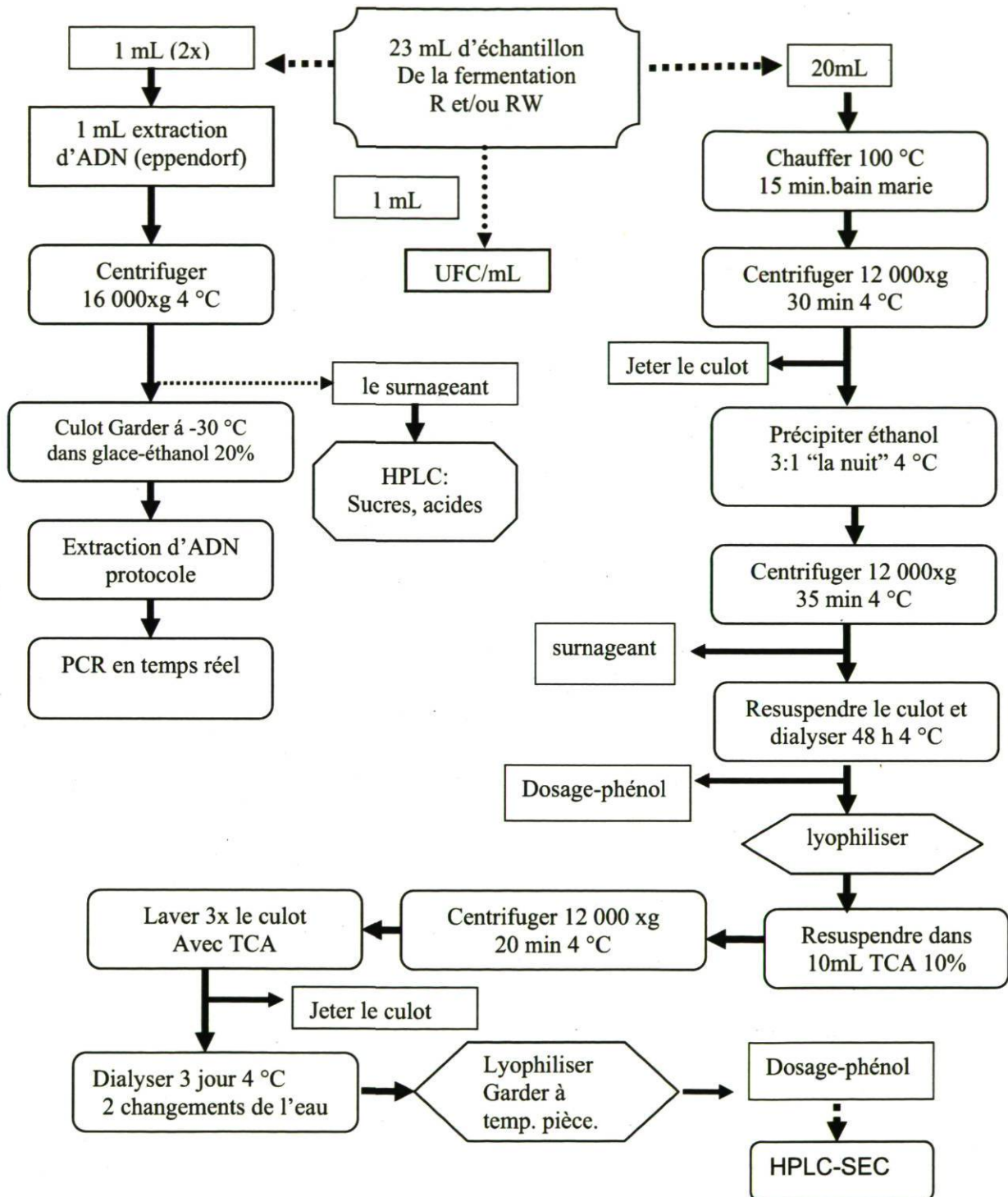
80. Ruas-Madiedo, P., Alting, A.C., Zoon, P. **2005b**. Effect of exopolysaccharides and proteolytic activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains on the viscosity and structure of fermented milks. *International Dairy Journal* 15: 155–164.
81. Rousselon, N., J. P. Delgenes. **2004**. A new real time PCR (TaqMan PCR) system for detection of the 16S rDNA gene associated with fecal bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 59: 15-22.
82. Roy, D., Mainville, I., Mondou, F., **1997**. Selective enumeration and survival of bifidobacteria in fresh cheese. *International Dairy Journal*, 7: 785-793.
83. Roy, D. **2005**. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Lait* 85: 39–56.
84. Sadeque A. Md. Selim, Boonkumkiao, P., Teruo S., Assavanig A., Wada, M, Yokota, A. **2005**. Development and Assessment of a Real-Time PCR Assay for Rapid and Sensitive Detection of a Novel Thermotolerant Bacterium, *Lactobacillus thermotolerans*, in Chicken Feces. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, No. 8p. 4214–4219.
85. Simova, E.D., Frengova, G.I., Beshkova, D.M. **2004**. Exopolysaccharides produced by mixed culture of yeast *Rhodotorula rubra* GED10 and yogurt bacteria (*Streptococcus thermophilus* 13a + *Lactobacillus bulgaricus* 2-11). *Journal of Applied Microbiology* 97: 512–519.
86. Squires, C., Squires C,L. **1992**. The Clp proteins: proteolysis regulators or molecular chaperones. *Journal of Bacteriology* 174: 1081-1085.
87. Sokolenko, A., Pojidaeva, E. **2002**. The gene complements for proteolysis in the *Cyanobacterium synechocystis* spp. PCC 6803 and *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Current Genetics* 41: 291-310.
88. Suokko, A., Savijoki, K. **2005**. Characterization of a mobile *clpL* gene from *Lactobacillus rhamnosus*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 2061-2069.
89. Sutherland, I.W. **1990**. *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*. Cambridge University Press. Cambridge, U.K.
90. Sutherland, I.W. **2001**. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147: 3–9.
91. Suzuki, N., Yoshida, A. **2004**. Quantitative microbiological study of subgingival plaque by real-time PCR shows correlation between levels of *Tannerella forsythensis* and *Fusobacterium* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 2255-2257

92. Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S **2007**. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.
93. Torino, M. I., Mozzi, F. and De Valdez, G. F. **2005**. Exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68 (2): 259-265.
94. Torino, M.I., Taranto, M.P., Sesma, F. and Font de Valdez, G. **2001**. Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in response to environmental pH. *Journal of Applied Microbiology* 91: 846-85.
95. Tuinier, R., Van Casteren, W., Looijesteijn, H. M., Schols, P.J., Voragen, H. A., Zoon, P. **2001**. Effects of structural modifications on some physical characteristics of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis*. *Biopolymers* 59: 160–166.
96. Varmanen, P., Vogensen, F.K. **2003**. Clp E from *Lactococcus lactis* promotes repression of CtsR-dependent gene expression. *Journal of Bacteriology* 185: 5117-5124.
97. Van Calsteren, M.R., Pau-Roblot, c., Bégin, A., Roy, D., **2002**. Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and R. *Biochemical Journal*, 363, 7 ±17 .
98. Van Den Berg D.J.C., Robijn G.W., Janssen A.C., Guiseppin M.L.F., Vreeker R., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G., Ledebouer A.M., Verrips C.T. **1995**. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Applied Environmental and Microbiology* 61: 2840-2844.
99. Van De Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Maguin, S.D.E. **2002**. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82:187-216.
100. Vaningelgem, F., Zamfir M., Mozzi, F., Adriany, T., Vancanneyt, M., Swings J., De Vuyst L. **2004**. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (2): 900–912.
101. Vincent, D., Roy D., Mondou F., Déry, C. **1998**. Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification. *International Journal of Food Microbiology*, 43: 185–193.
102. Vinderola, C.G., Mocchiutti P., Reinheimer, J.A. **2002**. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *Journal of Dairy Science* 85: 721–729.
103. Welman A. D., and Maddox, I. S **2003a**. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Perspectives and Challenges. *Trends in Biotechnology* 21: 269-274.

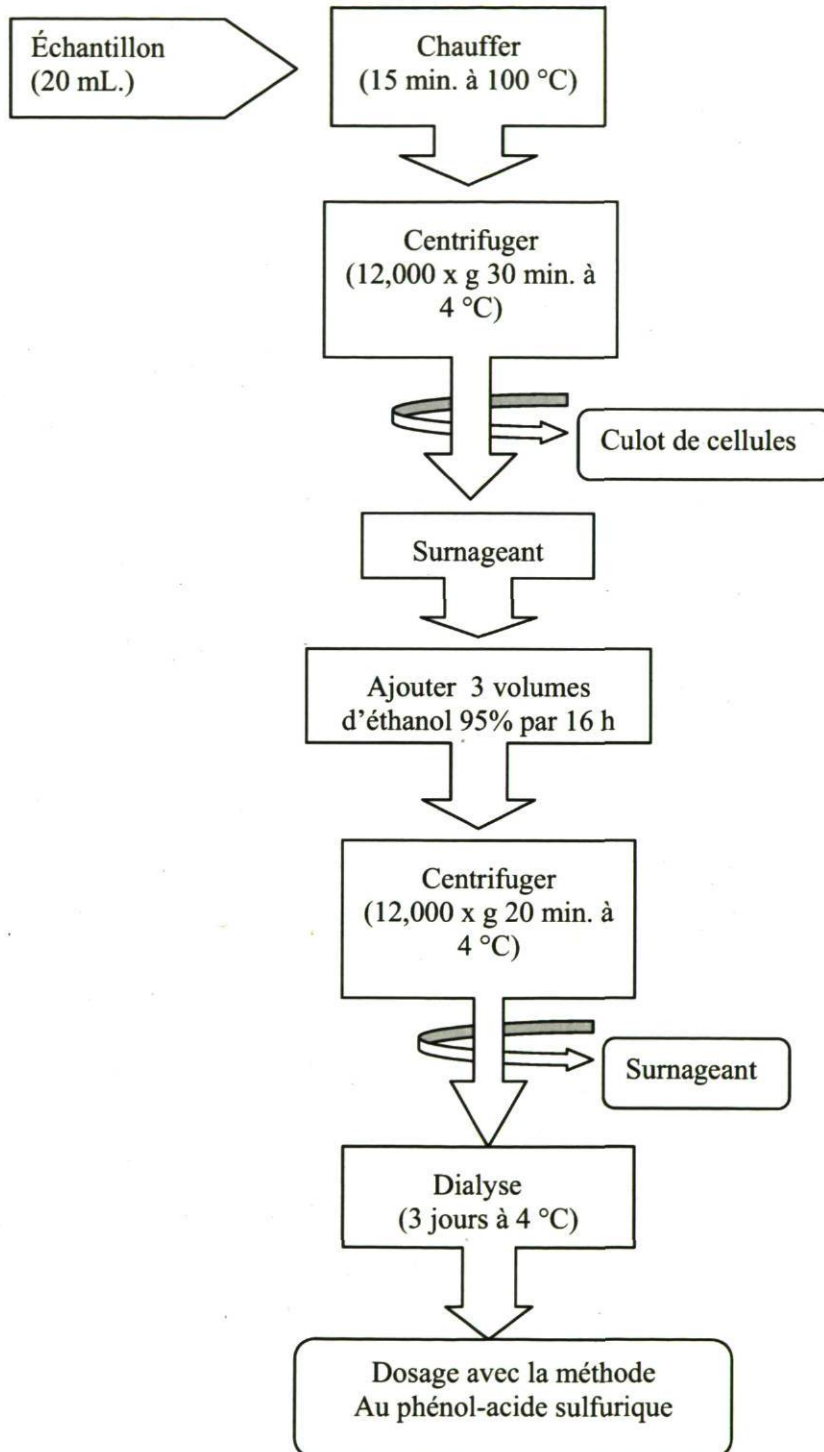
104. Welman, A. D., Maddox, I.S. **2003b**. Fermentation performance of an exopolysaccharide-producing strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* 30: 661–668.
105. Wong, M. L., Medrano, J.F. **2005**. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39: 75-85.
106. Yoshida, A., M. Kawada. **2004**. TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for the correlation of *Treponema denticola* numbers with the severity of periodontal disease. *Oral Microbiology and Immunology* 19: 196-200.
107. Yoshida, A., Suzuki, N. **2003**. Development of a 5' fluorogenic nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 863-866.
108. Yuanrong, Y., Nellaker, C., Karlsson, H. **2006**. Evaluation of minor groove binding probe and Taqman probe PCR assays: Influence of mismatches and template complexity on quantification. *Molecular and Cellular Probes* 20: 311–316.
109. Zhang, T., Fang, H.H. **2006**. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70: 281-289.

ANNEXES

Annexe I. Diagramme de traitements de échantillons



Annexe II. Diagramme de l'extraction et de la purification des polysaccharides.



Annexe III. Liste des composantes du milieu de croissance BMM pour la production d'EPS

Composant	g/L
Acides aminés	
L-Tyrosine	0.1
L-Arginine	0.1
L-Aspartic acid	0.2
L-Cysteine	0.2
L-glutamic acid	0.1
L-Isoleucine	0.1
L-leucine	0.1
L-lysine	0.1
L-Methionine	0.1
L-phénylalanine	0.1
L-serine	0.1
L-Théonine	0.1
L-Tryptophane	0.1
L-valine	0.1
Sels	
MnSO ₄ -7H ₂ O	0.5
FeSO ₄ -7H ₂ O	0.02
Sodium acétate	6
Ammonium citrate	1
KH ₂ PO ₄	3
K ₂ HPO ₄	3
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.5
Solution de vitamines	
Acide Folique	0.01
Acide nicotinique	0.1
Acide pantothénique	0.1
Pyridoxal	0.2
Riboflavine	0.1
Tween 80	1 mL
(Sorbitan polyoxyethylene monooleate).	
Glucose	20

Annexe IV. Protocole d'extraction d'ADN génomique*.

Préparer une culture de *Lb. rhamnosus* dans un tube de 20 mL à 37 °C par 24 h dans le milieu MRS, avant de deux pré-cultures de 16 h. Un prélèvement de 1 mL de cette culture se soumet à l'extraction suivante :

➤ Lavages

1. Centrifuger à 22 000 r.p.m pendant 10 min. à 4 °C.
2. Séparer le surnageant et ajouter 1 mL de tampon sucrose 12 %-tris-HCl 25 mM pH 8.0
3. Répéter 3 lavages avec tampon sucrose 12 %-tris-HCl 25 mM pH 8.0 et centrifuger à 22 000 r.p.m. pendant 10 min. à 4 °C chaque lavage.
4. Jeter le surnageant et garder le culot,
5. Ajouter 200 µL de tampon tris-sucrose et resuspendre le culot.

➤ Lyses

6. Ajouter :
 - 3 µL ARNase (Roche, Canada) d'une solution de 1 mg/mL
 - 25 µL lysozyme (Sigma, Canada) d'une solution de 40 mg/mL
 - 10 µL mutanolysine (Sigma, USA) d'une solution 2000U/mL
 - Incuber 2 h à 37 °C avec légère agitation.
7. Ajouter:
 - 41 µL SDS 10%
 - 41 µL EDTA 500 mM pH 8.0
 - 20 µL protéinase K fungal (Invitrogen, Germany) d'une solution à 20 mg/mL
 - Incuber 30 min. à 65 °C

➤ Élimination d'EPS

8. Ajouter :
 - 112 µL de CTAB-NaCl (10% hexadecyltrimethyl ammonium bromide dans 7.0M NaCl)
 - 134 µL de NaCl 5M
 - Incuber 20 min à 65 °C
9. Transférer la solution lyses dans les tubes phase-lock
10. Récupérer le reste des solutions lyses avec 150 µL de tris-HCl 10mM et le transférer dans les tubes phase-lock gel heavy (Eppendorf, Hamburg, Germany., Maxtract high density, Qiagen, On. Canada)
11. Ajouter un volume égal d'une solution phénol : chloroforme : alcool isoamilyque (25 :24 :1), ± 800 µL. Mélanger bien par immersion
12. Centrifuger 15 min. 15 °C, 22000 r.p.m.
13. Transférer la phase supérieure dans un tube différent.

➤ **Purification d'ADN**

14. Ajouter un volume égal d'isopropanol froid, $\pm 700 \mu\text{L}$ et $1 \mu\text{L}$ de glycogène (Roche, Canada) mélanger très doucement par immersion. Laisser précipiter à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 3 h.
15. Centrifuger à 22 000 r.p.m. pendant 30 min. $4 \text{ }^\circ\text{C}$
16. Laver trois fois avec 1 mL éthanol 70%, sans resuspendre jamais le culot.
17. Jeter le surnageant doucement.
18. Éliminer l'éthanol par speed-vac, 15 min. $45 \text{ }^\circ\text{C}$
19. Ajouter $40 \mu\text{L}$ de l'eau grade biomol sans resuspendre sans aucun bris mécanique
- 20 Laisser reposer l'ADN over night

(*) Modification du protocole du Vincent *et al.* 1998, (International Journal of Food Microbiology 43 (1998) 185–193) en utilisant la technologie Phase-lock.

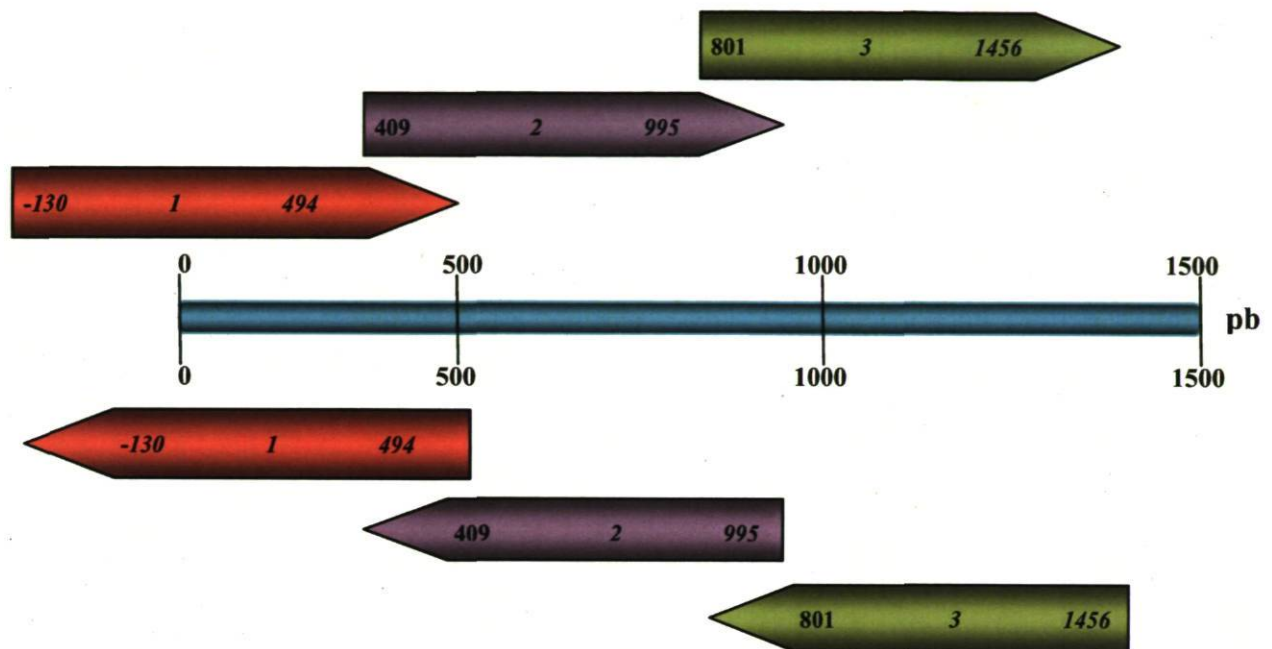
Annexe V. Analyse des séquences du gène *clpL***Figure 20.** Séquençage du gène *clpL*

Tableau 7. Pourcentages de la similarité obtenus entre les séquences cibles et les séquences de référence dans Genbank

Souches ciblées	Position Amorces	% Identité (séquences)	Référence Genbank
	-130 / 494	100 % (450 / 450)	AY659978
<i>Lb. rhamnosus</i> R	409 / 995	99 % (513 / 514)	AY659978
	801 / 1456	99 % (539 / 542)	AY659978
	-130 / 494	100 % (448 / 448)	AY659979
<i>Lb.rhamnosus</i> RW9595M	409 / 995	99 % (527 / 528)	AY659979
	801 / 1456	100 % (541 / 541)	AY659979

Alignements des séquences avec l'algorithme CLUSTAL W (Mega4 v. 4.0)

Séquence du gène *clpL* dans la région ciblée par les amorces -130F/494R, 409F/995R et 801F/1456R obtenue pour *Lb. rhamnosus* R.

#Lb.R_sequence	AATTCGACTA	TGGCAA	ACTT	TAACGATCCG	TTTTTCAATC	ATGACATGGA	[50]
#AY659978_GenBank	[50]
#Lb.R_sequence	CGATGTATTC	AATCAGATGC	TTCAAGGAAT	GGGTAAAGGC	GAGTCAGCCC		[100]
#AY659978_GenBank		[100]
#Lb.R_sequence	GCTATGTGGT	GAATGGCCAC	GAAATGACGC	CGGATGAATT	TGCGCAGTAT		[150]
#AY659978_GenBank		[150]
#Lb.R_sequence	CGGGCGACCG	GCCAGCTGCC	AAAGCAAGGC	GATGAAATCC	CGGTTGAAAC		[200]
#AY659978_GenBank		[200]
#Lb.R_sequence	GACTGGCGAA	CAAGCCGTCA	AGAAAGGCGG	TATTCTTGAA	AAGCTTGGCC		[250]
#AY659978_GenBank		[250]
#Lb.R_sequence	GCAACCTGAC	GCAAGAAGCC	AAGGATGGTC	TGCTTGATCC	GGTGATTGGC		[300]
#AY659978_GenBank		[300]
#Lb.R_sequence	CGTGATCAGC	AAATTCAGGA	AACTGCCGAA	ATTTTGAGTC	GGCGGACGAA		[350]
#AY659978_GenBank		[350]
#Lb.R_sequence	GAATAATCCA	ATTTTGGTCG	GTGACGCCGG	TGTCGGCAAG	ACCGCGGTGG		[400]
#AY659978_GenBank		[400]
#Lb.R_sequence	TCGAAGGCTT	GGCACAAGCG	ATTGTGAAGG	GCAATGTACC	GGAATCAATT		[450]
#AY659978_GenBank		[450]
#Lb.R_sequence	-----	-----	---TGATCTG	TCGAATCTGG	AAGCAGGCAC		[500]
#AY659978_GenBank	AAAGACAAGC	AGATTTGGTC	GAT.....		[500]
#Lb.R_sequence	GCAATATCGT	GGCAGCTTTG	AAGAAAAGAT	TCAGAATCTG	ATCAAAGAAG		[550]
#AY659978_GenBank		[550]
#Lb.R_sequence	TGAAAGCTGC	TGGCAATGTG	ATTCTGTTCT	TTGATGAAAT	CCATCAGATT		[600]
#AY659978_GenBank		[600]
#Lb.R_sequence	CTTGGCGCCG	GTGCAACTGG	TGGCGAAGAG	TCTGGCGGTA	AGGGGCTCGC		[650]
#AY659978_GenBank		[650]
#Lb.R_sequence	GGATATTATC	AAGCCGGCTT	TGTCGCGTGG	TGAAATCACT	GTGATCGGTG		[700]
#AY659978_GenBank		[700]
#Lb.R_sequence	CGACGACGCA	AGATGAATAT	CGCAATACCA	TTATGAAGGA	CAGCGCCTTG		[750]
#AY659978_GenBank		[750]
#Lb.R_sequence	GCACGTCGGT	TTAACGATGT	CACAATCAAT	GAACCCAGTG	CTACCGATAC		[800]
#AY659978_GenBank		[800]
#Lb.R_sequence	GGTCAAGATT	CTGGAAGGCG	TCAAGAAGCT	TTACGAACAG	CATCATCACG		[850]
#AY659978_GenBankG.		[850]
#Lb.R_sequence	TTCAGTTACC	GGAAAATGTT	TTGAAGGCGG	CGGTGAATTA	CAGTATTCAA		[900]
#AY659978_GenBank		[900]


```

#Lb.R_sequence      TATATTCCAC AGCGCTCCTT GCCGGATAAA GCAATTGACC TCATTGATAT [950]
#AY659978_GenBank  ..... [950]

#Lb.R_sequence      GACCGCGGCA CACTTAGCCA GCAAGCATCC GATTGTTGAC AAGGTGGAAC [1000]
#AY659978_GenBank  ..... [1000]

#Lb.R_sequence      TGGAAAAGCA AATCAAGGAT CTCAACGCGC AAAAGGATGC AGCGGCAAAA [1050]
#AY659978_GenBank  ..... [1050]

#Lb.R_sequence      GCTGAA-GAT TTTGAAAAAG CTGCCAACCT TAAGAAGGAG ATTGCCGACA [1100]
#AY659978_GenBank  .....A... [1100]

#Lb.R_sequence      AGCAACATCG GCTTGAAGGA ACGAACAACG AGAAGCCTGT CGTCGCAACC [1150]
#AY659978_GenBank  ..... [1150]

#Lb.R_sequence      CCGAATGATG TCGCTGCAGC TGTCGAACGT TTGACTGGCA TTCCGGTTTC [1200]
#AY659978_GenBank  ..... [1200]

#Lb.R_sequence      CAAGCTGGGA GCATCCGATA TTGAACGGCT GAAAGGCATT GGCAAGCGCC [1250]
#AY659978_GenBank  ..... .C..... [1250]

#Lb.R_sequence      TGAAGGGTAA GGTAATTGGC CAAGACGAAC CGTTGATATG GTTGCCCGCG [1300]
#AY659978_GenBank  ..... [1300]

#Lb.R_sequence      CTATTCGCCG GAACCGGGCT GGCTTTGATG AAGGTAATCG CCCAATTGGC [1350]
#AY659978_GenBank  ..... [1350]

#Lb.R_sequence      AGCTTCCTGT TTGTGGACC AACCGGTGTC GGAAGACCG AATTGGCTAA [1400]
#AY659978_GenBank  ..... [1400]

#Lb.R_sequence      GCAGTTG [1407]
#AY659978_GenBank  ..... [1407]

```


#Lb.RW9595	TCCTTGCCGG	ATAAAGCAAT	TGACCTCATT	GATATGACCG	CGGCACACTT	[950]
#AY659979	[950]
#Lb.RW9595	AGCCAGCAAG	CATCCGATTG	TTGACAAAGT	GGAACTGGAA	AAGCAAATCA	[1000]
#AY659979G..	[1000]
#Lb.RW9595	AGGATCTCAA	CGCGCAAAAG	GATGCAGCGG	CAAAAGCTGA	AGATTTTGAA	[1050]
#AY659979	[1050]
#Lb.RW9595	AAAGCTGCCA	ACCTTAAGAA	GGAGATTGCC	GACAAGCAAC	ATCAGCTTGA	[1100]
#AY659979	[1100]
#Lb.RW9595	AGGAACGAAC	AACGAGAAGC	CTGTCGTCGC	AACCCCGAAT	GATGTCGCTG	[1150]
#AY659979	[1150]
#Lb.RW9595	CAGCTGTTGA	ACGTTTACT	GGCATTCCGG	TTTCCAAGCT	GGGTGCATCC	[1200]
#AY659979	[1200]
#Lb.RW9595	GATATTGAAC	GGCTGAAAGG	CATTGGTAAG	CGCCTGAAGG	GTAAGGTAAT	[1250]
#AY659979	[1250]
#Lb.RW9595	TGGCCAAGAC	GAAGCCGTTG	ATATGGTTGC	CCGCGCTATT	CGCCGGAACC	[1300]
#AY659979	[1300]
#Lb.RW9595	GGGCTGGCTT	TGATGAAGGT	AACCGCCCAA	TTGGCAGCTT	CCTGTTTGT	[1350]
#AY659979	[1350]
#Lb.RW9595	GGACCAACCG	GTGTCGGGAA	GACTGAATTA	GCTAAGCAGT	TGG	[1393]
#AY659979	[1393]

Annexe VI. Mise au point des essais de la PCR quantitative en temps réel.

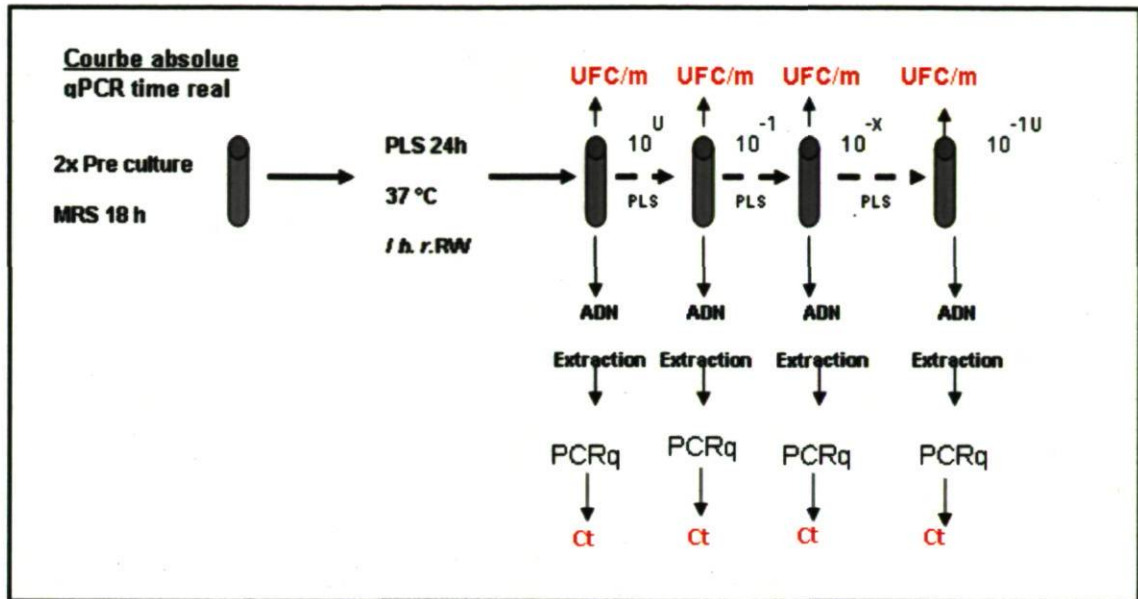


Figure 21. Schème des dilutions en série pour la qPCR.

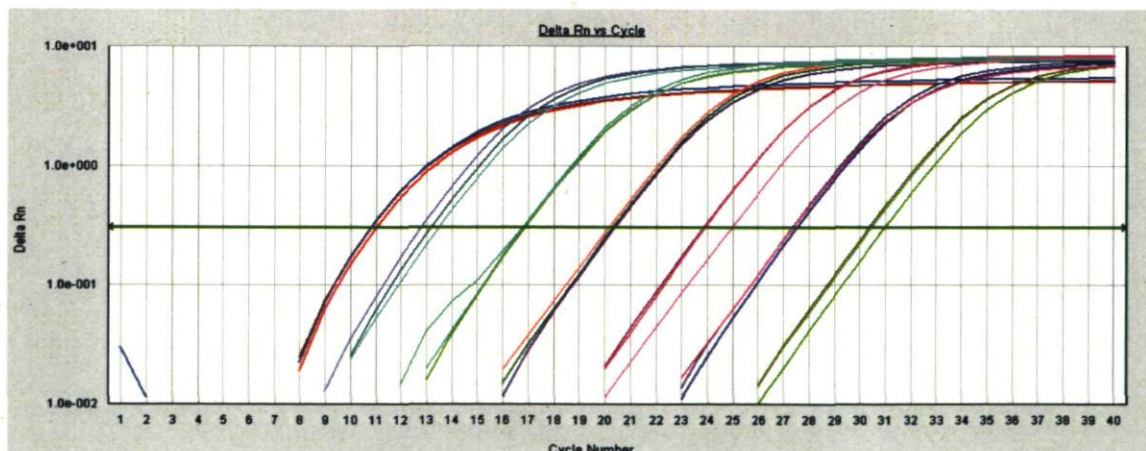


Figure 22. Sensibilité de l'amplification de la qPCR avec la sonde TaqMan-MGB spécifique pour *Lb. rhamnosus* RW9595M. L'ADN isolé à partir de la culture pure (2.26×10^9 UFC/mL dilué 10 fois ont été utilisé). Delta Rn (ΔRn) correspond à l'intensité du signal généré à chaque point durant la PCR. De gauche à droite courbe 1, signal de l'ADN extrait de la culture pure, correspondant à une concentration cellulaire de 2.26×10^9 UFC/mL, courbe 2 l'ADN 10 fois dilué à partir de l'extrait original, courbe 3 à la 7 correspond aux dilutions 10^{-2} à 10^{-6} de l'extrait original, respectivement. Chaque courbe a été répétée trois fois.

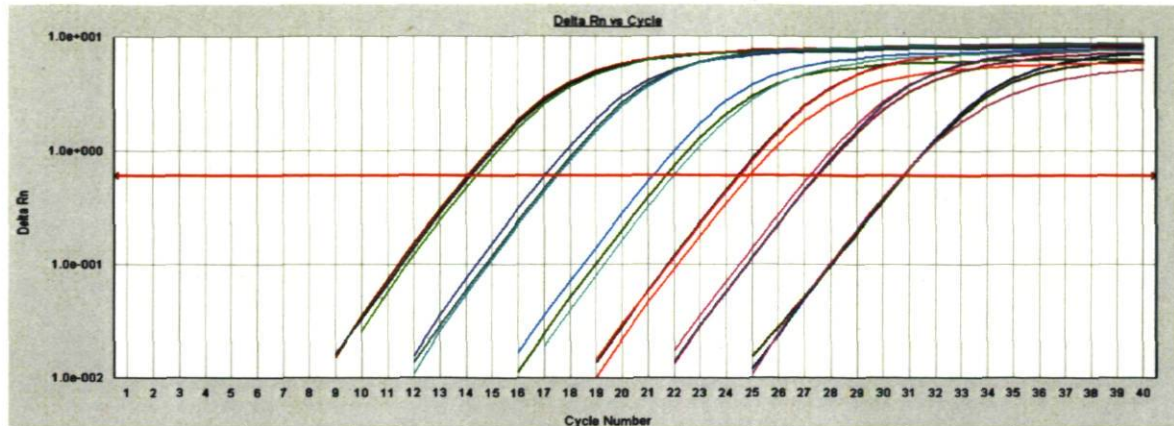


Figure 23. Sensibilité de l'amplification de la qPCR avec la sonde TaqMan-MGB spécifique pour *Lb. rhamnosus* R. L'ADN isolé depuis une culture pure (1.03×10^9 UFC/mL dilué 10 fois a été utilisé). Delta Rn (ΔRn) correspond à l'intensité du signal généré à chaque point durant la PCR. De gauche à droite courbe 1, signal de l'ADN extrait de la culture pure, correspondant à une concentration cellulaire de 2.26×10^8 UFC/mL. Courbe 2 à la 6 correspondent aux dilutions 10^{-2} à 10^{-6} de l'extrait original, respectivement.

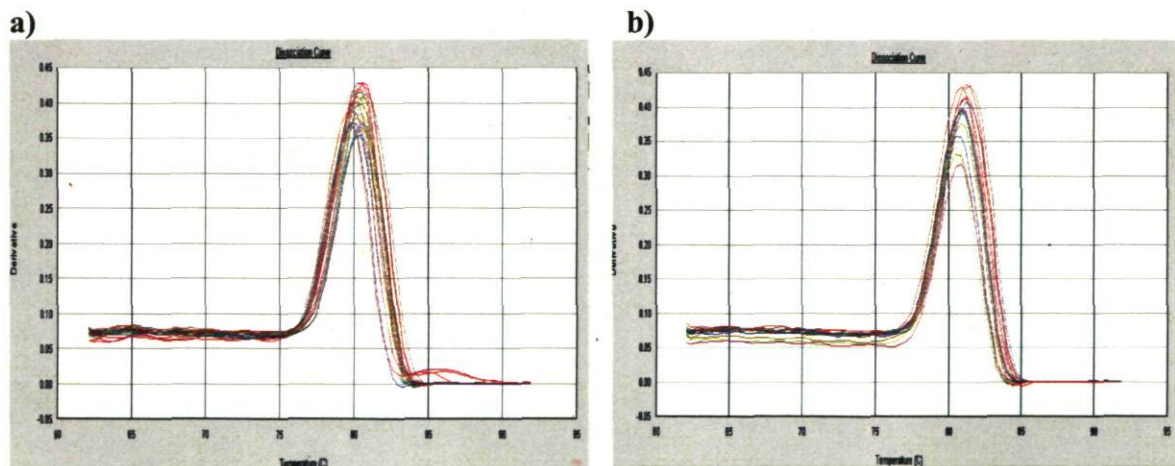


Figure 24. Analyse de la courbe de dissociation. En utilisant SYBRGreen avec des amorces du gène *clpL* position a) 1134-1196, b) 281-339 pour *Lb. rhamnosus* R et RW9595M. La détermination de la température d'hybridation des amorces par une courbe des dissociations, nous a permis de connaître la spécificité des amorces sur la matrice, la détection de mésappariement, et l'optimisation des concentrations des amorces dans un essai de qPCR.

Tableau 8. Courbe de calibration absolue pour *Lb. rhamnosus* RW9595M, en utilisant la sonde Taqman-MGB spécifique.

Ct	UFC/mL	Tm
10.84 ± 0.14	2.26 x 10 ⁹	79.83 ± 0.28
12.95 ± 0.27	2.26 x 10 ⁸	80.50 ± 0.00
16.79 ± 0.06	2.26 x 10 ⁷	80.06 ± 0.18
20.25 ± 0.10	2.26 x 10 ⁶	80.06 ± 0.18
24.23 ± 0.64	2.26 x 10 ⁵	80.05 ± 0.28
27.34 ± 0.11	2.26 x 10 ⁴	79.93 ± 0.18
30.58 ± 0.38	2.26 x 10 ³	80.01 ± 0.47

Tableau 9. Courbe de calibration absolue pour *Lb. rhamnosus* R, en utilisant la sonde Taqman-MGB spécifique.

Ct	UFC/mL	Tm
11.07 ± 0.13	1.03 x 10 ⁹	81.3 ± 0.11
14.17 ± 0.14	1.03 x 10 ⁸	81.1 ± 0.14
17.28 ± 0.20	1.03 x 10 ⁷	81.3 ± 0.14
21.61 ± 0.43	1.03 x 10 ⁶	80.6 ± 0.18
24.59 ± 0.26	1.03 x 10 ⁵	81.0 ± 0.14
27.35 ± 0.14	1.03 x 10 ⁴	80.9 ± 0.00
30.73 ± 0.04	1.03 x 10 ³	80.2 ± 0.32

Tableau 10. Courbe de calibration absolue pour *Lb. rhamnosus* R et RW9595M, en utilisant la sonde Taqman-MGB universelle.

Dilutions	Ct (monoculture R)	Ct (monoculture RW9595M)
1.03 / 2.26 x 10 ⁹ UFC/mL	12.42 ± 0.25	15.31 ± 0.27
1.03 / 2.26 x 10 ⁸ UFC/mL	16.14 ± 0.48	17.92 ± 2.04
1.03 / 2.26 x 10 ⁷ UFC/mL	19.74 ± 0.07	20.64 ± 4.30
1.03 / 2.26 x 10 ⁶ UFC/mL	23.14 ± 0.05	24.34 ± 4.29
1.03 / 2.26 x 10 ⁵ UFC/mL	26.62 ± 0.54	28.14 ± 3.40

Annexe VII. Courbes de calibration du poids moléculaire par HPLC-SEC

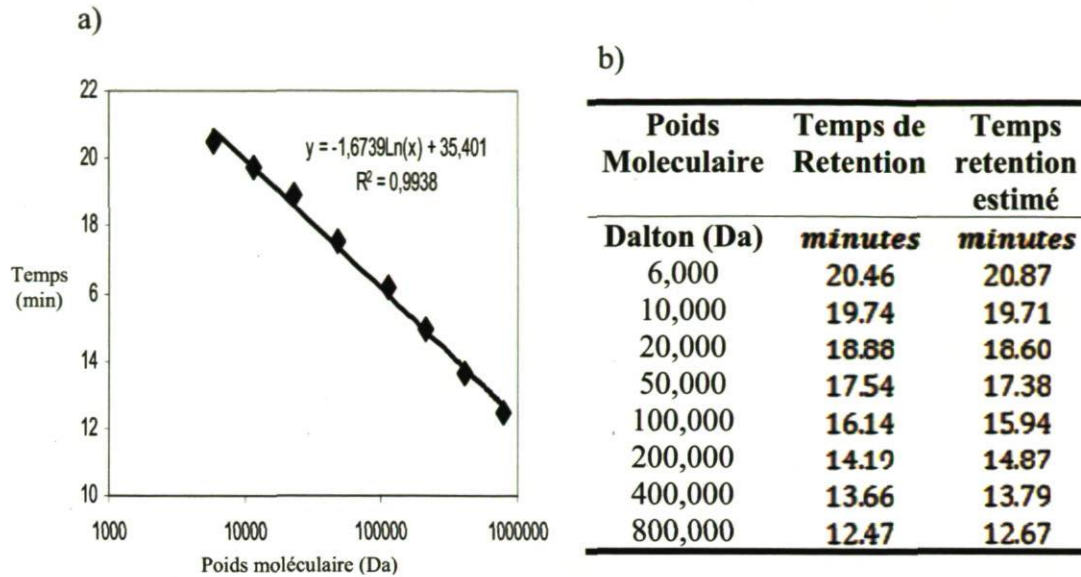


Figure 25. Courbe standard de temps de rétention obtenus pour le pullulan par la technique de HPLC-SEC. a) Trace de la relation linéaire entre le logarithme naturel du poids moléculaire connu du standard Pullulan (Da) contre le temps de rétention (minutes). b) Exemple représentatif des valeurs utilisées pour tracer la courbe standard, où chaque valeurs du temps de rétention représente la moyenne du triplicata. Une courbe standard différente était tracée pour chaque expérience.

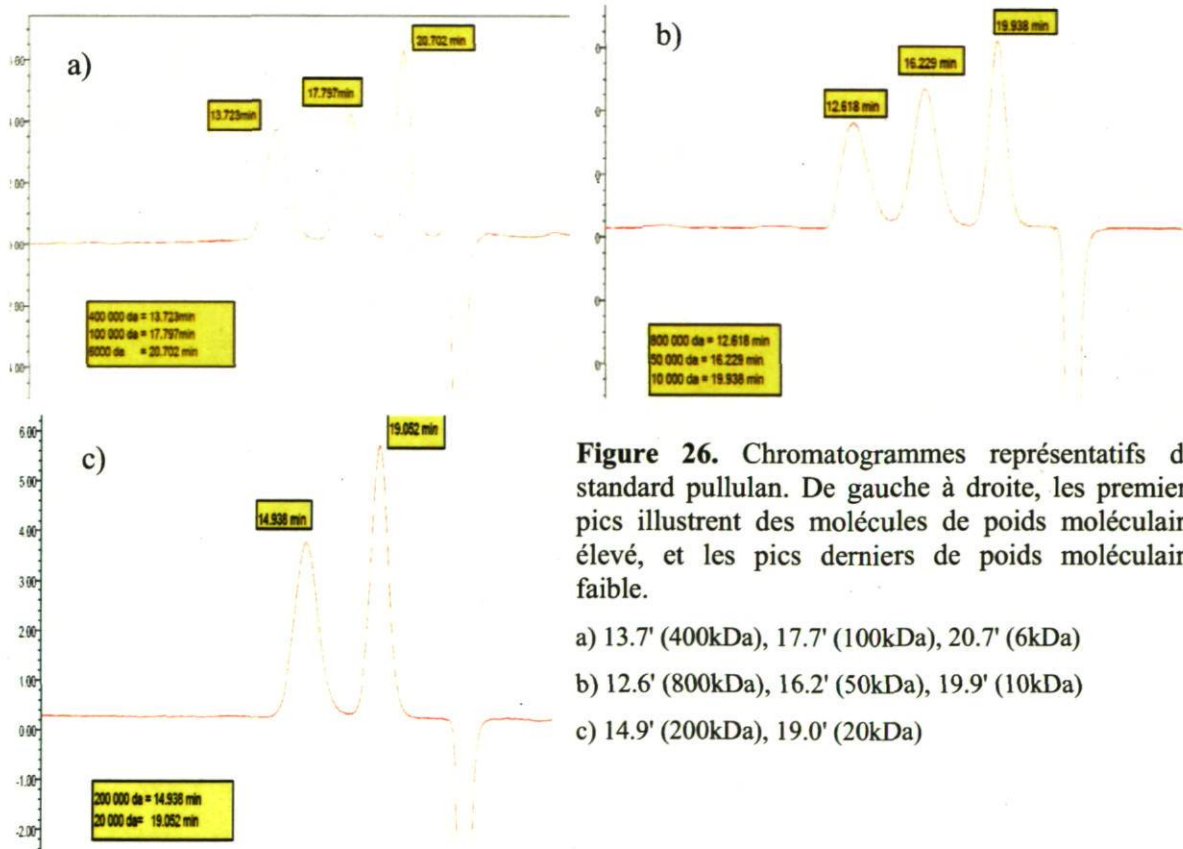


Figure 26. Chromatogrammes représentatifs du standard pullulan. De gauche à droite, les premiers pics illustrent des molécules de poids moléculaire élevé, et les pics derniers de poids moléculaire faible.

- a) 13.7' (400kDa), 17.7' (100kDa), 20.7' (6kDa)
- b) 12.6' (800kDa), 16.2' (50kDa), 19.9' (10kDa)
- c) 14.9' (200kDa), 19.0' (20kDa)

Annexe VIII. Données des cinétiques de croissances et production d'EPS

Tableau 11. Données de la cinétique de croissance et de la production d'EPS pour *Lb. rhamnosus* RW9595M dans milieu le BMM-S.

Temps (h)	D.O. _{600nm}	UFC/mL	EPS mg/L
0	0.00 ± 0.00	8.00 ± 0.26 x 10 ⁷	0.00 ± 0.00
12	2.41 ± 0.09	4.43 ± 5.05 x 10 ⁸	558 ± 34
24	3.10 ± 0.21	1.12 ± 0.96 x 10 ⁹	1,157 ± 145
48	2.21 ± 0.38	6.31 ± 4.70 x 10 ⁸	1,597 ± 221
60	1.80 ± 0.17	4.45 ± 4.57 x 10 ⁸	1,617 ± 159
72	1.11 ± 0.12	9.35 ± 1.38 x 10 ⁷	1,690 ± 171

Tableau 12. Données de la cinétique de croissance et de la production d'EPS pour *Lb. rhamnosus* R dans le milieu BMM-S.

Temps (h)	D.O. _{600nm}	UFC/mL	EPS mg/L
0	0.00 ± 0.00	4.88 ± 0.19 x 10 ⁷	0.00 ± 0.00
12	1.37 ± 0.11	7.43 ± 0.41 x 10 ⁸	37 ± 10
24	2.79 ± 0.11	1.18 ± 0.17 x 10 ⁹	251 ± 23
48	2.43 ± 0.15	9.77 ± 0.83 x 10 ⁸	461 ± 20
60	2.36 ± 0.04	1.07 ± 0.47 x 10 ⁹	497 ± 80
72	1.32 ± 0.05	2.35 ± 1.54 x 10 ⁸	285 ± 20

Tableau 13. Données de la cinétique de croissance et de la production d'EPS pour la coculture de *Lb. rhamnosus* R et RW9595M dans le milieu BMM-S.

Temps (h)	D.O. _{600nm}	UFC/mL	EPS mg/L
0	0.00 ± 0.00	5.10 ± 0.38 x 10 ⁷	0.00 ± 0.00
12	1.28 ± 0.22	7.88 ± 5.02 x 10 ⁸	916 ± 82
24	2.19 ± 0.01	1.91 ± 2.83 x 10 ⁹	1,124 ± 68
48	1.98 ± 0.16	6.40 ± 1.9 x 10 ⁸	1,447 ± 30
60	1.62 ± 0.01	6.20 ± 0.33 x 10 ⁸	995 ± 58
72	0.45 ± 0.05	4.33 ± 2.01 x 10 ⁷	991 ± 30

Tableau 14. Données de la cinétique de croissance et de la production d'EPS de *Lb. rhamnosus* RW9595M dans le milieu PLS. Compte de cellules viables par plaque et par PCR-TaqMan.

Temps (heures)	UFC/mL (Plaque)	UFC/mL (qPCR)	EPS mg/L
0	$2.09 \pm 0.62 \times 10^7$	-----	0.00
12	$2.73 \pm 0.35 \times 10^9$	$1.84 \pm 0.30 \times 10^9$	262 ± 2
24	$4.37 \pm 2.10 \times 10^9$	$4.27 \pm 0.19 \times 10^9$	510 ± 11
36	$4.38 \pm 2.90 \times 10^9$	$4.89 \pm 0.66 \times 10^8$	787 ± 93
48	$1.33 \pm 1.20 \times 10^8$	$1.94 \pm 0.25 \times 10^8$	1330 ± 31
60	$1.00 \pm 0.80 \times 10^7$	$2.27 \pm 0.94 \times 10^7$	1489 ± 86
72	$1.31 \pm 0.26 \times 10^7$	$5.26 \pm 0.91 \times 10^6$	1498 ± 61

Tableau 15. Données de la cinétique de croissance et de la production d'EPS de *Lb. rhamnosus* R dans le milieu PLS. Compte de cellules viables par plaque et par PCR-TaqMan.

Temps (heures)	UFC/mL (plaque)	UFC/mL (qPCR)	EPS mg/L
0	$1.03 \pm 0.82 \times 10^7$	-----	0.00
12	$1.13 \pm 0.73 \times 10^9$	$2.06 \pm 0.14 \times 10^8$	54 ± 3
24	$9.90 \pm 5.18 \times 10^9$	$1.38 \pm 0.14 \times 10^9$	219 ± 3
36	$9.93 \pm 5.17 \times 10^9$	$2.41 \pm 0.48 \times 10^9$	344 ± 8
48	$1.93 \pm 5.18 \times 10^{10}$	$2.68 \pm 0.39 \times 10^9$	466 ± 12
60	$4.83 \pm 3.75 \times 10^9$	$1.32 \pm 0.14 \times 10^9$	460 ± 17
72	$2.86 \pm 3.78 \times 10^9$	$9.90 \pm 0.70 \times 10^8$	450 ± 12

Tableau 16. Données de la cinétique de croissance et de la production d'EPS de la coculture de *Lb. rhamnosus* R et RW9595M dans le milieu PLS. Compte de cellules viables par plaque et par PCR-TaqMan.

Temps (heures)	UFC/mL total plaque	UFC/mL total qPCR (sonde universel)	EPS mg/L
0	$1.38 \pm 0.25 \times 10^8$	-----	0.00
12	$1.83 \pm 0.14 \times 10^9$	$4.42 \pm 0.49 \times 10^9$	70 ± 1
24	$1.18 \pm 0.13 \times 10^{10}$	$6.13 \pm 0.32 \times 10^9$	320 ± 52
36	$7.43 \pm 0.49 \times 10^9$	$7.90 \pm 0.61 \times 10^9$	488 ± 23
48	$8.27 \pm 1.58 \times 10^9$	$8.09 \pm 0.69 \times 10^9$	501 ± 10
60	$3.84 \pm 3.05 \times 10^9$	$2.95 \pm 0.61 \times 10^{10}$	493 ± 47
72	$3.75 \pm 4.88 \times 10^9$	$4.48 \pm 0.13 \times 10^{10}$	657 ± 90

Tableau 17. Données de la quantification pour la coculture de *Lb. rhamnosus* R et RW9595M avec les sondes spécifiques clpL- TaqMan-MGB.

Temps	Ct sonde R	UFC/mL (qPCR)	Ct sonde RW	UFC/mL (qPCR)
12	12.93 ± 0.69	9.53 x 10 ⁸	12.35 ± 0.57	1.71 x 10 ⁸
24	11.52 ± 0.32	1.79 x 10 ⁹	11.16 ± 0.57	3.16 x 10 ⁸
36	11.20 ± 0.31	2.05 x 10 ⁹	10.87 ± 0.88	3.67 x 10 ⁸
48	11.76 ± 1.21	1.60 x 10 ⁹	11.60 ± 0.99	2.52 x 10 ⁸
60	11.28 ± 0.22	1.98 x 10 ⁹	12.39 ± 1.01	1.67 x 10 ⁸
72	11.25 ± 0.99	2.01 x 10 ⁹	12.00 ± 0.40	2,05 x 10 ⁸

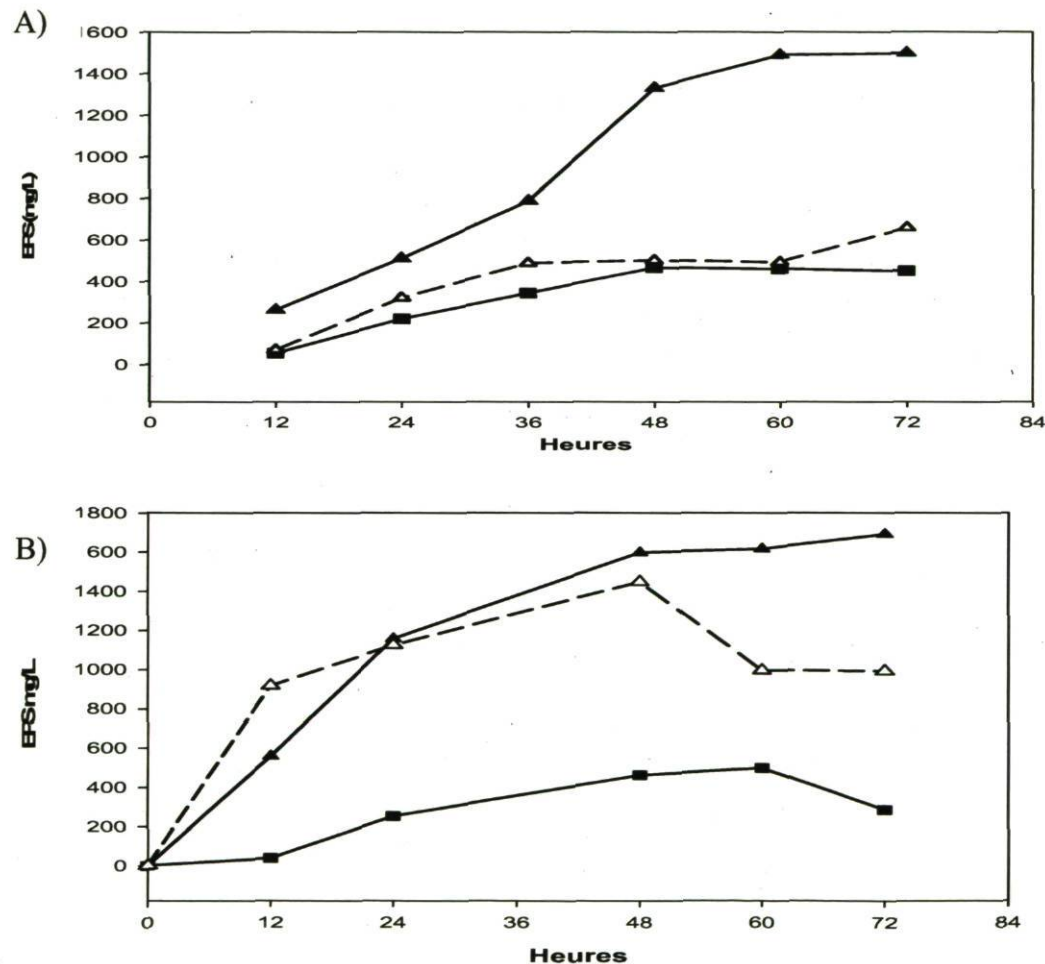


Figure 27. Les cinétiques de production d'EPS en monoculture et en coculture des souches *Lb. rhamnosus* R et RW9595M. A) milieu PLS, B) milieu BMM-S. (▲) monoculture *Lb. rhamnosus* RW9595M., (■) monoculture *Lb. rhamnosus* R (Δ) coculture.

