



Effet de la digestion gastrique sur la viabilité et l'expression de gènes de stress de bactéries probiotiques dans une matrice de sève d'érable

Mémoire

Laurie Hamelin

Maîtrise en sciences des aliments - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Laurie Hamelin, 2021

Effet de la digestion gastrique sur la viabilité et l'expression de gènes de stress de bactéries probiotiques dans une matrice de sève d'érable

Mémoire

Laurie Hamelin

Sous la direction de :

Denis Roy, directeur de recherche
Cyril Roblet, codirecteur de recherche



**UNIVERSITÉ
LAVAL**

Résumé

Les bactéries probiotiques doivent être en mesure de survivre pendant la digestion gastrique afin d'atteindre le côlon et ainsi conférer des bienfaits sur la santé humaine. Le potentiel des matrices d'origine laitière pour soutenir les probiotiques a souvent été décrit, mais celui des produits végétaux tels que la sève d'érable pour cette application reste peu connue, alors que l'engouement pour ces produits est en croissance. L'objectif de ce mémoire était d'évaluer la viabilité cellulaire par l'utilisation du propidium monoazide (PMA) couplé à la qPCR, ainsi que d'évaluer l'expression de cinq gènes reliés au stress *atpA*, *dnaK*, *galK*, *groEL* et *hrcA* par RT-qPCR lors de la digestion gastrique *in vitro* (TIM-1) de trois souches commerciales (*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* A026, *Lacticaseibacillus paracasei* A234, *Lacticaseibacillus rhamnosus* A119) ainsi que de la souche de référence *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) contenues dans de la sève d'érable. Les résultats ont indiqué que toutes les souches ont maintenu un taux de survie élevé suite à la digestion gastrique; *B. animalis* ssp. *lactis* A026 (7.14 log de cellules viables/mL), *L. paracasei* A234 (8.12 log de cellules viables/mL), *L. rhamnosus* A 119 (8.48 log de cellules viables/mL) et *L. rhamnosus* GG (8.36 log de cellules viables/mL) et que l'expression de certains gènes de stress ciblés avait été modulée pendant la digestion gastrique. Seule la souche *L. rhamnosus* GG a montré une modulation au niveau de l'expression de tous les gènes ciblés. Dans l'ensemble, l'expression d'au moins un gène associé à la réponse au stress a été modulée pour toutes les souches probiotiques pendant la digestion gastrique dans la matrice de sève d'érable. Face aux stress de la digestion gastrique, les différentes réponses du métabolisme des bactéries probiotiques permettent une meilleure survie cellulaire. En définitive, ces quatre souches ont le potentiel d'être utilisées comme probiotiques dans une matrice de sève d'érable, ce qui pourrait mener au développement d'une boisson fonctionnelle.

Abstract

The probiotic bacteria must be able to survive during gastric digestion in order to reach the colon and thus provide human health benefits. The potential of dairy matrices to support probiotics has often been described, but plant products such as maple sap for this application remains little known, while the interest for these products is growing. The objective of this thesis was to evaluate cell viability by the use of propidium monoazide (PMA) coupled to qPCR, as well as to evaluate the expression of five genes linked to stress *atpA*, *dnaK*, *galK*, *groEL* and *hrcA* by RT-qPCR during *in vitro* gastric digestion (TIM-1) of three commercial strains (*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* A026, *Lactocaseibacillus paracasei* A234, *Lactocaseibacillus rhamnosus* A119) as well as the reference strain *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) delivered in maple sap. The results indicated that all strains maintained a high survival rate after gastric digestion; *B. animalis* subsp. *lactis* A026 (7.14 log of viable cells/mL), *L. paracasei* A234 (8.12 log of viable cells/mL), *L. rhamnosus* A119 (8.48 log of viable cells/mL), and *L. rhamnosus* GG (8.36 log of viable cells/mL) and that the expression of certain target stress genes was modulated during gastric digestion. Only *L. rhamnosus* GG strain showed modulation in the expression of all target genes. Overall, the expression of at least one gene associated with the stress response was modulated for all probiotic strains during gastric digestion in the maple sap matrix. Faced with the stress of gastric digestion, the different responses of the metabolism of probiotic bacteria allow better cell survival. Ultimately, these four strains have the potential to be used as probiotics in a maple sap matrix, which could lead to the development of a functional drink.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures	vi
Liste des tableaux.....	vii
Listes des abréviations, sigles, acronymes.....	viii
Remerciements	xii
Avant-propos.....	xiii
Introduction	1
Chapitre 1 – Revue de littérature.....	2
1.1 Les probiotiques	2
1.1.1 Aperçu historique et définition	2
1.1.2 Effets sur la santé humaine	3
1.1.3 Critères de sélection	4
1.1.4 Les bifidobactéries.....	5
1.1.4.1 <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	6
1.1.5 Les lactobacilles	6
1.1.5.1 <i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	7
1.1.5.2 <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	8
1.2 Matrices alimentaires	8
1.2.1 Matrices laitières	8
1.2.2.1 La sève d’érable	9
1.3 La digestion gastrique et les mécanismes de défense des probiotiques	10
1.3.1 Digestion gastrique	10
1.3.2 Mécanismes d’adaptation des probiotiques.....	10
1.4 Hypothèses et objectifs.....	12
1.4.1 Hypothèse générale.....	12
1.4.2 Objectif général	12
1.4.3 Objectifs spécifiques.....	12
Chapitre 2 - L’expression de gènes de quatre bactéries probiotiques en réponse au stress acide pendant une simulation gastrointestinale dans une matrice de sève d’érable	13
2.1 Résumé	13
2.2 Abstract.....	14

2.3 Introduction.....	15
2.4 Materials and methods	16
2.4.1 Bacterial Strains, Growth Conditions and Viable Counts.....	16
2.4.2 <i>In vitro</i> Dynamic Gastric Digestion.....	17
2.4.3 Bacterial Viability	18
2.4.4 Gene Expressions	19
2.4.5 Statistical Analysis	21
2.5 Results.....	21
2.5.1 Bacterial Viability	21
2.5.1 Modulation of Stress Genes	23
2.6 Discussion.....	25
2.7 Acknowledgments	26
2.8 References	27
Chapitre 3 - Discussion générale.....	32
3.1 Modèle de digestion dynamique <i>in vitro</i> TIM-1	32
3.2 La viabilité et le PMA-qPCR	34
3.3 L'expression de gènes de stress	35
Conclusion générale	37
Références	38

Liste des figures

Fig 2.1 Survival curve of probiotic strains *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* A026, *Lactocaseibacillus* ATCC 53103 in maple sap during *in vitro* gastric digestion (TIM-1). Viable cells were determined by PMA-qPCR in gastric effluent each 20 min of digestion and are expressed as log viable cells/mL. Error bar represents standard error. *paracasei* A234, *Lactocaseibacillus rhamnosus* A119, and *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG22

Fig 2.2 Relative expression of genes *atpA* (red horizontal), *dnaK* (orange wave), *galK* (green vertical), *groEL* (blue point) and *hrcA* (purple diagonal) during *in vitro* gastric digestion (TIM-1) for strains *B. animalis* subsp. *lactis* A026 (A), *Lactocaseibacillus paracasei* A234 (B), *Lactocaseibacillus rhamnosus* A119 (C), and *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 (D). Expression levels were obtained by RT-qPCR and were expressed as fold-differences in gene transcript relative to time 0 after normalization with two reference genes. Means with an asterisk (*) were significantly different from their two reference genes ($P \leq 0.05$) at time 0. Error bars represent the standard deviation calculated by REST software.....24

Liste des tableaux

Tableau 1.1 Origine de souches de bifidobactéries probiotiques adapté de Ventura *et al.* [2004]..... 5

Tableau 1.2 Origine de souches de lactobacilles probiotiques 7

Table 2.1 Parameters of in vitro digestion for stomach compartment 17

Table 2.2 Primer sets for qPCR 19

Table 2.3 Definition, function and primer sets for selected reference and stress genes 20

Tableau 3.1 Comparaison des conditions pour les modèles *in vitro* statiques et dynamiques adapté de Laparra *et al.* [2003]..... 34

Listes des abréviations, sigles, acronymes

x g	Unité d'accélération
°C	Degré Celsius
µL	Microlitre
µM	Micromolaire
ANOVA	Analyse de la variance
ARN	Acide ribonucléique
ARN _r	Acide ribosomique ribosomal
bp	Paire de bases
g	Gramme
h	Heure
Log	Logarithme
min	Minute
mL	Millilitre
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramme
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PMA	Propidium monoazide
PMA-qPCR	qPCR précédé d'un traitement PMA
qPCR	PCR quantitative

rpm	Rotation par minute
s	Seconde
SE	Erreur type
sp.	Espèce non définie
t	Temps
TGI	Tractus gastro-intestinal
U	Unité
UFC	Unité formant colonie

« Si on l'avait su, la recherche n'aurait pas de but. »

« Quand on est enfin arrivé à la certitude, on éprouve l'une des plus grandes joies que puisse ressentir l'âme humaine. »

Louis Pasteur

Remerciements

J'aimerais débiter en remerciant avant tout mon directeur Denis Roy de m'avoir donné l'opportunité de travailler au sein de son équipe de recherche. M. Roy a toujours la réponse à nos plus grandes problématiques et a sa propre manière de nous illustrer la science par des références cinématographiques. Je remercie mon codirecteur Cyril Roblet pour son soutien, ses conseils scientifiques et de rédaction. Je remercie également Émilie Desfossés-Foucault de Biena Inc. de nous avoir permis d'étudier les souches probiotiques et pour ses conseils de conception d'affiche et de traduction.

Je voudrais également remercier toute l'équipe du laboratoire de génomique microbienne tant pour leurs conseils scientifiques que pour leur belle dynamique. Je remercie les professionnels de recherche Julien Chaillot, Karen Guay et Patricia Savard pour leur soutien technique et leurs nombreux conseils. Un merci spécial à ma collègue et conseillère scientifique hors pair Méricie Gagnon qui a lu, relu, corrigé et recorrecté mes communications orales et écrites et qui m'a toujours soutenue dans les moments plus difficiles. Un remerciement spécial également à Camille Cavestri, avec qui j'ai partagé ce projet et qui m'a enseigné les rudiments de l'extraction d'ARN et de l'expression de gènes.

À tous(tes) mes amis(es) et à toute ma famille, je vous remercie de m'avoir encouragée tout au long de mes études. D'abord, à mes parents et à ma grande sœur qui m'ont encouragé à surmonter les plus grands défis et de ne pas lâcher. Un énorme merci à mon copain pour son soutien tant émotionnel que technique pour la conception de graphiques. Un dernier remerciement à mes amis(es) sur le campus, Myriam Laroche, Jade Lévesque, Thomas Messier, Geneviève Pellerin et William Villeneuve d'avoir partagé nos hauts et nos bas en recherche.

Avant-propos

Le présent manuscrit s'inscrit comme mémoire avec l'insertion d'un article scientifique. L'article présenté sera soumis à la revue *Probiotic and Antimicrobial Protein* avec un comité de lecture et a été rédigé en anglais. Un résumé en français et en anglais l'accompagne. Les références bibliographiques de l'article sont listées à la fin de celui-ci alors que celles se présentant dans les autres chapitres se trouvent à la fin du manuscrit.

Le document est divisé en trois chapitres. Le chapitre 1 constitue la revue de littérature en parcourant les connaissances générales, les bienfaits santé et les critères de sélection des bactéries probiotiques, ainsi que les matrices alimentaires avec un regard plus important sur les produits végétaux. Ensuite, la digestion gastrique et le mécanisme de défense des bactéries probiotiques seront présentés. Enfin, les hypothèses et les objectifs de ce mémoire seront exposés.

Le chapitre 2 intitulé « *Gene modulation in response to gastric stress in dynamic gastrointestinal simulator of four probiotic bacteria in maple sap* » sera publié prochainement sous forme d'article dans *Probiotic and Antimicrobial Protein* dont je suis l'auteure principale. Les coauteurs sont Camille Cavestri, Patricia Savard, Émilie Desfossés-Foucault, Cyril Roblet et Denis Roy. Le projet a été conçu par Denis Roy en collaboration avec Émilie Desfossés-Foucault et Cyril Roblet. La méthodologie pour la digestion gastrique *in vitro* et l'extraction d'ARN a été réalisée par Patricia Savard ainsi que Camille Cavestri qui a également participé aux expériences.

En définitive, le chapitre 3 présente la discussion générale portant sur les méthodes de digestion *in vitro*, la viabilité par PMA-qPCR et l'expression de gènes des bactéries probiotiques. Des perspectives sont aussi apportées pour de futures expérimentations.

Introduction

Le marché mondial des probiotiques est en constante croissance et devrait atteindre 61,1 milliards de dollars d'ici 2024 [1]. Un grand nombre d'études a démontré que les produits probiotiques ont la capacité de conférer des bienfaits sur la santé humaine. Comme le mentionne la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé et l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, les bactéries bénéfiques doivent demeurer vivantes aux conditions de fabrication et d'entreposage pour ensuite passer dans le tractus gastro-intestinal (TGI), afin de se rendre au côlon [2].

Jusqu'à présent, plusieurs études ont indiqué que les produits laitiers constituent des matrices favorables à la survie des probiotiques pendant leur passage dans le système digestif [3-5]. Cependant, l'engouement pour les produits d'origine non laitière est en croissance en raison du développement d'intolérances, d'allergies et de problèmes de santé, mais aussi par l'augmentation de l'intérêt vers des régimes alimentaires végétaliens ou par simple choix. Parmi les alternatives végétales se trouve la sève d'érable. Cette alternative végétalienne est constituée principalement d'eau, de saccharose et de minéraux. La sève d'érable dispose d'un fort potentiel comme matrice pour assurer la viabilité des bactéries probiotiques pendant la digestion par sa teneur en sucre et sa faible acidité [6-7]. Lors de la digestion gastrique, les bactéries probiotiques sont exposées à l'acidité de l'estomac qui peut aller d'un pH de 6,4 à 1,7 et qui peut s'avérer fatale pour leur survie [8]. Par conséquent, les bactéries probiotiques sont dotées de mécanismes de défense en condition de stress acide. De plus, la matrice dans laquelle elles sont ajoutées peut jouer un rôle protecteur.

L'objectif de ce mémoire est d'évaluer la viabilité en corrélation à la modulation de gènes de stress ciblés de quatre souches probiotiques dans de l'eau d'érable pendant la digestion gastrique dans un simulateur de digestion *in vitro* dynamique, par des méthodes de microbiologie classiques et moléculaires.

Chapitre 1 – Revue de littérature

1.1 Les probiotiques

1.1.1 Aperçu historique et définition

Avant même qu'une association soit découverte entre la consommation d'aliments fermentés, notamment les produits laitiers, et la santé humaine, la fermentation était déjà une méthode de conservation très utilisée en Égypte et par les civilisations du Moyen-Orient [9]. Cela fait plus d'un siècle qu'il est connu que les aliments fermentés confèrent des bénéfices sur la santé humaine. Autrefois, du lait sûr était ordonné comme traitement aux patients pour restaurer des troubles d'estomac et d'intestins [10]. Par la suite, en 1908, Eli Metchnikoff de l'Institut Pasteur en France a été le premier à démontrer l'effet bénéfique sur la santé des bactéries lactiques du lait fermenté [11-12]. Son postulat reposait sur le fait que la production d'acide lactique et d'autres produits par les bactéries lactiques repoussait les bactéries productrices de toxines retrouvées dans l'intestin. Par conséquent, cela expliquait pourquoi les individus qui consommaient en grande quantité du lait fermenté avaient une plus grande espérance de vie [11-13]. À la même époque, Tissier de l'Institut Pasteur, avait également fait la découverte d'une dominance des bifidobactéries dans le microbiote intestinal humain, d'abord isolées dans les selles de nouveau-nés nourris au sein [12]. Par conséquent, il était recommandé de prescrire des bifidobactéries aux enfants qui souffraient de problèmes gastriques en pensant repousser les bactéries putréfactives [14]. Finalement, c'est en 1960 que les bactéries dites bénéfiques pour le tractus gastro-intestinal (TGI) ont été nommées comme probiotiques. La définition du terme probiotique a évolué au fil du temps grâce aux multiples recherches qui ont été menées. La définition la plus récente est celle donnée par l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture et l'Organisation mondiale de la santé définissant les probiotiques comme étant « des microorganismes vivants qui, lorsqu'administrés en quantité suffisante, confèrent des avantages bénéfiques à l'hôte » [15]. Plusieurs études ont fait la démonstration que certaines espèces bactériennes avaient les propriétés probiotiques et pouvaient contribuer non seulement à l'équilibre du microbiote intestinal, mais aussi d'autres bienfaits sur la santé [16]. Par conséquent, ces recherches ont eu un impact sur l'industrie alimentaire en raison d'une forte demande en produits probiotiques. Des produits laitiers ont d'abord été développés pour ensuite s'étendre à d'autres groupes alimentaires, notamment les produits carnés, céréaliers et végétaux, en passant par des capsules. En faisant face à des coûts de soins de santé qui sont en augmentation constante, à la promotion d'une alimentation

saine, l'engouement pour les aliments fermentés et aux nouvelles technologies, le marché des produits probiotiques est en constante croissance. En effet, la valeur du marché représentait 34 milliards de dollars en 2015, alors qu'il se chiffre à 50 milliards de dollars aujourd'hui [17].

1.1.2 Effets sur la santé humaine

La consommation de probiotiques contribue à prévenir ou à guérir certains problèmes de santé en agissant comme traitement préventif ou complémentaire à la prise de médicaments [13]. En effet, plusieurs études ont démontré des résultats positifs sur des individus qui présentaient déjà certaines pathologies [16]. L'un des effets santé les plus connus est la prévention et le traitement de diarrhées infectieuses causées par les rotavirus surtout chez les enfants. L'activité probiotique permet le renforcement de la réponse immunitaire et l'inactivation de particules virales [18-19]. La prévention et le traitement de diarrhées associées à la prise d'antibiotiques sont aussi référencés. En effet, une altération du microbiote intestinal peut se manifester suite à la prise d'antibiotique. Par conséquent, cela laisse la place aux microorganismes pathogènes pour s'installer et provoquer un épisode de diarrhées [20-21]. Des études ont aussi démontré que l'exposition à une vaste gamme d'espèces microbiennes pendant la vie peut contribuer positivement à la barrière de la muqueuse et donc à la réponse immunitaire face aux différents allergènes [22]. Comme les probiotiques contribuent au maintien de la barrière intestinale, leur consommation réduit les risques d'infection pathogène à la suite de diarrhées qui peuvent arriver suite à la consommation de lactose si celui-ci n'est pas préalablement digéré par les enzymes bactériennes avant d'arriver au côlon [23]. Plusieurs auteurs indiquent aussi des liens entre le microbiote intestinal, l'obésité et le diabète [24]. En effet, il a été proposé que la prise de probiotiques contribuerait à contrer la dysbiose intestinale, c'est-à-dire des perturbations ou des différences au niveau de la composition de la communauté microbienne, des gènes fonctionnels et des activités métaboliques [24]. La prise de suppléments probiotiques chez les adultes en bonne santé, c'est-à-dire sans pathologie, permet principalement l'amélioration de l'équilibre du microbiote intestinal. Par contre, cet effet ne perdure pas dans le temps et nécessite une prise en continu afin de conserver le bienfait puisque les probiotiques ne colonisent pas le microbiote intestinal et sont plutôt de passage comme ils sont éliminés en quelques jours ou quelques semaines. D'autant plus, le microbiote intestinal est facilement perturbé par l'alimentation. Par ailleurs, une alimentation élevée en prébiotiques, majoritairement retrouvés dans les fruits et les légumes, est nécessaire pour les bactéries probiotiques puisqu'ils contribuent à leur survie et à leur croissance. Par conséquent, si les conditions intestinales ne permettent pas le maintien de la survie, un déséquilibre peut survenir. Il a été démontré

qu'une supplémentation de probiotiques chez les personnes âgées pouvait améliorer et/ou réduire la dysbiose [16]. En plus de favoriser le retour à l'équilibre du microbiote intestinal, la prise de probiotiques peut contribuer à l'amélioration du système immunitaire en diminuant l'incidence et la gravité d'infections des voies respiratoires communes. Par conséquent, cet effet permet de réduire ou d'éliminer la prise d'antibiotiques dans certains cas et donc de limiter la résistance aux antibiotiques [26]. D'ailleurs, le microbiote intestinal joue aussi un rôle protecteur contre les pathogènes surtout chez les personnes âgées qui ont un système immunitaire plus affaibli [27]. En revanche, des études supplémentaires seront nécessaires pour confirmer certains effets comme la réduction du niveau de lipides sanguins et d'insuline [16], la régularité du TGI [28], la prévention d'infections urogénitales [29] et la santé psychologique [30-31] chez les adultes en santé.

1.1.3 Critères de sélection

Les microorganismes détenant l'allégation de probiotiques doivent répondre à plusieurs critères santé et technologiques. Avant tout, comme les probiotiques sont destinés à la consommation, ceux-ci doivent être sécuritaires, c'est-à-dire de ne pas révéler de pathogénicité et sans résistance aux antibiotiques. Certains genres bactériens comme les bifidobactéries, les lactobacilles et les lactocoques sont consommés depuis très longtemps et sont considérés comme étant sécuritaires pour les personnes en bonne santé [32-33]. De plus, les souches probiotiques doivent être en mesure de survivre durant le passage du système digestif pour se rendre au côlon afin de conférer leurs effets bénéfiques. Par conséquent, celles-ci doivent être tolérantes à l'acidité de l'estomac et à la bile, être en mesure d'adhérer aux muqueuses et aux cellules épithéliales du côlon et de détenir une activité antimicrobienne face aux pathogènes afin d'être acheminées au côlon vivantes [34-36]. Au Canada, une quantité minimale de $1,0 \times 10^9$ unités formant colonies (UFC) d'un ou de plusieurs microorganismes probiotiques doit être contenue par portion dans le produit afin d'obtenir l'allégation relative aux probiotiques [37]. De plus, pour utiliser l'allégation « probiotiques », il doit y avoir la présence d'au moins une des espèces suivantes *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*, *Bifidobacterium longum* ssp. *longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius* [37].

1.1.4 Les bifidobactéries

Tel qu'expliqué précédemment, les bifidobactéries ont d'abord été isolées par Tissier (1900) dans les fèces de nouveau-nés nourris au sein, mais proviennent majoritairement des fèces, de la bouche, du vagin, du TGI et du lait maternel ainsi que du lait fermenté (Tableau 1.1) [38-39]. En effet, les bifidobactéries sont un genre dominant dans le TGI chez les humains et les animaux [40], ayant toutefois tendance à diminuer avec l'âge [41]. Par leur présence naturelle dans le microbiote intestinal et les effets bénéfiques qu'elles procurent sur la santé, les bifidobactéries sont communément utilisées comme probiotiques [42].

Tableau 1.1 Origine de souches de bifidobactéries probiotiques adapté de Ventura *et al.* [2004]

Espèces bactériennes	Souche	Origine
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	ATCC 15703	Intestin adulte
<i>Bifidobacterium animalis ssp. animalis</i>	ATCC 25527	Fèces animal
<i>Bifidobacterium animalis ssp. lactis</i>	DSM 10140	Yogourt
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	ATCC 29521	Fèces enfant
<i>Bifidobacterium breve</i>	ATCC 15700	Intestin enfant
<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC 15717	Intestin adulte

Ces microorganismes à Gram positif sont non-motiles, non-sporulants, non-producteurs de gaz, catalase négative, anaérobie et ont généralement une forme de V irrégulière ou de Y [38; 43-44]. Les bifidobactéries appartiennent au phylum des actinobactéries et sont hétérofermentaires. Par conséquent, ces bactéries saccharolytiques utilisent les différentes sources de carbone présentes dans leur environnement comme le glucose, le fructose et le galactose principalement [40] et les transforment en acide lactique et acétique via une voie métabolique unique nommée « *Bifid shunt* » ou bifidus [45]. De plus, la modification de leurs systèmes de transport des sucres leur permet de s'adapter au TGI [40]. En effet, les composés carbonés qui ne sont pas digérés par l'Homme, par exemple les fibres, sont utilisés par ces microorganismes au niveau du colon [46]. Parmi les gènes identifiés dans le génome des bifidobactéries, il y a 8% de ces gènes qui sont reliés au métabolisme du carbone. Cette proportion de gènes est 30% plus grande que pour les autres bactéries du TGI [40; 47-48]. Malgré les conditions stressantes de la digestion, les bifidobactéries probiotiques sont aussi reconnues pour leur aptitude à conserver leur viabilité et leurs propriétés métaboliques et ainsi conférer des effets bénéfiques chez l'hôte [49].

1.1.4.1 *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*

Comme la majorité des bifidobactéries, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* tient son origine du microbiote des mammifères, plus particulièrement isolée de fèces humaines et animales [50-51]. *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* est une espèce de choix à ajouter dans les aliments comme probiotiques [52-53], entre autres en raison de ses propriétés technologiques [54-55]. Parmi les espèces de bifidobactéries étudiées comme probiotiques, c'est l'espèce qui a montré la meilleure résistance à l'acidité [55; 57]. C'est pour ces raisons que cette espèce est la plus retrouvée dans les produits laitiers fermentés en Amérique du Nord et en Europe [53; 56]. L'espèce *B. animalis* ssp. *lactis* est hautement tolérante aux stress du TGI et à l'oxygène [54; 58-59]. En plus de ces capacités à tolérer le stress, cette espèce s'adhère aux cellules épithéliales permettant l'équilibre du microbiote intestinal et la modulation le système immunitaire en prévenant la colonisation par des pathogènes [46; 51; 60-62].

1.1.5 Les lactobacilles

Les lactobacilles ont généralement été isolés d'humains, d'animaux, de plantes et d'aliments (Tableau 1.2). En effet, les espèces de ce genre bactérien sont utilisées depuis longtemps dans plusieurs secteurs agroalimentaires comme agents de conservation naturels ou ferments. Aussi, plusieurs espèces appartenant à la famille des *Lactobacillaceae* sont présentes dans le TGI des animaux et de l'Homme, notamment au niveau de la bouche, du système digestif, mais aussi du système urogénital chez la femme (Tableau 1.2) [63].

Tableau 1.2 Origine de souches de lactobacilles probiotiques

Espèce	Souche	Origine ¹
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4357	Intestins humains
<i>Lacticaseibacillus casei</i>	ATCC 393	Produits laitiers
<i>Lactobacillus gasseri</i>	ATCC 33323	Système digestif et urinaire humain
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	ATCC 33200	Sang humain
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	ATCC 25302	Animale et humaine
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	ATCC 14917	Chou mariné
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	ATCC 23272	Fèces humaines
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	ATCC 53103	Fèces humaines
<i>Ligilactobacillus salivarius</i>	ATCC 11741	Salive

¹ Site web de l'ATCC <https://www.atcc.org/>

Les lactobacilles sont non-motiles, Gram-positif, non sporulantes, ont une forme de bâtonnets ou de cocobacilles [43]. Le glucose est la principale source de carbone utilisée. D'ailleurs, certaines espèces sont homofermentaires par la transformation du glucose en acide lactique ou hétérofermentaires en produisant de l'acide lactique, mais aussi du CO₂, de l'éthanol et/ou de l'acide acétique [45; 64]. Leur métabolisme nécessite des apports en glucides, acides aminés, peptides, esters d'acides gras, sels, dérivés d'acide nucléiques et vitamines. De plus, par leur production d'acide lactique et leur caractère acidophile, les lactobacilles peuvent s'adapter et croître dans des environnements plus extrêmes ou d'autres microorganismes ne sont pas adaptés [64]. Cette capacité d'adaptation permet de franchir le TGI en conservant leur viabilité confirmant ainsi leur statut de probiotiques.

1.1.5.1 *Lacticaseibacillus paracasei*

L'espèce *Lacticaseibacillus paracasei* est surtout retrouvée dans le microbiote intestinal chez les animaux et chez l'Homme [65]. Il a été démontré que *L. paracasei* avait de bonnes capacités de survie lorsqu'exposée à des conditions acides et aux sels biliaires [65-66]. Il a aussi été montré que la souche *L. paracasei* contribue à l'amélioration de l'hypercholestérolémie, de l'hypertension, des allergies, des lésions gastriques, de l'ostéoporose et de l'obésité [67]. D'un point de vue technologique, quelques souches de cette espèce sont utilisées comme ferments dans les yogourts et les fromages pour le développement de saveurs et de textures [68], mais aussi pour son statut de probiotique [65].

1.1.5.2 *Lactocaseibacillus rhamnosus*

Lactocaseibacillus rhamnosus GG a été la première espèce du genre *Lactobacillus* à être brevetée comme probiotique en 1989 [69]. D'abord, isolée de fèces d'adultes en santé, celle-ci avait démontré d'excellentes capacités de survie lorsqu'exposée à l'acide gastrique et à la bile ainsi qu'un taux de croissance rapide [70-71]. Également, en plus d'avoir démontré une capacité antimicrobienne, celle-ci est en mesure de former des biofilms qui lui permettent de protéger la muqueuse intestinale de son hôte. Par ses différents attributs, il a été démontré dans plusieurs recherches que cette souche contribue positivement à la santé humaine notamment en traitement et en prévention de la diarrhée et des allergies [71]. En plus d'être bénéfique pour la santé, l'ajout de ce probiotique dans les aliments tels les produits laitiers, les jus, les fromages et les capsules est également d'intérêt pour améliorer certaines caractéristiques technologiques comme la texture, la flaveur, l'apparence et la qualité dans son ensemble [72].

1.2 Matrices alimentaires

Les probiotiques sont retrouvés principalement sous la forme de suppléments comme les capsules ou dans les aliments fonctionnels comme les produits laitiers et les breuvages à base de végétaux. Les aliments dans lesquels les probiotiques sont ajoutés jouent un rôle de véhicule, afin d'acheminer les probiotiques à travers le TGI qui présente des conditions stressantes notamment l'acidité de l'estomac (pH 5 à 1,5) et les sels biliaires. Les caractéristiques de l'aliment comme son pH, sa teneur en oxygène, sa composition en carbones, lipides et protéines, son activité de l'eau et ses métabolites sont reliées à la viabilité des cellules bactériennes [13; 73-76]. En effet, la viabilité cellulaire est fortement influencée par l'environnement [76-77]. En milieu acide, les cellules bactériennes peuvent être endommagées en raison de l'accumulation de protons. Par conséquent, cela peut causer la dégradation de la membrane cellulaire, mais aussi de l'ADN et des protéines, et donc en diminuer leurs fonctions [78]. Certains aliments soutiennent la viabilité des cellules bactériennes permettant aux probiotiques de traverser le système digestif en restant viables et fonctionnels [76; 79].

1.2.1 Matrices laitières

Les produits d'origine laitière ont initialement été les véhicules les plus communs pour délivrer les probiotiques [80]. Le yogourt, la crème glacée, le fromage et les produits à base de fromages sont souvent utilisés comme matrices pour les probiotiques [76]. Principalement composés de matières grasses et de protéines, ceux-ci jouent un rôle de protection lors du passage dans le TGI en protégeant

l'intégrité de la cellule bactérienne jusqu'au colon [81-82].

1.2.2 Matrices non-laitières

La demande en aliments probiotiques sans produits laitiers est en hausse, notamment en raison d'allergies, d'intolérances, de problèmes de santé reliés au cholestérol, de diètes alimentaires comme le végétalisme et le véganisme ou simplement par choix. Par conséquent, l'industrie alimentaire doit se tourner vers des alternatives végétales pour répondre à ce besoin. Parmi la littérature, différentes bases végétales comme les fruits et légumes, le soya ainsi que les céréales se sont avérées efficaces pour maintenir la viabilité de bactéries probiotiques [83]. En effet, l'étude de Roy *et al.* [84] a démontré que les boissons de soya ainsi que les mélanges de jus ont la capacité de soutenir la viabilité de bactéries probiotiques dans des conditions de réfrigération [84]. Parmi les aliments d'origine végétale, les jus de fruits sont particulièrement intéressants en raison de leur saveur et de leur aspect rafraîchissant [83]. D'un point de vue technologique, ceux-ci sont aussi avantageux puisqu'ils constituent une source de carbones, de vitamines, de minéraux et d'antioxydants propices à la croissance et à la survie des probiotiques [85-86]. Cependant, le pH très acide de certains fruits et leur contenu en antimicrobiens peuvent limiter la croissance des probiotiques. En effet, une étude de Sheehan *et al.* (2007) a démontré d'excellents taux de survie dans des jus d'orange et d'ananas pour les souches *L. rhamnosus* GG, *L. casei* DN-114 001, *L. paracasei* NFBC43338 et *B. lactis* BB-12, alors que le jus de canneberge s'est avéré létale pour ces quatre souches soit en raison de son faible pH (2,5), soit en raison de sa teneur en acide benzoïque et en lactones [87]. Par conséquent, l'utilisation de matrices plus neutres est à considérer pour soutenir la viabilité. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que l'utilisation de la sève de certains végétaux principalement constituée d'eau, de sucres et de sels minéraux, comme le raphia, le bouleau et l'érable avaient la capacité de soutenir la viabilité de bactéries probiotiques en plus de valoriser la matière première locale [7; 88-89].

1.2.2.1 La sève d'érable

Le Canada est le principal pays transformateur de l'érable. Le marché des produits de l'érable représentait 384,4 millions de dollars en 2018 où 91% des produits dérivés proviennent de la province de Québec [90]. La sève de l'érable à sucre (*Acer saccharum*) provient de la transformation de l'amidon en sucre, le saccharose, pendant la croissance de l'arbre. Les sucres sont mélangés à l'eau qui est absorbée par les racines de l'arbre et forment une solution liquide. Au printemps, suite à l'entailage des arbres, le phénomène de la coulée se produit en raison des changements de températures, soit le

gel et le dégel, qui permettent à cette eau sucrée, appelée la sève, d'être récoltée. La sève d'érable est composée majoritairement d'eau (95%-99%) et de saccharose (2,0-2,5%) ainsi que de faibles proportions de glucose et de fructose. Elle contient également des traces de potassium, de magnésium et de manganèse ainsi que des acides aminés, des acides organiques et des composés phénoliques [91-94]. En plus de contenir des nutriments favorables à la croissance et à la viabilité des probiotiques, la sève d'érable a un pH qui s'approche de la neutralité entre 6,5 et 7,0, favorable aux bactéries probiotiques [93]. En effet, plusieurs études ont démontré que la sève d'érable permet la survie des souches *B. lactis* ssp. *lactis* BB-12 et *L. rhamnosus* GG pendant 4 à 12 semaines à 4 °C [6-7]. En plus d'être stables dans cette matrice, ces deux bactéries probiotiques ont maintenu une concentration de cellules viables de 10^7 à 10^8 UFC/mL pendant la digestion gastro-intestinale *in vitro*, ce qui correspond à 10^9 à 10^{10} UFC par portion de 100 mL, soit une quantité suffisante pour avoir la désignation de produit probiotique [6].

1.3 La digestion gastrique et les mécanismes de défense des probiotiques

1.3.1 Digestion gastrique

Pendant le processus de la digestion, l'un des premiers obstacles pour les probiotiques est l'estomac. Cet organe du TGI procure une barrière de défense naturelle chez l'humain par ses conditions acides. Sa grande acidité provient de la sécrétion d'acide chlorhydrique qui est initiée lors de l'ingestion d'aliments [8]. En plus d'hydrolyser partiellement les protéines, cette acidité empêche le passage de certains microorganismes pathogènes, mais aussi de bactéries bénéfiques comme les probiotiques [95-96]. En effet, les protons H^+ dissociés de l'acide chlorhydrique diffusent à travers la membrane cellulaire des bactéries, pénètrent dans le cytoplasme et diminuent le pH intracellulaire. Par conséquent, cette diminution du pH peut affecter la viabilité et les fonctions des bactéries en endommageant la membrane des cellules, l'ADN et les protéines [79; 97]. Le métabolisme, la survie et les fonctions métaboliques peuvent donc être affectés jusqu'à mener à la mort cellulaire [79; 98-99].

1.3.2 Mécanismes d'adaptation des probiotiques

La niche principale des bifidobactéries et des lactobacilles est le microbiote des êtres vivants. Par conséquent, celles-ci se sont dotées au cours de leur évolution de certaines caractéristiques génétiques leur permettant de s'adapter aux stress du TGI comme l'acidité et les enzymes gastriques de l'estomac et la bile, la pancréatine et les autres enzymes du petit intestin [98; 100-101]. Afin de s'acclimater à ces conditions, les bactéries probiotiques ont la faculté de moduler l'activité de certaines

de leurs enzymes afin de survivre durant leur passage par le TGI [98]. En effet, en réponse aux conditions environnantes, le niveau d'expression d'un gène ou d'un groupe de gènes peut être modulé créant ainsi des changements dans la synthèse de protéines. Par exemple, les activités se déroulant au niveau de la division cellulaire, du métabolisme de l'ADN, des gènes de ménage, de la modulation de la composition membranaire et du transport des sucres par exemple peuvent en être affectées [102-103].

Le mécanisme de défense le plus documenté dans la littérature est l'action de la pompe à protons F_1F_0 -ATPase permettant la stabilisation du pH intracellulaire [104-105]. En condition acide, comme dans l'estomac par exemple, cette enzyme peut utiliser les protons extracellulaires afin de produire de l'ATP ou hydrolyser de l'ATP pour expulser des protons en dehors de la bactérie [105]. Cette dernière alternative permet de maintenir le pH intracellulaire près de la neutralité et de protéger la bactérie [106-107]. Selon la littérature, l'activité de la H^+ -ATPase est faible chez les espèces qui sont moins résistantes à l'acidité, alors qu'elle plus grande chez les espèces qui sont résistantes. La tolérance à l'acidité reposant principalement sur l'activité de cette enzyme [54; 108]. D'ailleurs, c'est le gène de ménage *atpA* qui est responsable de la régulation de l'activité de la sous-unité α de cette enzyme [106; 109]. En condition de stress, comme celui de l'acidité de l'estomac, d'autres protéines peuvent contribuer à la survie bactérienne. Notamment, les protéines *dnaK*, *groEL* et *hrcA* permettent le bon repliement des protéines qui sont naissantes ou dénaturées. L'action de ces protéines est régulée par l'entremise de gènes qui portent respectivement les mêmes noms [103; 106; 110-111]. Pareillement, les stress acides peuvent avoir des effets sur la régulation du métabolisme des sucres. Par exemple, le gène *galK* codant pour l'enzyme galactokinase, responsable de la dégradation du α -gal en galactose-1-P, peut être modulé en condition de stress ou lors d'un changement des sources de sucres disponibles dans l'environnement [40;112]. Aussi, l'expression de certains gènes est liée aux dommages liés à l'ADN, mais aussi à divers stress notamment la chaleur et l'oxygène, comme par exemple *recA* [113].

1.4 Hypothèses et objectifs

1.4.1 Hypothèse générale

La matrice de sève d'érable va permettre de maintenir la viabilité et les fonctions métaboliques des souches bactériennes probiotiques *B. animalis* ssp. *lactis* A026, *L. paracasei* A234, *L. rhamnosus* A119 et *L. rhamnosus* GG pendant la digestion gastrique.

1.4.2 Objectif général

L'objectif général est d'évaluer l'impact de la digestion gastrique sur la viabilité et la modulation de l'expression de gènes liés à la réponse aux stress acide et généraux dans une matrice de sève d'érable.

1.4.3 Objectifs spécifiques

- Évaluer la viabilité de quatre souches bactériennes probiotiques dans un véhicule de sève d'érable lors de la simulation *in vitro* dynamique d'une digestion gastrique (Tim-1) par des méthodes de microbiologie classiques et moléculaires.
- Évaluer la modulation de l'expression des gènes des bactéries probiotiques liés à la réponse aux stress de la digestion gastrique par des méthodes de microbiologie moléculaires.

Chapitre 2 - L'expression de gènes de quatre bactéries probiotiques en réponse au stress acide pendant une simulation gastrointestinale dans une matrice de sève d'érable

Gene Expression in Response to Gastric Stress in Dynamic Gastrointestinal Simulator of Four Probiotic Bacteria in a Maple Sap Matrix

Laurie Hamelin¹, Camille Cavestri¹, Patricia Savard¹, Émilie Desfossés-Foucault², Cyril Roblet,³ Denis Roy^{1*}

¹Département des sciences des aliments, Institut sur la nutrition et les aliments fonctionnels, Laboratoire de génomique microbienne, Université Laval, 2440 boulevard Hochelaga, Québec G1V 0A6 Canada

²Biena inc., 2955 Rue Cartier, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 1L4

³Fruit d'Or, 306 QC-265, Villeroy, Québec, Canada G0S 3K0

*Auteur correspondant: Denis Roy, Département des sciences des aliments, Laboratoire de génomique microbienne, Université Laval, 2440 boulevard Hochelaga, Québec G1V 0A6 Canada, 418 656 2131 ext. 403496, denis.roy@fsaa.ulaval.ca

2.1 Résumé

Les bactéries probiotiques doivent être en mesure de survivre pendant la digestion gastrique afin d'atteindre le côlon et ainsi conférer des bienfaits pour la santé humaine. Le potentiel des matrices d'origine laitière pour soutenir les probiotiques a souvent été décrit, mais celui des produits végétaux tels que la sève d'érable, pour cette application, reste peu connu, alors que l'engouement pour ces produits est en forte croissance. L'objectif de cette étude était d'évaluer la viabilité cellulaire par l'utilisation du propidium monoazide (PMA) couplé à la qPCR, ainsi que d'évaluer l'expression de cinq gènes reliés au stress *atpA* (stress et homéostasie de la cellule), *galK* (métabolisme des sucres), *dnaK*, *groEL* et *hrcA* (stress généraux) par RT-qPCR lors de la digestion gastrique *in vitro* (TIM-1) de trois souches commerciales (*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* A026, *Lactobacillus paracasei* A234, *Lactobacillus rhamnosus* A119) ainsi que de la souche de référence *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) livrées dans de la sève d'érable. Les résultats ont indiqué que toutes les souches

ont maintenu un taux de survie élevé suite à la digestion gastrique; *B. animalis* ssp. *lactis* A026 (7.14 log de cellules viables/mL), *L. paracasei* A234 (8.12 log de cellules viables/mL), *L. rhamnosus* A 119 (8.48 log de cellules viables/mL) et *L. rhamnosus* GG (8.36 log de cellules viables/mL) ainsi que l'expression de certains gènes de stress ciblés avait été modulé pendant la digestion gastrique. Seule la souche *L. rhamnosus* GG a montré une modulation au niveau de l'expression de tous les gènes ciblés. Dans l'ensemble, l'expression d'au moins un gène associé à la réponse au stress a été modulé pour toutes les souches probiotiques pendant la digestion gastrique dans la matrice de sève d'érable. Face aux stress de la digestion gastrique, les différentes réponses du métabolisme des bactéries probiotiques permettent une meilleure survie cellulaire. En définitive, ces quatre souches ont le potentiel d'être utilisées comme probiotiques dans une matrice de sève d'érable, ce qui pourrait mener au développement d'une boisson fonctionnelle.

2.2 Abstract

Probiotic bacteria must be able to survive through the stomach to reach the colon and provide health benefits to the host. The potential of dairy products as vehicles for probiotics are often described, but little is known about the potential of vegetal products such as maple sap for this application. The objective of this study was to assess cell viability by propidium monoazide (PMA) coupled to qPCR, as well as to evaluate stress gene expression by RT-qPCR during *in vitro* gastric digestion (TIM-1) of three commercial strains (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* A026, *Lacticaseibacillus paracasei* A234, *Lacticaseibacillus rhamnosus* A119) and *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) delivered in the maple sap. The results indicated that all strains maintained a high survival rate after gastric digestion; *B. animalis* subsp. *lactis* A026 (7.14 log of viable cells/mL), *L. paracasei* A234 (8.12 log of viable cells/mL), *L. rhamnosus* A119 (8.48 log of viable cells/mL), and *L. rhamnosus* GG (8.36 log of viable cells/mL) and that the expression of certain target stress genes was modulated during gastric digestion. Also, only *L. rhamnosus* GG has shown a modulation of all the targeted genes *atpA* (stress and cell homeostasis), *galK* (carbohydrate metabolism), *dnaK*, *groEL* et *hrcA* (general stress response). Overall, gastric digestion of all probiotic strains in maple sap had modulated the expression of at least one gene associated with general stress response. The metabolism of probiotic bacteria has different responses to gastric stresses and lead to better survivability. Overall, these four strains have the potential to be used as probiotics in maple sap, which could lead to the development of a functional drink.

2.3 Introduction

Public interest in probiotic products is constantly growing due to their benefits on human health [1-3]. Probiotic strain selection presents a complex challenge as it is necessary to maintain survival and the different properties of beneficial microorganisms throughout the production chain and the gastrointestinal tract (GIT). Probiotics must be viable before consumption to adequately confer their health benefits [4] as they are described by the FAO and the WHO [5]. Dairy products are currently used as food matrices for probiotics [6]. However, the demand for dairy-free products is increasing due to lactose intolerance, allergies, diets, and medical issues [7-9]. Maple sap is an allergen-free-vegan alternative, and it is potentially a good vehicle to deliver viable probiotics. Indeed, maple sap can maintain a high viability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG during storage and throughout digestion [10-12]. Probiotic bacteria must travel through the GIT and encounter the extreme stomach conditions to reach the colon. The highly acidic environment of this compartment is a natural defense against pathogens, but can also be fatal for beneficial bacteria [13]. Protons from gastric acids diffuse in the cell membrane, and enters the cytoplasm which decreased intracellular pH [14]. Many *in vitro* studies have documented gastric acid resistance of *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 [15-16], and several strains of *Lacticaseibacillus rhamnosus* [17], and *Lacticaseibacillus paracasei* [18]. These bacteria possess a response system that is induced under stress conditions. The transcription of those genes can be modulated according to their role to maintain cell metabolism [19]. The gene *atpA*, which is present in most LABs, is often upregulated under acidic stress [20]. This gene regulates activity of the subunit- α of the F_0F_1 -ATPase enzyme which uses protons to synthesize ATP or uses ATP to expulse protons, resulting in pH homeostasis in bacteria cells [21-22]. High acidity can lead to the deprivation of certain components by reducing or increasing carbon transporters such as *galK* [19; 23-24]. The chaperone genes *dnaK*, *groEL*, and *hrcA* are linked to general stress response including acid stress, but also osmotic, thermal, and oxidative stress [25-26]. The regulation of these genes is triggered when bacterial cells are exposed to environmental stresses [19]. To our knowledge, the relation between gene expression related to gastric stress and probiotic strain viability in maple sap has not been clearly defined. We hypothesize that maple sap is a favorable matrix for probiotics sustainability and that genes related to acid stress are modulated under gastric digestion to contribute to bacterial survival. This work aimed to evaluate the viability of four bacterial strains (*B. animalis* subsp. *lactis* A026, *Lacticaseibacillus paracasei* A234, *Lacticaseibacillus rhamnosus* A119, and *L.rhamnosus* GG (ATCC 53103)) and to quantify the relative expression of acid stress genes in

maple sap under simulated gastric digestion using the *in vitro* dynamic GIT model (TIM-1). The TIM-1 is a dynamic model allowing a better simulation of gastric digestion than conventional methods [27]. Cell viability was evaluated by using propidium monoazide (PMA) coupled to qPCR to distinguish viable but nonculturable and dead microorganisms according to their membrane integrity [28] and the gene expression was quantified by RT-qPCR.

2.4 Materials and methods

2.4.1 Bacterial Strains, Growth Conditions and Viable Counts

B. animalis subsp. *lactis* A026, *L. paracasei* A234, *L. rhamnosus* A119 isolated from human feces (Biena inc., QC, Canada), and *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 (ATCC, Manassas, Virginia, USA) were the probiotic strains used in this study. Stock cultures were kept at -80°C in MRS broth (Nutri Bact, QC, Canada) supplemented with 20% (v/v) glycerol (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ).

Before each experiment, the strains were reactivated by adding 1% frozen culture stock in fresh broth for 24h at 37°C. Lactobacilli were cultivated in MRS broth (Nutri Bact, QC, Canada) under aerobic conditions. Bifidobacteria were cultivated in a mixed broth of 50% (w/w) Reinforced Clostridial Medium (HiMedia, Mumbai, India) and 50% (w/w) MRS supplemented with 0.05% (w/w) of L-cysteine hydrochloride (Sigma-Aldrich) with pH adjusted to 6.8 under anaerobic conditions using an anaerobic chamber (Plas-Labs Inc., MI, USA) containing an atmosphere of 80% N₂, 10% H₂, and 10% CO₂ (Praxair, QC, Canada). After the first subculture of 24h, a second subculture was done by inoculating fresh medium (1%) for 24h. This second subculture was used to inoculate (1%) a volume of 100 mL of fresh media, and it was incubated until reaching the mid-logarithmic phase containing about 10⁸ cfu/mL. The 100-mL bacterial suspension was centrifugated at 8,000 × *g* for 2 min and the pellet was resuspended in maple sap for a total TIM-1 meal of 300 g.

Viable counts were performed by the drop-plate method as described by Herigstad *et al.* (2001) [29] with appropriate dilution in 0.1% (w/v) peptone water (Difco laboratories, Detroit, MI, USA) for lactobacilli and 0.1% (w/v) peptone water supplemented with 0.05% (w/v) of L-cysteine hydrochloride for bifidobacteria. They were incubated for 48h at 37°C on MRS agar for lactobacilli and MRS/RCM agar supplemented with 0.05% (w/w) of L-cysteine hydrochloride under anaerobic conditions as described previously for bifidobacteria.

2.4.2 *In vitro* Dynamic Gastric Digestion

The dynamic GIT system TIM-1 (TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, Netherlands) was used in this study to simulate gastric digestion by a healthy adult (Table 1) in the stomach compartment and was operated as described by Uriot and al. (2014) [30]. Briefly, 300g of maple sap bacterial suspension, as described previously, was introduced in the stomach compartment and was digested 1h at 37°C. One aliquot of 1 mL and one aliquot of 2 mL were taken in duplicate for bacterial survival and gene expression at 0, 20, 40, and 60 min from the stomach effluents. These effluents were kept at a temperature of 37°C until collection times between each interval to limit changes induced by thermal shock. Survival curves were presented as relative to the total cells in the meal before introduction in Tim-1 (% of intake). *In vitro* digestions were done in duplicate for each strain.

Table 2.1 Parameters of *in vitro* digestion for stomach compartment

Initial volume (ml)	300
t_{1/2}	20
β coefficient	1
Time (min) /pH	0/6 10/4.7 20/3.7 30/2.9 40/2.4 60/1.7
Initial secretion (gastric juice)	10 ml of gastric juice (pH 2): 2500 U of pepsin and 380 U of lipase in an electrolyte gastric solution (NaCl 6.2 g/L, KCl 2.2 g/L, CaCl ₂ 0.3 g/L, NaHCO ₃ 1.5 g/L)
Secretions	0.25 mL/min of pepsin (500 U/mL), pH 4 0.25 mL/min lipase (76 U/mL), pH 7 HCl (3 M) if necessary

The computer used the exponential $f = 1 - 2^{-((t/t_{1/2})^\beta)}$ where f represents the delivered meal fraction, t the delivery time, $t_{1/2}$ the half-time of delivery and β the coefficient describing the shape of the curve for gastric distribution. All the products came from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada) except for the lipase that came from Amano enzyme USA (Elgin, IL, USA).

2.4.3 Bacterial Viability

The propidium monoazide (PMA) treatment was performed as described by Lupien-Meilleur *et al.* (2016) [10] which was based on Nocker *et al.* (2007) [28]. The PMA solution (Biotium, Hayward, CA, USA) was added to the 1-mL sample for a final concentration of 50 mM. Subsequently, these samples were shaken in the dark for 5 min and were placed under the LED-Active Blue system (Ingenia Biosystems, Barcelona, Spain) for 15 min. The samples were centrifugated at $10,000 \times g$ for 2 min to collect the pellet. Samples were stocked à -80°C until DNA extraction.

DNA extraction was performed using PowerSoil DNA kit (Qiagen, ON, Canada) with an additional enzymatic lysis step. Briefly, the pellet was suspended in 200 μl of lysis buffer containing 10 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 20 mg/ml of lysozyme (Sigma-Aldrich), 20 mg/ml of proteinase K (Millipore Sigma), and 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of mutanolysin 20 U/ μl (Sigma-Aldrich) and incubated at 37°C during 1h. After the lysis, extraction kit instructions were followed. DNA was stored at -20°C .

The qPCR was performed with 7500 Fast real-time PCR 2.0.1 (Thermofisher) in 96-well plates. The 25 μl reaction mix contained 12.5 μl of Fast SYBR Green Master Mix (Thermofisher), 1 μl of appropriated primer set (Table 1), 5.5 μl of DNase-free water and 5 μl of DNA sample diluted 1:10. Primers used in this study (Table 1 and Table 2) were designed with Genius Pro R6 software (Biomatters, San Diego, USA) based on genes sequences of interest of *B. animalis* subsp. *lactis*, *L. paracasei*, and *L. rhamnosus* available in GenBank (National Center for Biotechnology Information). Negative controls were performed with DNase-free water and were included in each run. The cycling program consists of an initial denaturation at 95°C for 20 sec, followed by 40 cycles at 95°C for 3 sec and 60°C for 30 sec. Each sample was analyzed in triplicate. The qPCR standard curves were obtained with pure cultures of the four probiotic strains as described by Gagnon *et al.* (2015) [31], with serial dilutions of the DNA in sterile water, and PMA treatment as described previously. The C_t obtained in standard curves were matched to the corresponding viable cells per mL.

Table 2.2 Primer sets for qPCR

Gene	Bacterial species	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Product length (bp)	Concentration (nM)	Reference
<i>tal</i>	<i>B.</i> ¹ <i>lactis</i>	GCGCTGGGCTG CTCTGGAAGC	TGGCGAGCTC ATCGAC TACT	116	0.8 and 0.4	Desfossés-Foucault <i>et al.</i> [31]
	<i>L.</i> ² <i>paracasei</i>	GCACCG GATTCAACATG G	GGTTCTTGG TYTATGCG TATTAG	83	0.1	Byun <i>et al.</i> [44]
16S	<i>L. rhamnosus</i>	GGCTCAGGA GAACGCTGG	TCAAGATGCA AGCACCTTTC AA	81	0.25	This study

¹B. : *Bifidobacterium*

²L. : *Lacticaseibacillus*

2.4.4 Gene Expressions

The 2-mL samples collected from the TIM-1 stomach effluents were mixed with 4 mL of RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen, ON, Canada). After incubation at room temperature for 5 min, the samples were centrifugated at 5,000 × *g* for 10 min. The pellets were then stocked at -80°C until RNA extraction. RNA extraction was performed using RNeasy Mini kit (Qiagen, ON, Canada) with a preliminary step of enzymatic lysis. Briefly, the pellet was suspended in 100 µl of lyse buffer containing 10 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 20 mg/ml of lysozyme, 20 mg/ml of proteinase K, and 20 U/ml of mutanolysin incubated for 10 minutes at 37°C with agitation each 2 min. Thereafter, manufacturer instructions were followed. Residual DNA was removed by TURBO DNA-Free Kit (Ambion, ON, Canada). DNA absence was verified by qPCR as previously described. RNA quantification and quality were measured by Bioanalyser Agilent 2100 (Agilent Technologies). RNA samples were kept at -80°C until retro transcription.

Retro-transcription from 40 ng/µL of RNA to cDNA was performed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Thermo Fisher) following manufacturer's instructions. Resulting cDNA was diluted 1:10 in DNase-free water and stored at -20°C.

Gene expressions were evaluated by qPCR of cDNA. The 25-µl reaction containing 12.5 µL of Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 0.25 µM of appropriated strain primers (Table 3), 9.5 µl of DNase-free water and 1 µl of cDNA diluted 1:10. Reactions were performed in triplicate. The cDNA was denaturized at 95°C for 15 min, followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. Threshold values for each primer were fixed at 0.2 and amplification efficacy was controlled for data normalization. The software programs GENORM v3.4 to identify reference genes for each strain and REST 2009 v2.0.13 were used to calculate the level of expression of normalized

genes [32]. The selected reference genes for *B. animalis* subsp. *lactis* A026 were *recA* and *rpoB*, *L. rhamnosus* A119 were *ldh* and *rpoB*, *L. paracasei* A234 *ldh* and *tuf* and *L. rhamnosus* GG ATCC 23103 *gyrB* and *recA*.

Table 2.3 Definition, function and primer sets for selected reference and stress genes

Gene	Definition	Function	Bacterial species	Forward Primer	Reverse Primer	Product length (bp)	Reference
<i>atpA</i>	ATP synthase CF1 alpha subunit	Maintain pH homeostasis (Stress gene)	<i>B. lactis</i>	CAGTCCGATCT GTTCAACGC	AACATGGCGAA GGATTCCAG	161	This study
			<i>L. rhamnosus</i> and <i>Lb. paracasei</i>	ATTGCGGTT GGATCTGGCAT C	GGAATTGGATC AAG GAAGCCATG	204	This study
<i>dnaK</i>	Chaperone protein	Stress response (Stress gene)	<i>B. lactis</i>	GCAGCTCTGGC CTACGGT	ATAATGCGCTG GTCCAATC	189	Solano <i>et al.</i> [45]
			<i>L. paracasei</i>	TGACGAATT GCACA GATTAGC	GCATCCCTTCA ACAACAGAGAG	194	Wu <i>et al.</i> [38]
			<i>L. rhamnosus</i>	ACAAGCCGCTG GAACTCTTG	ATCGG CAAAGGAC CTTGGTACT	65	Aakko <i>et al.</i> [46]
<i>galK</i>	Galactokinase	Carbohydrate transport and metabolism (Stress gene)	<i>B. lactis</i>	CTCCGATGT GATTGCCGAGG	CTGAATGCCGC ATCGAAACC	141	This study
			<i>L. paracasei</i>	ACAGATGTCA CAAAGGTTT TACGG	CAC CAAT TAAAT TAATGCGTCCT GG	89	This study
			<i>L. rhamnosus</i>	GTCAGGA GATCTTAAAC CTTTGGC	TTCCGG TCACCTCA TAATCAAAGC	81	This study
<i>groEL</i>	Chaperonin	Stress response (Stress gene)	<i>B. lactis</i>	TCGTAC CAATGCGGAAG AC	TGCTCGAGGTG AGCAGAATGT	66	Aakko <i>et al.</i> [46]
			<i>L. paracasei</i>	TCCCGGTTT GAACGTCGCCT	CCGTGCCGCG GTTGAAGAAG	107	Desfossés-Foucault <i>et al.</i> [24]
			<i>L. rhamnosus</i>	CAAAGCCAGG TGCTTAAACG	CTGCCGACCT GGTTCGTAA	71	Aakko <i>et al.</i> [46]
<i>gyrB</i>	DNA topoisomerase subunit B	ATP-hydrolyzing (Reference gene)	<i>B. lactis</i>	CAAAG CAAAGACGA CAATCTCTCC	GAT GATGTTCTCG CCTCGTTC	208	This study
			<i>L. paracasei</i>	TTGG TCTGGGAAATC ATTGATAACG	TGT TACCGTCA CAC TATTATCTGGG	102	This study
			<i>L. rhamnosus</i>	AAAGAAGAACT GGCAGCAGA TATG	TCCCGT TATCAAT GATTTCCAAA C	148	This study
<i>hrcA</i>	Heat-inducible transcription repressor	Transcription repressor (Stress gene)	<i>B. lactis</i>	TGTAGA GACTA TA TACGGCAGCAG	GTGAGATAGCC TTCATCCTCCA G	129	This study
			<i>L. paracasei</i>	GGTCCGGAAGT CAACA TATTAAGC	TGAACACCT GATTTTCGA CATTACC	115	This study
			<i>L. rhamnosus</i>	AAATCATCCGC CTGT TACTGAAAG	TCGACCAGAT GATCAAGATA TAGC	205	This study
<i>ldh</i>	Lactate dehydrogenase	Conservate gene (Reference gene)	<i>B. lactis</i>	ATTCGCCAAT TAAGCCAACCA AG	GATGTCCTGCA ATGCGATCTCA C	116	This study
			<i>L. paracasei</i>	CATCCA GAAATCAAG GAAGACAAGC	CCATATT GACCATCCATG TAAACGG	191	This study

			<i>L. rhamnosus</i>	GAAAGGTGACG CAATTGATTTAA GC	GATAACAACC GATCAGCATCC TTG	106	This study
recA	Recombinase A	DNA repair (Reference gene)	<i>B. lactis</i>	CGTT GAAGTTCTATG CATCCGTC	CATCTT GTTCTT GACCACCTT GAC	113	This study
			<i>L. paracasei</i>	ATGTCGTCTCA ACAGGCATT TATC	TTTCCCAGTACT TTCAGGACC TAG	104	This study
			<i>L. rhamnosus</i>	ATTTTAGTGGTT GATTCAGTGGC AG	ATTGTTTTGG TCTTATT GATCGCCC	146	This study
rpoB	RNA polymerase beta subunit	RNA polymerisation (Reference gene)	<i>B. lactis</i>	GTCAC GACTACGACGA A TACCAC	TTCTTT GATGGAGCCGA AATTAC	106	This study
			<i>L. rhamnosus</i> <i>L.</i> <i>paracasei</i>	CGGATCAAG GAAGTTTT GGATCTTC	CAGCAGTT GATAGCCG CAAATTC	162	This study
tuf	Vacuolar ATP synthase subunit E1	Indispensable in protein synthesis (Reference gene)	<i>B. lactis</i>	TCACGA CAAGTGGGTT GCCA	GTT GATCGGCAGCT TGCCG	178	Sheu <i>et al.</i> [47]
			<i>L. paracasei</i>	ATCATGGAATT GATGGATACCA	TAGACTT GATAACATCTG GCTT	143	This study
			<i>L. rhamnosus</i>	TTTCTT GATGCCTGTT GAAGATGTC	GCTTCAAACCG AT GATTTCAACTTC	119	This study

¹*B.* : *Bifidobacterium*

²*L.* : *Lacticaseibacillus*

2.4.5 Statistical Analysis

Statistical analysis for bacterial survival was performed using JMP 14 Software (SAS Institute Inc., Cary, NC) with analysis of variance (ANOVA) to find mean differences ($P \leq 0.05$). Gene expressions were statistically analyzed by REST 2009 v2.0.13 software ($P \leq 0.05$).

2.5 Results

2.5.1 Bacterial Viability

Results obtained by PMA-qPCR indicated no significant differences ($P < 0.05$) in viability for *B. animalis* subsp. *lactis* A026 (F value = 2.38; $P = 0.21$), *L. paracasei* A234 (F value = 0.74; $P = 0.58$), *L. rhamnosus* A119 (F value = 2.14; $P = 0.24$), and *L. rhamnosus* GG (F value = 0.87; $P = 0.53$) delivered in maple sap during gastric digestion (Fig 1). The initial concentration of viable cells/ml of the strain *B. animalis* subsp. *lactis* (7.23 ± 0.13 log of viable cells/mL) was lower than *L. paracasei* A234 (8.34 ± 0.13 log of viable cells/mL), *L. rhamnosus* A119 (8.76 ± 0.11 log of viable cells/mL), and *L. rhamnosus* GG (8.30 ± 0.17 log of viable cells/mL) but had no impact on maintaining viability. Subsequently, viability of each strain remained stable during gastric digestion despite a drastic decrease in acidity dropping from 6.2 to 1.6. Therefore, all the strains showed excellent survival capacity in an acid

environment.

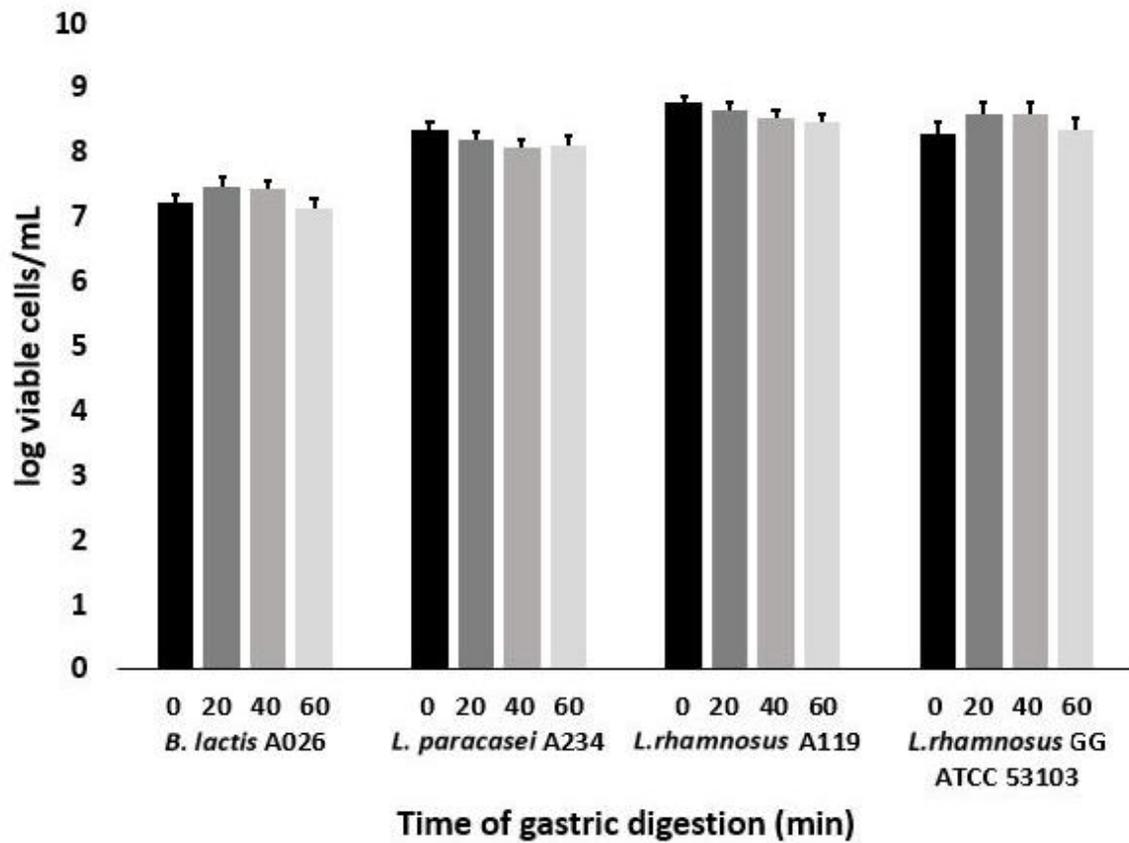


Fig 2.1 Survival curve of probiotic strains *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* A026, *Lacticaseibacillus paracasei* A234, *Lacticaseibacillus rhamnosus* A119, and *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 in maple sap during *in vitro* gastric digestion (TIM-1). Viable cells were determined by PMA-qPCR in gastric effluent each 20 min of digestion and are expressed as log viable cells/mL. Error bar represents standard error.

2.5.1 Modulation of Stress Genes

Gastric digestion has significantly modulated relative gene expression of the five stress genes *atpA*, *dnaK*, *galK*, *groEL*, and *hrcA* ($P < 0.05$) in all four probiotic strains (Fig. 2). The gene *galK* involved in carbohydrate metabolism was modulated for all the strains, but was only downregulated for *B. animalis* subsp. *lactis*. Indeed, it was downregulated in *B. animalis* subsp. *lactis* after 20 min (Fig. 2A), upregulated in *L. paracasei* A234 after 40 min (Fig. 2B), upregulated in *L. rhamnosus* A119 after 60 min (Fig. 2C), and upregulated in *L. rhamnosus* GG after 40 and 60 min (Fig. 2D). The gene *atpA*, involved in stress and cell homeostasis, was upregulated in *L. paracasei* A234 and was downregulated in *L. rhamnosus* GG for the first 40 min (Fig. 2D). The genes *dnaK* and *groEL* are involved in acid, alkaline, oxidative, heat, and salt stress. The *dnaK* gene was downregulated in *L. rhamnosus* A119 after 40 min (Fig. 2C) and was downregulated for *L. rhamnosus* GG after 40 and 60 min (Fig. 2D). Relative expression of *groEL* was modulated only for *L. rhamnosus* GG throughout digestion except at 40 min. Indeed, it was downregulated in *B. animalis* subsp. *lactis* after 20 min, upregulated in *L. paracasei* A234 after 40 min, upregulated in *L. rhamnosus* A119 after 60 min, and upregulated in *L. rhamnosus* GG after 40 and 60 min. The gene *hrcA* coding for the heat-inducible transcription repressor and involved in heat and oxidative stress was downregulated in *B. animalis* subsp. *lactis* after 40 min, was upregulated in *L. paracasei* A234 after 20 min, and was downregulated in *L. rhamnosus* GG after 20 and 40 min. All the targeted genes have been modulated in *L. rhamnosus* GG, which had a greater survival rate.

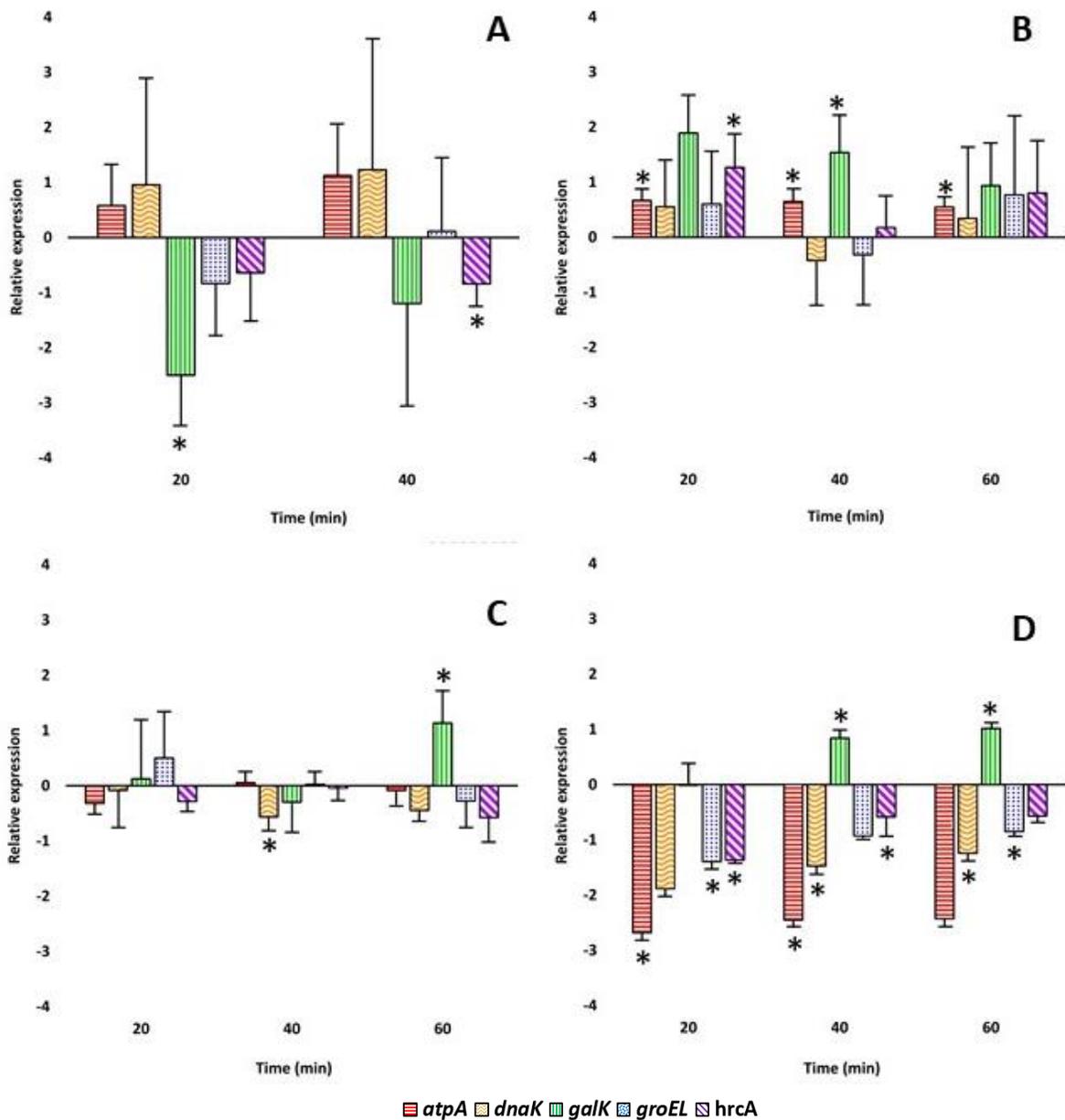


Fig 2.2 Relative expression of genes *atpA* (red horizontal), *dnaK* (orange wave), *galk* (green vertical), *groEL* (blue point) and *hrcA* (purple diagonal) during *in vitro* gastric digestion (TIM-1) for strains *B. animalis* subsp. *lactis* A026 (A), *Lacticaseibacillus paracasei* A234 (B), *Lacticaseibacillus rhamnosus* A119 (C), and *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 (D). Expression levels were obtained by RT-qPCR and were expressed as fold-differences in gene transcript relative to time 0 after normalization with two reference genes. Means with an asterisk (*) were significantly different from their two reference genes ($P \leq 0.05$) at time 0. Error bars represent the standard deviation calculated by REST software.

2.6 Discussion

All probiotic strains studied had great viability in maple sap during gastric digestion, a fundamental characteristic for probiotics [33]. The viability results suggested that all the strains had a great capacity to survive in an acidic environment such as the stomach. Studies conducted by Vamanu *et al.* (2010) [34] also demonstrated the survival capacity of *L. rhamnosus* IL1 when exposed for 1 hour to pH between 2 and 3, but dropped drastically with pH below 2. In the context of our study, the two *L. rhamnosus* strains showed a high ability to survive since it was not exposed to a pH below 1.2 for very long. This maintenance of survival has also been documented by Khalf *et al.* (2010) for *B. animalis* subsp. *lactis* A026 and *L. rhamnosus* GG in maple sap during gastric digestion in TIM-1 [11]. The strains *L. paracasei* A234 and *L. rhamnosus* A119 also had good survival rates similar to the study of Verdenelli *et al.* (2009) [35]. The survival capacity of *B. animalis* subsp. *lactis* in acidic condition has also been documented by Matsumoto *et al.* (2004) [15].

Our results confirmed that maple sap is a suitable vehicle for the passage of probiotics through the stomach and turns out to be an alternative to dairy products since it helps maintain viability. Maple sap mainly contains sucrose, which can be used as a carbon source for lactobacilli and bifidobacteria [10-12]. Indeed, it was demonstrated that maple sap was a suitable matrix for fermentation and a favorable vehicle for GIT for *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *L. rhamnosus* GG strains [11].

Sugar content in maple sap could be responsible for the good survival of the probiotic strains, contributing to carbohydrate metabolism under acid stress [36]. The gene *galK*, which codes for an enzyme responsible for carbohydrate transport, was upregulated for the lactobacilli strains. Several proteins linked to carbohydrate transport and metabolism can be modulated under acid stress [37-38]. The downregulation obtained for *B. animalis* subsp. *lactis* strain can be explained by a different reorganization of cell metabolism and different involvement of *galK* in the unique metabolic path of bifidobacteria called "Bifid shunt" [39]. Through glycolysis, glucose allows for ATP formation, which is used by the enzyme F₀F₁-ATPase to exclude intracellular protons [15-16, 40] and improve survival during gastric passage [41]. Several studies showed that the *atpA* gene in LAB is upregulated when subjected to acid stress [15; 22; 37], as for *L. paracasei* A234 in this study. However, it was downregulated in *L. rhamnosus* GG, which is in agreement with *Lactococcus lactis* ATCC 11454 [30]. Consequently, the modulation of the *atpA* gene can be different for various strains of the same species. Only one of the general stress genes coding for chaperone proteins has been modulated in all strains. However, for *L. rhamnosus* GG, all of these general stress genes have been modulated. The *dnaK*

gene was downregulated in both *L. rhamnosus* strains, and the same modulation was shown in this species by Koponen *et al.* (2012) [37]. The *groEL* and *hrcA* genes are involved in several types of stress such as heat, osmotic stress, so they may have been modulated to respond to gastric stress [42]. The *B. animalis* subsp. *lactis* strain also showed a modulation of its *galK* and *hrcA* genes which was different from the other strains, especially for the *galK* gene, perhaps by its different carbon metabolism. Overall, lactobacilli and bifidobacteria modulated stress genes differently but also between strains of the same species. Although these strains have shown great viability in the stomach, but other stresses such as those caused by bile from the duodenum will occur during the rest of the GIT and need to be studied [43].

This work showed that each of these strains has a probiotic potential as they maintained high survival in the stomach compartment. This capacity can result from the modulation of stress genes as *atpA*, *dnaK*, *galK*, *groEL*, and *hrcA*. The responses induced by gastric stresses were species- and strain-dependant. Now, we know that the probiotic strains used in this study can survive gastric digestion, their survival through duodenal digestion needs to be evaluated as well as their ability to survive storage conditions. Lastly, maple sap supplemented with probiotics should be a good functional food considering its capacity to deliver viable probiotic and its antioxidant capacity.

2.7 Acknowledgments

The authors thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Fruit d'Or for the financial assistance granted to Dr. Roy. The authors also thank M rilie Gagnon for her scientific advice and François Coulombe-Rozon and Karen Guay for laboratory assistance.

2.8 References

1. Goldin BR (2010) Probiotics and health: From history to future. In: Probiotics and Health Claims. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp 1–16
2. Khalesi S, Bellissimo N, Vandelanotte C, *et al.* (2019) A review of probiotic supplementation in healthy adults: Helpful or hype? *Eur J Clin Nutr* 73:24–37. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0135-9>
3. Recine N, Palma E, Domenici L, *et al.* (2016) Restoring vaginal microbiota: Biological control of bacterial vaginosis. A prospective case–control study using *Lactobacillus rhamnosus* BMX 54 as adjuvant treatment against bacterial vaginosis. *Arch Gynecol Obstet* 293:101–107. <https://doi.org/10.1007/s00404-015-3810-2>
4. FAO/WHO (2002) Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
5. Jackson SA, Schoeni JL, Vegge C, *et al.* (2019) Improving end-user trust in the quality of commercial probiotic products. *Front Microbiol* 10:1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00739>
6. Shah NP (2000) Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J Dairy Sci* 83:894–907. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74953-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74953-8)
7. Perricone M, Bevilacqua A, Altieri C, *et al.* (2015) Challenges for the production of probiotic fruit juices. *Beverages* 1:95–103. <https://doi.org/10.3390/beverages1020095>
8. Panghal A, Janghu S, Virkar K, *et al.* (2018) Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. *Food Biosci* 21:80–89. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.12.003>
9. Min M, Bunt CR, Mason SL, Hussain MA (2019) Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 59:2626–2641. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1462760>
10. Lupien-Meilleur J, Roy D, Lagacé L (2016) Viability of probiotic bacteria in a maple sap beverage during refrigerated storage. *LWT* 74:160–167. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.045>
11. Khalf M, Dabour N, Kheadr E, Fliss I (2010) Viability of probiotic bacteria in maple sap products under storage and gastrointestinal conditions. *Bioresour Technol* 101:7966–7972. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.053>

12. Cochu A, Fourmier D, Halasz A, *et al.* (2008) Maple sap as a rich medium to grow probiotic lactobacilli and to produce lactic acid. *Lett Appl Microbiol* 47:500–507. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02451.x>
13. Jungersen M, Wind A, Johansen E, *et al.* (2014) The Science behind the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®. *Microorganisms* 2:92–110. <https://doi.org/10.3390/microorganisms2020092>
14. Presser KA, Ratkowsky DA, Ross T (1997) Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl Environ Microbiol* 63:2355–60
15. Matsumoto M, Ohishi H, Benno Y (2004) H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *Int J Food Microbiol* 93:109–113. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.009>
16. Casey JR, Grinstein S, Orlowski J (2010) Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:50–61. <https://doi.org/10.1038/nrm2820>
17. Pitino I, Randazzo CL, Mandalari G, *et al.* (2010) Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract. *Food Microbiol* 27:1121–1127. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.019>
18. Reale A, Di Renzo T, Rossi F, *et al.* (2015) Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. *LWT - Food Sci Technol* 60:721–728. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.022>
19. Guchte M van de, Serror P, Chervaux C, *et al.* (2002) Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* 82:187–216. <https://doi.org/10.1023/A:1020631532202>
20. Wang C, Cui Y, Qu X (2018) Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. *Arch Microbiol* 200:195–201. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1446-2>
21. Futai M (1989) ATP synthase (H⁺-ATPase): Results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Annu Rev Biochem* 58:111–136. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.58.1.111>
22. Kullen MJ, and Klaenhammer TR (1999) Identification of the pH-inducible, proton-translocating F₁F₀-ATPase (atpBEFHAGDC) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: Gene structure, cloning and characterization. *Mol Microbiol* 33:1152–1161. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01557.x>

23. Poolman B, Smid EJ, Veldkamp H, *et al.* (1987) Bioenergetic consequences of lactose starvation for continuously cultured *Streptococcus cremoris*. *J Bacteriol* 169:1460–1468.
<https://doi.org/10.1128/jb.169.4.1460-1468.1987>
24. Desfossés-Foucault É, LaPointe G, Roy D (2014) Transcription profiling of interactions between *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 and *Lactobacillus paracasei* ATCC 334 during Cheddar cheese simulation. *Int J Food Microbiol* 178:76–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.004>
25. Champomier-Vergès M-C, Maguin E, Mistou M-Y, *et al.* (2002) Lactic acid bacteria and proteomics: Current knowledge and perspectives. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 771:329–42.
[https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(01\)00624-9](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(01)00624-9)
26. Jayaraman GC, Penders JE, Burne RA (1997) Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans hrcA*, *grpE* and *dnaK* genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification. *Mol Microbiol* 25:329–341. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4671835.x>
27. Mainville I, Arcand Y, Farnworth ER (2005) A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *Int J Food Microbiol* 99:287–296.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.020>
28. Nocker A, Sossa-Fernandez P, Burr MD, *et al.* (2007) Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* 73:5111–5117.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02987-06>
29. Herigstad B, Hamilton M, Heersink J (2001) How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Methods* 44:121–129. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00241-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00241-4)
30. Uriot O, Galia W, Awussi AA, *et al.* (2016) Use of the dynamic gastro-intestinal model TIM to explore the survival of the yogurt bacterium *Streptococcus thermophilus* and the metabolic activities induced in the simulated human gut. *Food Microbiol* 53:18–29. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.05.007>
31. Gagnon M, Savard P, Rivière A, *et al.* (2015) Bioaccessible antioxidants in milk fermented by *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains. *Biomed Res Int* 2015:1–12.
<https://doi.org/10.1155/2015/169381>
32. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, *et al.* (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:

research0034.1–0034.11. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>

33. Tannock GW (2004) A special fondness for lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* 70:3189–3194. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3189>
34. Vamanu E, Vamanu A (2010) Viability of the *Lactobacillus rhamnosus* IL1 Strain in Simulated Gastrointestinal Conditions. *Int J Pharmacol* 6:732–737. <https://doi.org/10.3923/ijp.2010.732.737>
35. Verdenelli MC, Ghelfi F, Silvi S, *et al.* (2009) Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *Eur J Nutr* 48:355–363. <https://doi.org/10.1007/s00394-009-0021-2>
36. Huang R, Pan M, Wan C, *et al.* (2016) Physiological and transcriptional responses and cross protection of *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 under acid stress. *J Dairy Sci* 99:1002–1010. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9993>
37. Koponen J, Laakso K, Koskenniemi K, *et al.* (2012) Effect of acid stress on protein expression and phosphorylation in *Lactobacillus rhamnosus* GG. *J Proteomics* 75:1357–1374. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.11.009>
38. Wu R, Zhang W, Sun T, *et al.* (2011) Proteomic analysis of responses of a new probiotic bacterium *Lactobacillus casei* Zhang to low acid stress. *Int J Food Microbiol* 147:181–187. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.003>
39. Sanchez B (2008) Proteomics of stress response in *Bifidobacterium*. *Front Biosci* 13:6905-6919. <https://doi.org/10.2741/3198>
40. Cotter PD, Hill C (2003) Surviving the acid test: Responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:429–453. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.429-453.2003>
41. Corcoran BM, Stanton C, Fitzgerald GF, *et al.* (2005) Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Appl Environ Microbiol* 71:3060–3067. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3060-3067.2005>
42. Amund OD (2016) Exploring the relationship between exposure to technological and gastrointestinal stress and probiotic functional properties of lactobacilli and bifidobacteria. *Can J Microbiol* 725:715–725
43. Begley M, Gahan CGM, Hill C (2005) The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev*

29:625–651. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.003>

44. Byun R, Nadkarni MA, Chhour K-L, *et al.* (2004) Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *J Clin Microbiol* 42:3128–3136.
<https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3128-3136.2004>
45. Solano-Aguilar G, Dawson H, Restrepo M, *et al.* (2008) Detection of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) in the intestine after feeding of sows and their piglets. *Appl Environ Microbiol* 74:6338–6347. <https://doi.org/10.1128/AEM.00309-08>
46. Aakko J, Salminen S, *et al.* (2014) Assessment of stress tolerance acquisition in the heat-tolerant derivative strains of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus rhamnosus* GG. 117:239–248. <https://doi.org/10.1111/jam.12520>
47. Sheu S-J, Chen H-C, Lin C-K, *et al.* (2013) Development and application of *tuf* gene-based PCR and PCR-DGGE methods for the detection of 16 *Bifidobacterium* species. *J Food Drug Anal* 21:177–183. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.05.008>

Chapitre 3 - Discussion générale

Dans ce mémoire, il a été possible d'évaluer l'effet de la digestion gastrique sur les souches probiotiques *B. animalis* ssp. *lactis* A026, *L. paracasei* A234, *L. rhamnosus* A119 et *L. rhamnosus* GG dans une matrice alimentaire composée seulement de sève d'érable par l'entremise des deux objectifs qui ont été présentés dans le chapitre 2.

Par le premier objectif, il a été démontré que les quatre souches probiotiques avaient d'excellentes capacités de survie pendant la digestion gastrique *in vitro* dans une matrice de sève d'érable. En effet, la concentration en cellules viables est restée stable tout au long de la digestion gastrique et ce, pour chacune des souches. Cette aptitude à survivre pendant le passage dans l'estomac est une caractéristique fondamentale pour les probiotiques. En effet, cela permettra aux souches d'atteindre le colon pour y conférer leurs propriétés bénéfiques à l'hôte, l'Homme. Leur survie en milieu acide comme dans l'estomac peut être en partie expliquée par le potentiel de la sève d'érable à fournir des nutriments essentiels au métabolisme des probiotiques expliqués par les résultats du deuxième objectif. Par celui-ci, il a été possible d'évaluer l'expression de cinq gènes communs associés à la réponse au stress chez les souches probiotiques pendant la digestion gastrique. Les résultats ont démontré que chacune des souches a eu la capacité de diminuer ou d'augmenter l'expression d'un ou de plusieurs gènes pendant la digestion. Par conséquent, ces résultats indiquent que les bactéries probiotiques ont la capacité de moduler l'expression de gènes contrôlant le pH intracellulaire, le métabolisme des sucres ainsi que des gènes ayant des fonctions plus générales en condition de stress afin d'assurer leur survie. De plus, la modulation de l'expression de ces gènes s'est avérée différente entre chacune des espèces et entre les souches. En d'autres termes, il n'y a pas de réponse générale, mais une réponse spécifique propre à chacune des souches, même si celles-ci appartiennent à la même espèce.

Dans les prochaines sections, les résultats et les méthodes utilisées dans le cadre de ce mémoire seront discutés.

3.1 Modèle de digestion dynamique *in vitro* TIM-1

Afin de reproduire le plus fidèlement possible les conditions de l'estomac *in vivo*, un modèle de digestion dynamique *in vitro* TIM-1 a été employé. Ce modèle a permis de contrôler la variation de pH, de température, l'ajout des enzymes comme les lipases et les pepsines, mais aussi le transit du

repas et les mouvements péristaltiques de l'estomac. L'utilisation de ce simulateur pour l'évaluation de la viabilité et de l'expression de gènes de stress était plus adaptée que la méthode statique décrite par Laparra *et al.* (Tableau 3.1) [114]. En effet, la digestion gastrique par le TIM-1 permet une meilleure simulation du mélange du chyme puisque le compartiment provoque des mouvements de va-et-vient dans son ensemble qui est similaire au péristaltisme, alors que l'agitation par la méthode statique est réglée à une vitesse constante. De plus, le modèle dynamique permet une gradation du pH allant de 6,4 à 1,7 en fonction du temps, alors que la méthode statique ne le permet pas. En effet, le pH est ajusté à 2 pendant toute la digestion, ce qui risque de biaiser les résultats puisqu'en réalité le repas est soumis à un gradient et non à un pH stable. De plus, l'ajout de bactéries directement dans un milieu très acide risque d'affecter davantage les bactéries probiotiques que lorsque le pH est ajusté par paliers, comme dans le cas d'un gradient d'acidité. Un autre avantage du TIM-1 est la vidange gastrique qui permet le passage du repas en fonction du temps de demi-vie dans les autres compartiments du système digestif qui n'est pas mimé par une méthode statique. Au niveau de l'utilisation, il est cependant moins dispendieux et plus facile d'utiliser une méthode statique, mais la plus grande précision des résultats obtenus compense largement pour ces deux désagréments. En bref, le simulateur dynamique TIM-1 est une méthode plus performante pour l'évaluation de la viabilité et de l'expression de gènes dans une matrice alimentaire en raison de son aspect plus réaliste. Cependant, des méthodes statiques peuvent être utilisées pour des examens préliminaires.

Tableau 3.1 Comparaison des conditions pour les modèles in vitro statiques et dynamiques adapté de Laparra *et al.* [114]

Type de modèle	Digestion SM	TIM-1
	Statique	Dynamique
Température d'incubation	37 °C	37 °C
Agitation	120 coups/min	Mélangé par péristaltisme
Digestion gastrique		
Volume de repas	100 mL	250 mL
pH	2	Temps = 0 min pH 6.4 Temps = 15 min pH 5.7 Temps = 45 min pH 4.5 Temps = 90 min pH 2.9 Temps = 120 min pH 2.3 Temps = 300 min pH 1.7
Temps d'incubation	2h	Paramètre de la sortie gastrique : $t_{1/2} = 85$ min $\beta = 1.8$
Enzymes gastriques	Pepsine	Pepsine et lipase

t le temps de sortie, $t_{1/2}$ le temps de demi-vie de la sortie et β le coefficient décrivant la forme de la courbe de la distribution gastrique

3.2 La viabilité et le PMA-qPCR

Dans le cadre de la présente étude, la viabilité des souches a été évaluée par une méthode de microbiologie moléculaire, le PMA-qPCR. L'utilisation du propidium monoazide (PMA) a permis de quantifier toutes les bactéries dites viables présentes dans les échantillons. En effet, le PMA est un agent colorant qui est capable de pénétrer dans les cellules dont la paroi est endommagée pour ensuite se fixer à l'ADN. Les cellules présentant une paroi intacte sont donc comptées comme viables. Une méthode de microbiologie classique comme le dénombrement sur boîte de Pétri n'aurait pas été d'intérêt puisque seules les cellules viables et cultivables auraient été dénombrées [115]. En effet, pendant la digestion, surtout au niveau gastrique, la viabilité des cellules est dans un état instable qui n'est pas distinguée par les méthodes conventionnelles puisque certaines cellules peuvent être toujours viables sans toutefois avoir la capacité d'être cultivées (aussi appelées « viable non cultivables »). Malgré cela, ces cellules auront possiblement la capacité de retrouver leur activité métabolique et ainsi de jouer leur rôle de bactéries probiotiques sur la santé de l'hôte qui les a ingérées. Par conséquent, les méthodes moléculaires comme le PMA-qPCR et la cytométrie de flux ont été

identifiées comme efficaces pour distinguer les cellules mortes des cellules vivantes, mais la cytométrie de flux permet aussi de distinguer les états physiologiques des cellules bactériennes [116]. Cependant, cette dernière méthode est deux fois plus coûteuse par échantillon, mais permet la collecte de plus d'informations sur l'intégrité des parois cellulaires. Par conséquent, la méthode du PMA-qPCR s'est avérée être la meilleure technique afin de comparer la viabilité des souches pendant la digestion gastrique lors de cette étude.

Au niveau des résultats par PMA-qPCR dans cette étude, ceux-ci ont permis d'évaluer la concentration de cellules vivantes au niveau de l'effluent stomacal. Par ailleurs, des différences de concentrations initiales ont été notées pour la souche *B. lactis* A026, mais n'a pas eu d'influence sur le reste de la digestion. En effet, pour chacune des souches, la concentration en cellules viables est restée stable dans la matrice de sève d'érable. Donc, chacune des souches a une excellente capacité de survie pendant la digestion gastrique dans une matrice de sève d'érable. D'autant plus, comme la concentration en cellules vivantes dépasse la quantité de 10^9 UFC par portion de 100 mL, cela répond à la législation sur la quantité minimale de probiotiques dans les aliments homologués comme probiotiques. Par conséquent, la stabilité de leur viabilité en condition de conservation reste à être étudiée pour ces souches. En effet, les études de Khalf *et al.* (2010) ainsi que de Lupien-Meilleur *et al.* (2016) avaient démontré une excellente stabilité pour les espèces *B. animalis* ssp. *lactis* et *L. rhamnosus* GG [6-7]. Cependant, il reste à évaluer ce critère pour les souches qui ont été utilisées dans cette présente étude.

Par sa définition, les probiotiques se doivent d'être viables. En effet, la viabilité des bactéries probiotiques est souvent un critère pour considérer des effets bénéfiques sur la santé puisque la majorité des études qui ont été faites jusqu'à présent utilisaient des probiotiques à l'état viable. Cependant, il y a certains cas où les probiotiques non viables pourraient aussi avoir des effets bénéfiques sur la santé humaine [2].

3.3 L'expression de gènes de stress

Pour évaluer la réponse au stress de la digestion gastrique, cinq gènes communs aux quatre souches reliées au stress ont été ciblés et évalués par RT-qPCR. Avec cette technique, les gènes doivent d'abord être ciblés préalablement afin de produire les amorces spécifiques aux espèces bactériennes et ainsi effectuer les analyses. Donc, une connaissance des séquences est de mise et peut être fastidieuse. Par conséquent, il existe d'autres méthodes, notamment le séquençage de

nouvelle génération, comme le RNA-seq, qui permet de détecter tous les gènes exprimés connus ou non, sans avoir à connaître les séquences (Illumina, San Diego, United States). Cependant, cette méthode est plus coûteuse, mais sans limites en termes de connaissances des séquences et peut être appliquée sur toutes les souches même si celles-ci sont inconnues. D'autant plus, les analyses bio-informatiques sont fastidieuses et demandent une grande expertise. Dans le contexte de notre étude, une telle méthode n'était pas nécessaire puisque les séquences à étudier étaient déjà connues et que les gènes avaient préalablement été ciblés.

Au niveau des résultats de notre étude, il a été démontré que le gène *galK* codant pour le métabolisme des sucres, au niveau de l'activité de la galactokinase, a été surexprimé pour toutes les souches de lactobacilles et sous-exprimé pour la souche de bifidobactérie. Cette différence entre les deux genres bactériens peut provenir de la contribution différente de ce gène au sein des bifidobactéries qui ont une voie métabolique des sucres (voie métabolique bifidus) distincte des lactobacilles. Quant au gène *atpA* responsable de la régulation de l'activité de la sous-unité α de l'enzyme F_0F_1 -ATPase, il a été surexprimé chez la souche *L. paracasei* A234 et sous-exprimé chez *L. rhamnosus* GG, mais est resté constant chez les deux autres souches. En effet, une augmentation de l'expression de ce gène a été documentée dans plusieurs études en condition acide. L'inverse a aussi été documenté dans la littérature, ce qui démontre que l'activité de ce gène peut varier d'une espèce et d'une souche à l'autre. En ce qui concerne les trois autres gènes liés aux stress généraux soit *dnaK*, *groEL* et *hrcA*, seule la souche *L. rhamnosus* GG a montré un changement au niveau des trois gènes, alors qu'un ou deux gènes seulement ont été sur ou sous-exprimés pour *B. lactis* A026, *L. paracasei* A234 et *L. rhamnosus* A119. Par conséquent, il y a une modulation de l'expression des gènes liés au stress pendant le passage dans l'estomac dans une matrice de sève d'érable.

Conclusion générale

Pour répondre aux critères des produits probiotiques, les bactéries probiotiques doivent être retrouvées en quantité minimale de 10^9 UFC par portion comme le mentionne la réglementation canadienne pour les probiotiques. Ces microorganismes doivent être vivants pour conférer leurs effets bénéfiques chez l'Homme. Par conséquent, pour soutenir la viabilité des probiotiques, ceux-ci sont souvent ajoutés à des matrices laitières comme le lait et le yogourt afin de les protéger pendant le stockage mais également pendant la digestion gastro-intestinale et contribuer à la stabilité de leur viabilité et de leur métabolisme pendant qu'ils sont acheminés au côlon. Cependant, la demande en produits probiotiques non laitiers augmente en raison de problème de santé, de diètes, etc. Par conséquent, cette étude s'est concentrée sur l'effet de la digestion gastrique sur la viabilité et l'expression de gènes de quatre souches probiotiques dans une matrice végétale : la sève d'érable. L'hypothèse de cette étude était que la sève d'érable a permis le maintien de la viabilité et les fonctions métaboliques de bactéries probiotiques lors de la digestion gastrique. Cette hypothèse a été vérifiée en partie par l'évaluation de l'effet de la digestion gastrique sur la viabilité et l'expression de gènes liés au stress sur quatre souches probiotiques. Par l'analyse de la viabilité par PMA-qPCR dans un simulateur dynamique *in vitro* Tim-1, il a été démontré, pour les souches *B. animalis* ssp. *lactis* A026, *L. paracasei* A234, *L. rhamnosus* A19 et *L. rhamnosus* GG, que leur concentration en cellules viables est restée stable tout au long de la digestion gastrique dans la matrice de sève d'érable, une caractéristique essentielle pour les produits probiotiques. Aussi, ces travaux ont montré par les résultats RT-qPCR, une modulation de l'expression d'un ou de plusieurs gènes ciblés liés à l'adaptation de conditions stressantes chez chacune des souches. En définitive, il a été démontré que la sève d'érable permet le passage de ces souches probiotiques dans l'estomac sans perte de viabilité. Cet aliment végétal a un fort potentiel pour être utilisé comme ingrédient dans les aliments probiotiques pareillement aux produits laitiers.

À la suite de cette étude, il serait intéressant de mesurer l'effet de la sève d'érable sur l'expression d'autres gènes d'intérêt en lien avec des propriétés probiotiques ainsi que d'évaluer la viabilité et l'expression de ces mêmes cinq gènes au niveau du duodénum qui est également un compartiment exerçant un stress majeur lors de la digestion gastro-intestinale, la bile, mais aussi d'utiliser la sève d'érable au sein d'un produit alimentaire probiotique.

Références

1. BCC R (2020) Probiotics in food, beverages, dietary supplements and animal feed. <https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/probiotics-market-ingredients-supplements-foods-report.html>. Accessed 4 Mar 2020
2. Lahtinen SJ (2012) Probiotic viability – does it matter? *Microb Ecol Heal Dis* 23:. <https://doi.org/10.3402/mehd.v23i0.18567>
3. Gagnon M, Savard P, Rivière A, *et al.* (2015) Bioaccessible antioxidants in milk fermented by *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains. *Biomed Res Int* 2015:1–12. <https://doi.org/10.1155/2015/169381>
4. Granato D, Branco GF, Cruz AG, *et al.* (2010) Probiotic dairy products as functional foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 9:455–470. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00120.x>
5. Kandyli P, Pissaridi K, Bekatorou A, *et al.* (2016) Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Curr Opin Food Sci* 7:58–63. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.012>
6. Khalf M, Dabour N, Kheadr E, Fliss I (2010) Viability of probiotic bacteria in maple sap products under storage and gastrointestinal conditions. *Bioresour Technol* 101:7966–7972. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.053>
7. Lupien-Meilleur J, Roy D, Lagacé L (2016) Viability of probiotic bacteria in a maple sap beverage during refrigerated storage. *LWT* 74:160–167. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.045>
8. Schubert ML (2016) Gastric acid secretion. *Curr Opin Gastroenterol* 32:452–460. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000308>
9. McFarland L V. (2015) From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. *Clin Infect Dis* 60 Suppl 2:S85-90. <https://doi.org/10.1093/cid/civ054>
10. Oberman H (1985) Fermented milks. *Microbiol Fermented Foods* 1:167–186
11. Hughes, D.B. and Hoover DG (1991) Bifidobacteria: Their potential for use in American dairy products. *Food Technol* 45:74–83
12. O'Sullivan MG, Thornton G, O'Sullivan GC, *et al.* (1992) Probiotic bacteria: myth or reality? *Trends Food Sci Technol* 3:309–314. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(10\)80018-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(10)80018-4)
13. Lourens-Hattingh A. and Viljoen BC (2001) Yogurt as probiotic carrier food. *Int Dairy J* 11:1–17. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00036-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00036-X)
14. Ishibashi, N. and Shimamura S (1993) Bifidobacteria: Research and development in Japan. *Food Technol* 47:126,129-134
15. FAO/WHO (2002) Health and nutritional properties and guidelines for evaluation

16. Khalesi S, Bellissimo N, Vandelanotte C, *et al.* (2019) A review of probiotic supplementation in healthy adults: helpful or hype? *Eur J Clin Nutr* 73:24–37. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0135-9>
17. Euromonitor and BCCResearch (2018) Probiotics market: the power of microbiota
18. Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, *et al.* (2013) Health benefits of probiotics: A review. *ISRN Nutr* 2013:1–7. <https://doi.org/10.5402/2013/481651>
19. Szajewska H and Mrukowicz JZ (2001) Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 33 Suppl 2:S17-25. <https://doi.org/10.1097/00005176-200110002-00004>
20. McFarland L V. (2006) Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol* 101:812–822. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00465.x>
21. Sazawal S, Hiremath G, Dhingra U, *et al.* (2006) Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infect Dis* 6:374–82. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70495-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70495-9)
22. Majamaa H and Isolauri E (1997) Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 99:179–85. [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(97\)70093-9](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(97)70093-9)
23. de Vrese M, Stegelmann A, Richter B, *et al.* (2001) Probiotics—compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr* 73:421s-429s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.421s>
24. Shen J, Obin MS, Zhao L (2013) The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med* 34:39–58. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.11.001>
25. Serban DE (2014) Gastrointestinal cancers: Influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. *Cancer Lett* 345:258–270. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.08.013>
26. Ouwehand AC, Forssten S, Hibberd AA, *et al.* (2016) Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. *Ann Med* 48:246–55. <https://doi.org/10.3109/07853890.2016.1161232>
27. Montecino-Rodriguez E, Berent-Maoz B, Dorshkind K (2013) Causes, consequences, and reversal of immune system aging. *J Clin Invest* 123:958–965. <https://doi.org/10.1172/JCI64096>
28. Sakai T, Makino H, Ishikawa E, *et al.* (2011) Fermented milk containing *Lactobacillus casei* strain Shirota reduces incidence of hard or lumpy stools in healthy population. *Int J Food Sci Nutr* 62:423–30. <https://doi.org/10.3109/09637486.2010.542408>
29. Borges S, Silva J, Teixeira P (2014) The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch Gynecol Obstet* 289:479–89. <https://doi.org/10.1007/s00404-013-3064-9>
30. Huang R, Wang K, Hu J (2016) Effect of probiotics on depression: A systematic review and

meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients* 8:483.
<https://doi.org/10.3390/nu8080483>

31. McKean J, Naug H, Nikbakht E, *et al.* (2017) Probiotics and subclinical psychological symptoms in healthy participants: A systematic review and meta-analysis. *J Altern Complement Med* 23:249–258. <https://doi.org/10.1089/acm.2016.0023>
32. FAO/OMS (2001) Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivantes. Cordoba, Argentine
33. Aguirre M, and Collins MD (1993) Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol* 75:95–107. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02753.x>
34. Tuomola E, Crittenden R, Playne M, *et al.* (2001) Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr* 73:393s–398s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.393s>
35. Morelli L (2000) In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Curr Issues Intest Microbiol* 1:59–67
36. De Angelis M, and Gobbetti M (2004) Environmental stress responses in *Lactobacillus* : A review. *Proteomics* 4:106–122. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300497>
37. Agence canadienne d'inspection des aliments (2019) Allégations relatives aux probiotiques. <https://www.inspection.gc.ca/exigences-en-matiere-d-etiquetage-des-aliments/etiquetage/industrie/allegations-sante/fra/1392834838383/1392834887794?chap=10>
38. Ventura M, van Sinderen D, Fitzgerald GF, *et al.* (2004) Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86:205–223. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000047930.11029.ec>
39. Gomes AMP, and Malcata FX (1999) *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci Technol* 10:139–157. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00033-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00033-3)
40. Pokusaeva K, Fitzgerald GF, van Sinderen D (2011) Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes Nutr* 6:285–306. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>
41. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, *et al.* (2009) The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol* 9:123. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-123>
42. Simon GL, and Gorbach SL (1984) Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* 86:174–193. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(84\)90606-1](https://doi.org/10.1016/0016-5085(84)90606-1)
43. Felis GE, and Dellaglio F (2007) Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr Issues Intest Microbiol* 8:44–61

44. Lee J-H, and O'Sullivan DJ (2010) Genomic Insights into Bifidobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:378–416. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00004-10>
45. Kandler O (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 49:209–224. <https://doi.org/10.1007/BF00399499>
46. Barrangou R, Briczinski EP, Traeger LL, *et al.* (2009) Comparison of the complete genome sequences of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140 and BI-04. *J Bacteriol* 191:4144–4151. <https://doi.org/10.1128/JB.00155-09>
47. Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, *et al.* (2002) The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14422–14427. <https://doi.org/10.1073/pnas.212527599>
48. Kleerebezem M and Vaughan EE (2009) Probiotic and gut *lactobacilli* and *bifidobacteria*: molecular approaches to study diversity and activity. *Annu Rev Microbiol* 63:269–90. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073341>
49. Berrada N, Lemeland JF, Laroche G, *et al.* (1991) Bifidobacterium from fermented milks: survival during gastric transit. *J Dairy Sci* 74:409–13. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78183-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78183-6)
50. Turrone F, Foroni E, Pizzetti P, *et al.* (2009) Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human Intestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 75:1534–1545. <https://doi.org/10.1128/AEM.02216-08>
51. Wall R, Hussey SG, Ryan CA, *et al.* (2008) Presence of two *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* probiotic strains in the neonatal ileum. *ISME J* 2:83–91. <https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2007.69>
52. Jayamanne VS, and Adams MR (2006) Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. *Lett Appl Microbiol* 42:189–94. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01843.x>
53. Masco L, Huys G, De Brandt E, *et al.* (2005) Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *Int J Food Microbiol* 102:221–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.018>
54. Matsumoto M, Ohishi H, Benno Y (2004) H⁺-ATPase activity in Bifidobacterium with special reference to acid tolerance. *Int J Food Microbiol* 93:109–113. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.009>
55. Mättö J, Malinen E, Suihko ML, *et al.* (2004) Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria. *J Appl Microbiol* 97:459–470. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02340.x>
56. Gueimonde M, Delgado S, Mayo B, *et al.* (2004) Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food*

Res Int 37:839–850. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.04.006>

57. Vernazza CL, Gibson GR, Rastall RA (2006) Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium*. J Appl Microbiol 100:846–853. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02832.x>
58. Collado MC, Gueimonde M, Sanz Y, *et al.* (2006) Adhesion properties and competitive pathogen exclusion ability of bifidobacteria with acquired acid resistance. J Food Prot 69:1675–9. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.7.1675>
59. Dianawati D, and Shah NP (2011) Enzyme stability of microencapsulated *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB12 after freeze drying and during storage in low water activity at room temperature. J Food Sci 76:M463-71. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02246.x>
60. Foligne B, Nutten S, Grangette C, *et al.* (2007) Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. World J Gastroenterol 13:236–43. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i2.236>
61. Gopal PK, Prasad J, Smart J, Gill HS (2001) In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. Int J Food Microbiol 67:207–16. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00440-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00440-8)
62. Paineau D, Carcano D, Leyer G, *et al.* (2008) Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults: A double-blind, randomized, controlled trial. FEMS Immunol Med Microbiol 53:107–113. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00413.x>
63. Slover CM, and Danziger L (2008) *Lactobacillus*: a Review. Clin Microbiol Newsl 30:23–27. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2008.01.006>
64. Hammes WP, and Hertel C (2006) The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: The Prokaryotes. Springer US, New York, NY, pp 320–403
65. Verdenelli MC, Ghelfi F, Silvi S, *et al.* (2009) Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. Eur J Nutr 48:355–363. <https://doi.org/10.1007/s00394-009-0021-2>
66. Ljungh Å, Lan J, Yanagisawa N (2002) Isolation, selection and characteristics of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19. Microb Ecol Health Dis 14:4–6. <https://doi.org/10.1080/089106002760003279>
67. Chiang S-S, and Pan T-M (2012) Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. Appl Microbiol Biotechnol 93:903–16. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3753-x>
68. Ortigosa M, Arizcun C, Irigoyen A, *et al.* (2006) Effect of lactobacillus adjunct cultures on the microbiological and physicochemical characteristics of Roncal-type ewes' milk cheese. Food Microbiol 23:591–598. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.09.005>

69. Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, *et al.* (1992) Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 37:121–128. <https://doi.org/10.1007/BF01308354>
70. Gorbach SL, and Goldin BR. (1989) *Lactobacillus* strains and methods of selection. U.S. Patent No. 4,839,281, 13.
71. Doron S, Snyderman DR, Gorbach SL (2005) *Lactobacillus* GG: Bacteriology and clinical applications. *Gastroenterol Clin North Am* 34:483–498. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2005.05.011>
72. Hekmat S, and Reid G (2006) Sensory properties of probiotic yogurt is comparable to standard yogurt. *Nutr Res* 26:163–166. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2006.04.004>
73. Champagne CP, Ross RP, Saarela M, *et al.* (2011) Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *Int J Food Microbiol* 149:185–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.005>
74. Donkor ON, Henriksson A, Vasiljevic T, *et al.* (2006) Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *Int Dairy J* 16:1181–1189. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.008>
75. Reid AA, Champagne CP, Gardner N, *et al.* (2007) Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. *J Food Sci* 72:M031–M037. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00222.x>
76. Ranadheera RDCS, Baines SK, Adams MC (2010) Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res Int* 43:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.009>
77. Ouwehand AC, and Salminen SJ (1998) The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int Dairy J* 8:749–758. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00114-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00114-9)
78. Corcoran, B. M.; Stanton, C.; Fitzgerald, G., *et al.* (2008) Life under stress: The probiotic stress response and how it may be manipulated. *Curr Pharm Des* 14:1382-1399(18)
79. Amund OD (2016) Exploring the relationship between exposure to technological and gastrointestinal stress and probiotic functional properties of *lactobacilli* and *bifidobacteria*. *Can J Microbiol* 62:715–725. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0186>
80. Saarela M, Virkajä, Rvi I, *et al.* (2006) Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *Int Dairy J* 16:1477–1482. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.12.007>
81. Chow J (2002) Probiotics and prebiotics: A brief overview. *J Ren Nutr* 12:76–86. <https://doi.org/10.1053/jren.2002.31759>
82. Ritter P, Kohler C, Ah U Von (2009) Evaluation of the passage of *Lactobacillus gasseri* K7 and *bifidobacteria* from the stomach to intestines using a single reactor model. *BMC Microbiol* 9:1–

9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-8>
83. Vijaya Kumar B, Vijayendra SVN, Reddy OVS (2015) Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. *J Food Sci Technol* 52:6112–24. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1795-2>
84. Roy D, Savard P, Guertin N, *et al.* (2016) Viability of *Lactobacillus reuteri* ncimb 30242 during storage in fruit juice and soy beverage. *J Microbiol Biotechnol Food Sci* 05:320–325. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2016.5.4.320-325>
85. Ding WK, Shah NP (2008) Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *Int Food Res J* 15:219–232
86. Perricone M, Bevilacqua A, Altieri C, *et al.* (2015) Challenges for the production of probiotic fruit juices. *Beverages* 1:95–103. <https://doi.org/10.3390/beverages1020095>
87. Sheehan VM, Ross P, Fitzgerald GF (2007) Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innov Food Sci Emerg Technol* 8:279–284. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.01.007>
88. Manga JAM, Zangué SCD, Tatsadjeu LN, *et al.* (2019) Producing probiotic beverage based on raffia sap fermented by *Lactobacillus fermentum* and *Bifidobacterium bifidum*. *Res Crop* 20:629–634. <https://doi.org/10.31830/2348-7542.2019.092>
89. Semjonovs P, Denina I, Fomina A, *et al.* (2014) Development of birch (*Betula pendula* Roth.) sap based probiotic fermented beverage. *Int Food Res J* 21:1763–1767
90. Gouvernement du Canada (2019) Aperçu statistique de l'industrie de l'érable au Canada
91. Yuan T, Li L, Zhang Y, Seeram NP (2013) Pasteurized and sterilized maple sap as functional beverages: Chemical composition and antioxidant activities. *J Funct Foods* 5:1582–1590. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.06.009>
92. Cochu A, Fourmier D, Halasz A, *et al.* (2008) Maple sap as a rich medium to grow probiotic lactobacilli and to produce lactic acid. *Lett Appl Microbiol* 47:500–507. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02451.x>
93. Ball DW (2007) The chemical composition of maple syrup. *J Chem Educ* 84:1647. <https://doi.org/10.1021/ed084p1647>
94. Thériault M, Caillet S, Kermasha S, *et al.* (2006) Antioxidant, antiradical and antimutagenic activities of phenolic compounds present in maple products. *Food Chem* 98:490–501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.079>
95. Jungersen M, Wind A, Johansen E, *et al.* (2014) The science behind the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®. *Microorganisms* 2:92–110. <https://doi.org/10.3390/microorganisms2020092>
96. SMITH JL (2003) The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria

- overcome acid conditions†. *J Food Prot* 66:1292–1303. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.7.1292>
97. Zomer A, Fernandez M, Kearney B, *et al.* (2009) An interactive regulatory network controls stress response in *Bifidobacterium breve* UCC2003. *J Bacteriol* 191:7039–49. <https://doi.org/10.1128/JB.00897-09>
 98. Sánchez B, Ruiz L, Gueimonde M, *et al.* (2013) Adaptation of bifidobacteria to the gastrointestinal tract and functional consequences. *Pharmacol Res* 69:127–136. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.004>
 99. Vasiljevic T, Shah NP (2008) Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *Int Dairy J* 18:714–728. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.004>
 100. Bottacini F, Medini D, Pavesi A, *et al.* (2010) Comparative genomics of the genus *Bifidobacterium*. *Microbiology* 156:3243–3254. <https://doi.org/10.1099/mic.0.039545-0>
 101. Ventura M, Turróni F, van Sinderen D (2012) Probiogenomics as a tool to obtain genetic insights into adaptation of probiotic bacteria to the human gut. *Bioeng Bugs* 3:73–79. <https://doi.org/10.4161/bbug.18540>
 102. Vanbogelen RA, Greis KD, Blumenthal RM, *et al.* (1999) Mapping regulatory networks in microbial cells. *Trends Microbiol* 7:320–328. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01540-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01540-1)
 103. Guchte M van de, Serror P, Chervaux C, *et al.* (2002) Stress responses in lactic acid bacteria. *Int J Gen Mol Microbiol* 82:187–216. <https://doi.org/10.1023/A:1020631532202>
 104. Cotter PD, Hill C (2003) Surviving the acid test: Responses of Gram-Positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:429–453. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.429-453.2003>
 105. Mozzi F, Raya RR, Vignolo GM (2015) *Biotechnology of lactic acid bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK
 106. Vinusha KS, Deepika K, Johnson TS, *et al.* (2018) Proteomic studies on lactic acid bacteria: A review. *Biochem Biophys Reports* 14:140–148. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.04.009>
 107. De Dea Lindner J, Canchaya C, Zhang Z, *et al.* (2007) Exploiting *Bifidobacterium* genomes: The molecular basis of stress response. *Int J Food Microbiol* 120:13–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.016>
 108. Miwa T, Abe T, Fukuda S, *et al.* (2001) Regulation of H(+)-ATPase synthesis in response to reduced pH in ruminal bacteria. *Curr Microbiol* 42:106–110. <https://doi.org/10.1007/s002840010187>
 109. Wang C, Cui Y, Qu X (2018) Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. *Arch Microbiol* 200:195–201. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1446-2>
 110. Wu R, Wang W, Yu D, *et al.* (2009) Proteomics analysis of *Lactobacillus casei* Zhang, a new probiotic bacterium isolated from traditional home-made Koumiss in inner Mongolia of China.

Mol Cell Proteomics 8:2321–2338. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800483-MCP200>

111. Jayaraman GC, Penders JE, Burne RA (1997) Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans hrcA*, *grpE* and *dnaK* genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification. *Mol Microbiol* 25:329–341. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4671835.x>
112. Møller T, Franch T, Udesen C, *et al.* (2002) Spot 42 RNA mediates discoordinate expression of the *E. coli* galactose operon. *Genes Dev* 16:1696–706. <https://doi.org/10.1101/gad.231702>
113. Duwat P, Ehrlich SD, Gruss A (1995) The *recA* gene of *Lactococcus lactis*: characterization and involvement in oxidative and thermal stress. *Mol Microbiol* 17:1121–1131. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17061121.x
114. Laparra JM, Vélez D, Montoro R, *et al.* (2003) Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an *in vitro* digestion method. *J Agric Food Chem* 51:6080–5. <https://doi.org/10.1021/jf034537i>
115. Emerson JB, Adams RI, Román CMB, *et al.* (2017) Schrödinger’s microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems. *Microbiome* 5:86. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0285-3>
116. Roussel C, Galia W, Leriche F, *et al.* (2018) Comparison of conventional plating, PMA-qPCR, and flow cytometry for the determination of viable enterotoxigenic *Escherichia coli* along a gastrointestinal *in vitro* model. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:9793–9802. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9380-z>