

Introduction

L'évolution de ferments lactiques, au cours de leur conservation, a été abordée dans cette étude en utilisant la spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide à ultra-haute pression (UHPLC). L'approche envisagée visait dans un premier temps, l'analyse de la fraction polaire de la matière grasse, contenant les phospholipides, impliqués dans la viabilité des cellules bactériennes conservées. Dans un second temps, une approche de type « lipidomique » a été développée, permettant ainsi une analyse globale de l'empreinte spectrale générée pour les différentes souches étudiées.

Matériel et méthode

Nature des échantillons

Souches bactériennes :

Bifidobacterium bifidum (BB)
Bifidobacterium infantis (BI)

Modes de conservation :

Température ambiante (AM)
Congélation (-18°C) (CM)

Préparation des échantillons

Extraction des lipides cellulaires :

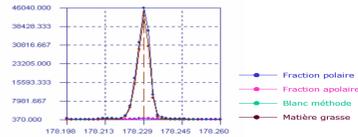
0,5 g de biomasse lyophilisée + 10 mL de lysozyme 0,8 mg/mL – 20 minutes à 37°C
Centrifugation 20 minutes à 4.000 rpm à 4°C
Élimination du surnageant et remise en solution du culot dans 10 mL Ethanol/Ether 3/1
Agitateur rotatif 3 heures
Filtration sur filtre plissé
Évaporation du filtrat et reconstitution dans 0,5 mL de chloroforme

Purification :

sur colonne Waters Sep-Pak[®] Vac 12cc (2g) Silica Cartridges
Conditionnement : 10 mL chloroforme
Dépôt de l'échantillon
Rinçage : 30 mL chloroforme
Élution : 30 mL de méthanol
Évaporation à sec et remise en solution dans 0,5 mL Chloroforme/Méthanol 80/20

Vérification de la présence de phospholipides :

Par ICP-AES (présence de phosphore dans la fraction polaire)



Raie utilisée pour la détection du phosphore : 178,229 nm

Injection de la fraction méthanolique en UPLC[®]-MSMS

Conditions chromatographiques

Colonne : UPLC BEH Hilic 1.7 µm – 2.1 * 100 mm

Injection : 20 µL

Température de la colonne : 60°C

Durée d'analyse : 12 minutes

Solvants d'éluion :

A – Acétate d'ammonium pH 5
B – Acétonitrile:Acétone (90:10)

Gradient :

T = 0.0 minutes : 65 % A – 35 % B
T = 10.0 minutes : 5 % A – 95 % B
T = 10.5 minutes : 65 % A – 35 % B
T = 12.0 minutes : 65 % A – 35 % B

Débit : 0.600 mL-minutes-1

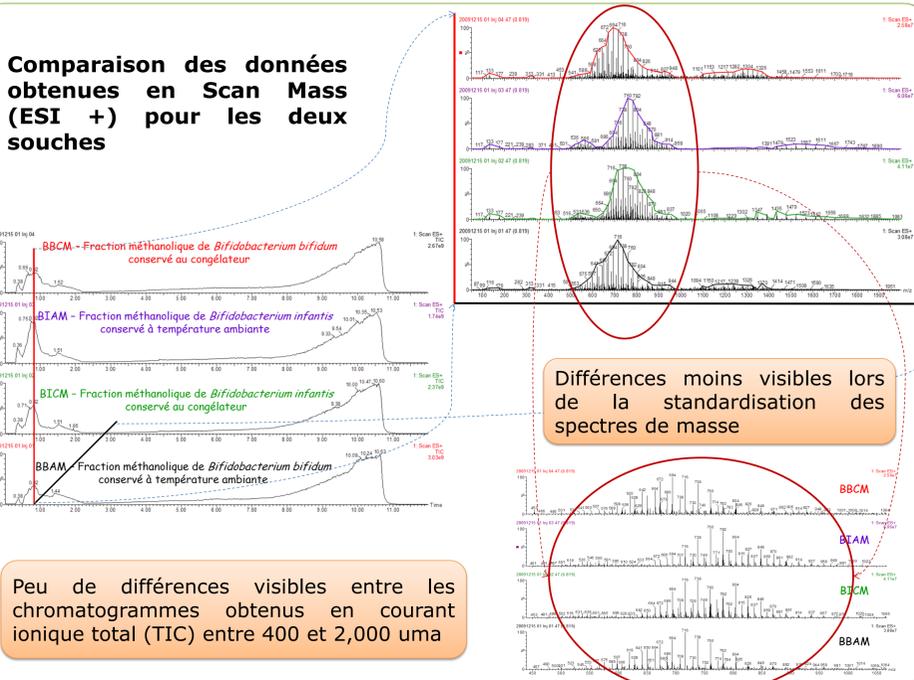
Stockage des échantillons : 4°C

Détection : spectrométrie de masse – Scan de masse 400 à 2.000 uma - ESI +



Résultats

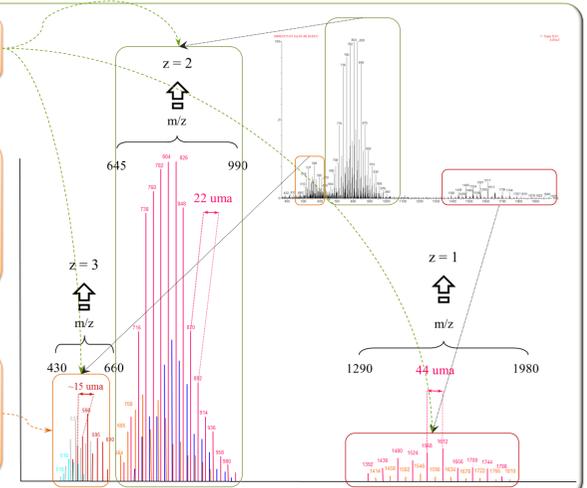
Comparaison des données obtenues en Scan Mass (ESI +) pour les deux souches



Présence de trois massifs caractéristiques

Deux relations possibles entre ces massifs : présence de « polymères » mono-chargés ou présence de « monomères » poly-chargés (z = 1, 2 ou 3)

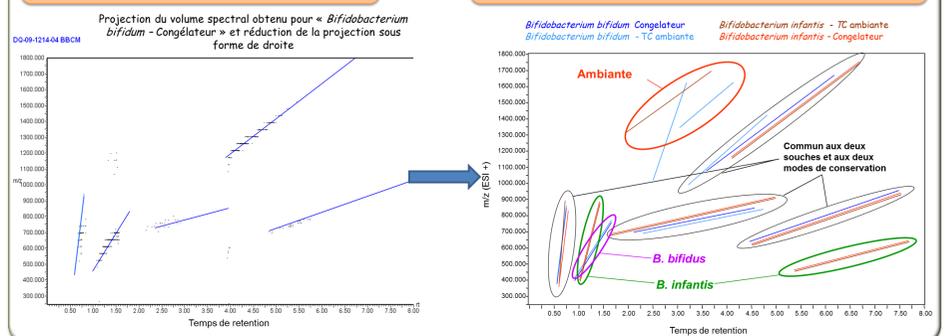
Présence de plusieurs composés peuvent de plus être mis en évidence dans les deux massifs de moindre masse



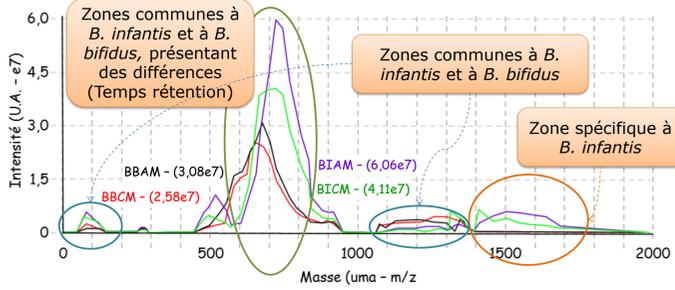
Mise en évidence de zones spectrales caractéristiques par projection du volume spectral [Intensité=f(temps, m/z)]

Communes aux deux souches ou aux deux modes de conservation

Propres à chaque souche indépendamment du mode de conservation



Distinction des deux souches au travers les enveloppes spectrales exprimées en unités absolues



Mise en évidence de zones spécifiques ou communes aux deux souches

Conclusions et perspectives

La recherche proposée visait à étudier l'évolution de la fraction polaire de la matière grasse isolée de cellules bactériennes au cours de leur conservation afin d'améliorer la viabilité des souches lors de leur revivification. Initialement basée sur la séparation et l'identification des phospholipides présents dans les culots cellulaires, l'analyse a évolué vers une approche de type « lipidomique ».

L'injection, en chromatographie liquide à ultra-haute pression (UHPLC), de la fraction méthanolique isolée à partir de la matière grasse extraite de cellules bactériennes lyophilisées (*Bifidobacterium bifidum* et *Bifidobacterium infantis*) conservées à température ambiante ou au congélateur (-20°C) a permis la mise en évidence de zones du volume spectral permettant de différencier les conditions de stockage et les deux sources bactériennes. Alors que l'information globale obtenue sur les échantillons (Chromatogramme TIC) ne permettait pas la mise en évidence de différences significatives entre les échantillons, l'analyse plus fine des volumes spectraux obtenus (spectres de masse et projection du volume spectral) a montré la présence de composantes communes aux deux souches et aux deux modes de conservation. Une zone apparaît pour les deux souches en conditions ambiantes. Une zone est quant à elle, propre à *B. infantis* dans les deux modes de conservation.

Remerciements