

Thèse
Thèse .

Présentée par

Esther IZQUIERDO ALEGRE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Spécialité : Chimie Analytique

**LES PROTEINES BACTERIENNES EN TANT QUE
BIOMARQUEURS DE L'ACTIVITE PROBIOTIQUE**

Soutenue le 26 Juin 2009 devant la commission d'examen

**Pr. Eric MARCHIONI
Dr. Saïd ENNAHAR
Pr. Rainer BISCHOFF
Pr. Bruno LE BIZEC
Dr. Philippe ANDRE
Dr. Yolanda SANZ HERRANZ**

**Directeur de thèse
Directeur de thèse
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Examineur
Examineur**

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'Aliment, UMR7178, Département Sciences Analytiques de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC). Ce travail a donné lieu aux publications et communications suivantes :

Publications :

- Izquierdo E., Cai Y., Marchioni E., Ennahar S. 2009. Genetic identification of the bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* IT62 and evidence that bacteriocin 32 is identical to enterocin IT. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53, 1907-1911.
- Izquierdo E., Wagner C., Marchioni E., Aoude-Werner D., Ennahar S. 2009. Enterocin 96, a novel class II bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* WHE 96, isolated from Munster cheese. 2009. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 4293-4276.
- Izquierdo E., P. Horvatovich, E. Marchioni, D. Aoudé-Werner, Y. Sanz, S. Ennahar. 2009. 2-DE and MS analysis of key proteins in the adhesion of *Lactobacillus plantarum*, a first step towards early selection of probiotics based on bacterial biomarkers. *Electrophoresis*, 30, 949-956
- Izquierdo E., E. Marchioni, D. Aoudé-Werner, C. Hasselmann, S. Ennahar. 2008. Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.*, 26, 16-20.
- Izquierdo E., A. Bednarczyk, C. Schaeffer, Y. Cai, E. Marchioni, A. Van Dorsselaer, S. Ennahar. 2008. Production of enterocins L50A, L50B, and the new IT by *Enterococcus faecium* IT62, a strain isolated from Italian ryegrass in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52, 1917-1923.
- Izquierdo E., M. Medina, S. Ennahar, E. Marchioni, Y. Sanz. 2008. Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for *Bifidobacterium longum* strains. *Curr. Microbiol.*, 56, 613-618.
- Medina M., E. Izquierdo, S. Ennahar, Y. Sanz. 2007. Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium longum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. *Clin. Exp. Immunol.*, 150, 531-538.

Communications à des congrès par affiche :

- Izquierdo Alegre E., E. Marchioni, S. Ennahar. 2009. Bacteriocin production by enterococcal strains. Second International Symposium on Antimicrobial Peptides. 17-19 juin, Saint-Malo, France
- Izquierdo Alegre E., P. Horvatovich, D. Aoudé-Werner, E. Marchioni, Y. Sanz, S. Ennahar. 2008. Application of comparative proteomics in preliminary selection of probiotic bacteria. Probiotics for the 3rd Millennium; 3rd International Probiotic Conference, 4-7 juin, High Tatras, Slovaquie

- Izquierdo Alegre E., A. Bednarczyk, E. Marchioni, S. Ennahar. 2007. Antibacterial activity of enterococci: Probiotic and technological potential of this controversial class of lactic acid bacteria. Méthodes alternatives d'obtention, d'analyse et d'évaluation – Forum Ingrédient, Santé, Beauté, Bien-être, 6 et 7 décembre, Vannes, France.

- Medina M., E. Izquierdo, S. Ennahar, Y. Sanz. 2007. On the way to the probiotic concept. 40th annual meeting of ESPGHAN, 9–12 mai, Barcelone, Espagne.

- Medina M., E. Izquierdo, S. Ennahar, Y. Sanz. 2007. Improved criteria for probiotic strain selection. Conference of gastrointestinal function, 16-18 Avril, Chicago, Etats-Unis

- Izquierdo Alegre E., A. Bednarczyk, Y. Cai, E. Marchioni, S. Ennahar. 2006. *Lactococcus lactis* RO50, a strain isolated from paddy rice silage in Japan, produces two nisin-family lantibiotics. The 1st International Symposium on Food, Veterinary and Medical Applications of Antimicrobial Peptides, 21–23 juin, Nantes, France.

Remerciements

Dans un premier temps, je tiens à remercier sincèrement Eric Marchioni pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse dans la meilleure des ambiances. J'ai beaucoup apprécié ta bonne humeur permanente et tes éclats de rire qui résonnent dans le couloir.

Toute ma gratitude va à Saïd Ennahar, le meilleur directeur de thèse (enfin !) que j'aurais pu avoir. J'ai beaucoup appris pendant ces quatre ans et j'espère avoir gardé un peu de ta rigueur et ton enthousiasme. Merci de m'avoir poussée quand il fallait pour que je donne le meilleur de moi et merci de m'avoir soutenue quand ça n'allait pas si bien. C'était un vrai plaisir de travailler avec toi, *my dear probiotic friend*.

J'exprime toute ma reconnaissance à Rainer Bischoff, Bruno Le Bizec, Philippe André et Yolanda Sanz de me faire l'honneur de juger ce travail.

Je tiens à remercier également Bernard, Christine et Adrienne, du laboratoire de microbiologie d'Aérial, de m'avoir si bien accueillie chaque fois que je venais faire mes manip chez vous et d'avoir fait votre mieux pour m'aider. Merci aussi à Dalal d'avoir participé à ce projet.

Merci à Peter Horvatovich d'avoir fait les analyses Chip-LC QTOF et d'être toujours prêt à répondre à mes questions.

Mil gracias a Yolanda Sanz, por haberme acogido en tu laboratorio y por haber compartido conmigo esa energia y esa entrega unicas con las que vives la ciencia. Siento que la burocracia sea tan complicada, pero de todas formas esta tesis tambien es en parte tuya. Gracias tambien a Amparo, Carmen e Inma, por haber hecho que me sintiera tan bien entre vosotros.

Un grand merci à tous les membres du Laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'aliment qui ont partagé mes journées pendant ces quatre ans. Merci à Martine et à Françoise parce que vous êtes géniales tant du côté scientifique qu'humain. Merci à Minjie, parce que tu es toujours prête à aider les autres. Merci à Myriam de nous rendre la vie un peu plus facile et de tant de conversations philosophiques partagées autour d'un café. Merci aussi à nos voisins de couloir, Thierry, Pierre et Mustafa, d'avoir toujours eu un sourire pour moi.

Merci à tous les thésards que j'ai rencontrés au cours de cette thèse ; aux anciennes, Hélène, Xin, Amandine et Diane de m'avoir si bien intégrée et m'avoir aidée dans mes premiers pas ; et à ceux qui sont encore là, Omar, Gildas, Céline et Eli, à vous de jouer maintenant. Merci aux stagiaires, Frédéric, Camille, Etienne et tant d'autres qu'il serait trop long de nommer mais qui ont donné de l'air frais au labo. Merci aussi à Erwan de m'avoir aidée ces derniers mois et de prendre le relais avec autant d'enthousiasme. Et enfin, mon plus grand merci à Julie, d'avoir été ma grande complice au labo et d'être toujours là pour moi. Cette thèse n'aurait pas été la même sans toi pour la partager. Merci aussi d'avoir rajouté plein d'accents dans ce manuscrit et désolée d'avoir autant râlé (eh oui, la grammaire française est tordue mais... ce n'est pas ta faute !). J'espère que tu vas rester mon *demi clown* pendant longtemps !

Et, parce qu'il y a une vie hors labo, merci à tous ces gens qui ont fait de mon séjour à Strasbourg une expérience si extraordinaire et inoubliable. Merci à ceux qui sont déjà partis, Laura, Jose, Carol, Leti, Vicky, mais qui ont laissé leur empreinte. Merci à Sandra, parce que tu m'as toujours impressionnée avec ton courage. Merci à Rafa, à Alfonso, à David, à Richi, à Agnès, à Guillaume, à Bertrand, à Irene, à Anaïs, à Lina et à tous ceux que j'oublie pour tous les moments mémorables passés ensemble. Merci de votre amitié et d'avoir pris si bien soin de moi.

Gracias tambien a mis chicas, Lucia, Elena, Cris y Monica, por seguir estando siempre ahí y por recargarme las pilas cada vez que vuelvo a casa.

Todo mi cariño y agradecimiento para mi familia. Gracias a mis abuelos, por haberme echado tanto de menos. Un pequeño recuerdo para Reme, para que sigas luchando! Y por supuesto mil gracias a mi madre y a mi padre porque sin vosotros nunca hubiera llegado hasta aquí. Gracias por haberme apoyado siempre, aunque fuera duro para vosotros y por tener tanta confianza en mí. Se que tengo mucha suerte de teneros y os adoro!

Et bien sur, un merci très spécial pour Joseph, sans qui tout ça n'aurait jamais commencé. Merci de m'avoir donné une raison de rester et de me faire sourire chaque jour.

Liste des abréviations

2D :	Bidimensionnel
ABC:	ATP Binding Cassette
ADN :	Acide Desoxyribonucleique
ATCC:	American Type Culture Collection
BAL :	Bactéries de l'Acide Lactique
BHI :	Brain Heart Infusion
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
CECT:	Coleccion Española de cultivos tipo
cFDA :	Carboxyfluoresceine diacetate
Da :	Dalton
DSM :	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
ESI :	Electrospray Ionisation
FAO :	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GRAS :	Generally Recognized As Safe
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography
IEF :	Isoelectrofocalisation
JCM :	Japan Collection of Microorganisms
LC:	Liquid Chromatography
MALDI:	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MICI:	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
MRS :	De Man, Rogosa, Sharpe
MS :	Mass Spectrometry
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
ORF:	Open Reading Frame
pI :	Point Isoélectrique
SDS:	Sodium Dodecyl Sulfate
TOF:	Time of Flight
UFC :	Unite Formatrice de Colonie

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : Contexte de l'étude	7
1-Les bactéries probiotiques	8
1.1. Principales espèces probiotiques	8
1.2. Effets positifs sur la santé	10
1.2.1. Amélioration de la digestion du lactose	11
1.2.2. Réduction du taux de cholestérol sanguin	12
1.2.3. Diminution des allergies alimentaires	13
1.2.4. Réduction du risque de diarrhée	14
1.2.5. Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin.	14
1.2.6. Prévention du cancer du côlon et autres cancers	15
1.3. Sélection des probiotiques	16
2-Caractéristiques des probiotiques : la production de bactériocines	20
2.1. Biologie des bactériocines	20
2.1.1. Les bactériocines des bactéries Gram-négatives	21
2.1.2. Les bactériocines des bactéries Gram-positives	22
2.1.2.1. Classification des bactériocines des BAL	22
2.1.2.2. Biosynthèse des bactériocines	26
2.1.2.3. Mode d'action	29
2.2. Ecologie des bactériocines	31
2.3. La dualité du rôle des bactériocines	31
2.3.1. Applications des bactériocines dans les aliments	33
2.3.2. L'application probiotique des bactériocines	35
3-Caractéristiques des probiotiques : la capacité d'adhésion	38
3.1. L'adhésion comme critère de sélection des souches probiotiques	38
3.2. Méthodes pour l'étude de l'adhésion	39
3.3. Molécules impliquées dans l'adhésion des probiotiques	41
4-Caractéristiques des probiotiques : la résistance aux conditions gastro-intestinales	46
4.1. L'appareil digestif	46
4.2. Survie des probiotiques au cours du transit digestif	48
4.3. Activité des bactéries non-viables	49
CHAPITRE 2 : Etude des bactériocines des bactéries lactiques	51
1-Introduction	52
2-Matériel et méthodes	53
2.3.1. Concentration des protéines	56
2.3.1.1. Précipitation au sulfate d'ammonium	56
2.3.1.2. Sans concentration	57
3-Résultats et discussion	65
3.1. Choix des souches indicatrices	65
3.2. Purification et déterminations structurales des bactériocines	67

3.2.1. Bactériocines de <i>L. lactis</i>	67
3.2.1.1. <i>L. lactis</i> RO50	67
3.2.1.2. <i>L. lactis</i> WHE 99 et <i>L. lactis</i> WHE 53	73
3.2.2. Bactériocines d' <i>E. faecium</i>	78
3.2.2.1. Purification des bactériocines produites par <i>E. faecium</i> IT62	78
3.2.2.2. Détermination des masses moléculaires	80
3.2.2.3. Caractérisation des peptides 1, 1', 2 et 2':entérocoques L50A et L50B	81
3.2.2.4. Caractérisation du peptide 3 : entérocoque IT	83
3.2.3. Bactériocines d' <i>E. faecalis</i>	90
3.2.3.1. Purification de la bactériocine produite par <i>E. faecalis</i> WHE 96	90
3.2.3.2. Caractérisation de l'entérocoque 96	91
3.2.3.3. Séquençage des déterminants génétiques	92
3.2. Activité des bactériocines purifiées	95
4-Conclusion	102
<i>Publication 1</i>	105
<i>Publication 2</i>	112
<i>Publication 3</i>	117
CHAPITRE 3 : Résistance et installation des probiotiques dans l'environnement gastro-intestinal	121
1-Introduction	122
2-Matériel et méthodes	125
2.1. Cultures bactériennes et milieux	125
2.2. Test d'adhésion au mucus	126
2.3. Caractérisation préliminaire des mécanismes d'adhésion	127
2.4. Résistance aux conditions gastro-intestinales simulées	128
3-Résultats et discussion	130
3.1. Adhésion à la mucine	130
3.2. Résistance aux conditions acides	137
3.3. Croissance en présence de bile	141
4-Conclusion	145
<i>Publication 4</i>	147
CHAPITRE 4 : Application de la protéomique à la recherche de biomarqueurs de l'activité probiotique	153
1-Introduction	154
2-Matériel et méthodes	157
2.1. Extraction des protéines de la paroi cellulaire	157
2.2. Extraction des protéines totales	158
2.3. Dosage des protéines	159
2.4. Electrophorèse bidimensionnelle	159
2.4.1. Première dimension : focalisation isoélectrique	160
2.4.2. Deuxième dimension : SDS-PAGE	162
2.5. Analyse des gels 2D	163
2.6. Digestion trypsique des protéines sélectionnées	164

2.7. Analyse des échantillons par spectrométrie de masse Chip-LC QTOF _____	164
2.8. Identification des protéines _____	165
3-Résultats et discussion _____	167
3.1. Extraction et purification des protéines _____	167
3.1.1. Protéines de la paroi cellulaire _____	167
3.1.2. Protéines totales _____	170
3.2. Analyse comparative du protéome de la paroi cellulaire des souches de <i>L. plantarum</i> _____	171
3.3. Analyse comparative du protéome total des souches de <i>L. plantarum</i> _____	183
3.4. Identification des molécules impliquées dans une propriété bactérienne : "cas de l'adhésion" _____	187
4-Conclusion _____	195
 <i>Publication 5</i> _____	 197
 CONCLUSION GENERALE _____	 205
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____	 211

INTRODUCTION GENERALE

Depuis quelques années l'idée d'une relation directe entre une alimentation optimale et un mode de vie sain fait son chemin auprès du grand public. Ainsi les marchés des aliments "sains" se sont fortement développés afin de répondre à la demande des consommateurs qui cherchent de plus en plus à contrôler leur qualité de vie et leur état de santé à travers une meilleure alimentation. Ces aliments incluent les produits dits biologiques ou encore les aliments à faibles teneurs en calories/en matière grasse, mais aucun cependant n'a connu la croissance spectaculaire du marché des aliments fonctionnels (+40% de 2004 à 2006). Ce marché, estimé à 23 milliards d'euros dans le monde, est toujours en forte croissance avec des gammes de produits sans cesse plus larges, à mesure que de nouveaux ingrédients fonctionnels apparaissent. Il ne fait aucun doute qu'il connaîtra encore une croissance dans les années à venir.

Il y a eu de nombreuses définitions du terme "aliment fonctionnel". L'une d'entre elles a cependant récemment fait l'unanimité dans les milieux scientifiques : on dit d'un aliment qu'il est fonctionnel lorsqu'il a été clairement démontré qu'il affecte avantageusement une ou plusieurs fonctions cibles de l'organisme indépendamment des effets nutritionnels adéquats, en provoquant une amélioration de l'état de santé et du bien-être et/ou une réduction des risques d'apparition de maladies (1). Les aliments fonctionnels sont, comme leur nom l'indique, des aliments, et leurs effets doivent être perceptibles après leur ingestion en quantités normales. Il ne s'agit en aucun cas de capsules/gélules ou de comprimés, mais bien d'aliments.

Les fonctionnalités concernent, dans l'ordre décroissant de popularité, les systèmes digestif, cardio-vasculaire, immunitaire, nerveux et osseux. Parmi les ingrédients liés aux allégations fonctionnelles, les probiotiques, les acides gras oméga 3 et 6, les acides gras polyinsaturés à longue chaîne, les phytostérols et les antioxydants sont parmi les plus classiques. L'Allemagne, la France, le Royaume Uni et l'Italie sont les pays européens les plus actifs en termes d'innovation en alimentation fonctionnelle.

Le marché le plus important, celui des fonctions digestives, est cependant dominé par les probiotiques. Alors qu'en 2003, le marché des probiotiques pesait à peine 6 milliards d'euros, il a quasiment doublé en 5 ans pour atteindre 10 milliards d'euros en 2008, soit environ 10% du marché mondial des aliments fonctionnels. Les stars des probiotiques sont les produits laitiers : l'an dernier, ils pesaient près de 80% des produits lancés sur les marchés américain et européen (Source : GNPD-Mintel). Les fabricants de produits laitiers ont en effet été les pionniers en la matière : après Yakult et son *Lactobacillus casei* Shirota au Japon dans

les années 50, on a vu apparaître des produits comme Activia (ex-Bio, *Bifidobacterium ActiRegularis*), ou encore LC1 de Nestlé (*Lactobacillus johnsonii*) et Actimel (*Lactobacillus casei defensis*) de Danone. Portés par la tendance des produits allégés et des nouveaux modes de consommation, les probiotiques se sont beaucoup diversifiés. Ils ont ainsi rejoint les linéaires des crèmes glacées (Lucerne Food aux USA) et des fromages (Millán Vicente au Portugal, Spar Vital en Hongrie). Désormais, ils sortent même de l'univers des produits laitiers pour être rajoutés aux produits céréaliers (céréales du petit déjeuner Very Berry Granola de l'américain Total Granola, barres céréalières Alpen chocolat/fudge de Weetabix en Grande-Bretagne), aux boissons (boisson énergisante Eminent de Emmi en Suisse et au Portugal) et même aux pâtes à tartiner comme le miel "Probiotic Honey" du britannique Daflorn. Ce succès des produits probiotiques, en grande partie à l'origine de l'essor du marché mondial des aliments fonctionnels, est sans aucun doute lié à la promotion faite aux propriétés prophylactiques et thérapeutiques supposées des produits laitiers fermentés ou additionnés de microorganismes vivants (82, 196). En plus des aliments fonctionnels, les probiotiques peuvent aussi se trouver sur marche comme compléments alimentaires, sous forme de comprimés, capsules ou poudres lyophilisées.

L'idée qu'une partie des bactéries présentes dans notre nourriture puisse avoir des effets bénéfiques pour la santé est beaucoup plus vieille que le terme probiotique. C'est au début du XX siècle que le lauréat du prix Nobel, Elie Metchnikoff, a observé qu'un nombre surprenant de personnes en Bulgarie vivaient plus de 100 ans (197). Cette longévité ne pouvait pas s'expliquer par les avancées de la médecine moderne, car la Bulgarie, un des pays les plus pauvres d'Europe à l'époque, ne bénéficiait pas de telles avancées. Le Dr. Metchnikoff a constaté que les Bulgares consommaient de grandes quantités de yaourt, et il a associé l'augmentation de la longévité observée à la consommation de microorganismes vivants provenant des produits laitiers fermentés. Même si Metchnikoff voyait les microbes comme étant plutôt nuisibles pour la santé humaine, il considérait bénéfique la substitution des bactéries du tractus gastro-intestinal par celles du yaourt dont le bacille bulgare (*Lactobacillus bulgaricus*). Il a alors expliqué l'effet bénéfique meilleur de ce dernier par l'absence de production d'alcool (néfaste à la longévité), en comparaison aux bactéries présentes dans d'autres laits fermentés tels que le kéfir ou le koumys. De plus, il a supposé que l'acide lactique produit, ainsi que d'autres facteurs non identifiés, agiraient de façon synergique pour inhiber la croissance de bactéries de la putréfaction dans le gros intestin (197). En 1930, 14 ans après la mort de Metchnikoff, le scientifique japonais Minoru Shirota

a isolé une bactérie lactique (BAL) des selles d'un enfant sain. Cinq ans après, Yakult, une des premières boissons à base de lait fermenté destinée à améliorer la santé intestinale a été produite en utilisant la souche isolée (*Lactobacillus casei*). Le concept des probiotiques s'est ensuite largement développé en Asie, et ce n'est que bien plus tard, dans les années 80, que les premiers produits laitiers contenant des probiotiques étaient introduits en Europe.

Le mot "probiotique" (traduction du grec "pour la vie"), qui a été utilisé pour la première fois en 1965 par Lilley et Stillwell (179) comme antonyme au terme antibiotique, a été pensé pour désigner des bactéries qui favoriseraient la croissance d'autres microorganismes. Depuis, les définitions du terme probiotique ont évolué avec le temps et la réflexion des chercheurs, des industriels et des spécialistes de la communication au grand public. En 1974, Parker choisit d'élargir la définition à des "organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore" (221). Cependant, Fuller reprocha à cette nouvelle définition d'inclure potentiellement les antibiotiques et proposa alors : "des micro-organismes ajoutés à l'alimentation et influençant de manière bénéfique l'animal hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale" (101). Trois éléments sont depuis venus plaider en faveur d'une révision de cette définition. Le premier est que certains micro-organismes peuvent avoir des effets sur l'hôte sans nécessairement modifier sa flore (effets enzymatiques directs ou immunomodulateurs). Le second est l'intérêt de certains industriels à ne pas labelliser comme "probiotique" des micro-organismes "classiques", tout particulièrement ceux du yaourt standard pour réserver ce label à des produits contenant des micro-organismes dont la valeur ajoutée justifie un coût supérieur. Le troisième était le désir de certains chercheurs et de nombreux industriels d'exclure de la définition les micro-organismes non viables. En effet, si certains micro-organismes tués par la chaleur peuvent exercer des effets bénéfiques pour l'hôte, des travaux ont montré que ces effets étaient en règle générale moins marqués que ceux des micro-organismes ingérés vivants (146, 150).

La définition retenue aujourd'hui "micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte" a été formulée par un comité mixte d'experts de la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture) et de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) qui a également établi des lignes directrices pour l'utilisation du terme «probiotique» dans les aliments (92). Dans cette définition, la nature du bénéfice n'est pas précisée, et de ce fait de nombreux effets bénéfiques pour la santé, plus ou moins controversés, ont pu être attribués aux BAL à allégation probiotique. Ils comprennent des activités anti-cancéreuses, anti-

ulcéreuses, anti-diabétiques, anti-obésité, hypocholestérolémiantes, anti-diarrhéiques, immunitaires et anti-inflammatoires, anti-IBD (affection abdominale inflammatoire), anti-allergiques, anti-oxydantes, antimicrobiennes (infections intestinales et uro-génitales) et favorisant l'équilibre microbien du côlon (82, 282). Dans la majorité des cas, des données ont été obtenues indiquant l'existence d'effets protecteurs, mais sans preuves expérimentales établissant un lien direct entre la consommation de produits fermentés ou non fermentés contenant des cultures probiotiques et les effets attendus par le consommateur. Par ailleurs, dans le cas d'effets avérés, les mécanismes physiologiques et biochimiques par lesquels les bactéries agissent restent largement méconnus.

Selon l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA), une grande variété d'allégations actuellement utilisées dans certains Etats membres de l'Union pour l'étiquetage des denrées alimentaires et la publicité en faveur de celles-ci se rapportent à des substances dont les avantages n'ont pas été prouvés ou qui ne bénéficient pas d'un consensus scientifique suffisant. Afin de s'assurer que les produits faisant l'objet d'une allégation ont réellement un effet nutritionnel ou physiologique bénéfique, une nouvelle réglementation européenne, prévoit la création pour les aliments fonctionnels de listes positives d'allégations nutritionnelles et de santé, ainsi que la définition des conditions d'autorisation de celles-ci dans l'Union Européenne (39). Depuis son entrée en vigueur au 1er juillet 2007, la croissance du marché des probiotiques a subi un ralentissement avec seulement 3% de nouveaux produits lancés entre 2007 et 2008, alors qu'entre 2004 et 2007, ce chiffre se situait à 11% par an. De nouvelles déclinaisons de produits, ainsi que la diversification des revendications permettent pourtant à ce marché de se maintenir et même de poursuivre sa croissance. Selon cette réglementation, seules les allégations qui se retrouveront dans les listes positives pourront être utilisées et devront reposer sur des preuves scientifiques permettant de prouver le lien entre la substance et l'effet sur la santé (article 5). La Commission doit présenter, au plus tard le 31 janvier 2010, la liste communautaire des allégations santé retenues. Ces allégations validées scientifiquement pourront figurer sur les étiquettes si leur correspondance avec le produit est prouvée et que les conditions d'utilisation sont respectées. Cette date butoir est très difficile à atteindre et risque fort d'être repoussée, puisque selon la Commission Européenne chargée de la validation, au moins 50% des 4000 allégations présentées nécessitent une clarification.

Il apparaît ainsi que la justification scientifique des allégations fonctionnelles constitue l'un des plus grands défis actuels pour les chercheurs dans le domaine des sciences alimentaires. En ce qui concerne les probiotiques, il n'existe pas l'heure actuelle de méthodes

fiables permettant de différencier les “vrais” probiotiques du reste de la flore microbienne, et la détermination des mécanismes physiologiques par lesquels ces bactéries contribuent aux effets avérés demeure un grand défi. Les critères de sélection des probiotiques se réfèrent souvent à des propriétés des cellules bactériennes, plus rarement à des effets probiotiques proprement dits. Ces critères sont basés sur les lignes directrices pour la sélection des probiotiques établies par le Comité mixte d’experts FAO/OMS en 2001 et sont : la résistance à l’acidité et à la toxicité biliaire, l’adhérence au mucus et/ou aux cellules intestinales épithéliales, la colonisation (même transitoire du tube digestif, l’antagonisme contre des germes pathogènes, la production d’agents antimicrobiens (bactériocines) et l’hydrolyse des sels biliaires (92).

L’objectif de ce travail de thèse a été de développer une méthode analytique globale, basée sur l’analyse des protéines, pour différencier les souches probiotiques du reste de la flore microbienne et pour essayer de comprendre certains mécanismes d’interaction probiotiques/hôte. A plus long terme, la capacité des souches particulières à favoriser des effets bénéfiques spécifiques pourra être liée à la présence ou à l’absence de certaines protéines. Etant donné la large gamme de propriétés des bactéries probiotiques, nous nous sommes limités à la production d’agents antimicrobiens, à la résistance aux conditions gastro-intestinales et à l’adhérence au mucus et aux cellules intestinales. La première partie de ce travail a consisté à isoler et caractériser des bactériocines à partir de souches de BAL de diverses origines, préalablement isolées. La structure biochimique ainsi que l’activité antimicrobienne de chacune des bactériocines isolées a été déterminée, ce qui a permis d’en découvrir des nouvelles. Par ailleurs, des tests *in vitro* ont été réalisés afin caractériser les capacités d’adhésion et de résistance aux conditions gastro-intestinales simulées d’un nombre relativement élevé de souches appartenant à des espèces couramment utilisées comme probiotiques et appartenant aux genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Enterococcus*. Finalement, en se basant sur les résultats des tests *in vitro*, une méthode de type protéomique a été développée avec l’objectif d’identifier des biomarqueurs de l’activité probiotique. En particulier, cette méthode, appliquée au cas de l’adhésion, a permis d’établir une corrélation entre certaines protéines présentes dans la paroi cellulaire d’une espèce de BAL et sa capacité d’adhésion.

Chapitre 1

Contexte de l'étude

1

Les bactéries probiotiques

1.1. Principales espèces probiotiques

La flore intestinale humaine est constituée d'environ 10^{14} cellules bactériennes appartenant à des centaines d'espèces différentes (beaucoup d'entre elles encore inconnues), soit 10 fois plus que le nombre de cellules qui constituent notre corps (182). La microflore intestinale peut être considérée comme un organe à part entière. Ses fonctions physiologiques sont nombreuses et ses dysfonctionnements peuvent conduire à des situations pathologiques (29). Parmi les nombreuses fonctions physiologiques de la flore intestinale endogène normale, on peut citer la fonction métabolique (fermentation, production de vitamines, etc.) ou encore la fonction de barrière qu'elle accomplit face à la colonisation par des microorganismes pathogènes.

L'idée d'administrer des microorganismes exogènes afin de moduler la flore endogène dans un sens favorable ou simplement d'utiliser leurs propriétés métaboliques est à la base du concept de probiotique. Le plus souvent les microorganismes utilisés comme probiotiques proviennent d'isolats humains constitués d'espèces que l'on retrouve parmi la flore résidente, et l'accent est ainsi mis sur le rétablissement de l'équilibre écologique de la flore intestinale. C'est l'une des raisons pour lesquelles les principales souches reconnues en tant que probiotiques et utilisées dans les produits alimentaires appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Figure 1). En effet, ces bactéries sont des membres de la flore normale de l'intestin, connues pour ne pas présenter de risque toxique ou infectieux et sont relativement faciles à inclure dans des produits laitiers.

Les lactobacilles sont les microorganismes probiotiques les plus en vue par leur association populaire avec les produits laitiers fermentés. Il s'agit en général de bâtonnets non flagellés, non sporulés et Gram-positifs faisant partie des BAL. Ils sont importants pour l'industrie alimentaire, notamment dans les fermentations laitières et végétales. Dans le corps humain, les espèces de lactobacilles font partie de la flore naturelle de la bouche, de l'intestin grêle, du côlon et du vagin. Même si elles y sont présentes, les espèces de lactobacilles ne sont pas prédominantes dans le tractus gastro-intestinal. Elles sont anaérobies et obtiennent leur énergie du métabolisme fermentatif, mais elles peuvent survivre en présence d'oxygène

grâce à leur activité peroxydase capable d'inactiver le peroxyde d'hydrogène. Elles ont également la capacité de survivre à des pH bas dans les milieux qu'elles acidifient par la production d'acide lactique, produit final de la fermentation des carbohydrates. Cette capacité à produire de l'acide lactique donne aux lactobacilles un avantage compétitif dans les environnements riches en nutriments, ce qui peut en partie expliquer leur potentiel probiotique. Une grande variété de lactobacilles sont utilisés comme probiotiques, parmi lesquels *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus rhamnosus* sont les espèces les plus étudiées (Figure 1).

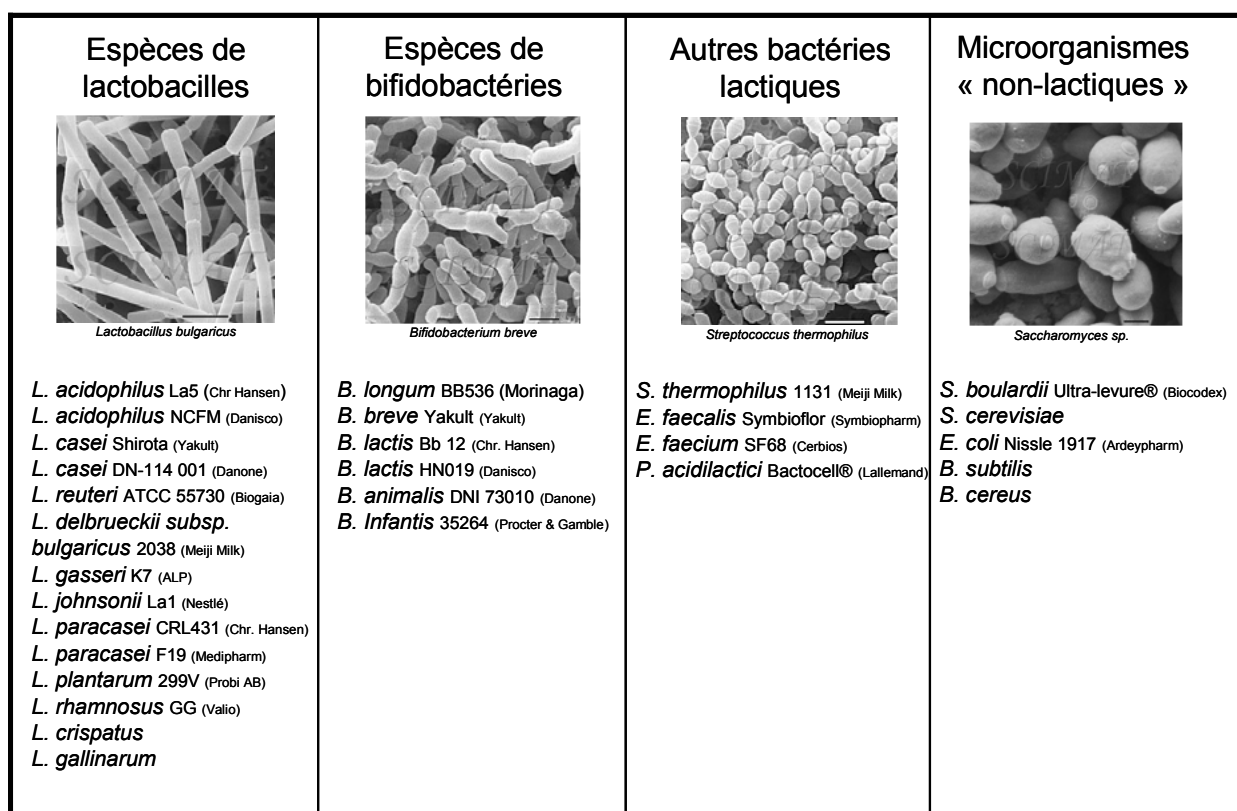


Figure 1. Principales espèces utilisées comme probiotiques et exemples des souches commercialisées. Source photos Scimat.

Les bifidobactéries sont des bâtonnets aux formes variées dont la plus caractéristique est une forme en Y. Elles sont non sporulées, Gram-positives, hétérofermentaires, anaérobies strictes et productrices d'acide lactique ou acétique. Même si elles partagent des caractéristiques phénotypiques avec les BAL et même si parfois elles sont considérées comme tel pour des questions pratiques, les bifidobactéries ne sont pas de "vraies" BAL. Elles sont présentes dans la flore normale des humains, et sont le genre prédominant parmi la

flore intestinale des nourrissons, bien que leurs niveaux décroissent pendant l'allaitement. Les espèces les plus utilisées comme probiotiques sont *Bifidobacterium lactis* et *Bifidobacterium longum*.

Un autre genre de BAL ayant fait l'objet de nombreuses études en vue de potentielles applications probiotiques est le genre *Enterococcus*, particulièrement les espèces *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis* (4, 37). Les entérocoques sont des bactéries cocci, Gram-positives, naturellement présents dans le tractus gastro-intestinal et dans de nombreux aliments. Toutefois, l'utilisation des entérocoques chez l'homme reste très controversée, étant donné qu'ils sont parfois associés à la contamination fécale et à la résistance aux antibiotiques. C'est pour cela que la sélection correcte des souches et les tests d'innocuité prennent une importance vitale dans le cas des entérocoques et permettent de garantir l'innocuité des souches utilisées. Ces souches sont le plus souvent utilisées comme probiotiques pour les animaux, mais il existent des produits refermant des cultures vivantes d'*E. faecalis* ou d'*E. faecium* et destiné à l'utilisation humaine, tels que Symbioflor ou Bioflorin qui sont commercialisés en Allemagne, en Autriche et en Suisse.

D'autres microorganismes ne faisant pas naturellement partie de la flore naturelle humaine peuvent également être utilisés comme probiotiques, et montrer des effets thérapeutiques importants tels que l'immunostimulation. L'un des meilleurs exemples est représenté par *Saccharomyces boulardii*, une levure probiotique dont les effets sont les mieux documentés (18, 240, 296).

1.2. Effets positifs sur la santé

Le Tableau 1 montre certains des produits commerciaux contenant des souches probiotiques vendus en France et les indications pour lesquelles ils sont conseillés. Des effets positifs nombreux et variés sont ainsi attribués à ces microorganismes. Beaucoup de ces effets ont été démontrés avec des études cliniques sur l'homme. Cependant, d'autres ne sont pas avérés ou sont simplement basés sur des tests *in vitro* ou sur des essais avec des animaux. Par ailleurs, les mécanismes d'action impliqués dans la plupart de ces effets restent loin d'être élucidés.

Tableau 1 Exemples de produits probiotiques commerciaux et ses applications.

Produit	Souche	Effet revendiqué
Activia® (Danone)	<i>Bifidobacterium animalis</i> DN-173 010	Aide à réguler le transit
Actimel® (Danone)	<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	Renforce les défenses naturelles de l'organisme
Yakult	<i>L. casei</i> Shirota	Régule le transit et renforce les défenses naturelles
BION®3 (Merck)	<i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> + vitamines + minéraux	Renforce les défenses naturelles de l'organisme. Aide à retrouver la forme
BION®Transit (Merck)	<i>L. plantarum</i> 299V	Evite l'inconfort intestinal et les ballonnements
BION®Voyage (Merck)	Probio-Tec® Quatro : <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 <i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12 <i>Streptococcus thermophilus</i> STY-31 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> LBY-27	Réduit la diarrhée du voyageur
BION®Flore intime (Merck)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 <i>Lactobacillus reuteri</i> RC 14	Restaure et protège l'équilibre de votre flore vaginale
VSL#3®	<i>Bifidobacterium breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>	Traite le syndrome de l'intestin irritable, la colite ulcéreuse et de la pouchite.
Lacteol® (Axcan Pharma)	<i>L. acidophilus</i>	Evite la diarrhée
Ultra-Levure® (Biocodex)	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Evite la diarrhée
Gefilus® (Valio)	<i>L. rhamnosus</i> GG	Renforce les défenses naturelles de l'organisme, multiples effets sur la santé

1.2.1. Amélioration de la digestion du lactose

L'un des effets des BAL qui a été le plus mis en avant et démontré chez l'homme est celui qui concerne l'amélioration de l'intolérance au lactose (70, 164, 186). Ce disaccharide, présent exclusivement dans le lait et ses dérivés, est formé de glucose et de galactose reliés entre eux par une liaison β . Sa digestion nécessite une lactase, ou β -galactosidase, qui hydrolyse cette liaison et permet alors l'absorption des sucres simples libérés. Chez les personnes souffrant d'intolérance au lactose, un déclin de la production de cette enzyme est

observé au-delà de la petite enfance. La deuxième cause d'intolérance (intolérance secondaire) est représentée par les maladies dont la conséquence est une réduction de la surface de digestion-absorption intestinale ou une accélération du transit jéjunal, comme les résections intestinales, les gastro-entérites, la maladie céliaque ou les gastrectomies.

Plusieurs études ont montré que la β -galactosidase des BAL participait à la digestion du lactose dans l'intestin (70, 186). En principe, le remplacement du lait par du yaourt conduit à une meilleure absorption et une meilleure tolérance chez les sujets présentant une intolérance au lactose (primaire et secondaire) (11, 25). Il a été démontré que les bactéries qui survivaient dans l'intestin gardaient une activité métabolique suffisante pour hydrolyser le lactose (81), et que celles dont la membrane est facilement lysée par les acides biliaires libéraient leur lactase dans l'intestin (186). Finalement, dans le même registre de la digestion et de la tolérance aux disaccharides, il a été montré que l'ingestion de *Saccharomyces cerevisiae* aidait à la digestion du saccharose chez des enfants déficients en saccharase (120).

1.2.2. Réduction du taux de cholestérol sanguin

Il a été observé que, par rapport à des témoins, les animaux élevés en environnement stérile, et donc exempts de microorganismes, excrètent des niveaux de cholestérol dans les selles plus faibles, ce qui a suggéré que la flore intestinale aurait une influence sur les niveaux de cholestérol sanguin (67). Des tests *in vitro* ont montré une réduction du taux de cholestérol dans un milieu de culture avec certains *Lactobacillus* (304). Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce fait, comme l'assimilation du cholestérol par les bactéries ou l'hydrolyse des sels biliaires conjugués.

Les acides biliaires, synthétisés par le foie à partir du cholestérol, sont "recyclés" et utilisés en moyenne trois fois pendant un même repas. L'hydrolyse des sels biliaires conjugués (les acides biliaires doivent être conjugués à la taurine et à la glycine pour être solubles) rend nécessaire la synthèse de sels biliaires supplémentaires, ce qui conduirait à une réduction du cholestérol (180, 224). Bien que la déconjugaison des sels biliaires peut avoir des effets bénéfiques sur l'hôte, comme la diminution des niveaux de cholestérol, une déconjugaison excessive ou une déshydroxylation des acides biliaires par certains microorganismes semble avoir plusieurs effets néfastes sur l'hôte. En effet, il a été suggéré que les sels biliaires secondaires qui en découlent (acide désoxycholique et lithocholique) endommagent l'ADN, augmentent les risques de cancer du colon et de calculs biliaires et

peuvent causer des altérations de muqueuses digestives provoquant de l'inflammation et de la diarrhée (238). En ce qui concerne la déshydroxylation des acides biliaires par les bactéries intestinales, celle-ci n'est toutefois attribuée qu'aux genres *Clostridium* et *Eubacterium* (20). Les bactéries les plus fréquemment désignée comme probiotiques, telles que les souches des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, sont incapables de déshydroxyler les sels biliaires déconjugés.

Une autre explication évoque une diminution du taux de cholestérol qui serait uniquement due à la co-précipitation du cholestérol avec les sels biliaires déconjugés, phénomène qui ne peut pas se produire *in vivo* car le pH est plus élevé que dans un milieu de culture acidifié par les BAL. Des études ont été réalisées sur des humains pour tester l'influence de la consommation de produits laitiers fermentés sur le taux de cholestérol sanguin, mais les résultats n'ont jamais été concluants (223, 281).

1.2.3. Diminution des allergies alimentaires

L'allergie alimentaire du nourrisson se traduit souvent par de l'eczéma atopique. Les traitements curatif et préventif de cette pathologie par des BAL ont été évalués lors d'une étude clinique sur 27 enfants nourris au sein et souffrant d'eczéma atopique (136). Il a été notamment observé qu'après deux mois de traitement avec une formule supplémentée en *L. rhamnosus* GG et *B. lactis* Bb12, il y a eu une amélioration plus rapide de l'état atopique en comparaison avec le groupe placebo. Un effet préventif de *L. rhamnosus* GG a aussi été observé chez des enfants à risque nés de parents atopiques (147).

Les mécanismes ainsi que les processus régulateurs de l'allergie sont loin d'être tous connus. Plusieurs mécanismes touchant à l'immunité ou à l'état de la muqueuse ont été suggérés pour expliquer l'effet protecteur des BAL (138). Celles-ci pourraient, en diminuant la perméabilité intestinale très augmentée en période de réactivité allergique, participer à la diminution du passage des protéines alimentaires (137). Elles pourraient également influencer directement les mécanismes régulateurs de la tolérance orale. Les premières données cliniques sont prometteuses, cependant, d'autres études sont nécessaires pour apporter des preuves supplémentaires quant aux effets protecteurs des BAL dans les processus allergiques et quant aux mécanismes impliqués.

1.2.4. Réduction du risque de diarrhée

Plusieurs types de diarrhées sont dus à des infections microbiennes. Des effets protecteurs de souches probiotiques contre certaines infections intestinales ont été observés sur des modèles animaux. Les mécanismes potentiellement impliqués incluent la production d'acide lactique, de peroxyde d'hydrogène, d'autres substances antimicrobiennes telles que les bactériocines, la compétition pour des nutriments ou des récepteurs d'adhésion, des actions anti-toxines et la stimulation du système immunitaire (107). Plusieurs études randomisées contrôlées sur l'homme ont montré l'efficacité des souches probiotiques pour prévenir ou atténuer les perturbations digestives liées à la prise d'antibiotiques (60, 97, 128) et les diarrhées nosocomiales infantiles dues surtout à des rotavirus (260, 278, 279). Cependant, ces effets ne sont pas universels et les probiotiques ne semblent pas efficaces en toutes circonstances.

L'une des affections les plus fréquentes, la diarrhée du voyageur, est une situation clinique le plus souvent due à un mécanisme infectieux. De nombreux produits pharmaceutiques destinés à prévenir cette pathologie existent sur le marché, comme par exemple Bion®Voyage (Merck) et Ultra-Levure® (Biocodex) (Tableau 1). Cependant, les études randomisées et contrôlées ayant été menées n'ont pas permis de démontrer un effet indiscutable d'un probiotique sur la diarrhée du voyageur, soit du fait d'une méthodologie statistique critiquable, soit du fait d'un trop grand nombre de sujets ayant abandonné l'étude (97, 188).

1.2.5. Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin.

Les formes les plus connues de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique et la pochite. De nombreux travaux ont montré que certains microorganismes de la flore endogène pouvaient jouer un rôle nocif pro-inflammatoire au cours des maladies inflammatoires du tube digestif (189). Des antibiotiques sont utilisés pour traiter la pochite et prévenir la rechute post-opératoire de la maladie de Crohn. Il a aussi été trouvé que tous les micro-organismes n'ont pas le même potentiel pro-inflammatoire car ils sont perçus différemment par les cellules intestinales ou immunitaires. Il y a des différences significatives d'influence de la flore intestinale chez des sujets sains et chez des sujets atteints de MICI. Ces constatations ont motivé les études sur les possibles effets bénéfiques des micro-organismes probiotiques dans modulation des MICI.

Des travaux ont ainsi suggéré des effets positifs des souches *Escherichia coli* Nissle 1917, *L. rhamnosus* GG, et du mélange de probiotiques VSL#3 (Tableau 1) dans la prévention des rechutes dans les cas de colites, de la pouchite ou encore de la maladie de Crohn (109, 201, 305). Néanmoins, d'autres études n'ont pas pu mettre en évidence des différences significatives entre un traitement probiotique et un placebo (135). Des études supplémentaires sont encore nécessaires en vue de l'application clinique des probiotiques dans le traitement des MICI, mais les résultats positifs obtenus sont sûrement très encourageants.

1.2.6. Prévention du cancer du côlon et autres cancers

La flore intestinale et le système immunitaire jouent un rôle dans la cancérogenèse colique, ces deux paramètres pouvant être eux-mêmes modulés par des probiotiques. Plusieurs études ont montré que certains probiotiques pouvaient diminuer l'activité d'enzymes, la concentration de mutagènes ou d'acides biliaires secondaires dans les selles, qui pourraient être impliqués dans la cancérogenèse colique (235). Les probiotiques pourraient empêcher la croissance d'autres souches qui transforment les procancérogènes en cancérogènes, réduisant ainsi la quantité de cancérogènes dans l'intestin.

Des études épidémiologiques ont montré une relation inverse entre la consommation de produits laitiers fermentés contenant des lactobacilles ou des bifidobactéries et l'incidence des cancers du colon et du poumon (26, 148, 292). Des études sur l'animal ont montré que la supplémentation de l'alimentation avec des souches spécifiques pouvait prévenir l'établissement, la croissance et la métastase des tumeurs induites chimiquement (205, 222). Deux études randomisées et contrôlées au Japon ont montré que l'administration orale de *L. casei* souche biolactis diminuait de manière significative le risque de récurrence de tumeurs superficielles de la vessie chez l'homme (12, 13).

D'un autre côté, bien qu'il n'y ait pas de preuves expérimentales directes de la suppression des cancers par la consommation de cultures probiotiques ; il existe de nombreuses preuves indirectes basées sur des études de laboratoire, ce qui ouvre des perspectives pour l'application des probiotiques dans la prévention de certains types de cancer et encouragent la recherche dans ce domaine.

Tableau 2. Effets positifs des probiotiques sur la santé humaine (effets probables ou suspectés)

Effets des probiotiques	Mécanismes d'activité proposés
Amélioration de la digestion du lactose	- Action de la β -galactosidase bactérienne dans l'intestin grêle
Diminution des allergies alimentaires	- Diminution du passage des protéines alimentaires par diminution de la perméabilité intestinale - Stimulation du système immunitaire
Réduction du risque des diarrhées	- Résistance à la colonisation par des pathogènes - Stimulation du système immunitaire
Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin	- Modulation de la flore intestinale - Stimulation du système immunitaire
Réduction du cholestérol	- Assimilation du cholestérol - Déconjugaison des sels biliaires
Prévention du cancer du côlon	- Stimulation du système immunitaire - Production de composés antimutagéniques - Modulation des enzymes fécales carcinogéniques - Dégradation de carcinogènes - Elimination des bactéries impliquées dans la production de cancérogènes

Le Tableau 2 récapitule les effets santé le plus couramment attribués aux bactéries probiotiques. La majorité des applications des souches probiotiques sont en voie de développement et beaucoup reste encore à faire. Un intérêt particulier devra être porté à la recherche de nouvelles souches plus efficaces, à la sélection des souches appropriées et des concentrations à utiliser, à la maîtrise des conditions des essais cliniques et à l'exploration des mécanismes d'action.

1.3. Sélection des probiotiques

Une grande variété de produits probiotiques a été développée et mise sur le marché ces dernières années ; cependant, les effets attribués à bon nombre de ces produits ne sont pas soutenus par une justification scientifique adéquate. Les produits de qualité médiocre doivent être dénoncés car ils discréditent les autres aux yeux des non spécialistes. Par conséquent, il est nécessaire d'établir des critères rationnels pour le criblage et la sélection des

microorganismes candidats, sans oublier d'évaluer l'efficacité des souches sélectionnées sur l'homme avec des essais cliniques contrôlés. L'élucidation des mécanismes à la base des effets santé et nutritionnels attribués aux probiotiques peut aider à associer de façon plus rationnelle ces effets aux bactéries probiotiques, et à choisir les souches ou les mélanges de souches les plus prometteurs à cet égard.

Il est généralement admis que les effets manifestés par une souche probiotique ne peuvent pas être extrapolés à une autre souche, même si elles appartiennent au même genre et à la même espèce. L'activité probiotique est donc "souche-spécifique", ce qui n'est pas surprenant si l'on considère la grande variété de résultats qui sont obtenus dans les tests *in vitro* en fonction des souches utilisées et peut être expliqué par des différences métaboliques et physiologiques entre celles-ci.

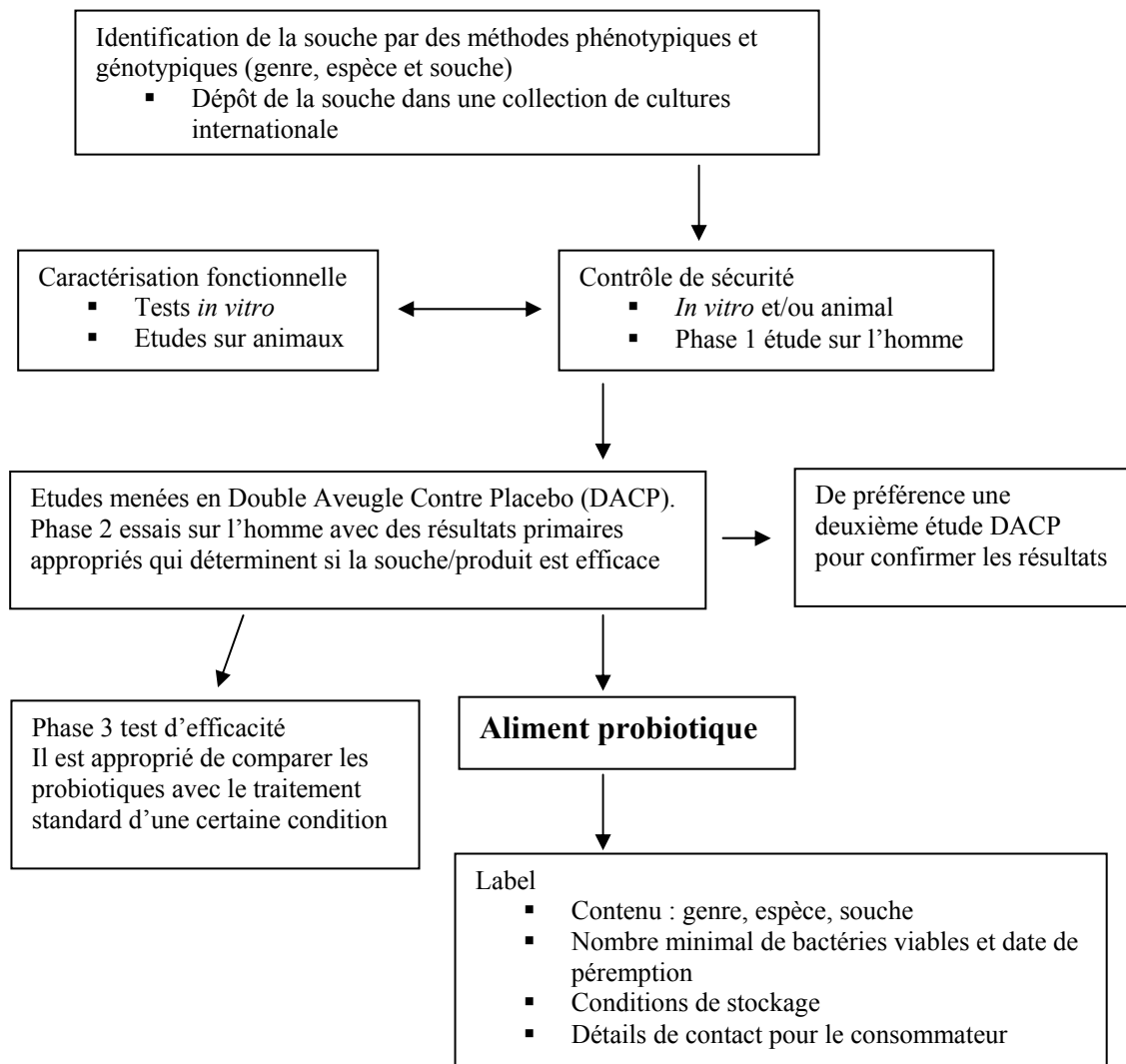


Figure 2. Lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques en vue d'une utilisation alimentaire. Source (92).

Comme cela a été évoqué dans l'introduction, c'est un comité mixte d'experts FAO/OMS qui a établi des critères et une méthodologie à utiliser pour l'évaluation des probiotiques et défini des données nécessaires à la justification des allégations santé (92). Le schéma de la Figure 2 résume les lignes directrices exposées dans le rapport rendu par ce comité. Il est ainsi recommandé de suivre celles-ci comme préalable à toute allégation concernant un produit probiotique.

Dans un premier temps, les tests *in vitro* sont critiques pour s'assurer de l'innocuité des microorganismes utilisés comme probiotiques. Dans ce sens, le comité recommande, même pour les groupes de bactéries ayant une longue histoire en terme de sécurité d'utilisation (GRAS), une certaine caractérisation des souches pour éliminer la possibilité de résistance aux antibiotiques, d'activités métaboliques nocives (production de D-lactate, déshydroxylation des sels biliaries, etc.), de production de toxines d'activité hémolytique, ou d'effets secondaires particuliers.

Tableau 3. Principaux critères utilisés pour la sélection des souches probiotiques (92).

Critères de sécurité	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Historique de non pathogénicité (GRAS) ▪ Souche d'origine humaine ou alimentaire ▪ Souche caractérisée par des méthodes phénotypiques et génotypiques ▪ Souche déposée dans une collection de cultures internationale ▪ Aucune possibilité de transmission de gènes de résistance aux antibiotiques ▪ Pas de déshydroxylation des sels biliaries
Critères fonctionnels	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tolérance à l'acidité gastrique ▪ Tolérance à la bile ▪ Antagonisme vis-à-vis des pathogènes et production de substances antimicrobiennes (bactériocines) ▪ Adhésion à diverses lignées de cellules intestinales et/ou au mucus ▪ Stimulation du système immunitaire
Critères technologiques	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini ▪ Conservation des propriétés probiotiques après production.

En plus d'assurer l'absence totale de toxicité ou de pathogénicité de la souche, et afin de satisfaire à la définition des probiotiques, les microorganismes doivent survivre, persister temporairement dans le tractus digestif et montrer une activité qui doit se traduire par des effets positifs pour l'hôte. Les microorganismes potentiellement probiotiques doivent donc être sélectionnés selon différents critères qui sont décrits dans le Tableau 3. Ces critères de

sélection, ainsi que les tests *in vitro* utilisés se réfèrent souvent à des propriétés bactériennes, telles que l'adhésion, la résistance aux conditions gastriques et la production de bactériocines, et plus rarement à des effets probiotiques proprement dits. Ces derniers sont en effet plus difficiles à mesurer et il n'existe pas de tests *in vitro* établis capables de les déterminer de manière fiable.

2

Caractéristiques des probiotiques : la production de bactériocines

Les bactéries utilisées pour des applications probiotiques aident à maintenir et/ou rétablir la flore microbienne naturelle de l'hôte. La capacité de ces bactéries d'exclure de manière compétitive les espèces indésirables est certainement accrue par la production de toxines antimicrobiennes. Parmi ces dernières, les plus souvent rencontrées sont les bactériocines, une grande famille de peptides antimicrobiens, fonctionnellement très diverse et que l'on retrouve chez les principales espèces bactériennes. L'utilisation potentielle des souches productrices de bactériocines comme probiotiques et agents bioprotecteurs a bénéficié récemment d'un intérêt croissant (108). Elles peuvent cibler spécifiquement certaines souches ou espèces et sont donc particulièrement attractives quand l'objectif de l'application du probiotique est d'éliminer ou d'empêcher l'installation d'un pathogène spécifique, de façon à ne pas altérer de façon significative la flore microbienne endogène de l'hôte.

2.1. Biologie des bactériocines

Les bactériocines ont été identifiées pour la première fois il y a presque un siècle, comme des molécules sensibles à la chaleur, présents dans les cultures d'*E. coli* V et toxique pour *E. coli* S. Ces molécules ont été appelées colicines, en référence à l'espèce productrice. Frederiq a montré que les colicines étaient des protéines et qu'elles avaient une activité limitée dépendante de la présence de récepteurs spécifiques sur la membrane des souches sensibles (99). Depuis ce temps, les bactériocines ont été trouvées dans les principaux lignages bactériens. Klaenhammer estime que 99% des bactéries pourraient produire au moins une bactériocine (157). En pratique, les proportions détectées sont généralement bien inférieures, ce qui peut être attribué au fait que l'activité des bactériocines concerne en général une gamme étroite de bactéries et est spécifique à la souche. Elle peut ainsi passer inaperçue si elle est testée sur un nombre faible de souches cible.

Ce spectre d'activité bactéricide spécifique distingue les bactériocines des BAL des antibiotiques classiques. L'activité de ces bactériocines est en effet souvent limitée à des espèces proches de la souche productrice, bien que certaines bactériocines identifiées contredisent cette définition en montrant un spectre d'activité plus large incluant des bactéries pathogènes et/ou d'altération alimentaire. D'autres éléments de différenciation avec les antibiotiques concernent la nature protéique des bactériocines et leur synthèse ribosomique. La famille des bactériocines est très diverse en ce qui concerne la taille, le mode d'action, le mode de libération, le système de régulation de la production ou encore le mécanisme d'immunité du producteur. Elle peut être divisée en deux groupes principaux : les bactériocines produites par les bactéries Gram-positives et celles produites par les bactéries Gram-négatives.

2.1.1. Les bactériocines des bactéries Gram-négatives

Les études réalisées sur *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter cloacae*, montrent des niveaux de production de bactériocines allant du 3 au 26% des isolats environnementaux (111, 242). Des bactériocines sont retrouvées chez 30-50% des souches d'*E. coli* d'origine humaine (243) et chez 90% des souches de *Pseudomonas*, tant d'origine humaine qu'environnementale (198). Contrairement aux bactériocines produites par des souches Gram-positives, les bactériocines produites par des souches Gram-négatives ont des spectres d'activité larges incluant même des genres taxonomiquement très éloignés de la souche productrice.

Depuis leur découverte, les colicines d'*E. coli* ont été les bactériocines les plus étudiées et elles servent aujourd'hui comme système modèle pour l'investigation des relations structure/fonction, de l'organisation génétique, de l'écologie et de l'évolution des bactériocines (38). Les colicines sont des protéines avec une masse moléculaire élevée qui tuent les cellules sensibles par perméabilisation de la membrane ou par dégradation des acides nucléiques (30, 244).

Les souches d'*E. coli* produisent aussi un deuxième type de bactériocines, connues sous le nom de microcines, qui sont plus petites que les colicines et qui ont plus de caractéristiques communes avec les bactériocines des bactéries Gram-positives, dont la thermostabilité, la résistance à certaines protéases, une relative hydrophobicité et la résistance

aux pH extrêmes (15, 228). Certaines microcines sont actives sans aucune modification, tandis que d'autres sont profondément modifiées par des enzymes de maturation dédiées.

2.1.2. Les bactériocines des bactéries Gram-positives

Aujourd'hui, les bactériocines des bactéries Gram-positives répertoriées dans la littérature sont plus nombreuses que celles des bactéries Gram-négatives, sans doute parce qu'elles ont été plus recherchées. Ce sont des peptides bactéricides généralement d'une taille inférieure à 10 kDa, cationiques, amphiphiles, et agissent en perméabilisant la membrane des cellules cibles (212). Parmi ces bactériocines, celles produites par les BAL ont reçu un intérêt particulier en raison des possibilités qu'elles offrent d'applications potentielles comme conservateurs naturels dans l'industrie alimentaire (88). En raison de cet intérêt, le nombre de molécules décrites chez les BAL a augmenté de façon exponentielle au cours des vingt dernières années et des souches productrices ont été découvertes chez tous les genres de ce groupe. En plus de l'acidification, la production de bactériocines jouerait en effet un rôle important dans la capacité des BAL à conserver les aliments suite à une fermentation lactique. Cette capacité est exploitée depuis longtemps par l'homme de façon consciente ou non.

2.1.2.1. Classification des bactériocines des BAL

En 1993, Klaenhammer a essayé de mettre un peu d'ordre dans la classification des bactériocines des BAL en proposant quatre classes basées sur des caractéristiques communes observées, principalement structurales (158) :

- La Classe I avec des bactériocines de type lantibiotiques qui sont de petits peptides (<5kDa) avec une structure modifiée contenant des acides aminés inhabituels comme la lanthionine (Lan), la β -methyllanthionine (MeLan) et des acides aminés déshydratés.
- La Classe II est formée de petits peptides (<10kDa), résistants à la chaleur, qui ne contiennent pas d'acides aminés modifiés et qui présentent comme unique modification post-traductionnelle possible des ponts disulfure.
- La Classe III avec de grandes protéines (>30kDa) sensibles à la chaleur.

- Une quatrième classe a été suggérée pour les bactériocines complexes pouvant inclure des entités non protéiques, bien que de telles structures n'aient pas encore été identifiées précisément. Les modifications de la classification de Klaenhammer réalisées ultérieurement (212, 289) ont supprimé cette classe du système de classification.

La grande majorité de bactériocines isolées font partie des classes I et II. Les lantibiotiques, formant la classe I, sont un groupe complexe de peptides synthétisés au niveau des ribosomes comme prépeptides consistant en une séquence leader N-terminale, qui est éliminée pendant la maturation, et en une région propeptide C-terminale. Des modifications post-traductionnelles de la région propeptide ont lieu et incluent la déshydratation de résidus spécifiques sérine et/ou thréonine résultant en des acides 2,3-déhydroaminés et l'addition de groupes thiol, provenant de résidus cystéine, aux doubles liaisons de quelques uns de ces acides aminés (255). Ceci donne lieu à des résidus acides aminés inhabituels, tels que la Lan et la MeLan qui forment des anneaux thioéther intramoléculaires, et quelques résidus déshydratés, tels que les acides aminés α , β -insaturés déhydroalanine (Dha) et déhydrobutyrine (Dhb) (132). La Lan et la MeLan forment des structures polycycliques uniques, caractéristiques des lantibiotiques (Figure 3). Ces derniers ont en général un spectre d'activité plus large que celui des bactériocines non modifiées (145) et jusqu'à ce jour ils n'ont été identifiés que chez les bactéries Gram-positives. La structure des lantibiotiques varie essentiellement en fonction de la localisation de ponts établis entre les acides aminés modifiés, ce qui permet de distinguer les types A (lantibiotiques linéaires) et B (lantibiotiques globulaires).

Le type A rassemble les lantibiotiques linéaires et cationiques structurés en hélice α amphiphile et de masse moléculaire inférieure à 4 kDa. Ces bactériocines sont principalement synthétisées par les genres *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* et également par des genres n'appartenant pas aux BAL comme *Staphylococcus* ou *Bacillus*. Le membre le plus étudié de cette classe est sans doute la nisine (Figure 3), le seul peptide anti-bactérien à être autorisé comme additif alimentaire (73). Les nisines (six variants naturels de ce lantibiotique identifiés) ont un mode d'action double qui implique le lipide II (voir 2.1.2.3.) (181).

Les lantibiotiques de type B sont des peptides de 1,8 à 2,1 kDa, adoptant une structure globulaire plus rigide que celle des peptides de type A et ayant une charge globalement nulle ou négative. Ces molécules agissent en inhibant certaines enzymes comme celles intervenant dans la biosynthèse de la paroi cellulaire. Cette sous-classe de lantibiotiques regroupe les

duramycines et leurs variants naturels, la mersacidine (Figure 3), l'actagardine et la mutacine A (193, 255).

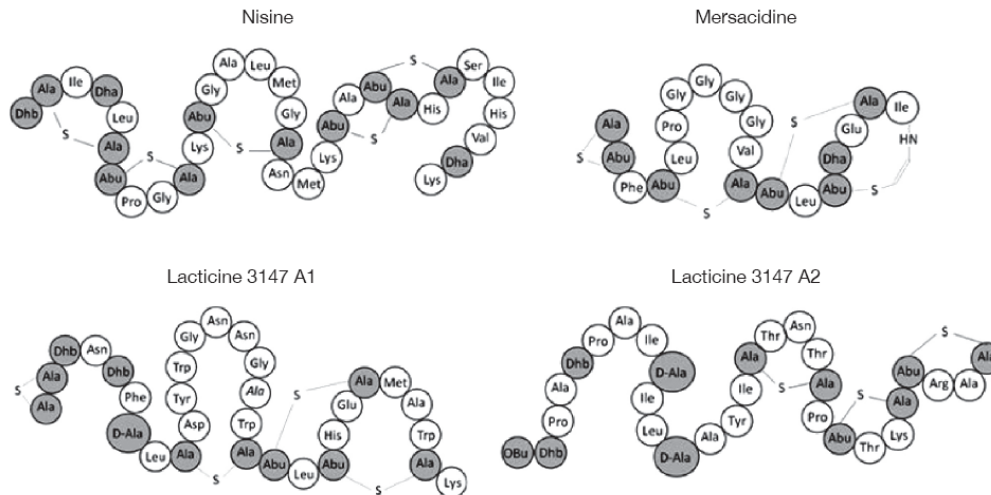


Figure 3. Séquence et structure de lantibiotiques de type A (Nisine), B (Mersacidine) et d'un lantibiotique à deux peptides (Lacticine). Source (79).

La classe II est constituée de petites bactériocines (< 10 kDa) thermostables n'incluant pas d'acides aminés modifiés et généralement actives à des concentrations nanomolaires par perméabilisation de la membrane de la bactérie cible. Cette classe de bactériocines est la plus large et la plus diversifiée, ce qui a conduit à sa subdivision. Plusieurs groupements ont été proposés (74, 212, 289), mais la nature très hétérogène de ce groupe de bactériocines rend difficile une classification rationnelle et définitive. Deux sous-classes sont toutefois communes à la plupart des schémas proposés : la sous-classe IIa, formée par des bactériocines de type pédiocine très actives contre *Listeria*, et la sous-classe IIb, formée par des bactériocines nécessitant l'action complémentaire de deux peptides pour être complètement actives.

Les bactériocines de la sous-classe IIa sont des peptides ayant une structure similaire à celle de la pédiocine PA-1, qui fut la première bactériocine de ce groupe à être décrite. Elles ont un spectre d'activité étroit, et une action particulièrement importante contre le pathogène alimentaire *Listeria monocytogenes*. Ces bactériocines ont une taille entre 37 et 48 acides aminés et possèdent un ou deux ponts disulfure. Le trait caractéristique de cette sous-classe est le motif conservé appelé "pediocin box" qui consiste en une région N-terminale cationique et hydrophile avec une séquence YGNGVxCxxxxCxV (90). Ce motif est supposé faciliter l'union avec la surface de la cellule cible (95, 149). Le domaine C-terminal, placé après la région articulée (acide aminé en position 17, indiqué en bleu sur la Figure 4), est

moins conservé et l'on pense qu'il est responsable de la spécificité de l'activité vis-à-vis de bactéries autres que du genre *Listeria* (143). Avec l'apparition de nouvelles structures, il s'est avéré que plusieurs sous-groupes peuvent être définis en se basant sur des similarités structurales dans la partie C-terminale (90). Les similarités structurales entre les bactériocines de la sous-classe IIa sont montrées dans la Figure 4.

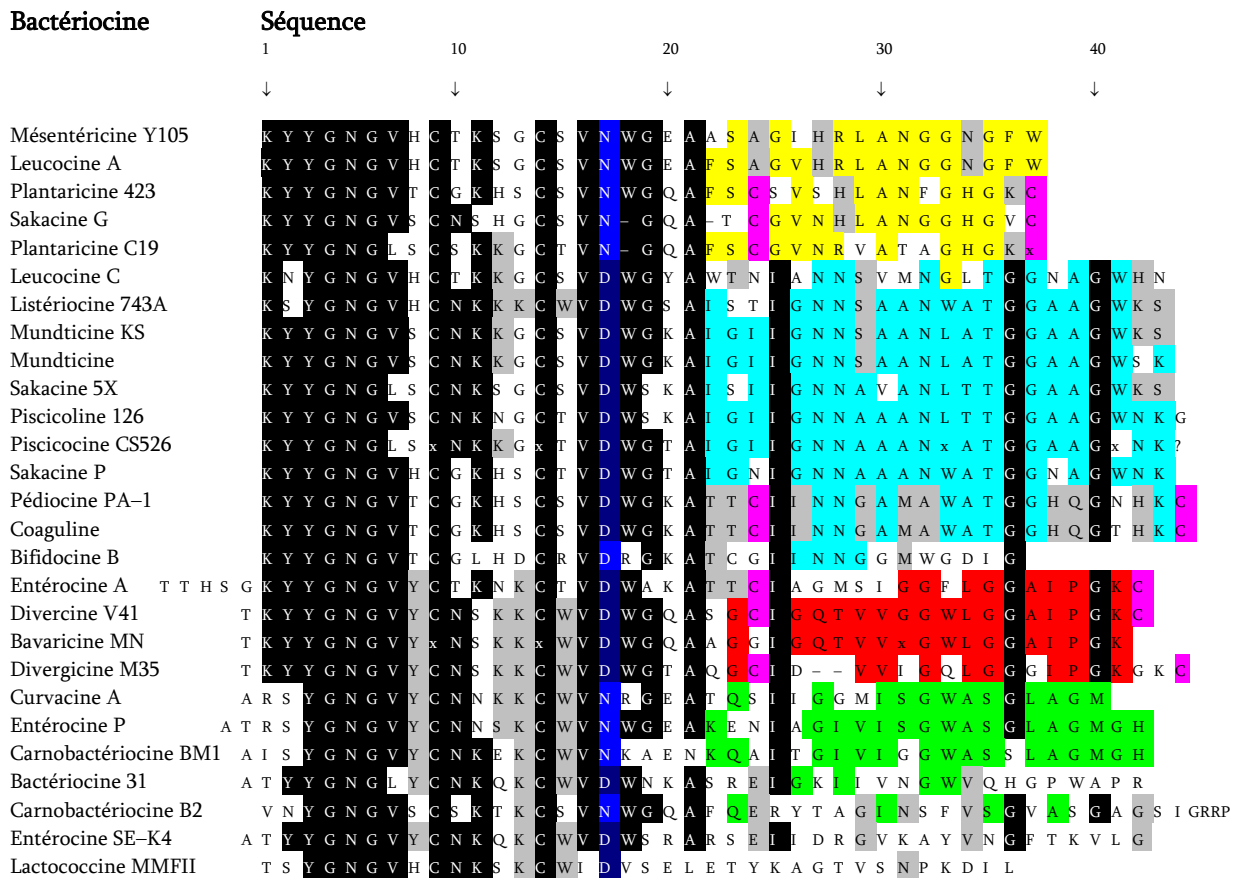


Figure 4. Bactériocines de la sous-classe IIa. Les résidus surlignés en noir sont conservés dans les parties N-ter et C-ter d'au moins une majorité (14) de peptides. Les résidus en gris sont moins bien conservés. Les résidus Asp et Asn en position 17 constitueraient une partie flexible séparant la partie N-ter en feuillet β et la partie C-ter majoritairement en hélice α . Les résidus en jaune, bleu ciel, rouge et vert délimitent 4 sous-groupes basés sur des différences de séquences C-ter. Les Cys en rose sont impliquées dans un 2^{ème} pont disulfure : côté C-ter. Les résidus x ne sont pas identifiés. Numéros à partir du deuxième acide aminé du côté N-ter du motif YGNGV/L. Source (90)

La sous-classe IIb regroupe les bactériocines à deux peptides (Tableau 4) (104). L'activité optimale dépend de l'action conjuguée des deux peptides et est aussi due à la formation de pores dans la membrane de la cible. Ces peptides peuvent être individuellement actifs, mais avec une activité synergique faisant que l'activité du mélange des deux bactériocines est supérieure à la somme des activités de chaque bactériocine, ou inactifs avec une activité subordonnée à l'association des deux peptides.

Tableau 4. Quelques bactériocines non modifiées à deux peptides : sous-classe IIb. Source (104)

Bactériocine	Séquence d'acides aminés	Souches productrices
Entéroccine 1071	A : ESVFSKIGNAVGPAAYWILKGLGNMSDVTQADRINRKNH B : GPGKWLPLQPAYDFVTGLFAKGIGKEGNKNKWKN	<i>Enterococcus faecalis</i> BFE 1071
Entéroccine L50	A : MGAIAKLVAKFGWPIVKKYYKQIMQFIGEGWAINKIIEWIKKHI B : MGAIAKLVTKFGWPLIKKFYKQIMQFIGQGWITDQIEKWLRH	<i>Enterococcus faecium</i> L50
Lactococcine G	α : GTWDDIGQGIGRVAYWVGKAMGNMSDVNQASRINRKKKH β : KKWGWLAWVDPAYEFIKGNIGKGAIKEGNKDKWKN	<i>Lactococcus lactis</i> LMG 2081
Plantaricine EF	PlnE : FNRGGYNFGKSVRHVVDAIGSVAGIRGILKSIR PlnF : VFHAYSARGVRNNYKSAVGPADWVISA VRGFIHG	<i>Lactobacillus plantarum</i> C-11
Lactocine 705	705 α : MD-NLNK-FKKLSDNKLQATIGG 705 β : MESNKLEKFANISNKDLNKITGG	<i>Lactobacillus casei</i> CRL 505
Plantaricine JK	PlnJ : GAWKNFWSSLRKGFDGEAGRAIRR PlnK : RRSRKNIGIGYAIGYAFGAVERAVLGGSRDYNK	<i>Lactobacillus plantarum</i> C-11

La sous-classe IIc était initialement réservée par Klaenhammer aux bactériocines activées par réduction des groupements thiol (159). Cependant, il a été depuis montré que la réduction d'un groupement thiol n'était pas indispensable à l'activité antibactérienne de ces bactériocines (294). Il a été par la suite proposé d'inclure dans cette sous-classe les bactériocines de classe II dont l'export est sous la dépendance du système général de sécrétion (bactériocines *sec*-dépendantes), les autres bactériocines de classe II étant sécrétées par des systèmes spécifiques. Cependant, des bactériocines *sec*-dépendantes de la sous-classe IIa ont depuis été décrites, comme l'entéroccine P (45), ce qui remet fortement en question la pertinence de cette sous-classe. Aujourd'hui, la sous-classe IIc sert à regrouper toutes les bactériocines qui ne peuvent pas être incluses dans les autres sous-classes décrites (98).

2.1.2.2. Biosynthèse des bactériocines

La comparaison des clusters génétiques de plusieurs bactériocines révèle un certain nombre de gènes conservés codant pour des protéines avec des fonctionnalités similaires. Ces clusters constituent en effet des opérons qui peuvent être portés par un chromosome, par un plasmide ou par des transposons. L'organisation du locus impliqué dans la production d'une bactériocine consiste au minimum en un gène de structure, généralement co-transcrit avec son gène d'immunité qui protège le producteur des effets de la bactériocine. Habituellement, un autre groupe de gènes comporte les éléments nécessaires au transport dédié et parfois un

troisième locus correspond à un système de régulation qui permet l'induction de la production de la bactériocine (207). Dans le cas des lantibiotiques on trouve aussi les gènes codant pour les enzymes responsables des modifications post-traductionnelles.

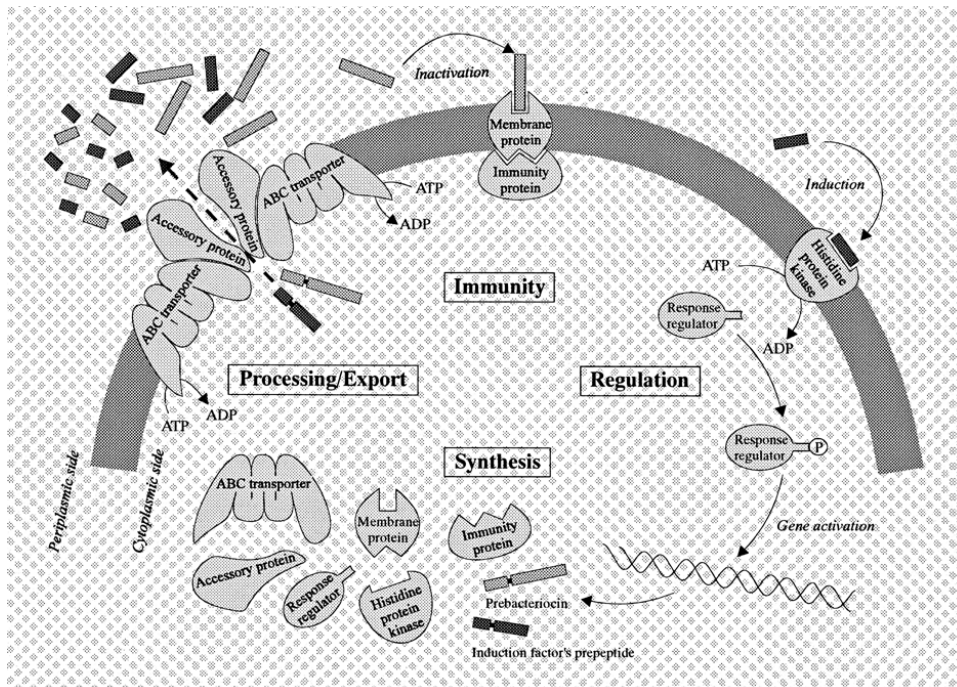


Figure 5. Vue schématique d'un possible système de production d'une bactériocine : système de régulation à trois composants, synthèse, maturation et immunité. Source (90)

Les bactériocines des BAL sont souvent synthétisées sous forme d'une prébactériocine, sorte de prépeptide inactif dont l'extension N-terminale, ou peptide leader, est clivée pour libérer la bactériocine au cours de l'étape de maturation (Figure 5). Le peptide leader maintient vraisemblablement la bactériocine sous une forme inactive à l'intérieur de la cellule productrice pour la protéger de l'action de sa bactériocine et il facilite l'interaction avec la (ou les) protéine(s) dont la fonction est de cliver le prébactériocine, de modifier ou de transférer la bactériocine à travers la membrane bactérienne. La maturation de la bactériocine se déroule pendant ou immédiatement après sa sécrétion, moment où le peptide leader est clivé qu'il s'agisse d'un système de transport dédié, ou, moins fréquemment, du système général de sécrétion (*sec*) de la cellule.

La structure du peptide leader est déterminante dans le type de mécanisme de transport emprunté par la prébactériocine (207). En effet, de la même façon que pour les bactériocines, des classes structurales de peptides leaders existent, celles-ci étant étroitement liées au mode de transport :

1. Les peptides leaders avec un motif commun « YNDLV » sont rencontrés chez certains lantibiotiques, comme par exemple la nisine. Ils sont généralement hydrophiles et possèdent une assez forte proportion de résidus chargés. Dans ce cas, les bactériocines sont exportées grâce à un transporteur de type *ATP binding cassette* ou ABC (121, 193). Il s'agit de transporteurs membranaires spécifiques qui utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour exporter le substrat contre le gradient de concentration. La partie leader est ensuite éliminée par une peptidase extracellulaire spécifiquement exprimée par la bactérie.

2. Les peptides leaders de type *double glycine* possèdent généralement une charge nette négative et se caractérisent par un site de clivage de séquence GG (parfois GA ou GS). Ce type de peptides leaders est commun à certains lantibiotiques et aux bactériocines de classe II en général. Les transporteurs ABC des bactériocines avec un leader de type GG ont une extension N-terminale cytoplasmique d'environ 150 résidus avec activité protéase qui réalise le clivage du peptide leader au cours de leur sécrétion par la protéine de transport. La prébactériocine se fixe à la partie protéolytique du transporteur ABC et l'hydrolyse de l'ATP induit alors un changement conformationnel entraînant le processus de clivage du peptide leader accompagné de la sécrétion de la bactériocine mature (121).

3. Certaines bactériocines de la classe II, comme l'entéroisine P (126), ont des peptides leaders qui n'ont ni le motif « YNDLV » ni le motif « GG ». Généralement les peptides de ce type n'ont pas de système de transport dédié et sont exportés par la voie *sec*-dépendante, en utilisant le système général de sécrétion de la cellule (139).

4. Finalement, il existe une minorité de bactériocines, parmi lesquelles se trouvent les entéroisines L50A et L50B, qui sont synthétisées sans peptide leader. Le mécanisme de transport de ces bactériocines vers l'extérieur de la cellule reste inconnu.

Tous les producteurs de bactériocines possèdent un système immunitaire qui les protège de l'effet délétère de leur bactériocine. Il s'agit d'une caractéristique qui distingue les bactériocines des antibiotiques. La protection de la souche productrice est assurée à la fois par une protéine d'immunité spécifique (225, 275) et par le transporteur de type ABC qui permet à la bactériocine de n'être active qu'une fois sortie de la cellule (216, 245). Selon les cas, les bactéries productrices utilisent l'un ou l'autre de ces deux systèmes d'immunité ou les deux en même temps (75, 80). Ces mécanismes d'immunité sont très spécifiques et normalement ne protègent pas contre d'autres bactériocines, même s'il y a quelques exceptions.

L'expression des bactériocines est régulée par des systèmes spécifiques. Il a été établi que dans la plupart des cas, la production des bactériocines est contrôlée par un mécanisme appelé *quorum sensing* ou détection du quorum, par lequel l'expression des bactériocines repose sur la production de peptides phéromones ou facteurs d'induction (161). Dans le cas de la nisine par exemple, le peptide lui-même fonctionne comme une phéromone qui induit sa propre production, qui est donc fonction de la quantité de nisine présente dans le milieu extérieur et indirectement de la phase de croissance de la bactérie productrice (160). Plus fréquemment, le système de régulation repose sur la présence de peptides spécifiques produits sous la forme de prépeptides qui sont maturés et sécrétés par le même système qui permet à la bactériocine du même locus d'être sécrétée. La transduction du signal passe par un système à deux composants, une histidine kinase et un régulateur de réponse. A cause de ce système de régulation, les facteurs environnementaux, comme les variations de pH et de température, peuvent jouer un rôle important dans les niveaux de production des bactériocines (58).

2.1.2.3. Mode d'action

Le mode d'action le plus connu et le plus répandu chez les bactériocines des BAL implique une action visant la fonction de barrière de la membrane, mais il existe des exceptions à ce mode général. Les bactériocines de la classe II représentent le cas typique de bactériocines agissant sur la membrane cytoplasmique des cellules sensibles en dissipant la force proton motrice (PMF) par la formation de petits pores membranaires. Ceci est précédé par une interaction des résidus chargés positivement et des régions hydrophobes de structure hélicoïdale de la bactériocine avec les membranes cytoplasmiques, caractérisées par un potentiel transmembranaire élevé et des phospholipides chargés négativement (42). Deux étapes peuvent en réalité être distinguées : d'abord, les molécules de bactériocine se fixent à la surface de la membrane et quand la concentration locale est élevée, l'orientation des molécules change et elles sont insérées dans la membrane causant la déstabilisation de la structure de la bicouche et la formation de pores (Figure 6). Ceci résulte en un flux d'ions, d'acides aminés et d'ATP vers l'extérieur de la cellule et en la dissipation de la PMF, avec comme conséquence la mort de la cellule par annulation de toutes les réactions énergie-dépendantes. A concentrations proches de la concentration minimale inhibitrice, les bactériocines tuent les bactéries beaucoup plus rapidement que les antibiotiques conventionnels (42).

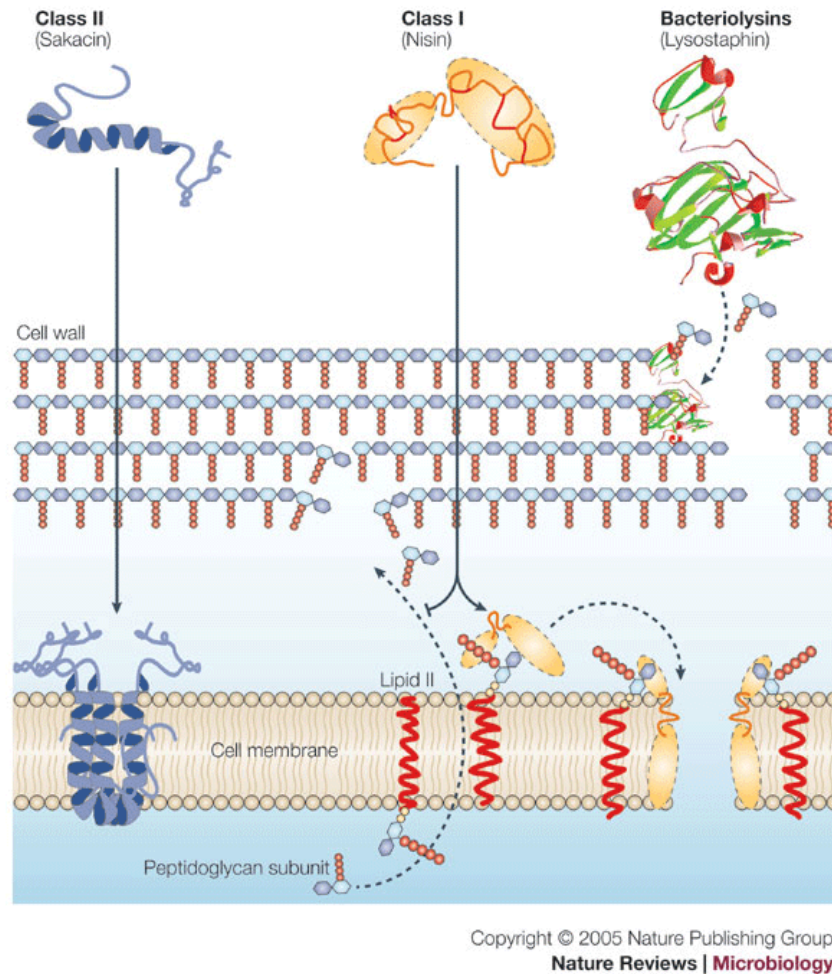


Figure 6. Mode d'action des bactériocines des bactéries lactiques. Source (58)

D'un autre côté, certains lantibiotiques, comme par exemple la nisine, montrent un mode d'action double : d'une part elles s'attachent au lipide II, le principal transporteur des unités de peptidoglycane du cytoplasme à la paroi cellulaire, ce qui empêche la synthèse correcte de la paroi cellulaire, causant la mort de la cellule ; d'autre part elles utilisent le lipide II comme point d'ancrage pour initier le processus d'insertion dans la membrane et la formation de pores provoquant la mort rapide de la cellule. Les bactériocines à deux peptides, comme par exemple la lacticine 3147, peuvent avoir cette activité double partagée entre les deux peptides (31, 33, 300). Une exception au mode d'action membranaire est représentée par les bactériocines de la classe III (bacteriolysines), telles que la lysostaphine, dont l'action bactéricide consiste à cliver la partie peptidique du peptidoglycane des cellules cibles (Figure 6) (213).

2.2. Ecologie des bactériocines

La fonction naturelle des bactériocines est encore mal connue, ce qui est certain cependant c'est que la capacité d'une souche bactérienne à synthétiser une ou plusieurs bactériocines est une caractéristique fortement avantageuse. Cette caractéristique est en effet liée au pouvoir de survie et de prolifération d'un microorganisme par l'élimination des bactéries concurrentes dans une niche écologique où la concurrence peut être intense, étant donnée la diversité des espèces présentes et la compétition pour les nutriments (83). Comme cela a été noté par Riley (241), l'observation des bactéries productrices de bactériocines dans des milieux naturels aussi divers que les produits alimentaires fermentés d'origine végétale ou animale, l'environnement ou la cavité buccale montre que ces bactéries possèdent un avantage par rapport aux bactéries qui leur sont sensibles présentes dans ces mêmes milieux. Il a même été constaté que la présence d'autres microorganismes, avec éventuellement une surpopulation et un épuisement de nutriments, crée des conditions stressantes susceptibles de provoquer la production de quantités plus importantes de bactériocines par les souches bactériocinogènes (241).

Les bactériocines jouent en fait un rôle fondamental dans la dynamique des populations bactériennes, même si les interactions de ces molécules avec des populations mixtes, comme dans des biofilms, sont tellement complexes qu'elles sont loin d'être entièrement élucidées. Des modèles mathématiques ont par ailleurs été conçus pour évaluer l'interaction entre les producteurs de bactériocines et les souches sensibles. La plupart de ceux-ci toutefois ne concernent pas les bactériocines des BAL, mais les colicines (bactériocines produites par *E. coli* et actives habituellement contre d'autres souches d'*E. coli* et des entérobactériacées très proches).

2.3. La dualité du rôle des bactériocines

Les bactériocines des BAL sont actives contre des bactéries Gram-positives, phylogénétiquement proches des souches productrices. Un très grand nombre d'entre elles ont une action anti-*Listeria* qui les a rendues très intéressantes pour des applications alimentaires. Dans un premier temps, la recherche sur les bactériocines s'est focalisée sur leur utilisation comme conservateurs « naturels » dans les aliments et leur application dans l'industrie alimentaire s'est largement développée.

La consommation de bactériocines à travers les aliments était considérée sans risque particulier étant donné qu'elles pouvaient être facilement hydrolysées par les protéases gastriques ou pancréatiques. Toutefois, l'intensification de la recherche sur les bactériocines dans les années 90 et 2000 a révélé que la production des bactériocines n'était pas exceptionnelle parmi les BAL ; bien au contraire. Lorsqu'on considère les sources d'où ont été isolées la grande majorité des souches produisant des bactériocines, à savoir des produits alimentaires, ainsi que la fréquence (34% des produits testés) de détection de souches bactériocinogènes dans ces produits (152), il est évident que les bactériocines sont consommées depuis des siècles, sans que la santé des consommateurs n'en soit visiblement incommodée.

Il est donc devenu admis que les BAL productrices de bactériocines ayant survécu au passage gastrique et s'étant installées au niveau du tractus intestinal, puissent produire leurs bactériocines *in situ*. L'idée de la présence de bactériocines dans le corps humain n'était plus aussi effrayante et l'on a commencé à s'intéresser aux conséquences de cette présence et aux avantages éventuels que l'organisme humain ou animal pourrait en tirer. Comme il a été signalé précédemment, la production de bactériocines était même devenue une des caractéristiques recherchées lors de la sélection des bactéries d'intérêt probiotique. Des bactéries bactériocinogènes ont en effet montré des propriétés intéressantes pour la santé, comme le potentiel pour combattre les pathogènes gastrointestinaux, tels que *Helicobacter pylori*, *E. coli* et *Salmonella* spp.

La Figure 7 présente un schéma qui regroupe les applications potentielles des bactériocines et des souches productrices (71). Ces applications sont diverses et peuvent aller de la sécurité alimentaire (en utilisant les bactériocines comme additif ou les souches productrices comme *starters* ou comme cultures associées), à la santé du tractus gastro-intestinal (à travers l'utilisation de souches probiotiques productrices de bactériocines). Cependant, bien que l'utilisation des bactériocines dans la médecine a été envisagée, cet aspect ne s'est pas encore vraiment développé (71).

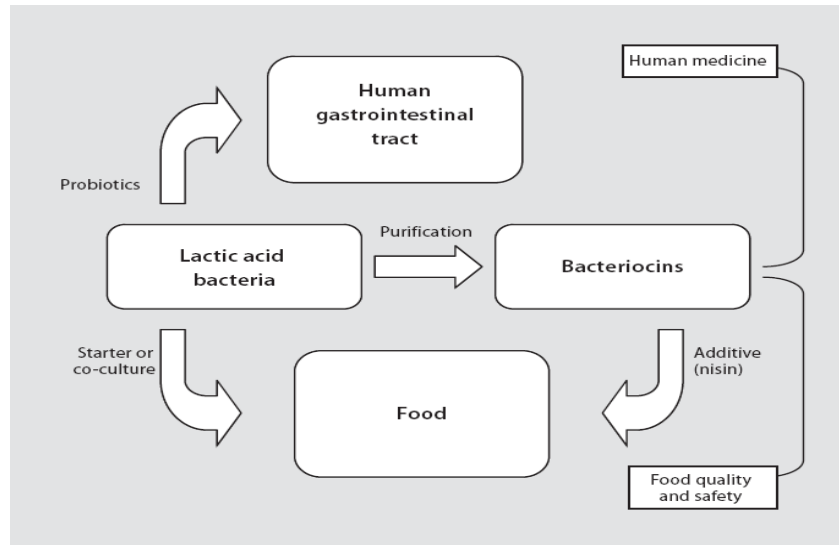


Figure 7. Vue d'ensemble des applications potentielles des bactériocines. Source (71)

2.3.1. Applications des bactériocines dans les aliments

L'une des principales préoccupations des consommateurs concerne les effets éventuellement défavorables sur la santé de la présence des additifs "chimiques" dans les aliments. En conséquence, ils sont de plus en plus attirés par les aliments "naturels", sans conservateurs chimiques ajoutés. Ce souhait des consommateurs et l'intérêt qu'a l'industriel de minimiser le nombre et l'intensité des procédés appliqués, notamment les traitements thermiques, tout en garantissant des durées de conservation longues, ont stimulé les recherches visant à découvrir et développer des conservateurs naturels et efficaces. Les bactériocines produites par les BAL ont un tel profil.

Les bactériocines peuvent être employées directement comme additifs et leur utilisation raisonnée permet sans aucun doute d'améliorer la sécurité microbiologique et la qualité des aliments. La nisine par exemple, produite et commercialisée sous une forme partiellement purifiée, est utilisée comme conservateur depuis plus de 40 ans (287). Une préparation commerciale de la pédiocine PA-1, bien que non autorisée comme additif, est disponible sur le marché (247). Malgré la variété de bactériocines connues à ce jour, la nisine reste la seule ayant reçu l'agrément de nombreux pays pour son utilisation comme additif alimentaire (287).

L'approbation de la nisine est basée sur des données de sécurité (publiées et non publiées). Des études de toxicité aiguë, subchronique et chronique, ainsi que de reproduction,

de sensibilisation *in vitro* et de résistance croisée, ont montré que la nisine est sûre pour la consommation à une dose acceptable de 2,9 mg/personne/jour (288). Puisque les bactériocines sont ingérées, des études sur leur devenir dans le tractus gastro-intestinal ont aussi été réalisées. Dans le cas de la nisine, il a été montré qu'elle est inactivée par la trypsine pancréatique et qu'elle n'avait aucun effet sur la microflore bénéfique (119). Ce qui est vrai pour la nisine l'est aussi pour un grand nombre d'autres bactériocines dont l'utilisation n'est autorisée qu'à travers les souches productrices. Cependant, à ce jour, aucune autre bactériocine n'a été autorisée comme additif alimentaire.

Comme alternative, les bactériocines peuvent également être produites directement dans les aliments à la suite de l'utilisation du producteur comme culture *starter* ou comme co-culture (175). Plusieurs études ont en effet montré que des cultures *starter* ou des co-cultures de BAL sont capables de produire leurs bactériocines dans les matrices alimentaires, et par conséquent de montrer une activité inhibitrice contre des bactéries pathogènes ou d'altération (175). Parce que les BAL ont été utilisées pendant des siècles dans les fermentations alimentaires, elles bénéficient du statut GRAS attribué par la FDA. En Europe également, leur utilisation dans les aliments n'est à ce jour soumise à aucune autorisation réglementaire (204). L'application des cultures productrices de bactériocines peut donc être utilisée afin d'éliminer ou empêcher la croissance de bactéries indésirables dans les aliments, que ce soit pour augmenter la sécurité alimentaire et prolonger la durée de conservation des produits ou pour établir une population microbienne désirée dans un processus fermentaire.

Finalement, certaines des limitations principales à l'application des bactériocines dans les aliments tiennent à leurs spectres d'activité relativement étroits, notamment l'absence d'activité contre les bactéries Gram-négatives, ainsi qu'à des effets antibactériens modérés dans la matrice alimentaire. C'est pour cela qu'afin d'assurer une qualité et une sécurité microbiologiques adéquates, l'application des bactériocines aux aliments ne peut être conçue que dans le cadre d'un concept de barrières. En effet, l'utilisation combinée des bactériocines et de différents autres traitements, thermiques ou non, permet en général de réduire l'intensité de chacun de ces traitements utilisés individuellement, tout en garantissant la maîtrise du développement microbien et des réactions de dégradation.

2.3.2. L'application probiotique des bactériocines

Tableau 5. Bactériocines produites par des bactéries probiotiques. Source (108)

Bactériocine	Souche productrice	Souche(s) inhibée(s)	Potentiel probiotique	Réf.
Gram-positives : bactériocines de la classe I				
ABP-118	<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	<i>Listeria monocytogenes</i>	Prévention des infections gastriques (modèle animal : souris)	(57)
Bovamine™	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	Prévention des infections du colon chez le bétail	(27, 28)
Lacticine B	<i>L. acidophilus</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>	Contention des infections chez les limandes japonaises	(280)
Bacillocine 22	<i>Bacillus subtilis</i>			
Butyricine 7423	<i>Clostridium butyricum</i>			
Salivaricine	<i>Streptococcus salivarius</i> K12	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Traitement de l'infection de gorge chez l'homme	(76, 298)
Salivaricine A & B		<i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Streptococcus mutans</i>	Prévention des caries chez l'homme	(36, 77)
Salivaricine B		<i>Micrococcus luteus</i> ; <i>Streptococcus anginosus</i> ; <i>Eubacterium saburreum</i>	Traitement de la mauvaise haleine chez l'homme	(35)
Salivaricine	<i>S. salivarius</i> CRL1328	<i>Enterococcus</i> spp., <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Traitement des infections vaginales chez la femme	(215)
UN ^a	<i>Lactobacillus casei</i> L26	<i>E. coli</i> O111, <i>L. monocytogenes</i>	Prévention des infections gastriques (modèle animal : souris)	(277)
Carnocine	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> B26 and B33	<i>Aeromonas salmonicida</i> , <i>Y. ruckeri</i>	Contention des infections chez la truite arc-en-ciel	(153)
UN	<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1	<i>Helicobacter pylori</i>	Prévention des infections gastriques chez l'homme	(63)
UN	<i>L. acidophilus</i> LB	<i>H. pylori</i> , <i>Helicobacter felis</i>	Prévention des infections gastriques chez l'homme	(50)
Gram-positives : bactériocines de la classe II				
Pediacine	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Enterococcus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Shigella</i>	Prévention des infections gastriques chez l'homme	(273)
Entéroccine	<i>Enterococcus faecium</i> EK13	<i>Salmonella dusseldorf</i> SA13	Réduction des infections chez les cailles japonaises	(171)
		<i>E. coli</i> , <i>Clostridia</i> sp.	Réduction des infections gastriques chez le lapin	(173)
	<i>E. faecium</i> J96	<i>Salmonella pullorum</i>	Contention des infections GI chez les poussins	(14)
Bactériocines de Gram-négatives				
UN	<i>Aeromonas media</i> A199	<i>Vibrio tubiashii</i> , <i>Saprolegnia parasitica</i>	Contention des infections chez les huîtres et les anguilles	(106, 170)
UN	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Contention des infections chez la truite arc-en-ciel	(134)
UN	<i>Roseobacter</i> sp. BS107	<i>Vibrio</i> spp.	Contention des infections chez la coquille Saint-Jacques	(254)
Colicines				
Colicine E2, E8 et E7	<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	Inhibition des contaminations GI chez le veau	(209)
Colicine E7	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	Réduction des contaminations GI chez les veau et le bétail adulte	(261)
Colicin E1 et Ib	<i>E. coli</i> H22	<i>E. coli</i> and <i>Enterobacter</i> spp.	Inhibition des infections GI enteriques (model animal : souris)	(64)
Microcines				
Microcine 24	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	Inhibition des infections GI chez les poulets	(230)
Microcine B17	<i>E. coli</i> Nissle 1917	<i>E. coli</i>	Réduction des infections du colon chez le veau	(297)
		<i>S. typhimurium</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>E. coli</i>	Traitement de la diarrhée aiguë chez l'enfant et le nourrisson	(125)
Microcine C7	<i>E. coli</i> H22	<i>Shigella flexneri</i>	Inhibition des infections GI enteriques (model animal : souris)	(64)

^aUN : bactériocine sans nom

Des études récentes ont montré la capacité de nombreuses souches probiotiques à produire des bactériocines *in vivo* (Tableau 5) (108). Une étude particulièrement intéressante a montré l'activité chez la souris contre *L. monocytogenes* de la souche *Lactobacillus salivarius* UCC118 productrice de la bactériocine Abp118. Une souche mutante, privée de sa capacité de produire la bactériocine, était sans effet. Il a par ailleurs été observé que la souche *L. salivarius* UCC118, productrice de la bactériocine, ne protégeait pas les souris contre le pathogène quand l'infection était réalisée avec une souche de *L. monocytogenes* qui exprimait la protéine d'immunité de la bactériocine Abp118 (57).

D'autres exemples existent d'une activité *in vivo* de bactéries probiotiques productrices de bactériocines contre des pathogènes. Par exemple, l'administration de *L. acidophilus* LB à des souris les protégeait contre l'infection par *Helicobacter felis* (50) et la consommation de bactéries vivantes de la souche *L. johnsonii* LA1 par des enfants colonisés par *H. pylori* diminuait la production d'uréase (63). Des souches d'*E. coli* productrices de colicines ou de microcines sont utilisées chez les animaux pour combattre des entéropathogènes Gram-négatifs typiques qui ne sont pas sensibles aux bactériocines des BAL. Ainsi, l'administration simultanée de la souche *E. coli* H22 et du pathogène *Shigella flexneri* à des souris résultait en une forte inhibition du pathogène, ce qui a été attribué à la production d'une microcine (64). En dehors du tractus gastro-intestinal, les probiotiques producteurs de bactériocines ont aussi été utilisés dans la cavité buccale pour prévenir les caries (129) et pour traiter la mauvaise haleine (35, 36), ainsi que comme probiotiques vaginaux pour inhiber des bactéries pathogènes telles que *Enterococcus* spp. ou *Neisseria gonorrhoeae* (215, 303).

Il est important de contrôler la croissance excessive des bactéries pathogènes dans le tractus gastro-intestinal des animaux destinés à la consommation humaine, surtout celle des bactéries qui peuvent être infectieuses pour l'homme. L'utilisation d'antibiotiques chez les animaux destinés à la consommation n'est pas très populaire, et peut dans certains cas être remplacée par l'utilisation de souches bactériocinogènes. Des souches comme *E. faecium* EK13, (171, 173), *E. Coli* (souches productrices de colicine E7) (261) ou *L. salivarius* DPC6005 (298) ont montré des bons résultats pour protéger des poulets, des lapins, des porcs ou des vaches contre de nombreuses infections. Le produit commercial Alchem Poseidon™, (un mélange de *Bacillus subtilis*, de *L. acidophilus*, de *Clostridium butyricum* et de *Saccharomyces cerevisiae*) a été utilisé en aquaculture pour améliorer la survie des limandes après contamination par *Vibrio anguillarum* (280). Les souches contenues dans ce produit

sont productrices de bactériocines (bacillocine, lactacine, acidocine et butyricine 7423) auxquelles a été attribué l'effet protecteur contre le pathogène opportuniste testé.

Ce ne sont là que quelques exemples du grand nombre d'études réalisées, tant *in vitro* qu'*in vivo*, et ayant pour objectif de déterminer l'impact de la production de bactériocines sur la capacité d'une souche à apporter des bénéfices pour la santé de l'hôte. Les bons résultats obtenus dans ces études, ajoutés aux bonnes connaissances de la biosynthèse et de l'écologie des bactériocines acquises ces 20 dernières années, ouvrent la voie à l'utilisation des bactéries bactériocinogènes comme probiotiques pour l'homme et pour les animaux. Un nouveau champ d'application est en train de s'ouvrir pour les bactériocines, dont l'utilisation a été jusque là confinée à la conservation et à la sécurité des aliments (108).

3

Caractéristiques des probiotiques : la capacité d'adhésion

3.1. L'adhésion comme critère de sélection des souches probiotiques

Au fil des années, l'importance de l'adhésion a été clairement démontrée pour les bactéries pathogènes. Celles-ci s'attachent à la surface intestinale, produisent des toxines et/ou envahissent les cellules épithéliales et de cette façon elles peuvent causer des infections intestinales (94). Il y a une trentaine d'années, il a été montré que des bactéries de la flore indigène, telles que les lactobacilles, étaient fortement attachées à la muqueuse intestinale des porcs (102) et à l'estomac des souris (165), ce qui suggérait une capacité d'adhésion de ces bactéries à certains supports. Des souches de lactobacilles ont aussi été isolées à partir de biopsies d'intestin humain (203).

Aujourd'hui, la capacité des souches à adhérer à la muqueuse gastro-intestinale est un des principaux critères de sélection des bactéries probiotiques (92). Il est largement accepté que plus une bactérie passe du temps dans le tractus gastro-intestinal, plus elle aura de chances d'exercer un effet bénéfique pour l'hôte. La capacité d'adhésion au mucus ou aux cellules épithéliales conditionne le temps de résidence intestinale et par conséquent la capacité de colonisation, au moins temporaire, du tractus gastro-intestinal (6). Ainsi, les bactéries adhérentes peuvent séjourner dans l'intestin plus longtemps que ce que permettrait le transit normal, contrairement aux bactéries non-adhérentes qui sont facilement évacuées à cause du péristaltisme. Le débit est relativement plus important dans l'intestin grêle comparé au gros intestin et pour cela l'adhésion est plus importante pour établir des populations bactériennes dans l'intestin grêle.

Par ailleurs, plusieurs des effets bénéfiques des bactéries probiotiques sont directement liés à la capacité d'adhésion. Ainsi, l'adhésion est importante pour l'immunomodulation (264), car seules les bactéries adhérentes sont en contact avec les cellules immunes de l'épithélium. Elle est également importante pour l'amélioration de la cicatrisation de la muqueuse gastrique, effet pour lequel la colonisation est nécessaire (86), ainsi que pour le déplacement et l'inhibition des pathogènes (53).

3.2. Méthodes pour l'étude de l'adhésion

La capacité d'adhésion est difficile à étudier *in vivo*, puisque cela nécessite des biopsies de l'intestin ou des méthodes de marquage des souches probiotiques permettant d'évaluer leur installation dans la muqueuse intestinale, par conséquent, plusieurs méthodes *in vitro* ont été développées pour examiner plus simplement les propriétés d'adhésion des bactéries. Ces méthodes comprennent en général trois étapes : l'incubation des cellules bactériennes avec le substrat d'adhésion pour permettre aux bactéries d'adhérer à la cible ; le lessivage des bactéries non adhérees ; l'énumération des bactéries adhérees. L'adhésion peut parfois être spécifique à l'hôte, et pour cela elle doit être étudiée sur le système approprié. Des échantillons représentant différentes régions de la muqueuse intestinale et provenant d'origines porcine, aviaire et bovine ont été utilisés comme substrats pour des tests d'adhésion et des études de colonisation.

Dans le cas de l'homme, la seule source de cellules intestinales fraîches est le cas particulier des patients présentant une iléostomie. Vu la difficulté évidente d'obtenir du tissu humain, différents modèles *in vitro*, mimant la muqueuse intestinale, ont été développés pour évaluer l'adhésion des souches probiotiques. La culture de lignées cellulaires humaines d'origine intestinale est largement utilisée pour les tests d'adhésion (49, 286), car ces lignées imitent bien l'épithélium intestinal. Elles sont souvent obtenues à partir de tumeurs, sont disponibles dans le commerce et peuvent être maintenues dans des conditions de culture standard. Les types de cellules les plus utilisés dans la recherche sur les probiotiques sont les Caco-2 (ATCC HTB-37) et les HT-29 (ATCC HTB-38), tous les deux isolés d'adénocarcinomes du colon humain. Les caractéristiques de ces cellules incluent la formation d'une monocouche, la différenciation fonctionnelle et la polarisation après confluence. Leur ressemblance avec les cellules épithéliales en a fait les principaux modèles de l'épithélium de l'intestin grêle humain et les supports les plus largement utilisés pour les tests d'adhésion.

La surface épithéliale de l'intestin est recouverte par une couche de mucus qui tapisse le glycocalyx des microvillosités des entérocytes et qui est synthétisée par des cellules épithéliales spécialisées (cellules en gobelet ou cellules à mucus). Les mucines (glycoprotéines du mucus) sont les composants organiques majeurs du mucus et sont responsables de ses propriétés viscoélastiques. Les mucines sont des polymères composés de monomères de glycoprotéines qui varient en taille et en composition de chaînes

d'oligosaccharides. La couche de mucus protège l'épithélium et fournit un habitat et des nutriments pour les bactéries de la microflore normale. Cette couche de mucus est le premier contact entre les bactéries ingérées et la muqueuse de l'hôte et elle est considérée comme un site important pour l'adhésion et la colonisation (200). Les glycoprotéines du mucus, immobilisées sur un support, peuvent être utilisées comme substrat pour tester l'adhésion des probiotiques. Cependant, il n'existe pas de méthode standard pour la préparation des glycoprotéines du mucus humain. Elles peuvent être obtenues de patients avec une iléostomie ou bien à partir d'échantillons fécaux (156, 285). La première option nécessite des donateurs et elle n'est pas accessible à tous les groupes de recherche. Les glycoprotéines du mucus isolées à partir des selles sont souvent assez dégradées. Une troisième solution existe, celle de faire produire du mucus par des cellules épithéliales isolées telles que les cellules HT29-MTX. Beaucoup plus répandue, l'utilisation des glycoprotéines du mucus d'origine animale disponibles dans le commerce, spécialement porcines, est aussi moins coûteuse (249).

En plus des deux modèles les plus utilisés que sont les lignées cellulaires et le mucus, quelques composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène, la laminine, la fibronectine et les protéoglycanes sont aussi des supports expérimentaux potentiels pour les tests d'adhésion bactérienne (68). Même si aucune de ces modèles ne reflète complètement les interactions complexes qui ont lieu au niveau de la muqueuse gastro-intestinale, ils constituent de façon générale des supports assez fiables, spécialement lorsqu'il s'agit de comparer l'adhésion de différentes souches, et dans la plupart des cas, il existe une bonne corrélation entre les résultats de tous ces modèles (5, 176).

Les méthodes de numération des bactéries adhérees sont également variées. Les bactéries adhérees aux cellules, monocouches ou tissus cellulaires peuvent être comptées à l'aide d'un microscope optique ou par fluorescence. Cette méthode directe est longue et demande le comptage de plusieurs champs microscopiques pour avoir des valeurs représentatives. Une deuxième méthode consiste à libérer les bactéries adhérees par des détergents ou par lyse des cellules épithéliales et à les compter après culture sur milieux gélosés. Cette méthode n'est toutefois pas assez sensible pour détecter des petites différences d'adhésion entre certaines souches. Les méthodes d'énumération directes sont difficilement applicables quand les tests à réaliser demandent à être appliqués sur un nombre important de souches et dans différentes conditions, car ces méthodes sont trop lourdes et peu reproductibles en comparaison avec les méthodes de marquage par exemple. Elles restent cependant de bons outils pour confirmer les résultats des méthodes indirectes.

Parmi les méthodes indirectes par marquage, il y a celle basée sur l'utilisation de substances radioactives dans le milieu de culture résultant en un marquage radioactif des bactéries pendant la culture. Après l'élimination correcte des bactéries non-adhérées, le signal correspondant aux bactéries adhérées peut être mesuré par scintillation liquide. Une alternative à la radioactivité, moins sensible, mais plus intéressante du point de vue sécurité, coût et facilité de mise en œuvre, est le marquage des bactéries avec des fluorochromes tels que le violet cristal (183) et la fluorescéine (22). Toutefois, avant l'utilisation de tels colorants, il faut s'assurer qu'ils ne changent pas la surface des bactéries, ni ne compromettent leur viabilité. Une autre alternative est l'utilisation d'anticorps spécifiques qui permettent la détection des bactéries adhérées par un test ELISA. Aujourd'hui, il existe des anticorps commerciaux qui reconnaissent des épitopes spécifiques des bactéries Gram-positives, d'un genre particulier, comme par exemple les lactobacilles et même d'une espèce ; cependant les tests immunologiques ne sont pas couramment utilisés pour les mesures d'adhésion.

La corrélation entre les résultats des tests d'adhésion *in vitro* et les situations *in vivo* est toujours difficile à établir. D'une manière générale, il est admis que les effets probiotiques de chaque souche bactérienne doivent être individuellement évalués dans le cadre d'études sur l'homme. Toutefois, les tests d'adhésion restent de bons outils pour comparer les souches entre elles, de plus, des souches avec de bons résultats *in vitro* ont montré une bonne capacité de colonisation de l'intestin (6).

3.3. Molécules impliquées dans l'adhésion des probiotiques

L'adhérence aux surfaces de la muqueuse est considérée être un facteur de virulence important dans un processus infectieux. Chez de nombreux pathogènes Gram-négatifs appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, les molécules qui déterminent l'adhésion spécifique, souvent appelées adhésines, sont localisées sur des appendices de la surface cellulaire ; les fimbriae (94). Les fimbriae sont des structures filiformes, non impliquées dans la mobilité et composées de centaines de copies d'une sous-unité protéique structurale. Les adhésines peuvent être associées avec cette sous-unité protéique majeure ou avec des composés fimbriaux mineurs où elles peuvent être localisées sur l'extrémité des fimbriae ou sur toute la longueur.

Bien que des observations microscopiques ont révélé des structures semblables à des flagelles ou fimbriae sur la surface de certaines souches de lactobacilles (194), généralement les structures adhérentes des bactéries Gram-positives sont différentes des fimbriae. La surface des bactéries Gram-positives est parsemée de protéines spécifiques à la souche pouvant être soit attachées à la surface de la paroi cellulaire, soit étendues à travers la paroi cellulaire et liées à la membrane cytoplasmique sous-jacente. Dans la plupart des cas, ces protéines jouent le rôle d'adhésines et participent à l'association des bactéries avec la muqueuse intestinale. En comparaison avec l'état actuel des connaissances concernant les mécanismes d'adhésion des bactéries pathogènes chez l'homme, la connaissance des molécules superficielles qui interviennent dans le processus d'adhésion des souches probiotiques à la muqueuse intestinale et leurs récepteurs est encore à ses débuts. En effet, malgré le nombre important d'études menées pour clarifier les mécanismes moléculaires des interactions probiotique-hôte, il reste encore beaucoup de difficultés à surmonter : les protocoles de mesure de l'adhésion bactérienne ne sont pas encore standardisés ; le nombre de génomes séquencés d'espèces probiotiques est limité ; l'analyse génétique de certaines souches (par exemple analyses mutationnelles) est difficile ; des marqueurs moléculaires fiables des cellules hôte, permettant de contrôler leur colonisation par les bactéries probiotiques, manquent (293). Malgré cela, certains facteurs intervenant dans l'adhésion à différentes parties de la muqueuse (surface épithéliale, couche de mucus et matrices extracellulaires) ont été caractérisés en détail.

Roos et Jonsson (251) ont caractérisé une protéine de surface de grande taille qui contribue à l'adhésion de *Lactobacillus reuteri* 1063 au mucus porcine et aviaire : la protéine Mub. De même, la protéine de type lectine, spécifique du manose, Msa, de *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (232) et la protéine Mub de *L. acidophilus* NCFM (34) ont été identifiées comme adhésines du mucus. Ces trois protéines ont le même type de domaine caractéristique des protéines de surface des bactéries Gram-positives : un peptide signal N-terminal pour le transport à travers la membrane plasmique et un motif d'ancrage C-terminal (LPxTG) qui est reconnu par une famille d'enzymes appelées sortases, clivé et lié de façon covalente au peptidoglycane de la paroi bactérienne. Ces trois protéines partagent aussi un domaine d'adhésion au mucus, MUB, décrit comme MucBP (MUCin-Binding Protein) dans la base de données Pfam (PF06458). Ce domaine consiste en 50 acides aminés et se trouve dans de nombreuses protéines bactériennes (293). Une autre protéine sortase-dépendante, caractérisée chez *L. salivarius* UCC118, est la protéine LspA. Elle s'est avérée active dans l'adhésion de

cette souche au mucus et aux cellules épithéliales (48, 291). L'analyse de domaine selon la base de données Pfam y a révélé huit domaines MucPB.

En dessous de la couche de mucus s'étend la matrice extracellulaire de l'hôte, composée de plusieurs protéines sécrétées telles que la laminine, la fibrine, l'héparine, le collagène et la fibronectine. Certains probiotiques ont la capacité d'adhérer à cette matrice. Il a été montré que la protéine CnBP (collagen-binding protein) de *L. reuteri* NCIB11951 adhère au collagène de type I de la matrice extracellulaire (7). Cette protéine a des similarités de séquence avec le domaine d'attachement du soluté des transporteurs bactériens ABC. Ce domaine a aussi été détecté dans une protéine homologue, MapA, identifiée récemment dans *L. reuteri* 104R (202). Chez les bifidobactéries, la protéine BopA, jouant un rôle probable dans l'adhésion aux cellules Caco-2, a été purifiée à partir d'un extrait de la paroi cellulaire d'une souche fortement adhérente, *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 (117). Il s'agit en fait d'une lipoprotéine d'attachement du soluté des transporteurs ABC.

Un autre type de protéines s'est révélé important dans le processus d'adhésion de certaines souches probiotiques, il s'agit des protéines de surface ou couche-S (S-layer). Cette couche est formée par des assemblages monomoléculaires paracrystallins de protéines ou de glycoprotéines à la surface des bactéries, apportant rigidité à la structure cellulaire. A cause de sa structure cristalline, la couche-S est composée de pores de taille et de morphologie identiques. Les sous-unités protéiques de la couche-S sont liées de façon non-covalente entre elles et à la paroi cellulaire. La connaissance du rôle physiologique de ce type de protéines est assez limitée et les fonctions proposées incluent la détermination de la forme cellulaire, un rôle protecteur, un piège de molécules, un site d'adhésion de coenzymes, un rôle d'adhésion cellulaire ou encore de reconnaissance de surface (271). Certaines protéines de la couche-S de *Lactobacillus crispatus* JCM 5810 (protéine CbsA) (9, 269), *Lactobacillus heveticus* R0052 (protéine Slp) (144), *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 (protéine SlpA) (131) et *L. acidophilus* NCFM (protéine SlpA) (34) ont montré des capacités d'adhésion aux cellules épithéliales, aux matrices extracellulaires et aux acides lipoteichoïques d'autres espèces bactériennes. De plus, même isolées, certaines de ces protéines ont prouvé leur efficacité pour la prévention de l'adhésion de pathogènes aux cellules épithéliales (144).

Les protéines bactériennes impliquées dans l'adhésion peuvent être attachées à la surface bactérienne ou exportées. Les protéines exportées peuvent contenir des séquences signal d'export et des domaines de rétention à la surface qui leur permettent d'être sécrétées et de rester au voisinage de la bactérie en s'associant à la membrane cytoplasmique ou à la

paroi bactérienne par des interactions covalentes ou non-covalentes (257). Par ailleurs, certaines protéines cytoplasmiques ne possédant pas de tels domaines peuvent aussi se trouver associées à la surface cellulaire ou libérées dans l'environnement extracellulaire. Ce type de protéines multifonctionnelles sans ancrage a aussi été associé, parmi d'autres fonctions, à l'adhésion bactérienne. Un exemple est le facteur d'élongation, EF-Tu, associé à la surface de *L. johnsonii* NCC533 et impliqué dans l'adhésion de cette souche aux cellules Caco-2 et aux mucines (113). Il s'agit en effet d'une protéine cytoplasmique impliquée dans la synthèse protéique et qui ne contient aucune séquence signal identifiable, ni motif de reconnaissance de la sortase LPxTG, ni domaine transmembranaire qui expliqueraient sa localisation à la surface cellulaire (113). La protéine EF-Tu isolée de *L. johnsonii* n'était capable de s'attacher, ni à la fibronectine, ni au collagène, mais seulement à la mucine gastrique et intestinale, suggérant son implication possible dans le processus d'adhésion à la couche de mucus et non à la matrice extracellulaire sous-jacente (113).

Une autre protéine connue comme cytoplasmique a été retrouvée associée à la surface de *L. johnsonii*, il s'agit de la protéine chaperone GroEL (19). Cette protéine est un médiateur du repliement des protéines dans le cytoplasme (59, 191), mais il a été suggéré que lorsqu'elle est localisée à la surface, elle est impliquée dans l'adhésion de la souche à la muqueuse intestinale. Non seulement la protéine GroEL recombinante a la propriété d'adhérer au mucus et aux cellules HT29, mais quand elle est mise à faible concentration en présence de cellules HT29, elle bloque l'adhésion de *L. johnsonii* (19). Par ailleurs, la Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et l'énolase sont des enzymes glycolytiques du cytosole qui ont été retrouvées sur la surface de certaines BAL, où elles sont capables d'adhérer à la mucine colique et aux matrices extracellulaires (laminine, collagène et plaminogène) (10).

Dans la plupart des cas, l'adhésion des bactéries probiotiques à la muqueuse intestinale est due à des protéines. Toutefois, d'autres molécules telles que les acides lipotéichoïques, polymères amphiphiles qui d'étendent à travers la couche de peptidoglycane de la paroi jusqu'à la surface cellulaire, et les exopolysaccharides, polysaccharides à chaînes longues attachés de façon souple à la surface cellulaire ou secrétés dans le milieu, ont aussi été impliquées dans l'adhésion de certaines souches (114, 252).

Finalement, il apparaît d'après ce tour d'horizon bibliographique que l'adhésion des probiotiques à la muqueuse intestinale de l'hôte est un processus multifactoriel et complexe dans lequel interviennent des nombreuses molécules de nature différente. Il est nécessaire

d'étudier individuellement ces molécules afin d'élucider le rôle de chacune, mais aussi les possibles interactions (comportement synergique) entre elles, ainsi que les phénomènes de régulation qui déterminent leur expression *in vivo*, ce qui contribuera à une meilleure compréhension des interactions probiotique-hôte.

4

Caractéristiques des probiotiques : la résistance aux conditions gastro-intestinales

4.1. L'appareil digestif

La principale fonction spécifique du tube digestif est de permettre l'absorption sélective des nutriments nécessaires au maintien d'un état nutritionnel adéquat. L'absorption n'est possible, en règle générale, que dans le cas de petites molécules, aussi une digestion préalable est-elle nécessaire pour transformer les aliments en nutriments absorbables. La digestion consiste en une dépolymérisation des molécules complexes ingérées qui sont transformées en nutriments simples absorbables. Elle est facilitée par la mastication préalable et les mouvements de trituration et de brassage mais résulte principalement de phénomènes chimiques. Ces derniers sont effectués par des enzymes et sont aidés par des sécrétions non enzymatiques qui maintiennent le chyme à l'état liquide et font varier les conditions physicochimiques. L'appareil digestif de l'homme est composé du tube digestif et de glandes annexes (Figure 8).

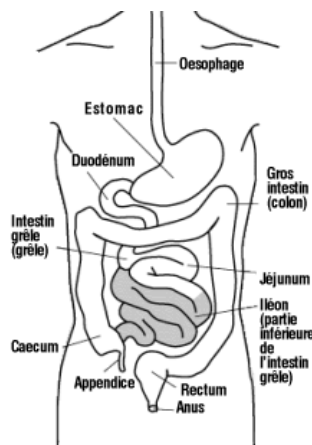


Figure 8. Schéma de l'appareil digestif de l'homme.

Le tube digestif commence par la bouche, où les dents et la langue entament le processus de dégradation de la nourriture, à l'aide de la salive sécrétée par les glandes salivaires. La salive lubrifie les aliments, les humidifie et débute la digestion de l'amidon grâce à l'amylase salivaire. Elle contient aussi une lipase (dite linguale) dont la fonction n'est qu'accessoire (56). La nourriture mastiquée, combinée à la salive, est avalée et descend

jusque dans l'estomac grâce aux mouvements péristaltiques (contractions rythmées) de l'œsophage. Certaines cellules de l'estomac présentes dans les glandes du fundus, sont spécialisées dans la sécrétion active d'acide chlorhydrique grâce à une pompe à protons, participant ainsi à la dénaturation des protéines. D'autres cellules sécrètent la pepsine (127), une enzyme protéolytique produite en forme de pepsinogènes qui sont activés en pepsine par le pH acide puis par autocatalyse. Son activité nécessite un pH inférieur à 5,6 et est optimale entre 1,8 et 3,5. Lorsque la nourriture est bien digérée, le liquide résultant, appelé chyme, franchit un sphincter appelé pylore pour entrer dans l'intestin grêle.

Le chyme acide qui entre dans l'intestin n'est que partiellement digéré : l'amidon a subi l'action de l'amylase, et les protéines, celle de la pepsine; les lipides n'ont encore subi aucune transformation. L'entrée du chyme provoque la libération du suc pancréatique et de la bile. La sécrétion pancréatique électrolytique est riche en bicarbonates et q un pH de 7,5 à 9. Elle permet de tamponner l'acidité provenant de l'estomac et ainsi d'obtenir un pH optimal pour l'action des enzymes pancréatiques (amylases, trypsine, chymotrypsine carboxypeptidases, lipases et nucléases). La bile est constituée d'eau et d'électrolytes, d'acides biliaires, de bilirubine conjuguée, de cholestérol et de phospholipides. Les principaux rôles physiologiques des acides biliaires sont la stimulation de la sécrétion biliaire, la solubilisation des lipides présents dans la bile (ce qui permet d'éviter la précipitation du cholestérol sous la forme de calculs), la formation de micelles dans le tube digestif nécessaires à la digestion/absorption des graisses et vitamines liposolubles, une stimulation de la motricité colique et le maintien de l'homéostasie du cholestérol.

L'intestin grêle est l'endroit le plus important pour la digestion et l'absorption. En plus de produire lui-même certaines enzymes digestives, il reçoit celles produites par le pancréas en plus de recevoir la bile en provenance du foie. Le chyme, propulsé lentement par des ondes de contraction (péristaltisme), séjournera de trois à six heures dans l'intestin grêle, l'endroit le plus important pour la digestion, l'absorption et aussi pour l'activité des probiotiques. Des ondes de segmentation brassent la nourriture, la fait se déplacer très lentement et, lorsqu'elle atteindra l'extrémité de l'intestin grêle, la digestion est terminée et l'absorption est presque totalement achevée.

Les résidus inutilisables passent dans le côlon (où la majeure partie de l'eau est réabsorbée dans la circulation sanguine) et le rectum, où il est stocké avant son excrétion. Ces déchets solides, appelés fèces, sont compactés et, lors de la défécation, expulsés par le canal anal et l'anus.

4.2. Survie des probiotiques au cours du transit digestif

Les aliments sont fortement transformés durant leur transit dans le tube digestif et une grande quantité des bactéries ingérées y est détruite. Ceci a amené les chercheurs à supposer que les effets des probiotiques seraient influencés par leur survie dans l'intestin et à étudier cette dernière. Aujourd'hui, il est admis que pour que la majorité des probiotiques puissent avoir des rôles bénéfiques sur la santé humaine, il faut qu'ils gardent une certaine viabilité lors du transit intestinal. Ainsi, les probiotiques doivent pouvoir passer sans dommage irréversible la barrière acide de l'estomac, puis l'effet inhibiteur éventuel des sels biliaires. La capacité de survie au cours du transit intestinal est très variable selon genres, espèces et souches microbiennes. Certaines bactéries sont détruites dès leur passage dans l'estomac alors que d'autres ont une capacité de survie élevée leur permettant de survivre tout au long du transit et même de s'y multiplier. Parmi les lactobacilles utilisés par l'industrie laitière pour la fabrication des laits fermentés, un grand nombre ne survivent pas à l'environnement acide de l'estomac et ne répondent donc pas totalement à la définition des probiotiques. Les bactéries du yaourt *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* ont une résistance à l'acidité faible et sont rapidement détruites au niveau stomacal (55). *L. lactis*, une espèce bactérienne assez largement utilisée dans des produits laitiers fermentés, est également très sensible à l'acide, mais aussi à la bile. La capacité de survie de certaines souches de *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. casei* et *L. johnsonii* dans des conditions acides est généralement meilleure que celle des souches de *L. bulgaricus* (190).

La protection contre l'acidité gastrique peut se faire en protégeant les bactéries par le pouvoir tampon de l'aliment vecteur ou par des systèmes galéniques de protection tels que la micro-encapsulation. La dose ingérée de probiotiques est aussi un facteur important pour obtenir des concentrations élevées dans les différents compartiments de tube digestif. A titre d'exemple, Saxelin et al. (1995), ont montré qu'une quantité de 10^{10} UFC devait être consommée pour détecter *L. rhamnosus* GG dans les fèces.

Etant donné que l'acidité gastrique et les sécrétions bilio-pancréatiques constituent les principaux mécanismes endogènes d'inactivation des bactéries ingérées, l'exposition à des mélanges simulant ces conditions a été adoptée comme l'un des principaux tests *in vitro* en vue de la sélection des souches ayant intérêt probiotique potentiel.

4.3. Activité des bactéries non-viables

Les probiotiques sont par définition des micro-organismes ingérés vivants. La question a toutefois été posée de savoir si des micro-organismes non vivants (corps microbiens détruits par un processus quelconque) ou des produits du métabolisme de probiotiques (milieu de culture par exemple) pouvaient avoir tout ou partie des effets des probiotiques. Cependant, peu de travaux ont comparé de manière rigoureuse les effets de bactéries vivantes par rapport à ceux de cellules bactériennes inactivées. Cette rigueur impose que la seule différence entre le groupe testé et le groupe contrôle soit le caractère vivant de la bactérie.

A l'évidence, certains effets des préparations bactériennes viables peuvent être dus à certains de leurs constituants, métabolites et/ou à leur ADN. Ils peuvent alors aussi être observés avec des préparations non vivantes. D'autres effets ne sont observés qu'avec des micro-organismes vivants. A titre d'exemple, les activités enzymatiques sont le fait de l'enzyme contenue dans la cellule bactérienne plutôt que de l'activité de la bactérie elle-même. C'est le cas de la digestion du lactose par les probiotiques grâce à la lactase. La lactase véhiculée par des bactéries dont la membrane est très facilement lysée par les acides biliaires est protégée de l'acidité gastrique et libérée dans le duodénum sous l'action des acides biliaires, participant ainsi efficacement dans l'intestin à la digestion du lactose. Il a été observé que des BAL au fort contenu en lactase mais dont la résistance à la bile est plus importante sont moins efficaces pour aider la digestion du lactose chez les sujets déficients en lactase (70). Il est donc préférable que la paroi de la bactérie soit lysée par la bile, ce qui permettrait la libération de la lactase intrabactérienne.

Une étude menée chez des malades atteints de pancréatite a montré l'efficacité supérieure de la souche *L. plantarum* 299 vivante dans le traitement de cette affection par rapport à la même souche tuée par la chaleur (150). Peu d'études ont comparé les effets de souches vivantes à ceux des souches mortes en ce qui concerne les propriétés immunitaires. Une étude réalisée sur 25 enfants souffrant de diarrhée à rotavirus et ayant reçu la souche *L. rhamnosus* GG sous forme vivante ou tuée a montré que les sujets du groupe traité par la souche vivante avaient plus de lymphocytes produisant des IgA anti-rotavirus (146).

Une autre étude a été réalisée en comparant l'influence sur la capacité phagocytaire d'un produit fermenté frais contenant du *L. johnsonii* La1 au même produit à date limite de consommation (DLC) dans lequel la population bactérienne probiotique viable a diminué.

Les résultats ont montré une absence d'effet dans le groupe non traité et dans celui recevant la dose faible de bactéries vivantes (malgré la présence de corps bactériens morts). Par contre, le groupe traité par un niveau de population élevé voyait la capacité phagocytaire significativement augmentée (78).

Il apparaît ainsi que, dans la plupart des cas, les bactéries viables montrent des effets supérieurs à ceux des bactéries non-viables. Pour cette raison, la sélection de souches sur la base de leur résistance aux conditions gastro-intestinales semble être un paramètre incontournable en vue de retenir les meilleurs probiotiques (218). Néanmoins, dans les cas où les bactéries non-viables montrent des effets exploitables, il serait intéressant d'envisager leur utilisation dans la fabrication de produits probiotiques, et ce pour des raisons économiques liées à des conditions de conservation moins contraignantes et à des durées vie plus longues.

Chapitre 2

Etude des bactériocines des bactéries lactiques

1

Introduction

Dans toute niche écologique où des microorganismes sont en compétition, ceux dont la capacité d'assimilation des substrats est plus grande ou dont la résistance à un facteur environnemental donné est meilleure possèdent un avantage certain. Cet avantage peut être toutefois grandement amélioré lorsque les microorganismes en question produisent des substances antimicrobiennes telles que des bactériocines, des antibiotiques, des toxines, des enzymes bactériolytiques, des bactériophages, ou d'autres sous-produits du métabolisme tels que l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène et le diacétyle. C'est pour cela que, dans le cas des microorganismes probiotiques, la production de substances antimicrobiennes est une propriété recherchée, puisqu'elle est censée contribuer à l'exclusion compétitive des espèces indésirables.

En ce qui concerne les BAL, les bactériocines sont certainement les composés antimicrobiens les plus largement étudiés. Elles elles sont particulièrement attractives en raison de leur spécificité d'action et de leur grande diversité structurale et de spectres d'activité.

Des recherches de souches productrices de bactériocines avaient été effectuées au laboratoire précédemment. La première partie de cette thèse a consisté à l'étude de cinq de ces souches, isolées à partir de sources laitières et végétales. Il s'agit de trois souches isolées du fromage de Munster, *L. lactis* WHE 53, *L. lactis* WHE 99, et *E. faecalis* WHE 96, d'une souche isolée d'ensilage de riz au Japon, *L. lactis* RO50, et d'une souche isolée du fourrage d'ivraie, également au Japon, *E. faecium* IT62. Les bactériocines produites par ces souches ont été purifiées et leurs structures ont été déterminées par des méthodes biochimiques et génétiques. De même, l'activité des peptides purifiés vis-à-vis d'une large variété de bactéries indicatrices a été déterminée.

2

Matériel et méthodes

2.1. Cultures bactériennes et milieux

Cinq souches de BAL productrices de bactériocines ont été étudiées. Il s'agit d'*Enterococcus faecium* IT62, isolée du fourrage d'ivraie ou ryegrass d'Italie (*Lolium multiflorum*), de *Lactococcus lactis* RO50, isolée d'ensilage de riz paddy (riz non décortiqué avec sa tige et ses feuilles) (89), de *Lactococcus lactis* WHE 53, de *Lactococcus lactis* WHE 99 et d'*Enterococcus faecalis* WHE 96, isolées de fromage de type Munster d'origine fermière.

Les souches utilisées comme souches indicatrices (souches sur lesquelles est testée l'action antibactérienne) pour démontrer et mesurer l'activité d'*E. faecium* IT62 pendant le processus de purification sont *L. lactis* RO50 et *E. faecium* WHE 81. *E. faecalis* CECT 481 est utilisée comme souche indicatrice pour l'activité d'*E. faecalis* WHE 96. *Enterococcus saccharolyticus* ATCC 43076 est utilisée comme souche indicatrice pour l'activité de *L. lactis* RO50. *Staphylococcus xylosus* 57 est utilisée comme souche indicatrice de l'activité des souches *L. lactis* WHE 99 et *L. lactis* WHE 53.

Le spectre d'activité des surnageants, stérilisés par filtration, des cultures des souches productrices de bactériocine avait été déterminé précédemment par Saïd Ennahar lors de l'isolement des souches productrices de bactériocines. Pour cela les méthodes des spots et de la dilution critique (voir 2.2) avaient été utilisées sur une large gamme de souches indicatrices. Cette détermination donne une idée de l'activité de la souche, mais elle n'est pas vraiment représentative de l'activité de la bactériocine, car un extrait de culture peut contenir plusieurs bactériocines. Ces spectres d'activité ont été utilisés pour le choix des souches indicatrices utilisées pour le suivi de la purification.

Toutes les souches utilisées ont été conservées à -80°C dans un mélange glycérol 30%, bouillon cerveau-cœur 70%. Pour une conservation de courte durée, elles sont gardées sur une gélose Tryptone-Soja à 4°C. Avant leur utilisation, les bactéries sont revivifiées par deux précultures successives dans un bouillon approprié, MRS, BHI ou M17 (Biokar diagnostics,

Beauvais, France), pendant 18 h à température optimale (30°C pour les lactocoques et 37°C pour les entérocoques).

En vue de la production des bactériocines, une culture en fin de phase exponentielle (environ 18h) est inoculée dans un bouillon MRS à 0,1% (v/v) de façon à obtenir une concentration d'environ 10^5 UFC/ml, puis incubée à température optimale pendant 15 h. Avant leur utilisation, les indicateurs sont cultivés pendant 18 h dans un bouillon MRS à température optimale.

2.2. Préparation de l'extrait de culture et détermination de l'activité antibactérienne

Pour la préparation de l'extrait de culture, 1 l de culture de la bactérie productrice de bactériocine est centrifugé à 4000 g pendant 20 min à 4°C et le surnageant récupéré est filtré sur une membrane Porafil de porosité 0,45 μm (Macherey-Nagel, Hoerd, France) pour éliminer les cellules bactériennes. Le pH de l'extrait de culture obtenu est ajusté à 6 avec une solution de NaOH.

L'activité antibactérienne de l'extrait de culture et des différentes fractions recueillies pendant la purification des bactériocines est déterminée par la méthode des spots (spot-on-lawn test). Cinq ml de gélose lactobacilli Agar AOAC (Difco, Le Pont de Claix, France) sont liquéfiés à 100°C, puis laissés refroidir à environ 40°C avant d'être inoculés avec une culture de 18-22 h de la souche indicatrice et déposés sur une boîte de Pétri contenant déjà une couche de gélose MRS (Biokar Diagnostics). Après solidification de la gélose déposée, les boîtes de Pétri en double-couche sont séchées sous flux d'air pendant 15 min, puis des gouttes de 10 μl de la solution à tester sont déposées à la surface de la gélose. Les boîtes sont incubées pendant 18 h, puis la présence de zones d'inhibition (zones claires dans une nappe trouble formée par la croissance de la bactérie indicatrice) est recherchée (Figure 9).

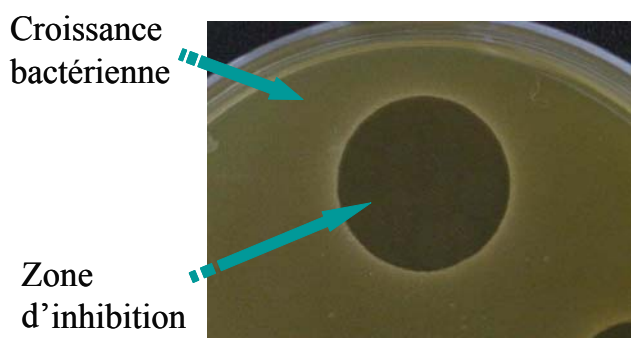


Figure 9. Zone d'inhibition indiquant la présence d'une substance antibactérienne.

L'activité antibactérienne est détectée et estimée par l'observation de zones d'inhibition autour des dépôts et la mesure de leur diamètre (Figure 10a). Une mesure plus précise est également effectuée, particulièrement lorsque l'activité à mesurer est importante. Il s'agit d'un titrage réalisé selon le test de la dilution critique : une série de dilutions en cascade au $\frac{1}{2}$ de la solution à tester est effectuée dans de l'eau distillée stérilisée. Une goutte de 10 μl de chaque dilution est déposée sur une boîte de Pétri en double-couche préparée comme indiqué précédemment. L'activité déterminée selon cette méthode s'exprime en unités arbitraires par ml (UA/ml) et elle est égale à l'inverse de la dilution maximale donnant encore lieu à une zone d'inhibition détectable multiplié par 100, le volume des gouttes déposées étant de 10 μl (Figure 10b).

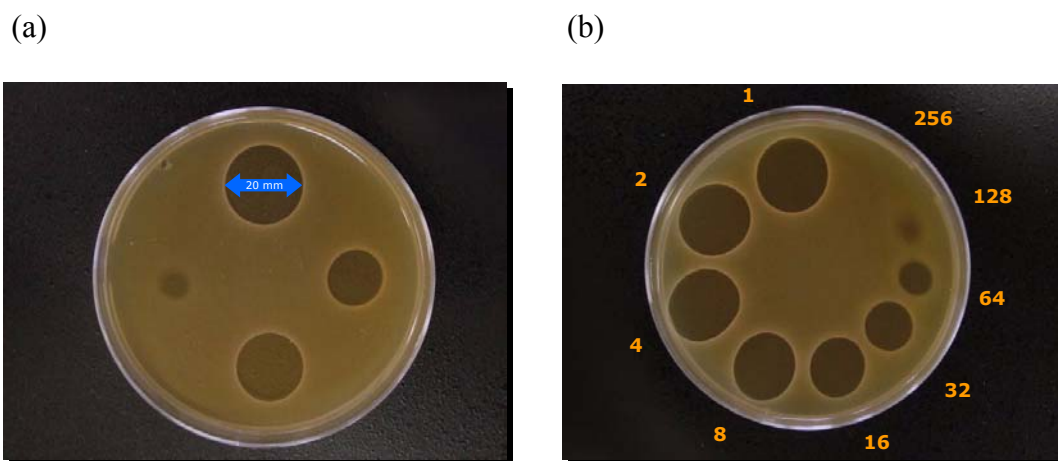


Figure 10. Mesure de l'activité antibactérienne par la méthode des spots (a) mesure du diamètre de la zone d'inhibition (b) test de la dilution critique.

2.3. Purification des bactériocines

La purification des bactériocines se fait à partir de l'extrait de culture de la souche productrice avec un protocole en plusieurs étapes basé sur leur caractère cationique et relativement hydrophobe (Figure 11).

Les bactériocines produites par les souches *L. lactis* RO50, *L. lactis* WHE 53 et *L. lactis* WHE 99 ont été purifiées par un protocole en quatre étapes : précipitation des protéines, dessalage, passage par un échangeur de cations et purification par chromatographie en phase inverse. Ce protocole a été simplifié pour la purification de la bactériocine produite par la

souche *E. faecium* IT62 où seulement deux étapes ont été utilisées : passage par un échangeur de cations et purification par chromatographie en phase inverse. Pour la purification de la bactériocine produite par la souche *E. faecalis* WHE 96 la concentration des protéines a été réalisée par ultrafiltration et non par précipitation, le dessalage ultérieur n'étant pas nécessaire.

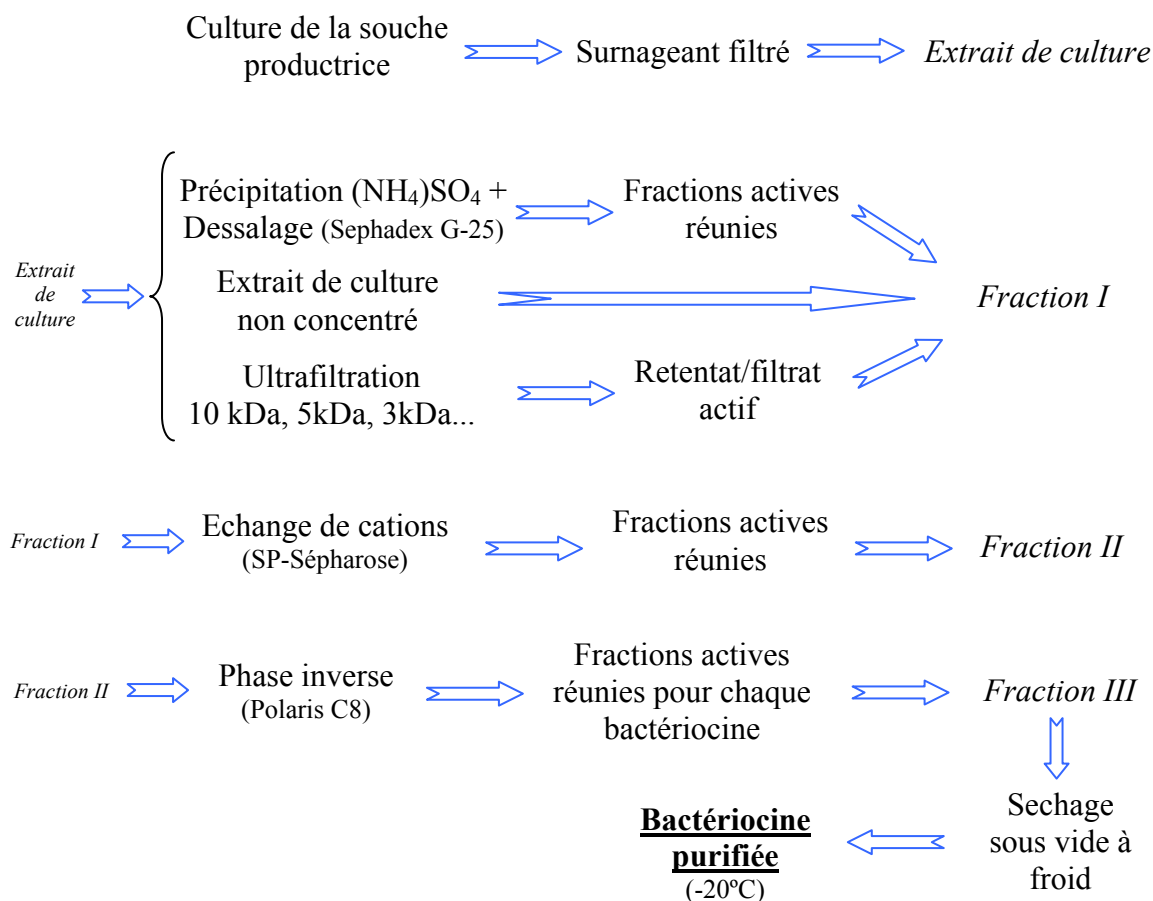


Figure 11. Schéma des méthodes utilisées pour la purification des bactériocines.

2.3.1. Concentration des protéines

2.3.1.1. Précipitation au sulfate d'ammonium

La précipitation au sulfate d'ammonium, méthode utilisée classiquement lors de la purification de protéines, permet de déposer et de concentrer la bactériocine, afin d'éliminer certains contaminants et de réduire le volume de l'extrait actif. La précipitation des protéines de l'extrait de culture obtenu après filtration de la culture de la souche productrice est réalisée à 0°C pendant une nuit en présence de 440 g/l de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Fluka, Steinheim, Pays-Bas) et 0,1% (v/v) de tween 80 (Fluka). Le précipité est récupéré par

centrifugation à 11000 g à 4°C pendant 1 h, puis solubilisé dans un volume minimal d'eau distillée (entre 20 et 30 ml). La solution obtenue est appelée fraction I.

La concentration en sels de la fraction I est trop élevée pour un passage sur un échangeur de cations, une étape de dessalage préalable s'avère donc nécessaire. Une colonne de perméation sur gel avec une phase stationnaire Sephadex G-25 a été utilisée à cet effet. Ce type de colonne sépare les molécules en fonction de leur taille : les molécules de grande taille (protéines et peptides) sont éluées en premier avec le volume mort de la colonne et les molécules de petite taille (sels neutres, sels du tampon, contaminants de bas poids moléculaire), ayant un accès complet aux pores, sont éluées plus tard (avec un volume d'éluion proche du volume total de la colonne). Cette technique peut être utilisée pour dessaler et pour éliminer des contaminants de bas poids moléculaire

La fraction I est dessalée par passage sur une colonne HiPrep 26/10 Desalting (phase stationnaire Sephadex G-25, longueur 100 mm, diamètre interne 26 mm, limite d'exclusion 5000 Da, Amersham Biosciences, Saclay, France) montée sur une chaîne HPLC basse pression (Waters 600, Waters, St-Quentin, France). Aucun détecteur n'est utilisé en sortie de colonne. La colonne de dessalage est équilibrée avec un tampon acétate de sodium 20 mM à pH 6,0 (tampon A). L'éluion est effectuée par le tampon A à un débit de 10 ml/min. Etant donné que le volume maximum d'échantillon recommandé pour chaque injection est de 15 ml, deux chromatographies successives sont nécessaires pour le dessalage de la fraction I.

Des fractions de 7 ml sont recueillies à l'aide d'un collecteur de fractions et testées par mesure du diamètre de la zone d'inhibition selon la méthode des spots (voir 2.2). Les fractions présentant une activité bactéricide sont réunies et utilisées pour l'étape suivante (fraction I).

2.3.1.2. Sans concentration

Les bactériocines étant souvent des peptides de taille relativement petite, leur précipitation au sulfate d'ammonium n'est pas toujours la méthode de choix, étant donné les faibles concentrations généralement obtenues dans les dépôts. De plus, cette méthode résulte en des échantillons avec une forte concentration en sel, ce qui affecte l'efficacité de l'étape de séparation par échange de cations et nécessite une étape supplémentaire de dessalage. Sachant que chaque étape de purification entraîne la perte d'une certaine quantité de bactériocine, et il est souhaitable de réduire le nombre d'étapes au minimum. Ainsi, dans certain cas, une étape de concentration des protéines par précipitation au sulfate d'ammonium, suivie d'un

déssalage, résulte en une perte plutôt qu'en une concentration de la bactériocine. Ceci a été le cas de la bactériocine produite par la souche *E. faecium* IT62 où les étapes de précipitation au sulfate d'ammonium et de dessalage n'ont pas été réalisées (Tableau 6). L'extrait de culture ajusté à pH 6,0 a en effet été directement passé sur la colonne échangeuse de cations dans les mêmes conditions que la fraction I obtenue de la purification des autres bactériocines.

2.3.1.3. Ultrafiltration

L'absence d'une étape de concentration préalablement à l'échange de cations n'est pas sans contraintes, car ça demande le traitement d'un volume important d'échantillon, ce qui consomme du temps et résulte en une dégradation plus rapide de la colonne chromatographique. L'acquisition par le laboratoire d'un système de filtration tangentielle nous a permis d'utiliser l'ultrafiltration comme méthode alternative à la précipitation au sulfate d'ammonium lors de la purification de la bactériocine produite par *E. faecalis* WHE 96 (Tableau 6). L'extrait de culture obtenu après filtration (0,45 µm) de la culture de la souche productrice est filtré successivement à travers des membranes à des seuils de coupure de 10, 5 et 3 kDa à l'aide d'un système de filtration tangentielle Centramate (Pall, New-York, USA). L'activité des parties perméat et rétentat après chaque étape d'ultrafiltration est testée par le test de la dilution critique. La fraction finale, contenant la bactériocine, est ajustée à pH 5,5 avec une solution de NaOH. Un dessalage n'est pas nécessaire après l'ultrafiltration et cette fraction est directement passée sur l'échangeur de cations (fraction I).

Tableau 6. Récapitulatif des techniques utilisées pour la concentration des protéines à partir de l'extrait de culture de chaque souche étudiée.

	<i>L. lactis</i> RO50	<i>L. lactis</i> WHE 53	<i>L. lactis</i> WHE 99	<i>E. faecalis</i> WHE 96	<i>E. faecium</i> IT62
Traitement de l'extrait de culture avant l'échange de cations	Concentration des protéines				Sans concentration des protéines
	Précipitation au sulfate d'ammonium + dessalage			Ultrafiltration	

2.3.2. Purification par passage sur un échangeur de cations

Les bactériocines ayant généralement un pHi élevé (souvent > 9), elles sont retenues sur des colonnes échangeuses de cations à des pH proches de la neutralité (237). La fraction I est passée sur une colonne à échangeur de cations SP-Sépharose HP (longueur 100 mm, diamètre interne 26 mm, taille de particule 34 μm , Amersham Biosciences) montée sur une chaîne HPLC basse pression (Waters 600). Aucun détecteur n'est utilisé en sortie de colonne. La colonne est préalablement équilibrée avec le tampon A et la solution contenant la bactériocine est passée à un débit de 5 ml/min. Après lavage de la colonne avec 100 ml de tampon A, les molécules de bactériocine sont éluées avec un gradient linéaire de NaCl (Tableau 7). Des fractions de 5 ml sont collectées après élution et testées selon la méthode des spots. Les fractions présentant une activité bactéricide sont réunies et appelées fraction II. Lors de la purification de l'extrait de culture d'*E. faecium* IT 62, deux groupes de fractions actives ont été détectés après l'échange de cations (fraction IIa et IIb).

2.3.3. Isolement des bactériocines par chromatographie en phase inverse

La nature relativement hydrophobe des bactériocines, permet sa purification par une chromatographie HPLC en phase inverse. La fraction II, éluée de l'échangeur de cations, est complétée à 50 ml avec de l'eau distillée contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) (v/v) et passée à un débit de 2 ml/min sur une colonne de chromatographie en phase inverse C8 Polaris C8-A (longueur 250 mm, diamètre interne 10 mm, porosité 180 Å, taille de particule 5 μm , Varian, Les Ulis, France) montée sur une chaîne HPLC (Varian 9012) équilibrée avec de l'eau contenant 0,1% de TFA. Après lavage de la colonne avec un mélange eau/acétonitrile contenant 0,1% de TFA pendant 20 min, les molécules de bactériocine sont éluées avec un gradient linéaire d'acétonitrile dans de l'eau distillée contenant 0,1% de TFA à un débit de 2 ml/min.

Les conditions chromatographiques sont adaptées pour la purification de chaque bactériocine et sont indiquées dans le Tableau 7. Le profil d'élution des molécules de bactériocine est suivi à l'aide d'un détecteur à barrette de diodes ProStar (Varian). Des fractions de 2 ml sont recueillies et testées selon la méthode des spots pour détecter l'activité. Les fractions actives correspondant à un même pic d'élution sont rassemblées, diluées 4 à 5 fois avec de l'eau distillée contenant 0,1% de TFA, puis rechromatographiées. Les fractions finales contenant la bactériocine purifiée (fraction III) sont séchées sous vide à froid dans un

évaporateur DD-4X (Genevac, Ipswich, Royaume-Uni) et conservées à -20°C.

Tableau 7. Conditions chromatographiques utilisées pour la purification de chaque bactériocine

Souche	Echange de cations	Chromatographie en phase inverse C8 (A : H ₂ O + 0,1% TFA; B : ACN + 0,1% TFA)
<i>L. lactis</i> RO50	Lavage 20 min NaAc 20 mM pH 6,0. Gradient linéaire NaCl de 0 à 0,4 M en 60 min.	- Fraction II Lavage 20 min à 25% de A ; de 30 à 50% de A en 40 min ; 50% de A pendant 10 min.
<i>L. lactis</i> WHE 53		- Fraction II Lavage 20 min à 20 % de A ; de 20 à 30 % A en 5 min ; de 30 à 50% de A en 40 min ; 50% de A pendant 10 min.
<i>L. lactis</i> WHE 99		
<i>E. faecium</i> IT62	Lavage 20 min NaAc 20 mM pH 6,0 Gradient linéaire NaCl de 0 à 1,0 M en 60 min.	- Fraction IIa : Lavage 20 min à 35% de A ; de 35 à 40 % A en 5 min ; de 40 à 60% de A en 40 min ; 60% de A pendant 10 min. - Fraction IIb : Lavage 20 min à 20% de A ; de 20 à 30% A en 5 min ; de 30 à 60% de A en 40 min ; 60% de A pendant 10 min.
<i>E. faecalis</i> WHE 96	Lavage 20 min NaAc 20 mM pH 5,5. Gradient linéaire NaCl de 0 à 1,0 M en 60 min.	- Fraction II Lavage 20 min à 20 % de A ; de 20 à 60 % A en 60 min ; 60% de A pendant 10 min.

2.4. Détermination de la masse moléculaire des peptides purifiés

La masse moléculaire de chaque bactériocine purifiée a été déterminée par spectrométrie de masse à source d'ionisation electrospray (ESI-MS). Les échantillons obtenus de la chromatographie en phase inverse ont été analysés par injection directe sur un spectromètre de masse à source d'ionisation electrospray et analyseur quadripolaire 1200L MS/MS (Varian). Les spectres ont été enregistrés dans un intervalle de masse/charge (m/z) de 500 à 1500 avec une tension de cône de 90 V. Les masses moléculaires moyennes ont été obtenues après déconvolution des spectres obtenus (contenant des ions multichargés) à l'aide du logiciel Mass ID (version 6.8, Varian). La masse moléculaire de la bactériocine produite par *E. faecium* WHE 96 a aussi été déterminée par spectrométrie de masse MALDI-TOF sur un spectromètre DE-PRO (Applied Biosystems, Foster City, CA., USA).

2.5. Digestion trypsique et analyse par nanoLC-MS/MS

Pour obtenir des informations sur la séquence peptidique, les bactériocines purifiées à partir de l'extrait de culture de la souche *E. faecium* IT62 ont été digérées à la trypsine et analysées par nanoLC-MS/MS. Ces analyses ont été réalisées dans le Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bioorganique, IPHC-DSA, Université de Strasbourg. Avant la digestion une étape de réduction/alkylation de la bactériocine est nécessaire afin d'éliminer les ponts disulfure. Les bactériocines purifiées sont remises en solution dans 40 µl de trifluoroéthanol et 40µL de DL-dithiothreitol préparé dans du bicarbonate d'ammonium 50 mM. Après chauffage du mélange à 65°C pendant 1 h, 40 µl d'une solution de bicarbonate d'ammonium 25 mM contenant de l'iodoacétamide 55 mM sont ajoutés. Les solutions sont laissées 1h à température ambiante en absence de lumière, puis 40 µl de bicarbonate d'ammonium 25 mM contenant 20 mM de DL-dithiothreitol sont ajoutés et les mélanges sont laissés une heure de plus à température ambiante en absence de lumière. Les échantillons sont dilués dans une solution de bicarbonate d'ammonium 25 mM pour réduire le pourcentage final de trifluoroéthanol à 5% et la digestion est réalisée pendant une nuit à température ambiante en présence de trypsine porcine modifiée (Promega, Madison, WI, USA). Le rapport trypsine/protéine utilisé pour la digestion est de 1/20. La réaction est arrêtée par addition d'acide formique 0,1 %.

Les mélanges de peptides digérés sont analysés par nanoLC-MS/MS sur un système HPLC-chip/MS 1100 (Agilent Technologies, Palo alto, CA, USA) avec une colonne C18 de 43 mm, couplé à un spectromètre de masse à source d'ionisation electrospray et détecteur à trappe d'ions HCT ultra (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne). Le mélange est séparé à un débit de 300 nl/min et un gradient linéaire en 7 min de 8 à 40 % de solvant B (solvant A : eau avec 2 % d'acétonitrile et 0,1 % d'acide formique ; solvant B : acétonitrile avec 2 % d'eau et 0,1 % d'acide formique). La tension appliquée au capillaire du détecteur est ajustée à -1750 V. Les trois peptides les plus abondants de chaque spectre de masse, de préférence des ions doublement chargés, sont isolés et fragmentés. Un total de 6 scans a été moyenné pour obtenir les spectres MS/MS. Les données collectées pendant l'analyse nanoLC-MS/MS sont traitées, converties en fichiers mgf et comparés à la base de données NCBIInr, à l'aide du serveur local Mascot (Matrix Science, Londres, Royaume Uni).

2.6. Séquençage N-terminal

Dans les cas de nouvelles structures peptidiques, l'information concernant la structure primaire de la bactériocine obtenue par spectrométrie de masse a été complétée par un séquençage par dégradation d'Edman. Ceci a été le cas pour les entérocinés IT et 96, produites respectivement par *E. faecium* IT62 et *E. faecalis* WHE 96. Dans le cas de l'entérociné IT un séquençage d'Edman a été réalisé sur un séquenceur de protéines modèle 473A (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Cette analyse a été réalisée au laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique de Strasbourg. Pour ce qui est de l'entérociné 96, un séquenceur Procise 494 (Applied Biosystems) a été utilisé. Cette analyse a été réalisée à la plate-forme de protéomique de l'IFRMP 23 de l'Université de Rouen.

2.7. Analyse des déterminants génétiques de production des bactériocines

Dans le cas des souches *E. faecium* IT62 et *E. faecalis* WHE 96 les déterminants génétiques de production des bactériocines ont été séquencés pour confirmer les séquences obtenues par spectrométrie de masse et par dégradation d'Edman, et pour déterminer la présence ou pas d'un peptide leader. Pour cela, l'ADN plasmidique de ces bactéries a été isolé et amplifié en utilisant des amorces synthétisées basées sur les séquences biochimiques préalablement déterminées, ainsi que sur les données de la littérature.

2.7.1. Extraction de l'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique des souches *E. faecium* IT62 et *E. faecalis* WHE 96 a été isolé à partir de 5 ml de culture avec un kit d'extraction GeneJET™ Plasmid Miniprep (Fermentas, Hanover, MD, USA) selon le protocole indiqué par le fabricant. Les souches bactériennes sont cultivées dans un bouillon MRS à 37°C pendant 18 h. La culture est alors centrifugée à 5000 g pendant 5 min et lavée deux fois avec du PBS (tampon phosphate 10 mM, 137 mM NaCl, pH 7,4). Le culot bactérien obtenu est remis en suspension dans 250 µL de la solution de resuspension (contenant un tampon Tris à pH 8,0, de l'EDTA et de la RNase A) et vortexé jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Ensuite, 250 µl de la solution de lyse (contenant du SDS et du NaOH) sont ajoutés et le tout est mélangé par inversion 4 à 6 fois. La lyse alcaline des cellules en présence du SDS, un détergent ionique qui désorganise la membrane cellulaire et déstabilise les interactions hydrophobes, provoque la dénaturation des

acides nucléiques et des protéines. Après 5 min, 350 µl de la solution de neutralisation (contenant un tampon acétate à pH 5,5) sont ajoutés au mélange, devenu visqueux et légèrement clair, le tout est immédiatement mélangé par inversion du tube. Le NaOH est neutralisé par le tampon acétate de façon à ce que l'ADN se renature à un pH proche de 7. Les protéines et les grands brins d'ADN chromosomique ne peuvent pas se renaturer correctement forment des liaisons non spécifiques entre eux. Les molécules d'ADN plasmidique, de plus petite taille et de conformation circulaire superenroulée, ne sont pas complètement dénaturées, et retrouve leur conformation initiale une fois les conditions dénaturantes dissipées. Ainsi les l'ADN chromosomique et les protéines se lient entre eux formant des agrégats et précipitent, tandis que l'ADN plasmidique reste en solution. Les débris cellulaires et l'ADN chromosomique sont éliminés par centrifugation pendant 5 min à 12000 g et le surnageant est transféré à une colonne Spin GeneJET™ pour la purification de l'ADN extrait. Après centrifugation à 12000 g pendant 1 min, le permeat est éliminé et la colonne spin est lavée 2 fois avec 500 µl de la solution de lavage. La colonne ensuite est centrifugée pendant 1 min supplémentaire pour éliminer la solution de lavage résiduelle. Cinquante µl du tampon d'élution sont ajoutés au centre de la colonne Spin. Après une mise en contact de 2 min à température ambiante, la colonne est centrifugée pendant 2 min à 12000 g pour éluer l'ADN plasmidique qui est ensuite conservé à -20°C.

2.7.2. Amplification PCR et séquençage des nucléotides

Les amorces oligonucléotidiques utilisées ont été obtenues de Millegen (Labège, France). La réaction PCR a été effectuée en utilisant les polymerases d'ADN Taq (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) et KOD (Novagen, Darmstadt, Allemagne) avec les conditions d'amplification suivantes : un cycle initial de dénaturation (97°C pendant 2 min), suivi de 35 cycles de dénaturation (94°C for 45 s), hybridation (50 à 62°C pendant 30 s), et polymérisation (72°C pendant 15 s à 3 min), et une étape finale d'extension à 72°C pendant 7 min dans un thermocycleur d'ADN 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Les produits de PCR résultants ont été purifiés avec un kit de purification QIAquick (Qiagen, Courtaboeuf, France) et analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1% avec un système d'acquisition d'images Gel Doc 1000 (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France). Avant le séquençage, les produits de PCR ont été purifiés à partir des gels d'agarose à l'aide d'un kit de purification Ultraclean Gel Spin (Mobio, Solana Beach, CA, USA). Les amorces utilisées pour l'amplification et les produits de PCR obtenus sont indiqués dans les Tableaux 14 et 15.

L'analyse des séquences d'ADN a été effectuée par Millegen avec un kit de séquençage BigDye Terminator v3.1 (Applied biosystems) et un analyseur génétique model ABI3130XL (Applied Biosystems). Tous les produits ont été utilisés selon les indications du fabricant. L'analyse des séquences de nucléotides a été réalisée avec le logiciel DNA Strider (version 1.2). Une recherche d'homologie sur la séquence d'acides aminés prévue a été réalisée à l'aide de l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) du National Center for Biotechnology Information (NCBI). Les comparaisons et calculs d'homologie ont été réalisés avec le logiciel DNASTAR.

2.8. Détermination du spectre d'activité des bactériocines purifiées

Pour déterminer le spectre d'activité des bactériocines, les peptides purifiés ont été remis en solution dans de l'eau stérile et leur effet bactéricide a été testé sur une large gamme de microorganismes à l'aide d'un turbidimètre automatisé Bioscreen 200C (Labsystems, Helsinki, Finland) capable de suivre au cours du temps l'absorbance dans les puits d'une microplaque. Ceci a été réalisé dans le cas des bactériocines produites par *E. faecium* IT62 et *E. faecium* WHE 96. Les bactéries ont été cultivées pendant 18 h aux températures et dans les milieux de culture indiqués dans les Tableaux 16 et 17. Les cultures indicatrices ont été diluées dans du milieu de culture frais de façon à obtenir une concentration d'environ 10^5 UFC/ml, puis 190 μ l de chaque échantillon ont été placés dans les puits d'une microplaque. Des aliquotes de 10 μ L des solutions aqueuses de chaque bactériocine purifiée ont été ensuite ajoutées aux puits. Des témoins ont été réalisés en ajoutant 10 μ l d'eau déminéralisée stérile aux cultures indicatrices au lieu des 10 μ l de solutions de bactériocines. La croissance des souches indicatrices a été suivie par mesure de l'absorbance à 600 nm pendant 24 h. Un retard de croissance visible a été associé à l'élimination d'une partie de la population initiale par l'action des bactériocines. L'activité de ces dernières a été exprimée par la différence maximale d'absorbance observée entre les témoins et les échantillons avec la bactériocine. Cette différence maximale est atteinte à la fin de la phase exponentielle de croissance, entre 7 et 14 h d'incubation, selon les souches.

3

Résultats et discussion

3.1. Choix des souches indicatrices

Lors de la purification de chaque bactériocine une ou plusieurs souches indicatrices sont utilisées pour mettre en évidence l'activité de chaque fraction recueillie. Le choix de la souche indicatrice est une étape très importante, car si celle-ci n'est pas assez sensible à une ou à plusieurs des bactériocines présentes dans l'extrait de culture, on pourrait négliger certaines d'entre elles pendant le processus de purification. Pour le choix des souches indicatrices nous nous sommes basés sur les données de l'activité de l'extrait de culture brut déterminées précédemment (Tableaux 8 et 9).

Tableau 8. Spectres d'activité de l'extrait de culture des bactéries isolées du fromage de Munster (256). L'activité a été quantifiée par mesure du diamètre des zones d'inhibition obtenues par la méthode des spots.

Bactérie indicatrice	Souche	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)		
		<i>E. faecalis</i> WHE 96	<i>L. lactis</i> WHE 53	<i>L. lactis</i> WHE 99
<i>Listeria monocytogenes</i>	LC 1/2a	8	2	4
	LC 1/2b	4	2	6
	LC 1/2c	0	2	4
	LC 3a	4	2	8
	LC 3b	5	2	8
	LC 4b	2	2	6
	LC 4d	2	1,5	4
<i>Listeria innocua</i>	LC 6a	2	2	4
	LC 6b	0	1,5	3
<i>Listeria seeligeri</i>	LC 26	1	4	6
<i>Listeria ivanovii</i>		0	1,5	3
<i>Lactobacillus. rhamnosus</i>	LC Lbc	0	10	9
<i>Lactococcus. lactis</i>	ATCC 11454	0	0	0
<i>Enterococcus faecium</i>	LC 25	n.d.	2	n.d.
<i>Bacillus linens</i>	SR3	0	4	15
<i>Micrococcus sedentarius</i>	LC 33	0	n.d.	1
<i>Staphylococcus xylosus</i>	LC 57	0	8	10
<i>Staphylococcus aureus</i>		0	2	4
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 9296	0	6	8
<i>Enterococcus faecium</i>	WHE 81	0	2	3
<i>Enterococcus faecalis</i>	WHE 96	0	2	2
<i>Lactococcus lactis</i>	WHE 102	0	2	2
	WHE 99	0	0	0
	WHE 33	0	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i>		0	0	0
<i>Salmonella infantis</i>	LC 8	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	B140119	0		0

n.d : non déterminé

Tableau 9. Spectre d'activité de l'extrait de culture des souches *L. lactis* RO50 et *E. faecium* IT62, isolées au Japon d'ensilage de riz et du fourrage d'ivraie respectivement. L'activité a été déterminée par la méthode de la dilution critique.

Bactérie indicatrice	Souche	Activité (UA/ml) (:200)	
		RO50	IT62
<i>Lactococcus lactis</i>	RO50	0	512
<i>L. lactis subsp. lactis</i>	JCM 5805	16	128
<i>L. lactis subsp. raffinolactis</i>	JCM 5706	8	0
<i>Lactococcus garvieae</i>	DSM20684	4	0
<i>Pediococcus acidilactici</i>	JCM 5885	1024	256
	JCM 8797	8	0
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	JCM 5890	16	0
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	JCM 5888	512	256
<i>Enterococcus faecium</i>	JCM 5804	32	32
<i>Enterococcus faecalis</i>	JCM 5803	256	32
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 10541	8	4
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	JCM 8723	128	256
<i>Enterococcus durans</i>	JCM 8725	8	0
<i>Enterococcus gallinarum</i>	JCM 8728	64	32
<i>Enterococcus mundtii</i>	JCM 8731	0	64
<i>Enterococcus raffinosus</i>	JCM8733	2	0
<i>Enterococcus saccharolyticus</i>	JCM 8734	512	128
<i>Lactococcus casei</i>	JCM 1134	1024	0
<i>Lactococcus fructosus</i>	JCM1119	0	0
<i>Lactococcus gasseri</i>	JCM 1031	0	0
<i>Lactococcus paracasei</i>	JCM 1181	0	0
<i>Lactococcus sake</i>	JCM 1157	2048	64
<i>Lactococcus vaginalis</i>	JCM 9505	0	0
<i>Weissella confusa</i>	JCM 1093	1024	0
<i>Weissella halotolerans</i>	JCM 1114	128	0
<i>Weissella hellenica</i>	JCM 10103	64	0
<i>Weissella kandleri</i>	JCM 5817	8	0
<i>Weissella minor</i>	JCM 1168	0	0
<i>Weissella paramesenteroides</i>	JCM 9890	128	32
<i>Weissella viridescens</i>	JCM 1174	32	0
<i>Lactococcus carnosum</i>	JCM 9695	64	64
<i>Lactococcus citreum</i>	JCM 9698	4	0
<i>Lactococcus fallax</i>	JCM 9694	32	0
<i>Lactococcus lactis</i>	JCM 6123	64	0
<i>Lactococcus mesenteroides</i>	JCM 6124	1024	0
<i>Lactococcus paramesenteroides</i>	JCM 9696	512	8

Sur le Tableau 8 on peut observer que les souches *L. lactis* WHE 53 et *L. lactis* WHE 99 ont des spectres d'activité très proches et plus larges que celui de la souche *E. faecalis* WHE 96. Etant donnée la similarité de leur activité, la souche indicatrice choisie pour ces deux souches de *L. lactis* a été la même : *S. xylosus* LC 57. L'extrait de culture de la souche *E. faecalis* WHE 96 n'est par contre pas actif contre *S. xylosus* LC 57. Les souches les plus sensibles à cette bactériocine sont les souches de *L. monocytogenes*. Afin d'éviter les contraintes liées à la manipulation des souches pathogènes, des souches supplémentaires ont

été testées (données non montrées ici), ce qui a permis de retenir la souche *E. faecalis* CECT 481, même si l'activité détectée (100 UA/ml) est assez faible.

Les souches *E. saccharolyticus* ATCC 43076 (JCM 8734) et *L. lactis* RO50 ont été choisies comme indicateurs respectifs de l'activité antibactérienne des souches *L. lactis* RO50 et *E. faecium* IT62 (Tableau 9). Un indicateur supplémentaire, *E. faecium* WHE 81, a été utilisé pour *E. faecium* IT62, ce qui a permis de détecter la présence d'une troisième bactériocine, à spectre d'activité étroit, produite par cette souche.

3.2. Purification et déterminations structurales des bactériocines

3.2.1. Bactériocines de *L. lactis*

3.2.1.1. *L. lactis* RO50

La purification de la bactériocine produite par *L. lactis* RO50 a été effectuée en quatre étapes successives. Une précipitation de l'ensemble des protéines de l'extrait de culture a été réalisée à 70 % de saturation en sulfate d'ammonium. Le précipité obtenu a été solubilisé dans 17 ml de tampon acétate à pH 6,0 et une activité de 6400 UA/ml a été mesurée pour la fraction I. Aucune activité n'a été détectée dans le surnageant.

La concentration en sels de la fraction I étant trop élevée pour un passage sur un échangeur de cations, une étape de dessalage préalable a donc été réalisée à l'aide d'une colonne de perméation sur gel avec une phase stationnaire Sephadex G-25. Comparée aux autres techniques de chromatographie liquide, la résolution de la perméation sur gel est faible et ce dessalage ne constitue pas vraiment une étape de purification, d'autant qu'il doit être effectué à un débit très élevé (10 ml/min). Puisque la séparation s'effectue sans adsorption et l'élution est réalisée en mode isocratique, l'échantillon n'est pas concentré pendant la séparation mais légèrement dilué. Le volume d'échantillon applicable à ce type de colonnes est limité par sa taille et la totalité de la fraction I ne peut pas être injectée en une seule fois. Deux injections de 10 ml ont été réalisées et des fractions de 7 ml ont été collectées. Les fractions 3 à 6 obtenues après chaque injection, présentant une activité importante, ont été rassemblées (fraction I).

Les bactériocines ayant des pI élevés, elles sont généralement bien retenues sur des colonnes échangeuses de cations aux pH neutres (237). Toutefois, étant donné les grandes

quantités de protéines et autres impuretés présentes dans un milieu de culture, de faibles variations de pH influencent grandement la quantité de bactériocine retenue, mais aussi la pureté des fractions recueillies. En effet, à des pH faibles (éloignés du pI) une quantité importante de bactériocine peut être retenue mais cela se fait aux dépens de la pureté des échantillons. Dans les conditions utilisées pour cette purification (échange de cations à pH 6,0), une partie de la bactériocine est perdue lors du chargement de la colonne et du lavage. Toutefois, puisque la priorité ici est la pureté de la bactériocine et non le rendement, l'utilisation d'un pH de 6,0 a été satisfaisante. Les fractions 24 à 33, d'un volume total de 50 ml, sont réunies (fraction II).

En raison de la nature relativement hydrophobe de la bactériocine, la dernière étape de purification est une chromatographie HPLC en phase inverse. Le chromatogramme obtenu à partir de la fraction II est représenté dans la figure 12.

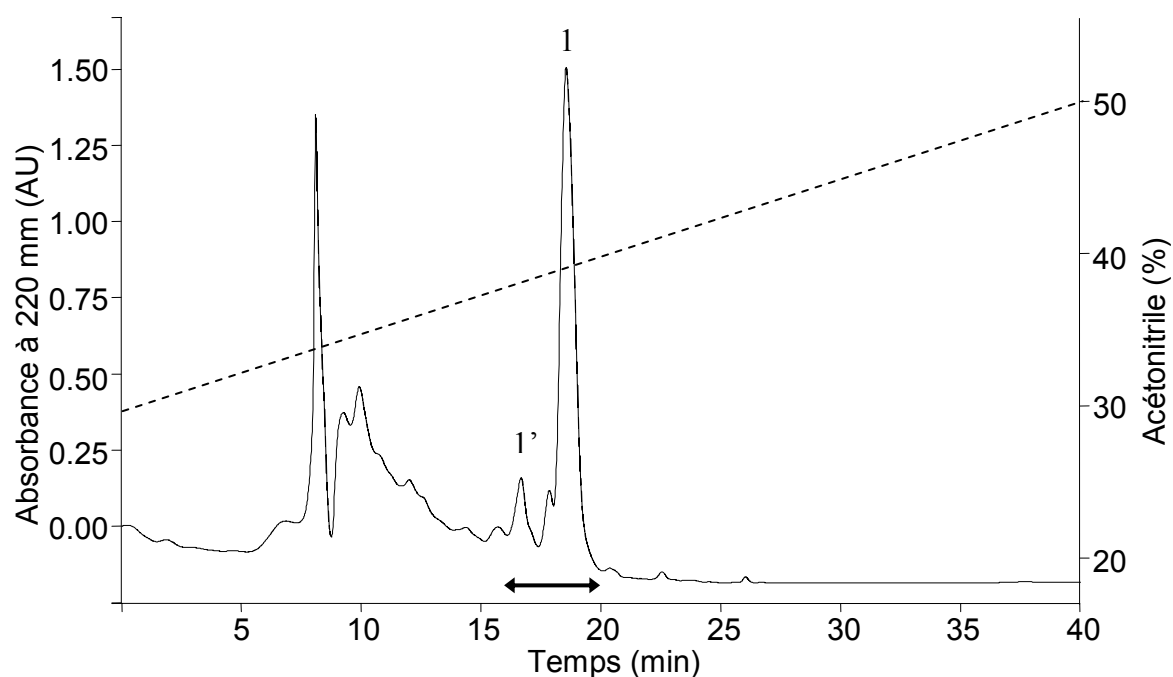


Figure 12. Purification de la bactériocine de RO50 par HPLC sur colonne C8. Profil chromatographique à 220 nm (—) ; gradient d'acétonitrile dans l'eau utilisé (---). La flèche noire indique les fractions actives.

Les fractions actives (17-20) correspondent à deux pics chromatographiques : 1' et 1. L'activité a été évaluée par la méthode de la dilution critique avec les résultats suivants : fraction 17 : 400 UA/ml ; fraction 18 : 400 UA/ml ; fraction 19 : 3200 UA/ml ; fraction 20 :

400 UA/ml. La fraction 20 contient visiblement une activité résiduelle correspondant au pic chromatographique 1 lequel coïncide en majorité avec la fraction 19. Cette dernière présente une pureté suffisante pour être analysée par spectrométrie de masse, par conséquent elle a été utilisée pour les analyses ultérieures de caractérisation de la bactériocine.

A la seule vue du chromatogramme (Figure 12), il est difficile de déterminer si le pic 1' correspond également à un composé actif ou si la bactériocine correspond seulement au pic 1 et que l'activité mesurée dans la fraction 17 est due aux premières molécules de bactériocine sorties à la base du pic. En vue de cette détermination, la fraction 17 a été diluée dans de l'eau contenant 0,1% de TFA et rechromatographiée dans les mêmes conditions qu'auparavant. Un pic bien séparé, correspondant à un temps de rétention de 17 min a été ainsi obtenu (Figure 13). La méthode des spots a montré une activité bactéricide dans les fractions 17 et 18, confirmant que le pic 1' est aussi actif. La fraction 17 étant la plus active, elle a été récupérée et analysée par spectrométrie de masse.

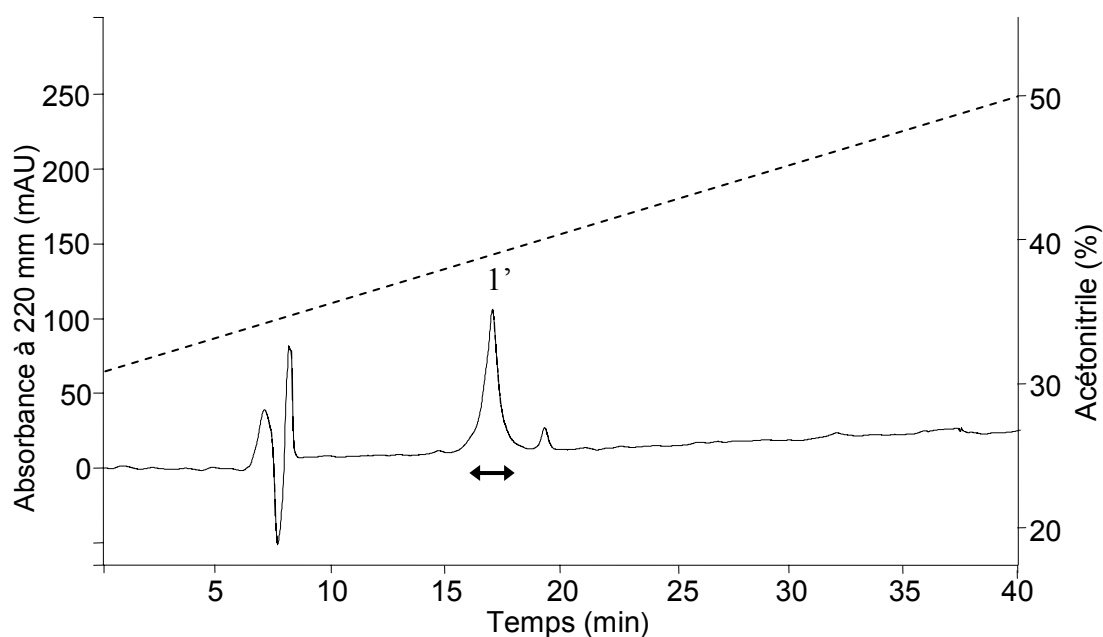


Figure 13. Purification du peptide correspondant au pic 1', obtenu à partir d'une culture de la souche RO50, par HPLC sur colonne C8 (fraction 16 de la Figure 12 repassée). Profil chromatographique à 220 nm (—) ; gradient d'acétonitrile dans l'eau utilisé (---). La flèche noire indique les fractions actives.

La masse des peptides correspondant aux pics 1 (RO50 1) et 1' (RO50 1') a été mesurée par ESI-MS (Figure 14). La masse moléculaire moyenne calculée pour le peptide RO50 1 après déconvolution du spectre obtenu est de 3330,6 Da. Pour le peptide RO50 1' la masse moléculaire moyenne calculée est de 3346,7 Da.

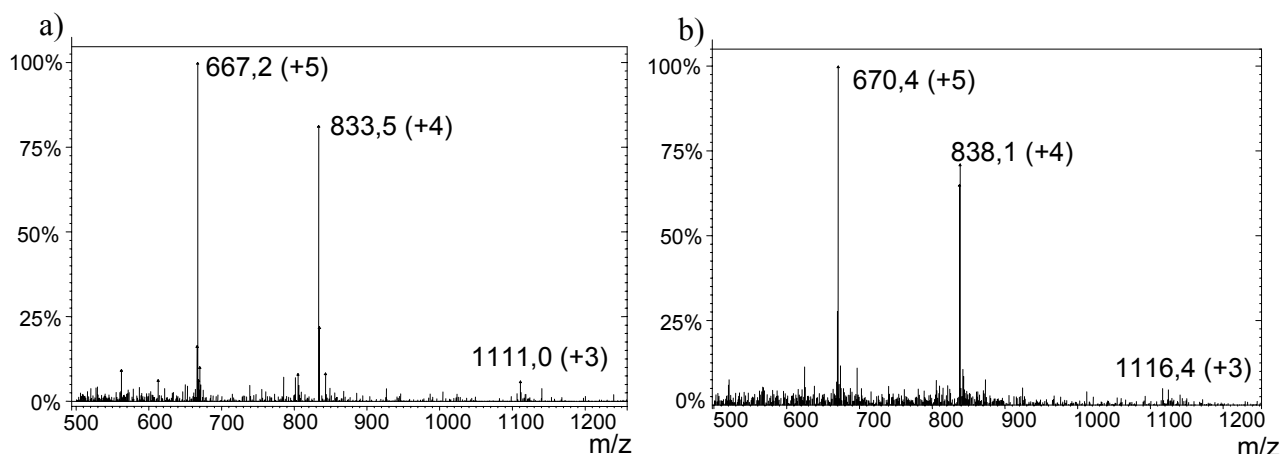
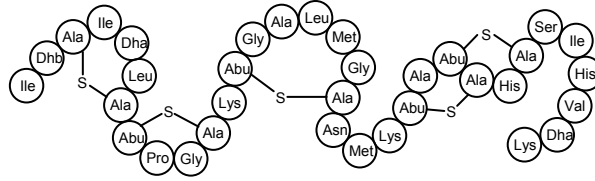


Figure 14. Spectres de masse réalisés par ESI-MS des peptides purifiés. a) RO50 1; b) RO50 1'.

La comparaison des masses mesurées pour les deux peptides purifiés avec les données de la littérature a montré que la masse du peptide RO50 1 est la même que celle de la nisine Z. Il est donc très probable qu'il s'agisse de la nisine Z. La nisine est en effet le lantibiotique le plus largement étudié et six variantes naturelles ont été trouvées à ce jour. Les structures et les masses moléculaires nisines A, Z, Q, U, U2 et F, qui diffèrent en un ou plusieurs acides aminés, sont représentées dans la Figure 15.

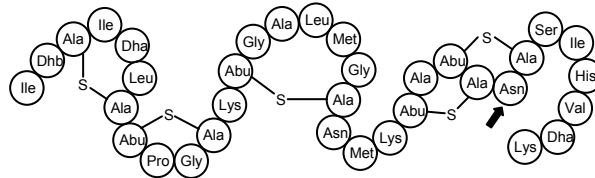
Nisin A

M mono = 3351,6 Da
M moy = 3354,2 Da



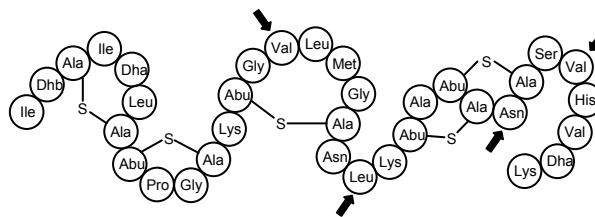
Nisin Z

M mono = 3328,6 Da
M moy = 3331,2 Da



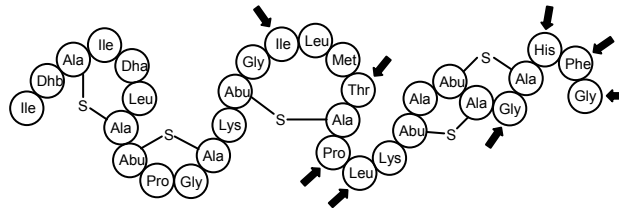
Nisin Q

M mono = 3324,6 Da
M moy = 3327,2 Da



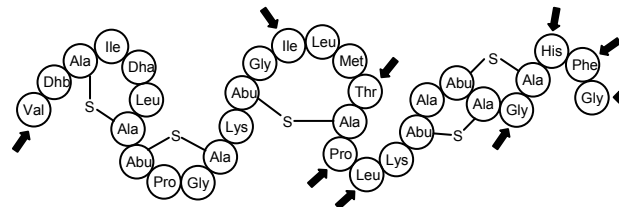
Nisin U

M mono = 3027,5 Da
M moy = 3029,8 Da



Nisin U2

M mono = 3013,5 Da
M moy = 3015,8 Da



Nisin F

M mono = 3314,5 Da
M moy = 3317,1 Da

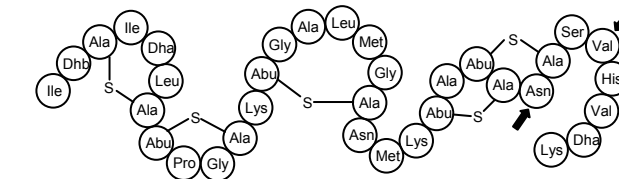


Figure 15. Séquences d'acides aminés et masses moyenne et monoisotopique (calculées théoriquement) des six variants naturels de la nisine. Les acides aminés différents entre les quatre variants sont marqués par une flèche.

La masse obtenue pour le peptide RO50 1' ne correspond à aucun des variants connus de la nisine. Cependant, cette masse, de 16 Da plus élevée que celle du peptide RO50 1, suggère que RO50 1' représente probablement une forme oxydée de RO50 1. L'oxydation de la nisine et des autres lantibiotiques est un phénomène largement répertorié dans la littérature

(65, 195, 250). Lors de la purification d'une bactériocine produite par *L. diacetylactis* UL 719, Meghrouh *et al.* (195) ont trouvé deux peptides similaires à ceux produits par *L. lactis* RO50 : l'un, avec une masse de 3330,39 Da a été identifié comme la nisine Z et l'autre, avec une masse de 3346,39 a été identifié comme un produit oxydé de la nisine Z. Des espèces chimiquement modifiées ont également été identifiées dans le cas de la nisine A par Rollema *et al.* (250). Le chromatogramme qu'ils ont obtenu ainsi que les espèces moléculaires correspondant à chaque pic sont montrés dans la Figure 16.

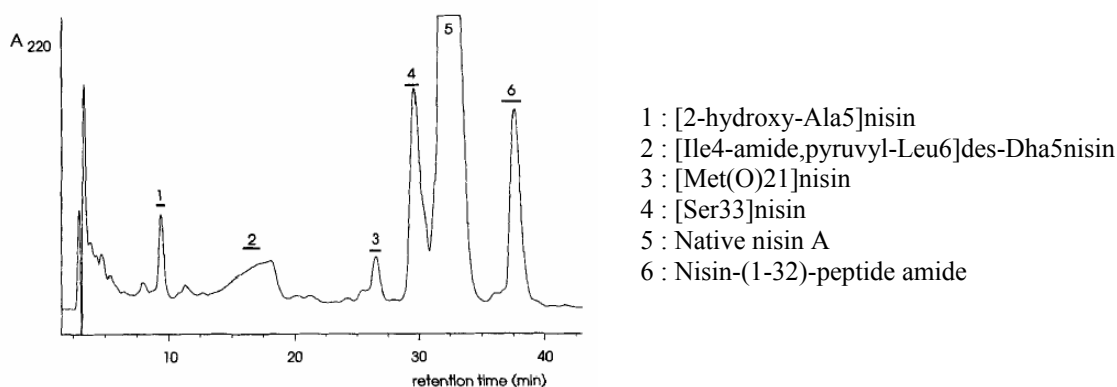


Figure 16. Profil HPLC d'une préparation commerciale de nisine A utilisée pour l'isolement des espèces chimiquement modifiées de cette bactériocine par Rollema *et al.* (250)

Ce chromatogramme a été comparé avec celui obtenu lors de la purification de notre bactériocine (Figure 12). Le pic 5 correspond à la forme native de la nisine A et le pic 3 à une forme de celle-ci oxydée sur la méthionine en position 21. Lors de la comparaison des deux chromatogrammes, nous pouvons observer une analogie entre le pic 1' (Figure 12) et le pic 3 (Figure 16), dans les deux cas il s'agit d'un petit pic sorti un peu avant le grand pic de nisine. La forme oxydée de la nisine A, encore active, est plus grande de 16 Da que sa forme native. Ceci est également le cas du peptide RO50 1' qui, sur la base de ces observations, correspondrait donc à une forme de la nisine Z oxydée sur la méthionine en position 21. L'oxydation des résidus de méthionine est un phénomène courant pour les bactériocines. L'atome de soufre se transforme en sulfoxyde, ce qui résulte en un incrément de masse de 16 Da (Figure 17).

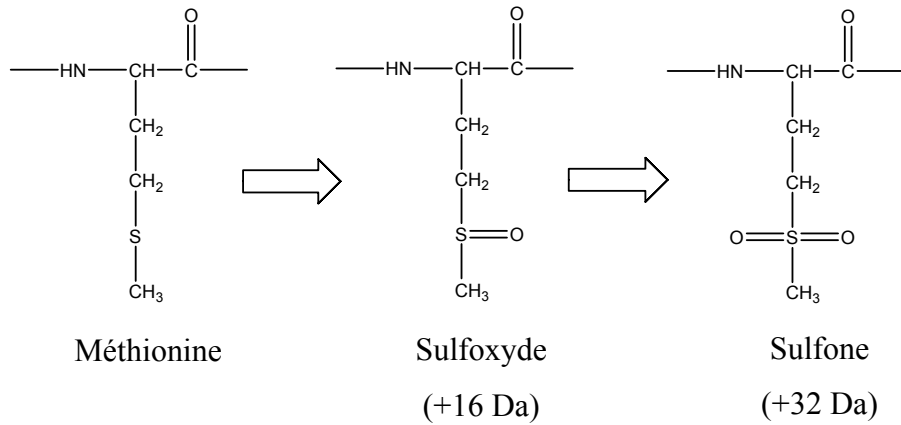


Figure 17. Oxydation des résidus méthionine dans une structure protéique.

3.2.1.2. *L. lactis* WHE 99 et *L. lactis* WHE 53

Les souches *L. lactis* WHE 99 et *L. lactis* WHE 53, isolées du fromage Munster, sont aussi productrices de bactériocines. Le spectre d'activité de ces deux souches étant très similaire, la même souche indicatrice a été utilisée lors de la purification des bactériocines produites : *S. xylosus* 57. L'activité détectée à partir de l'extrait de culture de *L. lactis* WHE 99 était plus élevée que celle détectée pour *L. lactis* WHE 53. Ceci pourrait indiquer que la bactériocine produite par *L. lactis* WHE 99 est plus active que celle produite par *L. lactis* WHE 53 ou bien que les deux souches produisent la même bactériocine (vu la similarité du spectre d'activité) mais la quantité produite par *L. lactis* WHE 99 est plus importante. Le même protocole en quatre étapes utilisé pour la purification de la bactériocine produite par *L. lactis* RO50 a été utilisé pour les souches *L. lactis* WHE 53 et *L. lactis* WHE 99. Les chromatogrammes obtenus après l'étape de purification par chromatographie en phase inverse sont montrés dans la Figure 18.

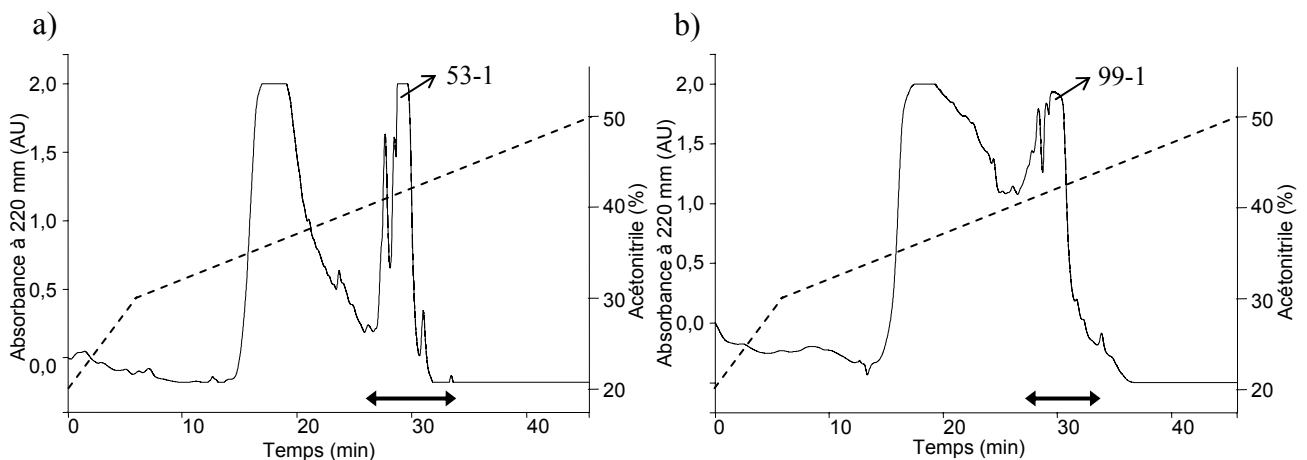


Figure 18. Séparation par HPLC sur colonne C8 des bactériocines produites par : a) *L. lactis* WHE 53 ; b) *L. lactis* WHE 99. Profil chromatographique à 220 nm (—) ; % d'acétonitrile dans l'eau utilisé pour le gradient (- - -). Les flèches noires indiquent les fractions actives.

Ces chromatogrammes montrent des pics, tant de bactériocines que d'impuretés voisines, très importants avec des signaux qui saturent le détecteur à 220 nm (Figure 18). Les pics des bactériocines (appelés respectivement 53-1 et 99-1 pour *L. lactis* WHE 53 et *L. lactis* WHE 99) obtenus sont ainsi mal résolus. L'activité, testée par la méthode des spots, est détectée dans les fractions 27 à 34 pour *L. lactis* WHE 53 et 28 à 34 pour *L. lactis* WHE 99. Les zones d'inhibition avec les diamètres majeurs ont été observées pour les fractions centrales : 29 et 30 pour *L. lactis* WHE 53 et 30 et 31 pour *L. lactis* WHE 99. Celles-ci ont été collectées et analysées par ESI-MS (Figure 19).

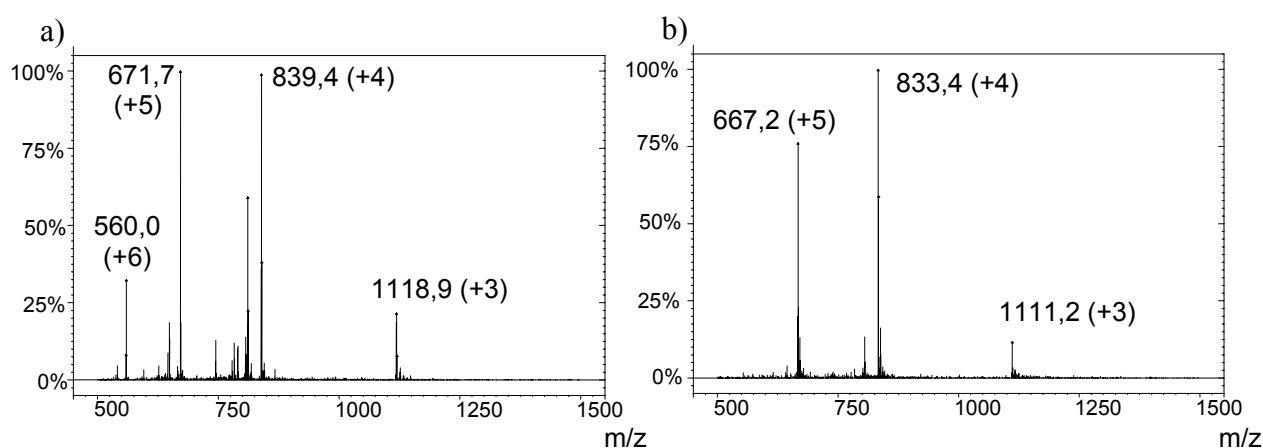


Figure 19. Spectres de masse réalisés par ESI-MS des fractions collectées après séparation par HPLC de la Figure 18. a) *L. lactis* WHE 53, fractions 29 et 30 (53-1); b) *L. lactis* WHE 99, fractions 30 et 31 (99-1).

Les spectres obtenus montrent que la pureté des fractions est suffisante pour permettre la détermination de masse des peptides majoritaires. La masse moléculaire moyenne calculée pour le peptide produit par *L. lactis* WHE 53 (Figure 19a) est de 3353 Da, ce qui correspond à la masse moléculaire de la nisine A (Figure 15). Dans le cas du peptide produit par *L. lactis* WHE 99 (Figure 19b), la masse moléculaire obtenue est de 3330 Da, la même que celle de la nisine Z (Figure 15). Les fractions centrales les plus actives obtenues à partir de *L. lactis* WHE 53 et de *L. lactis* WHE 99 correspondent donc respectivement à la nisine A et à la nisine Z.

Dans les deux cas, l'activité est toutefois étendue sur une large gamme de fractions, ce qui est sans doute dû aux quantités importantes de nisine en présence, mais pourrait également être le fait d'autres peptide actifs élués au voisinage des pics de nisine. Afin de vérifier ceci, toutes les fractions présentant une activité bactéricide sauf celles correspondant au pic de nisine (29 et 30 pour *L. lactis* WHE 53 et 30 et 31 pour *L. lactis* WHE 99) ont été réunies et rechromatographiées avec le même gradient que précédemment. Les chromatogrammes

obtenus ont révélé la présence de plusieurs pics. La Figure 20 représente la zone d'intérêt de ce chromatogramme (entre 20 et 40 min).

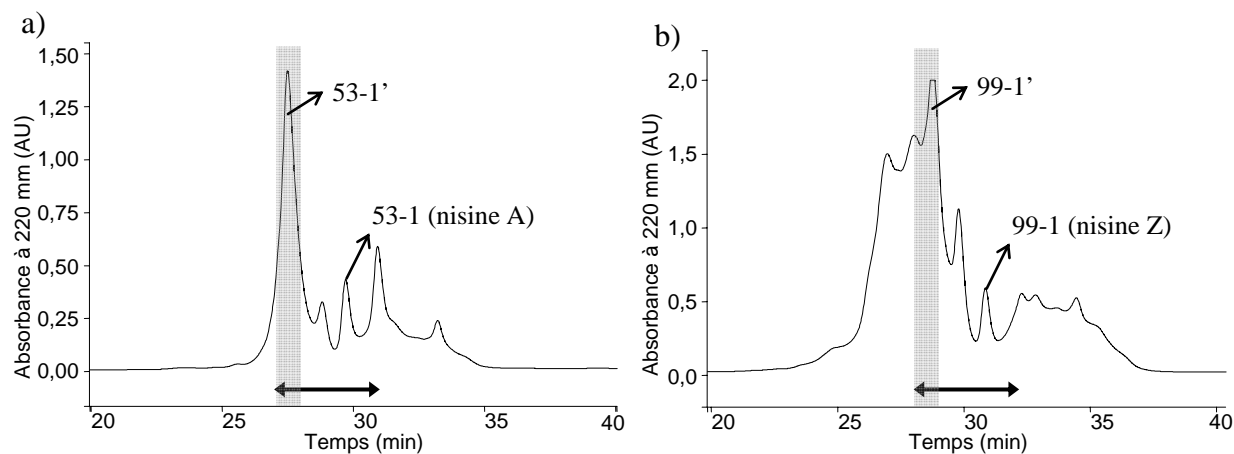


Figure 20. Séparation par HPLC sur colonne C8 des fractions d'intérêt collectées : a) *L. lactis* WHE 53, fractions 27-28 et 31-34 ; b) *L. lactis* WHE 99, fractions 28-29 et 32-34. Profil chromatographique à 220 nm. Les flèches noires indiquent les fractions actives. Les zones grises représentent les fractions, correspondant aux pics 53-1' et 99-1' qui ont été collectées et analysées par ESI-MS.

Dans ces chromatogrammes, les pics correspondant aux nisines A et Z peuvent encore être observés, mais ils sont peu intenses pour expliquer l'étendue de l'activité observée (indiquée par les flèches noires sur la Figure 20), surtout parce que les fractions plus actives sont celles sorties avant le pic de nisine (marquées en gris sur la Figure 20). Il est donc envisageable que d'autres peptides actifs puissent exister aux côtés des nisines. La fraction 28 (Figure 20a) dans le cas de *L. lactis* WHE 53 et la fraction 29 (Figure 20b) dans le cas de *L. lactis* WHE 99, ont été collectées et repassées sur la colonne C8 dans les mêmes conditions chromatographiques que précédemment. Un pic propre a été obtenu dans chaque cas (Figure 21).

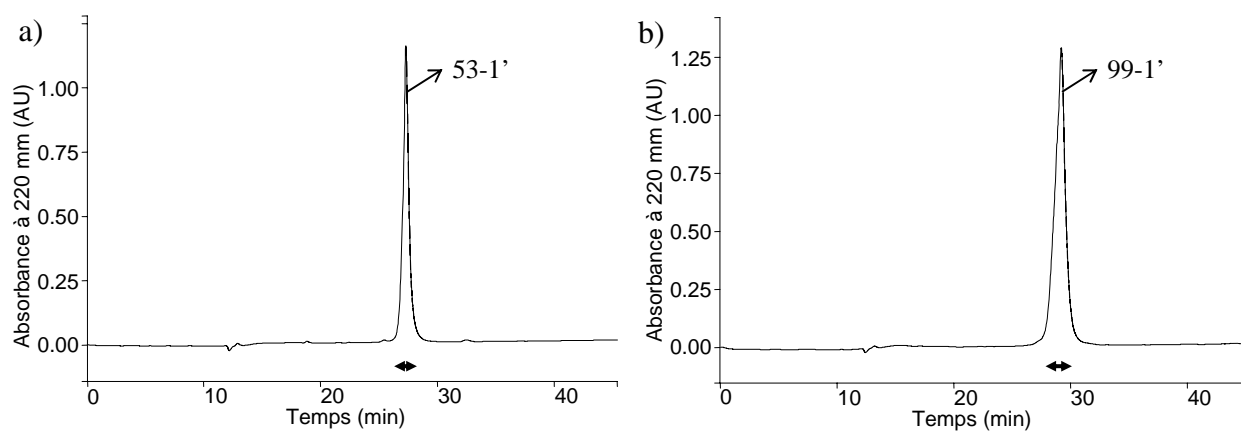


Figure 21. Repassage sur colonne C8 des fractions collectées après la chromatographie représentée dans la Figure 20 : a) *L. lactis* WHE 53, fraction 28 ; b) *L. lactis* WHE 99, fraction 29. Profil chromatographique à 220 nm. Les flèches noires indiquent les fractions actives

Les peptides 53-1' et 99-1' ont été testés par la méthode des spots sur la même souche indicatrice que dans le cas des nisines (*S. xylosus* 57) et se sont montrés actifs. Il ont alors été analysés par ESI-MS (Figure 22).

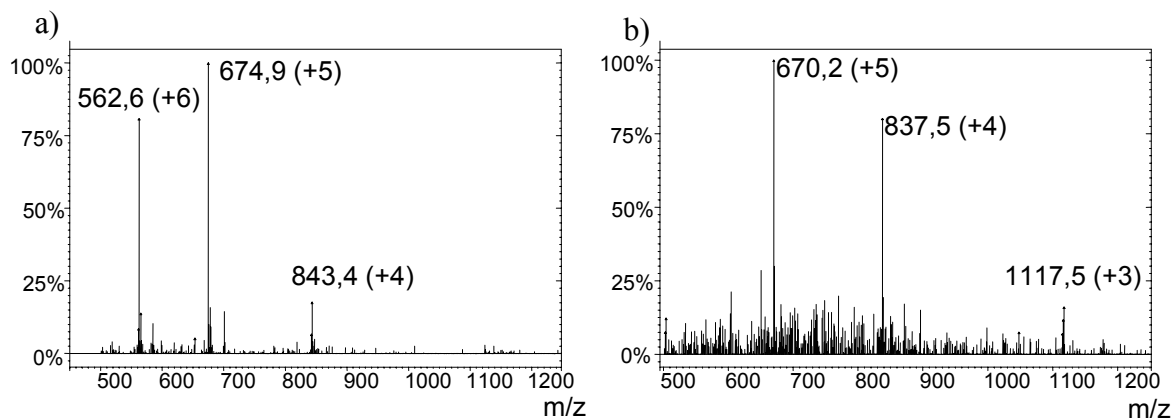


Figure 22. Spectres de masse des peptides 53-1' et 99-1' réalisés sur un spectromètre de masse ESI-MS. a) *L. lactis* WHE 53 (53-1') ; b) *L. lactis* WHE 99 (99-1').

La masse moléculaire moyenne calculée pour le peptide 53-1' est de 3369 Da, ce qui est 16 Da supérieur à la masse mesurée pour le peptide 53-1 (3353 Da), identifié comme la nisine A. La même différence de 16 Da a été observée entre les peptides 99-1' (3346 Da) et 99-1 (3330 Da). Cette différence de 16 Da correspond, comme dans le cas de *L. lactis* RO50, à une oxydation d'un résidu méthionine. Il apparaît donc que la souche *L. lactis* WHE 53 produit la nisine A, une partie de laquelle a été retrouvée sous forme oxydée, et que la souche *L. lactis* WHE 99 produit une autre forme de nisine, la nisine Z, dont une partie est également oxydée.

La nisine (A) est une bactériocine très répandue dans la nature, elle est aussi la plus étudiée et la seule autorisée comme additif dans les aliments. Il n'est donc pas étonnant que les trois souches de *L. lactis* étudiées dans ce travail soient productrices de nisine. Ce lantibiotique est particulièrement présent parmi les souches de *L. lactis*, ce qui a été illustré à nouveau ici à travers *L. lactis* WHE 53 et *L. lactis* WHE 99, deux souches isolées de même source (fromage de Munster) et capables de produire deux variants de la nisine, la nisine A et la nisine Z. Cette dernière est également produite par une autre souche d'une origine très différente : *L. lactis* RO50, isolée du fourrage d'ivraie au Japon. Il est à noter par ailleurs que, des six variants naturelles connues à ce jour, la nisine U, produite par *Streptococcus Uberis*, est la seule à avoir été caractérisée à partir d'une souche autre que *L. lactis*.

Dans les trois cas étudiés, une forme oxydée de la nisine, consistant en une oxydation sur la méthionine en position 21, a été mise en évidence. Ces formes oxydées sont présentes en petites quantités et peuvent être formées pendant la biosynthèse de la bactériocine, pendant la manipulation ou pendant la conservation des échantillons. L'oxydation des résidus de méthionine a lieu à des pH bas (32). Ainsi, les étapes de purification où le matériel est maintenu à pH acide, comme par exemple la chromatographie en phase inverse qui est réalisée avec des phases mobiles contenant du TFA, favoriseraient la formation d'oxydes de nisine A et Z. Des phénomènes d'oxydation ont déjà été rapportés pour la nisine et pour d'autres bactériocines (66, 250), avec des effets différents. Par exemple, l'oxydation des cystéines dans la lactococcine B et dans la leucocine A-UAL 187 réduisait l'activité antibactérienne de ces bactériocines (122, 294). Par contre, l'activité de la sakacine A n'était pas modifiée par l'oxydation. Dans notre étude, la différence d'activité entre les formes oxydées et non oxydées n'a pas été quantifiée.

L'effet des modifications chimiques telles que l'oxydation sur l'activité d'une bactériocine dépend de la structure de celle-ci, de l'endroit spécifique où l'oxydation a lieu et de la souche indicatrice sur laquelle l'activité est testée (93, 234, 250). Rollema *et al.* (250) ont étudié l'activité de 5 produits de dégradation de la nisine et ont observé que les modifications dans la partie C-terminale de la molécule avaient peu ou pas d'influence sur l'activité biologique. Cependant, les modifications sur le premier anneau Lan (Figure 15) ont un effet très important, le domaine N-terminal étant essentiel à une activité complète du lantibiotique. Ainsi, la formation de 2-hydroxyalanine en position 5 diminue considérablement l'activité biologique de la nisine (diminution d'un facteur 150).

Selon Rollema *et al.* (250), l'oxydation de la méthionine en position 21 (la même oxydation que nous avons observée lors de notre purification des nisines A et Z), a un effet faible sur l'activité du peptide, en la réduisant d'un facteur 2-3 (250). Le résidu en position 21 agissant comme une charnière flexible entre les deux grands domaines structuraux de la nisine semble lui aussi être important pour l'activité de formation de pores. Des mutations au niveau de cette charnière flexible entraînent l'incapacité totale de former des pores, mais ne réduisent que légèrement l'activité *in vivo* du lantibiotique. Cette activité maintenue est due au maintien du 2^{ème} mécanisme d'action de la nisine : la capacité de fixation au lipide II empêchant son incorporation dans le peptidoglycane.

3.2.2. Bactériocines d'*E. faecium*

3.2.2.1. Purification des bactériocines produites par *E. faecium* IT62

La souche *E. faecium* IT 62 a été isolée du fourrage d'ivraie ou ryegrass d'Italie (*Lolium multiflorum*) au Japon. Deux souches indicatrices ont été utilisées pour révéler et suivre l'activité antibactérienne d'*E. faecium* IT 62 : *L. lactis* RO50 et *E. faecium* WHE 81. La sensibilité de ces deux souches à la bactériocine produite par *E. faecium* IT 62 indique qu'il ne s'agit, ni de la nisine (produite par *L. lactis* RO50), ni des entérocinés A et B (produites par *E. faecium* WHE 81) puisque les souches productrices sont immunes à leurs propres bactériocines. L'activité détectée dans l'extrait de culture de cette souche est toutefois plus faible que celle détectée pour les souches de *L. lactis* RO50, WHE 53 et WHE 99.

Le protocole utilisé pour la purification des autres bactériocines a été appliqué dans le cas de cette souche avec quelques modifications. Les étapes de précipitation au sulfate d'ammonium et de dessalage n'ont pas été réalisées et l'extrait de culture sans préconcentration a été directement passé sur un échangeur de cations. Le pI des bactériocines produites par *E. faecium* IT62 étant plus élevé que celui des nisines, l'activité n'est pas éluée avec une concentration de NaCl de 0,4 M, mais un gradient de 0 jusqu'à 1 M de NaCl a été nécessaire. Contrairement aux purifications précédentes où l'activité à la sortie de l'échangeur de cations correspondait à un même groupe fractions, dans le cas présent, deux groupes de fractions actives bien séparées ont pu être observés. Quand *L. lactis* RO50 était utilisé comme indicateur, seules les fractions éluées entre 30 et 39 min (fraction IIa) montraient une activité, mais quand l'indicateur utilisé était *E. faecium* WHE 81, une activité bactéricide était également détectée dans les fractions éluées entre 50 et 62 min (fraction IIb).

Les fractions IIa et IIb ont été injectées séparément sur une colonne en phase inverse C8. Le chromatogramme obtenu pour la fraction IIa (Figure 23a) a montré la présence de quatre pics d'absorbance bien résolus. L'activité a été détectée dans les fractions correspondant aux pics 1, 2 et 2'. Les fractions correspondant aux pics 1 et 2 ont été collectées et rechromatographiées (Figure 23b) afin d'isoler les deux peptides. L'activité de chaque peptide isolé a été confirmée vis-à-vis des deux souches indicatrices.

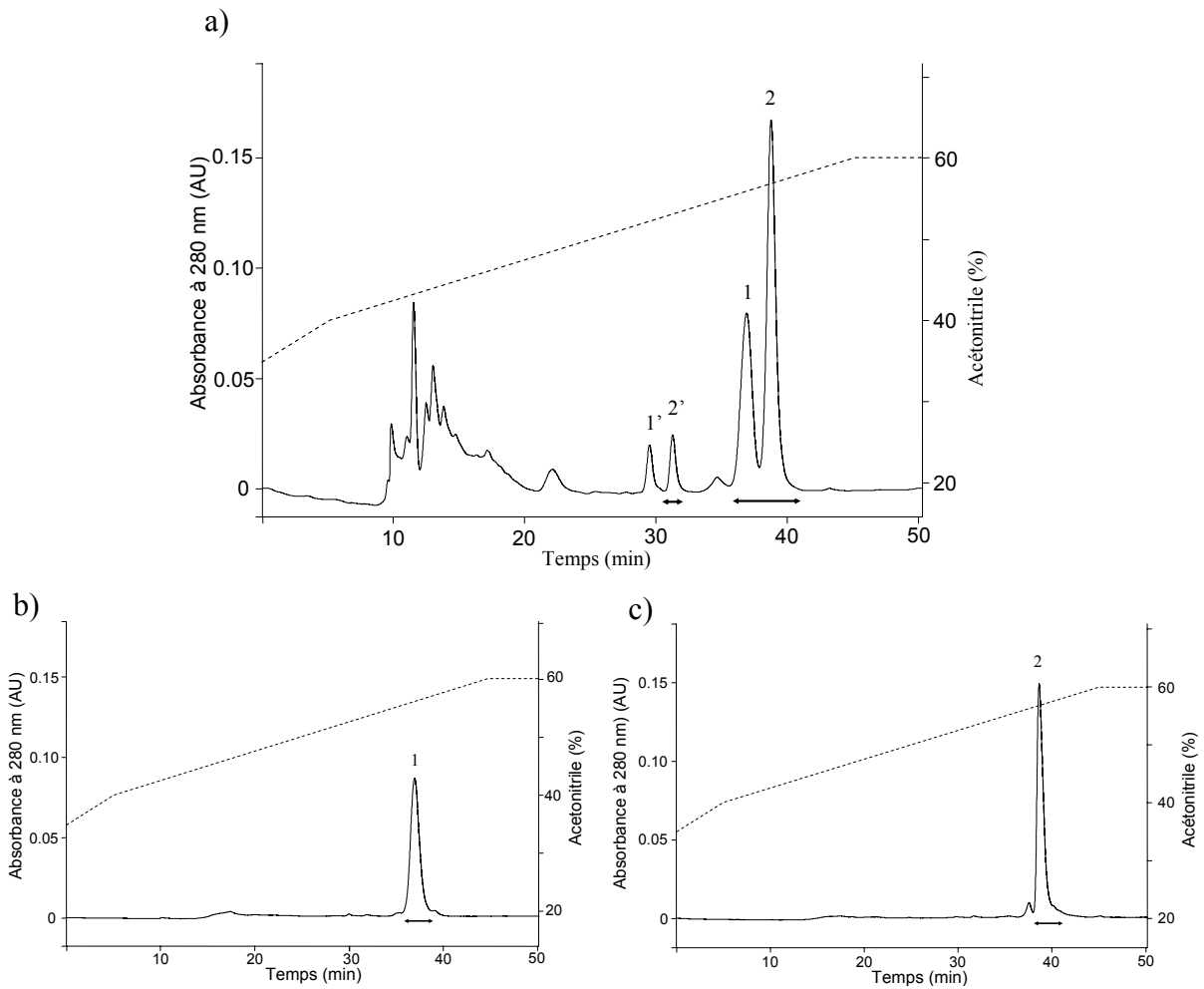


Figure 23. Purification des bactériocines de *E. faecium* IT62 par HPLC sur colonne C8 (fraction IIa). Profil chromatographique à 280 nm (—) ; gradient d'acétonitrile dans l'eau utilisé (---). a) Fraction IIa ; b) Peptide 1 isolé ; c) Peptide 2 isolé. Les flèches noires indiquent les fractions actives.

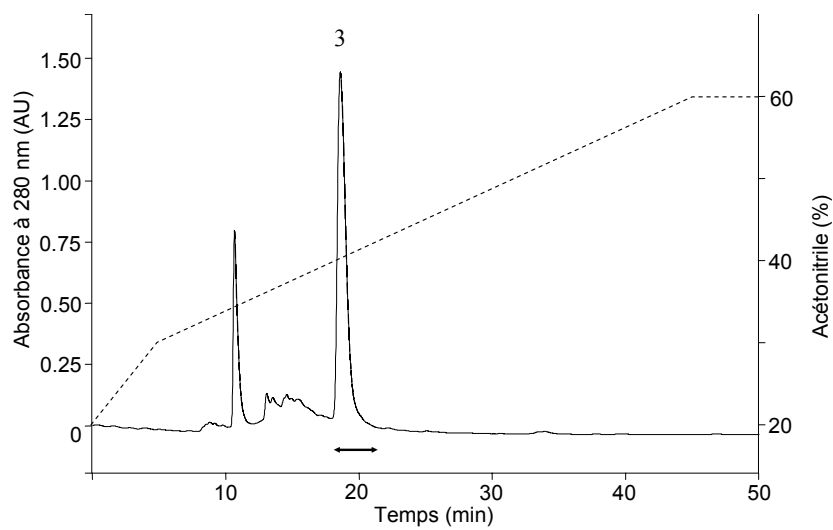


Figure 24. Purification des bactériocines de *E. faecium* IT62 par HPLC sur colonne C8 (fraction IIb). Profil chromatographique à 280 nm (—) ; gradient d'acétonitrile dans l'eau utilisé (---). La flèche noire indique les fractions actives.

L'analyse par chromatographie en phase inverse de la fraction IIb (Figure 24) a révélé un seul pic actif très bien résolu (pic 3). Le peptide correspondant à ce pic est actif contre *E. faecium* WHE 81, mais aucune activité n'a été détectée contre *L. lactis* RO50.

3.2.2.2. Détermination des masses moléculaires

Les masses moléculaires des quatre peptides actifs (correspondant aux pics 1, 2, 2' et 3) ont été mesurées par ESI-MS. Les masses moléculaires moyennes calculées sont les suivantes : 5206 Da pour le peptide 1, 5218 Da pour le peptide 2, 5234 Da pour le peptide 2' et 6390 Da pour le peptide 3. Le peptide non actif correspondant au pic 1' a aussi été analysé par ESI-MS, et la masse moyenne obtenue est de 5222 Da. Les spectres de masse obtenus sont montrés dans la Figure 25.

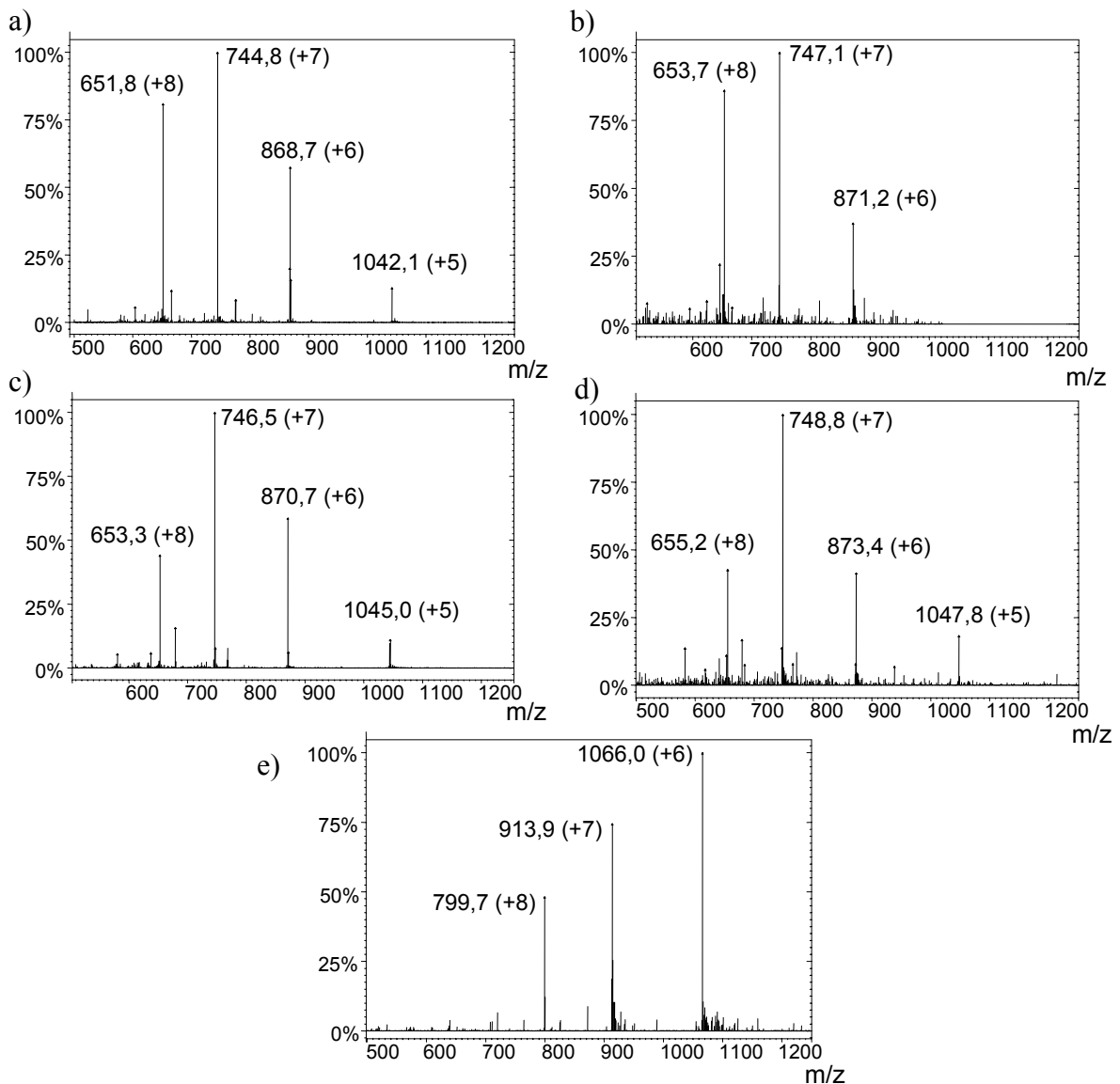


Figure 25. Spectres de masse réalisés par ESI-MS des bactériocines produites par *E. faecium* IT62. a) Peptide 1 b) Peptide 1'; c) Peptide 2; d) Peptide 2'; e) Peptide 3.

Les masses moléculaires des peptides purifiés à partir de l'extrait de culture *d'E. faecium* IT62 ont été comparées avec celles des bactériocines déjà connues. Les masses moléculaires des peptides 1 et 2 sont proches respectivement de celles des entérocinines L50B et L50A (47). Un incrément de masse de 16 Da suggère que les peptides 1' et 2' sont des formes oxydées respectives des peptides 1 et 2. En revanche, la masse moléculaire du peptide 3 ne correspondait à aucune bactériocine connue dans la littérature.

3.2.2.3. Caractérisation des peptides 1, 1', 2 et 2' : entérocinines L50A et L50B

Les trois peptides actifs 1, 2 et 2' ont été digérés à la trypsine et analysés par nano-LC-MS/MS. La comparaison des résultats obtenus avec la base de données NCBIInr, à l'aide du moteur de recherche Mascot, a permis l'identification des entérocinines L50A dans le cas du peptide 2 et L50B dans le cas du peptide 1 (Tableau 10).

Tableau 10. Fragments peptidiques issus de la digestion trypsique des peptides 1, 2, 2' et analysés par nano-LC/MS/MS, et séquences des bactériocines correspondantes identifiées par recherche Mascot sur la base de données NCBIInr.

Peptide	Masse (exp) (Da)	Séquence du fragment	Modification	Bactériocine	Séquence du peptide ^a
1	617,32	MGAI AK	Met N-formylation	L50B	<u>MGAI AKLVTKFGWPLIK</u> <u>KFYKQIMQFIGQGWTID</u> <u>QIEKWLKRH</u>
	859,44	FGWPLIK			
	987,50	FGWPLIKK			
	3024,00	QIMQFIGQGWTIDQIEK			
2	617,32	MGAI AK	Met N-formylation	L50A	<u>MGAI AKLVAKFGWP IVK</u> <u>KYYKQIMQFIGEGWAIN</u> <u>KIIEWIKKHI</u>
	1028,53	MGAI AKLVAK	Met N-formylation		
	845,43	FGWP IVK			
	1633,81	QIMQFIGEGWAINK			
2'	617,32	MGAI AK	Met N-formylation	L50A	<u>MGAI AKLVAKFGWP IVK</u> <u>KYYKQIMQFIGEGWAIN</u> <u>KIIEWIKKHI</u>
	845,43	FGWP IVK			
	1649,81	QIMQFIGEGWAINK	Met oxydation		

^aLes fragments tryptiques identifiés par nanoLC-MS/MS sont soulignés.

La recherche Mascot a été réalisée en incluant la possibilité d'oxydation des résidus méthionine (Met) et de N-formylation, car ces types de modifications sont courants parmi les bactériocines (17, 289). En fait, deux formes de L50A ont été identifiées : l'une d'elles était formylée sur la méthionine N-terminale (Peptide 2) et la deuxième était oxydée sur la méthionine en position 24 et formylée sur la méthionine N-terminale (Peptide 2').

L'entéroïne L50B a été identifiée avec une formylation sur la méthionine N-terminale (Peptide 1).

Ces résultats concordent avec les masses moléculaires des peptides non digérés déterminées par les analyses ESI-MS (Tableau 11). Le peptide 1' n'a pas été analysé par nano-LC/MS/MS, cependant l'analogie entre le profil d'élution des peptides 1 et 1' et celui des peptides 2 et 2', ainsi que la différence de 16 Da entre ces peptides suggère que le peptide 1' correspond à l'entéroïne L50B avec une formylation sur la méthionine N-terminale et une oxydation sur la méthionine en position 24. Les entéroïnes L50A et L50B non modifiées n'ont pas été isolées, ce qui suggère que la formylation sur la méthionine N-terminale peut être une modification native qui a lieu pendant la biosynthèse de la bactériocine.

Tableau 11. Tableau récapitulatif des masses des entéroïnes L50A et L50B purifiées

	Masse théorique	+ formylation N-terminale	+ formylation N-terminale + oxydation Met24
L50A	5190 Da	5218 Da → Peptide 2	5234 Da → Peptide 2'
L50B	5178 Da	5206 Da → Peptide 1	5222 Da → Peptide 1'

Les entéroïnes L50A et L50B sont des bactériocines assez répandues dans la nature. Ces deux bactériocines sont produites par plusieurs souches d'*E. faecium* isolées à partir de sources alimentaires très diverses, il s'agit des saucisses espagnoles séchées et fermentées (47), des olives vertes fermentées (96), du tempeh malaisien (206), du fromage à pâte molle marocain (2), et du airag mongol (17). Parfois, les masses expérimentales obtenues après purification de ces bactériocines diffèrent des masses théoriques (5190 Da pour l'entéroïne L50A et 5178 Da pour l'entéroïne L50B). Par exemple, Batdorj *et al.* (17) ont trouvé deux peptides actifs avec des masses moléculaires de 5206 Da et 5218 Da et Achemchem *et al.* (2) ont trouvé deux autres peptides actifs avec des masses de 5210,5 Da et 5234,3 Da. Dans les deux cas il s'agit très probablement des entéroïnes L50A et L50B, mais les différences entre les masses théoriques et expérimentales n'ont pas permis une identification certaine. Ces différences sont certainement dues à des modifications chimiques sur la chaîne peptidique,

telles que l'oxydation et la formylation, et peuvent compliquer l'identification des bactériocines (Figure 26).

Comme nous l'avons vu précédemment avec la nisine, l'oxydation des résidus de méthionine est un phénomène courant parmi les bactériocines. Nous avons observé que l'entéroïcine L50 est encore active après l'oxydation de la méthionine en position 24, tandis qu'aucune activité n'a pu être détecté pour l'entéroïcine L50B après une telle oxydation. Cependant, ces différences n'ont pu être étudiées d'avantage car les quantités de bactériocines oxydées étaient insuffisantes pour la réalisation d'un spectre d'activité.

La formylation est une modification post-traductionnelle qui consiste à l'addition d'un groupe formyle sur le côté N-terminal d'une protéine ou d'un peptide (Figure 26). Cette modification ayant lieu à l'extrémité de la bactériocine, elle n'affecte pas significativement la structure secondaire de celle-ci n'a pas d'influence remarquable sur l'activité. Toutefois, il est probable que les entéroïcines L50A et L50B n'existent que sous leurs formes formylées, car même si de nombreuses études rapportent l'identification de ces bactériocines (2, 17, 47, 96, 206), celles-ci n'ont pas encore été retrouvées sous des formes non modifiées (5190 Da et 5178 Da).

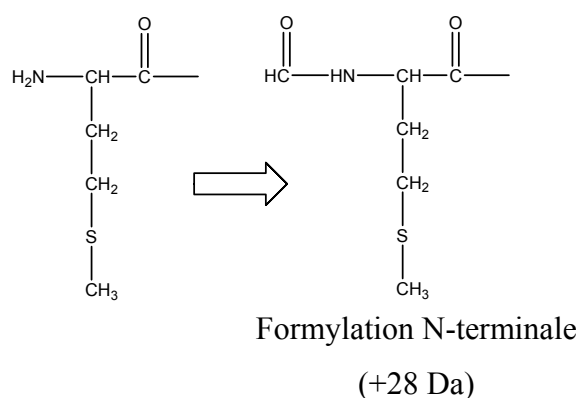


Figure 26. Formylation N-terminale d'un résidu de méthionine

3.2.2.4. Caractérisation du peptide 3 : entéroïcine IT

Le peptide 3 a été digéré à la trypsine et les fragments obtenus ont été séparés et analysés par nano-LC-MS/MS. La recherche réalisée à l'aide de Mascot en utilisant les spectres de masse obtenus a permis l'identification de quatre de ces fragments qui sont présents dans une entéroïcine caractérisée auparavant, la bactériocine 32 (133) (Tableau 10).

Cependant, la masse moyenne théorique de la bactériocine 32 est de 7998 Da, différente de celle déterminée par ESI-MS pour le peptide 3 qui est de 6390 Da.

Tableau 12. Fragments peptidiques issus de la digestion trypsique du peptide 3 et analysés par nano-LC-MS/MS, et séquence du prépeptide de la bactériocine 32 identifiée par recherche Mascot sur la base de données NCBI^{nr}.

Peptide	Masse (exp) (Da)	Séquence du fragment	Bactériocine	Séquence du peptide ^a
3	642,35	GYITK	Bac32	MKKT <u>KLLVASLCLFSSLLAFTPSVSFSQ</u>
	744,40	MLVNIR		NGGVVEAAAQR <u>GYIYK</u> KYPKGAKVPNK
	1461,73	TCYLMSWTASSR		VK <u>MLVNIR</u> GKQTMRT <u>TCYLMSWTASSR</u> T
	783,41	YYYYI		AK <u>YYYYI</u>

^aLes fragments trypsiques identifiés par nano-LC-MS/MS sont soulignés. Le peptide leader pour Bac 32 est marqué en gras (133)

Pour obtenir des informations supplémentaires sur la composition du peptide 3, cette bactériocine a été séquencée par dégradation d'Edman. Les premiers 38 acides aminés ont pu être déterminés : AAQRGYIYKKYPKGAKVPNKVKMLVNIRGKQTMRTCYL. La combinaison des données obtenues par dégradation d'Edman et par digestion trypsique et analyse de masse a permis l'identification de 94% de la séquence du peptide 3. En considérant la masse expérimentale de ce dernier, le reste de la séquence (trois acides aminés en position 47-49) a été déduit en se basant sur la séquence de la bactériocine 32. Le peptide purifié, composé de 54 acides aminés et ayant une masse moléculaire de 6390 Da a été nommé entérocyne IT. La séquence d'acides aminés de cette bactériocine est identique à celle de la bactériocine 32, identifiée par Inoue *et al.* (26), mais 16 acides aminés plus courte du côté N-terminal.

La séquence de la bactériocine 32 retrouvée dans la littérature a été obtenue en se basant sur la séquence de son gène structural *bacA* (26) (Figure 19). La séquence LLA a été proposée comme région signal pour le clivage du prépeptide, ce qui veut dire que la bactériocine commence à la position 20.

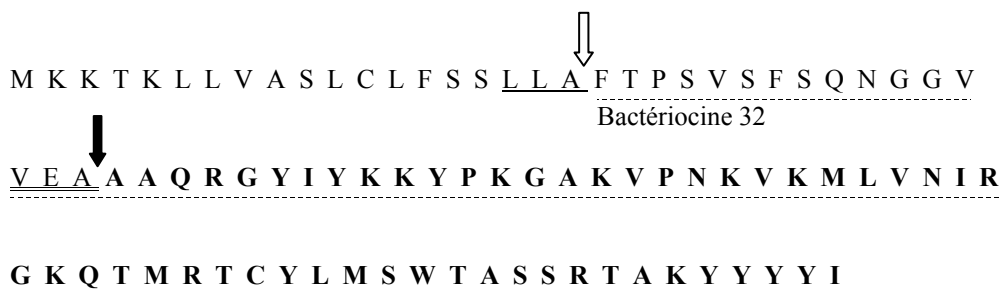


Figure 27. Séquence d’acides aminés déduite par Inoue *et al.* (133) à partir du gène structural de la bactériocine 32. La région signal supposée par ces auteurs est soulignée avec une ligne simple et le site de clivage correspondant est indiqué par une flèche blanche. La séquence de la bactériocine 32 est soulignée en pointillés. Une région signal plus probable est soulignée avec une ligne double et le site de clivage correspondant est indiqué par une flèche noire. La séquence d’acides aminés de la bactériocine IT est marquée en gras.

La comparaison avec les régions signal d’autres bactériocines décrites dans la littérature (126), représentées dans le Tableau 13, a montré que la séquence LLA est un site de reconnaissance de la peptidase signal beaucoup moins probable que la séquence VEA, située à la position 33 à 35 du prépeptide.

Tableau 13. Peptides leader des bactériocines *sec*-dépendantes.

Bactériocine	Séquence d'acides aminés ^a
Bacteriocine 31	MK K K L V I C G I I G I G F T A L G T N V E A
Enterocine P	M R K K L F S L A L I G I F G L V V T N F G T K V D A
Lactococcine 972	M K T K S L V L A L S A V T L F S A G G I V A Q A
Enterocine SE-K4	M K K K L V K G L V I C G M I G I G F T A L G T N V E A
Dysgalacticine	M K K L K R L V I S L V T S L L V I S S T V P A L V Y A
Hiracine JM79	M K K K V L K H C V I L G I L G T C L A G I G T G I K V D A
Propionicine T1	M K K T L L R S G T I A L A T A A A F G A S L A A P S A M A
Enterolysine A	M K N I L L S I L G V L S I V V S L A F S S Y S V N A
Listeriocine 743A	M K K A A L K F I I V I A I L G F S F S F F S I Q S E A
Bacteriocine T8	M K K K V L K H C V I L G I L G T C L A G I G T G I K V D A
Acidocine B	M V T K Y G R N L G L S K V E L F A I W A V L V V A L L L A T A
Divergicine A	M K K Q I L K G L V I V V C L S G A T F F S T P Q Q A S A

^aLes régions signal du type VEA ou VxA sont surlignées en gris

En effet, tandis que LLA n’a été reporté comme site de clivage pour aucune autre bactériocine, VEA est le site de clivage pour d’autres bactériocines *sec*-dépendantes telles que la bactériocine 31 (283) et l’entéroccine SE-K4 (85). De plus, des séquences du type VXA ont été trouvées pour l’enterolysine A, la bactériocine T8, l’entéroccine P, la dysgalacticine et la hiracine JM79 (98, 124, 258). Dans le cas, plus probable, où la région de clivage du prepeptide séquencé par Inoue *et al.* serait VEA, la bactériocine obtenue aurait exactement la même taille et la même séquence que l’entéroccine IT.

3.1.2.4. Séquençage des déterminants génétiques

La souche *E. faecium* IT62 produit trois bactériocines différentes, les entérocinines L50A, L50B et IT. Les gènes codant pour ces trois bactériocines ont été séquencés pour vérifier les données obtenues par dégradation d'Edman et par spectrométrie de masse et pour élucider la relation entre les bactériocines produites par *E. faecium* IT62 et les bactériocines proches ou identiques rapportées précédemment dans la littérature. Les amorces utilisées pour l'amplification des gènes de structure de ces trois bactériocines (Tableau 14) ont été construites en se basant sur les séquences d'acides aminés obtenues pour les bactériocines, mais aussi en se basant sur des séquences d'ADN publiées auparavant (47, 133).

Tableau 14. Amorces utilisées pour l'amplification des gènes de structure des entérocinines L50A, L50B et IT.

Désignation	Oligonucléotides		Produit PCR	
	Séquence (5'-3')		Région	Taille (pb)
EntITS1	TAGGATACACCCTTATGCTAGCT		Amont du gène structural de l'entérocinine IT	592
EntITS2	ATCAAACATTCACGTTCTGTAGTA		Amont du gène structural de l'entérocinine IT	416
EntITR1	AGTCCAACCTATAAGGTAACAA		Gène structural de l'entérocinine IT	354
EntITS3	ATCAAACATTCACGTTCTGTAGTA		Gène structural de l'entérocinine IT	400
EntITR2	TAATTTTGAGTGATTATTTTCGCC		Gène d'immunité de l'entérocinine IT	487
EntL50S1	TGGATCAAACCTGCAATGCCTAT		Amont du gène structural de l'entérocinine L50A	605
EntL50R1	ACATTTAATATTAGTTGACATT		Amont du gène structural de l'entérocinine L50A	443
EntL50S2	GCAAAGTTTGGGTGGCCTATTGTT		Gène structural de l'entérocinine L50B	304
EntL50R2	TTGATCTATTGTCCATCCTTG		Gènes structuraux des entérocinines L50A et L50B	593

Les trois gènes de structure ont pu être amplifiés à partir de l'ADN plasmidique isolé d'*E. faecium* IT62, ce qui a montré que ces gènes sont portés par un plasmide. Cependant, le plasmide portant les gènes pour les entérocinines L50A et L50B est différent de celui portant le gène de l'entérocinine IT. Le premier a été nommé pTAB1 et le second pTIT1. L'ADN amplifié a été purifié et les séquences d'ADN ont pu être déterminées.

Un fragment de 1475 paires de bases (pb) du plasmide pTAB1 portant les gènes des entérocinines L50A et L50B a été séquencé (Figure 28). Cette région correspond aux gènes structuraux des deux bactériocines et sa séquence a pu être obtenue en utilisant les amorces

EntL50S1, EntL50S2, EntL50R1 et EntL50R2. La séquence de ces gènes correspond respectivement à *entL50A* (à l'exception d'une modification simple sur un codon qui ne change pas l'acide aminé codé) et *entL50B*, les deux gènes structuraux des entérocinés L50A et L50B identifiés précédemment sur *E. faecium* L50 par Cintas *et al.* (46, 47). Les produits résultants correspondent aux entérocinés L50A (44 acides aminés) et L50B (43 acides aminés), ce qui confirme les séquences obtenues après la caractérisation biochimique des peptides identifiés par dégradation d'Edman et par spectrométrie de masse.

A l'exception de 9 pb, le fragment de pTAB1 séquencé (Figure 28) est identique à la région 264-1739 du fragment de 3703 pb (numéro d'accès AJ223633) du plasmide pCIZ1 (50 kpb) d'*E. faecium* L50. Comme dans le cas d'*E. faecium* L50, les entérocinés L50A et L50B, ne sont pas synthétisées par *E. faecium* IT62 comme precursors inactifs, car elles manquent de séquences leader du côté N-terminal. Il a aussi été rapporté que ces entérocinés manquent de protéines d'immunité dédiées. Cependant, le fragment du plasmide pTAB1 séquencé n'est pas assez long pour pouvoir tirer une conclusion quant à l'existence de telles protéines dans le cas d'*E. faecium* IT62.

```

1   ttttaaactattgaaaataataaataattatgatgca tcaataaattcaaattcat ttttcattgaaa aat tttctct      75
76   tttaaa tgc ttt a ttt tgc ttc t cgt ttc ttt att ctg tcc cac tga ctt aat cct gcc ata taa taa ata aagaat 150
151  cctaac atc aac ccc ata act att aat aaa ctt agt ttt tct cta aaa aca tat aaa ctt aat gca aca aaa ata 225
226  ccggga att aaa aac aat aaa tgc tta tta tta tta tta tta tta tta tta tta tta tta tta tta tta tta 300
301  aat aca att act tct acactc atctata aag gcc tcc tta tgc ttt tta taa atc aag tagc gat cct gga aat 375
376  aaa ata tct tca gaa aca aga ata tct aaat acact ttt aat gca tcc tct gta tat cta tct ttt cct att ttt 450
451  tcatta ata cat tgt agt ttc ttt ttt act ttt gaa tat gaa tat cct ttt tta cac att ctt gat atatta cct 525
526  tcagataaat aaa aaa tca atc ata aaa ttt tga tct tct aaa cta aaa tttagagaaa taa ttt tcc att ttt acc 600
601  tcc tataat aga ctc cct acag tct ccc cct cct ttc tgt ttt taa gac acc cta tac cat tac atc aaa cga cat 675
676  taa agt ata aat aaa aaa att cct gct aaat tga ct ata tca tac aaa ata act gag ttt act ttt gactaa taa 750
751  aag ctt ctt ttg gact ca taa ccg tta aaa aat att gat att tgg gata aat cat att tgt aga agc tct taa aca 825
826  aaa gaa aga a t c aaa ata gtagaa tga ttt tat ata ata taggct tga tat agt t a c att tca tca aat att tta 900
901  atgtca act aat att aaa tgt taa aat ttt tactta ttt taa aaa attt ttt ctt cta agagaa aaa aat tta att 975
976  gtggaa agc tagt att tgg caa caa tac atc tct at gca taa ata tat att ttt gca aat a t t t t t t t t t t 1050
1051 gtgtga tat aca att att atgaac aaa aaa atg att gga gga gtt ata tta tgg gag caa tgc caa aat tag tag 1125
                                     entL50A      M G A I A K L V
1126 caa agt ttgggtggc ctattgtttaaaa agt att aca aac aaatta tgc agt tta ttggagaaggatggg caatta 1200
      A K F G W P I V K K Y Y K Q I M Q F I G E G W A I
1201 aca aat cattg agt ggattaaa aac atatt ttaaaa ata aggatgtgttagtata t atggag gca atc gcaaaa cta 1275
      N K I I E W I K K H I *      entL50B      M G A I A K L
1276 gtgaca aag ttt ggg tgg cca cta atc aaaa aat tctac aaaa caa atc atg caa ttt att gga caa gga tgg aca 1350
      V T K F G W P L I K K F Y K Q I M Q F I G Q G W T
1351 atagat caa att gaa aat tgg cta aaa aga cattaa tgt tta aactaa act aaa ttt tga aaa aag act ata aag 1425
      I D Q I E K W L K R H *
1426 tta taaggat at cct tgt att ctt tgt agt ttt ttgtgtgtgtaaa cattc 1476
    
```

Figure 28. Séquence nucléotidique (numéro d'accès FJ618564) de la région du plasmide pTAB1 contenant les gènes *entL50A* et *L50B*, gènes qui codent respectivement pour les entérocinés L50A et L50B. Cette séquence a été obtenue en utilisant les amorces EntL50S1, EntL50S2, EntL50R1 et EntL50R2. Les séquences potentielles du site SD d'union du ribosome sont soulignées par une ligne double. Les séquences d'acides aminés déduites pour les entérocinés L50A et L50B sont soulignées. Les caractères en gras indiquent les paires de bases différentes par rapport à la séquence (numéro d'accès AJ223633) publiée précédemment par Cintas *et al.* (47) pour *E. faecium* L50; le symbole ! indique une paire de bases absente par rapport à cette séquence.

Un fragment de 1380 pb du plasmide pTIT1 portant le gène de structure de l'entéroccine IT a été amplifié en utilisant les amorces EntITS1, EntITS2, EntITS3, EntITR1 et EntITR2 et séquencé (Figure 29). Ceci a révélé la présence de deux ORFs (phases ouvertes de lecture) dont le premier, correspondant au gène de structure de l'entéroccine IT, est identique au gène *bacA* de structure de la bactériocine 32 déterminé précédemment par Inoue *et al.* (133). Le second ORF est probablement le gène d'immunité à l'entéroccine IT, et correspond au gène *bacB* d'immunité à la bactériocine 32 également identifié par Inoue *et al.* (133). Ce gène code pour une hypothétique protéine d'immunité formée par 55 acides aminés et sans séquence signal. Il s'agit d'une caractéristique typique des producteurs de bactériocine qui synthétisent des protéines immunitaires en même temps qu'ils produisent leurs bactériocines. Le gène d'immunité est placé immédiatement en aval du gène de structure, ce qui est un trait commun dans la majorité des loci des bactériocines non antibiotiques produites par les BAL (61, 90).

```

1  gca aaa atc tat tac tag taa ac gaa aga tga ttg gat tta ttt act taa aac ttt tatt gct act cct tcc aat 75
76  agga at att att att ttt tcagaa cga tct agg aac aat gtt agt ctt cat tgt tat tta tat ttt tat ttt gtt 150
151  tac gtc taa cat aaa tat aaa aat aat tgc ccc aat aat cgc cat tgg tgt tgt ttt atc ctt aat att ttt ata 225
226  ttt ggt tat atc aga tac agga ag aga ttt ctt att aaa aat agg att tca cga cta tcagtt taa aaga at aga 300
301  ctc atg gtt gaa tcc att ttt aga tcc aaa tgg atc tag cta tca gtt agc aaa tag ttt aat tgct at tgg ctc 375
376  tgg cgg act ttt agg tac tgg ttt taa tgt atc aaa cat tca cgt tcc tgt tag aga atc cga tat gat att ttc 450
451  tgt aat tgg aga aaa ttt tgg ctt tat agg aag ttg tct tgt aat att cct ata ctt tta ttt aat tta tca aat 525
526  gta taa aac atg ttt taa aag caa taa ctt att ttt cac cta tat cgg tat agg cat tgt tgc aat gat ttt ttt 600
601  tca tgt ttt tga aaa tat agg tgc gag tat cgg att act acc tct aac tgg tat tcc act ccc cta tat tag tca 675
676  agg tgg ttc tgc cat tct tag taa ttt ttt ggg gtt ggg att tat gtt gtg ttg tag tag ata tac taa cgaa aaa 750
751  aaa agg aac aca aaa atg aat tca aaa taa cac ttt atg aat aga atg tct att tca ata aaa att atg ata cct 825
826  taa agt taa tca tta aaa aag gag tgt cat aat ttg aaa aaa aca aaa tta ttg gta gct agt ttg tgt ttg ttt 900
      entIT      M K K T K L L V A S L C L F
901  agc agt tta tta gct ttc acc cct tct gtt tca ttt tct caa aat ggt gga gtg gtt gaagct gct gct caa aga 975
      S S L L A F T P S V S F S Q N G G V V E A A A Q R
976  gga tat atc tac aaa aaa tat cca aaa ggt gct aaagt gcca aat aaagt taa atg tta gta aat att agagg 1050
      G Y I Y K K Y P K G A K V P N K V K M L V N I R G
1051  aaa caa act atg cgt act tgt tac ctt atg agt tgg act gct agt agt aga aca gcc aaa tat tatt act tac att 1125
      K Q T M R T C Y L M S W T A S S R T A K Y Y Y Y I
1126  tag taa aaa caa aac att ctt tct ata caa taa aat agc gta tag aga gga tgt ttt taa ttt gaa aag gag tgg 1200
      *
1201  tta tct tta tga aaa atagat c att tgg cta tat tag tattat cgg taat ttt tat tag ata tattgt taataa cat 1275
      entIM      M K N R S F A I L V L S V I L L D I L L I T
1276  tag ctt taa aaa ctt taa att tag taa caagt ttgt catta tac cag taatta tag gaa tgt cta ttt att tca 1350
      L A L K T L N L V T S F V I I P V I I G M S I Y F
1351  tca aaa aaa ata aac aat ttt ttt gaa tga 1380
      I K K N K Q F F *

```

Figure 29. Séquence d'ADN (numéro d'accès FJ618565) de la région du plasmide pTIT1 contenant les gènes de structure de l'entéroccine IT (*entIT*) et d'immunité du producteur (*entIM*). Cette séquence a pu être obtenue avec les amorces EntITS1, EntITS2, EntITS3, EntITR1 et EntITR2. Les séquences potentielles du site SD d'union du ribosome sont soulignées par une ligne double. La séquence d'acides aminés déduite du prépeptide de l'entéroccine IT comprenant le peptide leader et la bactériocine mature est indiquée. Le site de clivage de ce prépeptide par la peptidase signal est indiqué par une flèche. La séquence d'acides aminés de la bactériocine mature, correspondant à celle obtenue par la dégradation d'Edman et par spectrométrie de masse, est soulignée. Les caractères en gras indiquent les paires de bases différentes par rapport à la séquence (numéro d'accès AB1502) publiée précédemment par Inoue *et al.*(133) pour *E. faecium* VRE2000.

Le gène de structure de l'entéroisine IT code pour un prépeptide composé de 89 acides aminés qui, après action de la peptidase signal, est coupé et transformé en bactériocine mature de 54 acides aminés et 6390 Da (Figure 29). Ce résultat est en accord avec les données biochimiques obtenues par spectrométrie de masse et par séquençage d'Edman.

A l'exception de 2 pb, le fragment d'ADN séquencé du plasmide TIT1 codant pour l'entéroisine IT est identique à la région 10091-11471 du plasmide pTII1 (numéro d'accès AB158402) qui englobe le locus génétique de la bactériocine 32 dans la souche *E. faecium* VRE200 (133). Etant donné que le même locus génétique code pour l'entéroisine IT et pour la bactériocine 32, il est certain qu'il s'agit d'une seule et même bactériocine. Le site de clivage du prépeptide de la bactériocine 32 séquencée par Inoue *et al.* (133) n'est donc pas LLA, comme suggéré par les simulations informatiques effectuées par ces auteurs, mais VEA, comme il a été montré par la structure de la bactériocine active. Par conséquent, la bactériocine 32 est très certainement 16 acides aminés plus courte que ce qui a été décrit précédemment et avec exactement la même taille et séquence que l'entéroisine IT. Par ailleurs, il a été rapporté que la bactériocine 32 est codée par un plasmide (pTII1) hautement transférable, ce qui résulte en une grande dissémination de la bactériocine 32 parmi les souches d'*E. faecium* (133).

Nous avons démontré dans cette étude que la dissémination de la bactériocine 32 n'est pas limitée à des isolats cliniques et qu'une structure particulière de bactériocine n'est pas liée à l'origine de la souche productrice. *E. faecium* IT 62, une souche isolée du fourrage d'ivraie au Japon, produit en effet deux types de bactériocines avec des activités très différentes, qui avaient été isolées précédemment de sources très différentes : d'un côté les entérosines L50A et L50B, deux bactériocines synergiques avec un spectre d'activité très large qui avaient été identifiées dans plusieurs isolats alimentaires et de l'autre côté l'entéroisine IT, une bactériocine avec un spectre d'activité très étroit et la même structure que la bactériocine 32, identifiée dans de nombreux isolats cliniques d'*E. faecium*. Ce fait va à l'encontre de l'idée d'une distribution écologique particulière des bactériocines dans laquelle, par exemple, les bactériocines anti-*Listeria* se trouveraient dans les aliments et les bactériocines telles que la bactériocine 32 ou l'entéroisine IT, se trouveraient dans les environnements cliniques où elles seraient associées à la résistance aux antibiotiques. Une souche bactérienne peut en effet, comme c'est le cas d'*E. faecium* IT62, produire des bactériocines avec des propriétés et des activités très différentes. Néanmoins, les bactéries produisant la "bonne" bactériocine dans

une certaine niche écologique, ont une plus grande chance de survivre et de devenir dominantes.

3.2.3. Bactériocines d'*E. faecalis*

3.2.3.1. Purification de la bactériocine produite par *E. faecalis* WHE 96

La souche *E. faecalis* WHE 96 a été isolée à partir du fromage de type Munster fermier (256). La substance antibactérienne produite par *E. faecalis* WHE 96 possède un champ d'activité inhibitrice très restreint en comparaison avec celui des nisines produites par *L. lactis* WHE 99 et WHE 53. Cette différence d'activité, en plus du fait qu'*E. faecalis* WHE 96 soit sensible aux extraits de culture de *L. lactis* WHE 99 et WHE 53, indiquent que cette souche ne produit pas une nisine. La souche *E. faecalis* CECT 481 a été utilisée comme indicateur pour cette bactériocine.

La bactériocine produite par *E. faecalis* WHE 96, nommée entéroccine 96, a été purifiée suivant le protocole utilisé précédemment avec quelques modifications. L'activité détectée dans l'extrait de culture par la méthode des spots étant assez faible (seulement 100 AU/ml), cinq litres de culture ont été utilisés en vue de la purification. Par ailleurs, le protocole classique de précipitation au sulfate d'ammonium n'a pas permis pas d'obtenir des bons rendements de précipitation de cette bactériocine et seule une faible quantité de bactériocine pouvait être récupérée dans le culot. La technique de l'ultrafiltration tangentielle a été choisie comme alternative et a permis de récupérer la totalité de la bactériocine et de bien la concentrer à partir des cinq litres de culture. Après une filtration à travers une membrane avec un seuil de coupure de 10 kDa, l'activité de la bactériocine a été détectée dans le perméat, indiquant que la bactériocine a une masse moléculaire inférieure à 10 kDa et elle n'a pas été retenue par la membrane. La fraction perméat ainsi obtenue a été ensuite passée sur une membrane avec un seuil de coupure de 5 kDa et concentrée jusqu'à un volume final de 220 ml. Cette deuxième membrane a retenu la bactériocine et aucune activité n'a été détectée dans le perméat, indiquant que la bactériocine produite par *E. faecalis* WHE 96 a une masse moléculaire entre 5 et 10 kDa. Puisque cette deuxième filtration a permis d'éliminer les sels et les petites molécules, une étape de dessalage n'est pas nécessaire en vue de l'échange de cations et la fraction rétentat de 220 ml (fraction I) obtenue peut être directement utilisée pour cette prochaine étape de purification.

La fraction I a été ajustée à pH 5,5, passée sur un échangeur de cations et éluée avec un gradient de 0 à 1 M de NaCl. Un seul groupe de fractions actives (36 à 40) a été détecté. L'analyse par chromatographie en phase inverse de ce groupe de fractions actives a révélé un seul pic actif avec un temps de rétention de 31,5 min (Figure 30).

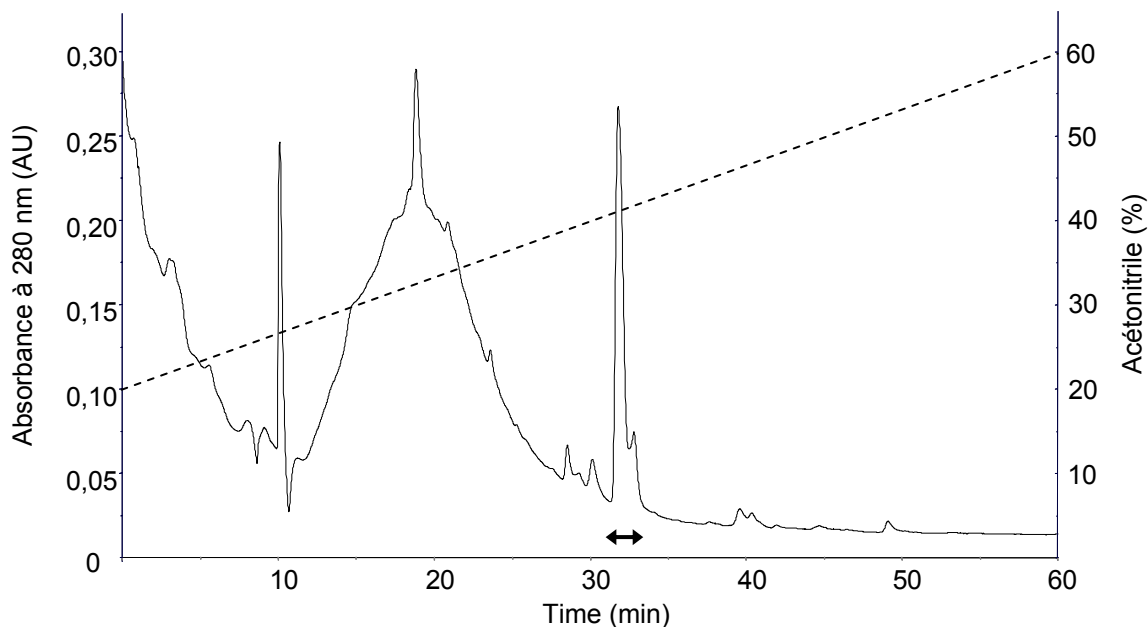


Figure 30. Purification de la bactériocine produite par *E. faecalis* WHE 96 par HPLC sur colonne C8. Profil chromatographique à 280 nm (—) ; gradient d'acétonitrile dans l'eau (---). La flèche noire indique les fractions actives.

La séparation obtenue après une première chromatographie n'étant pas tout à fait satisfaisante, les fractions les plus actives correspondant aux temps de rétention 32 et 33 ont été mélangées, diluées avec de l'eau contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique et rechromatographiées dans les mêmes conditions. Un pic de bactériocine très propre a ainsi pu être obtenu avec un temps de rétention de 31,5 min. Il a été aussi vérifié que l'épaule qui apparaît après le pic de bactériocine ne correspond pas à une substance active et il ne s'agit que d'une impureté.

3.2.3.2. Caractérisation de l'entéroïcine 96

L'analyse par ESI-MS de l'entéroïcine 96 purifiée a confirmé la pureté de l'échantillon et révélé que la masse moléculaire de cette bactériocine est de 5496 Da (Figure 31). Pour une meilleure précision, la masse de l'entéroïcine 96 a aussi été déterminée par MALDI-TOF, la masse moyenne obtenue était de 5493,92 Da.

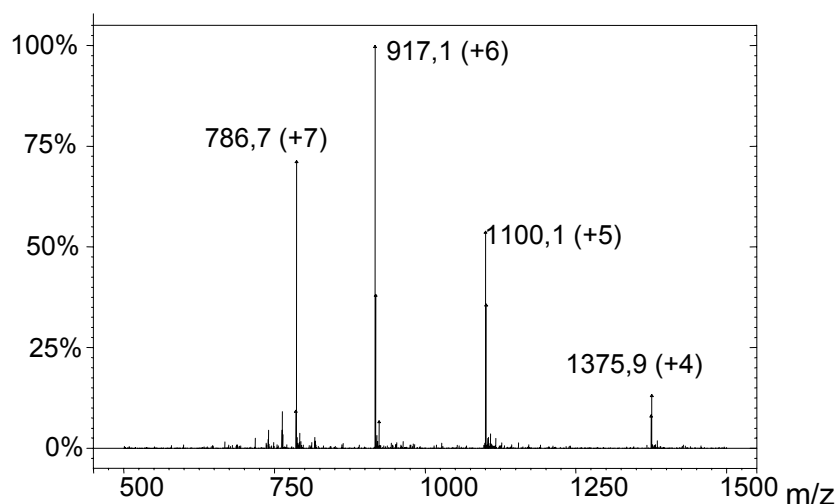


Figure 31. Spectres de masse réalisés par ESI-MS de l'entérocoque 96.

Le séquençage des acides aminés réalisé par dégradation d'Edman, a révélé que l'entérocoque 96 était un peptide relativement long composé de 48 acides aminés non modifiés :

MSKRDCNLMKACCAGQAVTYAIHSLNRLGGDSSDPAGCNDIVRKYCK

La masse moléculaire calculée à partir de cette séquence est de 5178,98 Da, ce qui est inférieur de 314,94 Da à la masse expérimentale obtenue pour la bactériocine purifiée. Ceci indique que la structure de la bactériocine peut contenir des modifications chimiques. Cette séquence d'acides aminés, comparée aux données de la littérature, ne correspond à aucune bactériocine déjà connue jusqu'à présent, ce qui montre qu'il s'agit d'une nouvelle bactériocine. Cette dernière ayant pu être séquencée par dégradation d'Edman, est certainement une bactériocine linéaire et ne possédant pas d'acides aminés modifiés tels que ceux retrouvés dans les lantibiotiques. Avec une masse moléculaire inférieure à 10 kDa, cette nouvelle bactériocine appartient donc à la classe II des bactériocines. De plus, elle a une structure assez particulière, puisqu'elle ne présente pas de motifs typiques reconnaissables, ni d'analogies de séquence avec d'autres bactériocines.

3.2.3.3. Séquençage des déterminants génétiques

Une recherche dans les bases de données de protéines a révélé que l'entérocoque 96 est identique à la partie C-terminale d'une protéine hypothétique "EF_B0056" d'*E. faecalis* V583. Cette protéine a été identifiée après séquençage du génome complet de la souche *E.*

faecalis V583 et sa séquence d'acides aminés contient une extension de 26 acides aminés du côté N-terminal par rapport à la séquence de l'entéroïcine 96.

Afin de montrer la présence ou non d'un peptide leader dans le cas de l'entéroïcine 96, son gène de structure a été séquencé. Ce gène d'intérêt a pu être isolé et amplifié à partir de l'ADN plasmidique d'*E. faecalis* WHE 96, ce qui a montré que ce gène est porté par un plasmide. Les amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN ont été construites en se basant sur la séquence d'acides aminés de l'entéroïcine 96, obtenue par dégradation d'Edman, mais également sur la séquence d'ADN du plasmide pTEF2 (numéro d'accès AE016831) de la souche *E. faecalis* V583 (Tableau 15).

Tableau 15. Amorces utilisées pour l'amplification du gène de structure de l'entéroïcine 96.

Oligonucléotides		Produit PCR	
Désignation	Séquence (5'-3')	Région	Taille (pb)
Ent96S1	TTGAAAGATTTTGATAATTT	Amont du gène structural de l'entéroïcine 96	348
Ent96R2	TCACAATATATTAATCTATA	Aval du gène structural de l'entéroïcine 96	170

Un fragment de 348 pb d'ADN plasmidique d'*E. faecalis* WHE 96, portant le gène de structure de l'entéroïcine 96, a pu être séquencé, ce qui a confirmé la séquence de la bactériocine déterminée par Edman (Figure 32). Ce fragment est identique à la région 49368-49715 du plasmide pTEF2 de la souche *E. faecalis* V583.

```

1  acttgattagtgagaggacgaaa ggagataataactatgttaataaaaaattatttagaaaatgggtgtagtaa 75
                                     M L N K K L L E N G V V N
76  gctgtaacaattgatgaacttgatgctcaatttggaggaaatgagcaaa cgtgat tgt aac ttgatgaaggcgtgt 150
    A V T I D E L D A Q F G G ↑ M S K R D C N L M K A C
151 tgtgctggacaagcagtaacatatgctattcatagctctttaaatacgaatagggtggagactctagtgatccagct 225
    C A G Q A V T Y A I H S L L N R L G G D S S D P A
226 ggttgtaatgatattgtaagaaaaatattgtaaaataaaaaatctcattagaataaccgtcctctccactaatcaa 300
    G C N D I V R K Y C K *
301 gtgatttaaaaaatgagtaaaagatattatagattataatattgtgat 348

```

Figure 32 Séquence d'ADN (numéro d'accès FJ769024) contenant le gène de structure de entérocin 96. Cette séquence a pu être obtenue en utilisant les amorces Ent96S1 et Ent96R2. Les séquences potentielles du site SD d'union du ribosome sont soulignées par une ligne double. La séquence d'acides aminés déduite du prépeptide de l'entérocin 96 comprenant le peptide leader et la bactériocine mature est indiquée. La séquence d'acides aminés obtenue par la dégradation d'Edman est soulignée et le site de clivage de la peptidase signal est indiqué par une flèche.

La combinaison des informations obtenues du séquençage du gène de structure et de la caractérisation biochimique de la bactériocine active, permettent de conclure que l'entérocin 96 est synthétisée sous forme d'un prépeptide inactif avec une extension N-terminale de 26 acides aminés par rapport à la bactériocine mature. Ce prépeptide est coupé par la peptidase signal en un peptide leader de 26 acides aminés et une bactériocine mature de 48 acides aminés.

On peut observer d'après la Figure 32 que le peptide leader de l'entérocin 96 contient deux résidus glycine C-terminaux. Ce type de peptide leader à double-glycine, très répandu parmi les bactériocines de class II, existe aussi parmi quelques lantibiotiques. La sécrétion des bactériocines avec un peptide leader du type GG est réalisée par un transporteur spécifique, ATP-binding cassette (ABC), qui possède un domaine N-terminal accessoire. Ce domaine N-terminal a les caractéristiques d'une protéase, incluant des résidus conservés de cystéine et d'histidine sur le site actif, essentiels pour l'activité protéolytique, et il est responsable du clivage du peptide leader après le motif double-glycine. Ce clivage a lieu du côté cytoplasmique de la membrane pendant la sécrétion du peptide antibactérien et ce type de système assure que la bactériocine est produite quand un certain seuil de densité de cellules bactériennes est atteint (23, 199).

3.2. Activité des bactériocines purifiées

Ce travail a abouti à l'identification de 6 bactériocines différentes à partir de 5 souches bactériennes. Les trois souches de *L. lactis* étudiées sont productrices de nisine (nisine A dans le cas de *L. lactis* WHE 53 et nisine Z dans le cas de *L. lactis* WHE 99 et de *L. lactis* RO50). La nisine Z, qui ne diffère de la nisine A que par une substitution de l'Asn27 par une His27, présente une structure tridimensionnelle très proche et une activité légèrement plus faible (208). La nisine est en effet une bactériocine très fréquente parmi les isolats de *L. lactis* et elle est sans doute la bactériocine la mieux étudiée à ce jour. Son activité antimicrobienne vis-à-vis des bactéries taxonomiquement proches a déjà été décrite en 1928 (248). Les spectres d'activité des nisines A et Z, qui sont identiques et incluent des genres très divers tels que *Bacillus*, *Listeria*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* et *Streptococcus*, ainsi que leur mode d'action ont été largement décrits dans la littérature et font encore aujourd'hui l'objet de nombreuses publications et revues (41, 42, 44, 73, 181, 246, 250, 276). Ces spectres d'activités étant bien connus, ils n'ont pas été déterminés dans ce travail.

La souche *E. faecium* IT62 produit trois bactériocines : les entérocinines L50A et L50B, deux bactériocines déjà connues mais dont les spectres d'activité individuels n'ont jamais été déterminés et l'entérocinine IT, une nouvelle bactériocine. De même, la souche *E. faecalis* WHE 96 produit une nouvelle bactériocine, l'entérocinine 96, dont le spectre d'activité n'est pas connu. Afin de déterminer les spectres d'activité de ces quatre bactériocines, les fractions pures ont été remises en solution dans de l'eau stérile et la sensibilité d'une large gamme de bactéries a été testée à chaque bactériocine en milieu liquide à l'aide d'un turbidimètre automatique (Bioscreen). Dans ce test, une souche est considérée comme sensible quand sa croissance est partiellement ou complètement inhibée en présence de la bactériocine. Cet effet sur la croissance est dû à l'élimination d'une partie de la population de la souche indicatrice sous l'effet de la bactériocine. La différence maximale d'absorbance à 600 nm observée entre le témoin et la courbe obtenue avec chaque bactériocine a été déterminée pour chaque souche indicatrice. Un exemple de courbe de croissance enregistrée par le turbidimètre Bioscreen 200C, où sont indiquées les différences maximales d'absorbance entre le témoin et chacun des tests, est montré dans la Figure 33.

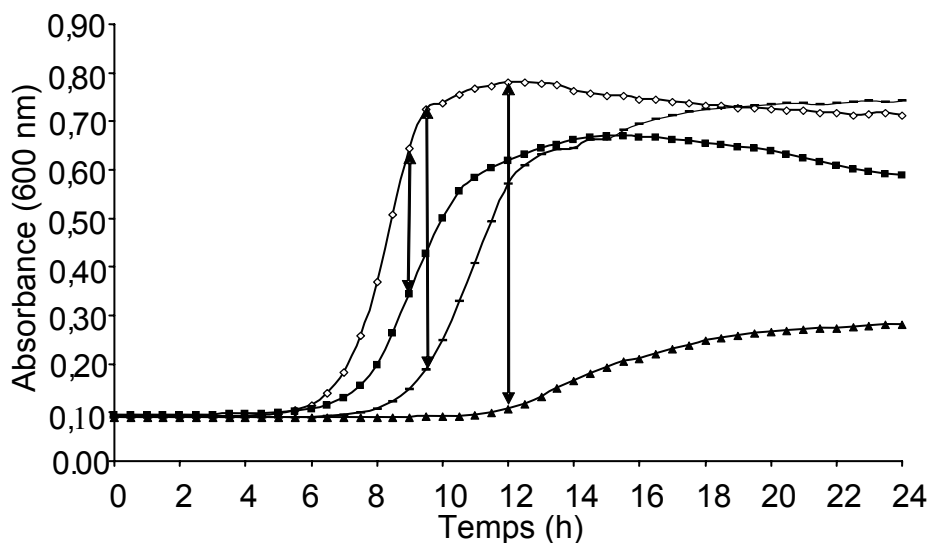


Figure 33. Graphique représentatif de l'effet antibactérien des bactériocines purifiées sur une souche indicatrice. (◇) Témoin; (▲) entéroïne L50A; (—) entéroïne L50B; (■) entéroïne IT. Les flèches indiquent la différence maximale d'absorbance à 600 nm observée entre le témoin et la courbe obtenue avec chaque bactériocine.

Lors de la purification des bactériocines il avait été observé que les entéroïnes L50A et L50B sont actives contre les deux indicateurs utilisés, *E. faecium* WHE 81 et *L. lactis* RO50, tandis que l'entéroïne IT est active seulement contre *E. faecium* WHE 81. Les différences d'activité observées entre les entéroïnes L50A, L50B et IT ont été étudiées plus profondément dans un milieu liquide sur une large gamme de bactéries. Les données pour toutes les souches indicatrices testées sont récapitulées dans le Tableau 16.

Tableau 16. Activité antimicrobienne des entérocoques purifiées d'*E. faecium* IT62 : entérocoque L50A (peptide 2), entérocoque L50B (peptide 1) et entérocoque IT (peptide 3).

Espèce indicatrice	Souche	Milieu	T (°C)	Activité de la bactériocine ^a		
				Entérocoque IT	Entérocoque L50A	Entérocoque L50B
<i>Bacillus subtilis</i>	CIP 5262	BHI	30	0	0,32	0,30
	CIP 7718	BHI	30	0,28	0,50	0,51
<i>Bacillus cereus</i>	CIP 78-3	BHI	30	0	0,19	0,25
	LC 447	BHI	30	0	0,37	0,37
<i>Enterococcus faecium</i>	LC WHE81	BHI	37	0,53	0,71	0,47
	LC 25	BHI	37	0,43	0,71	0,45
<i>Enterococcus hirae</i>	CIP 5855	BHI	37	0,13	0,67	0,38
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	BHI	37	0	0,42	0,31
	LC 96	BHI	37	0	0,50	0,16
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CIP A159	M17	30	0	0,19	0,19
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp, <i>sakei</i>	ATCC15521	M17	30	0	0,30	0,30
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LC 660	M17	37	0	0,39	0,15
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp, <i>paracasei</i>	LC 94	M17	30	0	0,23	0,21
<i>Lactococcus lactis</i>	LC RO50	BHI	30	0	0,57	0,42
	LC 72	BHI	30	0,3	0,67	0,53
<i>Lactococcus lactis</i> subsp, <i>cremoris</i>	LC 657	BHI	30	0	0,51	0,45
<i>Leuconostoc carnosum</i>	LC 449	BHI	30	0	0,39	0,49
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LC 258	BHI	30	0	0,32	0,30
<i>Listeria monocytogenes</i>	CIP 7838	BHI	37	0	0,39	0,33
	LC 9	BHI	37	0	0,32	0,30
	LC 10	BHI	37	0	0,50	0,40
	LC 11	BHI	37	0	0,42	0,57
	LC 12	BHI	37	0	0,44	0,39
<i>Listeria innocua</i>	LC 14	BHI	37	0	0,50	0,34
<i>Staphylococcus aureus</i>	CIP 7625	BHI	37	0	0,34	0,33
	ATCC 6538	BHI	37	0	0,42	0,39
<i>Escherichia coli</i>	CIP 7624	BHI	37	0	0,40	0,56
<i>Salmonella enteritidis</i>	LC 216	BHI	30	0	0,11	0,25
<i>Salmonella typhimurium</i>	LC 443	BHI	30	0	0,18	0,25
<i>Serratia marcescens</i>	LC 448	BHI	30	0	0,21	0,38
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LC 379	BHI	30	0	0,30	0,50

^aLes données indiquent la différence d'absorbance maximale à 600 nm, obtenue pendant l'incubation, comparée aux témoins

Dans la plupart des cas, la croissance a été significativement ralentie. Les entérocoques L50A et L50B ont montré un spectre antimicrobien très large affectant toutes les souches testées. Même les souches Gram-négatives testées sont sensibles à ces deux peptides, ce qui est un fait assez surprenant étant donné qu'il s'agit de bactériocines produites par des BAL qui normalement ne sont actives que contre les souches Gram-positives (140). Cette activité contre les bactéries Gram-négatives a été observée seulement en milieu liquide et n'a pas pu être détectée par la méthode des spots. Ceci est dû au fait que le test en milieu liquide est beaucoup plus sensible que la méthode des spots.

Les entérocoques L50A et L50B sont connus pour leur activité synergique (47) et leur spectre d'activité cumulé a déjà été décrit (44, 96). Cependant, nous avons déterminé pour la première fois les spectres d'activité individuels de ces deux bactériocines. Les spectres d'activité des entérocoques L50A et L50B sont très similaires, mais quelques différences peuvent être observées. Les bactéries lactiques testées étaient plus sensibles à l'entérocoque L50A, ce qui a déjà été rapporté dans la littérature (47). Par contre, les souches Gram-négatives ont montré une sensibilité plus élevée à l'entérocoque L50B. Les légères différences de structure entre les deux peptides peuvent être à l'origine de leurs activités complémentaires et expliquer leurs effets synergiques.

Contrairement aux entérocoques L50A et L50B, l'entérocoque IT a montré un spectre d'activité très étroit avec seulement 5 souches (*E. faecium* WHE 81, 25 et CIP 5855, *Bacillus subtilis* CIP 7718 et *L. lactis* 72) des 31 testées qui se sont avérées sensibles. De plus, l'effet bactéricide causé par l'entérocoque IT était plus faible que celui causé par les entérocoques L50A et L50B. Un spectre d'activité très étroit avait également été observé pour la bactériocine 32 (133).

Le spectre d'activité de l'entérocoque 96 a également été déterminé. Les résultats obtenus sont présentés sur le Tableau 17

Tableau 17. Activité antimicrobienne de l'entéroïne 96 purifiée. Toutes les souches indicatrices ont été cultivées dans un bouillon MRS à 37°C.

Espèce indicatrice	Souche	Activité ^a
<i>Enterococcus faecalis</i>	CECT 481	0,41
	LC E5	0,16
	LC E3	0,44
	LC E4	0,41
	CECT 795	0,45
<i>Enterococcus faecium</i>	WHE 81	0,14
	LC E14	0,24
<i>Enterococcus hirae</i>	CIP 5855	0,37
<i>Enterococcus pseudoavium</i>	LC E18	0,18
<i>Enterococcus sulfureus</i>	LC E22	0,40
<i>Enterococcus sacharolyticus</i>	ATCC 43076	0,10
<i>Enterococcus columbae</i>	LC E2	0,33
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CIP A159	0,15
	CECT 749	0,25
	299V	0,24
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LC 660	0
<i>Lactobacillus sakei subsp sakei</i>	ATCC 15521	0
<i>Lactobacillus paracasei subsp.</i>	LC 94	0,49
<i>Lactococcus lactis</i>	LC RO50	0
	LC 72	0,17
<i>L. lactis subsp. Cremoris</i>	LC 657	0,35
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LC258	0,14
<i>Bacillus subtilis</i>	CIP 7718	0,17
	CIP 5262	0,23
<i>Bacillus cereus</i>	CIP 78-3	0,21
	LC 447	0,17
<i>Listeria innocua</i>	LC14	0,13
<i>Listeria monocytogenes</i>	CIP 7838	0,35
	LC 12	0,20
	LC 40	0,19
<i>Staphylococcus xylosum</i>	LC 57	0,23
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	0,44
<i>Salmonella typhimurium</i>	LC 443	0,13
<i>Salmonella infantis</i>	LC 8	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LC 261	0,081
<i>Serratia liquefaciens</i>	LC 384	0,076
<i>Proteus vulgaris</i>	LC 243	0,068
<i>Enterobacter cloacae</i>	LC 407	0
<i>Escherichia coli</i>	LC 22	0,063
	CIP 7624	0
	ATCC 10536	0,093

^aLes données indiquent la différence d'absorbance maximale à 600 nm, obtenue pendant l'incubation, comparée aux témoins.

Comme attendu, les bactéries les plus sensibles à cette entéroïne sont les entérocoques, spécialement les souches d'*E. faecalis*, même si la plupart des BAL testées étaient aussi affectées. De façon intéressante, l'entéroïne 96 a aussi montré une activité contre quelques pathogènes Gram-positifs, tels que *L. monocytogenes* et *S. aureus*. Les

bactéries Gram-négatives testées sont résistantes ou faiblement sensibles, ce qui est une caractéristique commune pour la grande majorité des bactériocines des BAL (289).

Comme dans le cas des entérocinés L50A et L50B, la faible activité détectée contre quelques bactéries Gram-négatives telles que *E. coli* et *S. typhimurium* est certainement due à la grande sensibilité du test utilisé dans cette étude, lequel est réalisé en milieu liquide. En effet, lorsque la méthode des spots est utilisée, aucune activité de l'entérociné 96 contre des bactéries Gram-négatives n'est détectée. Toutefois, le spectre antibactérien de l'entérociné 96 peut être considéré comme assez large en comparaison avec ceux d'autres bactériocines de BAL (44).

Parmi les 6 bactériocines isolées dans ce travail on peut observer des différences d'activité très importantes. Les nisines A et Z sont celles dont le spectre d'activité est le plus large. Les entérocinés L50A et L50B, ainsi que l'entérociné 96 présentent des spectres d'activité relativement larges, mais toutefois, plus étroits que celui de la nisine. Finalement l'entérociné IT a montré un spectre d'activité assez étroit, concentré sur peu de souches très proches de la souche productrice. Naturellement, ces différences d'activité observées sont étroitement liées aux différences de structures entre ces molécules.

La caractéristique plus remarquable de la nisine, et des lantibiotiques en général, est la présence de résidus acides aminés modifiés de façon importante. Il semble que la conformation en anneau soit essentielle à la rigidité de la nisine, son insensibilité aux dégradations protéolytiques et sa résistance à l'inactivation par la chaleur (166). Il a aussi été suggéré que les acides aminés déshydratés pourraient être des sites idéaux d'addition de groupes thiols (ou autres groupes nucléophiles). Ces modifications covalentes pourraient résulter en l'inactivation d'enzymes, co-enzymes et autres composés à groupes fonctionnels importants pour la survie des cellules cible (123).

Les quatre entérocinés purifiées font partie de la classe II (sous-classes IIb et IIc). Les spectres d'activité de ces bactériocines sont généralement plus étroits que ceux des lantibiotiques et leur mode d'action est moins connu. La plupart des études portant sur le mode d'action des bactériocines concernent en effet les lantibiotiques et les bactériocines de la sous-classe IIa. Très peu d'informations sur les relations structure/fonction sont disponibles en ce qui concerne les autres bactériocines de classe II. Cependant, un certain nombre d'éléments structuraux des bactériocines des sous-classes IIb et IIc, également présents chez les bactériocines de la sous-classe IIa, pourraient accomplir des fonctions similaires (104). De tels éléments incluent la présence de charges cationiques, impliquées dans l'interaction

initiale avec la membrane cible, et l'existence d'une hélice α amphiphile, essentielle à la formation de pores (104, 212). Contrairement aux peptides de la sous-classe IIa, les autres bactériocines de la classe II ne présentent pas d'homologie de séquence particulière entre elles. Ces bactériocines sont très différentes du point de vue structural et dans leur spectre d'activité, comme on a pu l'observer avec les entérocinines L50A, L50B, IT et 96,

Cette variété de structures ouvre la voie à la recherche de nouvelles activités antibactériennes visant, non seulement les bactéries d'altération alimentaire ou les pathogènes liés à l'alimentation, mais sans doute des pathogènes de l'environnement gastro-intestinal tels que *H. pylori*. C'est ainsi que le développement récent de la recherche sur les probiotiques a créé un regain d'intérêt pour les bactériocines, essentiellement dans l'objectif d'applications chez l'homme visant à maintenir ou améliorer l'équilibre de la flore intestinale. La recherche de bactériocines avec des nouvelles structures reste un point clé pour arriver à comprendre les relations structure-fonction des classes de bactériocines encore peu connues. La détermination des spectres d'activité des nouvelles bactériocines est importante lors de la sélection des souches pour les nouvelles applications en voie de développement. Cependant, l'activité des nouvelles bactériocines devra être déterminée *in vivo* avant d'envisager une application probiotique.

4

Conclusion

Dans ce travail nous avons purifié et caractérisé 6 bactériocines. Alors que quatre de ces bactériocines, la nisine A, la nisine Z, l'entérocoque L50A et l'entérocoque L50B, avaient été décrites précédemment dans la littérature, deux des bactériocines purifiées, l'entérocoque IT et l'entérocoque, se sont révélées être des structures nouvelles. Les caractéristiques principales et les séquences des bactériocines étudiées sont récapitulées dans les Tableaux 18 et 19.

Tableau 18. Souches étudiées et leurs bactériocines identifiées.

Souche bactérienne	Source	Bactériocine	Classe	Masse moléculaire (Da)	Nombre d'acides aminés
<i>L. lactis</i> RO50	Ensilage de riz	Nisine Z	I	3331	34
<i>L. lactis</i> WHE 99	Fromage de Munster	Nisine Z	I	3331	34
<i>L. lactis</i> WHE 53	Fromage de Munster	Nisine A	I	3354	34
<i>E. faecium</i> IT62	Fourrage d'ivraie	Entérocoque L50A	IIb	5218	44
		Entérocoque L50B	IIb	5206	43
		Entérocoque IT	IIc	6390	54
<i>E. faecalis</i> WHE 96	Fromage de Munster	Entérocoque 96	IIc	5494	48

Tableau 19. Séquences d'acides aminés des bactériocines purifiées et de leurs peptides leader.

Bactériocine	Peptide leader	Séquence
Nisin A	MSTKDFNLDLVSVKKDSGASPR ^a	IDhbAIDhaLAAbuPGAKAbuGALMGANMKAbuAAbuAHASIHVDhaK ┌ s ┐ ┌ s ┐ ┌ s ┐ ┌ s ┐ └ s ┘
Nisin Z	MSTKDFNLDLVSVKKDSGASPR ^a	IDhbAIDhaLAAbuPGAKAbuGALMGANMKAbuAAbuANASIHVDhaK ┌ s ┐ ┌ s ┐ ┌ s ┐ ┌ s ┐ └ s ┘
Entérocoque L50A	-	MGAIAKLVAKFGWPIVKKYYKQIMQFIGEGWAINKIIWIKKHI
Entérocoque L50B	-	MGAIAKLVTKFGWPLIKKFKYKQIMQFIGQGWITDQIEKWLRH
Entérocoque IT	MKKTLLVASLCLFSSLLAFTPSVSFSQNGG VVEA	AAQRGYIYKYPKGAKVPNKVKMLVNIRGKQTMRTCYLMSWTA SSRTAKYYYYYI
Entérocoque 96	MLNKKLENGVVNAVITDELDAQFGG	MSKRDCNLMKACCAGQAVTYAIHSLNRLGGDSSDPAGCNDIVR KYCK

^a Les séquences des peptides leader des nisine A et Z n'ont pas été déterminées dans ce travail, mais obtenues de la littérature (181).

Pour l'étude des bactériocines, nous avons tout d'abord réalisé une détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse. Ensuite, un séquençage par spectrométrie de masse et/ou par la dégradation d'Edman a été réalisé pour caractériser la structure primaire des peptides avec une structure nouvelle ou présentant des modifications chimiques. A ce titre, il est important de noter que la détermination de la structure des bactériocines par les analyses de masse présente l'avantage de révéler des modifications de structure. Au-delà des modifications structurales profondes, commune dans le cas des lantibiotiques, certaines modifications légères telles que des oxydations ou des formylations ne sont en effet pas mises en évidence par le séquençage d'Edman.

Il s'agit également d'une limitation majeure de l'approche génétique à la détermination de structure des bactériocines. Ceci tient à ce que les différentes modifications post-traductionnelles pouvant avoir lieu dans les structures des pré-peptides (clivage, ponts disulfure, acides aminés modifiés ou simplement formylés, etc.) ne sont pas prises en compte. Toutefois, cette approche reste un complément parfois nécessaire au séquençage protéique permettant d'établir la structure peptidique primaire. La structure donnée par le séquençage génétique est celle du pré-peptide, et il faut être prudent dans la détermination du site de clivage de celui-ci et la déduction qui en est faite de la structure de la bactériocine mature. Des erreurs peuvent en effet se produire comme il a été observé dans le cas de la bactériocine 32 (133). Ainsi, une combinaison des approches biochimique et génétique est la meilleure stratégie pour caractériser correctement une bactériocine, ce qui passe nécessairement par l'obtention des peptides purifiés.

L'activité des bactériocines purifiées contre une large gamme de souches, incluant des bactéries pathogènes et d'altération alimentaire a également été déterminée. Les entérocinés L50A, L50B et 96 sont actives contre des pathogènes tels que *S. aureus* et *L. monocytogenes*. Cependant, en vue d'une possible application probiotique des souches productrices de bactériocines, il serait intéressant de tester leur activité vis-à-vis des bactéries de l'environnement gastro-intestinal et d'évaluer l'influence de la production de bactériocines sur la capacité des souches à s'installer dans le tractus gastro-intestinal et à déplacer les espèces indésirables.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

Production of Enterocins L50A, L50B, and IT, a New Enterocin, by *Enterococcus faecium* IT62, a Strain Isolated from Italian Ryegrass in Japan

Esther IZQUIERDO, Audrey BEDNARCZYK, Christine SCHAEFFER, Yimin CAI, Eric MARCHIONI, Alain VAN DORSSELAER, and Saïd ENNAHAR

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, vol. 52, numéro 6, p. 1917-1923

Pages 105-111 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01409-07>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Signalement bibliographique ajouté par :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

Genetic Identification of the Bacteriocins Produced by *Enterococcus faecium* IT62 and Evidence that Bacteriocin 32 Is Identical to Enterocin IT

Esther IZQUIERDO, Yimin CAI, Eric MARCHIONI, and Saïd ENNAHAR

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, vol. 53, n° 5, p. 1907-1911

Pages 112-116 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00052-09>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Signalement bibliographique ajouté par :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

Enterocin 96, a Novel Class II Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecalis* WHE 96, Isolated from Munster Cheese

Esther IZQUIERDO, Camille WAGNER, Eric MARCHIONI, Dalal AOUDE-WERNER, and Saïd ENNAHAR

Applied and Environmental Microbiology, 2009, Vol. 75, n° 13, p. 4273-4276

Pages 117-120 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02772-08>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Chapitre 3

Résistance et installation des probiotiques dans l'environnement gastro-intestinal

1

Introduction

Tandis que l'activité antibactérienne des BAL a été très étudiée durant les deux dernières décennies et que la plupart des molécules impliquées, ainsi que leurs méthodes de purification, sont assez bien connues, les molécules à la base d'autres propriétés bactériennes souhaitables pour les activités probiotiques sont beaucoup moins connues et leur élucidation représente un défi analytique majeur. Comme dans le cas de l'activité antibactérienne, avant d'envisager la caractérisation biochimique des molécules impliquées dans une propriété probiotique et l'étude des mécanismes mis en jeu, il faut pouvoir sélectionner les bonnes souches test. Les effets manifestés par une souche probiotique ne peuvent en effet pas être extrapolés à une autre souche, même dans le cas de souches intraspécifiques. Ainsi, des tests *in vitro*, parfois *in vivo* sur animaux, sont réalisés afin d'évaluer les propriétés de chaque bactérie et pouvoir choisir les souches d'intérêt. Ces dernières peuvent être l'objet d'études visant la caractérisation moléculaire d'activités probiotiques particulières, et certaines peuvent être retenues en prévision des essais cliniques, qui sont nécessaires pour confirmer toute activité probiotique potentielle.

En plus de présenter une innocuité totale pour l'hôte, les microorganismes potentiellement probiotiques doivent survivre, persister temporairement dans le tractus digestif et montrer une activité qui doit se traduire par des effets positifs. Il convient donc de distinguer ici entre trois niveaux de caractéristiques liées aux bactéries destinées à une application probiotique :

- 1) l'absence de caractère toxique ou pathogène pour l'hôte ;
- 2) des propriétés bactériennes utiles ou nécessaires à une activité probiotiques telles que la résistance aux conditions gastriques et à la bile, l'adhésion à la muqueuse intestinale ou la production de bactériocines ;
- 3) des activités probiotiques proprement dites telles que la capacité de stimuler le système immunitaire, de maintenir l'équilibre de la flore intestinale ou de réduire l'intolérance à un type d'aliment.

Une des limitations des tests *in vitro* utilisés lors de la sélection des probiotiques est qu'ils sont souvent destinés à l'évaluation de propriétés bactériennes, plus rarement à celle d'effets probiotiques réels. Ces tests ne reflètent en effet pas toujours très bien le comportement des souches *in vivo*. Toutefois, le coût important des tests *in vivo* et surtout des essais cliniques, fait des tests *in vitro* un outil très utile pour la sélection préliminaire des souches. Ainsi, il est important de développer de tests pouvant simuler au mieux les conditions dans l'organisme. Cependant, il ne faut pas oublier que de bonnes propriétés bactériennes ne suffisent pas pour garantir un effet probiotique et une activité sur l'hôte doit toujours être confirmée par d'autres essais.

Lorsqu'il s'agit de propriétés bactériennes, la capacité des bactéries à résister aux conditions gastro-intestinales et à coloniser de façon transitoire la muqueuse intestinale sont parmi les plus recherchées chez les souches candidates. En ce qui concerne la résistance, par définition, les micro-organismes probiotiques doivent être viables, de la production à la consommation et pendant le transit gastro-intestinal. Les bactéries probiotiques doivent donc survivre au passage par l'estomac et le duodénum. Celles-ci font face à une forte pression de sélection d'une part par la sécrétion gastrique acide et d'autre part par celle de la bile, tout particulièrement les acides biliaires (270). Ainsi, la capacité des souches à survivre à des pH bas et à se développer en présence de bile constitue la base de la sélection préliminaire de souches potentiellement probiotiques.

Pour ce qui de la colonisation du milieu intestinal, la capacité des bactéries d'adhérer à la muqueuse intestinale est considérée comme directement liée à la possibilité d'installation et de multiplication de celles-ci et donc à leur temps de résidence dans l'intestin (267). Étant donné que la colonisation de la muqueuse intestinale est considérée comme nécessaire à la manifestation de plusieurs activités probiotiques chez l'hôte, la capacité d'adhésion compte parmi les critères de sélection des souches potentiellement probiotiques recommandées par le comité d'experts FAO/OMS (92).

Dans ce travail, des souches probiotique commerciales, réputées pour leurs activités bénéfiques sur la santé, ont été choisies parmi *B. longum* et *L. plantarum*. De plus, pour chaque espèce, des souches de collection sans propriétés particulières rapportées et des souches isolées au laboratoire ont également été incluses dans l'étude. Quelques souches d'*Enterococcus*, un genre controversé de BAL, mais au potentiel probiotique incontesté, ont été également introduites dans l'étude. La comparaison des souches étudiées sur la base de trois propriétés probiotiques (la résistance à l'acidité, la tolérance à la bile et la capacité

d'adhésion à la muqueuse intestinale) a servi de point de départ à l'étude protéomique qui a suivi.

2

Matériel et méthodes

2.1. Cultures bactériennes et milieux

Les souches des espèces *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus plantarum*, *E. faecium* et *E. faecalis*, utilisées dans cette étude, ainsi que leurs sources sont indiquées dans le Tableau 20. Les souches *L. rhamnosus* GG et *B. lactis* Bb 12 ont été utilisées comme témoins positifs d'adhésion en raison des niveaux élevés d'adhésion rapportés pour ces deux souches dans de nombreuses études précédentes (217, 219, 220).

Tableau 20. Souches utilisées dans l'étude

Espèce bactérienne	Souche	Caractéristique	Source
<i>Bifidobacterium longum</i>	BB 536	probiotique	Morinaga Milk Industry, Japon
	NCC 2705	probiotique	Nestlé SA, Lausanne, Suisse
	W 11	probiotique	Zirfos, Bologna, Italie
	SP 07/3	probiotique	Bion3® Merck, Lyon, France
	NCIMB 8809	collection	National Collections of Industrial, Marine and Food Bacteria
	ATCC 15707	collection	American Type Culture Collection
	BIR 324	isolat	Fèces humaines
	BIF 53	isolat	Fèces humaines
<i>Bifidobacterium lactis</i>	Bb 12	probiotique	Chr. Hansen, Horsholm, Danemark
<i>Lactobacillus plantarum</i>	299v	probiotique	Probi, Lund, Suède
	CECT 4185	collection	Collection Espagnole de Cultures Types
	CECT 748	collection	Collection Espagnole de Cultures Types
	CECT 749	collection	Collection Espagnole de Cultures Types
	CIP A159	collection	Collection Institut Pasteur
	WHE 92	isolat	Fromage de Munster
	LC 800	isolat	Raifort
	LC 804	isolat	Olives
	LC 56	isolat	Ensilage
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	GG	probiotique	Valio, Ltd., Helsinki, Finlande
<i>Enterococcus faecium</i>	CECT 410	collection	Collection Espagnole de Cultures Types
	WHE 81	isolat	Fromage de Munster
<i>Enterococcus faecalis</i>	CECT 481	collection	Collection Espagnole de Cultures Types
	CECT 795	collection	Collection Espagnole de Cultures Types
	WHE 96	isolat	Fromage de Munster

Les lactobacilles et les entérocoques sont cultivés dans un milieu MRS et incubés à 37°C en conditions aérobies. Les bifidobactéries sont cultivées dans du bouillon MRSC, consistant en un milieu MRS supplémenté avec 0,05% (m/v) de cystéine (Sigma, St. Louis, MO, USA) et incubées à 37°C en conditions anaérobies (AnaeroGen, Oxoid, Basingstoke, Royaume Uni). L'isolement des souches probiotiques (W11, SP 07/3 et Bb12) à partir de produits commerciaux a été effectué dans une gélose MRSC contenant 80 µg/ml de mupirocine. Les bifidobactéries présumées ont été identifiées par PCR spécifique au genre et séquençage partiel ADNr 16s avec les amorces Y1 et Y2 comme décrit précédemment (116).

2.2. Test d'adhésion au mucus

En vue des tests d'adhésion, une culture en fin de phase exponentielle (18-20 h) a été inoculée dans le bouillon approprié (MRS pour les lactobacilles et entérocoques et MRSC pour les bifidobactéries) à 1% (v/v) de façon à obtenir une concentration d'environ 10^7 UFC/ml, puis incubée à 37°C pendant 20 h. Les cellules obtenues ont été collectées par centrifugation (6000 g pendant 10 min à 4°), lavées deux fois et remises en suspension dans un tampon PBS. Les suspensions bactériennes ont été ajustées à une absorbance de $2,00 \pm 0,05$ à 600 nm (A_{600}) et incubées avec 100 µM de diacétate de carboxyfluoresceine ou cFDA (Sigma, Steinheim, Allemagne) pendant 30 min à 37°C pour le marquage des bactéries (22). Ensuite, les bactéries ont été lavées deux fois et remises en suspension dans du PBS. La suspension bactérienne de travail marquée a été ajustée à $A_{600} 0,50 \pm 0,05$.

La mucine d'estomac porcine a été diluée dans du PBS à une concentration de 0,5 mg/ml et 100 µl de cette solution ont été déposés dans les puits d'une microplaque en polystyrène (Sterilin, Staffordshire, UK). Les microplaques ont été incubées pendant la nuit à 4°C pour permettre à la couche de mucine d'adhérer à la surface des puits (156). Pour enlever la partie du mucus qui n'a pas adhéré à la surface, les puits ont été lavés deux fois avec 200 µl de PBS. Cent µl de la suspension bactérienne de travail marquée ont été ajoutés à chaque puits et les plaques ont été incubées à 37°C pendant 1 h. Ensuite, les puits ont été lavés deux fois avec 200 µl de PBS pour enlever les bactéries qui n'ont pas adhéré. Les bactéries adhérentes ont été lysées par incubation à 37°C pendant 1 h avec 200 µl d'une solution à 1% (m/v) en dodécyl sulphate de sodium (SDS) dans du NaOH 0,1 M. La fluorescence contenue dans les bactéries adhérentes est libérée dans la solution et le contenu des puits a été transféré dans une

microplaque opaque pour l'analyse de fluorescence. La fluorescence a été mesurée à 485 et 538 nm comme longueurs d'onde respectives d'excitation et d'émission à l'aide d'un fluorimètre Multiscan (Fluoroskan Ascent, Labsystem, Oy, Finlande). Le résultat obtenu est représentatif de la population de bactéries adhérees par puits. Parallèlement, 100 µl de la suspension bactérienne de travail marquée ont été lysés par incubation à 37°C pendant 1 h avec 100 µl d'une solution 2% (m/v) de SDS dans du NaOH 0,2 M. La fluorescence a été mesurée comme décrit précédemment. Le résultat obtenu est représentatif de la population de bactéries ajoutées par puits. L'adhésion est exprimée en pourcentage de fluorescence retrouvé après adhésion à la mucine, par rapport à la fluorescence de la suspension bactérienne ajoutée par puits. L'adhésion a été déterminée en trois expériences indépendantes et chaque test a été réalisé en triplicat.

Les données obtenues sont soumises à une analyse de variance à un facteur contrôlé (one-way ANOVA) en utilisant le test de la plus petite différence significative (T multiple protégée) pour la comparaison des moyennes. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Statgraphics plus version 5.1 (Manugistics, Rockville, MD, USA).

2.3. Caractérisation préliminaire des mécanismes d'adhésion

Les souches étudiées ont été soumises à plusieurs traitements et leur influence sur la capacité d'adhésion de ces bactéries a été déterminée. Des suspensions bactériennes, réalisées dans les conditions détaillées précédemment, ont été ajustées à $A_{600} 2,00 \pm 0,05$ dans du PBS et soumises aux traitements suivants :

- Incubation avec de la trypsine (Sigma, St. Louis, MO, USA) 1mg/ml à 37°C pendant 1h.
- Incubation avec de la lipase (Sigma) 1mg/ml à 37°C pendant 1h.
- Incubation avec du métaperiodate de sodium 3mg/l à 37°C pendant 1h.
- Incubation avec du LiCl 1M, 3 M et 5M à 37°C pendant 1 h.
- Incubation avec du SDS 0,1% (m/v) à 37°C pendant 10 min.
- Incubation avec du dodécyl-β-D-maltoside (DDM) à 0,1% à 37°C pendant 2 h.
- Incubation avec du DDM 0,1% et du LiCl 5 M à 37°C pendant 2 h.
- Incubation avec du lysozyme 2 mg/ml à 37°C pendant 2 h.
- Dix cycles de sonication de 30 min chacun (dans la glace).

Parallèlement, une suspension bactérienne dans du PBS a été incubée dans les mêmes conditions et utilisée comme témoin. Après incubation, les cellules sont collectées par centrifugation (5000 g pendant 5 min à 4°C), lavées et remises en suspension dans du PBS. Le marquage au cFDA et les tests d'adhésion, sont réalisés comme décrit précédemment. Après chaque traitement, les cellules viables sont énumérées par dilutions en cascade et dénombrements sur des boîtes de gélose et comparées aux témoins.

2.4. Résistance aux conditions gastro-intestinales simulées

Des tests de résistance à la bile et aux conditions acides ont été réalisés sur les souches de *B. longum* et *L. plantarum*. Les tests sur *B. longum* ont été réalisés à l'Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) de Valence (Espagne).

Afin de déterminer la résistance des souches étudiées à l'acidité gastrique, 10 ml d'une culture en fin de phase exponentielle (18 à 20 h) ont été centrifugés, lavés deux fois et les cellules remises en suspension dans 10 ml de PBS (densité bactérienne d'environ 10^9 UFC/ml). Un millilitre de cette suspension bactérienne a été ensuite ajouté dans un tube contenant 9 ml d'une solution saline stérile avec 0,3 g/l de pepsine (Sigma), de façon à obtenir une population initiale d'environ 10^8 UFC/ml, et ajustée à différentes valeurs de pH (1,5 ; 2,0 ; 2,5 et 3,0) avec du HCl. Des aliquotes de cette solution ont été pris au temps 0 et après 90 min d'incubation à 37°C. La viabilité des bactéries après exposition à pH acide a été déterminée par des dilutions en cascade et un dénombrement sur boîtes de Pétri. Dans le cas des bifidobactéries, une deuxième méthode a été utilisée pour mesurer la viabilité des souches après exposition à pH acide. Le kit LIVE/DEAD BackLight (Molecular Probes, Leiden, Pays-Bas) a été utilisé selon les indications du fabricant. Cette méthode est basée sur le marquage de l'ADN des cellules avec deux fluorochromes avec des propriétés différentes : le SYTO[®]9 (fluorescence verte) et iodure de propidium (fluorescence rouge). Ces fluorochromes diffèrent par leur habilité à pénétrer les cellules bactériennes saines. Quand le SYTO[®]9 est utilisé seul il marque tant les cellules vivantes que les mortes. Par contre, l'iodure de propidium ne pénètre que les bactéries dont la membrane est endommagée, réduisant la fluorescence du SYTO[®]9 quand les deux fluorochromes sont présents. Ainsi, les bactéries dont la membrane est intacte fluorescent en vert et celles mortes avec la membrane endommagée le font en rouge. Les énumérations des cellules vivantes (fluorescence verte) et mortes (fluorescence rouge) ont été réalisées à l'aide d'un microscope BX 51 (Olympus, Tokyo, Japon).

La tolérance des souches de *L. plantarum* à la bile a été déterminée dans un bouillon MRS en présence de 0,5%, 1,0%, 2,0% et 3,0% (m/v) de bile bovine (Oxgall, Sigma). Ce milieu de culture a été inoculé avec une culture de 18-20 h de façon à obtenir une concentration d'environ 10^5 UFC/ml, puis déposé dans les puits d'une microplaque qui est ensuite incubée à 37°C. L'absorbance à 600 nm a été suivie dans un lecteur de microplaques Bioscreen 200C (Labsystems). La tolérance des souches de *B. longum* à la bile a également été déterminée (tests réalisés à l'IATA-CSIC à Valence) selon le même protocole avec quelques modifications. Un bouillon MRSC a été utilisé et les puits ont été couverts de vaseline pour créer l'anaérobiose. L'absorbance a été suivie à l'aide d'un lecteur de microplaques 550 (Bio-Rad).

3

Résultats et discussion

3.1. Adhésion à la mucine

Dans cette étude, une mucine commerciale d'origine porcine a été utilisée comme un modèle simple de mucus. Nous avons utilisé comme témoin positif d'adhésion deux souches probiotiques, *B. lactis* Bb12 et *L. rhamnosus* GG, dont les taux d'adhésion rapportés dans la littérature sont particulièrement élevés. Ces deux souches, dont la capacité d'adhésion a été largement étudiée, nous ont également servi à valider l'utilisation de la mucine porcine pour les tests d'adhésion. En effet, les niveaux d'adhésion de *B. lactis* Bb12 mesurées dans notre étude ($8,9\% \pm 1,9\%$) étaient en accord avec ceux ($9,8\%$, $10,6\%$) rapportés dans des travaux précédents dans lesquels du mucus intestinal humain avait été utilisé, montrant ainsi que la mucine porcine peut être utilisée pour les tests d'adhésion avec des résultats similaires (217, 220). L'adhésion de *L. rhamnosus* GG rapportée dans la littérature (de $19,3\%$ jusqu'à 40%) est cependant plus élevée que celle obtenue dans notre étude ($9,6\% \pm 1,1\%$) (217, 219, 220). Toutefois, étant données les grandes variations observées entre les données publiées, notre valeur reste acceptable, car il s'agit d'un taux d'adhésion assez élevé par rapport à celui des autres souches testées.

Une méthode indirecte basée sur un marquage par un fluorochrome (carboxyfluoresceine) a été utilisée pour l'énumération des bactéries adhérentes. Les bactéries ont été incubées dans une solution de diacétate de carboxyfluoresceine (cFDA), un composé capable traverser relativement aisément la membrane plasmique. Une fois à l'intérieur de la cellule bactérienne, le cFDA est hydrolysé en carboxyfluoresceine qui est retenue à l'intérieur de la cellule grâce à ses charges négatives supplémentaires et ne peut être libérée tant que la membrane plasmique est intacte. Ainsi, la fluorescence libérée et mesurée après lyse au SDS des cellules adhérentes à la mucine est indicatrice de la taille de cette population. Les taux d'adhésion déterminés par cette méthode sont en effet comparables à ceux obtenus par dénombrement des bactéries sur boîtes de gélose (comparaison des deux méthodes réalisée pour les souches de *B. longum* NCC2705, BIF 53, ATCC 15707 et NCBI 8809 dénombrées sur gélose MRSC).

La capacité d'adhésion au mucus des souches de *B. longum*, *L. plantarum*, *E. faecium* et *E. faecalis* étudiées est indiquée dans les Figures 34, 35 et 36. Les taux d'adhésion obtenus pour les bactéries étudiées varient largement (de 1,2 à 22,7%) selon l'espèce et la souche.

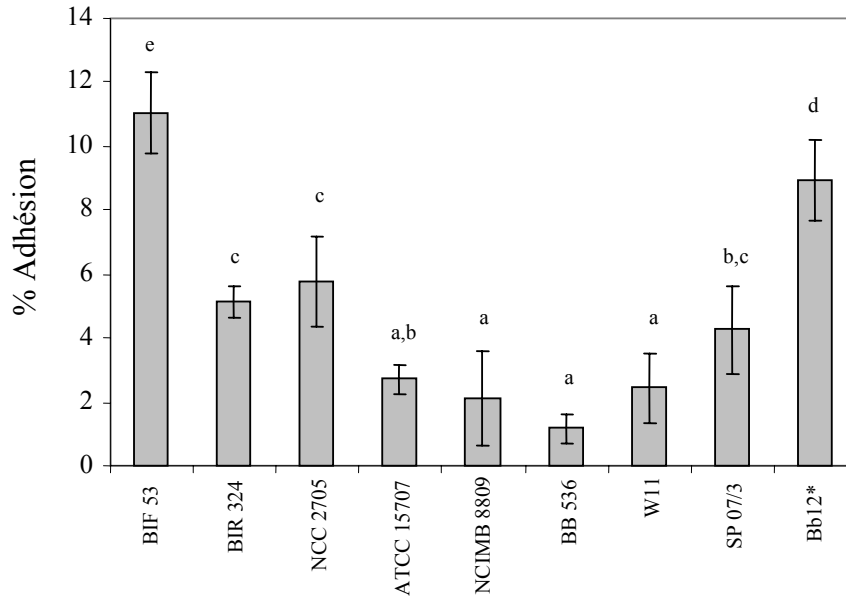


Figure 34. Taux d'adhésion des différentes souches de *B. longum* et du témoin (*) *B. lactis* Bb12 aux glycoprotéines du mucus. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes. Les moyennes avec des lettres différentes (a à e) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

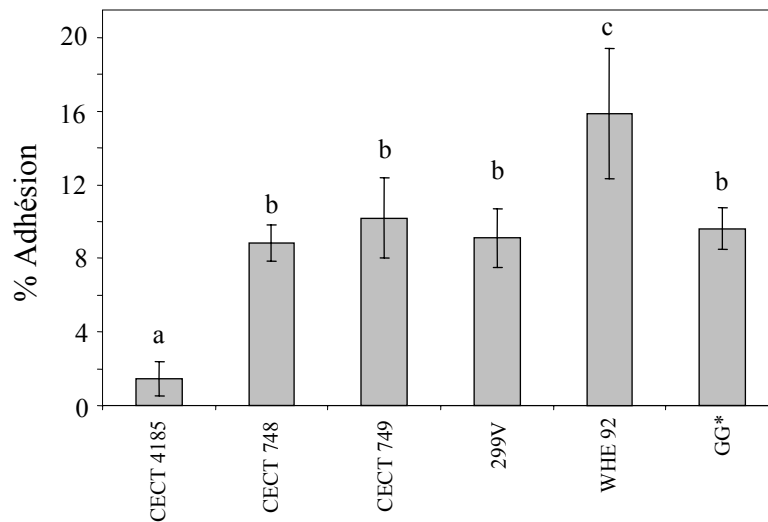


Figure 35. Taux d'adhésion des différentes souches de *L. plantarum* et du témoin (*) *L. rhamnosus* Bb12 aux glycoprotéines du mucus. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes. Les moyennes avec des lettres différentes (a à c) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

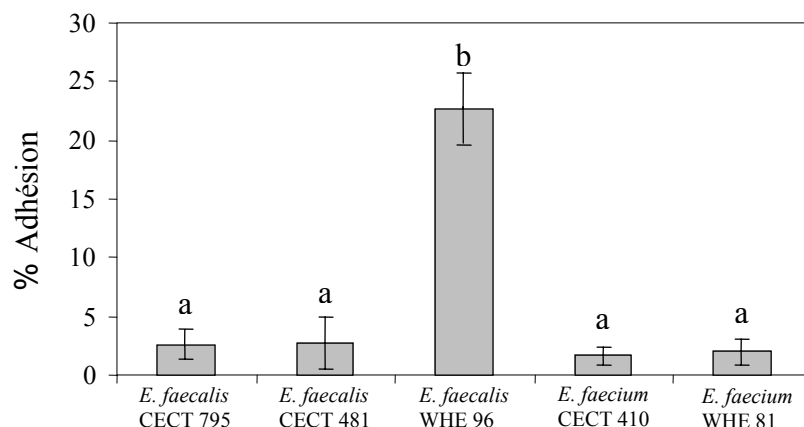


Figure 36. Taux d'adhésion des souches de *E. faecalis* et *E. faecium* aux glycoprotéines du mucus. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes. Les moyennes ne présentant pas des lettres communes (a et b) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

Parmi les *B. longum* étudiées, on peut observer qu'il existe une grande variabilité entre les souches. L'isolat de laboratoire *B. longum* BIF 53 est la souche de cette espèce avec le taux d'adhésion le plus élevé ($11,1\% \pm 1,1\%$), similaire à celui du témoin positif, *B. lactis* Bb 12 ($8,9\% \pm 1,3\%$), et significativement supérieur à celui de toutes les souches commerciales utilisées : *B. longum* W 11, BB 356 et SP07/3. Étonnamment, le taux d'adhésion des probiotiques commerciaux *B. longum* SP07/3 (110), W11 (72, 91) et BB536 (301) s'est avéré être assez faible et non significativement différent de celui des souches de collection sans aucune propriété probiotique rapportée, telles que *B. longum* ATCC 15707 et NCBI 8809. Même si les probiotiques peuvent exercer une certaine activité pendant le passage transitoire, sans être liés à l'épithélium, le manque d'adhésion observé pour ces souches commerciales signifie probablement des temps de séjour réduits et des effets bénéfiques plus faibles. La souche NCC 2705, probiotique de la collection de Nestlé, a montré une capacité d'adhésion moyenne ($5,7\% \pm 1,4\%$), significativement supérieure à celle des souches commerciales W11 et BB536, mais inférieure aux valeurs observées pour *B. longum* BIF 53 et *B. lactis* Bb12.

Les souches de *L. plantarum* ont montré une meilleure capacité d'adhésion que celles de *B. longum*, à l'exception de la souche de collection *L. plantarum* CECT 4185 ($1,4\% \pm 0,9\%$). Un isolat de laboratoire, *L. plantarum* WHE 92, s'est montré être la souche la plus adhésive parmi les *L. plantarum* testés, avec des taux d'adhésion ($15,9\% \pm 3,5\%$) supérieurs à ceux ($9,6\% \pm 1,1\%$) du témoin positif *L. rhamnosus* GG et à ceux ($9,1\% \pm 1,6\%$) de la souche commerciale *L. plantarum* 299V, un probiotique très utilisé et réputé par avoir une capacité

d'adhésion élevée (185). Même si elle est plus adhésive que la plupart des bifidobactéries testées, cette dernière présente un taux d'adhésion intermédiaire parmi les souches de *L. plantarum* testés, non significativement différent de ceux des souches de collection CECT 748 et CECT 749. Quant à *L. plantarum* WHE 92, sa forte capacité d'adhésion, associée à sa production de bactériocine (87), suggère sans doute un intérêt potentiel pour une utilisation probiotique.

La souche la plus adhésive de toutes celles que nous avons testées est *E. faecalis* WHE 96. Cette souche, productrice de l'entérotoxine 96 (Chapitre 2), présente un taux d'adhésion de $22,7\% \pm 3,1\%$, ce qui est nettement supérieur en comparaison avec les autres souches testées et deux fois plus grand que ce qui est mesuré pour les souches témoin, considérées comme fortement adhésives. Cette capacité d'adhésion particulièrement élevée est d'autant plus surprenante que toutes les autres souches d'*E. faecalis* et d'*E. faecium* testées présentent des taux d'adhésion très faibles.

Les taux d'adhésion obtenus varient très significativement entre les souches. Toutefois, en moyenne, on peut observer que les lactobacilles adhèrent un peu mieux que les bifidobactéries. De bons résultats d'adhésion ont déjà été rapportés dans la littérature pour les lactobacilles (267). Comme il a été évoqué, l'adhésion semble être un facteur déterminant dans la manifestation d'activités probiotique, d'autant que des probiotiques hautement adhésifs, comme *L. rhamnosus* GG et *L. plantarum* 299V, ont montré la capacité de coloniser le tractus gastro-intestinal animal (130, 265). Parmi les effets qui semblent être étroitement liés à l'adhésion, il y a les activités antagonistes contre des espèces indésirables. Ceci est particulièrement intéressant dans le cas de *L. plantarum* WHE 92 par exemple, étant donné que cette souche a une capacité d'adhésion très élevée, en plus de celle de produire une bactériocine, la pédiocine PA-1. Sa capacité d'adhésion pourrait ainsi accroître ou prolonger dans le temps l'effet éventuellement positif de la bactériocine et inversement la présence de la bactériocine donne à la souche un avantage compétitif qui peut favoriser son installation au tractus gastro-intestinal.

En ce qui concerne les bifidobactéries, environ la moitié des souches testées ont montré des capacités d'adhésion très faibles, notamment dans le cas de souches commerciales. Des taux très variables d'adhésion ont été rapportés pour ces bactéries dont le pouvoir de colonisation *in vivo* a également été lié à leur capacité d'adhésion (53, 239) (62, 178).

En ce qui concerne la capacité d'adhésion des entérocoques, très peu d'information est disponible en comparaison au grand nombre d'études réalisées sur les lactobacilles et les bifidobactéries. Ceci est certainement dû à la controverse existante autour de ce genre, et donc à l'intérêt moindre qu'il suscite lorsqu'il s'agit d'applications probiotiques. De plus, le peu d'études disponibles ont été réalisés uniquement sur des isolats de laboratoire et non sur des souches de collection, ce qui aurait permis des comparaisons de données (172, 233). Nos résultats confirment néanmoins le potentiel probiotique important des entérocoques, étant donné que c'est un entérocoque, *E. faecalis* WHE 96, qui a montré le taux d'adhésion au mucus le plus élevé de toutes les souches testées, cette capacité d'adhésion étant en plus accompagnée par la production d'une bactériocine.

Afin de caractériser la nature des molécules de la paroi cellulaire probablement impliquées dans l'adhésion au mucus, les souches les plus adhésives des quatre espèces étudiées (*B. longum* BIF 53, *B. longum* NCC 2705, *L. plantarum* WHE 92, *L. plantarum* 299V, *L. plantarum* CECT 748, *L. plantarum* CECT 749 et *E. faecalis* WHE 96) ont été soumises à plusieurs traitements. Dans un premier temps, les bactéries ont été incubées en présence de trypsine et de lipase pour étudier l'influence des composants de la paroi cellulaire de nature protéique et lipidique. Un traitement similaire visant à évaluer l'importance des exopolysaccharides cellulaires dans le processus d'adhésion a été envisagé avec du métapériodate de sodium (réactif qui oxyde les carbohydrates). Néanmoins, avec ce traitement la surface des bactéries devenait de couleur marron et les cultures prenaient un aspect grumeleux. Par conséquent, les bactéries ne pouvaient pas être marquées au cFDA. Ce traitement étant incompatible avec notre méthode de marquage, il a été abandonné. Le lysozyme, une protéine qui dégrade le peptidoglycane a également été utilisé pour traiter les cellules, ainsi que des détergents (SDS et DDM), du LiCl et un traitement physique par sonication.

L'adhésion après chaque traitement a été mesurée et comparée à celle d'un témoin non traité de la même culture. Le Tableau 21 indique les résultats concernant l'influence des enzymes sur la capacité d'adhésion de quelques souches sélectionnées, ceux-ci sont exprimés en pourcentage d'adhésion perdu après chaque traitement par rapport au témoin. Le traitement avec la lipase a provoqué une certaine réduction de la capacité d'adhésion des bactéries, mais cette réduction n'est significative que pour les souches de *L. plantarum* 299V et CECT 749. Pour les autres souches, la réduction a été faible et très variable de manière à ce qu'aucun résultat significatif ne pouvait être dégagé. Cette variabilité n'est toutefois pas surprenante au

vu des données dans la littérature (52, 53, 220). Le traitement à la trypsine a, quant à lui, provoqué une réduction significative de l'adhésion de toutes les souches testées à l'exception de *B. longum* NCC 2705. Parfois, cette réduction de l'adhésion était très importante, comme dans le cas de *L. plantarum* 299V et WHE 92 où elle a atteint 80% de la valeur de départ. Ceci indique que des molécules de la paroi cellulaire de nature protéique sont impliquées dans l'adhésion de la plupart de souches aux glycoprotéines du mucus

Tableau 21. Effets des traitements enzymatiques sur l'adhésion des bactéries aux glycoprotéines du mucus.

Souche	Perte d'adhésion (%) [*]		
	Lipase (1mg/ml)	Trypsine (1mg/ml)	Lysozyme (2mg/ml)
<i>B. longum</i> BIF 53	29,7% ± 34,0%	67,4% ± 20,6% ^a	57,7% ± 17,7%
<i>B. longum</i> NCC 2705	17,2% ± 18,4%	25,9% ± 26,9%	38,5% ± 15,9%
<i>L. plantarum</i> WHE 92	11,0% ± 17,8%	79,8% ± 12,8% ^a	40,5% ± 6,7%
<i>L. plantarum</i> 299V	66,0% ± 10,0% ^a	80,1% ± 2,0% ^a	38,4% ± 15,6%
<i>L. plantarum</i> CECT 748	8,3% ± 24,4%	44,3% ± 9,2% ^a	n.d.
<i>L. plantarum</i> CECT 749	46,6% ± 9,8% ^a	64,8% ± 7,9% ^a	n.d.
<i>E. faecalis</i> WHE 96	-11,3% ± 21,1%	73,0% ± 4,1% ^a	n.d.

* Données exprimées en tant moyenne ± écart type de trois expériences indépendantes.

^a Significativement différent ($P < 0.05$) du témoin (bactéries incubées dans du PBS avant le test d'adhésion).

n.d. : non déterminé

Les souches *L. plantarum* 299V et CECT 749 ont subi une réduction d'adhésion très importante en présence de trypsine, mais également en présence de lipase, ce qui indique qu'en plus des protéines, des composés de nature lipidique pourraient aussi influencer l'adhésion de ces souches. La souche *B. longum* NCC 2705 est différente des autres souches testées dans la mesure où sa capacité d'adhésion ($5,7\% \pm 1,4\%$) ne diminue pas significativement, ni avec la trypsine, ni avec la lipase. Ceci pourrait laisser penser à l'intervention d'autres composants dans l'adhésion de cette souche tels que des exopolysaccharides (293). Toutefois, étant donné que d'autres souches de la même espèce ont été sensibles à la trypsine, il est vraisemblable que les molécules impliquées dans l'adhésion soient de la même nature que pour les autres *B. longum*, mais que des petites différences de composition rendent la souche NCC 2705 plus résistante au traitement trypsique..

Le traitement avec du LiCl, méthode classique utilisée pour la solubilisation des composants de surface bactérienne, n'a provoqué aucune réduction dans la capacité d'adhésion des souches testées par rapport au témoin, indiquant qu'après ce traitement les molécules responsables de l'adhésion restent attachées à la paroi cellulaire. De même, la sonication et le traitement avec des détergents, comme le DDM et le SDS, n'ont pas eu d'effet sur l'adhésion. Un traitement combinant le DDM à 0,1% et le LiCl à 5 M, ayant affecté la viabilité des cellules (réduction d'environ 2 log), n'a pas été pris en compte dans l'étude.

Le lysozyme a, quant à lui, provoqué une diminution significative de l'adhésion. Le lysozyme est une hydrolase qui détruit la paroi bactérienne en catalysant l'hydrolyse des glycosaminoglycanes la constituant (Figure 37). Son action vise les liaisons covalentes entre l'acide N-acétyl-muramique et le quatrième atome de carbone de la N-acétyl-glucosamine. Le peptidoglycane est alors hydrolysé et les protéines contenues dans la paroi cellulaire sont solubilisées. La membrane cytoplasmique reste intacte et les protéines intracellulaires ne sont pas extraites. Le fait que seul le lysozyme soit capable de détacher les molécules impliquées dans l'adhésion des souches étudiées indique que ces molécules sont fortement liées à la paroi cellulaire, autrement, elles auraient pu être extraites par le LiCl ou par sonication.

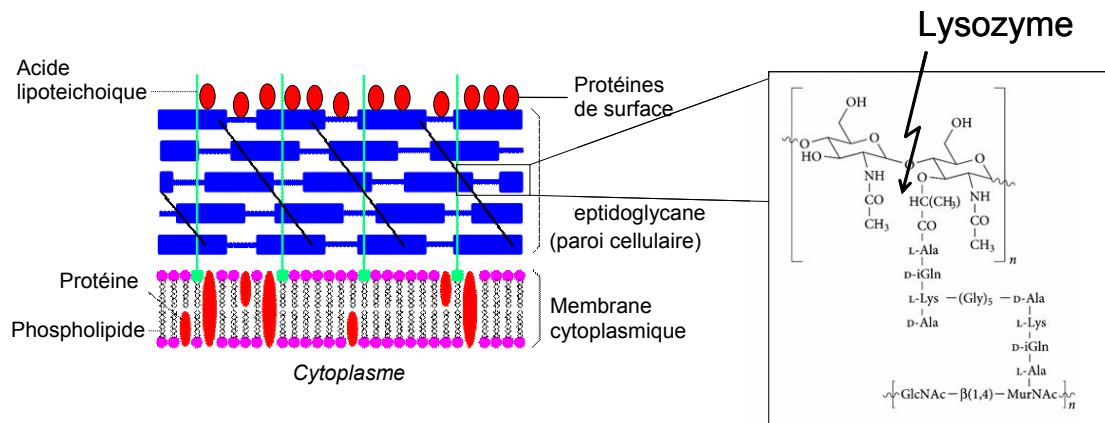


Figure 37. Schéma de la composition de l'enveloppe cellulaire des bactéries Gram-positives, structure du peptidoglycane et site d'action du lysozyme.

La nature protéique des molécules responsables de l'adhésion est en accord avec la littérature, puisque la majorité des molécules ayant une relation avec l'adhésion des probiotiques qui ont été identifiées et caractérisées sont de nature protéique (7, 9, 10, 34, 113, 117, 232, 251, 259, 293). Ces protéines identifiées sont assez diverses et incluent des protéines de la couche-S, des enolases et d'autres enzymes, ainsi que des protéines de stress.

Ces protéines interagiraient avec des surfaces telles que la muqueuse intestinale à travers des interactions faibles de nature électrostatique, hydrophobe ou simplement par des forces stériques (267). Une étude plus approfondie des protéines impliquées dans l'adhésion des souches de *L. plantarum* a été réalisée dans le chapitre 4.

3.2. Résistance aux conditions acides

L'une des conditions principales pour qu'une souche réponde à la définition de probiotique est qu'elle doit être viable de la production à la consommation et pendant le transit gastro-intestinal. Avant de pouvoir adhérer et s'installer, même de façon transitoire, les bactéries probiotiques doivent survivre au passage par l'estomac. Afin de déterminer cette capacité de survie chez des souches de *B. longum* et de *L. plantarum*, l'effet de l'exposition à un milieu gastrique simulé sur ces bactéries a été examiné. Les souches ont été exposées à des pH acides en présence de pepsine pendant 90 min et ensuite la proportion de cellules viables (et cultivables) a été évaluée par dénombrement sur des boîtes de gélose.

Dans le cas des bifidobactéries, une deuxième méthode, basée sur l'évaluation de l'intégrité de la membrane, a également été utilisée pour déterminer la viabilité des cellules après exposition à pH acide, et ce en utilisant un kit de viabilité cellulaire LIVE/DEAD® BacLight™. Il est intéressant de comparer les résultats issus de ces deux méthodes, étant donné que suivant l'intensité du traitement des cellules peuvent très bien être viables (membrane intègre) mais incapables de se multiplier (non cultivables). L'effet de l'acidité sur la viabilité et sur la capacité de croissance de *B. longum* est indiqué dans le Tableau 22. L'effet de l'acidité sur la capacité de croissance de *L. plantarum* est indiqué dans le Tableau 23.

Tableau 22. Effet de l'exposition à un milieu acide sur la viabilité des souches de *B. longum*.

	Viabilité *			Viabilité et croissance §							
	pH			pH							
	3			3		2,5		2			
	3	2,5	2	Témoin	Log UFC/ml	(%)	Log UFC/ml	(%)	Log UFC/ml	(%)	
NCC 2705	97,24±1,30 ^a	96,05±3,45 ^a	87,52±2,38 ^a	9,05±0,01	9,01±0,05	99,6 ^a	7,91±0,23	87,5 ^b	7,49±0,05	82,5 ^a	
W 11	93,52±1,90 ^{ab}	89,67±1,83 ^b	84,58±1,97 ^a	9,10±0,04	8,76±0,02	96,2 ^b	6,69±0,04	73,5 ^c	5,03±0,04	55,3 ^d	
BIR 324	89,43±2,31 ^{bc}	72,96±1,00 ^{de}	61,62±1,68 ^b	9,10±0,02	8,82±0,03	96,9 ^b	8,80±0,15	96,8 ^a	5,79±0,08	63,6 ^b	
ATCC 15707	88,11±2,42 ^{bc}	70,51±1,20 ^{de}	65,47±1,09 ^b	9,25±0,02	9,21±0,01	99,6 ^a	5,96±0,4	64,4 ^c	5,67±0,0	61,3 ^c	
BIF 53	96,28±2,64 ^{ab}	68,57±1,80 ^c	46,59±3,20 ^c	9,12±0,11	9,04±0,01	99,2 ^a	8,32±0,03	96,8 ^a	5,45±0,04	52,6 ^c	
BB 536	87,03±1,81 ^c	75,65±2,06 ^{cd}	13,54±2,01 ^d	9,43±0,01	8,43±0,01	89,5 ^c	6,39±0,55	67,7 ^d	0,00	0,00	
SP 07/3	98,43±1,90 ^a	78,35±1,70 ^c	11,57±3,69 ^d	9,00±0,0	7,31±0,03	81,2 ^d	4,76±0,06	52,8 ^f	0,00	0,00	
NCIMB 8809	1,82±0,50 ^d	0,00	0,00	8,08±0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

* Les résultats sont exprimés en pourcentage, par rapport à un témoin non traité, de viabilité des suspensions bactériennes, détectée avec le kit LIVE/DEAD® BacLight™.

§ Les résultats sont exprimés en log UFC/ml, déterminé par dénombrement sur boîtes de gélose et en pourcentage de bactéries viables par rapport à un témoin non traité,

*§ Les moyennes ± écarts type de trois expériences indépendantes sont données. Les moyennes dans la même colonne ne présentant pas des lettres communes, sont significativement différentes (P<0.05).

Tableau 23. Effet de l'exposition à un milieu acide sur la viabilité des souches de *L. plantarum*.

Souches	Viabilité et croissance*						
	pH	3		2,5		2	
	Contrôle	Log UFC/ml	%	Log UFC/ml	%	Log UFC/ml	%
LC 800	8,37 ± 0,10	8,14 ± 0,18	97,3 ^{a,b}	5,26 ± 0,20	62,8 ^a	1,93 ± 1,98	23,1 ^a
LC 804	8,19 ± 0,07	8,05 ± 0,06	98,2 ^b	5,60 ± 1,00	68,3 ^a	2,50 ± 2,48	30,46 ^a
CECT 748	8,41 ± 0,22	8,31 ± 0,20	99,2 ^b	5,56 ± 1,06	66,4 ^a	1,65 ± 1,52	19,7 ^a
CECT 749	8,32 ± 0,06	7,29 ± 0,51	92,4 ^{a,b}	5,29 ± 0,77	67,0 ^a	1,67 ± 1,50	21,1 ^a
CIP A159	8,04 ± 0,06	7,78 ± 0,05	96,7 ^{a,b}	4,62 ± 1,19	57,4 ^a	1,87 ± 2,10	23,3 ^a
WHE 92	8,09 ± 0,20	7,76 ± 0,03	95,9 ^{a,b}	1,65 ± 2,86	20,4 ^b	0	0 ^a
299V	8,21 ± 0,66	7,21 ± 1,03	87,8 ^a	4,12 ± 1,22	50,2 ^a	1,20 ± 2,08	14,6 ^a
CECT 4185	8,26 ± 0,50	7,65 ± 0,73	92,6 ^{ab}	3,71 ± 1,07	44,9 ^{a,b}	0	0 ^a
LC 56	7,15 ± 0,32	7,05 ± 0,50	98,7 ^b	3,96 ± 0,19	55,5 ^a	1,56 ± 1,55	21,9 ^a

* Les résultats sont exprimés en log UFC/ml, déterminé par dénombrement sur boîtes de gélose et en pourcentage de bactéries viables par rapport à un témoin non traité. Les moyennes ± écarts type de trois expériences indépendantes sont données. Les moyennes dans la même colonne ne présentant pas des lettres communes (a et b), sont significativement différentes (P<0.05).

Il apparaît que la résistance des deux espèces étudiées à l'acidité varie selon la souche, le pH testé et la technique de mesure. En ce qui concerne *B. longum*, cette espèce résiste assez bien à pH 3,0, mais avec des différences notables entre les souches. Les souches les plus sensibles, telles que BB 536 et SP 07/3, subissent toutefois des réductions de l'ordre d'un log à ce pH, alors que NCIMB 8809, la souche la plus sensible de toutes les souches testées n'y est plus viable (détermination par dénombrement sur gélose). A un pH de 1,5, aucune souche ne demeure viable, mais c'est aux pH 2,0 et 2,5 qu'on apprécie le mieux les différences entre les souches. Globalement, *B. longum* NCC 2705 est la souche la plus résistante à l'acidité, tandis que les probiotiques commerciaux BB 536 et SP 07/3 sont parmi les souches les plus sensibles.

La viabilité détectée par le kit LIVE/DEAD est en général plus élevée que celle détectée par dénombrement sur gélose et pour certaines souches on peut observer un décalage assez significatif entre les deux méthodes (Tableau 22). Ce décalage entre la viabilité des souches et leur capacité de croissance complique un peu l'évaluation de la résistance à l'acidité. Les méthodes basées sur la mise en culture, comme le dénombrement sur gélose,

sont les plus utilisées pour ce type de déterminations et en principe les plus adéquates, mais il semble qu'elles ne donnent qu'une vision limitée de l'état physiologique des cellules bactériennes (167). Cependant, malgré les limitations des tests *in vitro*, les études comparatives comme celle réalisée ici donnent une idée préliminaire de la résistance relative des souches aux conditions gastriques.

En ce qui concerne les lactobacilles, on peut observer qu'ils résistent très bien à l'exposition à pH 3,0. Après 90 min à pH 3,0, la réduction de la capacité de croissance des souches est négligeable. L'incubation à pH 2,5 a un effet beaucoup plus important et produit une réduction des UFC/ml d'environ 3 log. A pH 2,0, on remarque de grandes variations entre les différentes répétitions, ce qui se traduit par des écarts type importants, qui empêchent d'observer des différences entre les souches. En général, les souches perdent de l'ordre de 6 log UFC/ml quand elles sont exposées à pH 2,0. Cependant, si on tient compte des écarts type, le pourcentage de bactéries cultivables n'est pas significativement différent de 0. En effet, les tests de survie par dénombrement sur boîtes de gélose sont très sensibles à des petites variations des conditions et généralement les résultats obtenus ne sont pas toujours précis. Ceci est d'autant plus important quand la population à évaluer est faible, comme dans le cas des tests à pH 2. Une mauvaise homogénéisation des tubes a pu provoquer les grandes variations observées. Aucune des souches de *L. plantarum* testées ne demeure viable après exposition à pH 1,5.

Contrairement à ce qui avait été observé pour *B. longum*, toutes les souches de *L. plantarum* testées ont un comportement assez similaire à pH acide. La résistance à l'acidité des *L. plantarum* étudiés n'est pas significativement différente d'une souche à une autre, à aucun des pH testés, ce qui peut en partie s'expliquer par la grande variabilité du test mentionnée ci-dessus. Seules les souches WHE 92 et CECT 4185 semblent être un peu moins résistantes, vu qu'aucune croissance n'est observée après exposition à pH 2,0 et que WHE 92 présente la plus importante réduction à pH 2,5. Etant donné que toutes les souches ont quasiment la même tolérance à l'acidité, cette propriété n'a pas permis de discriminer les souches de *L. plantarum* sélectionnées.

3.3. Croissance en présence de bile

Après le passage par l'estomac, les bactéries arrivent au duodénum où est sécrétée la bile. A ce niveau, certains composants de la bile, notamment les acides biliaires comme l'acide cholique, compromettent sérieusement la viabilité des bactéries ingérées. La tolérance à la bile est l'une des caractéristiques recherchées lors de la sélection des bactéries probiotiques pour que le plus grand nombre possible de bactéries traversent le duodénum en direction de leur site d'action, tout en restant viable et capable de se multiplier.

La présence de bile peut provoquer un stress des cellules bactériennes, ce qui modifie leur capacité de survie. Contrairement à l'acidité qui s'estompe après le passage gastrique, la bile entrant en contact avec les cellules bactériennes ayant survécu ce passage, demeure en contact avec celles-ci pendant un temps plus long. Ainsi, il est plus judicieux d'observer la capacité de croissance d'un nombre limité de bactéries en présence de bile (tolérance), que de simplement mesurer la survie (résistance) d'une population importante après une exposition pendant un temps donné. Ainsi, il est plus intéressant d'exposer les souches à la bile et d'observer leur croissance que de simplement mesurer la proportion de bactéries viables après une certaine exposition.

Dans ce travail, la capacité de survie et de croissance de souches de *L. plantarum* sélectionnées en présence de bile a été testée. Ces souches ont été mises en culture dans un bouillon MRS supplémenté de bile à différentes concentrations (0,5%, 1,0%, 2,0% et 3,0%) et dans le même milieu en absence de bile, et leur croissance a été suivie en mesurant l'absorbance à 600 nm. La présence de bile provoque un retard de croissance visible plus ou moins important selon les souches qui est essentiellement dû à l'élimination d'une partie de la population bactérienne initiale. Nous avons déterminé le temps que le témoin de chaque souche met à atteindre la moitié de l'absorbance maximale (absorbance demi log) (t_c dans la Figure 38) et nous l'avons comparé au temps que les cultures en présence de bile mettent à atteindre cette même absorbance ($t_{0,5}$, t_1 , ...). Pour chaque concentration de bile nous avons ainsi calculé le retard de croissance provoqué ($t_c - t_{0,5}$, $t_c - t_1$, ...). Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 39.

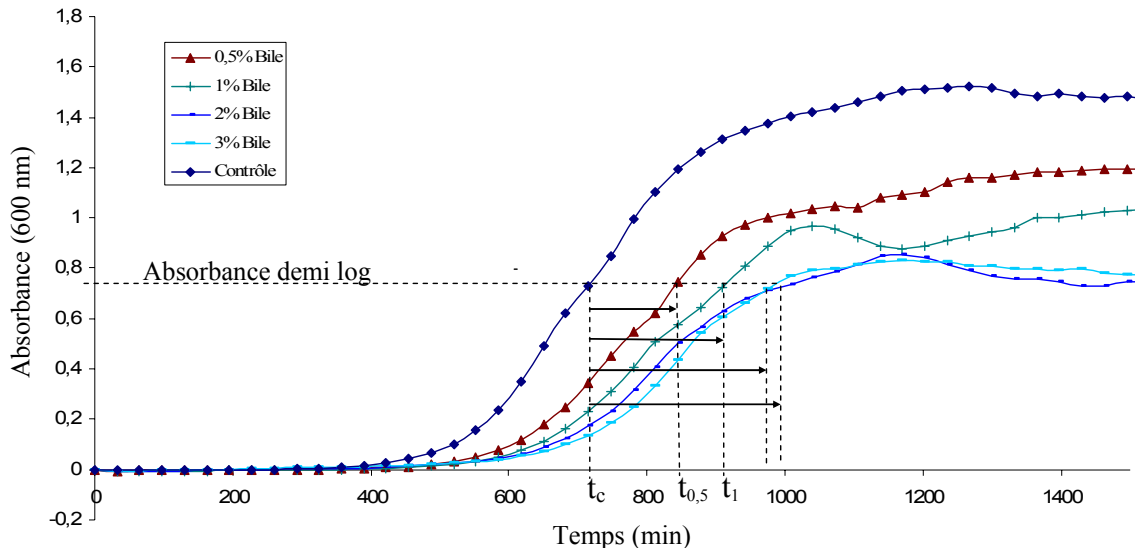


Figure 38. Graphique représentatif de l'effet de la bile sur la croissance d'une souche de *L. plantarum*. Les flèches représentent le retard de croissance des cultures en présence de bile par rapport au témoin. Ce retard a été déterminé pour une absorbance correspondant à la moitié de la phase exponentielle de croissance du témoin (absorbance demi log).

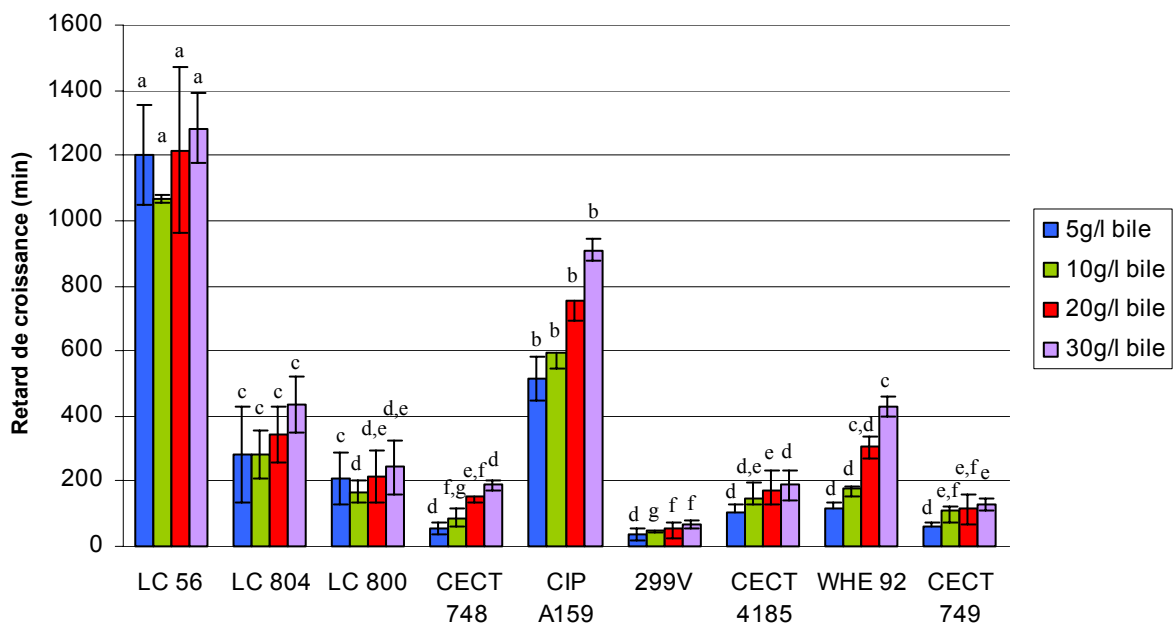


Figure 39. Effet de la présence de bile sur la croissance des souches de *L. plantarum*. Les données représentent le retard observé pour arriver à une absorbance correspondant à la moitié de la phase exponentielle de croissance du témoin (culture dans du MRS). Les moyennes \pm écarts type de trois expériences indépendantes sont données. Les colonnes de la même couleur ne présentant pas des lettres communes (a à g) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

On peut observer que la tolérance à la bile de *L. plantarum* diffère selon les souches. L'isolat de laboratoire LC 56 est la souche la moins tolérante à la bile et sa croissance est retardée de plus de 20 h. Le retard de croissance de cette souche est déjà très important à une concentration de bile de 0,5 g/L et il ne varie pas significativement quand on augmente la concentration. La croissance de cette souche 20 h après le début de l'incubation peut être due à l'apparition, parmi la population résiduelle, de phénomènes de résistance permanente ou réversible au stress provoqué par la présence de bile (214, 290) . La souche de collection CIP A159 est aussi peu résistante à la bile. A l'inverse, le probiotique commercial 299V est très résistant à la présence de bile et sa croissance n'est pratiquement pas affectée à aucune des concentrations testées. Les autres souches testées ont un comportement assez similaire entre elles et leur croissance est moyennement affectée par la présence de bile. Dans le cas de la résistance à acidité, il avait été observé que tous les *L. plantarum* testés résistaient de la même façon et qu'un classement différentiel des souches par rapport à ce critère était difficile. En ce qui concerne la bile en revanche, la capacité de croissance des *L. plantarum* n'est pas la même pour toutes les souches et on peut les grouper en trois catégories : tolérance élevée (299V), tolérance moyenne (LC 800, LC 804, CECT 749, CECT 748, CECT 4185 et WHE 92) et tolérance faible (CIP A159 et LC 56).

La tolérance à la bile des souches de *B. longum* a été testée à l'Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC) de Valence (Espagne). Les résultats obtenus ne sont pas inclus dans ce manuscrit, mais ils sont présents dans la publication annexe jointe à ce chapitre (E. Izquierdo, M. Medina, S. Ennahar, E. Marchioni, Y. Sanz, Curr. Microbiol., 56 :613-618, 2008). De façon générale, les profils de tolérance à la bile des souches de *B. longum* suivent la même tendance que ceux de résistance à l'acidité montrés dans le Tableau 22. Les souches avec une meilleure résistance à l'acidité (NCC 2705 et W11) présentent aussi les meilleurs taux de croissance en présence de bile. De la même façon, les souches commerciales BB536 et SP 07/3, qui sont très peu résistantes à l'acidité, présentent les taux de croissance les plus faibles à toutes les concentrations de bile testées.

Selon la littérature, la résistance des probiotiques à l'acidité, aux sels biliaires et leur survie de manière générale dans l'environnement digestif sont très variables en fonction de la souche (3, 105), ce qui concorde avec les résultats obtenus ici. L'objectif des tests *in vitro* simulant les conditions gastro-intestinales est d'avoir une estimation de la capacité de survie des bactéries dans l'environnement digestif. Cette survie peut aussi être influencée par des

facteurs autres que la nature de la souche, comme la dose ingérée, l'aliment vecteur et les caractéristiques spécifiques de l'hôte.

Une certaine relation peut être observée entre la résistance à l'acidité et à la bile *in vitro* et la survie pendant le transit intestinal. Si l'on considère l'exemple de *L. plantarum* 299V, souche ayant présenté les meilleurs taux de tolérance à la bile dans ce travail, sa survie dans le milieu gastro-intestinal est très bonne. En effet, Johansson *et al.* (142) ont rapporté une survie fécale importante de cette souche : l'ingestion quotidienne de $10^{10,3}$ UFC dans une boisson fermentée permettait la détection dans les selles d'environ 10^7 ufc/g. De nombreuses souches de bifidobactéries et de lactobacilles survivent bien pendant le transit intestinal pour pouvoir être détectées en grande quantité dans les fèces (21, 187, 227, 295).

4

Conclusion

En comparant, pour une même souche, la capacité d'adhésion au mucus avec la résistance aux conditions gastro-intestinales simulées (acidité et bile), on peut observer que ces deux propriétés ne sont pas corrélées entre elles. Ainsi, une souche qui adhère très bien n'est pas forcément résistante aux conditions gastro-intestinales et vice versa. Par exemple, la souche de *B. longum* la plus adhésive, *B. longum* BIF 53 montrait une résistance modérée à l'acidité et à la bile. Inversement, la souche probiotique *B. longum* W11 qui adhère très faiblement au mucus, s'est avérée très résistante à l'acidité et à la bile. Dans le cas de *L. plantarum*, la souche la plus adhésive, l'isolat de laboratoire *L. plantarum* WHE 92, est moins tolérante à la bile que le probiotique commercial *L. plantarum* 299V, qui par contre n'adhère que moyennement au mucus.

En ce qui concerne la résistance aux conditions gastro-intestinales, deux aspects différents ont été évalués : la résistance à l'acidité et la tolérance à la bile. Dans le cas des souches de *B. longum*, la résistance à l'acidité et la croissance en présence de bile suivent la même tendance. Les souches montrant une meilleure survie en milieu acide présentent aussi les meilleurs taux de croissance en présence de bile. Cependant, la même corrélation n'a pas pu être observée pour les souches de *L. plantarum* étudiées. Les souches *L. plantarum* 299V et LC 56, qui ont un comportement similaire face à l'acidité, se comportent de manières très différentes lorsqu'il s'agit de résister à la bile (la souche la plus et la moins résistante, respectivement). Ceci peut être dû à des caractéristiques spécifiques des souches qui leur confèrent une bonne tolérance à la bile, mais qui ne protègent pas contre l'acidité.

Lorsque l'on considère des probiotiques commerciaux, comme par exemple *B. longum* BB 536, il apparaît que ceux-ci ne présentent pas forcément les meilleures caractéristiques. Cette souche a en effet des taux d'adhésion au mucus et de résistance à l'acidité et à la bile très bas. Même si elle peut exercer un certain effet probiotique pendant son passage à travers le tractus gastro-intestinal, l'effet bénéfique sur l'hôte risque d'être significativement réduit en raison de la perte de viabilité et du manque d'adhésion, qui se traduiraient par des temps de résidence courts. Les meilleurs taux d'adhésion des souches testées ont été obtenus avec les

isolats de laboratoire *B. longum* BIF 53, *L. plantarum* WHE 92 et *E. faecalis* WHE 96, les deux derniers étant en plus des producteurs de bactériocines. Ceci suggère que les probiotiques déjà connus, sur lesquels est focalisée une partie importante de la recherche réalisée actuellement, peuvent ne pas être les meilleurs modèles d'études et que de nouveaux isolats pourraient s'avérer beaucoup plus appropriés.

La sélection des souches est par conséquent une des étapes clef qui déterminent l'efficacité des probiotiques et leurs applications éventuelles. Cette sélection est souvent réalisée par des tests *in vitro* qui prennent chacun en compte une propriété particulière, et ne permettent pas d'avoir une vision globale du métabolisme de la bactérie. Il est néanmoins important de définir les conditions des tests *in vitro* qui représentent au mieux le comportement *in vivo* et les interactions probiotique-hôte. A l'évidence, ces tests sont plus facilement concevables lorsqu'il s'agit de propriétés bactériennes, telles que celles étudiées ici, que dans le cas de propriétés probiotiques et d'effets réels sur l'hôte qui ne peuvent être correctement évalués qu'*in vivo*.

Il convient par ailleurs de préciser, à la vue des résultats présentés ici, que le caractère probiotique d'une souche sera toujours basé sur un compromis entre certaines propriétés très bien exprimées et d'autres plus moyennes. En effet, il ne faut pas chercher le probiotique parfait, car une souche ne pourra pas réunir les meilleures caractéristiques par rapport à tous les critères. Certaines souches pourront exprimer une propriété mieux que d'autres et elles seront sélectionnées sur la base de cette propriété, même si elles peuvent être peu performantes par d'autres aspects. Les propriétés recherchées en priorité seront différentes selon l'application envisagée pour le probiotique, et chaque souche aura une application bien spécifique.

Finalement, l'identification des éléments moléculaires à la base des effets probiotiques peut être une étape clef vers une classification des souches selon leurs potentialités probiotiques, et permettrait sans doute un jour de dépasser les limitations des tests *in vitro*. Cela contribuerait à une sélection des souches plus rationnelle et à une standardisation des critères d'évaluation des produits commerciaux. Dans le but d'identifier les molécules, ou familles de molécules, impliquées dans les propriétés bactériennes étudiées ici, nous avons entrepris une étude de nature protéomique basée sur la comparaison des profils protéiques des souches présentant le plus fort et le plus faible potentiel par rapport à une propriété déterminée. Cette étude a porté sur des souches de la même espèce testées dans cette partie du travail et montrant de grandes variations dans l'expression de la propriété en question.

Signalement bibliographique ajouté par :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

Resistance to Simulated Gastrointestinal Conditions and Adhesion to Mucus as Probiotic Criteria for Bifidobacterium longum Strains

E. IZQUIERDO, M. MEDINA, S. ENNAHAR, E. MARCHIONI and Y. SANZ

Current Microbiology, 2008, Vol. 56, numéro 6, p. 613-618

Pages 147-152 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1007/s00284-008-9135-7>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Chapitre 4

Application de la
protéomique à la
recherche de
biomarqueurs de
l'activité probiotique

1

Introduction

Avec la mise sur le marché d'une gamme croissante de produits probiotiques et l'entrée en vigueur imminente d'une nouvelle législation plus restrictive (39), l'accent est aujourd'hui mis sur la recherche de techniques et stratégies analytiques permettant de différencier les souches ayant un réel intérêt probiotique des souches à allégations probiotiques mais ayant probablement moins d'intérêt. De même, la détermination des mécanismes physiologiques qui régissent les effets probiotiques est un point clef dans la justification des allégations santé des souches probiotiques demandée par la nouvelle législation.

Les approches utilisées majoritairement pour l'évaluation des souches à intérêt probiotique sont les tests *in vitro* et *in vivo*. Les tests *in vitro* peuvent donner un bon aperçu des propriétés des bactéries telles que leur capacité de survivre dans les conditions gastro-intestinales ou encore d'adhérer à la muqueuse intestinale et de la coloniser. Cependant, comme cela a été dit précédemment, les activités probiotiques réelles telles que les effets anti-inflammatoires (16, 24), anti-cancérigènes (54), anti-cholestérol (169) et de prévention des allergies (231) sont plus difficiles à étudier *in vitro*. Des tests biologiques et des essais cliniques sont alors effectués, non seulement en vue de la confirmation de certains effets observés *in vitro*, mais en tant que réelles étapes de sélection préliminaire des souches probiotiques. Etant donné que les propriétés probiotiques sont spécifiques à la souche et non à l'espèce, le choix d'une souche implique que les tests biologiques et probablement aussi les essais cliniques soient effectués sur un grand nombre de souches candidates, ce qui est très coûteux en temps et en argent.

Une approche prometteuse s'est développée ces dernières années, celle basée sur les outils génomiques (226). Le séquençage et l'analyse bioinformatique de certains génomes permettent de révéler quelques caractères physiologiques et pourrait aider à expliquer certains effets probiotiques (34, 163, 168). Toutefois, la connaissance de la génétique des probiotiques est encore insuffisante pour élucider les bases moléculaires de leurs activités. Il n'existe qu'un nombre limité de bactéries dont le génome est séquencé, celles-ci étant souvent les souches-types des espèces individuelles, ce qui est loin d'être représentatif vu que les effets

probiotiques sont spécifiques à la souche et non à l'espèce. De plus, bien que la génomique permette de prédire les fonctions des gènes, le niveau d'expression de ces derniers, ainsi que l'influence de l'état cellulaire sur cette expression, restent souvent des données inconnues.

Le séquençage des génomes d'un nombre croissant de souches appartenant à des espèces couramment utilisées comme probiotiques a ouvert la voie à une approche complémentaire pour l'étude des propriétés bactériennes, la protéomique comparative et fonctionnelle (8, 162, 263). Cette approche permet d'obtenir un aperçu global des protéines exprimées à partir du génome, tenant compte de leur abondance relative pendant les différentes phases de croissance, ainsi que des possibles modifications post-traductionnelles et des phénomènes de translocation et de régulation de la synthèse (40, 51). Les séquences annotées du génome aident à l'identification des protéines résolues sur les gels d'électrophorèse bidimensionnelle, et inversement les données des études protéomiques aident à rendre le procédé d'annotation plus précis et plus fiable. Les données du génome et du protéome peuvent donc être intégrées et utilisées dans une approche globale à la résolution des questions difficiles liées à l'interaction bactérie-hôte.

L'application de la protéomique à la sélection des souches probiotiques et à l'élucidation de certains de leurs mécanismes d'action est un projet assez vaste qui a commencé au laboratoire avec cette thèse de doctorat. Dans cette première partie du projet, il s'agit de déterminer la faisabilité de cette approche en l'appliquant à l'étude de propriétés bactériennes assez simples à mesurer *in vitro*, telles que la capacité d'adhésion ou encore la résistance à la bile, et ce, sur une seule espèce probiotique, *L. plantarum*. Toutefois, l'objectif final à plus long terme est le développement d'une méthode analytique globale de nature protéomique qui serait appliquée à la mise en évidence, non seulement de propriétés bactériennes, mais aussi d'effets probiotiques potentiels chez l'hôte. Ceci permettrait de pouvoir différencier les souches avec de meilleures propriétés probiotiques potentielles du reste de la flore microbienne et de comprendre certains des mécanismes d'interaction probiotique/hôte. En particulier, la capacité de souches particulières à favoriser des effets bénéfiques spécifiques pourra être liée à la présence ou à l'absence de certaines protéines. Les protéines et les profils protéomiques caractéristiques identifiés pourront servir un jour comme biomarqueurs de propriétés qui, aujourd'hui, ne peuvent être mises en évidence que par des tests biologiques ou des essais cliniques lourds.

Les tests *in vitro* réalisés précédemment (chapitre 3) nous ont permis de classer les souches de *L. plantarum* selon des propriétés bactériennes : la capacité d'adhésion, la

résistance à l'acidité et la tolérance à la bile. Les souches présentant les plus grandes différences ont été retenues en vue de l'étude protéomique. Le protéome de la souche chez qui la propriété en question est la mieux exprimée a été comparé à celui de la souche chez qui cette même propriété est la plus faiblement exprimée. Les protéines avec des niveaux d'expression différents ont été analysées par spectrométrie de masse et identifiées après une recherche dans les banques de données. Le protéome de surface cellulaire et le protéome total ont été étudiés, ce qui a nécessité la mise au point de méthodes d'extraction et de purification protéiques spécifiques.

2

Matériel et méthodes

2.1. Extraction des protéines de la paroi cellulaire

Quarante ml d'une culture en phase stationnaire (18-20 h) sont centrifugés (5000 g pendant 5 min). Les culots bactériens obtenus sont lavés trois fois avec du PBS, remis en suspension dans 3 ml de la solution d'extraction (100 mM de Tris-HCl à pH 8,0, 5 mM d'EDTA et 1mg/ml de lysozyme) et incubés pendant 2 h à 37°C. Après centrifugation (8000 g pendant 15 min à 4°C), le surnageant récupéré est mis à pH 8,0. Cent microgrammes d'une phase échangeuse de cations forte (SCX, International Sorbent Technology, Tucson, AZ, USA), préalablement équilibrée avec une solution 100 mM de Tris-HCl et 5 mM d'EDTA à pH 8,0, y sont ensuite ajoutés et le mélange est agité à température ambiante pendant 30 min. Après centrifugation (5000 g pendant 5min à 4°C), le surnageant est filtré sur une membrane Porafil PET d'une porosité de 0,45 µm (Macherey-Nagel, Hoerd, France) et les protéines sont précipitées par addition de 10 ml d'acétone à -20°C et incubation pendant une nuit à cette même température.

Après centrifugation (12000 g pendant 15 min à 4°C), les protéines précipitées sont récupérées et purifiées à l'aide du Trizol (Euromedex, Souffelweyersheim, France) (réactif commercial qui contient du phénol et du thiocyanate de guanidine) selon le protocole indiqué par le fabricant. Ce protocole consiste à reprendre les protéines dans 0,5 ml du réactif Trizol et à les mélanger jusqu'à dissolution complète. Ensuite, 0,1 ml de chloroforme y sont mélangés à l'aide d'un vortex et le mélange est incubé pendant 5 min à température ambiante. Les protéines se dénaturent et deviennent solubles dans le phénol (phase organique contenant le phénol et le chloroforme), contrairement aux petites molécules et aux acides nucléiques (ARN) qui restent solubles dans la phase aqueuse. Après centrifugation (12000 g pendant 15 min à 4°C), la phase aqueuse (phase supérieure), contenant les sels et les impuretés solubles dans l'eau, est éliminée en faisant attention à ne pas prélever la pellicule blanche présente à l'interface avec la phase organique. Ensuite, 0,15 ml d'éthanol sont ajoutés, ce qui fait précipiter l'ADN, et le mélange est homogénéisé par inversion. Après 3 min d'incubation à température ambiante, les échantillons sont centrifugés (2000 g pendant 15 min à 4°C) et les

protéines contenues dans le surnageant sont précipitées par addition de 2 ml d'acétone à 0°C. Les culots protéiques obtenus sont lavés trois fois avec un mélange eau/acétone (80/20, v/v) et puis dissous dans 100-200 µl d'une solution tampon (tampon IEF) contenant 7 M d'urée, 2 M de thiourée, 4% de (m/v) 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propane-sulfonate (CHAPS) et 20 mM de Tris à pH 8,5. Les échantillons sont conservés à -20°C.

2.2. Extraction des protéines totales

Dix ml d'une culture en phase stationnaire (18-20 h) sont centrifugés (5000 g pendant 5 min). Les culots bactériens obtenus sont lavés trois fois avec du PBS et remis en suspension dans 2 ml d'une solution tampon 100 mM de Tris-HCl à pH 8,0 et 0,5 mM d'EDTA. Cette suspension bactérienne est déposée goutte à goutte dans un bûcher contenant de l'azote liquide de façon à former des petites billes de glace contenant les bactéries. Celles-ci sont placées dans un cylindre en polycarbonate équipé d'un pilon en acier inoxydable, l'ensemble est ensuite mis dans un broyeur cryogénique Freezer/Mill[®] 6870 (Spex CertiPrep, Stanmore, Royaume Uni). Le programme de broyage utilisé inclut une étape de refroidissement (immersion dans l'azote liquide) de 2 min, suivie de trois cycles de broyage consistant chacun en 3 min de broyage à une vitesse de 12 cps (coups par seconde) et 1 min de refroidissement.

Ce broyage permet de casser les cellules bactériennes et de libérer ainsi les protéines qui sont solubilisées dans le tampon de travail. Le broyat obtenu est transvasé dans un tube conique de 50 ml et laissé pendant 1 h à température ambiante pour permettre une solubilisation correcte des protéines. Les débris cellulaires insolubles en suspension sont quant à eux centrifugés et éliminés par passage à travers un filtre seringue UntiDisc[™] de porosité 0,45 µm (Interchim, Montluçon, France). Les protéines solubles contenues dans le filtrat sont précipitées par ajout de 8 volumes d'acétone à -20°C et incubation pendant une nuit à cette même température. Après centrifugation (12000 g pendant 15 min à 4°C), les protéines précipitées sont récupérées et purifiées à l'aide du réactif Trizol comme indiqué précédemment, avant d'être remises en solution dans 200 µl de tampon IEF.

2.3. Dosage des protéines

La quantité de protéines nécessaire pour chaque expérience varie selon le type et les quantités relatives de protéines à étudier, la taille du gel d'électrophorèse, la gamme de pH étudiée et la coloration utilisée. Par ailleurs, pour différents échantillons, cette quantité doit être exactement la même si l'on veut pouvoir comparer d'une manière la plus objective leurs protéomes.

La concentration de protéines de chaque échantillon est estimée en utilisant la méthode de Bradford. Le bleu de Coomassie contenu dans le réactif de Bradford (0,01% (p/v) bleu de Coomassie G-250, 4,7% (v/v) éthanol, 8,5% (v/v) acide orthophosphorique), a une couleur brune à cause du pH bas de cette solution, mais vire au bleu lorsque son pKa change au contact de certains résidus d'une protéine (l'arginine principalement mais aussi l'histidine, la lysine, la tyrosine, le tryptophane et la phénylalanine). La concentration en protéine d'une solution est estimée en mesurant son absorbance à 595 nm, en présence du réactif de Bradford. Les solutions de mesure sont préparées en mélangeant 1-4 µl d'échantillon (selon la taille du culot obtenu) avec 2 µl de HCl 0,1 M. Le volume est ensuite complété à 20 µl avec du tampon IEF, puis 1 ml du réactif de Bradford (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France), dilué 5 fois dans l'eau ultrapure, est ajouté à chaque échantillon. L'absorbance de ces solutions à 595 nm est comparée à celle obtenue avec une gamme-étalon composée de cinq concentrations d'albumine du sérum bovin (BSA) (Acros, Geel, Belgique) réparties régulièrement entre 0,2 et 1 g/L et préparée dans du tampon IEF de la même façon que les échantillons. La gamme étalon est préparée en duplicat et chaque échantillon en triplicat.

2.4. Electrophorèse bidimensionnelle

Dans l'électrophorèse bidimensionnelle (2D), les protéines sont d'abord séparées selon leur point isoélectrique (première dimension ou focalisation isoélectrique), puis, dans un deuxième temps, elles le sont selon leur masse moléculaire (deuxième dimension ou électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes) (Figure 40). Les protéines sont ensuite visualisées par coloration au bleu de Coomassie colloïdal.

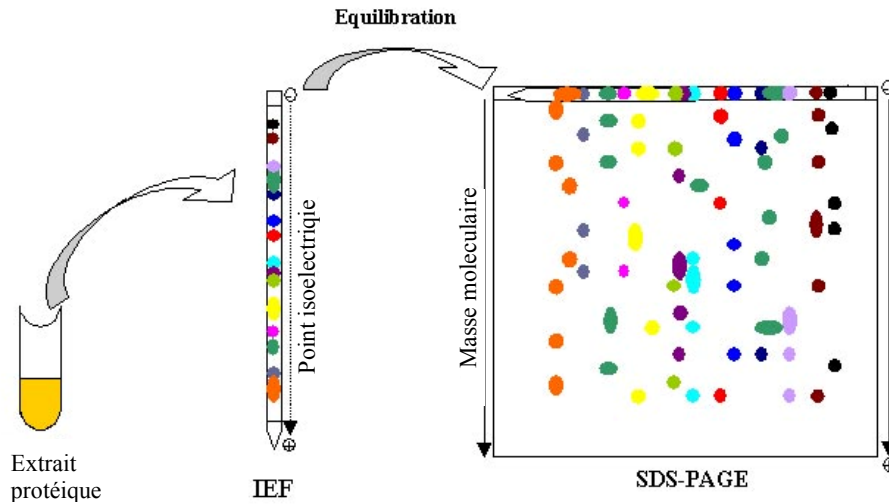


Figure 40. Principe d'une électrophorèse bidimensionnelle

2.4.1. Première dimension : focalisation isoélectrique

L'IEF permet de séparer les protéines selon leur point isoélectrique (pI), pH auquel la charge électrique globale de la protéine est nulle. L'application d'un champ électrique permet aux protéines de migrer jusqu'à arriver au point de pH qui correspond à leur pI, à ce moment leur charge globale devient nulle, et donc elles ne migrent plus. Cette méthode permet donc de séparer des protéines différentes, mais également de mettre en évidence des changements dans la charge électrique ou la masse d'une protéine suite à des mutations ou à des modifications post-traductionnelles. Ces modifications résultent parfois en plusieurs isoformes d'une même protéine, qui apparaissent sur les gels comme une série de spots proches, séparés régulièrement dans une direction déterminée.

La première dimension est effectuée dans un appareil de type Protean[®] IEF Cell (Bio-Rad). Les échantillons préparés précédemment et conservés à -20°C sont dilués de manière à obtenir la concentration de protéines souhaitée dans une solution de solubilisation des protéines adaptée à l'électrophorèse 2D contenant du tampon IEF, du dithiothréitol (DTT) à 20 mM, des ampholytes porteurs à 0,2% (Biolytes[®], pH 3-10, Bio-Rad), et une trace de bleu de bromophénol. L'urée et la thiourée sont des agents chaotropes qui permettent de casser les liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires. Le CHAPS, détergent zwitterionique, recouvre les zones les plus hydrophobes des protéines dénaturées et ainsi limite leur agrégation, prévenant la précipitation. Les ampholytes augmentent la solubilité des protéines et assurent une conductibilité uniforme au cours de la focalisation. Enfin, le DTT permet de couper les ponts disulfure intra- et intermoléculaires facilitant le dépliement total de la protéine.

La séparation des protéines est réalisée sur des bandelettes à gradient de pH (ReadyStripTM IPG, Bio-rad) de 7 et de 17 cm de longueur couvrant une gamme de pH allant de 4,0 à 7,0 et de 4,7 à 5,9. Ces bandelettes sont composées d'un gel déshydraté fixé sur un support solide. Le gel est réhydraté avec la solution protéique diluée (125 µl pour les bandelettes de 7 cm et 300 µl pour les bandelettes de 17 cm) de manière active (50V) pendant 15 h à température ambiante. Après la réhydratation des carrés de papier (électrodes wicks), préalablement humidifiés avec de l'eau ultrapure, sont placés à chaque extrémité des bandelettes, entre le gel et l'électrode. Ensuite, la migration des protéines est réalisée avec un programme de voltage qui a été optimisé selon la quantité de protéines déposée et l'intervalle de pH utilisé (Tableau 24). Enfin, une étape à 500 V est appliquée jusqu'à l'arrêt du programme afin d'éviter la diffusion des protéines au sein du gel. Pendant la migration, l'ampérage maximum est fixé à 50 µA/bandelette et la température est maintenue à 20°C. Une fois l'IEF terminée, les bandelettes peuvent être directement utilisées pour la deuxième dimension ou conservées à -20°C.

Tableau 24. Programmes de focalisation utilisés pour l'IEF.

Gel	Phase de conditionnement	Montée linéaire	Phase de focalisation
17 cm pH 4,0-7,0 (75 µg)	250 V pendant 2 h	250-10000 V montée lente pendant 6 h	10000 V jusqu'à 60000 Vx h
17 cm pH 4,7-5,9 (30 µg)		250-10000 V montée lente pendant 5 h	10000 V jusqu'à 45000 Vx h
17 cm pH 4,0-7,0 (200 µg) 17 cm pH 4,0-7,0 (150 µg)	250 V pendant 2 h 500 V pendant 2 h 750 V pendant 2 h 1000 V pendant 2 h	1000-10000 V montée lente pendant 5 h	10000 V jusqu'à 60000 Vx h

2.4.2. Deuxième dimension : SDS-PAGE

Pour la deuxième dimension des gels 2D, les bandelettes IPG sont mises en présence de SDS, qui se lie aux protéines en leur conférant une charge globale négative, masquant complètement les charges propres de la protéine. Les protéines chargées négativement migrent vers l'anode sous l'action d'un courant. Le gel de polyacrylamide, constitué d'acrylamide, unité de base et de la bisacrylamide (N, N méthylène-bisacrylamide), qui est l'agent réticulant, permet un tamisage moléculaire (les molécules de grandes tailles migrent plus lentement que les autres) et les protéines se répartissent le long du trajet de migration en fonction de leur masse moléculaire. En fonction des différents taux acrylamide/bisacrylamide, on obtient différents maillages et donc différentes densités de gel. La réaction de polymérisation se fait grâce à l'ajout de deux substances réactives : le TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) et le persulfate d'ammonium qui, en réagissant avec la lumière, deviennent des anions très réactifs qui enclenchent la polymérisation.

Avant la deuxième dimension, une réduction/alkylation des protéines est réalisée sur les bandelettes focalisées. Dans un premier temps, les bandelettes sont équilibrées 15 min dans 2 ml d'une solution contenant de l'urée à 6 M, du SDS à 2% (m/v), du Tris-HCl à 375 mM et pH 8,8, du glycérol à 20% (v/v) et du DTT à 130 mM. Cette étape permet de saturer le gel en SDS et de réduire les protéines. Les bandelettes sont ensuite placées pendant 20 min dans la même solution en substituant le DTT par de l'iodoacétamide à 135 mM (Sigma), ce qui permet l'alkylation des protéines. Cinquante µl de bleu de bromophénol à 0,05% sont ajoutés à la solution d'alkylation afin de colorer la bandelette et suivre la migration des protéines.

Les bandelettes équilibrées sont placées en tête d'un gel composé de 12% d'acrylamide et y sont fixées avec un gel à 0,5 % d'agarose à bas point de fusion préparé dans du tampon de migration (décrit ci-dessous). Un carré de papier imbibé de 5 µl d'une solution d'un marqueur de taille moléculaire Precision Plus ProteinTM (Bio-Rad) est placé du côté droit de chaque bandelette. La migration des protéines est réalisée dans un tampon composé de Trisbase à 25 mM, de glycine à 192 mM et de SDS à 0,1%, et ce en utilisant un système Protean[®] II xi Cell (Bio-Rad) avec un ampérage constant de 32 mA pendant 30 min puis 48 mA jusqu'à la fin de la migration (environ 5 h).

2.5. Analyse des gels 2D

Pour révéler les protéines nous utilisons une coloration au bleu de Coomassie colloïdal. A la fin de l'électrophorèse, les gels sont démoulés et plongés pendant 20 min dans une solution de fixation composée de 45% de méthanol et 1% d'acide acétique, puis dans la solution de coloration (34% de méthanol, 17% (m/v) de sulfate d'ammonium, 0,5% d'acide acétique, et 0,1% de bleu de Coomassie G-250) pendant 18 à 24 h. Les gels sont alors décolorés à l'eau chaude (55°C), en changeant l'eau toutes les 20 min, jusqu'à ce que le rapport entre l'intensité des spots et le bruit de fond soit satisfaisant et que l'eau de décoloration reste incolore. Les gels obtenus sont scannés avec un densitomètre calibré GS-800 (Bio-Rad). Pour chaque souche, trois gels sont réalisés à partir de cultures indépendantes et les spots présents dans les trois gels sont utilisés pour la comparaison.

Pour effectuer la comparaison qualitative et quantitative, les gels scannés sont analysés avec le logiciel PDQuest (Bio-Rad). Ce logiciel convertit un signal provenant d'une protéine ou d'un groupe de protéines formant un spot en données numériques et décompose chaque spot détecté selon le nombre de pixels qui le représente. L'intensité de signal moyenne est calculée en additionnant les valeurs d'intensité de chaque pixel et en divisant le total par le nombre de pixels qui compose le spot. Après la détection automatique des spots de chaque gel, une étape de "nettoyage" manuelle est nécessaire pour corriger les artefacts qui ont été détectés comme étant de spots et pour rajouter les spots n'ayant pas été reconnus. L'appariement de spots (matching) consiste à associer, sur les différents gels analysés les spots identiques entre eux. Ceci est effectué automatiquement mais nécessite que l'utilisateur définisse des points d'ancrage (landmarks) qui permettent au programme de fixer des points de repère et de compenser d'éventuelles déformations des gels. Une certaine variabilité dans l'intensité des spots peut être due à des facteurs expérimentaux (perte d'échantillon au cours des préparations, mauvais transfert des protéines de la première vers la deuxième dimension, variation de temps de coloration des gels, température ambiante, etc.). Afin d'effectuer une comparaison fiable des taux d'abondance des protéines, ces variations indépendantes du contexte biologique doivent être compensées. Pour cela, une normalisation de l'intensité des spots est réalisée pour chaque expérience par rapport à l'ensemble des spots valides.

Une analyse qualitative et quantitative est réalisée sur les gels. La quantité d'une protéine est considérée différente quand l'intensité des spots varie d'un gel à l'autre d'au moins le double. Les différences d'intensité des spots sont soumises à une analyse de variance

avec le logiciel Statgraphics plus 5.1. Les différences sont considérées significatives avec $p < 0,05$.

2.6. Digestion trypsique des protéines sélectionnées

Les morceaux de gel contenant les spots d'intérêt sont excisés en utilisant comme emporte-pièce un embout de pipette coupé. Bien que la coloration au bleu de Coomassie soit assez compatible avec la spectrométrie de masse, une décoloration des spots est effectuée avant de procéder à la digestion trypsique. Pour cela, les morceaux de gel sont lavés au moins deux fois avec un mélange acétonitrile/ NH_4HCO_3 à 50 mM (50/50 v/v). Une fois les morceaux de gel sont incolores, ils sont déshydratés par ajout de 50 μl d'acétonitrile et séchés à température ambiante après élimination du surnageant. Les morceaux de gel sont réhydratés avec 30 μl d'une solution de trypsine (Promega, Madison, WI, USA) à 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dans de l'eau ultrapure. Après 1h d'incubation à température ambiante, 30 μl d'une solution de NH_4HCO_3 à 50 mM sont ajoutés et les échantillons sont incubés à 37°C pendant une nuit sous agitation pour la digestion trypsique. Le lendemain les surnageants sont transférés dans des vials de chromatographie et conservés à -20°C.

2.7. Analyse des échantillons par spectrométrie de masse Chip-LC QTOF

Les analyses des fragments tryptiques par spectrométrie de masse ont été réalisées au Département de Biochimie Analytique du Centre de Pharmacie de l'Université de Groningue (Pays-Bas). Pour cela, un système Chip-LC Q-TOF a été utilisé comprenant un module Nano LC de type Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), un Chip Cube HPLC de type Agilent G4240A et un spectromètre de masse de type Agilent G6510A. En vue de la séparation chromatographique des fragments tryptiques, une colonne analytique 300SB-C18 de 150 mm x 75 μm et 5 μm de granulométrie (Zorbax, Ville, Pays) contenue dans un Chip Protein id LC-chip #2 (Agilent Technologies) est utilisée. Un microlitre d'échantillon est injecté à l'aide d'une boucle d'injection de 8 μl , en utilisant un mélange eau ultrapure/acétonitrile (97/3 ; v/v) avec 0,1% d'acide formique et à un débit de charge de 3 $\mu\text{l}/\text{s}$ pendant 4 min. L'élution est réalisée avec un gradient de 3 à 60% d'acétonitrile dans de l'eau ultrapure avec 0,1% d'acide formique en 24 min et à un débit de 300 nl/min. Après chaque 10

injections, un échantillon de 100 fmol de Cytochrome C de cheval digéré à la trypsine est injecté comme témoin en vue du contrôle de qualité. Le mode d'ionisation utilisé est le ESI en mode positif avec un voltage de capillaire de 1900V. Les données sont collectées en mode centroïde en utilisant un intervalle dynamique étendu de masse de 100-2000 m/z et une vitesse de scan de 3,1 spectres/s pour MS1 et un intervalle de masse de 50-2000 m/z et une vitesse de scan de 2,1 spectres/s pour MS2. La correction des masses a été réalisée à l'aide des masses internes de référence : stéarate de méthyle (m/z : 299,294457 Da) et HP-1221,990637 (m/z : 1221,990637 Da). Les données sont enregistrées et exportées à l'aide du logiciel MassHunter version B.01.03 (Agilent Technologies).

2.8. Identification des protéines

Les valeurs de masse obtenues par analyse Chip-LC Q-TOF sont comparées, en utilisant le serveur Phenyx (<http://phenyxonline.genebio.com>, Geneva Bioinformatics, Genève, Suisse), à des valeurs calculées contenues dans la banque de données protéomiques et génomiques NCBI. Ces valeurs sont basées sur des spectres de masse de fragments tryptiques générés *in silico* à partir des protéines contenues dans ces bases de données. Naturellement, dans le cas où le génome de l'espèce bactérienne étudiée est séquencé (cas de *L. plantarum* (11)), celui-ci est pris en compte en entier dans la recherche, ce qui facilite d'autant plus les identifications protéiques. La comparaison des données de masse résulte en une valeur (ou "score") fondée sur le nombre de fragments protéolytiques obtenus dont les masses correspondent à celles des fragments protéolytiques des banques de données, ainsi que sur la précision avec laquelle les masses sont déterminées. Les scores les plus élevés correspondent aux identifications les plus fiables. On peut ainsi caractériser une protéine connue (soit identifiée, soit répertoriée comme produit de gène) uniquement grâce à son spectre de masse.

Les paramètres suivants ont été utilisés pour la recherche sur le serveur Phenyx : mode d'enregistrement ESI-Q-TOF ; charge de l'ion parent 2, 3 (confiance = moyenne) ; oxydation de méthionines comme modification partielle possible ; trypsine comme enzyme de digestion ; possibilité d'un clivage manqué ; mode de clivage "half cleaved" ; tolérance de l'ion parent 10,0 ppm ; seuils des peptides : longueur ≥ 5 acides aminés, score $\geq 5,0$, identification significative $p \leq 1 \cdot 10^{-5}$, recouvrement $\geq 0,2$; séries d'ions identifiées b, b doublement chargé, y et y doublement chargé. La Figure 41 montre les sites possibles de

fragmentation des peptides. Les ions b et y sont les plus souvent observés, les ions a et x sont moins fréquents et les ions c et z ne sont jamais observés.

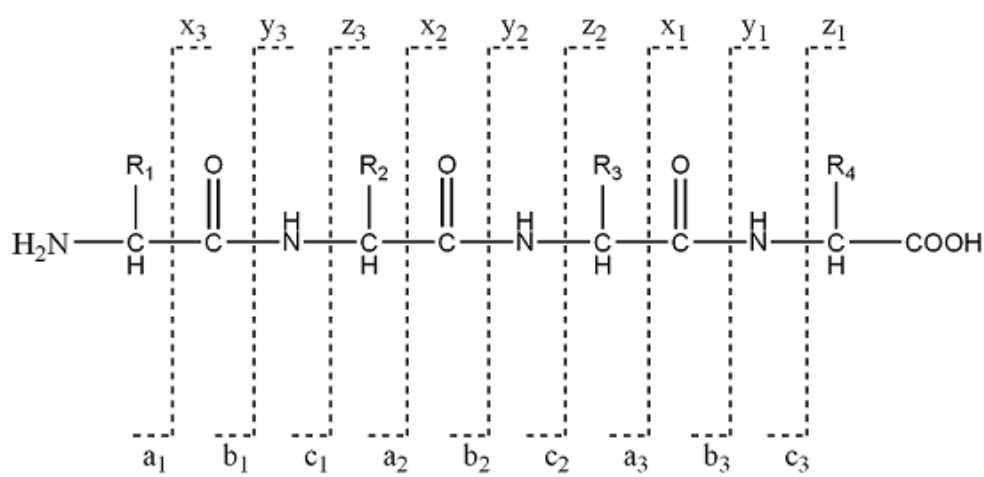


Figure 41. Types de fragmentation des peptides lors des analyses MS/MS. Les ions a, b et c sont formés avec la charge du côté N-terminal, tandis que les ions y, x et z sont formés avec la charge du côté C-terminal. La série b/y est la plus fréquente.

3

Résultats et discussion

3.1. Extraction et purification des protéines

3.1.1. Protéines de la paroi cellulaire

Dans l'étape précédente de ce travail (chapitre 3), il avait été observé que les molécules responsables de l'adhésion des souches de *L. plantarum* au mucus sont de nature protéique. Pour une caractérisation approfondie de ces protéines, nous avons réalisé une extraction sélective des protéines de surface et de la paroi cellulaire des bactéries sélectionnées. Cette extraction a été réalisée avec du lysozyme, le seul des traitements testés (Chapitre 3- 3.1) qui s'est avéré efficace pour diminuer la capacité d'adhésion des souches les plus adhésives, tout en conservant la viabilité des cellules et l'intégrité des protéines. Le peptidoglycane est hydrolysé par action du lysozyme, ce qui permet l'extraction des composants de la paroi cellulaire. L'extraction est réalisée dans une solution d'EDTA à 5mM et de Tris-HCl à 100mM et à pH 8, qui aide à la solubilisation des protéines.

Une des phases critiques dans l'analyse comparative par électrophorèse 2D est la quantification des protéines de l'échantillon avant la réalisation des gels. Le lysozyme étant une protéine rajoutée en grandes quantités dans les échantillons pour l'extraction, il représente une source importante d'erreur lors de la quantification. Il est donc nécessaire d'éliminer sélectivement le lysozyme présent dans l'échantillon pour s'assurer que seules les protéines bactériennes soient prises en compte dans la quantification.

La taille du lysozyme (14 kDa) ne permet pas de l'éliminer par dialyse puisque des protéines de petite taille, intéressantes pour notre étude, pourraient être perdues. Une autre caractéristique intéressante du lysozyme est son pI élevé, aux alentours de 11, tandis que les protéines bactériennes analysées dans notre étude ont des pI compris entre 4,0 et 7,0. Le lysozyme peut donc être éliminé par simple échange de cations à un pH supérieur à 7,0. Plusieurs phases échangeuses de cations ont été testées pour éliminer le lysozyme sélectivement : Chromafix SA (Marcherey Nagel), Chromafix SB (Marcherey Nagel) et SCX

(International Sorbent Technology). Les échangeurs de cations, très acides au départ, sont équilibrés avec un volume important d'un tampon Tris-HCl à 100 mM et pH 8,0 pour atteindre un pH de 8,0. Dans ces conditions toutes les molécules ayant un pI supérieur à 8,0 sont retenues par la phase stationnaire et peuvent être éliminées et celles ayant un pI inférieur à 8,0 restent en solution. L'échangeur de cations fort SCX s'est avéré être le plus efficace des trois phases testées en permettant une très bonne rétention du lysozyme sans fixer les protéines d'intérêt (Figure 42).

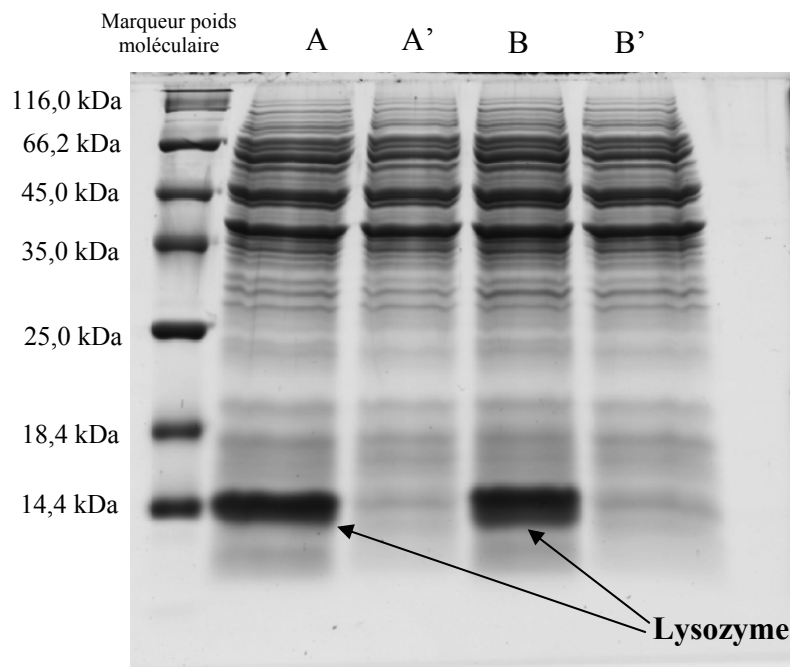


Figure 42. Analyse par SDS-PAGE (12% acrylamide) des extraits de paroi cellulaire de la souche *L. plantarum* WHE 92 avant et après l'élimination sélective du lysozyme à l'aide d'une phase échangeuse de cations SCX. Les lignes A et B représentent des extraits des protéines de la paroi cellulaire réalisés avec du lysozyme (deux répétitions indépendantes). Les lignes A' et B' correspondent respectivement aux échantillons A et B après passage par l'échangeur de cations SCX.

Comme on peut observer sur la Figure 42, la bande intense à 14,4 kDa correspondant au lysozyme, est quasiment absente dans les échantillons ayant été traités avec l'échangeur de cations SCX. Les quantités des autres protéines de l'extrait de paroi cellulaire de *L. plantarum*, semblent rester inchangées. Les rendements d'extraction de protéines de la paroi cellulaire obtenus par cette méthode sont de l'ordre de 150 à 250 µg de protéine (mesurés par la méthode de Bradford) obtenus à partir de 40 ml de culture.

Les extraits obtenus sont précipités avec de l'acétone glacée pour concentrer les protéines. Cependant, la précipitation à l'acétone ne permet pas d'éliminer la plupart des

contaminants présents dans les échantillons et ces extraits bruts doivent être purifiés avant la réalisation des séparations électrophorétiques. En effet, l'IEF des protéines est une étape très sensible et la présence de contaminants tels que les sels, les phospholipides ou les acides nucléiques peut faire précipiter les protéines pendant la focalisation, empêchant une bonne séparation, et causant des traînées dans les gels.

Différents traitements de purification des protéines ont été envisagés. Nous avons utilisé des membranes Vivaspin (Sartorius, Hannover, Allemagne) avec un seuil de coupure de 3000 Da pour éliminer les sels et les petites molécules par ultrafiltration. Cependant, cette technique n'a pas donné des bons résultats, puisqu'elle aboutit à une concentration des protéines qui sont perdues par précipitation et adhésion à la membrane de séparation.

Une autre technique de purification envisagée a été le dessalage par perméation sur gel à l'aide de petites colonnes spin remplies avec 1ml d'une phase Sephadex G-25. Cette méthode permet d'éliminer les sels et les molécules de petite taille. Toutefois, d'autres contaminants, tels que les lipides et les acides nucléiques, ne peuvent pas être éliminés avec une phase G-25 et la qualité des gels réalisés avec les échantillons ainsi dessalés n'était pas satisfaisante. Ces gels présentaient des nombreuses traînées, surtout du côté des bas pI, dues à la précipitation des protéines dans le gel pendant l'étape de l'IEF (Figure 43a).

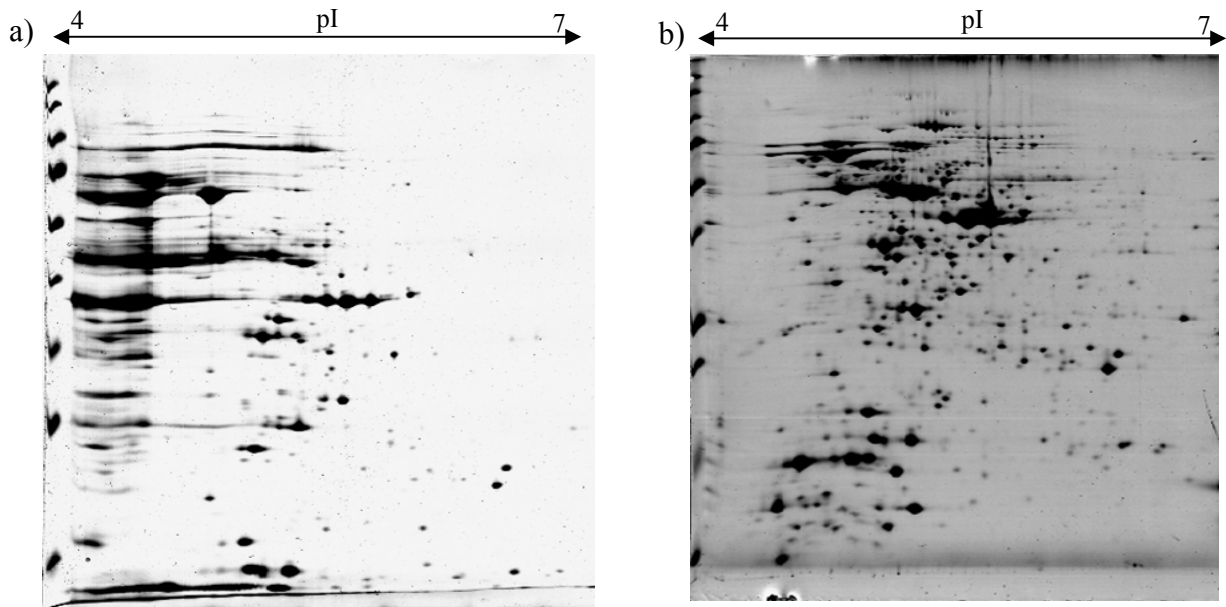


Figure 43. Electrophorèse 2D des protéines de la paroi cellulaire de *L. plantarum* réalisée dans un intervalle de pH 4,0-7,0, avec un gel chargé de 75 µg de protéines et coloré au bleu de Coomassie colloïdal. a) Echantillon purifié par perméation sur gel avec une phase G-25. b) Echantillon purifié à l'aide du réactif Trizol.

Une troisième méthode de purification a été utilisée et consiste en une extraction au thiocyanate de guanidine-phénol-chloroforme en utilisant le réactif Trizol (43). Elle est basée sur une séparation de phases par centrifugation d'un mélange d'une phase aqueuse saturée en phénol, du chloroforme et d'une solution de thiocyanate de guanidine, un agent chaotrope dénaturant. Cette technique est généralement utilisée afin d'extraire les acides nucléiques débarrassés des protéines, mais le même le protocole peut toutefois être utilisé pour la purification des protéines. Ces dernières sont récupérées de la phase organique par une précipitation à l'acétone glacée. Les culots obtenus sont facilement remis en solution dans le tampon IEF. Les gels préparés avec les échantillons purifiés par cette méthode ont une résolution significativement améliorée par rapport à ceux purifiés par perméation sur gel (Figure 43b). La méthode de purification des protéines au Trizol a donc été retenue pour la suite de l'étude.

3.1.2. Protéines totales

L'adhésion des bactéries au mucus dépend principalement de la composition de la paroi cellulaire. Cependant, d'autres propriétés des bactéries telles que la résistance à l'acidité et à la bile, mais aussi la plupart des effets probiotiques, mettent en jeu tant la surface cellulaire que le cytoplasme de la bactérie, ce qui exige que la totalité des protéines bactériennes soient extraites en vue d'une identification des protéines impliquées dans ces propriétés et effets. La mise au point d'un protocole d'extraction des protéines totales est donc nécessaire.

Plusieurs protocoles destinés à extraire les protéines totales des bactéries existent (299), la plupart d'entre eux utilisant des détergents et des enzymes pour la lyse des cellules. Or, l'addition de réactifs et d'enzymes peut être gênante dans les étapes qui succèdent, telles que la quantification des protéines dans le cas des enzymes ou l'IEF dans le cas des détergents anioniques. Ce problème a été illustré précédemment avec l'utilisation du lysozyme, qui a rendu nécessaire une étape de purification supplémentaire, ce qui augmente les risques de perte de protéines et de variations entre les différents essais.

Il existe toutefois des méthodes physiques ou mécaniques de lyse des cellules qui permettent d'extraire tout le contenu cellulaire et qui ne nécessitent pas d'addition chimique et n'altèrent donc pas la composition des échantillons. Parmi celles-ci, il y a la sonication avec des sondes à ultrasons et le broyage dans différents systèmes tels que la French Press ou les

broyeurs à billes. Ces techniques sont assez efficaces, mais elles produisent un échauffement rapide des échantillons susceptible d'altérer les structures protéiques (par exemple par dénaturation ou par oxydation des chaînes latérales des acides aminés).

L'acquisition par le laboratoire d'un broyeur à l'azote liquide a permis l'application de cette technique pour l'extraction des protéines bactériennes totales. Les échantillons sont congelés par immersion dans une cuve d'azote liquide, puis ils sont broyés par d'un pilon métallique actionné magnétiquement. Le broyage consiste en plusieurs cycles courts de broyage dans l'azote liquide. A l'opposé des autres techniques mécaniques, le phénomène de réchauffement des échantillons est ici évité, puisque ceux-ci sont maintenus congelés tout le long du processus de broyage. L'état solide des cellules permet par ailleurs un broyage plus facile et plus fin de celles-ci. Le lysat bactérien obtenu, très visqueux en raison de l'ADN libéré, contient des débris cellulaires qui peuvent être éliminés par filtration des protéines solubilisées, qui peuvent être précipitées à l'acétone glacée. Toutefois, les précipités obtenus ne sont pas purs à cause de l'ADN présent, et nécessitent une purification au réactif Trizol. Le rendement en protéines ainsi extraites est d'environ 1 mg de protéines à partir d'une culture de 10 ml.

3.2. Analyse comparative du protéome de la paroi cellulaire des souches de *L. plantarum*

Les protéomes de surface cellulaire de souches de *L. plantarum* ont été comparés afin d'établir un lien entre leur capacité d'adhésion et leur profils protéomiques et de pouvoir identifier les protéines impliquées dans l'adhésion au mucus de *L. plantarum*. D'après les résultats d'adhésion au mucus (chapitre 3), les souches sélectionnées pour cette étude sont : l'isolat de laboratoire *L. plantarum* WHE 92 (capacité d'adhésion élevée) ; la souche de collection *L. plantarum* CECT 4185 (capacité d'adhésion faible) et le probiotique commercial *L. plantarum* 299V (capacité d'adhésion moyenne). Des électrophorèses 2D ont été réalisées en utilisant 75 µg d'extrait de protéines de la paroi cellulaire de chacune de ces trois souches avec une charge de 75 µg de protéines par gel.

Les protéines ont été révélées au bleu de Coomassie colloïdal, une coloration nettement moins sensible que la coloration à l'argent, mais réputée pour sa bonne compatibilité avec l'analyse par spectrométrie de masse. Les protéomes extraits sont comparés par analyse d'images des profils électrophorétiques en utilisant le logiciel PDQuest

(Bio-Rad). Les différences identifiées sur les gels peuvent être de trois ordres : un spot protéique présent dans un échantillon et absent dans un autre (Figure 44a), un spot protéique présent dans deux ou plusieurs échantillons, mais à des intensités différentes (Figure 44b) et un spot protéique présent dans deux ou plusieurs échantillons mais avec de légers déplacements (Figure 44c). Dans le cas d'un déplacement, les spots sont identifiés par PDQuest comme des protéines différentes et ils sont analysés comme un cas d'absence/présence.

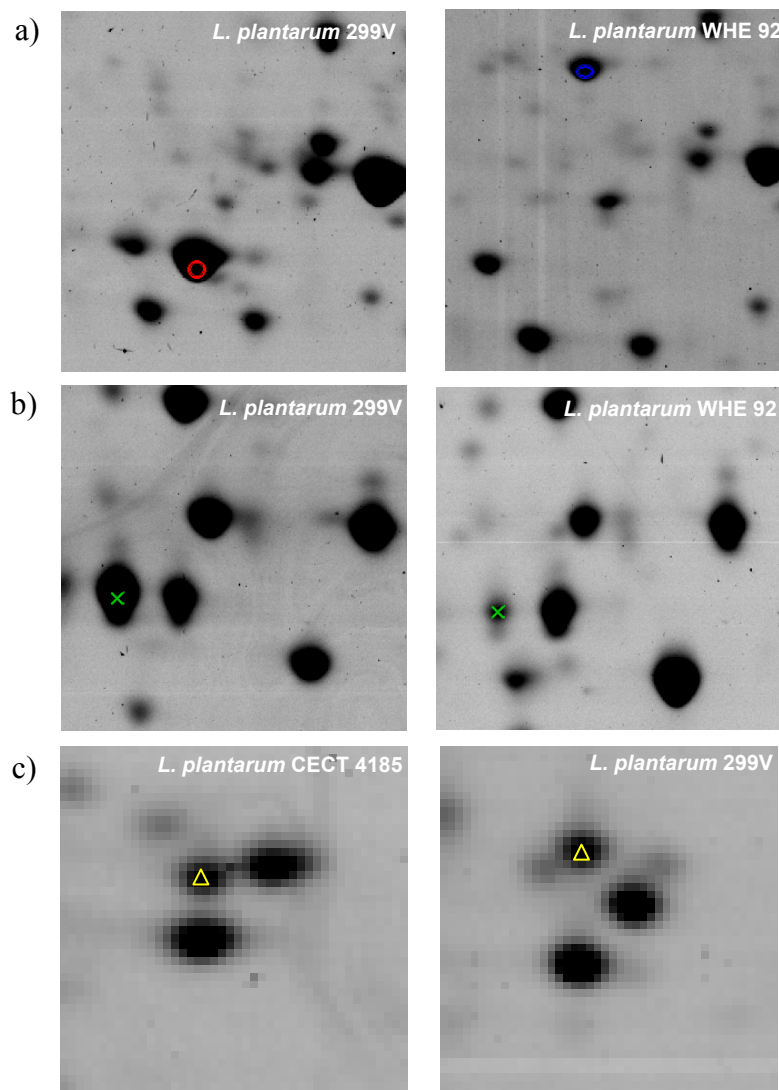


Figure 44. Détail des gels obtenus après électrophorèse 2D réalisée avec les protéines de la paroi cellulaire de *L. plantarum*. a) Le spot marqué en rouge (gauche) est un spot présent chez la souche 299V et absent chez la souche WHE 92, à l'inverse du spot marqué en bleu (droite) qui est présent chez la souche WHE 92 et absent chez la souche 299V. b) Le spot marqué par une croix verte est plus intense chez la souche 299V que chez la souche WHE 92. c) Le spot marqué par un triangle jaune se trouve déplacé chez la souche CECT 4185 par rapport à la souche 299V.

Pour rechercher de possibles biomarqueurs de l'adhésion, nous avons examiné les protéines qui sont mieux exprimées dans la paroi cellulaire des souches hautement et moyennement adhésives par rapport à la souche faiblement adhésive. Les Figures 45, 46 et 47 présentent respectivement les profils électrophorétiques des protéines de paroi cellulaire des souches *L. plantarum* WHE 92 (souche la plus adhésive), *L. plantarum* 299V (souche moyennement adhésive) et *L. plantarum* CECT 4185 (souche faiblement adhésive).

Même si, comme il était attendu, les profils protéomiques de trois souches sont très similaires, l'analyse qualitative et quantitative par PDQuest a révélé que 35 spots présentaient des niveaux d'expression différents d'au moins un facteur 2 (Figures 45, 46 et 47). Parmi ces protéines, 19 étaient surexprimées dans la souche *L. plantarum* WHE 92 et 16 dans la souche *L. plantarum* 299V.

D'après les profils électrophorétiques, la protéine du spot 35 est présente en très grande quantité et sous plusieurs isoformes. Cependant, les différences d'intensité observées entre les souches ne peuvent pas être clairement évaluées, justement en raison d'une surcharge importante du spot. Ceci résulte en effet en une traînée verticale et en une mauvaise séparation entre les isoformes, empêchant ainsi l'analyse quantitative correcte du spot, surtout dans l'échantillon *L. plantarum* WHE 92 où il est le plus intense.

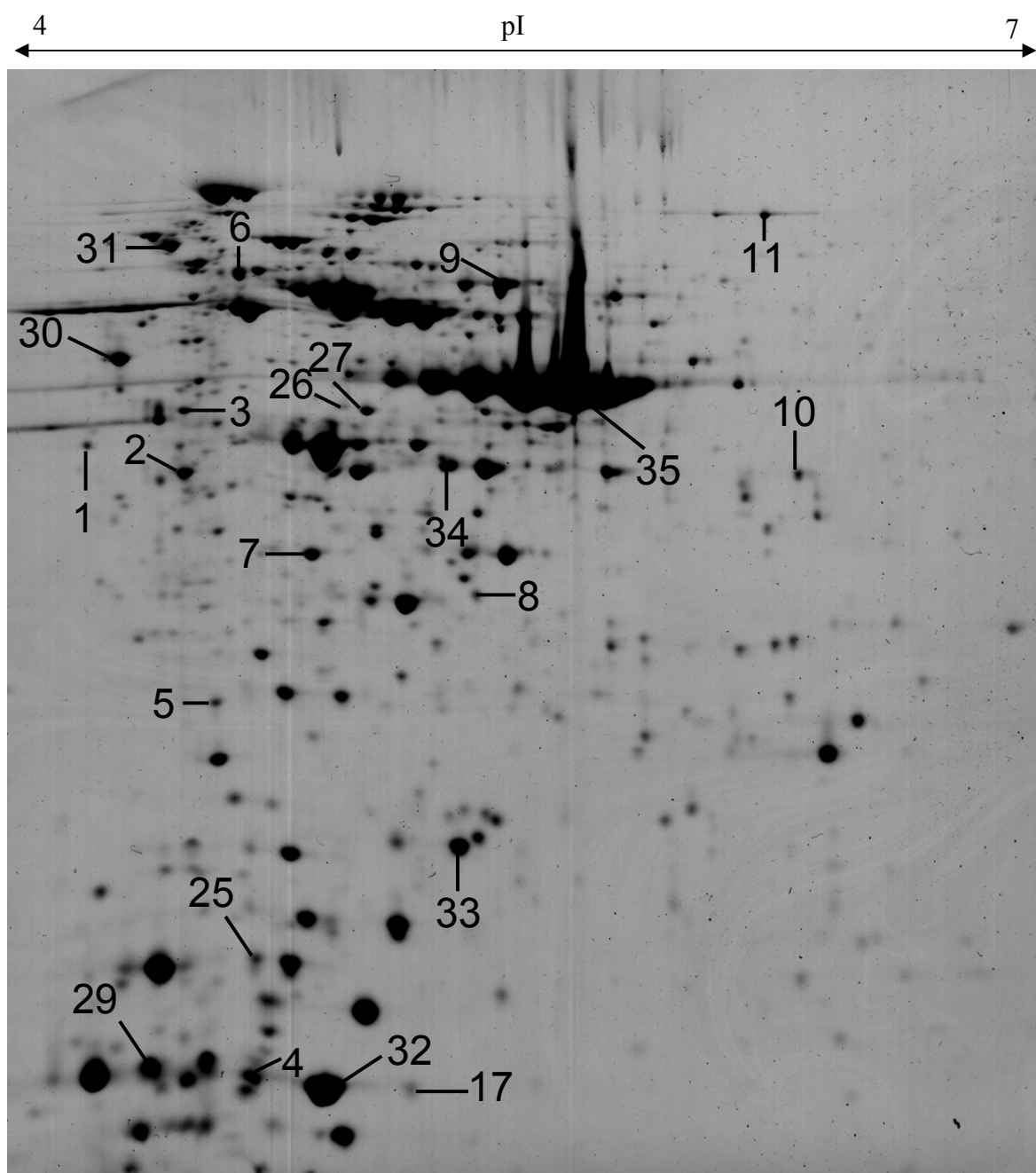


Figure 45. Electrophorèse 2D des protéines de la paroi cellulaire de *L. plantarum* WHE 92 réalisée dans un intervalle de pH 4,0-7,0 avec un gel à 12% d'acrylamide, chargé de 75 µg de protéines et coloré au bleu de Coomassie colloïdal. Les chiffres 1-35 représentent les protéines avec une expression différente en comparaison avec les deux autres souches étudiées.

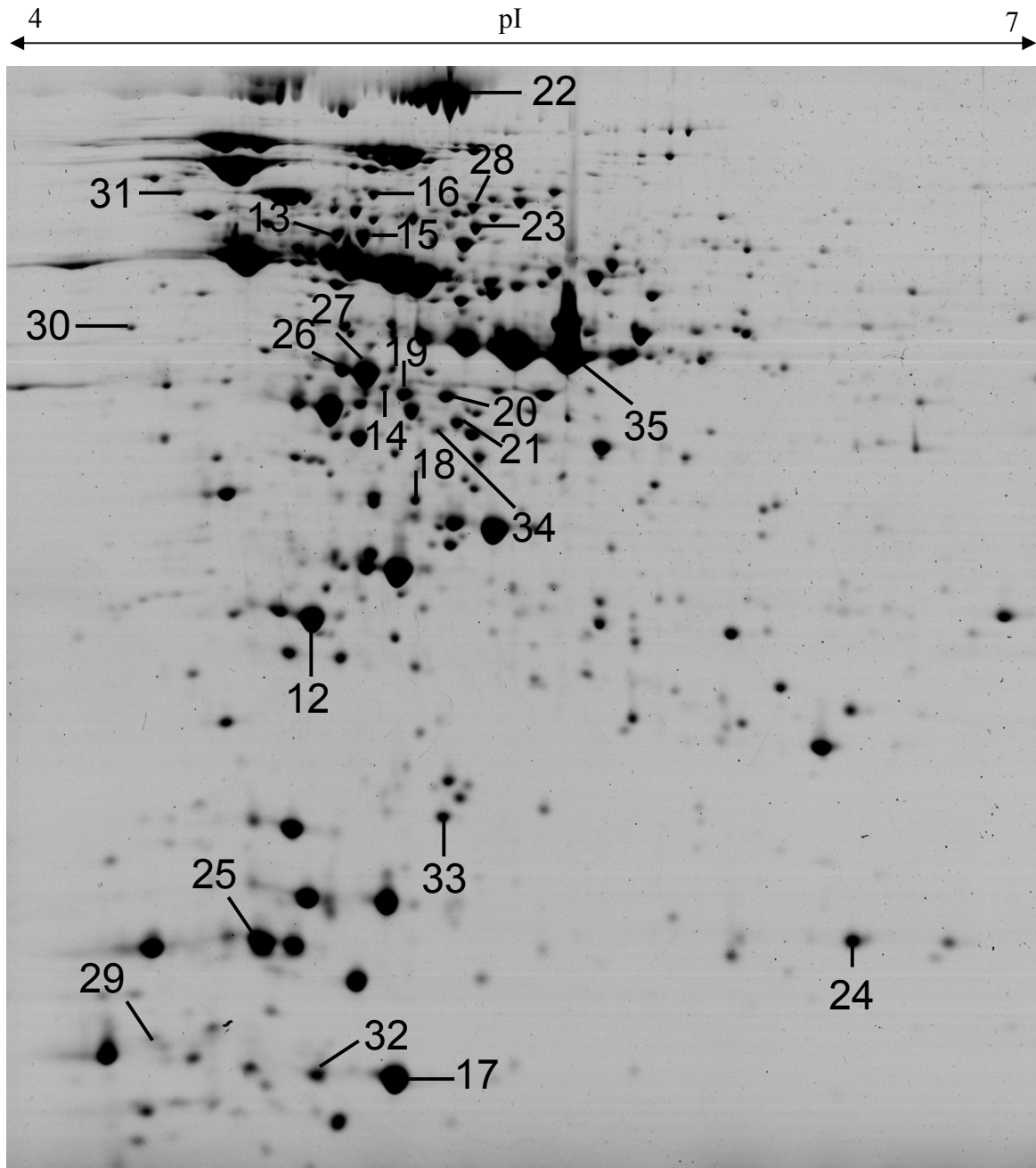


Figure 46. Electrophorèse 2D de protéines de la paroi cellulaire de *L. plantarum* 299V réalisée dans un intervalle de pH 4,0-7,0 avec un gel à 12% d'acrylamide, chargé de 75 µg de protéines et coloré au bleu de Coomassie colloïdal. Les chiffres 1-35 indiquent les protéines avec une expression différente, en comparaison avec les deux autres souches étudiées.

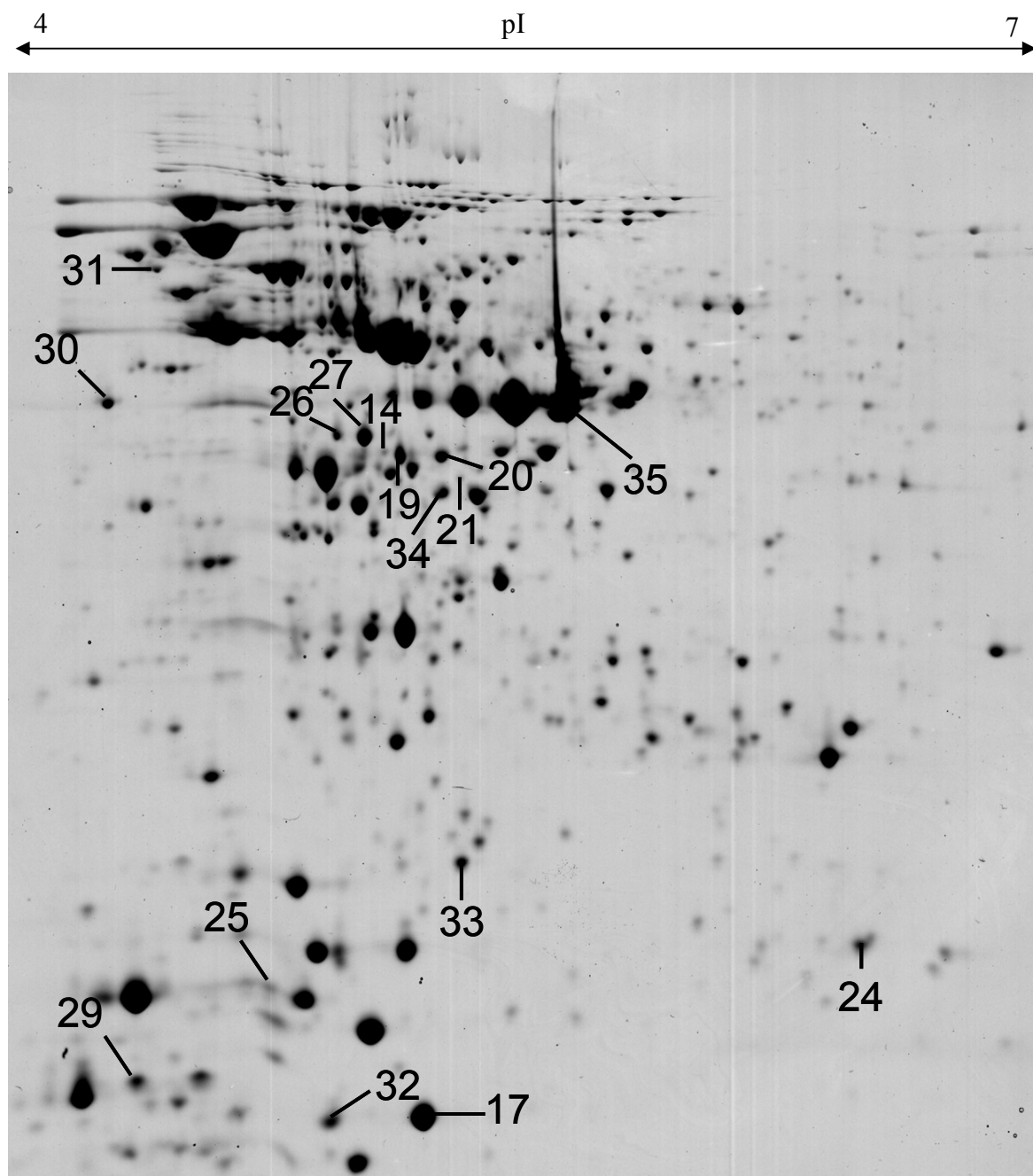


Figure 47. Electrophorèse 2D des protéines de la paroi cellulaire de *L. plantarum* CECT 4185 réalisée dans un intervalle de pH 4,0-7,0 avec un gel à 12% d'acrylamide, chargé de 75 µg de protéines et coloré au bleu de Coomassie colloïdal. Les chiffres 1-35 représentent les protéines avec une expression différente en comparaison avec les deux autres souches étudiées.

Une quantité de protéines de 75 µg permet d'obtenir des gels de bonne qualité et l'analyse comparative de la plupart des protéines de la paroi cellulaire avec un niveau d'intensité moyen. Cependant, ces gels ne semblent pas adaptés à l'analyse des protéines dans les spots majoritaires (précipitation des protéines et mauvaise résolution), ni à celle des protéines dans des spots minoritaires (faible sensibilité). Il apparaît donc que la quantité de protéines déposée sur le gel d'électrophorèse doit être adaptée en fonction de la concentration des protéines d'intérêt et des électrophorèses supplémentaires utilisant charges différentes de protéines ont été nécessaires afin d'analyser toutes les protéines présentes dans l'échantillon (majoritaires, d'intensité moyenne et minoritaires).

Quand une protéine est en concentration trop élevée elle précipite dans la bandelette d'IEF et peut causer des traînées et des distorsions dans toute la zone voisine du gel 2D. Ainsi, afin de mieux analyser les protéines dans les spots intenses, des électrophorèses 2D utilisant une plus petite charge de protéines (30 µg par gel) et un gradient de pH plus étroit (4,7 - 5,9) ont été réalisées. En effet, une plus faible quantité de protéines évite la surcharge et la précipitation des protéines majoritaires dans la bandelette de focalisation isoélectrique et une gamme de pH plus étroite permet en une meilleure séparation des protéines. Les résultats montrent effectivement que, même si la protéine correspondante au spot 35 reste assez concentrée et quelques traînées sont encore visibles, la diminution de la charge en protéines des gels a permis une meilleure résolution des spots (Figure 48). De plus, l'utilisation d'une gamme de pH plus étroite a résulté en une meilleure séparation entre le spot 35 et ses isoformes. Les gels obtenus sont de qualité suffisante pour permettre une analyse quantitative des protéines dans les spots intenses, en particulier celle de la protéine dans le spot 35 et ses isoformes.

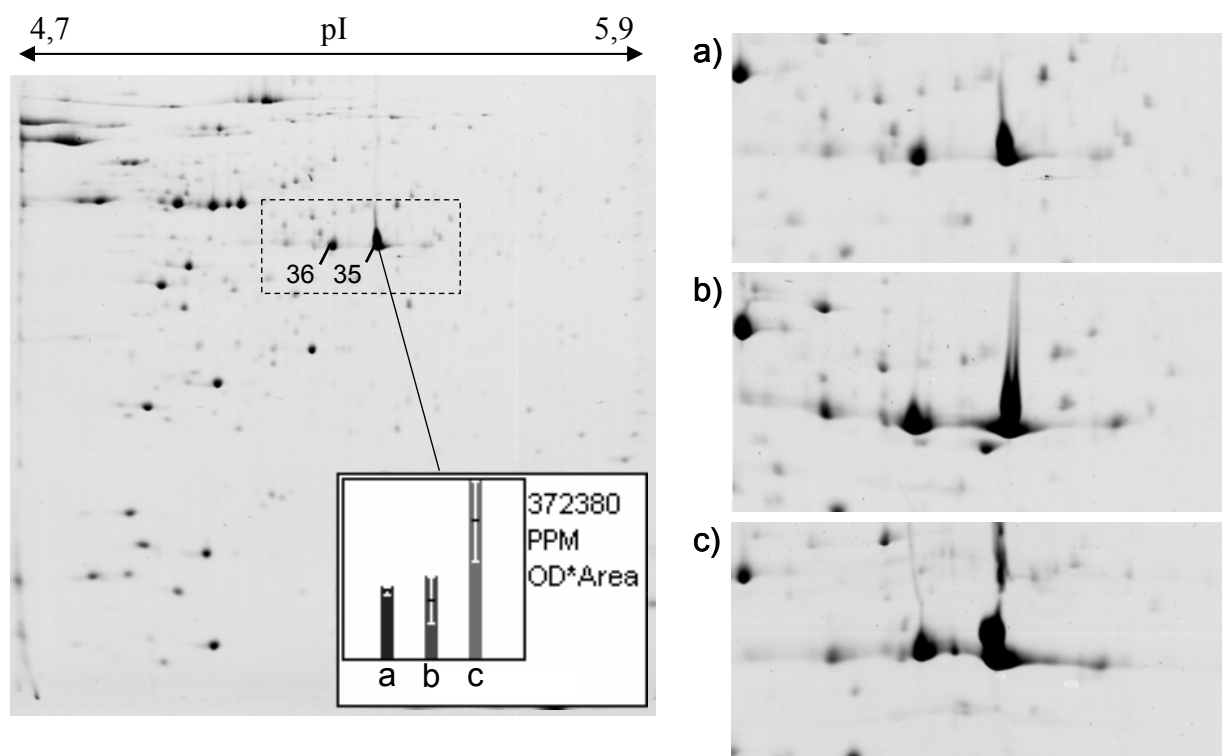


Figure 48. Electrophorèse 2D des protéines de la paroi cellulaire des souches de *L. plantarum* réalisée dans un intervalle de pH 4,7-5,9 avec un gel à 12 % d'acrylamide, chargé de 30 µg de protéines et coloré au bleu de Coomassie colloïdal. La partie du gel contenant le spot 35 et les spots voisins (marquée sur l'image par une ligne pointillée) est représentée à droite pour chacune des souches : a) *L. plantarum* 299V ; b) *L. plantarum* CECT 4185 ; c) *L. plantarum* WHE 92. L'histogramme représente la quantité normalisée de la protéine du spot 35 (moyenne et écart type de trois répétitions indépendantes) obtenue avec le logiciel PDQuest.

La normalisation des quantités de protéine dans le spot 35 et leur comparaison entre les souches étudiées à l'aide du logiciel PDQuest ont permis de constater que cette protéine est mieux exprimée chez *L. plantarum* WHE 92. Sa quantité est environ deux fois plus importante chez *L. plantarum* WHE 92 que chez *L. plantarum* CECT 4185 et *L. plantarum* 299V (Figure 48). Ces deux dernières souches ne présentent toutefois pas une différence en quantité protéique dans le spot 35.

A l'inverse des protéines majoritaires, telles que celle du spot 35, l'étude des protéines minoritaires, qui pourraient aussi avoir une influence importante sur les propriétés des bactéries, nécessite d'augmenter la quantité de protéines appliquée aux gels. Cependant, la présence de quelques protéines majoritaires par rapport au reste, présentes en quantités importantes, limite la charge d'échantillon applicable pour la réalisation des gels. Une autre solution serait changer le type de coloration en utilisant du nitrate d'argent, qui est beaucoup

plus sensible que le bleu de Coomassie colloïdal. Cependant, autant la coloration au nitrate d'argent est sensible et permet la détection d'un grand nombre de spots, autant l'identification des protéines contenues dans ces spots est difficile par manque de signal lors des analyses par spectrométrie de masse. L'utilisation d'un colorant tel le bleu de Coomassie, même s'il est moins sensible, est donc nécessaire dans l'objectif d'une identification protéique après séparation. Avec les techniques disponibles, l'augmentation de la quantité totale de protéines déposée sur les gels semble donc être le seul moyen de pouvoir analyser les protéines minoritaires, et ce malgré la moindre qualité des gels par endroits, à cause de la surcharge en protéines majoritaires.

Des gels 2D des extraits de la paroi cellulaire de *L. plantarum* ont été réalisés avec une charge de 200 µg de protéines par gel (Figures 49, 50 et 51). La partie supérieure-gauche de ces gels montre des distorsions importantes, ce qui rend compliquée l'analyse des protéines présentes dans cette région. Cependant, la résolution dans le reste du gel est acceptable et permet d'analyser certaines protéines minoritaires, qui n'avaient pas pu être prises en compte lors des analyses précédentes (avec 30 µg et 75 µg de protéines par gel).

Cette nouvelle série de gels nous a permis de confirmer certaines des 35 variations observées lors des analyses réalisées avec 75 µg de protéines (celles présentes dans la partie exploitable des gels) et d'identifier des variations d'expression sur 26 protéines faiblement exprimées qui n'avaient pas été détectées précédemment. Parmi ces protéines, 8 étaient mieux exprimées dans la souche *L. plantarum* WHE 92, 15 dans la souche *L. plantarum* 299V et 3 dans la souche *L. plantarum* CECT 4185.

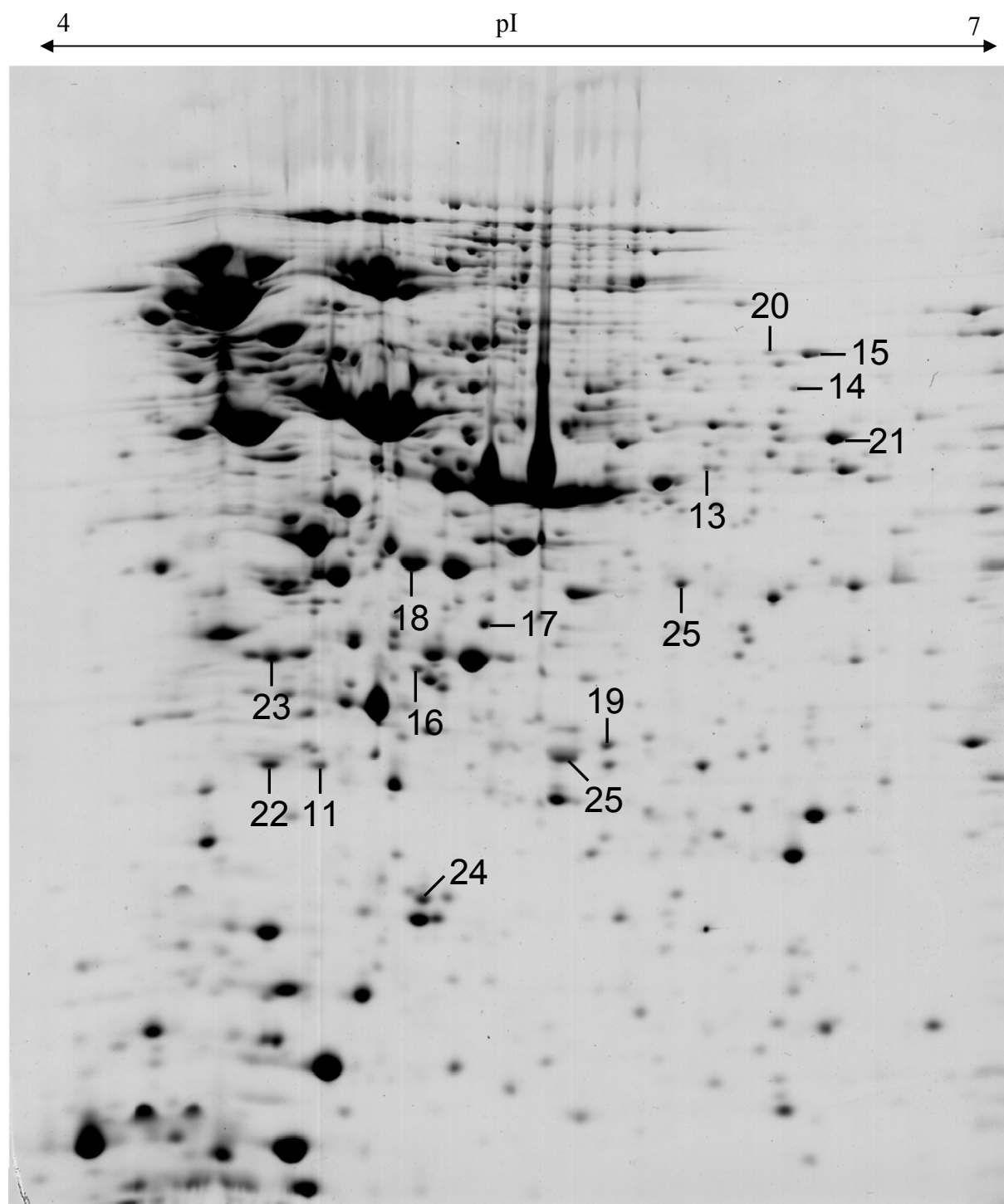


Figure 49. Electrophorèse 2D des protéines de la paroi cellulaire de *L. plantarum* WHE 92 réalisée dans un intervalle de pH 4,0-7,0 avec un gel à 12% acrylamide, chargé de 200 µg de protéines et coloré au bleu de Coomassie colloïdal. Les chiffres 1-26 représentent les protéines avec une expression différente en comparaison avec les deux autres souches étudiées.

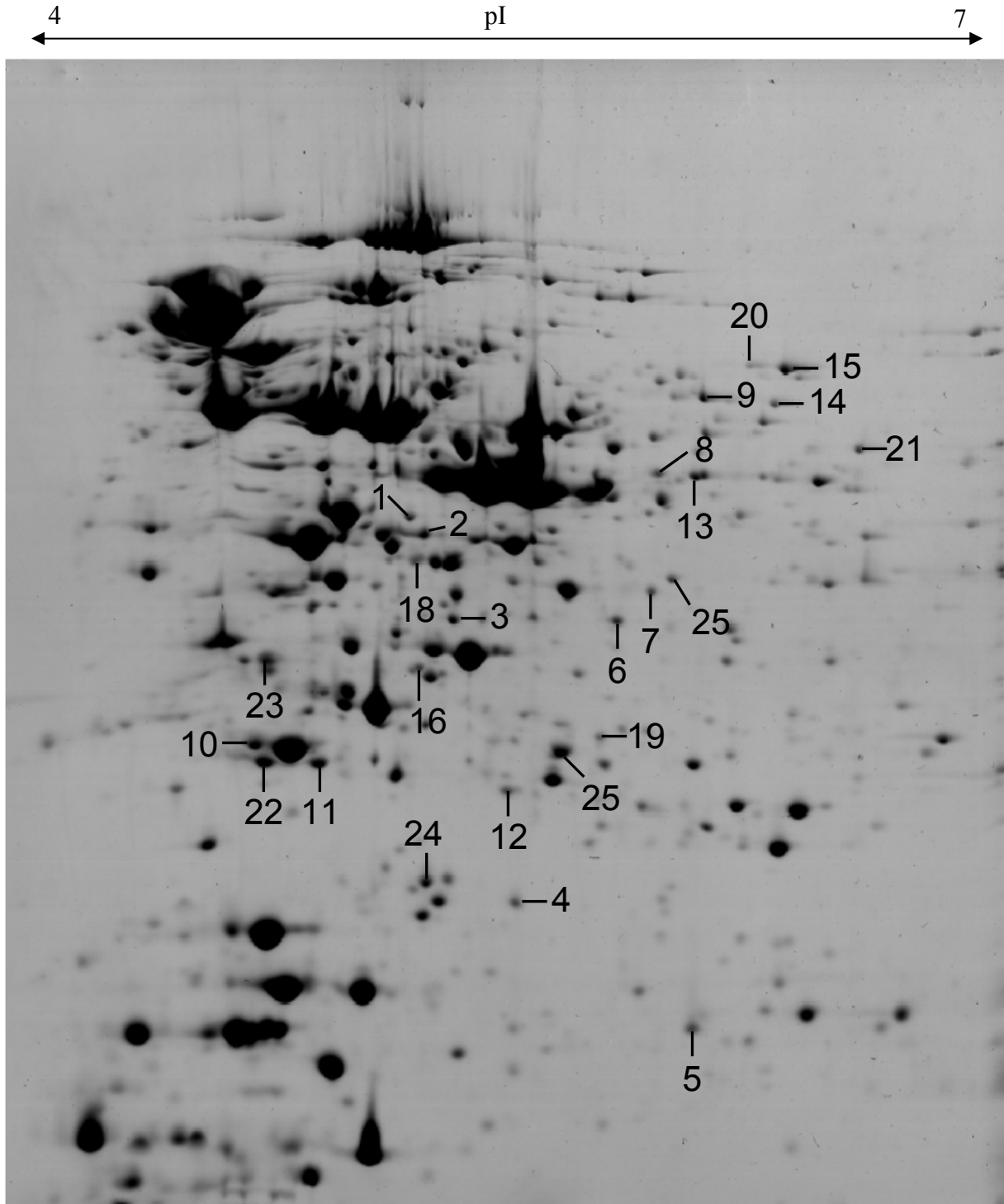


Figure 50. Electrophorèse 2D des protéines de la paroi cellulaire de *L. plantarum* 299V réalisée dans un intervalle de pH 4,0-7,0 avec un gel à 12% acrylamide, chargé de 200 µg de protéines et coloré au bleu de Coomassie colloïdal. Les chiffres 1-26 représentent les protéines avec une expression différente en comparaison avec les deux autres souches étudiées

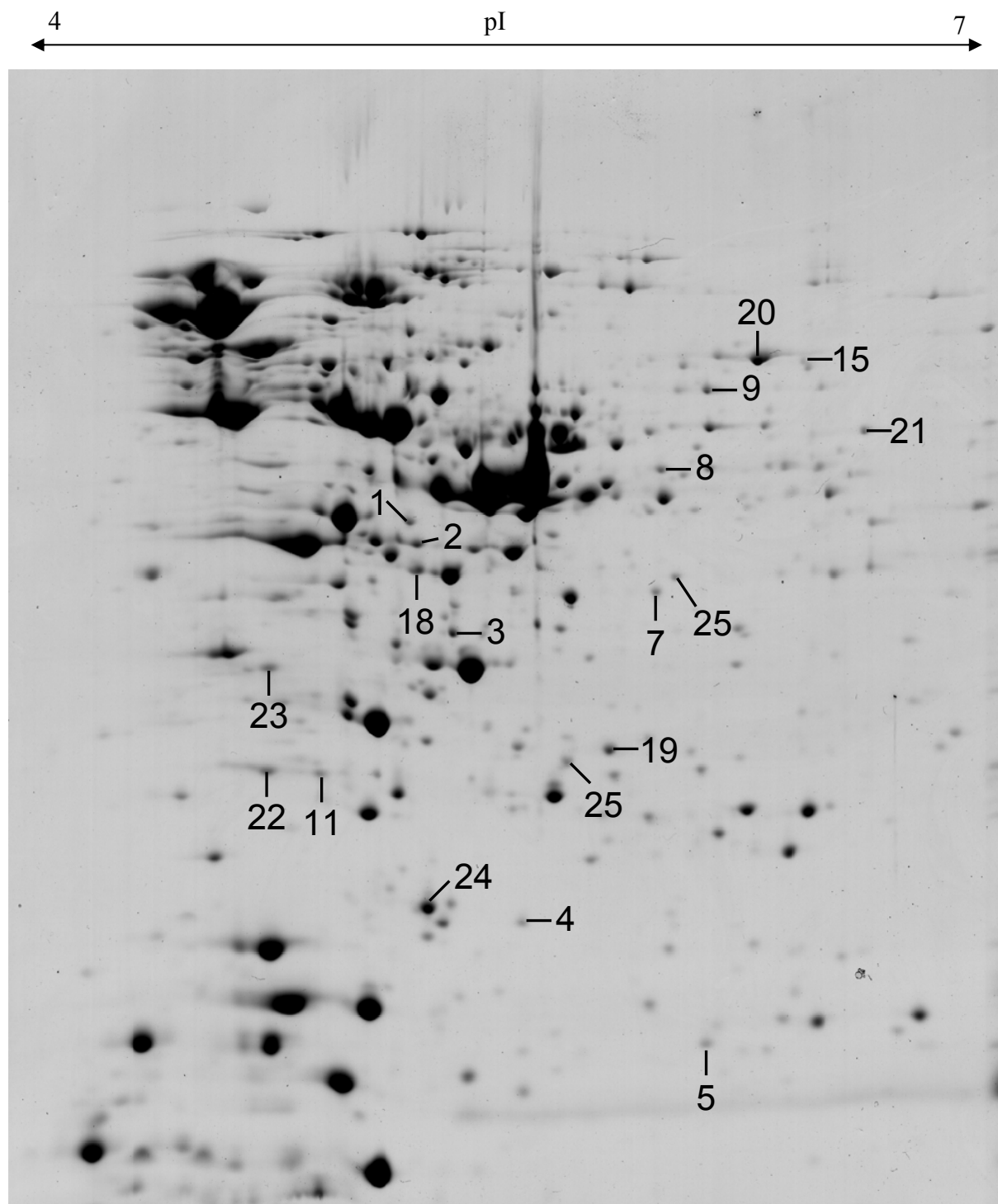


Figure 51. Electrophorèse 2D des protéines de la paroi cellulaire de *L. plantarum* CECT 4185 réalisée dans un intervalle de pH 4,0-7,0 avec un gel à 12% acrylamide, chargé de 200 µg de protéines et coloré au bleu de Coomassie colloïdal. Les chiffres 1-26 représentent les protéines avec une expression différente en comparaison avec les deux autres souches étudiées.

3.3. Analyse comparative du protéome total des souches de *L. plantarum*

Lors des tests de tolérance à la bile des souches de *L. plantarum* (chapitre 3), nous avons observé des différences significatives entre les souches. Ces différences peuvent être dues à des facteurs très divers tels que la composition de la paroi et de la membrane cellulaires, la capacité de réponse au stress et la synthèse d'enzymes capables de modifier chimiquement les constituants de la bile. En effet, la tolérance des souches à la bile ne dépend pas seulement de la composition de la surface cellulaire, comme c'était le cas de la capacité d'adhésion au mucus, mais de la physiologie et de la composition de toute la cellule. Afin d'étudier les protéines qui déterminent une meilleure tolérance à la bile d'une souche par rapport à une autre, le protéome total des souches de *L. plantarum* a été extrait et comparé.

Les souches suivantes ont été sélectionnées pour l'étude : *L. plantarum* 299V, probiotique commercial dont la croissance était la moins affectée par la présence de bile ; *L. plantarum* LC 56, isolat de laboratoire et souche la moins résistante à la bile ; et *L. plantarum* LC 804, isolat de laboratoire avec une tolérance moyenne à la bile. Des électrophorèses 2D ont été réalisées avec les extraits des protéines totales de ces 3 souches obtenus par lyse des bactéries dans un broyeur à l'azote liquide (Figures 52, 53 et 54). Les profils électrophorétiques 2D obtenus sont d'apparence comparables à ceux obtenus en utilisant l'extrait de la paroi cellulaire, mais avec une variété et une abondance de protéines visibles plus grandes. En effet, les mêmes protéines majoritaires semblent également prédominer dans le protéome total. Cependant, la plus grande abondance du reste des protéines des échantillons fait que le rapport entre les protéines majoritaires et les autres est un peu moins accentué que dans le cas des extraits de la paroi cellulaire. Ceci a permis la réalisation d'électrophorèses avec 150 µg de protéines, tout en gardant une résolution satisfaisante pour l'analyse. L'analyse qualitative et quantitative réalisée des protéomes des trois souches de *L. plantarum* a révélé des différences significatives dans l'expression de 75 protéines.

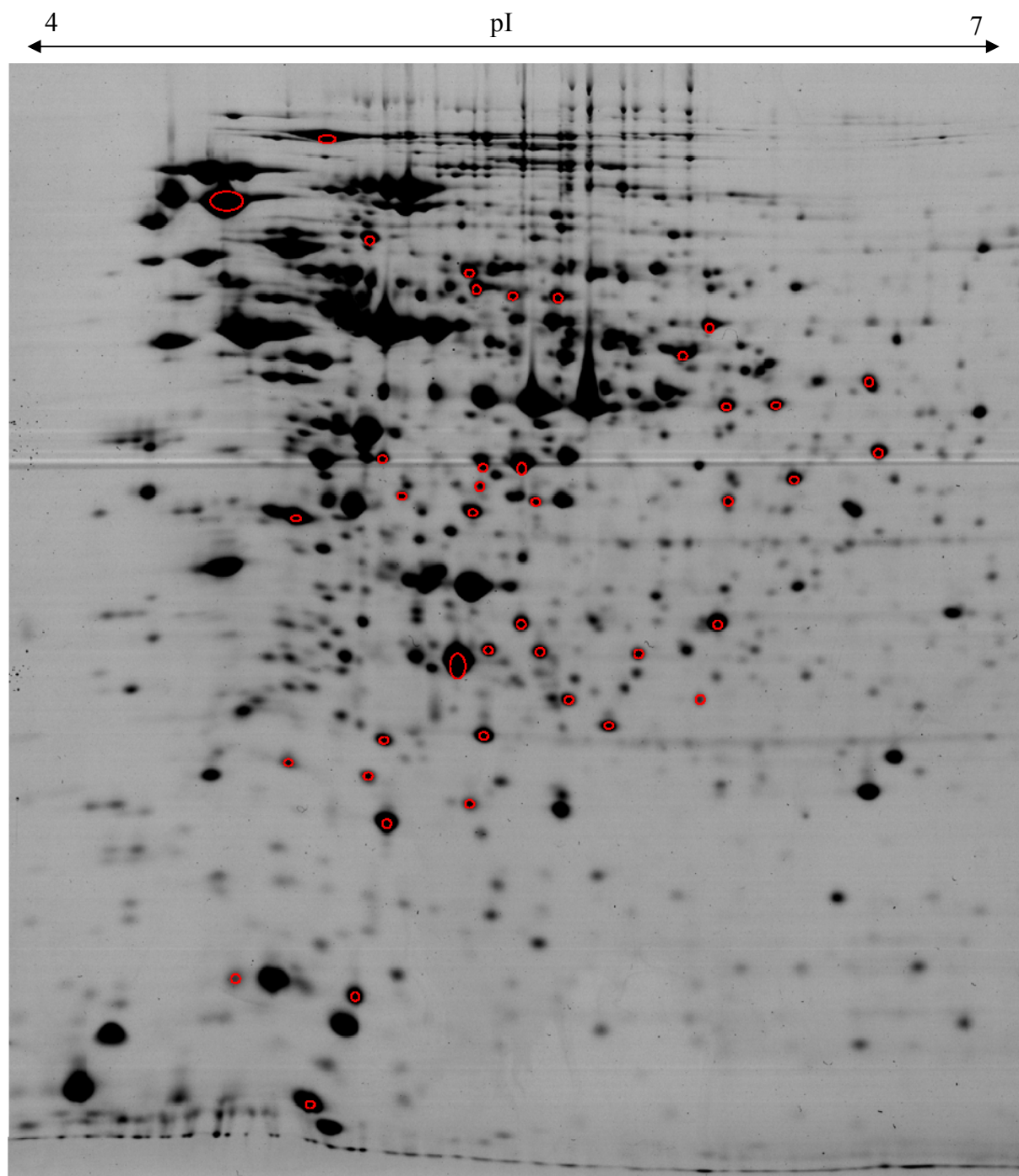


Figure 52. Electrophorèse 2D du protéome total de *L. plantarum* LC 56 réalisée dans un intervalle de pH 4,0-7,0 avec un gel à 12% acrylamide, chargé de 150 µg de protéines et coloré au bleu de Coomassie colloïdal. Les protéines marquées en rouge présentent une expression différente en comparaison avec les deux autres souches étudiées.

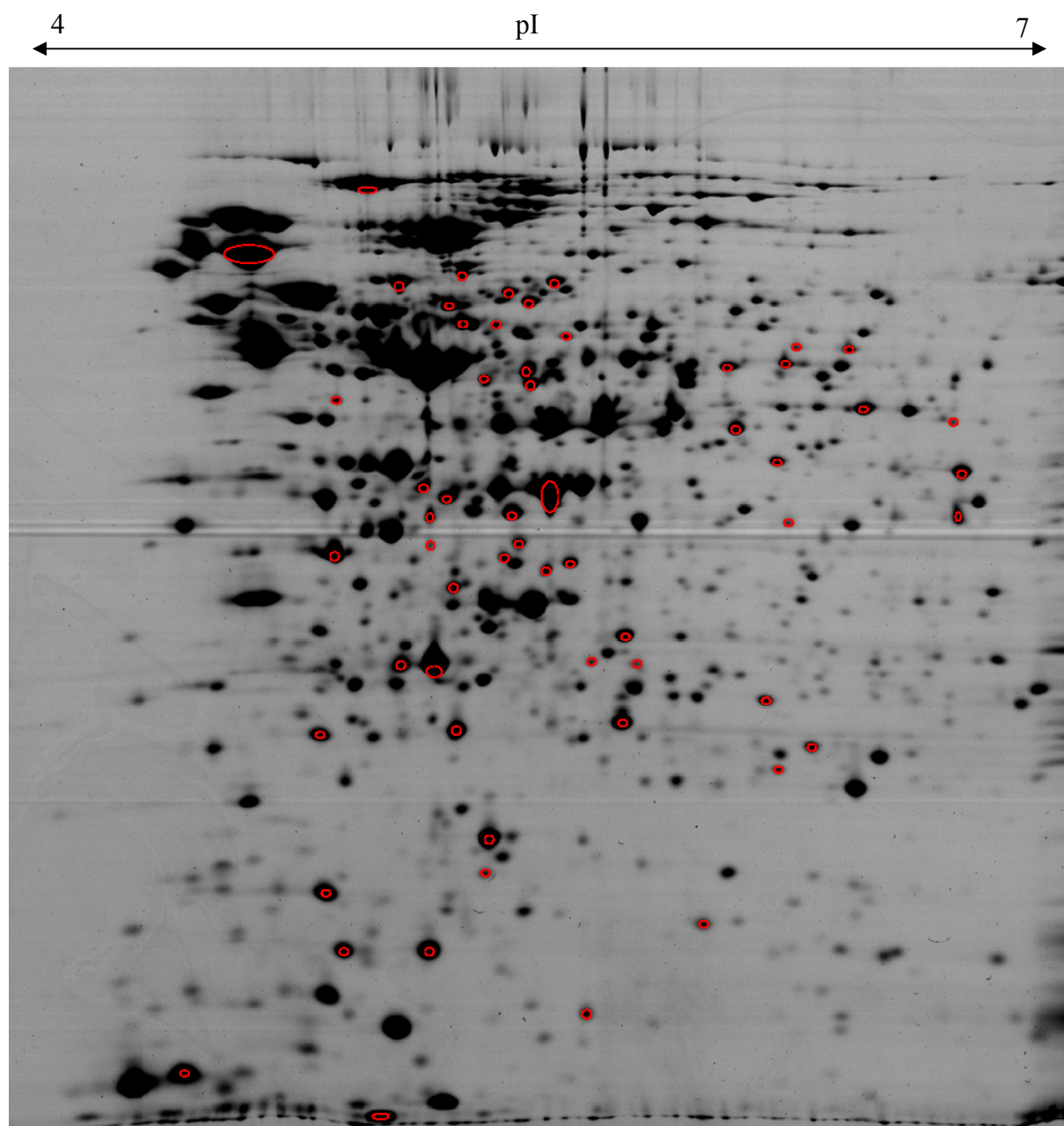


Figure 53. Electrophorèse 2D du protéome total de *L. plantarum* LC 804 réalisée dans un intervalle de pH 4,0-7,0 avec un gel à 12% acrylamide, chargé de 150 µg de protéines et coloré au bleu de Coomassie colloïdal. Les protéines marquées en rouge présentent une expression différente en comparaison avec les deux autres souches étudiées.

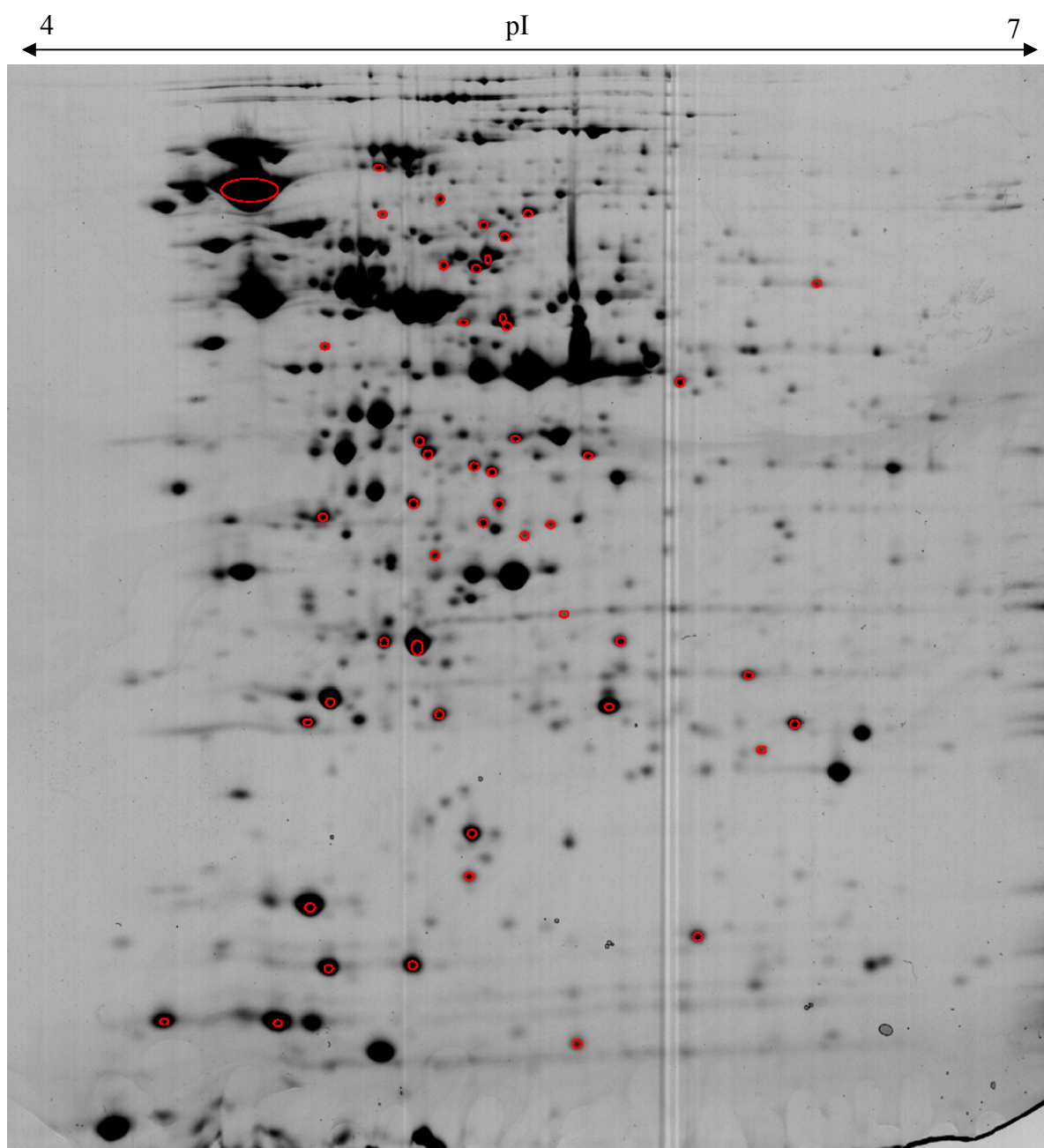


Figure 54. Electrophorèse 2D du protéome total de *L. plantarum* 299V réalisée dans un intervalle de pH 4,0-7,0 avec un gel à 12% acrylamide, chargé de 150 µg de protéines et coloré au bleu de Coomassie colloïdal. Les protéines marquées en rouge présentent une expression différente en comparaison avec les deux autres souches étudiées.

3.4. Identification des molécules impliquées dans une propriété bactérienne : "cas de l'adhésion"

Afin de déterminer quelles protéines ou familles de protéines sont impliquées dans le processus d'adhésion au mucus des souches de *L. plantarum*, nous avons analysé les protéines présentant des différences significatives d'expression dans le protéome de la paroi cellulaire des souches avec de capacités d'adhésion différentes. Les morceaux de gel correspondant aux spots sélectionnés après des électrophorèses avec 75 µg et 200 µg d'extrait de paroi cellulaire (spots 1-35 Figures 45,46 et 47 et spots 1-26 Figures 49, 50 et 51) ont été excisés et les protéines contenues digérées à la trypsine. Cette enzyme hydrolyse les protéines du côté C-terminal des résidus lysine et arginine, générant ainsi des peptides avec les résidus basiques C-terminaux. Par ailleurs, les tailles des peptides tryptiques sont généralement adaptées à l'analyse par spectrométrie de masse.

Dans un premier temps, les mélanges peptidiques issus des protéines digérées ont été analysés par MALDI-TOF pour une identification des protéines par la technique d'empreinte peptidique. Cependant, cette méthode a donné lieu à très peu d'identifications et nous avons choisi d'utiliser une technique plus performante : le Chip-LC Q-TOF. Le couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en tandem permet d'abord de séparer les peptides issus de la digestion, puis d'obtenir leurs spectres de fragmentation, générant ainsi beaucoup plus de données qu'avec l'analyse MALDI-TOF, ce qui permet des identifications plus fiables lors de la recherche dans les bases de données.

Les chips sont des dispositifs qui intègrent une pré-colonne, une colonne analytique et une aiguille nanospray. Elles sont fabriquées à partir de films de polyimide sur lesquels les canaux, les chambres et les ports sont générés par ablation laser. Une fois les canaux créés, la pré-colonne et la colonne analytique sont remplies de phase stationnaire (302). Ces systèmes miniaturisés réduisent considérablement les volumes morts, permettant de gagner en résolution et en sensibilité. Ainsi, la quantité d'échantillon nécessaire est plus petite, ce qui permet l'identification des protéines présentes en quantités faibles.

Les données de spectrométrie de masse en tandem obtenues avec le système Chip-LC Q-TOF ont été utilisées pour une recherche dans la base de données NCBIInr à l'aide du serveur Phenyx. Cette recherche nous a permis d'identifier 27 des 35 protéines sélectionnées à l'issue des électrophorèses réalisées avec 75 µg de protéines (Tableau 25). Les protéines non identifiées proviennent dans la plupart des cas de spots peu intenses. Leur injection était

généralement précédée dans la séquence d'injections par celle de protéines présentes en quantités importantes, ce qui a causé une contamination croisée ayant empêché leur identification. Lors de l'analyse des protéines minoritaires provenant des électrophorèses réalisées avec 200 µg de protéines, une injection à blanc a été réalisée après chaque injection d'échantillon afin d'éviter ce phénomène de contamination croisée. Malgré la quantité de protéine faible présente dans certains échantillons, les protéines contenues dans les 26 spots retenus ont pu être identifiées (Tableau 26).

Tableau 25. Protéines identifiées par analyse Chip-LC-QTOF et recherche dans NCBIInr présentant une différence d'expression d'au moins un facteur 2 dans le protéome de la paroi cellulaire des souches *L. plantarum* CECT 4185, 299V et WHE 92 (électrophorèses réalisées avec 75 µg de protéines).

Protéine identifiée	Spot ^a	Numéro d'accès ^b	Peptides identifiés ^c	Recouvrement %
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	gi 28377642	70	57
	35	gi 28377642	255	64
	36	gi 28377642	121	71
GroEL Chaperonin	2	gi 28377591	33	27
GroES Co-chaperonin	17	gi 28377590	195	72
	32	gi 28377590	147	50
	4	gi 28377590	15	56
DNA-directed DNA polymerase III beta chain	6	gi 28376976	82	46
Elongation factor Tu (EF-Tu).	7	gi 22266044	4	21
Glutathione reductase	9	gi 28379636	99	58
Cysteine aminopeptidase	13	gi 28377479	31	38
	15	gi 28377479	47	51
Glycyl-tRNA synthetase alpha chain	14	gi 28378608	25	34
Bifunctional GMP /glutamine amidotransférase protein	16	gi 28377744	27	31
Conjugated bile acid hydrolase	19	gi 149533	59	49
	20	gi 149533	40	47
Citrate lyase, chaîne beta	21	gi 28377896	44	50
Probable phosphoketolase 1	22	gi 28379168	18	18
6-Phosphogluconate dehydrogenase	23	gi 28378252	62	56
S-ribosylhomocysteinase	24	gi 28377630	26	39
Stress induced DNA binding protein	25	gi 28379536	64	74
D-lactate dehydrogenase	26	gi 28378688	16	40
	27	gi 28378688	64	68
Seryl-tRNA synthetase 2	28	gi 28377821	43	38
Cold shock protein CspC	29	gi 28377809	15	68
Trigger factor (TF).	30	gi 28378739	43	40
Molecular chaperonin DnaK	31	gi 28378660	42	33
Hypothetical protein lp_1872	33	gi 28378527	40	68

a) Numéro de spot correspondant aux Figures 45, 46, 47 et 48.

b) Numéro d'accès dans la banque de données NCBIInr pour *L. plantarum* WCFS1.

c) Nombre de peptides identifiés avec des valeurs de *z-score* différentes, le nombre de peptides tryptiques (fragments de la protéine) étant généralement plus faible.

Tableau 26. Protéines identifiées par analyse Chip-LC-QTOF et recherche dans NCBIInr présentant une différence d'expression d'au moins un facteur 2 dans le protéome de la paroi cellulaire des souches *L. plantarum* CECT 4185, 299V et WHE 92 (électrophorèses réalisées avec 200 µg de protéines).

Protéine identifiée	Spot ^a	Numéro d'accès ^b	Peptides identifiés ^c	Recouvrement %
Hypothetical protein lp_1905	1	gi 28378555	15	16
Conjugated bile acid hydrolase; CBH	2	gi 149533	36	55
Prolyl aminopeptidase	3	gi 28377695	34	51
Oxidoreductase (putative)	4	gi 28377171	23	60
L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase	6	gi 28378014	50	49
Oxidoreductase	7	gi 28379674	42	56
UDP-galactopyranose mutase	8	gi 28377950	13	24
PyrAa1 protein		gi 114049525	13	31
Glutamate decarboxylase	9	gi 28379751	28	30
	10	gi 28377639	19	56
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	11	gi 28377639	65	78
	22	gi 28377639	67	46
Nitroreductase	12	gi 28379118	35	70
O-acetyltransferase	12	gi 28379249	10	28
UDP-galactopyranose mutase	13	gi 28377950	31	44
Glutaminase of carbamoyl-phosphate synthase	13	gi 1514602	12	25
UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate synthetase	14	gi 28378801	42	55
Bifunctional protein: phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase; IMP cyclohydrolase	15	gi 28379214	81	68
	20	gi 28379214	24	20
2,3,4,5-tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase	16	gi 28378858	6	28
Alpha-acetolactate decarboxylase	16	gi 28378663	4	14
Reponse regulator	17	gi 28377004	39	71
Citrate lyase, beta chain	18	gi 28377896	71	58
6-phosphofructokinase	18	gi 28378549	47	62
Metal-dependent hydrolase of the beta-lactamase superfamily III (putative)	19	gi 28378827	11	54
Acetate kinase	21	gi 28377232	102	80
Elongation factor Tu	23	gi 28378740	29	33
Heat shock protein GrpE	23	gi 28378661	13	42
Ribosomal protein L10	24	gi 28377497	41	81
Adenylate kinase	25	gi 28377853	13	38
Ribose-phosphate pyrophosphokinase	26	gi 28378776	59	62

a) Numéro de spot correspondant aux Figures 49, 50 et 51.

b) Numéro d'accès dans la banque de données NCBIInr pour *L. plantarum* WCFS1.

c) Nombre de peptides identifiés avec des valeurs de *z-score* différentes, le nombre de peptides tryptiques (fragments de la protéine) étant généralement plus faible.

Parmi les protéines identifiées on peut observer que plusieurs d'entre elles sont des enzymes impliquées dans le métabolisme de la bactérie. La localisation logique de ce type de protéines est intracellulaire ou membranaire, où elles peuvent exercer leurs fonctions catalytiques. Cependant, il a déjà été observé que certaines protéines intracellulaires, en plus de leurs fonctions principales, peuvent exercer des activités secondaires quand elles sont présentes dans la surface cellulaire (113, 154, 211, 284). Une étude réalisée récemment sur *B.*

longum a identifié 128 protéines présentes dans l'enveloppe cellulaire de cette espèce parmi lesquelles des protéines de la paroi cellulaire bien connues, mais aussi un nombre important de protéines cytoplasmiques (253). Une revue par Sanchez *et al.* (257) a par ailleurs décrit certaines des protéines intracellulaires qui sont exportées et retrouvées sur la surface de souches probiotiques, ainsi que leur relation avec les effets immunomodulateurs et l'adhésion de ces bactéries.

La paroi cellulaire des bactéries probiotiques est essentiellement composée d'un réseau macromoléculaire de peptidoglycane dans lequel sont intégrées des molécules accessoires (telles que des protéines, des acides teichoïques et teichuroniques, des lipoglycane, des polyphosphates et des carbohydrates) (118). Sa fonction principale est d'agir comme un exosquelette protégeant la bactérie contre le stress osmotique et mécanique, mais elle agit comme support physique, avec des sites d'attachement d'une grande variété de molécules incluant certaines protéines exportées. En général, ces dernières contiennent un peptide signal N-terminal qui les dirige vers les dispositifs d'export permettant ainsi leur migration à la surface bactérienne. Une fois hors du cytoplasme, ces protéines peuvent rester attachées à la paroi cellulaire par différents systèmes d'ancrage tels que l'attachement covalent (210), les interactions électrostatiques (192) et les interactions hydrophobes (174).

La Figure 55 représente les différents types de protéines exportées. Parmi ces protéines, les mieux connues sont probablement celles contenant un motif C-terminal LPXTG. Ce motif est reconnu par la sortase, qui catalyse le clivage entre la thréonine et la glycine et forme une liaison covalente avec le peptidoglycane. (211). Des lipoprotéines peuvent aussi se lier de façon covalente à la paroi cellulaire. Les autres types de protéines dans la figure sont liés à la paroi cellulaire par interactions non covalentes dues à des motifs spécifiques.

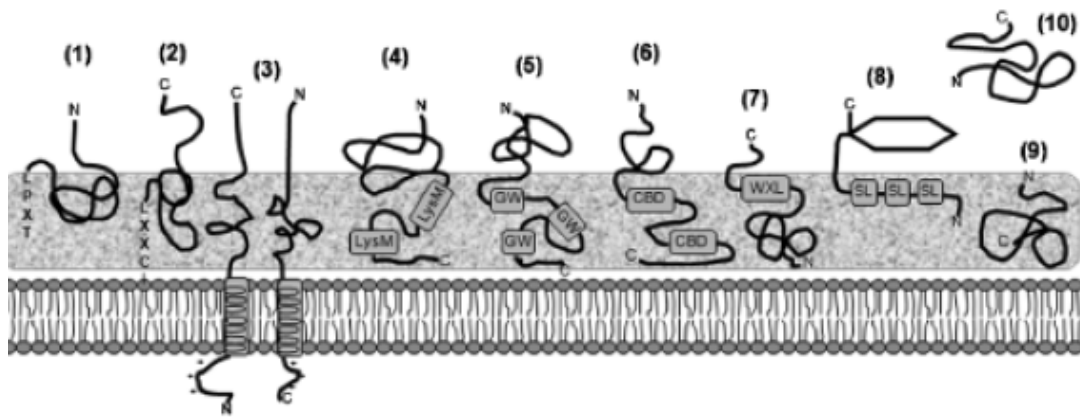


Figure 55. Différents types de protéines exportées identifiées chez les bactéries probiotiques (figure extraite de (257)). 1) Protéines LPXTG. 2) Lipoprotéines. 3) Protéines avec des hélices transmembranaires. 4) Protéines LysM. 5) Protéines GW. 6) Protéines avec un domaine d'attachement de type choline. 7) Protéines WXL. 8) Protéines de la "couche-S". 9) Protéines sans ancrage. 10) Protéines sécrétées.

La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (spot 35 et 36, Tableau 25) est l'une des protéines majoritaires dans le protéome de la paroi cellulaire des souches de *L. plantarum* étudiées. La quantité importante de cette protéine a résulté en des spots très larges et mal définis, rendant nécessaire la réalisation d'électrophorèses avec une charge de protéines plus faible. Ces gels ont permis la quantification de la GAPDH et ont révélé qu'elle était présente en quantité plus importante dans la paroi cellulaire de la souche la plus adhésive, *L. plantarum* WHE 92. Cette enzyme glycolytique, qui catalyse l'interconversion du glycéraldéhyde-3-P en 1,3-bis-phosphoglycérate, a aussi été identifiée sur la surface cellulaire de plusieurs bactéries pathogènes, où elle agit comme une adhésine facilitant l'attachement à de multiples tissus (112, 184, 266, 272). Cependant, la raison de la localisation extracellulaire de la GAPDH n'est pas connue étant donné que cette protéine ne possède pas de peptide signal N-terminal d'export.

Récemment, Kinoshita *et al.* (154, 155) ont rapporté que la GAPDH présente à la surface cellulaire de *L. plantarum* LA 318 adhère à la mucine colique humaine, suggérant que les bactéries probiotiques peuvent utiliser les mêmes mécanismes d'adhésion que les pathogènes. En plus du spot 35, le spot 36 (Figure 48) a aussi été identifié comme GAPDH, montrant que cette protéine est présente en au moins deux isoformes différentes. Le rôle de ces isoformes et comment elles affectent l'activité de la GAPDH, ainsi que leur influence éventuelle sur la capacité d'adhésion ne sont pas clairs. On sait toutefois que des modifications, telles que les phosphorylations, sont déterminantes dans le rôle biologique des

protéines, une étude plus approfondie des modifications de la GAPDH est donc nécessaire pour mieux comprendre le rôle de cette protéine à la surface cellulaire.

Plusieurs autres protéines susceptibles d'être impliquées dans l'adhésion des bactéries ont été trouvées en concentration plus importante dans le protéome de la paroi cellulaire de *L. plantarum* WHE 92 (la souche la plus adhésive) que dans celui des deux autres souches. L'une d'elles est le facteur d'élongation Tu (EF-Tu). Même si pendant longtemps on a pensé que la présence de cette protéine était limitée au cytoplasme de la bactérie, EF-Tu a été également retrouvée dans d'autres compartiments cellulaires (113, 141, 151, 229, 268) et par conséquent son association avec la paroi cellulaire de *L. plantarum* n'est pas surprenante. La fonction principale du EF-Tu est le transport des aminoacyl-tARNs sur le site actif des ribosomes (84). Cependant, il a aussi été montré qu'il s'attache à la mucine et qu'il est impliqué dans le processus d'adhésion de souches probiotiques telles que *L. johnsonii* (113) et *L. crispatus* (268). Dans les premières électrophorèses, réalisées avec 75 µg de protéines, EF-Tu avait été identifié uniquement dans la paroi cellulaire de *L. plantarum* WHE 92 (spot 7, Tableau 25). Toutefois, l'utilisation d'une quantité plus importante de protéines (200 µg) a permis de voir que cette protéine était également présente dans la paroi cellulaire de *L. plantarum* 299V en faible quantité et dans celle de *L. plantarum* CECT 4185 en quantité encore moindre, ce qui coïncide avec l'ordre décroissant d'adhésion des souches. Cette protéine pourrait par conséquent jouer un rôle important dans la capacité d'adhésion élevée de la souche *L. plantarum* WHE 92.

Une autre protéine qui a été rapportée comme étant impliquée dans l'adhésion des bactéries et qui est mieux exprimée dans la paroi cellulaire de *L. plantarum* WHE 92 par rapport aux autres souches, est la protéine chaperonne GroEL (spot 2, Tableau 25). Il a été montré que la famille des protéines chaperonnes participe à des fonctions très variées, sans aucun lien apparent et dans des localisations cellulaires très différentes (236). Ainsi, des chaperonnes peuvent se retrouver sur la surface cellulaire de bactéries pathogènes où elles sont impliquées dans le processus d'adhésion à la muqueuse intestinale (236). Le rôle de chaperonnes a été étudié presque exclusivement dans les bactéries pathogènes (100, 103, 236). Cependant, les mécanismes utilisés par les BAL pour adhérer à cette muqueuse sont susceptibles d'être similaires à ceux utilisés par les pathogènes,. Ainsi, une étude récente a révélé que, quand elle est associée à la surface cellulaire, la chaperonne GroEL de la souche probiotique *L. johnsonii* NCC 533 est capable de se lier à la mucine et à des lignées cellulaires (19), contribuant ainsi à l'adhésion de la bactérie.

De la même façon que GroEL, la chaperonne moléculaire DnaK (spot 31, Tableau 25) et la co-chaperonne GroES (spots 4 et 32, Tableau 25) sont présentes en quantités plus importantes dans la paroi cellulaire de *L. plantarum* WHE 92, comparativement à *L. plantarum* 299V et à *L. plantarum* CECT 4185. La capacité de la chaperonne moléculaire DnaK d'augmenter l'adhésion des bactéries a également été suggérée précédemment, lors de l'étude des protéines de la paroi cellulaire de *L. monocytogenes*, mais aussi d'une souche probiotique, *L. salivarius* (151, 262).

En ce qui concerne la co-chaperonne GroES, à ce jour, aucun lien n'a été établi entre cette protéine et la capacité d'adhésion des probiotiques. Toutefois, la présence plus importante de cette protéine dans le protéome de la paroi cellulaire de la souche la plus adhésive suggère qu'elle pourrait avoir un rôle à jouer dans l'adhésion de *L. plantarum*. En effet, sur les trois protéines identifiées comme GroES, deux (spots 4 et 32) sont mieux exprimées dans la paroi cellulaire de *L. plantarum* WHE 92. Ces trois protéines pourraient correspondre à des isoformes différentes de la même protéine. De même que l'activité des chaperonnes dépend de leur localisation cellulaire (236), elle pourrait aussi être influencée par les modifications chimiques (phosphorylation, glycosilation, etc.) que ces protéines peuvent subir.

Dans ce travail, nous avons comparé les protéomes de souches de *L. plantarum* exprimant des propriétés particulières à des niveaux différents. Grâce aux résultats analytiques obtenus et à une recherche bibliographique, certaines de ces protéines ont pu être liées à la capacité d'adhésion. Cependant, étant donné que nous comparons des souches différentes, les différences de génomes et donc de protéomes entre ces organismes sont relativement importantes et ne concernent de loin pas que l'adhésion, mais dans d'autres propriétés et activités de ces bactéries.

C'est le cas par exemple de l'hydrolase d'acides biliaires conjugués, une enzyme qui catalyse l'hydrolyse des acides biliaires conjugués avec la glycine ou la taurine en résidus d'acides aminés et en acides biliaires libres. La déconjugaison par une bactérie des acides biliaires, permet la détoxification de ceux-ci et augmente sa chance de survie dans le tractus gastro-intestinal (69, 115). De plus, il a été suggéré que la déconjugaison des acides biliaires a des effets bénéfiques sur l'hôte tels que la diminution des niveaux de cholestérol (274). L'activité hydrolase des acides biliaires conjugués est donc une propriété souhaitable chez un probiotique. Dans notre étude, une petite quantité de cette enzyme a été identifiée dans l'extrait de surface des souches *L. plantarum* 299V et CECT 4185. Cependant, sa présence

n'est pas en soi une preuve d'effet, ni sur la tolérance à la bile des souches, ni sur les taux de cholestérol chez l'hôte. Il faudrait à cet effet comparer les niveaux de l'enzyme dans le protéome total des bactéries (et donc prendre en compte sa présence intracellulaire), et bien évidemment confirmer l'effet supposé chez l'hôte par des essais *in vivo*.

La comparaison du protéome total des souches de *L. plantarum* avec des capacités différentes de tolérance à la bile a été réalisée et il a révélé des différences d'intensité concernant 75 protéines. L'identification de ces protéines, qui est en cours, permettra d'élucider l'influence de l'hydrolase des acides biliaires conjugués sur la tolérance des souches à la bile, ainsi que d'autres facteurs impliqués dans cette tolérance tels que des protéines membranaires qui empêcheraient les acides biliaires de pénétrer dans la cellule. D'autres protéines identifiées dans le protéome total pourraient être associées à des activités probiotiques.

4

Conclusion

Ce travail a montré que la protéomique comparative et fonctionnelle est un outil très utile pour l'identification des protéines et des familles de protéines qui jouent un rôle important sur une propriété probiotique. Plusieurs protéines : EF-Tu, les chaperonnes GroEL, GroES et DnaK et la GAPDH ont pu être liés à capacité d'adhésion élevée de *L. plantarum* WHE 92, ce qui soutient l'idée d'un mécanisme d'adhésion complexe qui ne peut pas être attribuée à une unique molécule, mais à la combinaison de l'activité de plusieurs molécules capables d'attacher aux composants de la muqueuse intestinale. La présence de ces protéines permet d'établir un profil caractéristique d'une souche avec une capacité d'adhésion au mucus élevée.

Toutefois, il faut être prudent en interprétant les résultats des analyses protéomiques, puisque les différences d'expression observées entre les souches fortement et faiblement adhésives ne permettent pas d'établir automatiquement un lien entre les protéines identifiées et le phénomène d'adhésion. La comparaison de souches différentes est rendue complexe par le fait que les protéines identifiées pourraient être responsables d'autres caractéristiques cellulaires qui n'ont pas été testées, mais pour lesquelles les souches en question présenteraient aussi des propriétés différentes.

Bien évidemment, il est plus aisé de comparer le protéome d'une même souche avant et après une altération génétique ou un *stimulus* qui changerait l'expression de la propriété d'intérêt. Dans ce type d'études, les protéines avec une expression différentielle sont moins nombreuses et leur relation avec la propriété étudiée est plus évidente. Cependant, cette approche ne rend pas compte de la complexité de phénomènes tels que l'adhésion ou la résistance à un facteur environnemental donné. En effet, d'une part, chez une même souche plusieurs protéines peuvent être impliquées dans une certaine propriété, et d'autre part, chez des souches différentes, même intraspécifiques, des protéines différentes peuvent être impliquées dans la même propriété, comme nous l'avons vu dans le cas de l'adhésion. C'est d'ailleurs pour cette raison que nous avons étudié non seulement les protéines avec des

niveaux d'intensités différents entre les souches, mais aussi les protéines qui sont produites par une seule des souches de la même espèce (absence/présence).

L'approche utilisée nous a permis d'identifier les protéines candidates pour un effet sur l'adhésion des souches, mais la relation entre les profils protéiques identifiés et cet effet devra également être validée par des comparaisons à d'autres souches de la même espèce, dont la capacité d'adhésion est connue, et même à des souches d'autres espèces, où les protéines en question pourraient être présentes. Ceci, tout en admettant que de façon ultime, seuls des tests complémentaires, tels que des mutations dirigées, peuvent confirmer le rôle des protéines identifiées. Certaines de ces protéines pourraient servir de biomarqueurs de la capacité d'adhésion.

Signalement bibliographique ajouté par :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

2-DE and MS analysis of key proteins in the adhesion of *Lactobacillus plantarum*, a first step toward early selection of probiotics based on bacterial biomarkers

Esther IZQUIERDO, Peter HORVATOVICH, Eric MARCHIONI, Dalal AOUDE-WERNER, Yolanda SANZ, Saïd ENNAHAR

Electrophoresis, 2009, vol. 30, numéro 6, p. 949 – 956, Special Issue: EMPHASIS ON PROTEINS AND PROTEOMICS

Pages 197-204 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1002/elps.200800399>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

CONCLUSION GENERALE

Les probiotiques ont été définis comme des micro-organismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte (92). Cette définition est assez générale et elle ne précise pas la nature du bénéfice présumé. De ce fait, de nombreux effets bénéfiques pour la santé, plus ou moins controversés, ont pu être attribués aux BAL à allégation probiotique. Dans la majorité des cas, le lien direct entre les effets revendiqués et la consommation des souches probiotiques n'a pas été établi. Par ailleurs, dans le cas d'effets avérés, les mécanismes physiologiques et biochimiques par lesquels les bactéries agissent restent largement méconnus. Dans ce contexte, l'entrée en vigueur imminente d'une nouvelle législation européenne plus restrictive demande la justification scientifique des allégations santé des souches probiotiques (39). Ceci a mis l'accent sur la recherche de techniques et stratégies analytiques permettant de différencier les souches ayant un réel intérêt probiotique des souches à allégations probiotiques mais ayant probablement moins d'intérêt.

Au cours de ce travail de thèse nous nous sommes intéressés aux protéines bactériennes qui pourraient être à la base de ces effets probiotiques et aux méthodes analytiques permettant de les mettre en évidence. Etant donné la large gamme de propriétés attribuées aux bactéries probiotiques, nous avons choisi d'étudier des propriétés bactériennes qui sont utilisées en priorité lors de la sélection des souches à intérêt probiotique. Celles-ci concernaient la production d'agents antimicrobiens, la résistance aux conditions gastro-intestinales (acidité et présence de bile) et la capacité d'adhésion à la muqueuse gastro-intestinale.

Le pouvoir antimicrobien des BAL est souvent largement renforcé par la production de substances antimicrobiennes telles que les bactériocines. Ces petits peptides antimicrobiens, qui se différencient des antibiotiques par leur synthèse ribosomique et par leur spectre d'activité relativement étroit, et qui sont connus pour leur rôle dans la conservation des aliments, ont récemment vu augmenter leur intérêt dans la recherche sur les probiotiques.

Nous avons étudié les bactériocines produites par cinq souches de BAL de différentes origines : *L. lactis* 53, *L. lactis* 99 et *E. faecalis* WHE 96, isolées du fromage Munster, *L. lactis* RO50, isolée d'ensilage de riz et *E. faecium* IT62, isolée du fourrage d'ivraie. Pour chacune de ces bactériocines, une méthode de purification basée sur un protocole en trois étapes a été mise au point : concentration des protéines à partir de l'extrait de culture, purification par passage sur un échangeur de cations et isolement de la bactériocine par

chromatographie en phase inverse. Des adaptations, concernant notamment l'étape de concentration, ont été réalisées selon la nature de chaque bactériocine.

Les trois souches de *L. lactis* étudiées se sont avérées productrices de nisine. Deux variants naturels, la nisine A et la nisine Z, ainsi que des formes oxydées de celles-ci, ont pu être identifiés. La souche *E. faecium* IT62 s'est révélée être un producteur de trois bactériocines : les entérocoques L50A et L50B et une nouvelle bactériocine, l'entérocoque IT. Les séquences d'acides aminés de ces trois bactériocines et leurs déterminants génétiques ont été identifiés, ce qui a montré que l'entérocoque IT était codée par la même séquence génétique que la bactériocine 32. Il a ainsi été montré que la structure de cette dernière, précédemment identifiée dans des isolats cliniques d'*E. faecium*, était erronée, ce qui a permis sa correction. Une nouvelle bactériocine a également été purifiée à partir de l'extrait de culture d'*E. faecalis* WHE 96 : l'entérocoque 96.

Les spectres d'activité des deux nouvelles bactériocines et ceux des entérocoques L50A et L50B ont été déterminés. Tandis que l'entérocoque IT possède un spectre d'activité très étroit, limité à certaines souches d'*E. faecium*, *L. lactis* et *B. subtilis*, les entérocoques 96, L50A et L50B sont actives contre une vaste gamme de bactéries qui inclut des pathogènes gram+ comme *L. monocytogenes* et *S. aureus*.

L'identification de bactériocines avec des nouvelles structures reste un point clé pour la recherche de nouvelles activités antibactériennes visant, non seulement les bactéries d'altération alimentaire et les pathogènes liés à l'alimentation, mais également des pathogènes de l'environnement gastro-intestinal tels que *H. pylori*. Mais au delà des applications éventuelles, la recherche de nouvelles structures a aussi un intérêt du point de vue théorique, puisqu'elle permet l'étude des relations structure-fonction de ces peptides antibactériens.

Parmi les autres propriétés bactériennes importantes pour l'activité probiotique, il y a l'adhésion à la muqueuse intestinale et la résistance aux conditions du transit gastro-intestinal. La capacité d'adhésion au mucus, la résistance à l'acidité et la tolérance à la bile d'une série de souches de *B. longum* et *L. plantarum* ont été évaluées à l'aide de tests *in vitro* simples. Ces tests ont montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre les capacités d'adhésion et de résistance des souches, mettant en évidence le fait que le caractère probiotique d'une souche sera toujours basé sur un compromis entre certaines propriétés très bien exprimées et d'autres qui le sont moins.

Les molécules impliquées dans ces propriétés bactériennes, moins connues que celles responsables de l'activité antibactérienne, ne pouvaient pas être étudiées en utilisant les méthodes appliquées aux bactériocines. Une nouvelle approche basée sur la comparaison des profils protéomiques des bactéries classées suivant leurs degrés d'expression d'une propriété donnée a donc été envisagée.

Lors de l'étude de la capacité d'adhésion de *L. plantarum*, cette approche nous a permis d'établir un lien entre un taux d'adhésion élevé, cas de la souche WHE 92, et certaines protéines mieux exprimées par cette souche par rapport aux autres souches de la même espèce ayant des taux d'adhésion plus faibles. En effet, des protéines telles que le facteur d'élongation EF-Tu, les chaperonnes GroEL, GroES et DnaK et la GAPDH, dont l'influence sur la capacité d'adhésion des bactéries avait été rapportée précédemment (257, 293), ont été trouvées en quantité plus importante dans le protéome de la paroi cellulaire de la souche la plus adhésive. L'implication effective des protéines identifiées dans le processus d'adhésion devra toutefois être confirmée par des tests complémentaires et par l'élargissement de l'étude à un nombre de souches plus important.

Cette étude ouvre la voie à l'utilisation de la protéomique comme un outil analytique pour la sélection préliminaire des bactéries probiotiques à travers l'identification de profils protéomiques caractéristiques d'activités probiotiques particulières. La recherche de biomarqueurs à travers une étude protéomique est une méthode utilisée généralement en médecine pour le développement des outils de diagnostic. On étudie par exemple l'impact des événements perturbateurs tels que la maladie ou un traitement médicamenteux sur les niveaux d'expression des protéines. En ce qui concerne les bactéries, la protéomique a surtout été utilisée pour l'identification de facteurs de virulence (177). Cependant, l'application de la protéomique à la caractérisation et à la sélection des souches probiotiques est une approche nouvelle, mais qui, à la vue des résultats obtenus, s'est montrée bien prometteuse.

Dans la recherche actuelle sur les probiotiques, il n'y a pas de substitut aux tests *in vitro* et biologiques pour l'identification des souches avec des effets probiotiques potentiels. La seule alternative vient du développement de méthodes analytiques capables de prédire de tels effets à travers l'identification de métabolites et de composants cellulaires particuliers. Les métabolites et composants identifiés pourraient en effet servir de biomarqueurs bactériens, non seulement pour des propriétés bactériennes, comme il a été montré dans cette étude, mais aussi pour la détection des effets potentiels sur la santé de l'hôte. Finalement, le développement de cette approche et son application à la prédiction des effets sur l'hôte tels

que l'immunomodulation, la prévention du cancer et la réduction du cholestérol, représenteraient une voie de progrès très importante dans la recherche sur les probiotiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. The european food information council. *www.efvic.org* . **2009**.
2. Achemchem, F., M. Martinez-Bueno, J. Abrini, E. Valdivia, and M. Maqueda. **2005**. *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. *Journal of Applied Microbiology* 99:141-150.
3. Agence française de securite sanitaire des aliments (afssa). **2005**. Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte.
4. Agerbaek, M., L. U. Gerdes, and B. Richelsen. **1995**. Hypocholesterolaemic effect of a new fermented milk product in healthy middle-aged men. *European Journal of Clinical Nutrition* 49:346-352.
5. Aissi, E. A., M. Lecocq, C. Brassart, and S. Bouquelet. **2001**. Adhesion of some Bifidobacterial strains to human enterocyte-like cells and binding to mucosal glycoproteins. *Microbial Ecology in Health and Disease* 13:32-39.
6. Alander, M., R. Satokari, R. Korpela, M. Saxelin, T. Vilpponen-Salmela, T. Mattila-Sandholm, and A. Von Wright. **1999**. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology* 65:351-354.
7. Aleljung, P., W. Shen, B. Rozalska, U. Hellman, A. Ljungh, and T. Wadstrom. **1994**. Purification of collagen-binding proteins of *Lactobacillus reuteri* NCIB 11951. *Current Microbiology* 28:231-236.
8. Altermann, E., W. M. Russell, M. A. Azcarate-Peril, R. Barrangou, B. L. Buck, O. McAuliffe, N. Souther, A. Dobson, T. Duong, M. Callanan, S. Lick, A. Hamrick, R. Cano, and T. R. Klaenhammer. **2005**. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:3906-3912.
9. Antikainen, J., L. Anton, J. Sillanpää, and T. K. Korhonen. **2002**. Domains in the S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus* involved in adherence to collagens, laminin and lipoteichoic acids and in self-assembly. *Molecular Microbiology* 46:381-394.
10. Antikainen, J., V. Kuparinen, K. Lähteenmäki, and T. K. Korhonen. **2007**. Enolases from Gram-positive bacterial pathogens and commensal lactobacilli share functional similarity in virulence-associated traits. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 51:526-534.
11. Arrigoni, E., P. Marteau, F. Briet, P. Pochart, J. C. Rambaud, and B. Messing. **1994**. Tolerance and absorption of lactose from milk and yogurt during short- bowel syndrome in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 60:926-929.
12. Aso, Y., H. Akaza, T. Kotake, T. Tsukamoto, K. Imai, and S. Naito. **1995**. Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial. *European Urology* 27:104-109.
13. Aso, Y. and H. Akazan. **1992**. Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. *Urologia Internationalis* 49:125-129.
14. Audisio, M. C., G. Oliver, and M. C. Apella. **2000**. Protective effect of *Enterococcus faecium* J96, a potential probiotic strain, on chicks infected with *Salmonella Pullorum*. *Journal of Food Protection* 63:1333-1337.
15. Baquero, F. and F. Moreno. **1984**. The microcins. *FEMS Microbiology Letters* 23:117-124.
16. Baroja, M. L., P. V. Kirjavainen, S. Hekmat, and G. Reid. **2007**. Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients. *Clinical and Experimental Immunology* 149:470-479.

17. Batdorj, B., M. Dalgalarondo, Y. Choiset, J. Pedroche, F. Metro, H. Prévost, J. M. Chobert, and T. Haertlé. **2006**. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *Journal of Applied Microbiology* 101:837-848.
18. Berg, R. D., P. Bernasconi, D. Fowler, and M. Gautreaux. **1993**. Inhibition of *Candida albicans* translocation from the gastrointestinal tract of mice by oral administration of *Saccharomyces boulardii*. *Journal of Infectious Diseases* 168:1314-1318.
19. Bergonzelli, G. E., D. Granato, R. D. Pridmore, L. F. Marvin-Guy, D. Donnicola, and I. E. Cortesy-Theulaz. **2006**. GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: Potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* 74:425-434.
20. Bernalier-Donadille, A. **2009**. Principales fonctions métaboliques de la flore intestinale de l'homme, In J. C. Rambaud, J. P. Buts, G. Corthier, and B. Flourié (eds.), Flore microbiene intestinale. John Libbey Eurotext, Paris.
21. Berrada, N., J. F. Lemeland, G. Laroche, P. Thouvenot, and M. Piaia. **1991**. *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *Journal of Dairy Science* 74:409-413.
22. Bianchi, M. A., D. del Rio, N. Pellegrini, G. Sansebastiano, E. Neviani, and F. Brighenti. **2004**. A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells. *Letters in Applied Microbiology* 39:301-305.
23. Biemans-Oldehinkel, E., M. K. Doeven, and B. Poolman. **2006**. ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Letters* 580:1023-1035.
24. Bonet, M. E. B., A. S. Chaves, O. Meson, and G. Perdigon. **2006**. Immunomodulatory and anti-inflammatory activity induced by oral administration of a probiotic strain of *Lactobacillus casei*. *European Journal of Inflammation* 4:31-41.
25. Boudraa, G., M. Touhami, P. Pochart, R. Soltana, J. Y. Mary, and J. F. Desjeux. **1990**. Effect of feeding yogurt versus milk in children with persistent diarrhea. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 11:509-512.
26. Boutron, M. C., J. Faivre, P. Marteau, C. Couillault, P. Senesse, and V. Quipourt. **1996**. Calcium, phosphorus, vitamin D, dairy products and colorectal carcinogenesis: A French case-control study. *British Journal of Cancer* 74:145-151.
27. Brashears, M. M., M. L. Galyean, G. H. Loneragan, J. E. Mann, and K. Killinger-Mann. **2003**. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given *Lactobacillus* direct-fed microbials. *Journal of Food Protection* 66:748-754.
28. Brashears, M. M., D. Jaroni, and J. Trimble. **2003**. Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *Journal of Food Protection* 66:355-363.
29. Brassart, D. and E. J. Schiffrin. **1997**. The use of probiotics to reinforce mucosal defence mechanisms. *Trends in Food Science & Technology* 8:321-326.
30. Braun, V., H. Pils, and P. Gross. **1994**. Colicins: Structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution. *Archives of Microbiology* 161:199-206.
31. Breukink, E., I. Wiedemann, C. Van Kraaij, O. P. Kuipers, H. G. Sahl, and B. De Kruijff. **1999**. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286:2361-2364.
32. Brot, N. and H. Weissbach. **1991**. Biochemistry of methionine sulfoxide residues in proteins. *BioFactors* 3:91-96.

33. Brötz, H., M. Josten, I. Wiedemann, U. Schneider, F. Götz, G. Bierbaum, and H. G. Sahl. **1998**. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Molecular Microbiology* 30:317-327.
34. Buck, B. L., E. Altermann, T. Svingerud, and T. R. Klaenhammer. **2005**. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology* 71:8344-8351.
35. Burton, J. P., C. N. Chilcott, and J. R. Tagg. **2005**. The rationale and potential for the reduction of oral malodour using *Streptococcus salivarius* probiotics. *Oral Diseases* 11:29-31.
36. Burton, J. P., P. A. Wescombe, C. J. Moore, C. N. Chilcott, and J. R. Tagg. **2006**. Safety assessment of the oral cavity probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Applied and Environmental Microbiology* 72:3050-3053.
37. Buydens, P. and S. Debeuckelaere. **1996**. Efficacy of SF 68 in the treatment of acute diarrhea. A placebo-controlled trial. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 31:887-891.
38. Cascales, E., S. K. Buchanan, D. Duche, C. Kleantous, R. Lloube, K. Postle, M. Riley, S. Slatin, and D. Cavard. **2007**. Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71:158-229.
39. CE. **2006**. Regulation No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. *Off.J.2006 L404/9*.
40. Champomier-Verges, M., E. Maguin, M. Mistou, P. Anglade, and J. Chich. **2002**. Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in Biomedical and Life Sciences* 771:329-342.
41. Chan, W. C., H. M. Dodd, N. Horn, K. Maclean, L. Y. Lian, B. W. Bycroft, M. J. Gasson, and G. C. K. Roberts. **1996**. Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: Role of dehydroalanine 5. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2966-2969.
42. Chatterjee, C., M. Paul, L. Xie, and W. A. van der Donk. **2005**. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chemical Reviews* 105:633-683.
43. Chomczynski, P. and N. Sacchi. **1987**. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159.
44. Cintas, L. M., P. Casaus, M. F. Fernandez, and P. E. Hernandez. **1998**. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiology* 15:289-298.
45. Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Havarstein, P. E. Hernandez, and I. F. Nes. **1997**. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and environmental microbiology* 63:4321-4330.
46. Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Havarstein, H. Holo, P. E. Hernandez, and I. F. Nes. **2000**. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *Journal of Bacteriology* 182:6806-6814.
47. Cintas, L. M., P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernandez, I. F. Nes, and L. S. Havarstein. **1998**. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *Journal of Bacteriology* 180:1988-1994.
48. Claesson, M. J., Y. Li, S. Leahy, C. Canchaya, J. P. Van Pijkeren, A. M. rraga, J. Parkhill, S. Flynn, G. C. O'Sullivan, J. Kevin Collins, D. Higgins, F. Shanahan, G. F. Fitzgerald, D. Van Sinderen, and P. W. O'Toole. **2006**. Multireplicon genome architecture of *Lactobacillus salivarius*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:6718-6723.

49. Coconnier, M. H., T. R. Klaenhammer, S. Kerneis, M. F. Bernet, and A. L. Servin. **1992**. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Applied and Environmental Microbiology* 58:2034-2039.
50. Coconnier, M. H., V. Lievin, E. Hemery, and A. L. Servin. **1998**. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Applied and Environmental Microbiology* 64:4573-4580.
51. Cohen, D. P. A., J. Renes, F. G. Bouwman, E. G. Zoetendal, E. Mariman, W. M. de Vos, and E. E. Vaughan. **2006**. Proteomic analysis of log to stationary growth phase *Lactobacillus plantarum* cells and a 2-DE database. *Proteomics* 6:6485-6493.
52. Collado, M. C., M. Gueimonde, Y. Sanz, and S. Salminen. **2006**. Adhesion properties and competitive pathogen exclusion ability of bifidobacteria with acquired acid resistance. *Journal of Food Protection* 69:1675-1679.
53. Collado, M. C., M. Gueimonde, M. Hernandez, Y. Sanz, and S. Salminen. **2005**. Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *Journal of Food Protection* 68:2672-2678.
54. Commane, D., R. Hughes, C. Shortt, and I. Rowland. **2005**. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 591:276-289.
55. Conway, P. L., S. L. Gorbach, and B. R. Goldin. **1987**. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science* 70:1-12.
56. Cook, D. I., E. W. van Lennep, M. L. Roberts, and J. A. Young. **1994**. Secretion of the major salivary glands, p. 1061-1118. In L. R. Johnson, D. H. Alpers, J. Christensen, E. D. Jacobsen, and J. H. Walsh (eds.), *Physiology of the gastrointestinal tract*. Raven Press, New York.
57. Corr, S. C., Y. Li, C. U. Riedel, P. W. O'Toole, C. Hill, and C. G. M. Gahan. **2007**. Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:7617-7621.
58. Cotter, P. D., C. Hill, and R. P. Ross. **2005**. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3:777-788.
59. Craig, E. A., B. D. Gambill, and R. J. Nelson. **1993**. Heat shock proteins: Molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiological Reviews* 57:402-414.
60. Cremonini, F., S. Di Caro, E. C. Nista, F. Bartolozzi, G. Capelli, G. Gasbarrini, and A. Gasbarrini. **2002**. Meta-analysis: The effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 16:1461-1467.
61. Criado, R., D. B. Diep, A. Aakra, J. Gutierrez, I. F. Nes, P. E. Hernandez, and L. M. Cintas. **2006**. Complete Sequence of the Enterocin Q-Encoding Plasmid pCIZ2 from the Multiple Bacteriocin Producer *Enterococcus faecium* L50 and Genetic Characterization of Enterocin Q Production and Immunity. *Applied and Environmental Microbiology* 72:6653-6666.
62. Crociani, J., J. P. Grill, M. Huppert, and J. Ballongue. **1995**. Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with in vivo study. *Letters in Applied Microbiology* 21:146-148.
63. Cruchet, S., M. C. Obregon, G. Salazar, E. Diaz, and M. Gotteland. **2003**. Effect of the ingestion of a dietary product containing *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in children. *Nutrition* 19:716-721.

64. Cursino, L., D. majs, J. marda, R. M. D. Nardi, J. R. Nicoli, E. Chartone-Souza, and A. M. A. Nascimento. **2006**. Exoproducts of the *Escherichia coli* strain H22 inhibiting some enteric pathogens both in vitro and in vivo. *Journal of Applied Microbiology* 100:821-829.
65. Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., Simard, R. E., and Lemieux, L. **1994**. Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. *Journal of Applied Bacteriology* 77[6], 682-688.
66. Daba, H., C. Lacroix, J. Huang, R. E. Simard, and L. Lemieux. **1994**. Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. *Journal of Applied Bacteriology* 77:682-688.
67. Danielsson, H. and B. Gustafsson. **1959**. On serum-cholesterol levels and neutral fecal sterols in germ-free rats. Bile acids and steroids 59. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 83:482-485.
68. De Leeuw, E., X. Li, and W. Lu. **2006**. Binding characteristics of the *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 surface layer to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiology Letters* 260:210-215.
69. De Smet, I., L. Van Hoorde, M. Vande Woestyne, H. Christiaens, and W. Verstraete. **1995**. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 79:292-301.
70. De Vrese, M., A. Stegelmann, B. Richter, S. Fenselau, C. Laue, and J. Schrezenmeir. **2001**. Probiotics - Compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition* 73:421S-429S.
71. De Vuyst, L. and F. Leroy. **2007**. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 13:194-199.
72. Del Piano, M., M. Ballare, F. Montino, M. Orsello, E. Garello, P. Ferrari, C. Masini, G. P. Strozzi, and F. Sforza. **2004**. Clinical experience with probiotics in the elderly on total enteral nutrition. *Journal of Clinical Gastroenterology* 38:111-114.
73. Delves-Broughton, J. **1996**. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 69:193-202.1.
74. Diep, D. B. and I. F. Nes. **2002**. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in gram positive bacteria. *Current Drug Targets* 3:107-122.
75. Diep, D. B., M. Skaugen, Z. Salehian, H. Holo, and I. F. Nes. **2007**. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:2384-2389.
76. Dierksen, K. P., M. Inglis, and J. R. Tagg. **2000**. High pharyngeal carriage rates of *Streptococcus pyogenes* in Dunedin school children with a low incidence of rheumatic fever. *New Zealand Medical Journal* 113:496-499.
77. Dierksen, K. P., C. J. Moore, M. Inglis, P. A. Wescombe, and J. R. Tagg. **2007**. The effect of ingestion of milk supplemented with salivaricin A-producing *Streptococcus salivarius* on the bacteriocin-like inhibitory activity of streptococcal populations on the tongue. *FEMS Microbiology Ecology* 59:584-591.
78. Donnet-Hughes, A., F. Rochat, P. Serrant, J. M. Aeschlimann, and E. J. Schiffrin. **1999**. Modulation of Nonspecific Mechanisms of Defense by Lactic Acid Bacteria: Effective Dose. *Journal of Dairy Science* 82:863-869.
79. Dortu, C. and P. Thonart. **2009**. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 13:143-154.

80. Draper, L. A., R. P. Ross, C. Hill, and P. D. Cotter. **2008**. Lantibiotic immunity. *Current protein & peptide science* 9:39-49.
81. Drouault, S., G. Corthier, S. D. Ehrlich, and P. Renault. **1999**. Survival, physiology, and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4881-4886.
82. Dunne, C., L. Murphy, S. Flynn, L. O'Mahony, S. O'Halloran, M. Feeney, D. Morrissey, G. Thornton, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, E. M. M. Quigley, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan, and J. K. Collins. **1999**. Probiotics: From myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 76:279-292.
83. Dykes, G. A. **1995**. Bacteriocins: Ecological and evolutionary significance. *Trends in Ecology and Evolution* 10:186-189.
84. Eargle, J., A. A. Black, A. Sethi, L. G. Trabuco, and Z. Luthey-Schulten. **2008**. Dynamics of Recognition between tRNA and Elongation Factor Tu. *Journal of Molecular Biology* 377:1382-1405.
85. Eguchi, T., K. Kaminaka, J. Shima, S. Kawamoto, K. Mori, S. H. Choi, K. Doi, S. Ohmomo, and S. Ogata. **2001**. Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65:247-253.
86. Elliott, S. N., A. Buret, W. McKnight, M. J. S. Miller, and J. L. Wallace. **1998**. Bacteria rapidly colonize and modulate healing of gastric ulcers in rats. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 275:G425-G432.
87. Ennahar, S., D. Aoude-Werner, O. Sorokine, A. Van Dorsselaer, F. Bringel, J. C. Hubert, and C. Hasselmann. **1996**. Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 62:4381-4387.
88. Ennahar, S., K. Sonomoto, and A. Ishizaki. **1999**. Class Ila bacteriocins from lactic acid bacteria: Antibacterial activity and food preservation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87:705-716.
89. Ennahar, S., Y. Cai, and Y. Fujita. **2003**. Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. *Applied and environmental microbiology* 69:444-451.
90. Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto, and A. Ishizaki. **2000**. Class Ila bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews* 24:85-106.
91. Fanigliulo, L., G. Comparato, G. Aragona, L. Cavallaro, V. Iori, M. Maino, G. M. Cavestro, P. Soliani, M. Sianesi, A. Franze, and F. Di Mario. **2006**. Role of gut microflora and probiotic effects in the irritable bowel syndrome. *Acta Biomedica* 77:85-89.
92. FAO/WHO working group. **2002**. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.
93. Fimland, Gunnar, Blingsmo, Ola R., Sletten, Knut, Jung, Guenther, Nes, Ingolf F., and Nissen-Meyer, Jon. **1996**. New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. *Applied and Environmental Microbiology* 62[9], 3313-3318.
94. Finlay, B. B. and S. Falkow. **1997**. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61:136-169.
95. Fleury, Y., M. A. Dayem, J. J. Montagne, E. Chaboisseau, J. P. Le Caer, P. Nicolas, and A. Delfour. **1996**. Covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin Y 10537, a defensive peptide from gram-positive bacteria *leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Biological Chemistry* 271:14421-14429.

96. Floriano, B., J. L. Ruiz-barba, and R. Jimenez-Diaz. **1998**. Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology* 64:4883-4890.
97. Fooks, L. J. and G. R. Gibson. **2002**. Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition* 88:S39-S49.
98. Franz, C. M. A. P., M. J. van Belkum, W. H. Holzapfel, H. Abriouel, and A. Galvez. **2007**. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews* 31:293-310.
99. Frederiq, P. **1946**. Sur la pluralité des récepteurs d'antibiose d'*E. coli*. *CR Soc.Biol.(Paris)* 140:1189-1194.
100. Frisk, A., C. A. Ison, and T. Lagergard. **1998**. GroEL Heat Shock Protein of *Haemophilus ducreyi*: Association with Cell Surface and Capacity To Bind to Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity* 66:1252-1257.
101. Fuller, R. **1991**. Probiotics in human medicine. *Gut* 32:439-442.
102. Fuller, R., P. A. Barrow, and B. E. Brooker. **1978**. Bacteria associated with the gastric epithelium of neonatal pigs. *Applied and Environmental Microbiology* 35:582-591.
103. Garduno, R. A., E. Garduno, and P. S. Hoffman. **1998**. Surface-Associated Hsp60 Chaperonin of *Legionella pneumophila* Mediates Invasion in a HeLa Cell Model. *Infection and Immunity* 66:4602-4610.
104. Garneau, S., N. I. Martin, and J. C. Vederas. **2002**. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84:577-592.
105. Gibson, G. R., G. Rouzaud, J. Brostoff, and N. Rayment. **2005**. An evaluation of probiotic effects in the human gut: microbial aspects. Final Technical report for FSA project refG01022.
106. Gibson, L. F., J. Woodworth, and A. M. George. **1998**. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture* 169:111-120.
107. Gill, H. S. **2003**. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastro-intestinal tract. *Best.Pract.Res.Clin.Gstroenterol.* 17:755-773.
108. Gillor, O., A. Etzion, and M. A. Riley. **2008**. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81:591-606.
109. Gionchetti, P., F. Rizzello, A. Venturi, P. Brigidi, D. Matteuzzi, G. Bazzocchi, G. Poggioli, M. Miglioli, and M. Campieri. **2000**. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: A double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 119:305-309.
110. Glagau, Kristian and Schmidt, Michael. **19-2-2002**. Micronutrient combination product with pro- and prebiotics. Orthomol Pharmazeutische Vertriebs GmbH, Germany. 2002-10206995[10206995], 8. DE.
111. Gordon, D. M., E. Oliver, and J. Littlefield-Wyer. **2007**. The diversity of bacteriocins in Gram-negative bacteria, p. 5-18. In M. A. Riley and M. Chavan (eds.), *Bacteriocins: ecology and evolution*. Springer, Berlin.
112. Gozalbo, D., I. Gil-Navarro, I. Azorin, J. Renau-Piqueras, J. P. Martinez, and M. L. Gil. **1998**. The cell wall-associated glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infection and Immunity* 66:2052-2059.

113. Granato, D., G. E. Bergonzelli, R. D. Pridmore, L. Marvin, M. Rouvet, and I. E. Corthesy-Theulaz. **2004**. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infection and Immunity* 72:2160-2169.
114. Granato, D., F. Perotti, I. Masserey, M. Rouvet, M. Golliard, A. Servin, and D. Brassart. **1999**. Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology* 65:1071-1077.
115. Grill, J. P., S. Perrin, and F. Schneider. **2000**. Bile salt toxicity to some bifidobacteria strains: Role of conjugated bile salt hydrolase and pH. *Canadian Journal of Microbiology* 46:878-884.
116. Gueimonde, M., S. Delgado, B. Mayo, P. Ruas-Madiedo, A. Margolles, and C. De Los Reyes-Gavilan. **2004**. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Research International* 37:839-850.
117. Guglielmetti, S., I. Tamagnini, D. Mora, M. Minuzzo, A. Scarafoni, S. Arioli, J. Hellman, M. Karp, and C. Parini. **2008**. Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology* 74:4695-4702.
118. Hancock, I. C. **1997**. Bacterial cell surface carbohydrates: Structure and assembly. *Biochemical Society Transactions* 25:183-187.
119. Hara, S., K. Yakazo, K. Nakakawaji, T. Takeuchi, T. Kobayasi, M. Sata, Z. Imai, and T. Shibuya. **1962**. An investigation of toxicity of nisin with a particular reference to experimental studies of its oral administration and influences by digestive enzymes. *Journal Tokyo Medical Collection* 20:176-207.
120. Harms, H. K., R. M. Bertele-Harms, and D. Bruer-Kleis. **1987**. Enzyme-substitution therapy with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in congenital sucrase-isomaltase deficiency. *New England Journal of Medicine* 316:1306-1309.
121. Harvarstein, L. S., D. B. Diep, and I. F. Nes. **1995**. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Molecular Microbiology* 16:229-240.
122. Hastings, J. W., M. Sailer, K. Johnson, K. L. Roy, J. C. Vederas, and M. E. Stiles. **1991**. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *Journal of Bacteriology* 173:7491-7500.
123. Hechard, Y. and H. G. Sahl. **2002**. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* 84:545-557.
124. Heng, N. C. K., N. L. Ragland, P. M. Swe, H. J. Baird, M. A. Inglis, J. R. Tagg, and R. W. Jack. **2006**. Dysgalacticin: a novel, plasmid-encoded antimicrobial protein (bacteriocin) produced by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Microbiology (Reading, United Kingdom)* 152:1991-2001.
125. Henker, J., M. Laass, B. M. Blokhin, Y. K. Bolbot, V. G. Maydannik, M. Elze, C. Wolff, and J. Schulze. **2007**. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. *European Journal of Pediatrics* 166:311-318.
126. Herranz, C. and A. J. M. Driessen. **2005**. Sec-mediated secretion of bacteriocin enterocin P by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1959-1963.
127. Hersey, S. J. **1994**. Gastric secretion of pepsins, p. 1227-1238. In L. R. Johnson, D. H. Alpers, J. Christensen, E. D. Jacobsen, and J. H. Walsh (eds.), *Physiology of the gastrointestinal tract*. Raven Press, New York.
128. Hickson, M., A. L. D'Souza, N. Muthu, T. R. Rogers, S. Want, C. Rajkumar, and C. J. Bulpitt. **2007**. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: Randomised double blind placebo controlled trial. *British Medical Journal* 335:80-83.

129. Hillman, J. D. **2002**. Genetically modified *Streptococcus mutans* for the prevention of dental caries. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 82:361-366.
130. Hudault, S., V. Vin, M. F. Bernet-Camard, and A. L. Servin. **1997**. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Applied and Environmental Microbiology* 63:513-518.
131. Hynonen, U., Westerlund-Wikstrom, A. Palva, and T. K. Korhonen. **2002**. Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin-binding function in the S1pA surface protein of *Lactobacillus brevis*. *Journal of Bacteriology* 184:3360-3367.
132. Ingram, L. C. **1969**. Synthesis of the antibiotic, nisin: formation of lanthionine and b-methylanthionine. *Biochimica et Biophysica Acta* 184:216-219.
133. Inoue, T., H. Tomita, and Y. Ike. **2006**. Bac 32, a novel bacteriocin widely disseminated among clinical isolates of *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50:1202-1212.
134. Irianto, A., P. A. W. Robertson, and B. Austin. **2003**. Oral administration of formalin-inactivated cells of *Aeromonas hydrophila* A3-51 controls infection by atypical *A. salmonicida* in goldfish, *Carassius auratus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 26:117-120.
135. Isaacs, K. and H. Herfarth. **2008**. Role of probiotic therapy in IBD. *Inflammatory bowel diseases* 14:1597-1605.
136. Isolauri, E., T. Arvola, Y. Sutas, E. Moilanen, and S. Salminen. **2000**. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical and Experimental Allergy* 30:1604-1610.
137. Isolauri, E., H. Majamaa, T. Arvola, I. Rantala, E. Virtanen, and H. Arvilommi. **1993**. *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology* 105:1643-1650.
138. Isolauri, E., S. Rautava, M. Ki, P. Kirjavainen, and S. Salminen. **2002**. Role of probiotics in food hypersensitivity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2:263-271.
139. IZARD, J. W. and D. A. Kendall. **1994**. Signal peptides: Exquisitely designed transport promoters. *Molecular Microbiology* 13:765-773.
140. Jack, R. W., J. R. Tagg, and B. Ray. **1995**. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews* 59:171-200.
141. Jacobson, G. R. and J. P. Rosenbusch. **1976**. Abundance and membrane association of elongation factor Tu in *E. coli*. *Nature (London, United Kingdom)* 261:23-26.
142. Johansson, M. L., S. Nobaek, A. Berggren, M. Nyman, I. Björck, S. Åhrn, B. Jeppsson, and G. Molin. **1998**. Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v), and effect on the short-chain fatty acid content of faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats. *International Journal of Food Microbiology* 42:29-38.
143. Johnsen, L., G. Fimland, and J. Nissen-Meyer. **2005**. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *Journal of Biological Chemistry* 280:9243-9250.
144. Johnson-Henry, K. C., K. E. Hagen, M. Gordonpour, T. A. Tompkins, and P. M. Sherman. **2007**. Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cellular Microbiology* 9:356-367.
145. Jung, G. **1991**. Lantibiotics - Ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and α,β -didehydroamino acids. *Angewandte Chemie - International Edition in English* 30:1051-1068.

146. Kaila, M., E. Isolauri, M. Saxelin, H. Arvilommi, and T. Vesikari. **1995**. Viable versus inactivated *Lactobacillus* strain GG in acute rotavirus diarrhoea. *Archives of Disease in Childhood* 72:51-53.
147. Kalliomaki, M., S. Salminen, H. Arvilommi, P. Kero, P. Koskinen, and E. Isolauri. **2001**. Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357:1076-1079.
148. Kampman, E., R. A. Goldbohm, P. A. Van Den Brandt, and P. Van't Veer. **1994**. Fermented dairy products, calcium, and colorectal cancer in the Netherlands cohort study. *Cancer Research* 54:3186-3190.
149. Kazazic, M., J. Nissen-Meyer, and G. Fimland. **2002**. Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of the pediocin-like bacteriocin sakacin P. *Microbiology* 148:2019-2027.
150. Kecskés, G., T. Belágyi, and A. Oláh. **2003**. Early jejunal nutrition with combined pre- and probiotics in acute pancreatitis--prospective, randomized, double-blind investigations. *Magyar sebészet* 56:3-8.
151. Kelly, P., P. B. Maguire, M. Bennett, D. J. Fitzgerald, R. J. Edwards, B. Thiede, A. Treumann, J. K. Collins, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan, and C. Dunne. **2005**. Correlation of probiotic *Lactobacillus salivarius* growth phase with its cell wall-associated proteome. *FEMS Microbiology Letters* 252:153-159.
152. Kelly, W. J., R. V. Asmundson, and C. M. Huang. **1996**. Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. *International Journal of Food Microbiology* 33:209-218.
153. Kim, D. H. and B. Austin. **2006**. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish and Shellfish Immunology* 21:513-524.
154. Kinoshita, H., H. Uchida, Y. Kawai, T. Kawasaki, N. Wakahara, H. Matuo, M. Watanabe, H. Kitazawa, S. Ohmura, K. Miura, A. Horii, and T. Saito. **2008**. Cell surface *Lactobacillus plantarum* LA 318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin. *Journal of Applied Microbiology* 104:1667-1674.
155. Kinoshita, H., N. Wakahara, M. Watanabe, T. Kawasaki, H. Matsuo, Y. Kawai, H. Kitazawa, S. Ohnuma, K. Miura, A. Horii, and T. Saito. **2008**. Cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) of *Lactobacillus plantarum* LA 318 recognizes human A and B blood group antigens. *Research in Microbiology* 159:685-691.
156. Kirjavainen, P. V., A. C. Ouwehand, E. Isolauri, and S. J. Salminen. **1998**. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters* 167:185-189.
157. Klaenhammer, T. R. **1988**. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70:337-349.
158. Klaenhammer, T. R. **1993**. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12:39-85.
159. Klaenhammer, T. R. **1993**. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12:39-85.
160. Kleerebezem, M. **2004**. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides* 25:1405-1414.
161. Kleerebezem, M. and L. E. Quadri. **2001**. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: A case of multicellular behavior. *Peptides* 22:1579-1596.
162. Kleerebezem, M., J. Boekhorst, R. van Kranenburg, D. Molenaar, O. P. Kuipers, R. Leer, R. Tarchini, S. A. Peters, H. M. Sandbrink, M. W. E. J. Fiers, W. Stiekema, R. M. Klein Lankhorst, P. A. Bron, S. M. Hoffer, M. N. Nierop Groot, R. Kerkhoven, M. de Vries, B. Ursing, W. M. de Vos, and R. J. Siezen.

- 2003.** Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:1990-1995.
163. Klinman, D. M., D. Currie, I. Gursel, and D. Verthelyi. **2004.** Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunological Reviews* 199:201-216.
164. Kolars, J. C., M. D. Levitt, M. Aouji, and D. A. Savaiano. **1984.** Yogurt - an autodigesting source of lactose. *New England Journal of Medicine* 310:1-3.
165. Kotarski, S. F. and D. C. Savage. **1979.** Models for study of the specificity by which indigenous lactobacilli adhere to murine gastric epithelia. *Infection and Immunity* 26:966-975.
166. Kuipers, O. P. **1996.** Protein engineering of lantibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 69:161-170.
167. Lahtinen, S. J., M. Gueimonde, A. C. Ouwehand, J. P. Reinikainen, and S. J. Salminen. **2006.** Comparison of four methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product. *Food Microbiol* 23:571-577.
168. Lammers, K. M., P. Brigidi, B. Vitali, P. Gionchetti, F. Rizzello, E. Caramelli, D. Matteuzzi, and M. Campieri. **2003.** Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 38:165-172.
169. Larkin, T. A., L. B. Astheimer, and W. E. Price. **2007.** Dietary combination of soy with a probiotic or prebiotic food significantly reduces total and LDL cholesterol in mildly hypercholesterolaemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition* 63: 238-245.
170. Lategan, M. J., F. R. Torpy, and L. F. Gibson. **2004.** Control of saprolegniosis in the eel *Anguilla australis* Richardson, by *Aeromonas media* strain A199. *Aquaculture* 240:19-27.
171. Laukova, A., P. Guba, R. Nemcova, and Z. Vasilkova. **2003.** Reduction of *Salmonella* in gnotobiotic Japanese quails caused by the enterocin A-producing EK13 strain of *Enterococcus faecium*. *Veterinary Research Communications* 27:275-280.
172. Lauková, A., V. Stropfová, and A. Ouwehand. **2004.** Adhesion properties of enterococci to intestinal mucus of different hosts. *Veterinary Research Communications* 28:647-655.
173. Laukova, A., V. Stropfova, V. Skrivanova, Z. Volek, E. Jindrichova, and M. Marounek. **2006.** Bacteriocin-producing strain of *Enterococcus faecium* EK 13 with probiotic character and its application in the digestive tract of rabbits. *Biologia* 61:779-782.
174. Leenhouts, K., G. Buist, and J. Kok. **1999.** Anchoring of proteins to lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 76:367-376.
175. Leroy, F. and L. De Vuyst. **2004.** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology* 15:67-78.
176. Li, X. J., L. Y. Yue, X. F. Guan, and S. Y. Qiao. **2008.** The adhesion of putative probiotic lactobacilli to cultured epithelial cells and porcine intestinal mucus. *Journal of Applied Microbiology* 104:1082-1091.
177. Li, Y. Z., Y. P. Ho, S. T. Chen, T. W. Chiou, Z. S. Li, and D. Shiuan. **2009.** Proteomic comparative analysis of pathogenic strain 232 and avirulent strain J of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Biochemistry (Moscow)* 74:215-220.
178. Lievin, V., I. Peiffer, S. Hudault, F. Rochat, D. Brassart, J. R. Neeser, and A. L. Servin. **2000.** *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 47:646-652.
179. Lilly, D. M. and R. H. Stillwell. **1965.** Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147:747-748.

180. Liong, M. T. and N. P. Shah. **2005**. Bile salt deconjugation and BSH activity of five bifidobacterial strains and their cholesterol co-precipitating properties. *Food Research International* 38:135-142.
181. Lubelski, J., R. Rink, R. Khusainov, G. N. Moll, and O. P. Kuipers. **2008**. Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65:455-476.
182. Luckey T.D. and Floch M.H. **1972**. Introduction to intestinal microecology. *Am.J.Cli.Nutr.* 25:1291-1295.
183. Mack, D. R. and P. L. Blain-Nelson. **1995**. Disparate in vitro inhibition of adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* RDEC-1 by mucins isolated from various regions of the intestinal tract. *Pediatric Research* 37:75-80.
184. Maeda, K., H. Nagata, Y. Yamamoto, M. Tanaka, J. Tanaka, N. Minamino, and S. Shizukuishi. **2004**. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus oralis* functions as a coadhesin for *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae. *Infection and Immunity* 72:1341-1348.
185. Mangell, P., P. Lennernas, M. Wang, C. Olsson, S. Ahrne, G. Molin, H. Thorlacius, and B. Jeppsson. **2006**. Adhesive capability of *Lactobacillus plantarum* 299v is important for preventing bacterial translocation in endotoxemic rats. *APMIS* 114:611-618.
186. Marteau, P., B. Flourie, P. Pochart, C. Chastang, J. F. Desjeux, and J. C. Rambaud. **1990**. Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: An in vivo study in lactase-deficient humans. *British Journal of Nutrition* 64:71-79.
187. Marteau, P., P. Pochart, Y. Bouhnik, S. Zidi, I. Goderel, and J. C. Rambaud. **1992**. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* sp ingested in a fermented milk in the small intestine: A rational basis for the use of probiotics in man. *Gastroenterologie Clinique et Biologique* 16:25-28.
188. Marteau, P., P. Seksik, and R. Jian. **2002**. Probiotics and intestinal health effects: A clinical perspective. *British Journal of Nutrition* 88:S51-S57.
189. Marteau, P., P. Seksik, and F. Shanahan. **2003**. Manipulation of the bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology* 17:47-61.
190. Marteau, P. and F. Shanahan. **2003**. Basic aspects and pharmacology of probiotics: An overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology* 17:725-740.
191. Martin, J., T. Langer, R. Boteva, A. Schramel, A. L. Horwich, and F. U. Hartl. **1991**. Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a 'molten globule'-like intermediate. *Nature* 352:36-42.
192. Masuda, K. and T. Kawata. **1983**. Distribution and chemical characterization of regular arrays in the cell walls of strains of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Letters* 20:145-150.
193. McAuliffe, O., R. P. Ross, and C. Hill. **2001**. Lantibiotics: Structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews* 25:285-308.
194. McGroarty, J. A. **1994**. Cell surface appendages of lactobacilli. *FEMS Microbiology Letters* 124:405-409.
195. Meghrou, J., C. Lacroix, M. Bouksaim, G. LaPointe, and R. E. Simard. **1997**. Note: Genetic and biochemical characterization of nisin Z produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL 719. *Journal of Applied Microbiology* 83:133-138.
196. Mercenier, A., S. Pavan, and B. Pot. **2003**. Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design* 9:175-191.

197. Metschnikoff, E. **1908**. Prolongation of life. Putnam, New York.
198. Michel-Briand, Y. and C. Baysse. **2002**. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 84:499-510.
199. Michiels, J., G. Dirix, J. Vanderleyden, and C. Xi. **2001**. Processing and export of peptide pheromones and bacteriocins in Gram-negative bacteria. *Trends in Microbiology* 9:164-168.
200. Mikelsaar, M., R. Mändar, and E. Sepp. **1998**. Lactic acid microflora in the human microbial ecosystem and its development, p. 279-342. *In* Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. Marcel Dekker, New York.
201. Mimura, T., F. Rizzello, U. Helwig, G. Poggioli, S. Schreiber, I. C. Talbot, R. J. Nicholls, P. Gionchetti, M. Campieri, and M. A. Kamm. **2004**. Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut* 53:108-114.
202. Miyoshi, Y., S. Okada, T. Uchimura, and E. Satoh. **2006**. A mucus adhesion promoting protein, MapA, mediates the adhesion of *Lactobacillus reuteri* to Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 70:1622-1628.
203. Molin, G., B. Jeppsson, M. L. Johansson, S. Ahrne, S. Nobaek, M. Stahl, and S. Bengmark. **1993**. Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. *Journal of Applied Bacteriology* 74:314-323.
204. Montville, T. J. and K. Winkowski. **1997**. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria, *In* Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM, Washington, DC.
205. Moreno de LeBlanc, A., C. Matar, and G. Perdigón. **2007**. The application of probiotics in cancer. *British Journal of Nutrition* 98.
206. Moreno, M. R. F., J. J. Leisner, L. K. Tee, C. Ley, S. Radu, G. Rusul, M. Vancanneyt, and L. De Vuyst. **2002**. Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Applied Microbiology* 92:147-157.
207. Morisset, D., J. M. Berjeaud, J. Frère, M. Hickson, and Y. Héchar. **2005**. Bactériocines de bactéries lactiques, p. 113-194. *In* Bactéries lactiques et probiotiques. Lavoisier, Paris.
208. Mulders, J. W. M., I. J. Boerrigter, H. S. Rollema, R. J. Siezen, and W. M. De Vos. **1991**. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *European Journal of Biochemistry* 201:581-584.
209. Murinda, S. E., R. F. Roberts, and R. A. Wilson. **1996**. Evaluation of colicins for inhibitory activity against diarrheagenic *Escherichia coli* strains, including serotype O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology* 62:3196-3202.
210. Navarre, W. W. and O. Schneewind. **1994**. Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* 14:115-121.
211. Navarre, W. W. and O. Schneewind. **1999**. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63:174-229.
212. Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Havarstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink, and H. Holo. **1996**. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70:113-128.
213. Nilsen, T., I. F. Nes, and H. Holo. **2003**. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and Environmental Microbiology* 69:2975-2984.

214. Noriega, L., I. Cuevas, A. Margolles, and C. G. los Reyes-Gavilán. **2006**. Deconjugation and bile salts hydrolase activity by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile. *International Dairy Journal* 16:850-855.
215. Ocaña, V. S., A. A. P. Ruiz Holgado, and M. Nader. **1999**. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by a vaginal *Lactobacillus salivarius* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 65:5631-5635.
216. Otto, M., A. Peschel, and F. tz. **1998**. Producer self-protection against the lantibiotic epidermin by the ABC transporter EpiFEG of *Staphylococcus epidermidis* Tu 3298. *FEMS Microbiology Letters* 166:203-211.
217. Ouwehand, A. C., S. Grasten, P. Niemi, H. Mykkanen, and S. Salminen. **2000**. Wheat or rye supplemented diets do not affect faecal mucus concentration or the adhesion of probiotic microorganisms to faecal mucus. *Lett Appl Microbiol* 31:30-33.
218. Ouwehand, A. C. and S. J. Salminen. **1998**. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal* 8:749-758.
219. Ouwehand, A. C., E. M. Tuomola, S. Tolkkio, and S. Salminen. **2001**. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *International Journal of Food Microbiology* 64:119-126.
220. Ouwehand, A. C., P. Niemi, and S. J. Salminen. **1999**. The normal faecal microflora does not affect the adhesion of probiotic bacteria in vitro. *FEMS Microbiology Letters* 177:35-38.
221. Parker, R. B. **1974**. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health* 29:4-8.
222. Perdigón, G., J. C. Valdez, and M. Rachid. **1998**. Antitumour activity of yogurt: Study of possible immune mechanisms. *Journal of Dairy Research* 65:129-138.
223. Pereira, D. I. A. and G. R. Gibson. **2002**. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 37:259-281.
224. Pereira, D. I. A. and G. R. Gibson. **2002**. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology* 68:4689-4693.
225. Peschel, A. and F. tz. **1996**. Analysis of the *Staphylococcus epidermidis* genes epiF, -E, and -G involved in epidermin immunity. *Journal of Bacteriology* 178:531-536.
226. Pfeiler, E. A. and T. R. Klaenhammer. **2007**. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology* 15:546-553.
227. Pochart, P., P. Marteau, Y. Bouhnik, I. Goderel, P. Bourlioux, and J. C. Rambaud. **1992**. Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. *American Journal of Clinical Nutrition* 55:78-80.
228. Pons, A. M., I. Lanneluc, G. Cottenceau, and S. Sable. **2002**. New developments in non-post translationally modified microcins. *Biochimie* 84:531-537.
229. Porcella, S. F., R. J. Belland, and R. C. Judd. **1996**. Identification of an EF-Tu protein that is periplasm-associated and processed in *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbiology (Reading, United Kingdom)* 142:2481-2489.
230. Portrait, V., S. Gendron-Gaillard, G. Cottenceau, and A. M. Pons. **1999**. Inhibition of pathogenic *Salmonella enteritidis* growth mediated by *Escherichia coli* microcin J25 producing strains. *Canadian Journal of Microbiology* 45:988-994.

231. Prescott, S. L. and B. Björkstén. **2007**. Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120:255-262.
232. Pretzer, G., J. Snel, D. Molenaar, A. Wiersma, P. A. Bron, J. Lambert, W. M. De Vos, R. Van Der Meer, M. A. Smits, and M. Kleerebezem. **2005**. Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology* 187:6128-6136.
233. Pruzzo, C., R. Tarsi, M. Marile, C. Signoretto, M. Zampini, R. R. Colwell, and P. Canepari. **2002**. In vitro adhesion to human cells by viable but nonculturable *Enterococcus faecalis*. *Current Microbiology* 45:105-110.
234. Quadri, L. E., M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas, and M. E. Stiles. **1994**. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *Journal of Biological Chemistry* 269:12204-12211.
235. Rafter, J. **2002**. Lactic acid bacteria and cancer: Mechanistic perspective. *British Journal of Nutrition* 88:S89-S94.
236. Ranford, J. C., A. R. M. Coates, and B. Henderson. **2000**. Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. *Expert Reviews in Molecular Medicine [online computer file]* No.
237. Richard, C., R. Canon, K. Naghmouchi, D. Bertrand, H. Prevost, and D. Drider. **2005**. Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiology* 23:175-183.
238. Ridlon, J. M., D. J. Kang, and P. B. Hylemon. **2006**. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of Lipid Research* 47:241-259.
239. Riedel, C. U., F. Foata, D. R. Goldstein, S. Blum, and B. J. Eikmanns. **2006**. Interaction of bifidobacteria with Caco-2 cells-adhesion and impact on expression profiles. *International Journal of Food Microbiology* 110:62-68.
240. Rigotherier, M. C., J. Maccario, P. N. Vuong, and P. Gayral. **1990**. Effects of *Saccharomyces boulardii* yeast on trophozoites of *Entamoeba histolytica* in vitro and on cecal amebiasis in the young rat. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 65:51-60.
241. Riley, M. A. **1998**. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. 32, 255-278.
242. Riley, M. A., C. M. Goldstone, J. E. Wertz, and D. Gordon. **2003**. A phylogenetic approach to assessing the targets of microbial warfare. *Journal of Evolutionary Biology* 16:690-697.
243. Riley, M. A. and D. M. Gordon. **1992**. A survey of Col plasmids in natural isolates of *Escherichia coli* and an investigation into the stability of Col-plasmid lineages. *Journal of General Microbiology* 138:1345-1352.
244. Riley, M. A. and Wertz, J. E. **2002**. Bacteriocins: Evolution, ecology, and application. 56, 117-137.
245. Rincé, A., A. Dufour, P. Uguen, J. P. Le Pennec, and D. Haras. **1997**. Characterization of the lacticin 481 operon: The *Lactococcus lactis* genes lctF, lctE, and lctG encode a putative ABC transporter involved in bacteriocin immunity. *Applied and Environmental Microbiology* 63:4252-4260.
246. Rodriguez, J. M. **1996**. Review: Antimicrobial spectrum, structure, properties and mode of action of nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. *Food Science and Technology International* 2:61-68.
247. Rodríguez, J. M., M. I. Martínez, and J. Kok. **2002**. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42:91-121.

248. Rogers, L. A. **1928**. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Bacteriology* 16:321-325.
249. Rojas, M., F. Ascencio, and P. L. Conway. **2002**. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Applied and Environmental Microbiology* 68:2330-2336.
250. Rollema, H. S., J. W. Metzger, P. Both, O. P. Kuipers, and R. J. Siezen. **1996**. Structure and Biological Activity of Chemically Modified Nisin A Species. *European Journal of Biochemistry* 241:716-722.
251. Roos, S. and H. Jonsson. **2002**. A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology (Reading, United Kingdom)* 148:433-442.
252. Ruas-Madiedo, P., M. Gueimonde, A. Margolles, C. De Los Reyes-Gavilan, and S. Salminen. **2006**. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *Journal of Food Protection* 69:2011-2015.
253. Ruiz, L., Y. Couto, B. Sánchez, C. G. los Reyes-Gavilán, J. C. Sanchez, and A. Margolles. **2009**. The cell-envelope proteome of *Bifidobacterium longum* in an in vitro bile environment. *Microbiology (Reading, England)* 155:957-967.
254. Ruiz-Ponte, C., J. F. Samain, J. L. Sánchez, and J. L. Nicolas. **1999**. The benefit of a *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae. *Marine Biotechnology* 1:52-59.
255. Sahl, H. G., R. W. Jack, and G. Bierbaum. **1995**. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *European Journal of Biochemistry* 230:827-853.
256. Saïd Ennahar. **1995**. Elimination de *Listeria Monocytogenes* dans les fromages a pate molle. *Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg*.
257. Sanchez, B., P. Bressollier, and M. C. Urdaci. **2008**. Exported proteins in probiotic bacteria: Adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 54:1-17.
258. Sanchez, J., D. B. Diep, C. Herranz, I. F. Nes, L. M. Cintas, and P. E. Hernandez. **2007**. Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hircin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *FEMS Microbiology Letters* 270:227-236.
259. Sanders, M. E. and J. Huis In't Veld. **1999**. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: Microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 76:293-315.
260. Sarker, S. A., S. Sultana, G. J. Fuchs, N. H. Alam, T. Azim, H. Bruhnsow, and L. Hammarstrom. **2005**. *Lactobacillus paracasei* strain ST11 has no effect on rotavirus but ameliorates the outcome of nonrotavirus diarrhea in children from Bangladesh. *Pediatrics* 116:e221-e228.
261. Schamberger, G. P., R. L. Phillips, J. L. Jacobs, and F. Diez-Gonzalez. **2004**. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in cattle by addition of colicin E7-producing *E. coli* to feed. *Applied and Environmental Microbiology* 70:6053-6060.
262. Schaumburg, J., O. Diekmann, P. Hagendorff, S. Bergmann, M. Rohde, S. Hammerschmidt, L. Jaensch, J. Wehland, and U. Kaerst. **2004**. The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. *Proteomics* 4:2991-3006.
263. Schell, M. A., M. Karmirantzou, B. Snel, D. Vilanova, B. Berger, G. Pessi, M. C. Zwahlen, F. Desiere, P. Bork, M. Delley, R. D. Pridmore, and F. Arigoni. **2002**. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:14422-14427.

264. Schiffrin, E. J., D. Brassart, A. L. Servin, F. Rochat, and A. Donnet-Hughes. **1997**. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *American Journal of Clinical Nutrition* 66:515-520.
265. Schultz, M., C. Veltkamp, L. A. Dieleman, W. B. Grenther, P. B. Wyrick, S. L. Tonkonogy, and R. Balfour Sartor. **2002**. *Lactobacillus plantarum* 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflammatory Bowel Diseases* 8:71-80.
266. Seifert, K. N., W. P. McArthur, A. S. Bleiweis, and L. J. Brady. **2003**. Characterization of group B streptococcal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Surface localization, enzymatic activity, and protein-protein interactions. *Canadian Journal of Microbiology* 49:350-356.
267. Servin, A. L. and M. H. Coconnier. **2003**. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research, Clinical Gastroenterology* 17:741-754.
268. Siciliano, R. A., G. Cacace, M. F. Mazzeo, L. Morelli, M. Elli, M. Rossi, and A. Malorni. **2008**. Proteomic investigation of the aggregation phenomenon in *Lactobacillus crispatus*. *Biochimica et Biophysica Acta, Proteins and Proteomics* 1784:335-342.
269. Sillanpaa, J., B. Martinez, J. Antikainen, T. Toba, N. Kalkkinen, S. Tankka, K. Lounatmaa, J. Keranen, M. Hook, B. Westerlund-Wikstrom, P. H. Pouwels, and T. K. Korhonen. **2000**. Characterization of the collagen-binding S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus*. *Journal of Bacteriology* 182:6440-6450.
270. Simon, G. L. and S. L. Gorbach. **1987**. Intestinal flora and gastro-intestinal function, p. 1729-1747. In L. R. Johnson (ed.), *Physiology of the gastro-intestinal tract Volume 2*. Raven Press, New York.
271. Sleytr, U. B. and T. J. Beveridge. **1999**. Bacterial S-layers. *Trends in Microbiology* 7:253-260.
272. Sojar, H. T. and R. J. Genco. **2005**. Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of epithelial cells as a second molecule that binds to *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 45:25-30.
273. Speelmans, G., Vriesema, A. J., and Oolhorst, S. D. E. **2006**. Pediocin-producing pediococci. [20060165661]. USA.
274. Sridevi, N., P. Vishwe, and A. Prabhune. **2009**. Hypocholesteremic effect of bile salt hydrolase from *Lactobacillus buchneri* ATCC 4005. *Food Research International* 42:516-520.
275. Stein, T., S. Heinzmann, S. sterhus, S. Borchert, and K. D. Entian. **2005**. Expression and functional analysis of the subtilin immunity genes spaIFEG in the subtilin-sensitive host *Bacillus subtilis* MO1099. *Journal of Bacteriology* 187:822-828.
276. Stevens, K. A., B. W. Sheldon, N. A. Klapes, and T. R. Klaenhammer. **1991**. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram- negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 57:3613-3615.
277. Su, P., A. Henriksson, and H. Mitchell. **2007**. Survival and retention of the probiotic *Lactobacillus casei* LAFTI-« L26 in the gastrointestinal tract of the mouse. *Letters in Applied Microbiology* 44:120-125.
278. Szajewska, H. and J. Z. Mrukowicz. **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. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 33:S17-S25.
279. Szymanski, H., J. Pejcz, M. Jawien, A. Chmielarczyk, M. Strus, and P. B. Heczko. **2006**. Treatment of acute infectious diarrhoea in infants and children with a mixture of three *Lactobacillus rhamnosus* strains - A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 23:247-253.

280. Taoka, Y., H. Maeda, J. Y. Jo, M. J. Jeon, S. C. Bai, W. J. Lee, K. Yuge, and S. Koshio. **2006**. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fisheries Science* 72:310-321.
281. Taylor, G. R. J. and C. M. Williams. **1998**. Effects of probiotics and prebiotics on blood lipids. *British Journal of Nutrition* 80:S225-S230.
282. Teitelbaum, J. E. and Walker, W. A. **2002**. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. 22, 107-138.
283. Tomita, H., S. Fujimoto, K. Tanimoto, and Y. Ike. **1996**. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pY117. *Journal of Bacteriology* 178:3585-3593.
284. Ton-That, H., L. A. Marraffini, and O. Schneewind. **2004**. Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1694:269-278.
285. Tuomola, E. M., A. C. Ouwehand, and S. J. Salminen. **1999**. Human ileostomy glycoproteins as a model for small intestinal mucus to investigate adhesion of probiotics. *Letters in Applied Microbiology* 28:159-163.
286. Tuomola, E. M. and S. J. Salminen. **1998**. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology* 41:45-51.
287. Twomey, D., R. P. Ross, M. Ryan, B. Meaney, and C. Hill. **2002**. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: Structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 82:165-185.
288. U.S. Food and Drug Administration. **1988**. Nisin Preparation : Affirmation of GRAS status as direct human food ingredient. 53, April 6.
289. van Belkum, M. J. and M. E. Stiles. **2000**. Nonantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria (1995 to date). *Natural Product Reports* 17:323-335.
290. Van de Guchte, M., P. Serror, C. Chervaux, T. Smokvina, S. D. Ehrlich, and E. Maguin. **2002**. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 82:187-216.
291. Van Pijkeren, J. P., C. Canchaya, K. A. Ryan, Y. Li, M. J. Claesson, B. Sheil, L. Steidler, L. O'Mahony, G. F. Fitzgerald, D. Van Sinderen, and P. W. O'Toole. **2006**. Comparative and functional analysis of sortase-dependent proteins in the predicted secretome of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Applied and Environmental Microbiology* 72:4143-4153.
292. Van't Veer, P., E. M. Van Leer, A. Rietdijk, F. J. Kok, E. G. Schouten, R. J. J. Hermus, and F. Sturmans. **1991**. Combination of dietary factors in relation to breast-cancer occurrence. *International Journal of Cancer* 47:649-653.
293. Velez, M. P., S. C. J. De Keersmaecker, and J. Vanderleyden. **2007**. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters* 276:140-148.
294. Venema, K., M. H. R. Dost, G. Venema, and J. Kok. **1996**. Mutational analysis and chemical modification of Cys24 of lactococcin B, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. *Microbiology* 142:2825-2830.
295. Vesa, T., P. Pochart, and P. Marteau. **2000**. Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 14:823-828.
296. Vidon, N., B. Huchet, and J. C. Rambaud. **1986**. Effect of *S. boulardii* on water and sodium secretion induced by cholera toxin. *Gastroenterologie Clinique et Biologique* 10:13-16.

297. Von Buenau, R., L. Jaekel, E. Schubotz, S. Schwarz, T. Stroff, and M. Krueger. **2005**. *Escherichia coli* strain Nissle 1917: Significant reduction of neonatal calf diarrhea. *Journal of Dairy Science* 88:317-323.
298. Walsh, M. C., G. E. Gardiner, O. M. Hart, P. G. Lawlor, M. Daly, B. Lynch, B. T. Richert, S. Radcliffe, L. Giblin, C. Hill, G. F. Fitzgerald, C. Stanton, and P. Ross. **2008**. Predominance of a bacteriocin-producing *Lactobacillus salivarius* component of a five-strain probiotic in the porcine ileum and effects on host immune phenotype. *FEMS Microbiology Ecology* 64:317-327.
299. Westermeier, R. and T. Naven. **2002**. Proteomics in practice: a manual of proteome analysis. Wiley-VCH Verlag-GmbH, Weinheim.
300. Wiedemann, I., E. Breukink, C. Van Kraaij, O. P. Kuipers, G. Bierbaum, B. De Kruijff, and H. G. Sahl. **2001**. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *Journal of Biological Chemistry* 276:1772-1779.
301. Xiao, J. Z., S. Kondo, N. Yanagisawa, N. Takahashi, T. Odamaki, N. Iwabuchi, K. Miyaji, K. Iwatsuki, H. Toqashi, K. Enomoto, and T. Enomoto. **2006**. Probiotics in the treatment of Japanese cedar pollinosis: a double-blind placebo-controlled trial. *Clinical and Experimental Allergy* 36:1425-1435.
302. Yin, H., K. Killeen, R. Brennen, D. Sobek, M. Werlich, and T. Van De Goor. **2005**. Microfluidic chip for peptide analysis with an integrated HPLC column, sample enrichment column, and nanoelectrospray tip. *Analytical Chemistry* 77:527-533.
303. Zárate, G. and M. E. Nader-Macias. **2006**. Viability and biological properties of probiotic vaginal lactobacilli after lyophilization and refrigerated storage into gelatin capsules. *Process Biochemistry* 41:1779-1785.
304. Zhang, M., X. Hang, X. Fan, D. Li, and H. Yang. **2008**. Characterization and selection of *Lactobacillus* strains for their effect on bile tolerance, taurocholate deconjugation and cholesterol removal. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:7-14.
305. Zocco, M. A., L. Z. Dal Verme, F. Cremonini, A. C. Piscaglia, E. C. Nista, M. Candelli, M. Novi, D. Rigante, I. A. Cazzato, V. Ojetti, A. Armuzzi, G. Gasbarrini, and A. Gasbarrini. **2006**. Efficacy of *Lactobacillus* GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 23:1567-1574.