

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
7 décembre 2006 (07.12.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2006/128864 A2

(51) Classification internationale des brevets :
C07K 14/315 (2006.01) A23C 9/123 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2006/062715

(22) Date de dépôt international : 30 mai 2006 (30.05.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0505497 31 mai 2005 (31.05.2005) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **COMPAGNIE GERVAIS DANONE** [FR/FR]; 17, Bd Haussmann, F-75009 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **DRUESNE, Anne** [FR/FR]; 12, Allée de la Roseraie, F-91440 Bures-sur-Yvette (FR). **GARAULT, Peggy** [FR/FR]; 14, Rue des Grandes Vignes, F-91310 Monthéry (FR). **FAURIE, Jean-Michel** [FR/FR]; 3, Rue Lamartine, F-78350 Jouy-en-Josas (FR). **LICAU, Nadine** [FR/FR]; L'Ermitage, 2, allée Ravel, F-91940 Les Ulis (FR).

(74) Mandataires : **VIALLE-PRESLES, Marie-José** etc.; CABINET ORES, 36, rue de Saint-Petersbourg, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,

AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport
- avec une (des) indication(s) relative(s) à du matériel biologique déposé, fournie(s) selon la règle 13bis, séparément, et non avec la description
- avec la partie réservée au listage des séquences de la description publiée séparément sous forme électronique et disponible sur demande auprès du Bureau international

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: MUTANT STRAINS OF LACTIC ACID BACTERIA HAVING A NON-PHOSPHORYLABLE LACTOSE PERMEASE

(54) Titre : SOUCHES MUTANTES DE BACTERIES LACTIQUES POSSEDANT UNE LACTOSE PERMEASE NON PHOSPHORYLABLE.

(57) Abstract: The invention concerns lactic acid bacteria strains wherein the phosphorylable histidine of the IIA domain of lactose permease is replaced by a non-phosphorylable amino acid. Said strains have a reduced post-acidification and are useful in particular for preparing fermented dairy products.

(57) Abrégé : L'invention est relative à des souches de bactéries lactiques chez lesquelles l'histidine phosphorylable du domaine IIA de la lactose perméase est remplacée par un acide aminé non phosphorylable. Ces souches possèdent une post-acidification réduite et sont utilisables notamment pour la préparation de produits laitiers fermentés.

WO 2006/128864 A2

SOUCHES MUTANTES DE BACTERIES LACTIQUES POSSEDANT UNE LACTOSE PERMEASE NON PHOSPHORYLABLE

La présente invention concerne le domaine de la fermentation laitière. Plus précisément, cette invention porte sur des nouveaux mutants de *Streptococcus thermophilus* exprimant une lactose perméase mutante, dont l'activité de transport du lactose est modifiée. Ces souches, et des ferments les comprenant, peuvent être utilisés pour l'obtention de produits laitiers fermentés possédant de bonnes propriétés de conservation.

Les yaourts (ou yoghourts) sont traditionnellement obtenus par fermentation du lait avec une association de différentes bactéries lactiques, choisies parmi les souches de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus*. Au cours de la fermentation, qui est effectuée à une température d'environ 40 à 45°C, ces bactéries utilisent principalement le lactose comme substrat énergétique, et produisent de l'acide lactique qui entraîne la coagulation du lait ; lorsque le pH atteint une valeur d'environ 4,8 à 4,5, on met fin à cette étape de fermentation (également dénommée « acidification ») en refroidissant le produit. Celui-ci est ensuite maintenu au froid pendant la suite du processus de fabrication et de conditionnement, et jusqu'à sa consommation.

Cependant, le refroidissement ne stoppe pas complètement la fermentation lactique ; même lorsque le produit est maintenu à 4°C, on observe une augmentation progressive de son acidité au cours du temps.

Ce phénomène, connu sous le nom de post-acidification, est responsable d'une dégradation des qualités organoleptiques du produit pendant sa conservation.

La post-acidification résulte essentiellement de l'utilisation, par les bactéries, du lactose restant dans le produit à l'issue de l'étape d'acidification contrôlée. Pour l'éviter, il a été proposé d'utiliser des souches de bactéries lactiques ne fermentant pas, ou très peu, le lactose.

Les enzymes essentielles pour la fermentation du lactose chez *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* sont codées par l'opéron lactose, qui contient le gène *lacS*, codant pour la lactose perméase, et le gène *lacZ*, codant pour la β -galactosidase. Ces protéines sont respectivement responsables du transport et de l'hydrolyse du lactose. Il a donc été proposé, pour obtenir des souches non-postacidifiantes de bactéries lactiques, de produire des variants artificiels, ou de sélectionner des mutants naturels, chez lesquels l'activité d'au moins une de ces enzymes était affectée.

Le Brevet EP 1078074 (Compagnie Gervais Danone) concerne des mutants de *L. bulgaricus* déficients en activité β -galactosidase, comprenant une mutation non-sens dans au moins un des gènes de l'opéron lactose. Ce brevet décrit plus spécifiquement un mutant dont l'analyse de la séquence fait apparaître deux mutations

ponctuelles : l'une introduisant un codon de terminaison dans le gène de la β -galactosidase, qui induit l'incapacité de ce mutant à utiliser le lactose ; l'autre mutation induit un changement d'acide aminé au niveau du gène de la perméase (Lys -> Asn en position 122) ; EP 1078074 ne rapporte aucun effet de cette mutation sur le phénotype du mutant.

5 WO0188150 décrit des mutants d'une souche de *Lactobacillus*. Ces mutants sont incapables d'utiliser le lactose, mais conservent la capacité d'exprimer la β -galactosidase. WO0188150 ne précise pas la nature ou la position de la mutation concernée, et indique simplement qu'elle peut se situer dans un des gènes de structure de l'opéron lactose, par exemple la perméase, ou dans une région de régulation de l'opéron lactose, ou dans un gène intervenant dans le contrôle de l'expression de l'opéron lactose.

10 Les mutants décrits dans les documents cités ci-dessus ont en commun la propriété d'être complètement incapables d'utiliser le lactose. Ils ne peuvent pousser sur du lait que si celui-ci est complétement avec un sucre autre que le lactose, généralement du glucose. Les propriétés d'acidification et de post-acidification de ces mutants sont contrôlées par la quantité de glucose ajoutée.

Afin de fournir une alternative à ces mutants, les Inventeurs ont recherché s'il était possible d'obtenir des souches de bactéries lactiques ayant d'une part une capacité à utiliser le lactose au cours de leur croissance comparable à celle des souches sauvages, et d'autre part une aptitude restreinte à utiliser le lactose au cours de la phase stationnaire, de façon à diminuer ou abolir le phénomène de post-acidification. Dans ce but, ils se sont intéressés à la possibilité d'agir sur la régulation du transport du lactose dans les cellules de bactéries lactiques, et notamment dans les cellules de *S. thermophilus*.

20 Le transport du lactose extracellulaire dans des cellules de *S. thermophilus* se fait par l'intermédiaire de la lactose perméase LacS. Ce transport du lactose se fait en symport avec un proton, ou en antiport avec le galactose intracellulaire résultant de la dégradation du lactose.

Le transport du lactose est dépendant de deux phénomènes : d'une part, l'état de phosphorylation de la lactose perméase et, d'autre part, l'expression du gène *lacS*, codant pour cette lactose perméase. Ces deux aspects sont détaillés ci-dessous.

30 *Phosphorylation de la lactose perméase*

La protéine LacS est composée d'un domaine de translocation et d'un domaine de régulation (IIA). Ces domaines contiennent différents résidus histidine, dont la phosphorylation intervient dans la régulation du transport du lactose. Notamment, le domaine IIA est phosphorylable sur l'histidine 552. Cette phosphorylation est effectuée par la protéine HPr (*histidine-containing phosphocarrier protein*), elle-même préalablement phosphorylée.

HPr peut être phosphorylée :

- sur une sérine par une protéine kinase ATP dépendante ; la réaction inverse d'hydrolyse de HPr(Ser-P) est catalysée par une activité phosphatase (HPr(Ser-P) phosphatase) ;

5 - sur une histidine HPr(His~P), par un groupement phosphorylé provenant du phosphoénolpyruvate, et par l'intermédiaire de l'enzyme I (EI).

Seule la forme de HPr phosphorylée sur l'histidine permet la phosphorylation de la lactose perméase sur l'histidine 552.

10 Il a été observé, sur un modèle *in vitro* de protéoliposomes reconstituant l'environnement membranaire de la protéine LacS et sa phosphorylation par HPr(His~P) que cette phosphorylation n'a pas d'effet sur le transport du lactose en symport avec un proton (Gunnewijk and Poolman, 2000a), mais augmente d'un facteur 2 environ, le flux de l'échange lactose/galactose.

Transcription du gène lacS

15 La transcription de l'opéron lactose est induite par la croissance en milieu lactosé. Le promoteur des gènes *lacS* et *Z* contient un site *cre* (*catabolite responsive element*) qui permet une régulation par CcpA : CcpA réprime l'expression de *lacS* et de *lacZ*. CcpA a au contraire un effet activateur sur la transcription du gène codant pour la lactate déshydrogénase (van den Bogaard *et al.*, 2000).

20 La forme HPr(Ser-P) est capable d'interagir avec CcpA. Ces protéines ensemble vont permettre de former un complexe avec le site *cre*, ce qui entraîne une répression de la transcription du gène *lacS* (Jones *et al.*, 1997).

25 Il a été observé (Gunnewijk and Poolman, 2000b) que la forme HPr(Ser-P) est dominante au début de la phase exponentielle de croissance des cultures de *S. thermophilus* et diminue au cours de celle-ci, alors que la forme HPr(His~P) apparaît au cours de la phase exponentielle et est maximale à l'entrée en phase stationnaire. Le passage de HPr(Ser-P) à HPr(His~P) se fait en parallèle de la diminution du lactose et de l'augmentation du galactose dans le milieu de culture, et d'une très forte augmentation de l'expression de la lactose perméase.

30 Ainsi, l'état de phosphorylation de la protéine HPr apparaît jouer un rôle dans la régulation du transport du lactose, en compensant la diminution du lactose dans le milieu, à travers d'une part le niveau d'expression de la protéine LacS, et d'autre part la régulation de son activité.

35 Sur la base des observations rapportées ci-dessus, Gunnewijk et Poolman ont proposé le modèle suivant : lorsque le lactose est abondant dans le milieu, l'expression du gène *lacS* est réprimée par le complexe HPr(Ser-P)/CcpA. Au cours de la fermentation, l'accumulation de galactose dans le milieu et la diminution du lactose disponible provoquent une diminution de la capacité de la bactérie à faire pénétrer le lactose (et donc

une diminution de l'acidification du milieu). Cette diminution entraîne une baisse de l'activité glycolytique, et une chute de la concentration en ATP, ainsi qu'une hausse de la concentration en phosphate inorganique, entraînant une baisse de l'activité de HPr(Ser-P) kinase au profit de l'activité de HPr(Ser-P) phosphatase, ce qui aurait pour effet la diminution de la concentration en HPr(Ser-P). Cette diminution de la concentration en HPr(Ser-P) permet de lever la répression catabolique du gène *lacS* et par conséquent d'augmenter la production de lactose perméase. Parallèlement l'augmentation de HPr(His~P) permettrait d'augmenter la phosphorylation de la lactose perméase sur l'histidine 552, et donc la capacité de transport du lactose par antiport avec le galactose.

10 Ce modèle, suggérant que la phosphorylation de la lactose perméase sur l'histidine 552 par HPr(His~P) augmente le flux du lactose dans les cellules lorsque la quantité de substrat dans le milieu diminue, permet de supposer que l'acidification en fin de phase exponentielle pourrait être ralentie si l'on empêche cette phosphorylation. Toutefois, il est basé en partie sur des expérimentations *in vitro*, et ne permet pas de préjuger de la part réelle *in vivo* de l'augmentation de la phosphorylation de la lactose perméase, par rapport à l'augmentation de son expression, dans l'importation du lactose *in vivo*. En outre, les observations concernant les effets de la concentration en HPr(Ser-P) et HPr(His~P) sur l'augmentation de l'expression et de la phosphorylation de LacS ont été effectuées sur des bactéries en phase exponentielle ou en début de phase stationnaire ; aucune indication n'est fournie en ce qui concerne les concentrations de ces deux formes de HPr à des stades plus avancés de la phase stationnaire.

Les seules informations disponibles quant à l'effet de l'absence de phosphorylation de LacS sur l'histidine 552 sont fournies dans une publication de Poolman et al. (Poolman *et al.*, 1992), qui décrit différents plasmides contenant la séquence codant pour l'enzyme LacS de *Streptococcus thermophilus*, mutée sur différents résidus histidine. Ces plasmides sont utilisés pour transformer une souche d'*E.coli* dans laquelle le gène *lacS* endogène a été préalablement délété. Le transport du lactose dans les souches transformées par les différents mutants est évalué par rapport à celui observé dans la même souche d'*E.coli* contenant un plasmide codant pour l'enzyme LacS sauvage de *Streptococcus thermophilus*. Aucune différence significative n'est observée en ce qui concerne le mutant H552R dans lequel l'histidine native est remplacée par une arginine. Poolman et al. attribuent ce résultat soit à l'inefficacité de la phosphorylation de l'enzyme LacS sauvage de *Streptococcus thermophilus* par HPr(His~P) de *E.coli*, soit au fait que cette phosphorylation ne joue pas de rôle dans le transport du lactose.

35 Les Inventeurs ont cependant recherché si une mutation prévenant la phosphorylation de LacS sur le résidu histidine, pourrait avoir un effet sur les propriétés d'acidification et de post-acidification de la bactérie mutante.

Ils ont choisi pour cette étude une souche industrielle de *Streptococcus thermophilus*. Cette souche, déposée à la CNCM le 12/12/2002, sous le numéro I-2967, permet d'obtenir des produits laitiers fermentés ayant une texture intéressante ; toutefois, cette souche conduit à une post-acidification importante.

5 Les inventeurs ont construit et caractérisé un mutant de cette souche, exprimant, à la place de la lactose perméase sauvage, une lactose perméase mutée, non-phosphorylable sur l'histidine 552.

Ils ont constaté que cette souche mutante possédait une courbe d'acidification différente de celle de la souche mère. L'acidification démarre plus
10 lentement dans le cas du mutant que dans celui de la souche mère, et la vitesse maximale d'acidification du mutant est moins élevée. Cependant, un pH équivalent est atteint au bout de 6 heures de fermentation pour les deux souches. C'est au niveau de la post-acidification que la différence entre les deux souches est la plus nette. Dans les mêmes conditions de conservation (28 jours de conservation à 10°C), le Δ pH (différence entre le pH à J0 et le
15 pH à J28) est de l'ordre de 0,6 dans le cas de la souche mère, et de l'ordre de 0,4 dans le cas de la souche mutante. Cette différence de post-acidification ne provient pas d'une différence au niveau de la survie des bactéries. Celle-ci est en effet équivalente pour les deux souches. En outre, les produits fermentés obtenus avec le mutant présentent les mêmes qualités de texture que ceux obtenus avec la souche mère.

20 La présente invention porte donc en premier lieu sur un procédé d'obtention d'une souche mutante de bactérie lactique possédant une post-acidification plus faible que la souche mère dont elle est issue, caractérisé en ce que l'on introduit dans l'ADN génomique, notamment l'ADN chromosomique, de ladite souche mère, une mutation du codon codant pour l'histidine phosphorylable par HPr(His~P) du domaine IIA
25 de la lactose perméase, ladite mutation induisant le remplacement de ladite histidine par un acide aminé non phosphorylable.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ladite souche est une souche de *Streptococcus thermophilus*, et ladite mutation induit le remplacement de l'histidine en position 552 de la lactose perméase par un acide aminé non
30 phosphorylable.

Ledit acide aminé non-phosphorylable peut être n'importe quel acide aminé, à l'exception de la sérine, de la tyrosine, de l'histidine et de la thréonine. De préférence, on choisira l'alanine.

Avantageusement, le codon codant pour l'histidine en position 552 de la
35 lactose perméase est remplacé par un codon codant pour une alanine. Cette mutation génère un site de restriction *Bst*UI qui facilite le criblage des mutants obtenus.

Le procédé conforme à l'invention peut être mis en œuvre en utilisant des techniques conventionnelles de mutagenèse dirigée, notamment de mutagenèse par PCR, bien connues de l'homme du métier.

L'ADN muté ainsi obtenu est ensuite inséré dans un vecteur permettant
5 l'intégration du gène dans le chromosome bactérien. Cette intégration s'effectue de préférence par recombinaison de l'insert porté par le vecteur avec la région homologue du chromosome bactérien.

Classiquement, on insère l'ADN muté dans un vecteur intégratif portant un marqueur de sélection (par exemple un gène de résistance à un antibiotique), et l'on
10 introduit ce vecteur dans les bactéries chez lesquelles on souhaite effectuer la mutation. Celles-ci sont ensuite cultivées sur milieu sélectif (par exemple, si le marqueur de sélection est un gène de résistance à un antibiotique, en présence de l'antibiotique correspondant), et l'on récupère les bactéries qui sont capables de pousser dans ces conditions, qui sont celles qui ont intégré le vecteur par recombinaison homologue entre l'insert et la région
15 homologue du chromosome bactérien. La structure intégrée dans le chromosome est constituée des séquences du vecteur flanquées d'une part par la séquence mutée provenant de l'insert, et d'autre part par la séquence homologue de la bactérie hôte.

Les bactéries ainsi sélectionnées sont cultivées sur milieu non-sélectif, afin de permettre l'excision des séquences provenant du vecteur, qui s'effectue par
20 recombinaison homologue entre les régions flanquant ces séquences. La moitié des bactéries chez lesquelles cette recombinaison a eu lieu contient la séquence « sauvage » provenant de la bactérie hôte, et l'autre moitié contient la séquence mutée provenant de l'insert. Les bactéries portant la mutation sont ensuite sélectionnées par tout moyen approprié. Par exemple, si la mutation crée un site de restriction, la sélection peut
25 s'effectuer sur la base de la présence de ce site de restriction dans un produit d'amplification par PCR de la région mutante.

Des vecteurs intégratifs sont disponibles pour de nombreuses bactéries lactiques. Classiquement, pour une espèce bactérienne donnée, un vecteur intégratif est un vecteur qui peut être introduit dans les bactéries de cette espèce, mais qui est incapable de
30 s'y répliquer.

A titre d'exemples de vecteurs utilisables comme vecteurs intégratifs chez *Streptococcus thermophilus* on citera Pgem5, Puc19 (Mollet *et al.*, 1993), Pnd324 (Duan *et al.*, 1999).

Avantageusement, pour augmenter l'efficacité de transformation, on peut
35 utiliser comme vecteur intégratif un vecteur à répllication conditionnelle chez la bactérie choisie. Dans ce cas, les bactéries dans lesquelles a été introduit le vecteur sont dans un premier temps cultivées dans des conditions permissives pour sa répllication, ce qui lui permet de s'établir dans ces bactéries transformées ; dans un deuxième temps les bactéries

sont cultivées en conditions non-permissives pour la réplication du vecteur, et l'on peut, comme dans le cas des vecteurs intégratifs classiques effectuer la sélection des bactéries dans lesquelles le vecteur a été intégré dans le chromosome.

5 A titre d'exemples de vecteurs à réplication conditionnelle utilisables comme vecteurs intégratifs chez un grand nombre de bactéries lactiques, on citera les vecteurs thermosensibles décrits par BISWAS et al. et MAGUIN et al (Biswas *et al.*, 1993; Maguin *et al.*, 1996), ainsi que dans la Demande PCT WO 93/18164, ou les vecteurs pwv01 (Law *et al.*, 1995) et Pucl22 (Frere *et al.*, 1998).

10 L'invention a également pour objet une souche de bactérie lactique susceptible d'être obtenue par un procédé conforme à l'invention.

Cette souche est caractérisée en ce qu'elle contient dans son ADN chromosomique, une mutation du codon codant pour l'histidine phosphorylable par HPr(His~P) du domaine IIA de la lactose perméase, ladite mutation induisant le remplacement de ladite histidine par un acide aminé non phosphorylable.

15 Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ladite souche est une souche de *Streptococcus thermophilus*, dans laquelle le gène de la lactose perméase contient une mutation induisant le remplacement de l'histidine en position 552 de la protéine par un acide aminé non phosphorylable.

20 Une souche de bactéries lactiques conforme à l'invention a été déposée selon le Traité de Budapest, le 10 mai 2004, auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes), 25 rue du Docteur Roux, à Paris, sous le numéro I-3213. Il s'agit d'une souche mutante de *S. thermophilus*, dérivée de la souche CNCM I-2967 (déposée à la CNCM le 12 décembre 2002), par l'introduction, par mutagenèse dirigée, d'une mutation remplaçant le codon histidine 552 par un codon alanine.

25 Les souches de bactéries lactiques conformes à l'invention ont au cours de leur phase de croissance, une activité lactose perméase similaire à celle de la souche mère dont elles sont issues. Elles possèdent donc des capacités d'assimilation du lactose et d'acidification, comparables à celle de la souche mère dont elles sont issues. En revanche, leur activité lactose perméase pendant la phase stationnaire est réduite par rapport à celle de la souche mère, ce qui entraîne une post-acidification réduite.

30 Avantagement, les souches de bactéries lactiques conformes à l'invention sont issues de bactéries lactiques possédant une activité β -galactosidase, et conservent cette activité. Elles peuvent croître normalement sur du lait non supplémenté avec un sucre autre que le lactose.

35 De préférence, les souches de bactéries selon l'invention sont des mutants appropriés à l'industrie alimentaire (ou mutants «*food-grade*»). Ils sont avantagement dérivés de souches bactériennes caractérisées, présentant des propriétés avantageuses de fermentation des produits laitiers.

La présente invention concerne également un ferment lactique comprenant au moins une souche de bactéries telle que décrite ci-dessus. Selon un mode de réalisation particulier, un ferment lactique selon l'invention comprend au moins une souche mutante de *S. thermophilus* exprimant une lactose perméase dont l'histidine 552 a été remplacée par un résidu non phosphorylable, associée à au moins une autre souche de bactérie lactique, par exemple une souche de *L. bulgaricus*, pouvant éventuellement posséder également une post acidification réduite (par exemple résultant de la mutation, conformément à l'invention, de la lactose perméase, ou bien résultant d'une mutation inactivant la β -galactosidase).

Un procédé de préparation d'un produit laitier fermenté, comprenant une étape au cours de laquelle on fermente du lait à l'aide d'un ferment lactique tel que décrit ci-dessus, fait également partie intégrante de la présente invention, ainsi que tout produit laitier fermenté susceptible d'être obtenu par un tel procédé, tel qu'un yaourt, un lait fermenté, une boisson fermentée, un kéfir, un fromage ou un lait infantile fermenté.

Les exemples expérimentaux qui suivent, illustrés par les figures, exposent plus en détail certains aspects de la présente invention, sans toutefois en limiter l'objet.

Légende des figures

Figure 1 : Comparaison de la séquence du gène *lacS* du variant I-3213 avec la séquence du gène *lacS* de la souche mère I-2967.

Figure 2 : Comparaison des courbes d'acidification obtenues avec le mutant I-3213 et la souche mère I-2967.

Figure 3 : Comparaison des vitesses d'acidification du mutant I-3213 et de la souche mère I-2967.

Figure 4 : Suivi de l'acidité Dornic au cours de la conservation des produits. Comparaison du mutant I-3213 et de la souche mère I-2967.

Figure 5 : Principe de la mesure de la viscosité η d'un produit.

EXEMPLES

EXEMPLE 1 : FABRICATION DU MUTANT

La souche de départ est la souche de *S. thermophilus* I-2967, déposée à la CNCM le 12 décembre 2002.

Dans la séquence du gène *lacS*, le codon pour l'histidine 552 (l'histidine qui est phosphorylable) a été remplacé par un codon alanine, par double recombinaison. De plus, la mutation effectuée (remplacement du deuxième nucléotide du codon 522 par une cytosine, au lieu d'une adénine) a créé dans le gène un site de restriction *Bst*U1. Ceci a permis de sélectionner les clones ayant intégré la mutation désirée dans le gène *lacS*.

La stabilité de la mutation a été vérifiée à partir d'un des clones obtenus (déposé à la CNCM le 10 mai 2004 sous le numéro I-3213), par 6 repiquages successifs, suivis du séquençage du gène *LacS*. La figure 1 montre la comparaison de la séquence du gène *lacS* du variant I-3213 (SEQ ID NO : 2) avec celle du gène *lacS* de la souche mère I-2967 (SEQ ID NO : 1). La mutation est bien présente : le codon pour l'histidine 552 code désormais pour une alanine. Il n'y a pas de mutation indésirable ailleurs dans le gène *lacS*.

Le mutant I-3213 est approprié à l'utilisation agroalimentaire, car il ne contient aucune séquence résiduelle du plasmide utilisé pour intégrer la mutation du gène *lacS*.

10 **EXEMPLE 2 : TESTS PHYSIOLOGIQUES REALISES SUR LE MUTANT I-3213**

Afin de vérifier que le mutant I-3213 est moins post-acidifiant que la souche mère I-2967, des produits sont fabriqués en souche pure et sont suivis jusqu'à J+28 : acidification, post-acidification, survie, texture.

2.A - Protocole

- 15 - Revivification des souches par 2 repiquages.
- Préparation de ferments sur lait stérile additionné d'extraits de levure avec incubation à 44°C, jusqu'à ce qu'une acidité de 85°D soit atteinte (correspondant à 10⁸ à 10⁹ UFC/ml).
- Ensemencement d'un mélange de 120g de poudre de lait écrémé +
20 930 ml d'eau + 1g peptone de gélatine N3 (Organotechnie), pasteurisé 10 min à 95°C, avec 1% (v/v) de ferment.
- Incubation en pots dans une étuve à 44°C, jusqu'à ce qu'un pH de 4,65 soit atteint.
- Arrêt de la fermentation en plaçant les pots pendant 30 minutes dans
25 l'eau glacée.
- Conservation des produits pendant 28 jours en chambre froide à 10°C.

2.B - Suivi - Comparaison de l'acidification par les mutants par rapport à la souche I-2967

2.B.1. Courbes d'acidification

- 30 Grâce au système CINAC (CINétique d'ACidification, Alliance Instruments), le pH est mesuré en continu au cours du temps. On peut obtenir ainsi :
- la courbe d'acidification de chaque souche,
 - la dérivée première par rapport au temps, qui donne la vitesse d'acidification.

2.B.2. Mesure du pH

Le suivi de l'évolution du pH au cours de la conservation des produits se fait grâce à un pH-mètre MP220 de chez Mettler Toledo.

2.B.3. Mesure de l'acidité Dornic

5 La mesure de l'acidité Dornic (D°) permet de titrer la concentration molaire en ions H_3O^+ . Le nombre de degrés Dornic correspond au nombre, en dixièmes de millilitres, de solution d'hydroxyde de sodium, à la concentration 0,1 N qui sont nécessaires pour neutraliser 10,32g de lait. La neutralité est visualisée en utilisant un indicateur coloré, la phénolphthaléine. Aux alentours de sa zone de virage (pH 8,2), la
10 phénolphthaléine passe de l'incolore au rose. Un degré Dornic représente 100 mg d'acide lactique par litre de lait.

2.B.4. Préparation du mix pour les tests produits

Le milieu lait est reconstitué à partir de 120 g de poudre de lait écrémé (Milex 240, Arla Food Ingredients) + 930 ml d'eau permutée + 1 g de peptide N3 (Vital
15 Armor 950, Armor Protéines). Le mix est mélangé jusqu'à complète homogénéisation. Le milieu est ensuite réhydraté 30 min à température ambiante, puis pasteurisé à 95°C pendant 10 minutes.

2.B.5. Survie des souches

Les mesures de survie sont réalisées sur milieu gélosé M17 saccharosé.
20 Isolement en surface *via* un ensemenceur spirale (WASP de chez AES). Incubation à 37°C sous H_2CO_2 . Lecture après 72 heures d'incubation.

Les courbes d'acidification en souches pures ont été réalisées en duplicate.

2.B.6. Interprétation

25 Les résultats, présentés aux figures 2 et 3, montrent que le mutant I-3213 a une courbe d'acidification plus lente que la souche mère, avec un effet urée plus prononcé et une vitesse maximale d'acidification plus faible. Cependant, le pH 4,50 est atteint en 6 heures pour les deux souches.

2.C - Suivi - Comparaison de la post-acidification du mutant I-3213 par rapport à la souche I-2967

30

La figure 4 montre les résultats du suivi de l'acidité Dornic au cours de la conservation des produits, en comparant les produits obtenus par fermentation par le mutant I-3213 et par la souche mère I-2967.

35 Les résultats concernant la mesure du pH immédiatement après arrêt de la fermentation (J0), et après 28 jours de conservation à 10°C, sont présentés dans la Tableau 1 ci-dessous.

	pH J0	pH J28
I-2967 a	4,65	4,07
I-2967 b	4,64	4,08
I-3213 a	4,60	4,27
I-3213 b	4,65	4,19

Tableau 1

L'ensemble de ces résultats confirme que le mutant est moins post-acidifiant que la souche mère.

2.D - Suivi - Comparaison de la survie des mutants par rapport à la I-2967

5 Le tableau 2 ci-dessous indique le nombre de colonies bactériennes présentes dans 1 ml de produit après 28 jours de stockage à 10°C.

	UFC/ml J28
I-2967 a	$1,4 \cdot 10^7$
I-2967 b	$7,6 \cdot 10^7$
I-3213 a	$7,4 \cdot 10^7$
I-3213 b	$1,0 \cdot 10^8$

Tableau 2

Ces résultats montrent que la survie du mutant est aussi bonne que celle de la souche mère, après 28 jours de stockage suivant l'arrêt de la fermentation.

10 2.E- Suivi - Comparaison de la texture des produits obtenus à partir d'un mutant en comparaison avec ceux obtenus à partir de la souche mère I-2967

Les mesures de texture ont été réalisées sur les produits d'une seule fabrication. Toutes les mesures ont été effectuées en triple (3 pots par mesure).

Trois méthodes de mesure de la texture ont été réalisées sur les produits à

15 J+7 :

- Mesure de pénétrométrie avec le TAXT2 (10°C)
- Mesure d'écoulement après brassage manuel sur le Rhéomat 260 (4°C)
- Mesure de viscosité sur le sérum après centrifugation sur le MCR300

(20°C)

20 Ces différentes techniques de mesure de la texture sont détaillées ci-dessous.

2.E.1 - Mesure de viscosité sur le sérum des produits fermes

L'intérêt de cette méthode consiste à analyser le sérum des produits fermes afin de confirmer les caractérisations rhéologiques des laits fermentés par les
25 souches.

Cette méthode d'analyse permet dans un premier temps de récupérer le sérum des produits fermes. Pour cela, une quantité de produit, environ 50g, est centrifugée à 631 g pendant 10 minutes à température ambiante, ce qui permet de recueillir le sérum présent à l'intérieur du gel des laits fermentés par les souches. Le sérum est alors prélevé et

subit la même centrifugation afin d'éliminer la majorité des résidus du produit. Le reste de ces particules sédimente pour former un culot fragile.

La viscosité du sérum est ensuite mesurée à 20°C et à un gradient de cisaillement fixe de 100 s⁻¹ pendant une minute. Trois mesures sont également effectuées sur trois pots de lait fermenté par la même souche et dans les mêmes conditions. L'appareil utilisé pour cette analyse est un rhéomètre Anton Paar Physica® MCR 300 équipé d'une géométrie coaxiale à doubles entrefers de type DG 26.7/TEZ 150 p-c, ainsi que d'un système de régulation de température à effet Peltier. Ce système rotatif permet d'évaluer la viscosité du sérum à un gradient de cisaillement constant avec une acquisition d'un point par seconde.

Généralement, les deux premières valeurs de cette mesure sont incohérentes et faussées par l'initialisation du système rotatif. De ce fait, la viscosité de chaque sérum [Vs] est déterminée par la moyenne des valeurs retenues par l'appareil, excepté les deux premières.

15 2.E.2 - Mesure de pénétrométrie (Fgel – Dgel – F15mm)

L'appareil utilisé pour cette mesure est un pénétromètre Thermo Rhéo TAXT2 (Anton Paar Physica, Autriche).

Un cylindre d'environ 1 cm de diamètre pénètre dans le gel (tempéré à 10°C) à vitesse constante sur 15 mm de profondeur. Lors de la descente du mobile dans le produit, le gel oppose une résistance, il va se déformer avant de rompre. On mesure la force qui en résulte.

Les paramètres extraits sont les suivants :

Fgel = Force de gel (g), correspond à la valeur de la force appliquée par le mobile au moment de la rupture du gel (premier pic de la courbe).

25 Dgel = Distance à la force de gel (mm), correspond à la profondeur à laquelle se trouve le mobile au moment de la rupture du gel.

F15 = Force à 15 mm (g), correspond à la force mesurée lorsque le mobile est en fin de course.

2.E.3 - Mesure d'écoulement – Viscosité écoulement

30 Cette méthode consiste à déterminer la viscosité des produits fermes, après un brassage manuel et une incubation de 30 minutes à 4°C. Trois mesures sont effectuées à 4°C sur trois pots de lait fermenté par la même souche et dans les mêmes conditions. L'appareil utilisé pour cette analyse est un viscosimètre Mettler® RM 260 réfrigéré et équipé d'un système coaxial de type DIN 145. Ce système rotatif permet d'observer une destructuration du produit en fonction d'un gradient de cisaillement linéaire, soit une contrainte à un gradient donné.

Les résultats sont obtenus sous forme d'une courbe d'écoulement en continu, rampe montante et descendante entre 0 et 20 s⁻¹. Le produit subit un gradient de cisaillement croissant de 0 à 20 s⁻¹ pendant 1 minute. Cette phase correspond à la rampe montante. Puis, il subit un gradient de cisaillement décroissant de 20 à 0 s⁻¹ pendant 1 minute, correspondant à la rampe descendante.

Chaque courbe descendante est ensuite modélisée suivant le modèle de Casson :

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_0} + \sqrt{\eta \times D}$$

τ : Contrainte (Pa)

τ_0 : Seuil d'écoulement du produit (Pa) [Seuil 4]

η : Viscosité du produit (Pa.s) [V4]

D : Gradient de cisaillement (s⁻¹)

Cette modélisation par Casson, suivie d'une droite de régression linéaire sur la partie descendante de la courbe, permet de relever un paramètre important qui est la viscosité du produit η , correspondant à la pente de la droite de régression.

La figure 5 illustre le mode de calcul de la viscosité selon cette modélisation.

2.E.4 – Résultats

Les résultats obtenus avec chacune des techniques de mesure sont présentés dans le Tableau 3 ci-après.

Suivis	I-2967	I-3213
Visco sérum (mPa.s)	2,18	2,31
Fgel (g)	33,58	33,18
Dgel (mm)	3,29	2,96
F 15mm (g)	39,23	38,78
Viscosité écoulement	1154	1171

Tableau 3

Des analyses de variance (P<0,05) sont faites sur les résultats des mesures de texture (pour chaque paramètre les valeurs sont comparées par test de Student):

- Les paramètres Force de gel, Distance pour la force de gel et Force à 15mm montrent que les deux souches ne sont pas significativement différentes.

- Le paramètre de viscosité issu de la mesure d'écoulement montre que les deux souches ne sont pas significativement différentes.

- La viscosité du sérum étant très reproductible montre une différence significative entre les deux souches, mais le mutant ayant une viscosité plus importante que la souche I-2967, cela prouve qu'il n'y a pas eu de perte de texture.

2.E.5 - Interprétation

Les mesures de texture effectuées sur les produits fermentés obtenus avec le mutant et la souche mère permettent de montrer qu'il n'y a pas de perte de texture due à la mutation.

5 2.F - Conclusions

Un mutant lactose perméase non phosphorylable de la souche I-2967 a été obtenu par double événement de recombinaison.

Ce mutant, nommé I-3213 présente :

- une courbe d'acidification différente de celle de la souche mère (vitesse
- 10 ralentie),
- une post-acidification à J28 moins importante,
- une texture semblable à celle de la souche mère, et
- une bonne survie à J28.

REFERENCES

- Biswas, I., Gruss, A., Ehrlich, S.D. and Maguin, E. (1993) High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J Bacteriol*, **175**, 3628-3635.
- 5 Duan, K., Liu, C.Q., Liu, Y.J., Ren, J. and Dunn, N.W. (1999) Nucleotide sequence and thermostability of pND324, a 3.6-kb plasmid from *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **53**, 36-42.
- Frere, J., Benachour, A., Giard, J.C., Laplace, J.M., Flahaut, S. and Auffray, Y. (1998) A new theta-type thermosensitive replicon from *Lactococcus lactis* as an integration
- 10 vector for *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol Lett*, **161**, 107-114.
- Gunnewijk, M.G. and Poolman, B. (2000a) HPr(His approximately P)-mediated phosphorylation differently affects counterflow and proton motive force-driven uptake via the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J Biol Chem*, **275**, 34080-34085.
- 15 Gunnewijk, M.G. and Poolman, B. (2000b) Phosphorylation state of HPr determines the level of expression and the extent of phosphorylation of the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *J Biol Chem*, **275**, 34073-34079.
- Jones, B.E., Dossouet, V., Kuster, E., Hillen, W., Deutscher, J. and Klevit, R.E. (1997) Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by
- 20 phosphorylation of its corepressor HPr. *J Biol Chem*, **272**, 26530-26535.
- Law, J., Buist, G., Haandrikman, A., Kok, J., Venema, G. and Leenhouts, K. (1995) A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes. *J Bacteriol*, **177**, 7011-7018.
- Maguin, E., Prevost, H., Ehrlich, S.D. and Gruss, A. (1996) Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *J Bacteriol*, **178**, 931-935.
- 25 Mollet, B., Knol, J., Poolman, B., Marciset, O. and Delley, M. (1993) Directed genomic integration, gene replacement, and integrative gene expression in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*, **175**, 4315-4324.
- 30 Poolman, B., Modderman, R. and Reizer, J. (1992) Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. The role of histidine residues. *J Biol Chem*, **267**, 9150-9157.
- van den Bogaard, P.T., Kleerebezem, M., Kuipers, O.P. and de Vos, W.M. (2000) Control of lactose transport, beta-galactosidase activity, and glycolysis by CcpA in
- 35 *Streptococcus thermophilus*: evidence for carbon catabolite repression by a non-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system sugar. *J Bacteriol*, **182**, 5982-5989.

REVENDEICATIONS

- 1) Procédé d'obtention d'une souche mutante de bactérie lactique possédant une post-acidification plus faible que la souche mère dont elle est issue, caractérisé en ce que l'on introduit dans l'ADN génomique de ladite souche mère, une mutation du codon codant pour l'histidine phosphorylable par HPr(His~P) du domaine IIA de la lactose perméase, ladite mutation induisant le remplacement de ladite histidine par un acide aminé non phosphorylable.
- 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la souche mère est une souche de *Streptococcus thermophilus* et en ce que cette mutation introduit un codon alanine à la place du codon histidine 552.
- 3) Souche de bactérie lactique susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2.
- 4) Souche de bactérie lactique selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle possède une activité β -galactosidase.
- 5) Souche de bactérie lactique selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'il s'agit de la souche mutante de *S. thermophilus* déposée le 10 mai 2004 à la CNCM sous le numéro I-3213.
- 6) Ferment lactique comprenant au moins une souche de bactéries selon l'une quelconque des revendications 3 à 5.
- 7) Ferment lactique selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une souche mutante de *S. thermophilus* selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, associée à au moins une souche de *L. bulgaricus*.
- 8) Procédé de préparation d'un produit laitier fermenté, comprenant une étape au cours de laquelle on fermente du lait à l'aide d'un ferment lactique selon la revendication 6 ou la revendication 7.
- 9) Produit laitier fermenté susceptible d'être obtenu par le procédé selon la revendication 8.
- 10) Produit laitier fermenté selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit produit est choisi parmi les yaourts, les laits fermentés, les boissons fermentées, les kéfirs, les fromages et les laits infantiles fermentés.

> I-2967 TCCACAACCTCTTG 14
 > I-3213 CTTCCAATAATCTTGACTGCAGCTGAACTCTTCTTCATTCCACAACCTCTTG 52

 > I-2967 TGTTCCTTGTGTGCTTTATGATTATCTCTGACTCAGTAGAATATGGTCAATG 66
 > I-3213 TGTTCCTTGTGTGCTTTATGATTATCTCTGACTCAGTAGAATATGGTCAATG 104

 > I-2967 GAAAACGGGACACCGTGATGAATCACTTACTTTGTGAGTTCGTCCTTATT 118
 > I-3213 GAAAACGGGACACCGTGATGAATCACTTACTTTGTGAGTTCGTCCTTATT 156

 > I-2967 GATAAACTTGGTGGTGGCGATGTCAAACCTGGCTTGTTTCTACATTTGCCGTAG 170
 > I-3213 GATAAACTTGGTGGTGGCGATGTCAAACCTGGCTTGTTTCTACATTTGCCGTAG 208

 > I-2967 CTGCCGGTATGACAACAGGTGCCTCAGCATCAACAATTACAACACATCAACA 222
 > I-3213 CTGCCGGTATGACAACAGGTGCCTCAGCATCAACAATTACAACACATCAACA 260

 > I-2967 GTTTATCTTTAAGCTTGGCATGTTTGCTTTCCAGCAGCAACAATGCTTATC 274
 > I-3213 GTTTATCTTTAAGCTTGGCATGTTTGCTTTCCAGCAGCAACAATGCTTATC 312

 > I-2967 GGTGCCTTCATTGTTGCTCGTAAAATCACTTTGACTGAAGCACGTCACGCTA 326
 > I-3213 GGTGCCTTCATTGTTGCTCGTAAAATCACTTTGACTGAAGCACGTCACGCTA 364

 > I-2967 AAATTGTTGAAGAATTGGAACATCGCTTTAGCGTAGCAACTTCTGAAAATGA 378
 > I-3213 AAATTGTTGAAGAATTGGAACATCGCTTTAGCGTAGCAACTTCTGAAAATGA 416

 > I-2967 AGTTAAAGCTAACGTCGTATCTCTTGTAAACCCCTACAACCTGGTTATTTGGTT 430
 > I-3213 AGTTAAAGCTAACGTCGTATCTCTTGTAAACCCCTACAACCTGGTTATTTGGTT 468

 > I-2967 GATCTCTCAAGTGTTAATGATGAACACTTTGCTTCAGGTAGCATGGGTAAAG 482
 > I-3213 GATCTCTCAAGTGTTAATGATGAACACTTTGCTTCAGGTAGCATGGGTAAAG 520

 > I-2967 GTTTCGCCATTAAACCTACTGATGGAGCTGTCTTTGCACCAATTAGTGGTAC 534
 > I-3213 GTTTCGCCATTAAACCTACTGATGGAGCTGTCTTTGCACCAATTAGTGGTAC 572

 > I-2967 CATTTCGTCAAATTCCTTACTCGCCATGCAGTTGGTATTGAAAGTGAAGAT 586
 > I-3213 CATTTCGTCAAATTCCTTACTCGCCATGCAGTTGGTATTGAAAGTGAAGAT 624

 > I-2967 GGTGTCATTGTTCTTATCCACGTTGGCATCGGAACAGTTAAACTTAATGGTG 638
 > I-3213 GGTGTCATTGTTCTTATCCCGGTTGGCATCGGAACAGTTAAACTTAATGGTG 676

 > I-2967 AAGGATTCATTAGTTACGTAGAACAAGGTGATCATGTTGAAGTTGGACAAA 689
 > I-3213 AAGGATTCATTAGTTACGTAGAACAAGGTGATCATGTTGAAGTTGGACAAA 727

 > I-2967 AACTTCTTGAGTTCTGGTCACCAATTATTGAGAAAAATGGTCTTGATGACA 740
 > I-3213 AACTTCTTGAGTTCTGGTCACCAATTATTGAGAAAAATGGTCTTGATGACA 778

 > I-2967 CAGTACTTGTCACCTGTAAC TAATTCAGAAAAATTCAGTGCTTTCCATCTTG 791
 > I-3213 CAGTACTTGTCACCTGTAAC TAATTCAGAAAAATTCAGTGCTTTCCATCTTG 829

 > I-2967 AACAAAAAGTTGGAGAAAAGGTAGAAGCTTTGTCTGAAGTTATTACCTTCAA 843
 > I-3213 AACAAAAAGTTGGAGAAAAGGTAGAAGCTTTGTCTGAAGTTATTACCTTCAA 881

 > I-2967 AAAAGGAGAATAATCTATGAACATGACTGAAAAAATTCAACTTATTTAAAC 895
 > I-3213 AAAAGGAGAATAATCTATGAACATGACTGAAAAAATTCAACTTATTTAAAC 933

 > I-2967 GATCCAAAGATTGTTAGCGTTAATACTGTTGATGCTCACTCAGATCATAAG 946
 > I-3213 GATCCAAAGATTGTTAGCGTTAATACTGTTGATGCTCACTCAGATCATAAG 984

Figure 1

```
>I-2967 TATTTGAATCTCTTGAAGAATTTTCTGAAGGGGAGATGAAGTTAAGACAAT 998
>I-3213 TATTTGAATCTCTTGAAGAATTTTCTGAAGGGGAGATGAAGTTAAGACAAT 1036

>I-2967 CTCTTAATGGAAAATGGAAAATTCACTATGCTCAGAATACAAATCAGGTTTT 1050
>I-3213 CTCTTAATGGAAAATGGAAAATTCACTATGCTCAGAATACAAATCAGGTTTT 1088

>I-2967 AAAAGACTTTTATAAAACAGAATTTGATGAACTGATTTGAATTTCAATCAAT 1102
>I-3213 AAAAGACTTTTATAAAACAGAATTTGATGAACTGATTTGAATTTCAATCAAT 1140

>I-2967 GTACCAGGTCATTTAGAGCTTCAAGGTTTTGGTTCTCCACAATATGTGAATA 1154
>I-3213 GTACCAGGTCATTTAGAGCTTCAAGGTTTTGGTTCTCCACAATATGTGAATA 1192

>I-2967 CCCAATATCCTTGGGATGGTAAAGAATTCCTTCGTCCACCTCAAGTTCCTCA 1206
>I-3213 CCCAATATCCTTGGGATGGTAAAGAATTCCTTCGTCCACCTCAAGTTCCTCA 1244

>I-2967 AGAATCAAATGCTG 1220
>I-3213 AGAATCAAATGCTGTTGCATCATAACGTTAAACAT 1278
```

Figure 1 (suite)

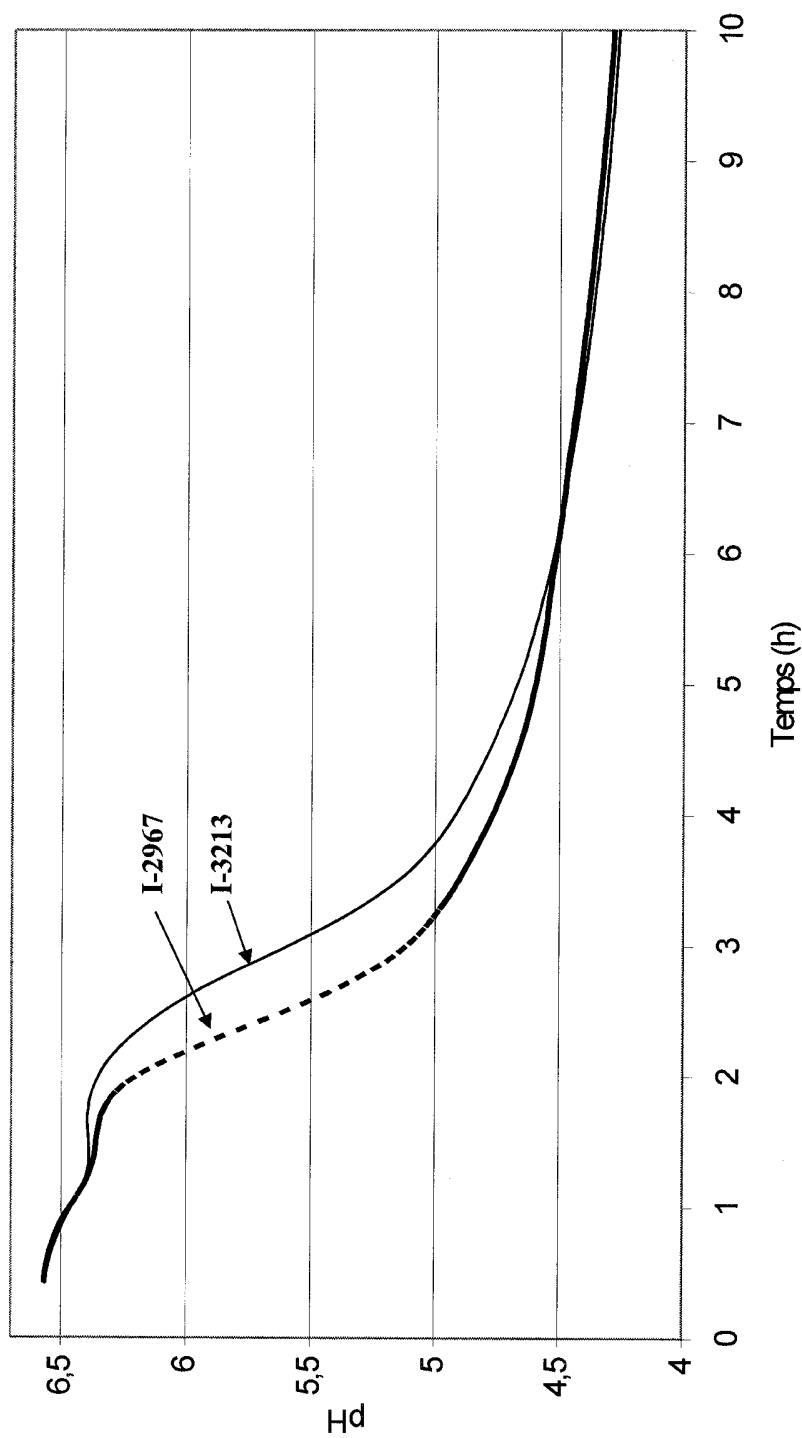


Figure 2

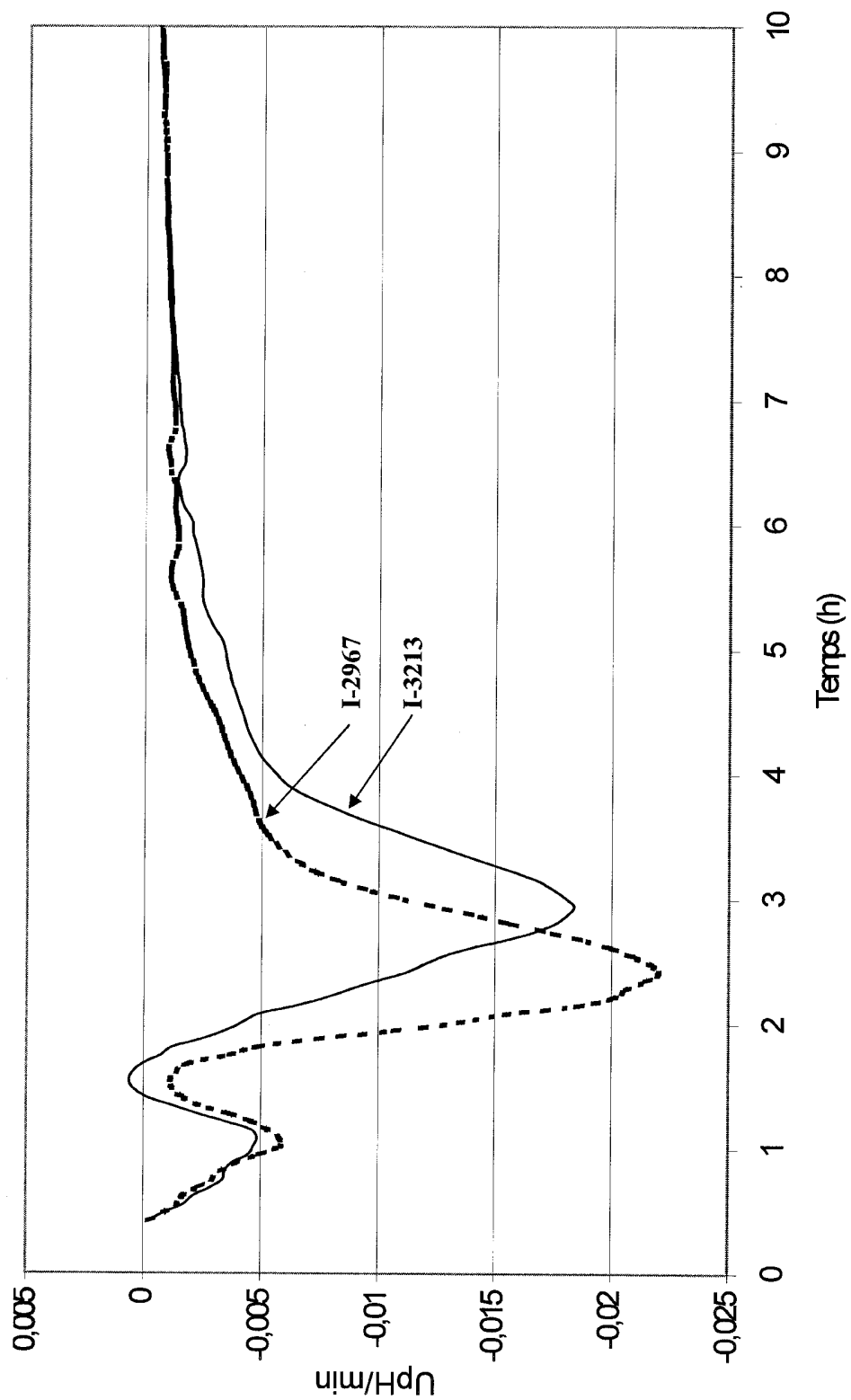


Figure 3

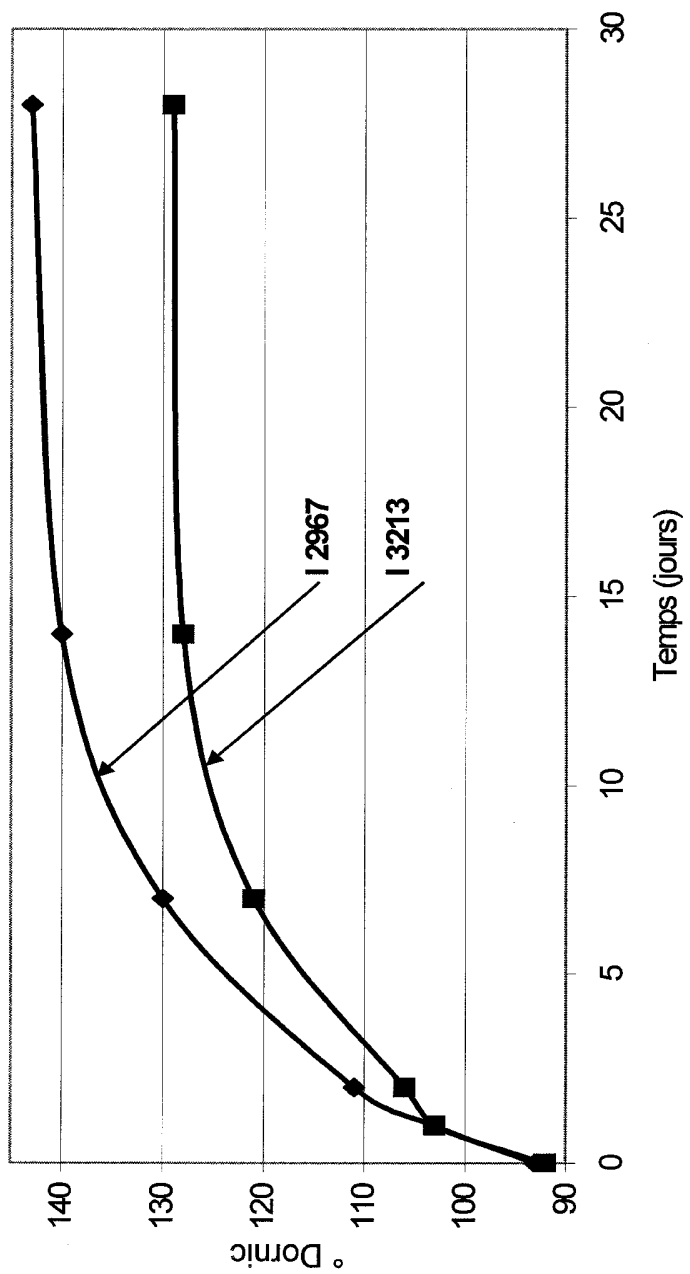


Figure 4

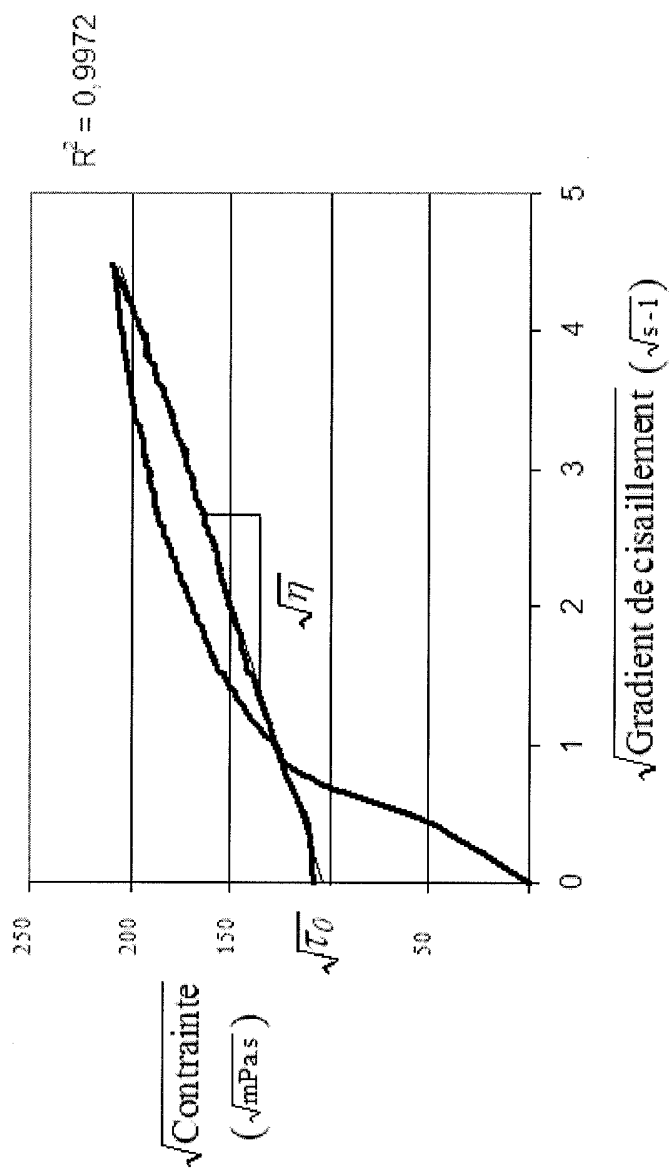


Figure 5

PCT

Imprimé (original sous forme électronique)

0-1	Formulaire PCT/RO/134 (SAFE) Indications relatives à des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés (règle 13bis du PCT)	
0-1-1	Préparée avec	PCT Online Filing Version 3.5.000.176 MT/FOP 20020701/ 0.20.4rc.2.7
0-2	Demande internationale n°	
0-3	Référence du dossier du déposant ou du mandataire	MJPmad191213
1	Les indications ci-dessous ont trait au micro-organisme ou autre matériel biologique visé dans la description :	
1-1	page	7
1-2	ligne	20
1-3	Identification du dépôt	
1-3-1	Nom de l'institution de dépôt	CNCM Collection nationale de cultures de micro-organismes
1-3-2	Adresse de l'institution de dépôt	FR- Institut Pasteur, 25, rue du Dr Roux, F-75724 Paris Cedex 15
1-3-3	Date du dépôt	10 Mai 2004 (10.05.2004)
1-3-4	Numéro d'ordre	CNCM I-3213
1-5	Etats désignés pour lesquels les indications sont données	de toutes les désignations

RÉSERVÉ À L'OFFICE RÉCEPTEUR

0-4	Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale : (oui ou non)	
0-4-1	Fonctionnaire autorisé	

RÉSERVÉ AU BUREAU INTERNATIONAL

0-5	Cette feuille est parvenue au Bureau international le :	
0-5-1	Fonctionnaire autorisé	

TRAITÉ DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE
INTERNATIONALE DU DÉPÔT DES MICRO-ORGANISMES
AUX FINS DE LA PROCÉDURE EN MATIÈRE DE BREVETS

FORMULE INTERNATIONALE

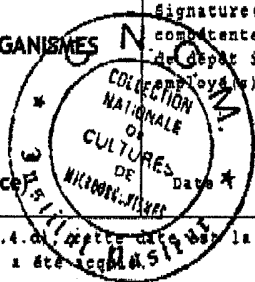
DESTINATAIRE :

COMPAGNIE GERVAIS DANONE
BP 63
126, rue Jules Guesde
92302 LEVALLOIS-PERRET

NOM ET ADRESSE
DU DÉPOSANT

RECEPISSE EN CAS DE DÉPÔT INITIAL,
délivré en vertu de la règle 7.1 par
l'AUTORITÉ DE DÉPÔT INTERNATIONALE
identifiée au bas de cette page

I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME	
Référence d'identification donnée par le DÉPOSANT :	Numéro d'ordre attribué par l'AUTORITÉ DE DÉPÔT INTERNATIONALE :
DN-250 145	CNCM I-3213
II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DESIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSÉE	
Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné :	
<input checked="" type="checkbox"/> d'une description scientifique <input checked="" type="checkbox"/> d'une désignation taxonomique proposée (Cocher ce qui convient)	
III. RECEPTION ET ACCEPTATION	
La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous chiffre I, qu'elle a reçu le 10 mai 2004 (date du dépôt initial) ¹	
IV. RECEPTION D'UNE REQUÊTE EN CONVERSION	
La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous chiffre I le _____ (date du dépôt initial) et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au Traité de Budapest le _____ (date de réception de la requête en conversion)	
V. AUTORITÉ DE DÉPÔT INTERNATIONALE	
Nom : COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM) Adresse : Institut Pasteur 25, rue du Docteur Roux F-75724 Paris Cedex 15 (France)	Signature(s) de la (des) personne(s) compétente(s) pour représenter l'autorité de dépôt internationale ou de la (des) autorité(s) : Georges Wagener Paris, le 11 juin 2004



¹ En cas d'application de la règle 6.4. du Règlement, cette date est la date à laquelle le statut d'autorité de dépôt internationale a été reconnu.