



Thèse

Thèse .

Présentée par

Erwann HAMON

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Spécialité

Chimie Analytique

Utilisation de l'analyse protéomique dans la caractérisation des bactéries d'intérêt probiotique

Soutenue publiquement le 09 décembre 2011 devant la commission d'examen

**Dr. S. ENNAHAR
Dr. M-Ch. CHAMPOMIER-VERGES
Pr. B. LE BIZEC
Pr. M-CI. LETT
Pr. E. MARCHIONI
Dr. D. AOUDE-WERNER**

**Directeur de thèse
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Examinateur
Examinateur
Examinateur**

**Institut Pluridisciplinaire
Hubert Curien**

Département des Sciences
Analytiques
Equipe de Chimie Analytique des
Molécules Bioactives

UMR 7178

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe de Chimie Analytique des Molécules Bio-Actives (CAMBA), UMR7178, Département Sciences Analytiques (DSA) de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), en partenariat, par une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE), avec le Centre de Ressources Technologiques (CRT) Aériel. Ce travail a donné lieu aux publications et communications suivantes :

Publications

Hamon E., Horvatovich P., Bisch M., Bringel F., Marchioni E., Aoudé-Werner D., Ennahar S. **Investigation of biomarkers of bile tolerance in *Lactobacillus casei* using comparative proteomics**. 2012. *Journal of Proteome Research*, 11:109-118.

Hamon E., Horvatovich P., Izquierdo E., Bringel F., Marchioni E., Aoudé-Werner D., Ennahar S. **Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance**. 2011. *BMC Microbiology*, 11: 63.

Communications à des congrès

Communication par affiche :

Hamon E., Horvatovich P., Izquierdo E., Marchioni E., Aoudé-Werner D., Ennahar S. **2D electrophoresis and MS analysis of key proteins in bile tolerance of *Lactobacillus plantarum*: the hunt for bacterial biomarkers for probiotics**. International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics, Kosice (Slovaquie), 15-17 juin 2010.

Communication orale :

Hamon E., Izquierdo E., Horvatovich P., Marchioni E., Aoudé-Werner D., Sanz Y., Ennahar S. **Comparative proteomics for the preliminary selection of probiotic bacteria**. Congrès Goût-Nutrition-Santé, Dijon (France), 18-20 mars 2009.

Remerciements

Ce projet est le fruit d'une longue collaboration entre le laboratoire de Chimie Analytique des Molécules Bio-Actives et le Centre de Ressources Technologiques Aérial. Il s'inscrit dans le cadre de l'Unité Mixte Technologique 06.3 « Méthodes Analytiques et Nutrimateurs », labellisée par le Ministère de l'Agriculture. Merci à Eric Marchioni et Alain Strasser de m'avoir accueilli dans leurs structures respectives et donné les moyens techniques et économiques de réaliser ce travail. Merci également à Saïd Ennahar d'avoir dirigé cette thèse et à Dalal Aoudé-Werner de l'avoir suivie pour Aérial.

Je tiens à remercier Mesdames Marie-Claire Lett et Marie-Christine Champomier-Vergès ainsi que Monsieur Bruno Le Bizec d'avoir accepté de juger ce travail.

Un grand merci à l'ensemble du personnel (permanent ou de passage) de mes deux structures d'accueil, pour m'avoir épaulé dans ce projet.

Je remercie tout particulièrement Esther Izquierdo, de m'avoir ouvert la voie et initié au monde de la protéomique, Peter Horvatovich d'avoir effectué les analyses LC-MS/MS et d'être toujours disponible pour répondre à mes questions, Françoise Bringel pour sa gentillesse et ses précieux conseils, Magali Bisch pour sa collaboration à ces travaux.

Enfin, merci à Julie de m'avoir soutenu au quotidien et à notre fille Margaux d'avoir égayé ma dernière année de thèse : vous êtes mes deux rayons de soleil.

Liste des abréviations

2D : Bidimensionnel	IVET : <i>In Vivo</i> Expression Technology
ABC : ATP Binding Cassette	J.-C. : Jésus Christ
ADN : Acide Désoxyribonucléique	JCM : Japan Collection of Microorganisms
ADNc : ADN complémentaire	LC : Liquid Chromatography
ADP : Adénosine Diphosphate	MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
ARN : Acide Ribonucléique	MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
ARNm : ARN messenger	MRS : De Man, Rogosa, Sharpe
ATCC : American Type Culture Collection	MS : Mass Spectrometry
ATP : Adénosine Triphosphate	NCBI :National Center for Biotechnology Information
ATPase : ATP synthétase	NCIMB : National Collection of Industrial, food and Marine Bacteria
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool	ORF : Open Reading Frame
CECT : Coleccion Española de Cultivos Tipo	OMSSA : Open Mass Spectrometry Search Algorithm
CFA : Cyclopropane Fatty acid	PAGE : Polyacrylamide Gel Electrophoresis
CGH : Comparative Genomic Hybridization	PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells
cFDA : Carboxyfluoresceine diacetate	PBP : Penicillin-Binding Protein
CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse	PCR : Polymerase Chain Reaction
DD : Differential Display	Pfam : Protein families
Da : Dalton	pI : Point Isoélectrique
DCPA : Double Aveugle Contre Placebo	PMF : Proton Motive Force
DIGE : Difference Gel Electrophoresis	PRR : Pattern Recognition Receptor
DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen	PSD : Protéine Sortase-Dépendante
ECEH : <i>Escherichia coli</i> enterohémorragique	QS : Quorum Sensing
EFSA : European Food Safety Agency	R-IVET : Recombination-based IVET
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	RT-PCR :Reverse Transcriptase PCR
ESI : Electrospray Ionisation	SCOTS : Selective Capture Of Transcribed Sequences
FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations	SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
FOS : Fructo-oligosaccharides	SRDC : Système de Régulation à Deux Composants
GOS : Galacto-oligosaccharides	STM : Signature-Tagged Mutagenesis
GRAS : Generally Recognized As Safe	TLR : Toll-like Receptor
HoPS : Homopolysaccharide	TOF : Time of Flight
HPLC : High Performance Liquid Chromatography	UFC : Unité Formant Colonie
HSB : Hydrolase de Sels Biliaires	WHO : World Health Organization
IEF : Isoelectrofocalisation	
IL : Interleukine	

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	11
CHAPITRE 1 : CONTEXTE DE L'ETUDE	17
1. LES TESTS <i>IN VITRO</i> COMME OUTILS DE CARACTERISATION PRELIMINAIRE	18
1.1 PROCESSUS DE SELECTION DES PROBIOTIQUES	18
1.2 TESTS DE RESISTANCE AUX CONDITIONS GASTRO-INTESTINALES	21
1.3 TESTS D'ADHESION	23
1.4 TESTS DE L'ACTIVITE HYPOCHOLESTEROLEMIANTE	26
1.5 TESTS D'IMMUNOMODULATION	27
2. STRATEGIES POUR LA CARACTERISATION MOLECULAIRE DES PROBIOTIQUES	29
2.1 ANALYSE GENOMIQUE COMPARATIVE	29
2.2 ETUDES FONCTIONNELLES DE L'EXPRESSION DES GENES	33
2.2.1 <i>Analyse du transcriptome par puces à ADN</i>	33
2.2.2 <i>La DD RT-PCR</i>	34
2.2.3 <i>Les technologies IVET et R-IVET</i>	35
2.3 ANALYSE PROTEOMIQUE	36
2.3.1 <i>Aspects conceptuels</i>	36
2.3.2 <i>Considérations techniques de la protéomique d'expression</i>	38
2.3.3 <i>Application à l'étude des probiotiques</i>	39
2.4 INACTIVATION DE GENES	40
3. GENES ET MOLECULES IMPLIQUES DANS LES PROPRIETES ET ACTIVITES DES PROBIOTIQUES	42
3.1 SURVIE ET MAINTIEN DES PROBIOTIQUES CHEZ L'HOTE : LES FACTEURS D'ADAPTATION	43
3.1.1 <i>Mécanismes de résistance aux stress</i>	43
3.1.2 <i>Adaptation à l'environnement nutritionnel de l'hôte</i>	48
3.1.3 <i>Facteurs d'adhésion</i>	51
3.2 EFFETS POSITIFS SUR LA SANTE : LES FACTEURS PROBIOTIQUES	55
3.2.1 <i>Effets anti-pathogènes</i>	55
3.2.2 <i>Effet anti-apoptopique</i>	59
3.2.3 <i>Immunomodulation</i>	60
4. POSITIONNEMENT DES TRAVAUX VIS-A-VIS DE L'ETAT DE L'ART	63
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	65
1. CARACTERISATION PRELIMINAIRE DES SOUCHES UTILISEES	66

1.1	IDENTIFICATION ET CULTURE	66
1.2	RESISTANCE A L'ACIDITE	67
1.3	TOLERANCE A LA BILE	68
1.4	ADHESION AU MUCUS	68
1.5	REDUCTION DU CHOLESTEROL	69
2.	ANALYSE PROTEOMIQUE	71
2.1	EXTRACTION DES PROTEINES	71
2.1.1	<i>Protéines totales</i>	71
2.1.2	<i>Protéines de la paroi cellulaire</i>	72
2.1.3	<i>Dosage des protéines</i>	73
2.2	SEPARATION DES EXTRAITS PAR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE	74
2.2.1	<i>Première dimension : focalisation électrique</i>	74
2.2.2	<i>Deuxième dimension : SDS-PAGE</i>	75
2.3	ANALYSE DES GELS	76
2.4	DIGESTION TRYPSIQUE DES PROTEINES SELECTIONNEES	76
2.5	ANALYSE DES ECHANTILLONS PAR LC-MS/MS	77
2.6	IDENTIFICATION DES PROTEINES	78
3.	ELEMENTS STATISTIQUES	80
3.1	COMPARAISON DE MOYENNES	80
3.1.1	<i>Classement des souches dans les tests in vitro</i>	80
3.1.2	<i>Différences d'expression des spots</i>	80
3.2	CLASSIFICATION HIERARCHIQUE	81
3.3	TEST DE CORRELATION DE SPEARMAN	82
3.4	ANALYSE FACTORIELLE DISCRIMINANTE	83
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION		85
1.	CONDITIONS D'APPLICATION DE L'APPROCHE	86
1.1	PRINCIPE DE L'APPROCHE	86
1.2	MODELES BACTERIENS	88
1.3	CARACTERES ETUDIES	91
1.4	EXTRACTION DES PROTEINES	92
1.4.1	<i>Protéines totales</i>	92
1.4.2	<i>Protéines de surface</i>	94
1.5	SEPARATION ELECTROPHORETIQUE	96
1.6	ANALYSE D'IMAGE ET IDENTIFICATION DES PROTEINES D'INTERET	99
1.7	CONCLUSION	101

2. RESISTANCE A L'ACIDITE	103
2.1 EVALUATION <i>IN VITRO</i> DE LA SURVIE DES SOUCHES AUX CONDITIONS GASTRIQUES	103
2.2 ANALYSE PROTEOMIQUE COMPARATIVE DE <i>L. CASEI</i>	106
2.3 ANALYSE PROTEOMIQUE COMPARATIVE DE <i>L. PLANTARUM</i>	112
2.4 CONCLUSION	119
3. TOLERANCE A LA BILE	120
3.1 EVALUATION <i>IN VITRO</i> DE LA TOLERANCE DES SOUCHES A LA BILE	120
3.2 ANALYSE PROTEOMIQUE COMPARATIVE DE <i>L. CASEI</i>	122
3.3 ANALYSE PROTEOMIQUE COMPARATIVE DE <i>L. PLANTARUM</i>	129
3.4 CONCLUSION	135
4. CAPACITE D'ADHESION	136
4.1 ADHESION DES BACTERIES A LA MUCINE	137
4.2 ANALYSE PROTEOMIQUE COMPARATIVE DE <i>L. CASEI</i>	139
4.3 ANALYSE PROTEOMIQUE COMPARATIVE DE <i>L. PLANTARUM</i>	143
4.4 CONCLUSION	146
5. ACTIVITE HYPOCHOLESTEROLEMIANTE	147
5.1 ACITIVITE HYPOCHOLESTEROLEMIANTE DE SOUCHES DE <i>L. PLANTARUM</i>	147
5.2 ANALYSE PROTEOMIQUE COMPARATIVE	149
5.3 ANALYSES COMPLEMENTAIRES	151
5.4 CONCLUSION	153
6. ACTIVITE IMMUNOMODULATRICE	154
6.1 ACTIVITE IMMUNOMODULATRICE DE SOUCHES DE <i>L. CASEI</i> .	154
6.2 ANALYSE PROTEOMIQUE COMPARATIVE	155
6.3 CONCLUSION	157
CONCLUSION GENERALE	159
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	165
PUBLICATION 1	189
PUBLICATION 2	203
ANNEXES	215

INTRODUCTION

GENERALE

« Que ton aliment soit ta première médecine » (Hippocrate, 460-356 avant J.-C.). L'idée selon laquelle l'alimentation est un facteur majeur de santé n'est, en soi, pas nouvelle (219). Depuis l'Antiquité, les sociétés de différentes cultures ont construit des systèmes diététiques, c'est-à-dire édicté des recommandations alimentaires sous forme de prescriptions et d'interdits, censés maintenir une bonne santé ou guérir un trouble physique ou mental particulier. Par ailleurs, d'autres aspects de l'alimentation étaient tout aussi présents, au-delà de la fonction purement nutritive de l'acte alimentaire : le plaisir gustatif, la dimension sociale de la commensalité, ou encore les composantes symboliques de l'aliment (100).

Depuis quelques années cependant, la dimension santé de l'alimentation semble avoir pris une importance nouvelle, et ce au détriment des autres rôles qui lui sont prêtées (258). Ce phénomène résulte de la convergence de plusieurs facteurs : (i) l'augmentation de la fréquence de nombreuses maladies chroniques ; (ii) l'explosion des dépenses publiques et privées de santé liées à ces dernières, ainsi qu'au vieillissement des populations des pays industrialisés (241) ; (iii) les résultats de la recherche qui montrent un lien de plus en plus évident entre le mode de vie, en particulier l'alimentation, et l'incidence des maladies chroniques (48), et (iv) l'évolution du comportement des individus, conséquence des messages des pouvoirs publics encourageant les pratiques de prévention et soulignant l'importance de la nutrition comme facteur de santé (207). Dans ce contexte, l'argument santé est apparu comme une opportunité stratégique pour les industriels de l'agro-alimentaire. Ceci s'est traduit par l'émergence d'une nouvelle catégorie de produits alimentaires : les aliments fonctionnels.

Il n'existe pas de définition simple et universelle de l'aliment fonctionnel. Toutefois, l'énoncé le plus communément utilisé et cité au niveau européen est celui du rapport de consensus issu de différentes réunions d'experts en nutrition, promues par l'Union Européenne à la fin des années 1990. Ce dernier précise : « un aliment peut être qualifié de fonctionnel lorsqu'il a été clairement démontré qu'il affecte avantageusement une ou plusieurs fonctions cibles de l'organisme au-delà de ce qui peut-être attendu des effets d'une alimentation adéquate et d'une manière telle qu'il améliore l'état de bien-être ou réduit le risque d'une maladie. Cet aliment fonctionnel doit rester un aliment et la démonstration de son effet doit être faite pour des quantités qui peuvent être consommées dans l'alimentation habituelle. Il ne peut s'agir ni d'une pilule ni d'une gélule. » (84). Selon cette définition, l'aliment fonctionnel serait donc avant tout un concept, davantage centré sur les fonctions à moduler que sur les produits à développer. Ces fonctions concernent, par ordre décroissant de

popularité, les systèmes digestif, cardio-vasculaire, immunitaire, nerveux et osseux. Parmi les ingrédients revendiquant traditionnellement des allégations fonctionnelles figurent les probiotiques, les acides gras oméga 3 et 6, les acides gras polyinsaturés à longue chaîne, les phytostérols et les antioxydants (267).

A l'évidence, les probiotiques occupent une place singulière dans ce paysage. Définis comme « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte » (98), ils se distinguent intrinsèquement des autres ingrédients fonctionnels par leur nature animée. De plus, la diversité des propriétés prophylactiques et thérapeutiques qui leur sont attribuées les rend particulièrement attractifs pour bon nombre d'applications alimentaires à visée fonctionnelle (92, 312). C'est pourquoi depuis quelques années, ils font l'objet d'un engouement remarquable de la part des consommateurs, contribuant fortement au développement du marché des aliments fonctionnels dont les prévisions annuelles de croissance sont estimées à 13% pour la période 2009-2014 (161). Si les aliments fermentés, en particulier laitiers, restent les supports privilégiés pour leur incorporation, d'autres matrices alimentaires, telles les boissons, le chocolat, les crèmes glacées et les biscuits, sont depuis peu également utilisées.

L'absence d'un cadre réglementaire clair vis-à-vis des probiotiques pourrait néanmoins compromettre ces perspectives socio-économiques prometteuses. Ainsi en Europe, les probiotiques utilisés en alimentation humaine ne relèvent d'aucune réglementation spécifique, sauf si les produits en question sont considérés comme de nouveaux aliments. Seules les allégations santé y afférant sont régies depuis peu par la directive 1924/2006 qui vise à établir une liste positive d'allégations autorisées par l'Union Européenne sur proposition de l'EFSA, l'Agence Européenne de Sécurité des Aliments (96). Or, à ce jour, toutes les demandes examinées d'allégations santé concernant les probiotiques et relatives aux articles 13.1 (fonctions générales), 13.5 (fonctions émergentes à enjeux de propriété intellectuelle) et 14 (allégations ciblant les enfants et/ou la réduction de pathologies) ont été rejetées faute de preuves scientifiques suffisamment tangibles. Celles-ci doivent notamment s'appuyer sur des études cliniques particulièrement onéreuses. Malgré l'établissement de telles preuves pour un certain nombre de souches probiotiques (339), les produits alimentaires commercialisés ne semblent pas répondre pleinement aux niveaux d'exigence fixés par l'EFSA.

Ces difficultés montrent l'importance d'une documentation sans faille des demandes d'allégation, non seulement sur la base de données cliniques et épidémiologiques concluantes,

mais aussi d'après des éléments mécanistiques précis, pierre angulaire du faisceau de preuves nécessaire à la justification des effets santé (123). En amont, il s'agit donc de développer des outils analytiques fiables permettant, d'une part, la sélection préliminaire des souches les plus intéressantes en vue des essais cliniques, et d'autre part, la mise en évidence des mécanismes qui sous-tendent les activités probiotiques. De tels outils pourraient à la fois servir à l'élaboration d'une réglementation propre aux probiotiques et contribuer, à travers les allégations fonctionnelles, à la mise en œuvre d'actions ciblées de santé publique, tout en favorisant l'essor d'un marché en devenir.

La démonstration d'effet sur la santé doit reposer sur des marqueurs validés (ou biomarqueurs), variables mesurables capables de rendre compte de l'amélioration d'une fonction ou de la diminution du risque d'une maladie (266). Aussi, le choix de biomarqueurs est déterminant pour évaluer l'activité des probiotiques dans les études cliniques. A ce titre, plus les connaissances mécanistiques du processus physiopathologique seront avancées, plus pertinents seront les biomarqueurs choisis et plus efficace sera leur utilisation. L'acquisition de telles connaissances implique à la fois des recherches médicales poussées chez l'homme, des investigations scientifiques approfondies au niveau des bactéries, et l'analyse globale des interactions bactéries-hôte.

Avec l'avènement des techniques de séquençage à haut débit, de nouvelles technologies visant à étudier les organismes cellulaires dans leur globalité sont récemment apparues. Regroupées sous le terme générique de « génomique fonctionnelle », elles procèdent à l'analyse éponyme des séquences d'ADN et de leurs produits. Cette approche holistique de la biologie cellulaire inclut : la *transcriptomique*, qui examine le niveau d'expression des gènes ; la *protéomique*, qui étudie l'état et le niveau d'expression des protéines ; la *métabolomique*, analyse qualitative et quantitative des métabolites ; et l'*intégromique*, résultante des trois premières approches pour une compréhension d'ensemble du système biologique étudié. A l'aube de cette « révolution génomique », des projets transnationaux ont ainsi vu le jour et s'emploient actuellement à mieux comprendre les interactions microbiote¹-hôte (321). Des travaux plus ciblés ont également permis d'appréhender certaines des bases moléculaires sous-jacentes aux activités probiotiques (171).

Une étude pionnière réalisée dans notre laboratoire a notamment mis en évidence des protéines clés impliquées dans l'adhésion de *Lactobacillus plantarum* aux glycoprotéines du

¹ Ensemble des micro-organismes vivant en accord avec l'hôte

mucus (138). Il a été montré que l'analyse protéomique peut être utilisée dans l'identification de profils protéiques caractéristiques d'une propriété probiotique. À terme, de tels profils pourront servir de marqueurs bactériens de la propriété d'intérêt et être utilisés pour le criblage de nouvelles souches, répondant à la fois aux besoins des industriels et aux exigences réglementaires.

La présente étude s'inscrit dans la continuité de ces travaux exploratoires. Son objectif est de développer une méthode analytique globale, de type protéomique, capable de différencier les souches probiotiques des souches sans bénéfice santé pour l'hôte. Cette méthode est fondée sur le principe de l'identification de biomarqueurs du potentiel probiotique, traduisant la capacité des bactéries à survivre, à persister temporairement dans le tractus digestif et à exercer un ou plusieurs effets bénéfiques sur l'hôte. Dans cette perspective, le champ d'investigation défini dans le cadre de l'étude inclut trois propriétés bactériennes couramment utilisées pour sélectionner les probiotiques : la résistance à l'acidité, la tolérance à la bile, et la capacité d'adhésion ; ainsi que deux activités probiotiques notoires que sont la réduction du taux de cholestérol et l'immunomodulation. Par ailleurs, deux espèces bactériennes fréquemment incorporées dans les produits probiotiques commerciaux, *L. casei* et *L. plantarum*, servent de modèles à ces travaux. Dans un premier temps, l'étude est resituée dans son contexte scientifique, à travers la réalisation d'un état des lieux des travaux de recherche concernant la caractérisation du potentiel probiotique. Ensuite, les aspects méthodologiques relatifs à ces travaux sont présentés. Enfin, les résultats de ces recherches sont exposés et discutés au regard de l'objectif visé.

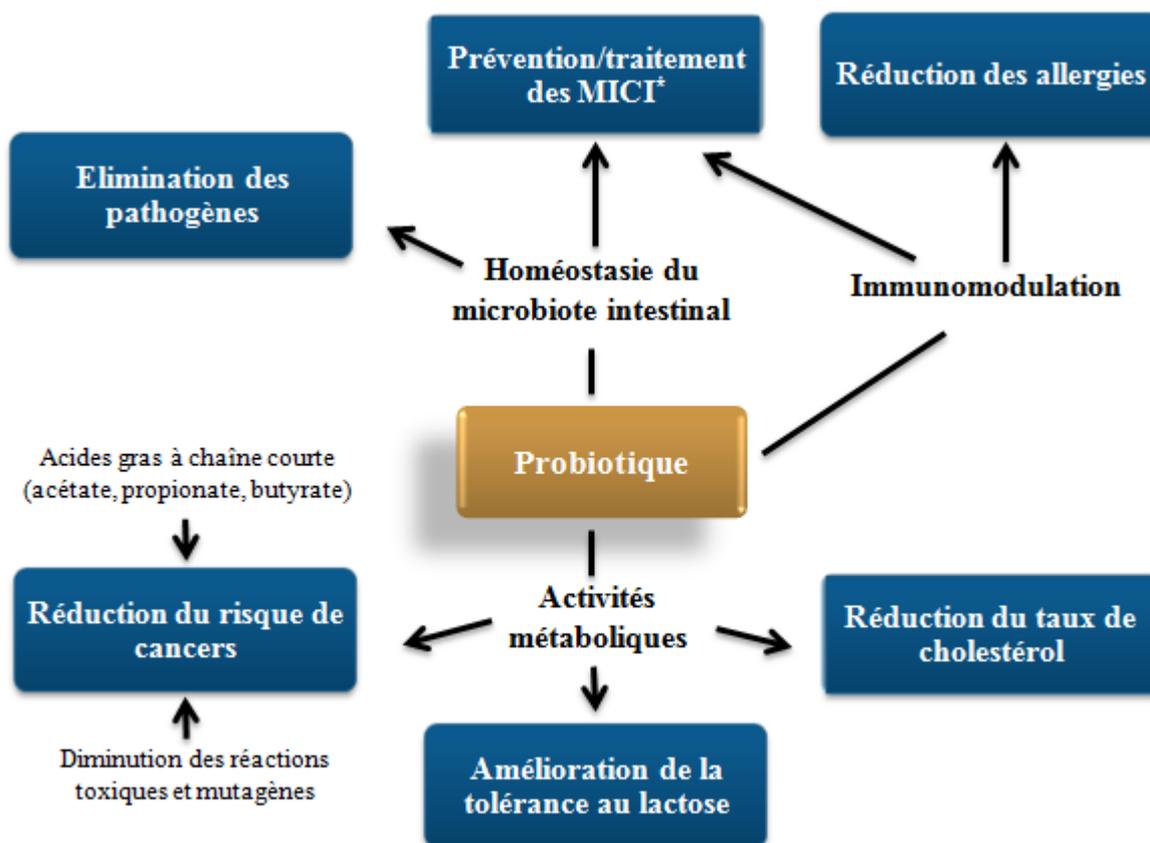
Chapitre 1 :

Contexte de l'étude

1. Les tests *in vitro* comme outils de caractérisation préliminaire

1.1 Processus de sélection des probiotiques

La sélection d'une souche en vue de son utilisation comme probiotique est un processus centré sur la recherche et la mise en évidence d'effets sur la santé humaine (Figure 1). Dans cette perspective, deux aspects clés doivent être pris en considération.



*MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Figure 1. Effets bénéfiques sur la santé humaine attribués aux probiotiques. Adapté de (248).

D'abord, l'activité probiotique est réputée être spécifique à la souche, c'est-à-dire que les effets manifestés par une souche ne peuvent être extrapolés à une autre, quand bien même elles appartiendraient au même genre ou à la même espèce. Diverses études *in vitro* et *in vivo* ont en effet pu montrer une grande variété de résultats selon les souches utilisées (284). Récemment, une étude clinique a confirmé cette spécificité des effets produits pour trois probiotiques du genre *Lactobacillus* au niveau de la muqueuse intestinale (323). Une des hypothèses les plus couramment avancées pour expliquer une telle singularité est basée sur la variabilité inter-souche des activités métaboliques et physiologiques dans un écosystème particulier. Cet état de fait impose une identification des bactéries probiotiques et un examen de leurs activités au niveau de la souche.

Ensuite, la justification scientifique des effets probiotiques est essentielle pour étayer les allégations santé, qu'elles concernent l'amélioration d'une fonction comme le transit intestinal ou la réduction d'un des facteurs de risque d'une maladie telle la diminution du cholestérol dans le cadre des maladies cardiovasculaires. Selon les réglementations en vigueur, cette démonstration doit impérativement s'appuyer sur des études cliniques menées chez l'homme selon la méthodologie dite en double aveugle contre placebo (DACP ; (123)). Si ces études sont unanimement considérées comme les mieux à même d'établir un rapport de causalité entre un produit et son bénéfice sur la santé humaine, leur coût élevé s'avère prohibitif pour bon nombre d'entreprises agro-alimentaires. Aussi, cette contrainte économique implique de limiter les essais cliniques aux meilleurs candidats bactériens.

Compte-tenu de ces éléments, un comité mixte d'experts FAO/OMS a établi en 2002 les lignes directrices et critères pour la sélection et l'évaluation des probiotiques (Figure 2 ; (98)). Dans son rapport, afin de garantir l'innocuité de ces micro-organismes, il est ainsi recommandé de privilégier les groupes de bactéries ayant un historique de non pathogénicité (GRAS), en particulier les souches d'origine alimentaire ou humaine. Celles-ci doivent être identifiées par des méthodes phénotypiques et génotypiques, préalablement à une caractérisation selon des critères fonctionnels et de sécurité. Dans ce sens, le comité préconise l'utilisation de tests *in vitro*, éventuellement complétés par des études chez l'animal. En plus de montrer l'absence totale de toxicité et de pathogénicité des cellules, ces tests doivent permettre de discriminer les souches les plus prometteuses du reste de la flore microbienne en estimant leur potentiel probiotique, c'est-à-dire leur capacité à survivre, persister temporairement dans le tractus digestif et avoir un ou plusieurs effets bénéfiques sur l'hôte.

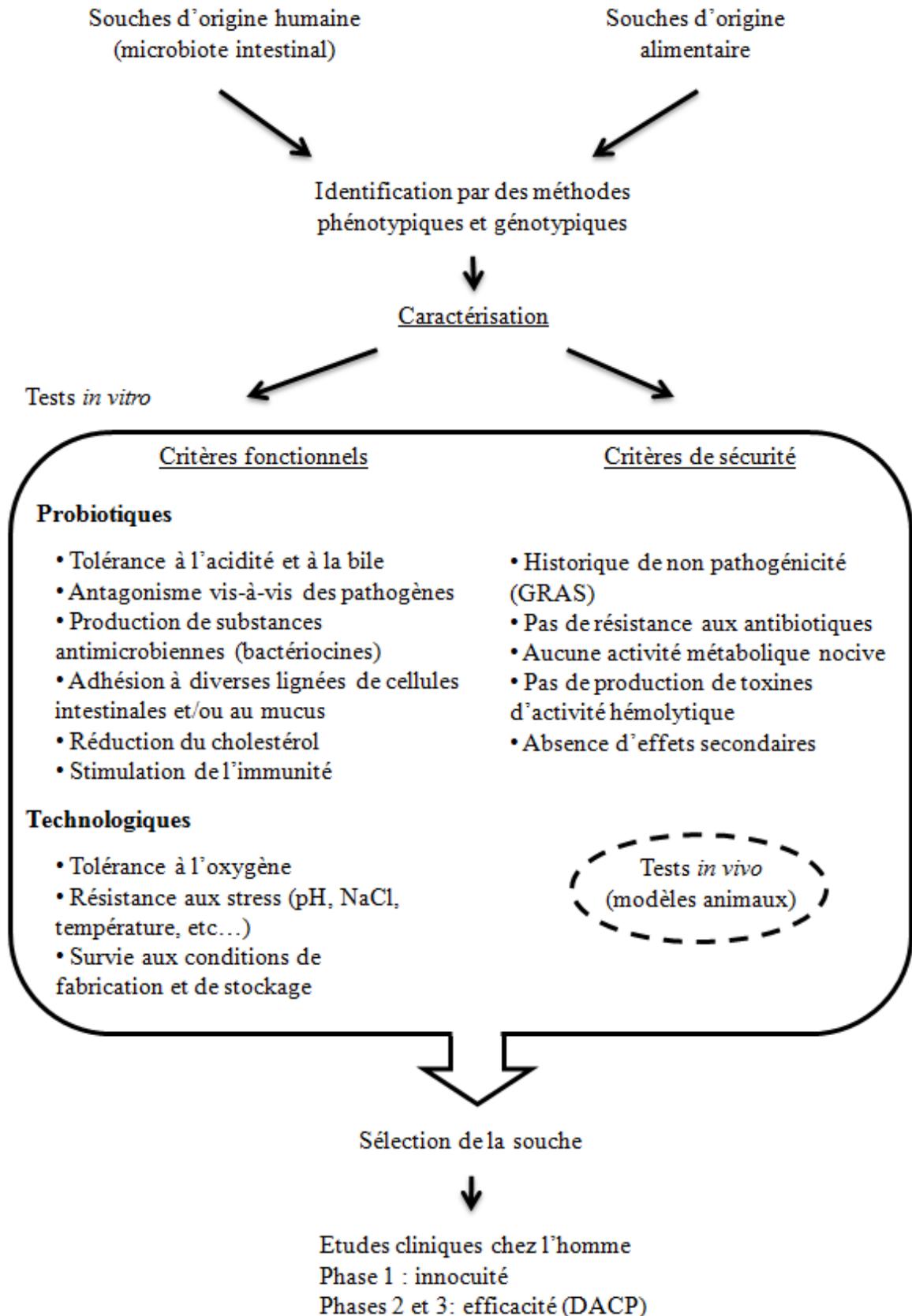


Figure 2. Lignes directrices et critères pour la sélection et l'évaluation des probiotiques. Adapté du rapport FAO/WHO de 2002 (98).

De plus, il s'agit d'évaluer leur aptitude technologique, à savoir leur faculté à tolérer les différentes opérations unitaires des procédés de fabrication et de conservation. La sélection s'opère ainsi parmi les seules souches sûres d'un point de vue sanitaire, sur la base d'un compromis entre potentiel probiotique et aptitude technologique. L'évaluation peut alors se poursuivre par les études cliniques dans le but de confirmer l'innocuité (phase 1) et l'efficacité de la souche (phases 2 et 3 en DACP).

Ainsi, le diptyque évaluation systématique des souches d'une part, et nécessaire validation en DACP d'autre part, confère aux tests *in vitro* relatifs à la caractérisation du potentiel probiotique un rôle critique dans le processus de sélection des meilleurs candidats. Particulièrement sélectifs, ces tests doivent être représentatifs de la propriété bactérienne ou de la fonction étudiée tout en restant simples à mettre en œuvre, et ce afin de permettre la juste évaluation d'un grand nombre de souches. Aussi, différents modèles existent pour chaque critère à examiner. Leur recensement est effectué et leur représentativité examinée ci-après pour ce qui concerne la résistance aux conditions gastro-intestinales, la capacité d'adhésion, l'activité hypocholestérolémiante et l'immunomodulation, critères habituels servant à la sélection des probiotiques et utilisés par ailleurs dans cette étude.

1.2 Tests de résistance aux conditions gastro-intestinales

Aujourd'hui, il est admis que les bactéries probiotiques doivent conserver une certaine viabilité lors du transit gastro-intestinal pour être en mesure d'exercer un rôle bénéfique sur la santé humaine (284). Il leur est notamment nécessaire de survivre à l'acidité gastrique et aux sécrétions bilio-pancréatiques, principaux mécanismes endogènes d'inactivation des bactéries ingérées (180, 292). C'est pourquoi, l'exposition à des mélanges simulant ces conditions a été adoptée comme l'un des principaux critères d'évaluation et de sélection *in vitro* des candidats probiotiques (98).

L'étude de la résistance à l'acidité gastrique (capacité à survivre au stress acide) est généralement réalisée à l'aide de modèles très simplifiés (228). L'approche utilisée implique de : (i) cultiver la souche étudiée; (ii) centrifuger, laver puis resuspendre les cellules dans un milieu acidifié ; et (iii) dénombrer les bactéries ayant survécu au stress acide qui leur a été imposé. Selon les cas, la composition et le pH du milieu, ainsi que le temps de séjour et le nombre initial de bactéries incubées varient considérablement, rendant impossible toute

comparaison pertinente entre les études. Seul le dénombrement par culture sur milieu gélosé est commun à tous ces modèles, parfois complété par une analyse microscopique par fluorescence des cellules mortes et vivantes (137). Face à cette hétérogénéité, une méthode standardisée a récemment été proposée pour mesurer la résistance à l'acidité des candidats probiotiques (51). Cette méthode vise à calculer des indicateurs décrivant la cinétique de survie des bactéries pour un pH et une population initiale donnés.

Globalement, si les modèles utilisés permettent de comparer différentes souches entre elles et de les hiérarchiser, ils n'ont pas nécessairement de valeur prédictive quant à leur comportement *in vivo*. A titre d'exemple, une souche de *L. casei* ayant montré une résistance limitée à l'acidité *in vitro* (52) a néanmoins donné d'excellents résultats *in vivo* (67). D'une manière générale, il semble qu'une résistance modérée aux bas pH (~3,5) soit suffisante pour survivre au transit intestinal ; seules les souches particulièrement sensibles au stress acide *in vitro* se révèlent incapables de coloniser l'hôte (227).

Des tests similaires à ceux utilisés pour évaluer la résistance à l'acidité ont été élaborés en vue d'étudier la résistance à la bile (capacité à survivre au stress biliaire) des souches à potentiel probiotique : le bain acide initial a simplement été remplacé par un milieu contenant des sels biliaires (52, 139). Bien que l'usage d'un stress limité dans le temps soit représentatif des conditions acides rencontrées par les bactéries *in vivo*, cette approche ne semble pas adaptée pour l'étude d'un stress biliaire. En effet, si l'acidité du chyme est progressivement neutralisée lors de son passage dans le duodénum, les sels biliaires inondent en permanence les bactéries colonisant la muqueuse intestinale. Dès lors, il est impératif que les candidats probiotiques puissent non seulement survivre au stress biliaire, mais également se développer en leur présence. C'est pourquoi, il est préférable d'utiliser des tests évaluant la tolérance des souches à la bile, c'est-à-dire leur capacité de croissance en présence de bile (112).

Cette évaluation s'effectue dans un milieu de culture supplémenté en bile, comparativement à un milieu témoin. En pratique, elle est souvent réalisée par des mesures d'absorbance, des lecteurs automatiques permettant de suivre simultanément jusqu'à 200 conditions. Les souches sont alors comparées les unes aux autres sur la base de leurs taux de croissance maximum (38), des niveaux de population observés en phase stationnaire (11), ou des temps de culture nécessaires pour atteindre une densité de population donnée (112). Ces paramètres peuvent également être déterminés par dénombrement sur milieu gélosés, méthode alternative qui s'avère beaucoup plus lourde à mettre en œuvre (274). Dans la grande majorité

des études et par commodité, les préparations de bile employées sont d'origine bovine ou porcine, selon une gamme de concentrations allant de 0,01 à 5% (228). Il semble cependant que la composition de la bile, différente suivant l'origine, ait une certaine influence sur la tolérance des souches, ce qui milite en faveur de l'utilisation de bile humaine (227). Toutefois, une telle pratique est rare étant donné les difficultés liées à la disponibilité des donneurs (93).

Dans l'ensemble, les tests s'appuyant sur l'analyse des cinétiques de croissance ont un fort pouvoir discriminant, permettant de différencier des souches au sein d'une même espèce (53, 112, 137). Ils présentent par ailleurs de bons niveaux de corrélation avec les études *in vivo* (64, 112), ce qui fait de la tolérance à la bile *in vitro* un critère de premier plan dans le processus de sélection des probiotiques.

Enfin, d'autres modèles, dynamiques et nettement plus sophistiqués, ont été proposés pour simuler l'ensemble de l'appareil digestif (200, 205, 224). Ces modèles sont organisés en plusieurs réacteurs représentant peu ou prou les différentes régions de l'appareil digestif et alimentés par une variété de jus imitant les sécrétions rencontrées par les aliments lors de leur digestion. Les flux sont régis par un système de pompes généralement contrôlées par ordinateur. Bien que ce type de dispositif permette d'évaluer l'influence de la matrice alimentaire sur la survie des bactéries (204), il ne semble cependant pas adapté pour la sélection des probiotiques, des souches connues pour leur persistance *in vivo* n'ayant pas réussi à survivre *in vitro* (208).

1.3 Tests d'adhésion

L'adhésion des bactéries probiotiques à l'épithélium intestinal conditionne leur temps de résidence chez l'hôte et leur capacité à exercer des effets bénéfiques sur sa santé (285). C'est pourquoi, la capacité des souches à adhérer à la muqueuse intestinale est un des principaux critères de sélection des probiotiques (98). Cette propriété s'avère difficile à étudier *in vivo*, puisque cela nécessite d'effectuer des biopsies de l'intestin ou d'utiliser des méthodes de marquage permettant d'évaluer leur installation *in situ*. En revanche, plusieurs tests *in vitro* ont été développés pour examiner plus simplement les propriétés d'adhésion des bactéries. Ces tests comprennent en général trois étapes : l'incubation des cellules bactériennes avec le

substrat d'adhésion pour leur permettre d'adhérer à la cible ; le lessivage des bactéries non adhérentes ; et l'énumération des bactéries adhérentes.

Le modèle le plus simple est basé sur l'immobilisation de mucines à la surface des puits d'une microplaque (137, 319). Les mucines sont les composants organiques majeurs du mucus et sont responsables de ses propriétés viscoélastiques. La pellicule formée par ces glycoprotéines sur les parois des puits simule ainsi la couche de mucus protégeant l'épithélium intestinal. Premier contact entre les bactéries ingérées et la muqueuse de l'hôte, cette couche est considérée comme un site important pour l'adhésion et la colonisation (221). Compte-tenu des difficultés techniques, éthiques et économiques liées à l'utilisation de glycoprotéines du mucus humain, l'utilisation de mucines d'origine animale, spécialement porcine, est de loin la plus répandue. Disponibles dans le commerce et standardisées elles sont aussi beaucoup moins onéreuses.

Malgré la simplicité de mise en œuvre des tests utilisant les mucines commerciales, la culture de lignées cellulaires humaines d'origine intestinale reste l'approche la plus largement utilisée pour les tests d'adhésion, ces lignées simulant bien l'épithélium intestinal (59, 318). Dans la recherche sur les probiotiques, les types de cellules privilégiés sont les Caco-2 (ATCC HTB-37) et les HT29 (ATCC HTB-38), tous deux isolés d'adénocarcinomes du côlon humain. En particulier, les Caco-2 ont permis de réaliser des avancées substantielles dans les études d'interactions cellulaires. En effet, celles-ci peuvent aisément se développer selon une couche unitaire homogène et polarisée de cellules, leur conférant une forte ressemblance aux entérocytes humains mûrs de l'intestin grêle, phénotype cellulaire majoritaire de l'épithélium intestinal (183, 256). Cependant, l'absence de mucus à leur surface constitue un inconvénient majeur pour simuler fidèlement la situation *in vivo*. Tel n'est pas le cas de la lignée HT29-MTX, issue de l'adaptation de cellules HT29 au méthotrexate (MTX) (184), et qui se différencie en cellules en gobelets caractérisées par la sécrétion de mucines (185, 186). Ces cellules à mucus représentent l'autre phénotype cellulaire principal de l'épithélium intestinal, selon un ratio 10:90 par rapport aux entérocytes (131). Aussi, en vue de mieux représenter les conditions *in vivo*, des techniques de co-culture des Caco-2 et des HT29-MTX ont été développées (199, 237, 257, 332). Une approche alternative consiste à combiner l'emploi de Caco-2 et de mucine (168).

Outre les deux modèles principaux que sont le mucus et les lignées cellulaires, quelques composants de la matrice extracellulaire comme le collagène, la laminine, la fibronectine et

les protéoglycanes représentent également des supports expérimentaux potentiels pour les tests d'adhésion bactérienne (74). Bien que ces modèles ne reflètent intégralement les interactions complexes ayant lieu au niveau de la muqueuse intestinale, ils n'en restent pas moins suffisamment fiables, en particulier lorsqu'il s'agit de comparer les propriétés d'adhésion de différentes souches. A cet égard, si une bonne corrélation a souvent pu être établie entre les résultats de ces différents modèles (94, 189), des divergences peuvent apparaître selon les mucines, les bactéries, les lignées cellulaires et autres conditions de culture utilisées (168).

A l'instar des substrats d'adhésion, les techniques de numération des bactéries sont également variées. Les bactéries adhérant aux cellules peuvent ainsi être comptées par microscopie soit à optique ou à fluorescence. Cette méthode directe est longue et nécessite l'analyse de plusieurs champs microscopiques pour obtenir des valeurs représentatives. Elle est donc difficilement applicable à l'étude d'un grand nombre de souches dans différentes conditions. Une seconde méthode consiste à libérer les bactéries adhérees à l'aide de détergents ou via la lyse des cellules épithéliales : leur dénombrement est alors effectué après culture sur milieux gélosés. Cette approche n'est toutefois pas assez sensible pour détecter de petites différences de niveaux d'adhésion entre les souches.

D'autres méthodes, indirectes basées sur la quantification d'un signal, s'appuient sur le marquage radioactif ou fluorescent des bactéries et permettent de s'affranchir de ces inconvénients. Quoique moins sensible, la technique utilisant des fluorochromes tels le violet cristal (196) ou la fluorescéine (26) est plus facile à mettre en œuvre et se révèle économiquement plus intéressante que la radioactivité. Elle est de ce fait largement privilégiée pour la numération des bactéries adhérees. A noter que les tests immunologiques de type ELISA, également adaptés pour réaliser de telles numérations, restent assez peu utilisés pour les mesures d'adhésion.

Finalement, les tests d'adhésion sont de bons outils pour comparer les souches entre elles. De plus, les souches présentant de bons résultats *in vitro* montrent en général une bonne colonisation de l'intestin (3, 68), bien qu'il n'existe pas de corrélation systématique entre les deux situations. A titre d'illustration, une étude comparative portant sur plusieurs bifidobactéries a montré des différences selon les souches considérées : tandis que, dans certains cas (*B. longum* BB536 et ATCC 15707), les données relatives à l'adhésion aux Caco-2 et à la colonisation intestinale concordaient, les résultats divergeaient dans d'autres (*B.*

animalis), se traduisant par une sous-estimation dans les conditions *in vitro* par rapport aux observations *in vivo* (68).

1.4 Tests de l'activité hypocholestérolémiante

Le criblage *in vitro* des souches potentiellement probiotiques inclut de plus en plus souvent l'examen de leur activité hypocholestérolémiante (150, 354). L'intérêt porté à cette activité tient, d'une part, au lien établi entre la réduction du taux de cholestérol sérique et la diminution du risque de maladies cardiovasculaires (203), et d'autre part, aux résultats de plusieurs études cliniques menées chez l'animal et chez l'homme prônant une telle activité à plusieurs souches de lactobacilles et de bifidobactéries (242). Néanmoins, cet effet probiotique reste controversé dans la mesure où certains résultats de ces études ont, par la suite, été remis en cause (127, 188, 294).

Les modèles utilisés pour étudier l'activité hypocholestérolémiante des bactéries *in vitro* s'appuient sur des méthodologies diverses. Généralement, l'approche consiste à: (i) mettre en culture les cellules dans un milieu supplémenté en cholestérol ; (ii) les incuber jusqu'en phase stationnaire de croissance, puis les éliminer ; et (iii) doser le cholestérol restant dans le milieu. La teneur initiale du milieu en cholestérol est le plus souvent de l'ordre de 100 mg/L (252) et ne dépasse pas les 150 mg/L (4). Cette fourchette est représentative de ce qui peut être ingéré au cours d'un repas (19). Compte-tenu de sa faible solubilité dans l'eau (2 mg/L), le cholestérol est incorporé au milieu de trois manières différentes : préalablement dissout dans de l'éthanol (175), incorporé dans un sérum (111), ou par l'intermédiaire d'un dérivé soluble (le polyoxyéthanyl-cholesteryl sebacate) (252). Cette question de la solubilité est importante dans la mesure où l'étape de centrifugation qui vise à séparer les cellules du milieu avant dosage risque d'éliminer également le cholestérol non solubilisé, faussant ainsi les résultats. En complément, de la bile bovine ou porcine est communément ajoutée au milieu à des concentrations physiologiques (~0,3%) (252). Une telle association vise à reproduire la situation *in vivo* : le cholestérol joue en effet un rôle de précurseur dans l'anabolisme des sels biliaires et entre dans la composition de la bile (22). A noter qu'un modèle dynamique, équivalent à ceux présentés dans le cadre des tests de résistance aux conditions intestinales, a également été proposé pour étudier l'activité hypocholestérolémiante des bactéries (253).

Le dosage du cholestérol s'effectue à l'aide de trois méthodes principales, aux sensibilités différentes. La première est un titrage colorimétrique à l'ortho-phtalaldéhyde permettant de détecter avec précision des quantités supérieures ou égales à 5 mg de cholestérol (269). La seconde est une quantification par spectrophotométrie ou fluorimétrie suite à une série de réactions enzymatiques (272). Elle présente des seuils de détection allant de 0,2 (fluorimétrie) à 1 mg (spectrophotométrie). La dernière utilise la chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (175). Les niveaux de sensibilité atteints par cette approche sont de l'ordre du milligramme. Quelle que soit la méthode employée, celle-ci est toujours précédée par une étape de récupération du cholestérol du milieu qui consiste en la saponification des lipides à la potasse éthanolique, l'extraction liquide-liquide à l'hexane ou à l'heptane de l'insaponifiable (contenant le cholestérol), et l'évaporation à sec du solvant sous azote.

Malgré la controverse suscitée par l'activité hypocholestérolémiant des probiotiques, plusieurs études ont montré une bonne corrélation entre les résultats *in vitro* et *in vivo* (175, 242). Il est cependant nécessaire de consolider ces résultats par des recherches complémentaires, afin de confirmer l'existence d'un tel effet et de comprendre les mécanismes qui le sous-tendent.

1.5 Tests d'immunomodulation

De nombreuses études cliniques montrent que l'ingestion de micro-organismes à activité probiotique a un impact sur le système immunitaire (225). Cette interaction n'est pas surprenante dans la mesure où 60 à 70% du nombre total de nos cellules immunitaires se retrouvent dans la muqueuse de l'intestin grêle et du côlon (118). Le champ d'action des effets produits concerne essentiellement les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et certaines allergies. Schématiquement, la faculté d'un probiotique à engendrer ou non un de ces effets est liée à son aptitude à orienter le système immunitaire de l'hôte vers une réponse particulière (225).

Vu la complexité des mécanismes mis en jeu, l'immunomodulation est généralement étudiée *in vivo* sur des modèles animaux. Cependant, plusieurs tests *in vitro*, basés sur l'utilisation de cellules dendritiques (associées ou non à des cellules épithéliales de type Caco-2) (222), de mononucléaires du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells*

[PBMC]) (102), ou encore de lignées cellulaires d'origine murine imitant les macrophages (128), ont été proposés. Ces dispositifs sont difficiles à mettre en œuvre et nécessitent de trouver des donneurs humains pour les deux premiers d'entre eux. Ils permettent de mesurer l'impact des probiotiques sur les profils cytokiniques sécrétés par ces cellules *ex vivo*. Le dosage des cytokines est alors effectué à l'aide de tests immunologiques de type ELISA. De tels profils régissent la différenciation de la réponse immunitaire en réponse à médiation cellulaire, via les lymphocytes Th1, ou en réponse humorale, sous l'égide des lymphocytes Th2. Ils contrôlent également l'équilibre Th1/Th2 de ces réponses par l'intermédiaire des lymphocytes T régulateurs (225).

A ce jour, aucun résultat *in vitro* obtenu par l'intermédiaire de ces modèles n'a été relié à des effets *in vivo* concernant les allergies. En revanche, plusieurs études ont démontré le caractère prédictif des tests utilisant les cellules dendritiques (222) et les PBMC (102) quant à l'efficacité de souches probiotiques à lutter contre diverses formes de colites induites chez la souris. En particulier, dans le modèle de Foligne *et al.*, il semble que les niveaux d'interleukine (IL)-10 et d'IL-12, respectivement anti- et pro-inflammatoire, soient corrélés à la capacité des bactéries d'atténuer les symptômes de colite murine (102). Ces résultats encourageants permettent d'envisager ce test comme outil pour la sélection préliminaire des souches ayant un potentiel effet protecteur dans les MICI. Néanmoins, les contraintes inhérentes à l'utilisation de cellules d'origine humaine font obstacle à sa généralisation et à son application systématique dans les criblages à grande échelle.

2. Stratégies pour la caractérisation moléculaire des probiotiques

Malgré l'utilité manifeste des tests *in vitro* dans la caractérisation et la sélection préliminaires des souches à potentiel probiotique, l'information obtenue reste d'ordre général et fonctionnel. En effet, ils ne permettent pas d'identifier d'indicateurs précis des différentes activités, ni de comprendre les mécanismes qui sous-tendent celles-ci. Or, ces aspects sont non seulement scientifiquement intéressants, mais ils sont essentiels dans le contexte réglementaire actuel relatif aux allégations santé.

Depuis l'avènement de la technologie de l'ADN recombinant dans les années 1970 et jusqu'au milieu des années 1990, les scientifiques ont été limités dans leurs investigations à une approche réductionniste basée, au mieux, sur un petit groupe de gènes ou de protéines (46). Aujourd'hui, avec l'émergence de techniques à haut débit, les génomes entiers des micro-organismes peuvent être séquencés rapidement et à faibles coûts. Ainsi, en août 2011, 16 ans après l'achèvement du premier séquençage d'un génome bactérien (*Haemophilus influenzae* RD (101)), les séquences complètes et annotées de 1698 bactéries étaient librement accessibles sur le site du National Center for Biotechnology Information (NCBI ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Parmi elles figuraient 36 souches de *Lactobacillus* et 22 souches de *Bifidobacterium*, les deux principaux genres représentant les probiotiques actuellement sur le marché (Tableau 1). Cette « révolution génomique » a favorisé l'apparition de stratégies et d'outils innovants pour l'analyse des déterminants des propriétés et activités des probiotiques (Tableau 2).

2.1 Analyse génomique comparative

Le développement des outils bioinformatiques et des puces à ADN autorise depuis quelques années l'analyse comparative des génomes des bactéries à potentiel probiotique (171). Cette approche vise à identifier des séquences communes ou propres aux souches,

Tableau 1. Caractéristiques générales de différents génomes séquencés parmi les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*.

Souches	Taille du génome ^a	GC (%)	Gènes	Protéines	Origine	Numéro d'accès ^b	Source
<i>B. longum</i> NCC2705	2 256 640	60	1 798	1 727	Tractus digestif humain	NC_004307	(279)
<i>B. longum</i> DJ010A	2 375 286	59	1 908	1 908	Tractus digestif humain	NC_010816	(176)
<i>B. breve</i> UCC2003	2 422 668	59	1 868	1 590	Fèces de nourrisson	CP000303	(230)
<i>B. adolescentis</i> ATCC15703	2 089 645	59	1 701	1 631	Tractus digestif humain	NC_008618	-
<i>B. adolescentis</i> L2-32	2 238 571	59	2 499	2 428	Fèces de nourrissons	NZ_AAXD000000	-
<i>B. lactis</i> HN0019	1 915 892	60	1 632	1 578	Inconnue	NZ_ABOT000000	-
<i>L. acidophilus</i> NCFM	1 993 560	34	1 936	1 862	Tractus digestif humain	NC_006814	(6)
<i>L. casei</i> ATCC334	2 895 264	46	2 909	2 751	Emmental	NC_008526	(201)
<i>L. gasseri</i> ATCC33323	1 894 360	35	1 898	1 755	Tractus digestif humain	NC_008530	(202)
<i>L. johnsonii</i> NCC533	1 992 676	34	1 918	1 821	Tractus digestif humain	NC_005362	(260)
<i>L. plantarum</i> WCFS1	3 308 274	44	3 135	3 007	Tractus digestif humain	NC_004567	(160)
<i>L. reuteri</i> F275	1 999 618	38	2 027	1 900	Tractus digestif humain	NC_009513	(81)
<i>L. fermentum</i> IFO 3956	2 098 685	51	1 912	1 843	Plantes fermentées	NC_010610	(81)
<i>L. salivarius</i> UCC118	1 827 111	32	1 864	1 717	Tractus digestif humain	NC_007929	(57)

^aTaille exprimée en nombre de paires de bases.

^bNuméro d'accès dans la banque de données NCBIInr.

'-' : données non publiées.

susceptibles d'expliquer leur évolution ou certains de leurs caractères physiologiques, en rapport notamment avec leur faculté à coloniser l'hôte ou à exercer un effet bénéfique sur sa santé. A l'instar des « îlots de pathogénicité » décrits chez les espèces virulentes comme *Enterococcus faecalis* (58) et *Salmonella enterica* (124), l'idée est donc de caractériser des « îlots probiotiques » et autres « îlots d'adaptation », régions de l'ADN chromosomique comportant des groupements de gènes potentiellement responsables des spécificités des bactéries probiotiques (13).

Un exemple d'îlot probiotique a été découvert suite à l'analyse *in silico* des séquences de deux souches phylogénétiquement proches : *L. reuteri* JCM 1112^T et *L. fermentum* IFO 3956 (229). Celle-ci a révélé que *L. reuteri* JCM 1112^T possède un groupement unique de 58 gènes responsables de la biosynthèse d'une bactériocine (la reutéline) et de la vitamine B12 (309), du fait d'un transfert horizontal. Cette approche bioinformatique d'alignement des séquences a également permis d'identifier un déterminant de la forte capacité de la souche *Lactobacillus rhamnosus* GG à adhérer aux glycoprotéines du mucus (147). Par ailleurs, une étude transversale portant sur les génomes de 11 souches de bactéries lactiques a dégagé 6 et 3 gènes susceptibles de constituer des îlots d'adaptation aux produits laitiers et à l'intestin

Tableau 2. Outils génétiques utilisés à ce jour dans la caractérisation moléculaire du potentiel probiotique

Technique	Description	Intérêts	Limites	Références clés
Analyse <i>in silico</i>	Analyse des séquences à l'aide d'algorithmes informatiques	Exploration d'éléments génétiques non documentés ; prédiction de l'évolution des bactéries.	Les génomes étudiés doivent être séquencés ; les fonctions restent putatives ; risque d'erreurs d'annotation.	(177, 240)
Hybridation génomique comparative (CGH)	Comparaison de séquences par hybridation ADN-ADN	Identification des séquences uniques d'une souche de référence.	Information sur les seuls gènes présents dans la souche de référence, dont le génome doit être séquencé.	(29, 223)
Analyse de profils transcriptomiques par bio-puce	Méthode d'analyse du transcriptome sur la base d'une hybridation ADN-ADNc	Vision globale de la transcription dans des conditions particulières.	Les souches étudiées doivent être séquencées ; les ARN ne sont pas en lien direct avec les fonctions cellulaires ; analyses <i>in vivo</i> délicates.	(37, 81)
Tri d'ARNm ou DD-RT-PCR	Criblage d'ADNc différenciellement accumulés sur gels	Analyse transcriptomique ne requérant pas d'outils génétiques spécifiques ni de séquençage préalable du génome.	Risque de faux positifs du fait d'une surreprésentation de l'ARN structural dans l'ARN total ; analyses <i>in vivo</i> délicates.	(165)
IVET et R-IVET	Techniques de piégeage de promoteurs actifs <i>in vivo</i>	Identification <i>in vivo</i> de facteurs potentiels d'adaptation ; R-IVET : les gènes faiblement exprimés ou de façon transitoire peuvent être identifiés.	Les souches étudiées doivent être séquencées.	(39, 334)
Analyse protéomique	Analyse à grande échelle de profils protéiques	Les protéines sont en lien direct avec les fonctions cellulaires ; permet de révéler les modifications post-traductionnelles.	L'identification des protéines nécessite des ressources en spectrométrie de masse haute résolution ; analyses <i>in vivo</i> difficiles.	(138, 276)
Analyse ciblée de mutants	Inactivation d'un gène	Détermination d'un lien de causalité entre un gène et sa fonction ; confirmation <i>in vivo</i> d'une fonction proposée.	Nécessite une hypothèse de départ ; pléiotropie de certains gènes.	(120, 230) [voir aussi tableaux 3-6 §3]

humain, respectivement (240). Enfin, l'analyse génomique comparative de 9 souches du genre *Bifidobacterium* a mis en lumière les bases génétiques de leur aptitude à coloniser durablement l'hôte (177)

Une alternative aux analyses *in silico* réside dans l'utilisation de puces à ADN selon la technique dite « d'hybridation génomique comparative » (*comparative genome hybridization* [CGH]). Une puce à ADN (ou bio-puce) est un ensemble de molécules d'ADN fixées en rangées ordonnées sur une petite surface qui peut être du verre, du silicium ou du plastique. Dans la méthode CGH, les fragments d'ADN chromosomique d'une souche de référence séquencée et d'une souche à tester, marqués par des sondes fluorescentes différentes, sont hybridés sur une bio-puce représentant l'ensemble des gènes de la souche de référence. Des lecteurs et logiciels spécifiques détectent alors la présence ou l'absence des gènes de la souche de référence dans le génome de la souche testée (210). Cette technique est couramment utilisée pour déterminer la composition et la plasticité des génomes bactériens (85). Pour des souches appartenant à une même espèce ou à des espèces phylogénétiquement proches, elle permet d'éviter de recourir à leur séquençage complet.

La CGH a notamment permis d'appréhender la diversité génétique de l'espèce *L. plantarum* à travers l'étude comparative de 20 souches (223). Les différences principales observées concernent des domaines mobiles (ou transférables) tels les prophages ou certains éléments d'insertion, mais aussi d'autres régions dont les gènes encodent des bactériocines (plantaricines), des peptides non-ribosomiaux ou encore des exopolysaccharides (polysaccharides à chaînes longue attachés de façon souple à la surface cellulaire ou sécrétés dans le milieu [EPS]). Une grande variabilité a également été rencontrée dans une région de 600 kb incluant des gènes impliqués dans le métabolisme des sucres et qui représente un îlot d'adaptation aux diverses niches écologiques colonisées par cette espèce. De la même manière, les profils d'hybridation génomique de 20 souches de *B. breve* isolées de nouveaux-nés suggèrent l'existence de sous-groupes homogènes sur le plan génétique en lien avec une spécificité d'habitat (29).

D'autres îlots probiotiques ou d'adaptation seront certainement bientôt mis à jour, à mesure que de nouvelles souches seront séquencées et leurs puces à ADN développées. Précisément, la restriction du champ d'investigation aux seules souches séquencées représente l'inconvénient principal des analyses *in silico*. De plus, la méthode CGH ne donne d'information que sur les gènes présents dans ces souches de références. A noter également

que les fonctions attribuées aux gènes restent putatives : leurs rôles précis doivent donc être confirmés expérimentalement. Enfin, les possibles erreurs d'annotation des séquences peuvent compromettre les analyses réalisées par cette méthodologie. Ces deux dernières remarques sont d'ailleurs valables pour l'ensemble des technologies utilisant ces séquences comme support pour l'interprétation des données.

2.2 Etudes fonctionnelles de l'expression des gènes

Malgré l'intérêt manifeste des analyses comparatives de génomes dans la caractérisation génétique du potentiel probiotique, celles-ci doivent être complétées par des approches fonctionnelles visant à comprendre les modes d'action des probiotiques dans leur environnement. Dans cette perspective, différentes technologies ont été développées en vue d'examiner, dans leur globalité, les modifications d'expression des gènes des bactéries entre des conditions standard de croissance *in vitro*, et des conditions *in vivo* ou des conditions simulant ces dernières. Ces approches transcriptomiques ont permis de révéler nombre des facteurs d'adaptions connus à ce jour chez les probiotiques.

2.2.1 Analyse du transcriptome par puces à ADN

La méthode la plus couramment utilisée pour l'analyse globale de l'expression génique chez les bactéries utilise les puces à ADN. Son principe est basé sur l'hybridation comparative de populations d'ARN messager (ARNm) accumulés dans les cellules soumises à différents traitements (contrôle et expérimental) (304). Concrètement pour chaque condition, les ARNm totaux des cellules sont extraits sélectivement puis copiés par PCR en ADN complémentaires (ADNc) monocaténares. Ces ADNc cibles sont alors marqués par fluorescence, leur synthèse se déroulant en présence d'une base nucléotidique modifiée. Les deux populations (1 et 2) d'ADNc cibles sont ensuite mélangées et hybridées sur une même bio-puce (portant les ADN sondes). A lecture de la puce, le signal obtenu correspond au rapport de fluorescence des cibles de la population 1 et des cibles de la population 2, traduisant la modification du niveau d'expression des gènes entre les deux conditions.

Cette technique ne peut être utilisée que pour des souches dont le génome a été préalablement séquencé. Elle ne donne un aperçu du transcriptome qu'à un instant donné : les études dynamiques nécessitent donc de multiplier les prises d'essais au cours du temps et les

analyses par bio-puces correspondantes, ce qui est relativement lourd et complique l'interprétation des résultats du fait d'une variabilité accrue. Dans le cadre d'études *in vivo*, il peut être difficile de récupérer suffisamment d'ARNm pour effectuer les analyses. Enfin, le rôle exact des gènes identifiés doit être confirmé expérimentalement.

Sur le plan pratique, cette méthodologie a été employée dans l'identification des gènes surexprimés et sous-exprimés chez *L. reuteri* ATCC 55730 (341), *L. plantarum* WCFS1 (37) et *L. rhamnosus* GG (147), en réponse à un stress biliaire. Pour cette dernière souche, les modifications des niveaux d'expression des gènes ont été étudiées dans le temps, donnant pour la première fois un aspect dynamique à ce type d'études. D'autre part, l'analyse transcriptomique de l'influence d'un stress acide sur l'expression génique globale de *L. reuteri* ATCC 55730 a également été effectuée par cette technique (331). Parallèlement à ces études *in vitro*, les variations du transcriptome de la souche *L. johnsonii* NCC533 après transit dans le système gastro-intestinal de souris axéniques ont pu être mises en évidence par l'intermédiaire de cette approche (81). A chaque fois, les gènes différemment exprimés concernaient aussi bien des protéines cytoplasmiques que des protéines de surface.

2.2.2 La DD RT-PCR

Une autre technique employée pour l'analyse du transcriptome consiste en un tri d'ARNm (ou *differential display*). Elle est fondée sur trois étapes majeures : (i) transcription inverse à partir d'ARNm aboutissant à l'obtention d'ADNc monocaténaire ; (ii) amplification par PCR des ces ADNc ; et (iii) séparation électrophorétique des fragments d'ADNc bicaténaire avant clonage. Ces trois étapes sont réalisées simultanément et en parallèle sur des ARNm isolés de cellules ayant subi différents traitements (contrôle et expérimental). La comparaison des gels électrophorétiques permet d'identifier des bandes d'ADNc différenciellement accumulées, faisant référence à des gènes surexprimés ou sous-exprimés en réponse au traitement imposé (304).

Quoique plus rarement utilisée que les bio-puces, cette approche s'est révélée efficace dans la détermination des gènes induits chez *L. acidophilus* NCFM en réponse à un stress acide (165). Basée sur l'emploi de la PCR, elle ne nécessite aucun outil génétique spécifique et peut être appliquée à des souches dont les génomes ne sont pas encore séquencés. Cependant, une surreprésentation de l'ARN structural dans l'ARN total peut être à l'origine de faux-positifs. De plus, au même titre que pour les bio-puces, l'isolement d'ARN bactérien peut se révéler difficile dans les expériences *in vivo*.

2.2.3 Les technologies IVET et R-IVET

Les technologies IVET (*in vivo expression technology*) et R-IVET (*recombination-based-IVET*) sont, comme leur nom l'indique, adaptées à l'analyse de l'expression génique *in vivo*. Leur principe repose sur l'analyse fonctionnelle de promoteurs, régions de l'ADN intervenant dans une régulation spatio-temporelle de l'expression d'un gène (304).

L'analyse fonctionnelle d'un promoteur nécessite de connaître la séquence nucléotidique de cette région régulatrice. Une construction chimérique est réalisée, constituée : (i) du promoteur soumis à l'analyse fonctionnelle ; (ii) d'un gène dit rapporteur (dont l'expression peut facilement être mise en évidence par une activité enzymatique particulière) ; (iii) des signaux permettant la terminaison de la transcription. Ces gènes chimères sont construits *in vitro* dans un plasmide par des séries de coupures grâce à des enzymes de restriction, des ligatures et des clonages dans *Escherichia coli*.

En répétant cette procédure pour l'ensemble des promoteurs du génome de la souche, une bibliothèque de plasmides recombinants portant les différentes constructions chimériques est ainsi constituée. Ceux-ci sont alors utilisés pour l'élaboration d'organismes génétiquement modifiés (OGM). Les OGM sont introduits dans l'alimentation de l'hôte (généralement une souris) puis récupérés dans ses matières fécales. L'activité enzymatique de la protéine codée par le gène rapporteur est alors recherchée dans les différents clones isolés. En pratique, on choisit une activité enzymatique qui se manifeste par une modification phénotypique du clone facilement détectable, telle la perte de résistance à un antibiotique. Si l'activité enzymatique est mesurable (*e.g.* sensibilité du clone à l'antibiotique), le gène rapporteur a été transcrit sous le contrôle de la partie promotrice. Ce promoteur est donc actif dans les conditions d'analyse : le gène qu'il régule a été activé. Un séquençage du promoteur permet alors d'identifier le gène correspondant.

Seuls les promoteurs actifs, et par conséquent les gènes induits, sont donc détectés par les technologies IVET et R-IVET. Celles-ci nécessitent de travailler avec des souches dont le génome est séquencé et différent quant à leur sensibilité. Par conception, la technique IVET nécessite que le gène d'intérêt soit activé tout au long du transit de la bactérie *in vivo* pour pouvoir détecter l'activité enzymatique du gène rapporteur. L'approche R-IVET, en revanche, utilise l'activité enzymatique irréversible des résolvasés comme gène rapporteur. Ainsi, même les gènes faiblement ou transitoirement exprimés peuvent être identifiés.

Ces deux méthodes ont respectivement été utilisées pour identifier les gènes de *Lactobacillus reuteri* 100-23 (334) et *L. plantarum* WCFS1 (39) induits dans le tractus gastro-intestinal de souris. A noter que deux autres stratégies d'analyse de l'expression génique *in vivo* ont été développées : la capture sélective des séquences transcrites (*selective capture of transcribed sequences* [SCOTS]) (87) et la mutagenèse par étiquettes spécifiques (*signature-tagged mutagenesis* [STM]) (213). Couramment employées dans l'analyse des facteurs de virulence chez les pathogènes, elles n'ont pour le moment jamais été appliquées chez les bactéries d'intérêt probiotique.

2.3 Analyse protéomique

2.3.1 Aspects conceptuels

La protéomique est une approche complémentaire aux études génomique et transcriptomique pour comprendre la biologie des probiotiques. Elle peut être définie comme l'analyse globale des protéines exprimées dans une cellule ou tout autre échantillon biologique à un moment donné et dans des conditions particulières (83). Si le génome d'un organisme est statique ou presque, son protéome, lui, est dynamique, en ce sens que : (i) toutes les protéines ne sont pas exprimées en même temps ni en même quantité, (ii) plusieurs formes d'une même protéine peuvent coexister du fait de modifications post-traductionnelles, et (iii) ces différences d'expression sont fonction de l'état de la cellule et de son environnement. Toutes situations confondues, un génome donné peut donc potentiellement occasionner un nombre infini de protéomes (121). De plus, les modifications des niveaux d'expression d'un gène et de la protéine qu'il encode ne sont pas nécessairement liées. Chez *L. rhamnosus* GG par exemple, une analyse transcriptomique et protéomique a montré que 316 gènes contre 42 protéines étaient différemment exprimés en réponse à un stress biliaire. Toutefois, une corrélation entre les observations effectuées à l'échelle du transcriptome et du protéome n'a pu être établie que pour 14 de ces protéines (162). Au final, l'immense majorité des processus cellulaires étant assurés par des protéines, l'analyse protéomique joue un rôle essentiel dans la compréhension des fonctions biologiques et de leur rapport avec le génome et le transcriptome. Il s'agit par conséquent d'un outil particulièrement adapté à la caractérisation moléculaire du potentiel probiotique.

L'analyse protéomique couvre aujourd'hui de nombreux champs d'application, incluant l'étude des interactions entre protéines, de leur localisation et de leur fonction, ou encore des modifications post-traductionnelles (Figure 3). Selon l'objectif visé, elle peut être divisée en trois grands domaines : (i) la protéomique structurale, qui étudie par spectrométrie de masse les composition conformation et interaction de protéines issues de la purification d'organelles ou de complexes ; (ii) la protéomique fonctionnelle, terme générique qui regroupe de nombreuses approches visant à mieux comprendre les mécanismes des maladies et l'interaction entre protéines et médicaments ; et (iii) la protéomique d'expression, qui consiste en l'analyse quantitative des niveaux d'expression des protéines d'un échantillon (50). Cette dernière discipline permet, selon une approche différentielle, de comparer l'expression de protéomes ou sous-protéomes issus de conditions ou d'organismes différents. Des protéines clés impliquées dans différentes fonctions cellulaires peuvent ainsi être révélées. C'est la méthode privilégiée pour identifier les marqueurs spécifiques d'une maladie et les déterminants d'une propriété bactérienne d'intérêt.

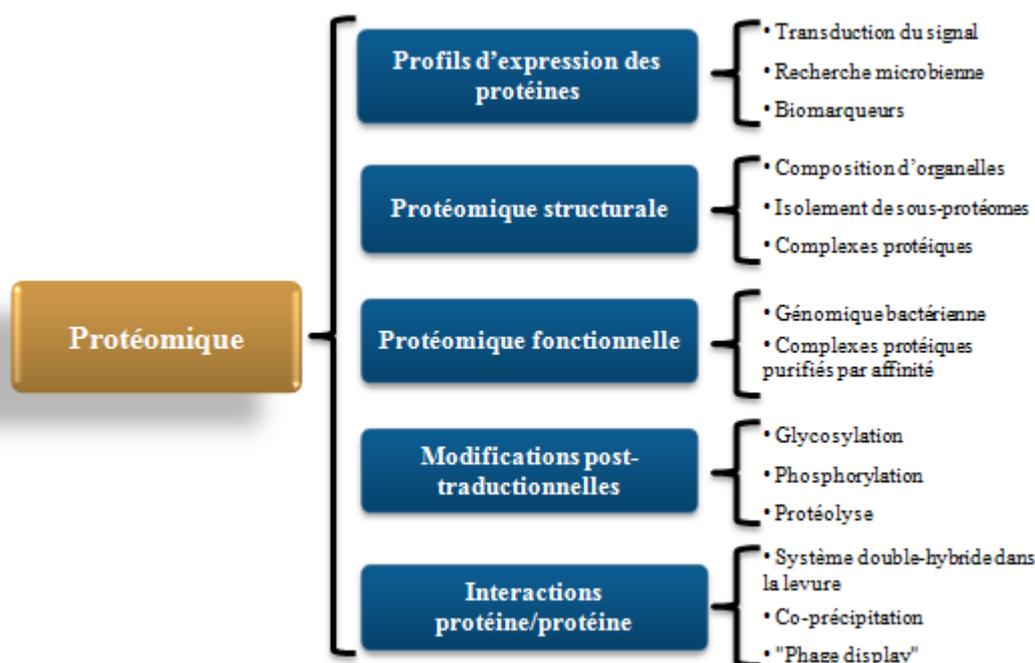


Figure 3. Disciplines regroupées sous le terme générique « protéomique » et leurs applications biologiques. Source (50)

2.3.2 Considérations techniques de la protéomique d'expression

Une analyse protéomique consiste en trois étapes principales : (i) la préparation de l'échantillon ; (ii) la séparation des protéines ; et (iii) l'identification des protéines d'intérêt. Si cette dernière étape utilise systématiquement la spectrométrie de masse, la seconde, en revanche, s'appuie sur deux approches différentes qui conditionnent la préparation des échantillons : l'électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide (*two-dimensional polyacrylamid gel electrophoresis* [2D-PAGE]), d'une part, et diverses technologies sans gel relatives à la chromatographie liquide, d'autre part.

La 2D-PAGE est une technique analytique robuste et bon marché, développée dans les années 1970 (239). Elle a largement été améliorée des points de vue de la sensibilité et de la résolution au cours des décennies suivantes. Ainsi, jusqu'à 10 000 protéines différentes peuvent aujourd'hui être séparées sur un même gel par cette méthode (50). Leur détection fait appel à des techniques de coloration (bleu colloïdal de Coomassie, sels d'argent ou de ruthénium), ou de marquage radio-isotopique ou fluorescent. Cette dernière méthode a donné naissance à l'électrophorèse bidimensionnelle différentielle en fluorescence (*two-dimensional differential in-gel electrophoresis* [2D-DIGE]) qui permet l'analyse sur un même gel de plusieurs échantillons marqués par des fluorochromes différents, et ainsi de s'affranchir des problèmes de variabilité inter-gels inhérents à ce type de méthode (297).

Quel que soit le mode de détection considéré, la séparation d'extraits protéiques par gels d'électrophorèse présente un certain nombre de limites. Les protéines faiblement abondantes sont notamment difficiles à détecter (192, 264), et celles ayant un caractère hydrophobe (comme les protéines membranaires) délicates à solubiliser. Ces dernières ont tendance à s'agréger au niveau de leur point isoélectrique (pI), ce qui donne lieu à des trainées sur les gels et des spots moins bien résolus voire non détectés (116). Les protéines aux valeurs de pI extrêmes ($pI < 3$ et $pI > 10$) sont hors champ d'application des gels 2D, ce qui est également le cas pour celles présentant des poids moléculaires trop faibles (< 10 kDa) ou trop élevés (> 250 kDa) (56). Par ailleurs, bien que cette technique soit simple d'utilisation et adaptée à l'identification par spectrométrie de masse, la gamme dynamique pour la quantification relative des protéines par coloration au bleu colloïdal reste relativement restreinte comparée aux autres types de détection évoqués précédemment (297). Enfin, l'excision des spots d'intérêt avant identification des protéines correspondantes est chronophage car effectuée manuellement. Des équipements automatisés ont toutefois été développés récemment pour pallier cet inconvénient (114).

Les technologies sans gel, quant à elles, utilisent généralement un couplage de deux séparations orthogonales par chromatographie liquide suivies d'une analyse par spectrométrie de masse en tandem (164). Cette approche entièrement automatisable, nommée *shotgun proteomics*, permet d'identifier de manière semi-quantitative l'ensemble des protéines d'un extrait. L'étape d'identification n'étant pas dissociée de la séparation proprement dite, le traitement des données est beaucoup plus lourd dans la mesure où toutes les protéines sont analysées, y compris celles qui ne présentent pas d'intérêt pour l'étude. De plus, cette technologie ne donne pas accès aux pI ni aux masses moléculaires des protéines : celles-ci sont en effet clivées en peptides avant l'analyse à l'aide d'enzymes protéolytiques. Pour cette même raison, les isoformes liées à des modifications post-traductionnelles sont traitées comme une seule et même protéine.

Ces éléments montrent le caractère complémentaire des approches avec et sans gel. L'identification des protéines nécessite, dans tous les cas, des ressources en spectrométrie de masse à haute résolution, équipements onéreux qui ne sont pas accessibles à tous les laboratoires. Les protéines sont identifiées par analogie de séquence à partir des bases de données disponibles en ligne, et leurs fonctions putatives doivent ensuite être confirmées par des analyses complémentaires. Il est également difficile de récupérer suffisamment de matériel protéique dans les études *in vivo*.

2.3.3 Application à l'étude des probiotiques

L'expression différentielle étant, comme nous l'avons vu, la mieux à même d'identifier les protéines clés impliquées dans une propriété bactérienne d'intérêt, les études protéomiques relatives aux probiotiques ont largement privilégié cette approche. A ce titre, l'immense majorité d'entre elles a eu recours à la 2D-PAGE comme technique de séparation des protéines (2). Ce plébiscite tient au fort pouvoir résolutif de la 2D-PAGE et aux faibles coûts d'instrumentation. Aussi, deux types d'applications ont été envisagées : (i) l'étude de la réponse d'un micro-organisme à un facteur biotique ou abiotique, et (ii) la comparaison des profils protéiques de différentes souches dans des conditions données.

L'analyse protéomique de la réponse des micro-organismes aux stress environnementaux est bien documentée pour les bactéries lactiques (50). Ceci est principalement dû à l'intérêt porté par l'industrie agro-alimentaire pour ces bactéries qui interviennent dans nombre de ses produits. En particulier dans le domaine des probiotiques, les travaux ont porté sur un certain nombre de facteurs d'adaptation aux conditions gastro-

intestinales comme la tolérance à la bile (178, 187, 274, 276) et à l'acidité gastrique (179, 193, 275), et la capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale (20, 347). Ces études, ciblant à chaque fois une souche en particulier, ont largement contribué à la compréhension des mécanismes utilisés par ces bactéries pour coloniser l'hôte.

A l'inverse, si l'outil protéomique a permis d'analyser le polymorphisme protéique de certaines bactéries pathogènes et de distinguer plusieurs de leurs phénotypes (25, 89, 90, 95, 338), cette approche n'a que très rarement été utilisée pour comparer des souches sur la base de leurs propriétés probiotiques. Une étude pionnière menée dans notre laboratoire a notamment mis en évidence des protéines clés impliquées dans l'adhésion de *L. plantarum* aux glycoprotéines du mucus (138). Récemment, les profils protéiques de quatre souches de *B. longum* ont été analysés à la lumière de leurs caractéristiques d'hydrophobicité et d'agglutination (1). Ces recherches exploratoires ont montré que l'analyse protéomique comparative peut être utilisée dans l'identification de profils protéiques caractéristiques d'une propriété probiotique chez une espèce donnée. De tels profils sont susceptibles de servir de marqueurs bactériens d'une telle propriété.

2.4 Inactivation de gènes

Dans les techniques décrites précédemment, l'identification d'un gène ou d'une protéine d'intérêt en lien avec l'activité des probiotiques aboutit à la comparaison de sa séquence avec celles disponibles dans les banques de données internationales. En général, le gène (la protéine) identifié(e) présente des similitudes avec un gène (une protéine) d'un autre micro-organisme dont la fonction est établie. Cependant, la séquence étudiée ne présente parfois aucune ressemblance avec des séquences annotées et la fonction de la protéine codée par ce gène reste indéterminée. Dans ces deux types de situation, il reste nécessaire soit de confirmer expérimentalement la fonction biologique identifiée par similarité, soit de la caractériser. La technique de l'inactivation de gènes (*knock-out*) permet l'obtention d'un organisme transgénique n'exprimant plus le gène d'intérêt. Le phénotype de ce mutant, à qui il manque une fonction, donne alors des indications sur le rôle de la protéine codée par le gène étudié.

Concrètement, l'inactivation d'un gène implique une transformation génétique de la souche bactérienne considérée au cours de laquelle un transgène est intégré dans la séquence du gène d'intérêt. Pour ce faire, le gène d'intérêt est modifié *in vitro*, à l'aide d'enzymes de

restriction, en y plaçant une séquence codant pour un gène de sélection. Ainsi, la traduction du gène d'intérêt donnera une protéine incomplète et inactive. Cette construction est alors introduite dans l'organisme par transformation. Les cellules transformées sont ensuite séparées des autres cellules à l'aide de l'agent sélectif présent dans le milieu et leur phénotype peut ainsi être analysé (304).

Bien que cette technique cherche à établir une relation de causalité entre le gène d'intérêt et la fonction de la protéine qu'il encode, l'interprétation est parfois compliquée par la pluralité des effets qu'occasionne la mutation chez la bactérie : plusieurs caractères phénotypiques peuvent alors être modifiés. Cette pléiotropie n'est cependant pas surprenante : une protéine agit rarement seule mais s'inscrit généralement dans un réseau complexe de voies métaboliques ; les conséquences de son inactivation peuvent de ce fait être multiples. De plus, selon leur localisation dans la cellule, certaines protéines peuvent avoir plusieurs rôles, telles l'énolase et la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), enzymes glycolytiques d'ordinaire situées dans le cytosol des bactéries et qui agissent comme des adhésines si exportées à leur surface. On parle alors de protéines multifonctionnelles (ou *moonlighting proteins*) (132).

Il n'est resté pas moins que l'inactivation des gènes est une approche qui a largement contribué à la compréhension des déterminants des propriétés probiotiques. Dernier maillon d'une analyse descendante allant d'une représentation globale de l'organisme étudié à la description particulière d'une protéine et de sa fonction, elle est la clé de voûte de la caractérisation moléculaire du potentiel probiotique, comme illustré dans une étude récente menée chez *B. breve* et utilisant successivement : (i) le séquençage complet du génome d'une souche d'intérêt ;(ii) son analyse *in silico* comparativement aux génomes des autres souches de bifidobactéries; (iii) l'hybridation génomique comparative de 18 isolats de l'espèce *B. breve* ; (iv) l'analyse transcriptomique comparative de la souche d'intérêt après colonisation stable chez la souris; et (v) l'inactivation d'un gène supposé essentiel chez cette bactérie pour coloniser durablement l'intestin murin et confirmé comme tel (230).

3. Gènes et molécules impliqués dans les propriétés et activités des probiotiques

La caractérisation moléculaire des bactéries d'intérêt probiotique implique, en lien avec leur définition, d'identifier à la fois les facteurs promoteurs de la colonisation de l'hôte (facteurs d'adaptation) et ceux contribuant directement à l'amélioration de sa santé (facteurs probiotiques). Dans le premier cas, l'examen porte aussi bien sur les processus de résistance des bactéries aux stress rencontrés dans le tractus digestif, l'adaptation de leur métabolisme à l'environnement nutritionnel de l'hôte, que sur les déterminants de leur adhésion à la muqueuse intestinale ; dans le second, les investigations concernent un des trois mécanismes d'action communément attribués à ces bactéries que sont : (i) l'inhibition des pathogènes et la restauration de l'homéostasie microbienne, (ii) la protection de l'épithélium intestinal, et (iii) la modulation des réponses immunitaires (171) (Figure 4). Comme nous l'avons vu précédemment, la génomique fonctionnelle associée à l'inactivation de gènes sont, à l'heure actuelle, les meilleurs outils pour mettre à jour ces facteurs. A ce titre, seules les études s'appuyant sur des mutants ciblant un gène ou un opéron en particulier ont été rapportées ci-après. Celles-ci ont porté principalement sur les lactobacilles, les bifidobactéries n'ayant pas fait l'objet d'autant d'intérêt, en raison principalement de difficultés inhérentes à l'inactivation de leurs gènes (327). Toutefois, les récents progrès réalisés en vue d'améliorer l'efficacité des transformations génétiques des bifidobactéries devraient permettre de réduire cet écart (238, 349).

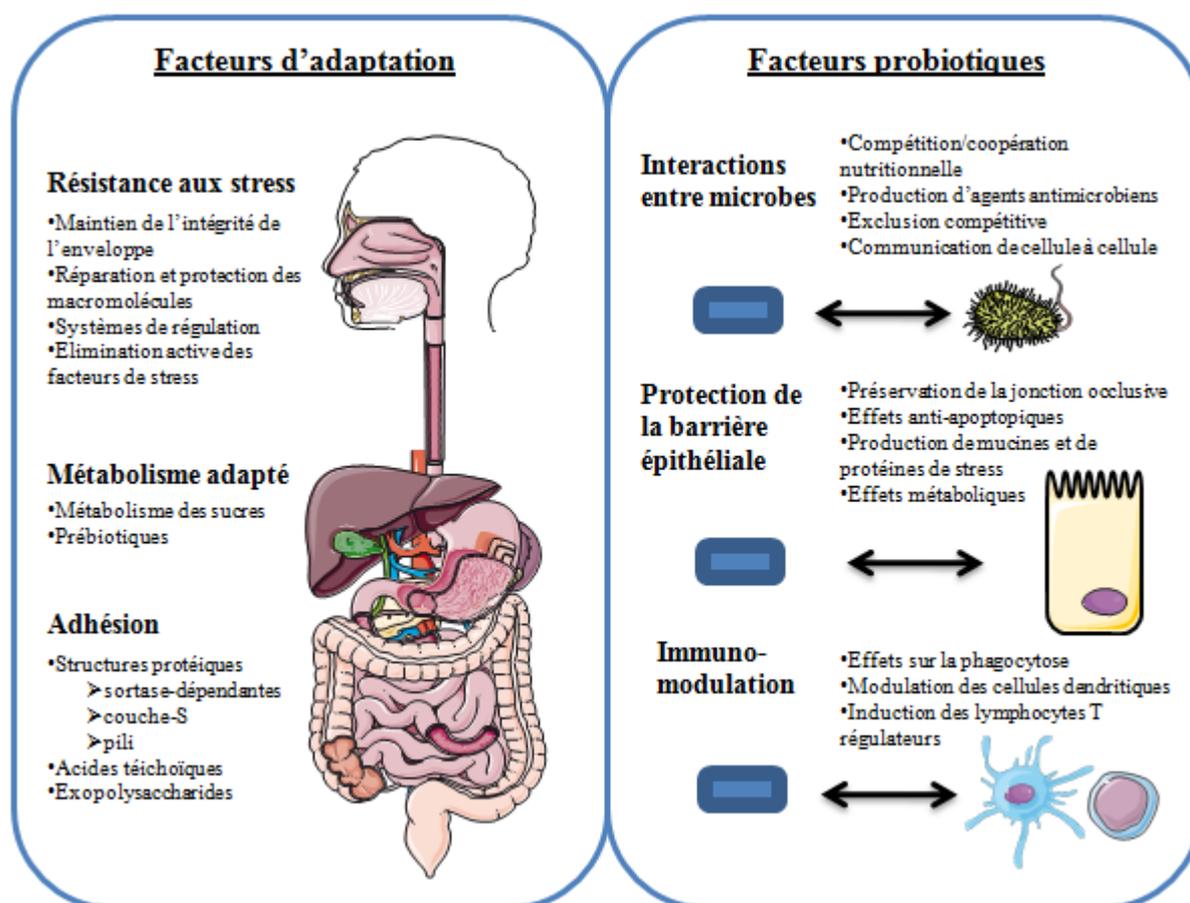


Figure 4. Mécanismes d'action des probiotiques. Source (171).

3.1 Survie et maintien des probiotiques chez l'hôte : les facteurs d'adaptation

3.1.1 Mécanismes de résistance aux stress

Les données relatives aux mécanismes de résistance aux stress des probiotiques sont abondantes (21, 66, 71, 324). Malgré l'hétérogénéité des conditions expérimentales (conditions de culture, types et intensité du stress, souches, temps d'exposition...), des traits communs peuvent être dégagés. Il apparaît ainsi que certains facteurs, tels le maintien de l'intégrité de l'enveloppe, et la protection ou réparation des macromolécules, contribuent de manière générique à la résistance aux stress; d'autres relèvent de mécanismes spécifiques, comme la détection des marqueurs de stress et l'élimination des molécules toxiques (Tableau 3).

Tableau 3. Gènes de lactobacilles impliqués dans la résistance aux stress sur la base d'analyses mutationnelles.

Mécanisme	Micro-organisme	Gène	Stratégie d'identification	Fonction présumée	Phénotype du mutant	Source
Maintien de l'intégrité de l'enveloppe cellulaire	<i>L. acidophilus</i> NCFM	<i>cfa</i>	Approche spécifique	Synthétase d'acides gras cyclopropaniques	Sensibilité accrue à l'acidité	(156)
		<i>slpA</i>	Approche spécifique	Protéine de couche-S	Résistance accrue à la bile et réduite au stress osmotique	(156)
		<i>cdpA</i>	Analyse <i>in silico</i>	Division cellulaire et séparation des protéines	Résistance accrue à la bile et réduite au stress osmotique	(5, 156)
	<i>L. reuteri</i> ATCC55730	lr1516	Analyse transcriptomique	Possible estérase impliquée dans la biosynthèse du peptidoglycane	Sensibilité accrue à l'acidité et à la bile	(331, 341)
	<i>L. reuteri</i> 100-23	<i>dltA</i>	Approche spécifique	D-alanylation des acides téichoïques	Adaptation réduite à l'acidité	(335)
<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>dltD</i>	Approche spécifique	D-alanylation des acides téichoïques	Sensibilité accrue à l'acidité	(251)	
Protection et réparation des macromolécules	<i>L. plantarum</i> WCFS1	<i>clpC</i>	R-IVET	Clp ATPase (chaperonne)	Persistance réduite <i>in vivo</i>	(36, 39)
	<i>L. reuteri</i> ATCC55730	<i>clpL</i>	Analyse transcriptomique	Clp ATPase (chaperonne)	Sensibilité accrue à l'acidité et à la bile	(331, 341)
	<i>L. reuteri</i> 100-23	<i>msrB</i>	IVET	Méthionine sulfoxyde réductase	Persistance réduite <i>in vivo</i>	(333, 334)
	<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>luxS</i>	Approche spécifique	Cycle d'activation des méthyles	Persistance réduite <i>in vivo</i>	(170)
Systèmes de régulation à deux composants	<i>L. acidophilus</i> NCFM	LBA1524	Analyse <i>in silico</i>	Histidine protéine kinase	Sensibilité accrue à l'acidité	(15)
		LBA1430	Analyse transcriptomique	Histidine protéine kinase	Sensibilité accrue à la bile	(254)
		LBA1431	Analyse transcriptomique	Régulateur de réponse	Sensibilité accrue à la bile	(254)
		LBA1432	Analyse transcriptomique	Inconnue (similaire à RelA/SpoT)	Sensibilité accrue à la bile	(254)
	<i>L. sakei</i> 23K	<i>rrp-1</i>	Approche spécifique	Régulateur de réponse	Sensibilité accrue à l'acidité	(226)
		<i>rrp-48</i>	Approche spécifique	Régulateur de réponse	Sensibilité accrue à l'acidité	(226)
Élimination active des facteurs de stress	<i>L. acidophilus</i> NCFM	<i>gadC</i>	Analyse <i>in silico</i>	Antiporteur glutamate/ γ -amino-butyrates	Sensibilité accrue à l'acidité	(14)
		LBA0867	Analyse <i>in silico</i>	Régulateur transcriptionnel	Sensibilité accrue à l'acidité et à la bile	(14)
		LBA0995	Analyse <i>in silico</i>	Perméase d'acides aminés	Sensibilité accrue à l'acidité et à la bile	(14)
		LBA0996	Analyse <i>in silico</i>	Ornithine décarboxylase	Sensibilité accrue à l'acidité mais meilleure résistance à la bile	(14)
		LBA1427	Analyse transcriptomique	Possible oxidoréductase	Tolérance accrue à la bile	(254)
		LBA1428	Analyse transcriptomique	Inconnue (similaire protéines rédox)	Tolérance accrue à la bile	(254)
		LBA1429	Analyse transcriptomique	Transporteur multidrogues	Sensibilité accrue à la bile	(254)
	<i>L. plantarum</i> WCFS1	<i>copA</i>	R-IVET	ATPase transportant les ions cuivre	Colonisation réduite de l'intestin murin	(36, 39)
	<i>L. reuteri</i> ATCC55730	lr1265	Analyse transcriptomique	Transporteur multidrogues	Adaptation réduite à la bile	(341)
		lr1584	Analyse transcriptomique	Transporteur multidrogues	Adaptation réduite à la bile	(341)

3.1.1.1 Maintien de l'intégrité de l'enveloppe

Différentes macromolécules constituant la paroi et la membrane cellulaires des bactéries contribuent au maintien de l'intégrité de la cellule stressée. L'analyse phénotypique d'un mutant de la souche *L. acidophilus* NCFM affecté dans sa capacité à synthétiser les phospholipides de la membrane a notamment montré une sensibilité accrue de la bactérie au stress acide (156). Chez cette même souche, l'inactivation d'une enzyme promouvant la division cellulaire et supposée modifier la paroi, a à la fois amélioré sa résistance aux sels biliaires et réduit sa tolérance à un stress osmotique (5, 156). Ces effets antagonistes pourraient être liés à une structure immature de la paroi du mutant. Des phénotypes similaires ont été observés suite à l'inactivation d'une protéine de surface ou couche -S (*S-layer protein*) de cette même bactérie (156). De plus, les esters D-alanyliques d'acides téichoïques, polymères amphiphiles s'étendant à travers la couche de peptidoglycane de la paroi jusqu'à la surface cellulaire, jouent un rôle déterminant dans la préservation de la cellule à pH acides et en présence de bile (234). A ce titre, deux gènes de l'opéron *dlt* (*dltA* et *dltD*), qui encode quatre protéines responsables de la substitution de ces acides par la D-alanine, se sont avérés essentiels chez *L. reuteri* 100-23 (335) et *L. rhamnosus* GG (251) pour coloniser le tractus gastro-intestinal murin et faire face à un choc acide, respectivement. Enfin, une protéine fixatrice de pénicilline (*penicillin-binding protein* [PBP]) impliquée dans la biosynthèse du peptidoglycane est apparue indispensable à la souche *L. reuteri* ATCC 55730 pour résister au stress acide (331) et biliaire (341).

3.1.1.2 Réparation et protection des protéines

La protection et la réparation des macromolécules est généralement assurée par des protéines chaperonnes. Les chaperonnes interviennent en effet dans le repliement de protéines néo-synthétisées, la protection et la réparation des protéines dénaturées, et leur dégradation quand la perte de fonctionnalité est irréversible. A ce titre, elles participent activement à la réponse et à l'adaptation bactérienne aux stress environnementaux, en particulier les stress acide (179, 275) et biliaire (254, 276).

Deux études ont pu démontrer le caractère essentiel de l'activité des Clp ATPases pour faire face à ce type de stress. Cette catégorie de chaperonnes cible spécifiquement les protéines mal-repliées en vue d'une dégradation par la Clp peptidase. Chez *L. reuteri* ATCC 55730, l'inactivation de la ClpL s'est soldée par une baisse significative du taux de survie de la bactérie après incubation à pH 2,7 (331) ou dans un milieu contenant 0,3% de bile (341). Chez *L. plantarum* WCFS1, un gène codant pour la ClpC s'est vu surexprimé après

transit de la bactérie dans l'appareil digestif murin (39). De plus, la persistance *in vivo* d'un mutant auquel cette protéine faisait défaut a diminué de 10 à 100 fois par rapport à la souche sauvage (36).

Outre les chaperonnes, d'autres protéines sont susceptibles de contribuer à la préservation des macromolécules dans des situations de stress. Tel est le cas des enzymes du cycle d'activation des groupements méthyles, en lien étroit avec le métabolisme du glutathion, un biomarqueur du stress oxydatif (342). Pour partie induit par l'action délétère des sels biliaires (21), le stress oxydatif représente en effet une source supplémentaire d'agression des bactéries dans le tractus gastro-intestinal. A ce titre, l'enzyme LuxS, qui catalyse la conversion de S-ribosylhomocystéine en homocystéine dans le précédent cycle, semble essentielle pour la survie de *L. rhamnosus* GG *in vivo* (170). Par ailleurs, une étude menée sur *L. reuteri* 100-23 rapporte la surexpression d'un gène encodant une méthionine sulfoxyde réductase (Msr) après passage de la bactérie dans le tractus gastro-intestinal murin (334). Par son action, la Msr s'oppose à la perte d'activité biologique des protéines causée par l'oxydation de la méthionine en méthionine sulfoxyde, contribuant ainsi à la protection des bactéries contre le stress oxydatif. Cette action protectrice de la Msr a été confirmée chez *L. reuteri* par la construction d'un mutant dont la capacité de survie chez la souris était significativement affectée (333).

3.1.1.3 Systèmes de régulation à deux composants

Dans un environnement hostile, il est capital pour leur survie que les bactéries puissent à la fois détecter spécifiquement les différents facteurs de stress auxquels elles sont soumises et fournir une réponse adaptée à ces stimuli. Bien que ces mécanismes ne soient pas bien connus chez les lactobacilles et les bifidobactéries, ils impliquent souvent des systèmes de régulation à deux composants (SRDC). Ceux-ci sont constitués de deux protéines et mettent en jeu un transfert de phosphate pour la transduction du signal. Il s'agit : (i) d'une protéine kinase, appelée senseur, généralement située au niveau de la membrane, et qui s'autophosphoryle en réponse à un signal ; et (ii) d'un régulateur de réponse sur lequel est transféré le groupe phosphate à partir du senseur qui contrôle son activité. Ce dernier possède un domaine de fixation à l'ADN et régule sa transcription (301).

Le rôle clé de deux régulateurs de réponse dans la tolérance à l'acidité a été mis en évidence chez *L. sakei* 23K : l'inactivation des gènes *rrp-1* et *rrp-48* l'a dans les deux cas rendue plus sensible aux pH acides (226). De même, deux protéines kinases, LBA1524 et

LBA1430, se sont avérées stratégiques chez *L. acidophilus* NCFM dans sa lutte contre des stress acide (15) et biliaire (254), respectivement. Cette seconde protéine appartient à un opéron de huit gènes codant pour un SRDC, un transporteur, une oxydoréductase, et quatre protéines aux fonctions inconnues. Des mutations dirigées de la protéine kinase, du régulateur de réponse, du transporteur et d'une des protéines inconnues se sont toutes traduites par une perte de tolérance de la bactérie à la bile. A l'inverse, les mutations ciblant les autres gènes de cet opéron se sont soldées par une amélioration de sa résistance aux sels biliaires (254). Ces éléments montrent l'importance de cet opéron dans les processus de tolérance à la bile mis en œuvre par *L. acidophilus* NCFM.

3.1.1.4 Elimination des molécules toxiques

Les bactéries ont également élaboré de nombreuses stratégies pour transporter et éliminer les différents facteurs de stress qu'elles rencontrent dans le tractus digestif. Chez les lactobacilles et bifidobactéries, différentes études ont souligné le rôle capital des ATPases, des réactions de décarboxylation des acides aminés, et du transport et de l'hydrolyse de la bile dans ces processus.

Deux ATPases semblent constituer des facteurs d'adaptation décisifs pour les candidats probiotiques. La première (CopA), supposée transporter les ions cuivre, est essentielle à la survie de *L. plantarum* WCFS1 dans l'intestin murin (36). La fonction exacte de ce transporteur reste néanmoins indéterminée. La seconde (F1F0-ATPase) est un transporteur de protons qui catalyse aussi bien la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique en utilisant la force motrice transmembranaire, que l'hydrolyse de l'ATP, générant ainsi un gradient transmembranaire de protons (324). Il a été montré que l'expression de l'opéron qui encode cette pompe à proton est induite par un pH acide et un stress biliaire chez *L. acidophilus* NCFM (165) et *L. plantarum* WCFS1 (37), respectivement. Bien qu'aucun transgène spécifique de cette ATPase n'ait été construit, un mutant spontané de *B. animalis* ssp. *lactis* IPLA 4549 résistant à la bile a permis de confirmer l'implication de cette pompe à protons dans la tolérance à ce stress, via le maintien de l'homéostasie du pH interne (277).

Les systèmes de décarboxylation des acides aminés servent également de pompe à proton. Ils sont constitués d'une ou plusieurs enzymes décarboxylase qui convertissent leur substrat en un dérivé aminé et en CO₂ (ou en bicarbonate) et d'un antiporteur qui échange l'acide aminé contre le dérivé aminé produit. La décarboxylation de la lysine, de l'arginine et du glutamate prédomine dans l'acido-tolérance (31). Des inactivations successives de gènes

ont ainsi révélé l'importance d'une ornithine décarboxylase, d'une perméase, d'un antiporteur glutamate/ γ -amino-butyrates, et d'un régulateur transcriptionnel similaire au système de décarboxylation du glutamate chez *Lactococcus lactis*, dans la tolérance de *L. acidophilus* NCFM à l'acidité (14).

Certaines bactéries utilisent des systèmes à efflux de la famille des transporteurs multidrogues pour exporter la bile (21). Le rôle d'un de ces transporteurs a déjà été discuté précédemment comme membre d'un système de régulation déterminant pour la tolérance à la bile de *L. acidophilus* NCFM (254). Par ailleurs, une analyse transcriptomique menée chez *L. reuteri* ATCC 55730 a identifié deux loci codant pour de tels transporteurs, lr1265 et lr1584, dont l'expression a été induite suite à un stress biliaire (341). Si leur inactivation successive n'a pas diminué la capacité de la souche à survivre face à ce stress, les mutants ont en revanche perdu leur capacité de croissance dans un milieu supplémenté en bile. Ces deux transporteurs paraissent donc avoir un rôle crucial dans l'adaptation de la souche à la bile (341).

Enfin, plusieurs souches des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont capables d'hydrolyser les sels biliaires conjugués (22). Cette capacité est due à des enzymes spécifiques, les hydrolases de sels biliaires (HSB), qui catalysent l'hydrolyse de la liaison amide entre la partie stéroïdienne des acides biliaires et les acides aminés qui servent à leur conjugaison. Elles sont généralement retrouvées chez des micro-organismes isolés du tractus digestif des mammifères. Toutefois, le rôle précis des HSB dans la survie de ces bactéries *in situ* reste inconnu, les différentes analyses mutationnelles réalisées à ce jour n'ayant pas donné de résultats probants (81, 167, 211).

3.1.2 Adaptation à l'environnement nutritionnel de l'hôte

Outre leur aptitude à résister aux stress, la capacité qu'ont les souches à s'adapter à leur environnement nutritionnel conditionne fortement leur survie et temps de résidence dans les différents micro-habitats de l'appareil digestif. Les sources principales d'énergie et de carbone dont disposent les bactéries évoluant dans l'intestin sont, d'une part, des sucres simples facilement assimilables pour la partie haute, et d'autre part, des sucres complexes non digestibles pour la partie basse, ces derniers provenant soit du régime alimentaire de l'hôte soit des mucines. Dès lors, le côlon apparaît comme une niche écologique adaptée aux bifidobactéries, leurs génomes comportant divers opérons impliqués dans la dégradation des

polysaccharides. Au contraire, les compartiments proximaux de l'appareil digestif semblent plus favorables aux lactobacilles riches en transporteurs de sucres (99).

3.1.2.1 Importance du métabolisme des sucres

Différentes analyses génomiques comparatives ont mis en évidence la diversité et la disparité des ressources génétiques des bactéries lactiques pour transporter et utiliser les sucres (177, 240). Aussi, le métabolisme des sucres constitue un facteur clé dans l'adaptation réussie de souches de bifidobactéries aux stress acide (275) et biliaire (276). Le caractère essentiel de certains de ces gènes pour la persistance des bactéries dans le tractus gastro-intestinal a pu être confirmé *in vivo* (Tableau 4).

Tableau 4. Gènes de lactobacilles impliqués dans le métabolisme actif des sucres chez l'hôte et des oligofructosides *in vitro* sur la base d'analyses mutationnelles.

Micro-organisme	Gène	Stratégie d'identification	Fonction présumée	Phénotype du mutant	Source
<i>L. acidophilus</i> NCFM	<i>bfrA</i>	Analyse <i>in silico</i>	β -fructosidase (métabolisme des FOS)	Capacité réduite à être cultivé avec des FOS	(17)
	<i>msmE</i>	Analyse <i>in silico</i>	ABC transporteur	Capacité réduite à être cultivé avec des FOS	(17)
<i>L. johnsonii</i> NCC533	LJ1654-1656	CGH et analyse transcriptomique	PEP-PTS transporteur	Persistance réduite dans l'intestin murin	(81)
<i>L. paracasei</i> 1195	<i>fosE</i>	Analyse transcriptomique	β -fructosidase (métabolisme des FOS)	Capacité réduite à être cultivé avec des FOS	(113)
<i>L. plantarum</i> WCFS1	<i>pts14C</i>	R-IVET	Cellobiose PTS	Colonisation réduite de l'intestin murin	(36, 39)
<i>L. reuteri</i> TMW1.106	<i>inu</i>	Approche spécifique	Inulosucrase	Colonisation réduite de l'intestin murin	(336)
	<i>gfta</i>	Approche spécifique	Glucosyl-transférase	Colonisation réduite de l'intestin murin	(336)

Un des systèmes majeurs de transport des sucres à travers la membrane cytoplasmique est le PEP-PTS (système de phosphotransférase dépendant du phosphoénol-pyruvate), qui couple la phosphorylation du sucre avec son transport. Les transporteurs de la famille PTS sont responsables de l'absorption de plusieurs sucres permettant un métabolisme rapide. En particulier, le génome de *L. johnsonii* NCC533 comporte un opéron de trois gènes codant pour un PEP-PTS relatif au transport du mannose. Cet opéron, dont l'expression est induite après transit de la bactérie dans l'appareil digestif murin, s'est révélé être déterminant pour la persistance de la souche *in vivo*. Aussi, l'absence de cet opéron chez *L. johnsonii* ATCC 33200 pourrait expliquer ses performances écologiques plus faibles chez la souris par rapport à la NCC533 (80, 81). De même, une analyse mutationnelle menée chez *L. plantarum*

WCFS1 a confirmé l'importance d'un système PTS spécifique du cellobiose dans la persistance de la souche dans l'intestin murin (36).

Par ailleurs, certains lactobacilles sont capables de synthétiser des homopolysaccharides (HoPS), les glucanes et les fructanes, à partir du saccharose sous l'action d'enzymes extracellulaires, les glycosyltransférases et fructosyltransférases, respectivement. Ces HoPS sont susceptibles de servir de réserve d'énergie pour les bactéries évoluant dans des environnements appauvris en sucres, ce qui peut s'avérer utile dans le tractus digestif où la disponibilité des substrats est sujette à des changements (106). Chez *L. reuteri* TMW1.106, l'inactivation alternée d'une fructosyltransférase et d'une glycosyltransférase a réduit dans les deux cas la capacité de la souche à coloniser le tractus digestif murin (336). Cependant, il est difficile de distinguer les rôles spécifiques des HoPS dans le métabolisme des sucres et dans les mécanismes d'adhésion.

3.1.2.2 Amélioration de la persistance par les prébiotiques

Comme nous l'avons vu précédemment, l'aptitude à fermenter certains sucres joue un rôle clé dans colonisation compétitive et durable de l'hôte par les probiotiques. Le concept de prébiotique s'appuie précisément sur ce constat. Un prébiotique est un ingrédient alimentaire non digestible qui stimule de manière sélective au niveau du côlon la multiplication ou l'activité d'un nombre limité de groupes bactériens susceptibles d'améliorer la physiologie de l'hôte (110). Les prébiotiques peuvent ainsi être administrés soit seuls, soit en association avec des probiotiques : on parle alors de synbiotiques. De fait, les groupes bactériens visés par les prébiotiques sont principalement les bifidobactéries, au point que les mots « prébiotique » et « bifidogène » sont souvent considérés comme synonymes. A ce jour, le degré d'évidence de la capacité bifidogène varie considérablement entre les différents glucides indigestibles. Les seuls véritables consensus concernent certains fructanes (oligofructosides (FOS) et inuline) et les oligogalactosides (GOS) dont les propriétés prébiotiques sont clairement démontrées chez l'adulte et chez le nouveau-né (75, 314).

L'une des clés susceptibles de répondre à la question de la spécificité des populations cibles serait l'élucidation des mécanismes explicitant l'effet bifidogène. Etonnamment, ces mécanismes sont peu étudiés et peu discutés dans la littérature. Dans les rares cas contraires, l'effet bifidogène induit par les fructanes est présenté comme découlant logiquement de la faculté des bifidobactéries à utiliser ces composés glucidiques. Or, cette aptitude est inégalement retrouvée chez les différentes espèces (268). De plus, tandis que l'analyse

génomique comparative des souches de bifidobactéries actuellement séquencées donne un aperçu des déterminants potentiels de cette spécificité, aucune démonstration probante n'a pour le moment été effectuée (177).

Outre les bifidobactéries, certains lactobacilles sont également capables de fermenter des prébiotiques comme les FOS. Cependant, cette propriété semble propre à la souche (148), et les mécanismes qui sous-tendent le métabolisme des FOS commencent tout juste à être percés (Tableau 4). L'implication de deux gènes du probiotique *L. acidophilus* NCFM dans le métabolisme des FOS a ainsi pu être démontrée par analyse mutationnelle. Ceux-ci encodent un transporteur de protéines affines aux substrats et une β -fructosidase. Leur inactivation s'est traduite par une incapacité des mutants à être cultivés en présence de FOS comme seule source de glucides (17). Une autre β -fructosidase s'est révélée indispensable à la souche *L. paracasei* 1195 pour se développer sur un milieu équivalent (113). Malgré l'intérêt de ces études *in vitro* pour comprendre les systèmes bactériens d'utilisation des FOS, l'application de ces prébiotiques en vue d'améliorer la survie de ces probiotiques *in vivo* doit encore être validée.

3.1.3 Facteurs d'adhésion

En comparaison avec l'état actuel des connaissances concernant les bactéries pathogènes chez l'homme, la compréhension des processus d'adhésion des souches probiotiques à la muqueuse intestinale et leurs récepteurs en est encore à ses débuts. En effet, malgré le nombre important d'études menées pour clarifier les mécanismes moléculaires des interactions probiotique-hôte, beaucoup de difficultés restent, comme évoqué auparavant, à surmonter : les protocoles de mesure de l'adhésion bactérienne ne sont pas encore standardisés ; le nombre de génomes séquencés parmi les souches probiotiques est limité ; l'analyse mutationnelle de certaines souches (comme les bifidobactéries) est difficile ; des marqueurs fiables des cellules hôte, permettant de contrôler leur colonisation par les bactéries probiotiques, manquent (326). Toutefois, certains facteurs intervenant dans l'adhésion à différentes parties de la muqueuse ont été caractérisés en détail (Tableau 5).

Les facteurs de surface de la famille des protéines sortase-dépendantes (PSD) sont souvent associés aux propriétés d'adhésion des probiotiques. Les PSD comportent un peptide signal N-terminal pour le transport à travers la membrane plasmique et un motif d'ancrage C-terminal (LPxTG) reconnu spécifiquement par les sortases, clivé et lié de façon covalente au peptidoglycane de la paroi bactérienne. Plusieurs PSD sont, à ce jour, apparues comme des

Tableau 5. Gènes de bifidobactéries et de lactobacilles impliqués dans les processus d'adhésion sur la base d'analyses mutationnelles

Facteurs d'adhésion	Micro-organisme	Gène	Stratégie d'identification	Fonction présumée	Phénotype du mutant	Source
Protéines de surface	<i>L. acidophilus</i> NCFM	<i>cdpA</i>	Analyse <i>in silico</i>	Enzyme intervenant dans la biosynthèse de la paroi et la division cellulaire	Adhésion réduite aux Caco-2	(5)
		<i>fbpA</i>	Analyse <i>in silico</i>	Adhésine potentielle de la fibronectine	Adhésion réduite aux Caco-2	(40)
		<i>mub</i>	Analyse <i>in silico</i>	Adhésine potentielle du mucus	Adhésion réduite aux Caco-2	(40)
		<i>slpA</i>	Approche spécifique	Protéine de couche-S	Adhésion réduite aux Caco-2	(40)
	<i>L. plantarum</i> WCFS1	<i>lp_2940</i>	R-IVET	Protéine sortase-dépendante de la paroi	Persistance réduite dans le tractus digestif murin	(36, 39)
		<i>msa</i>	CGH	Adhésine spécifique du mannose	Adhésion réduite au mannose (test d'agglutination aux levures)	(259)
		<i>srtA</i>	Analyse <i>in silico</i>	Sortase	Adhésion réduite au mannose (test d'agglutination aux levures)	(259)
	<i>L. reuteri</i> 100-23	<i>lsp</i>	Criblage de phages avec un antisérum	Protéine de surface	Persistance réduite dans le tractus digestif murin	(333)
	<i>L. salivarius</i> UCC118	<i>lspA</i>	Analyse <i>in silico</i>	Protéine de surface ; adhésine potentielle du mucus	Adhésion réduite aux Caco-2 et HT-29	(325)
	Pili	<i>B. breve</i> UCC2003	Bbr_0132-0138 (<i>tad₂₀₀₃</i>)	Analyse <i>in silico</i> , CGH, transcriptomique	Cluster génétique intervenant dans la biosynthèse d'un pilus de type IVb	Colonisation réduite du tractus gastro-intestinal murin
<i>L. rhamnosus</i> GG		<i>spaC</i>	Analyse <i>in silico</i>	Adhésine du mucus incorporée dans un pilus	Adhésion réduite au mucus humain	(147)
Acides téichoïques	<i>L. reuteri</i> 100-23	<i>dltA</i>	Approche spécifique	D-alanylation des acides téichoïques	Formation réduite de biofilm <i>in vivo</i>	(325)
	<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>dltD</i>	Approche spécifique	D-alanylation des acides téichoïques	Formation accrue de biofilm sur du polystyrène	(226)
EPS	<i>L. johnsonii</i> NCC533	LJ1021-1035	CGH et analyse transcriptomique	Cluster génétique intervenant dans la biosynthèse d'EPS	Persistance légèrement prolongée dans l'intestin murin	(81)
	<i>L. plantarum</i> WCFS1	<i>lama</i>	Analyse <i>in silico</i>	Régulateur de réponse d'un SRDC impliqué dans le métabolisme des EPS et des protéines membranaires	Formation réduite de biofilm sur support en verre	(302)
	<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>weIE</i>	Approche spécifique	Glycosyltransférase	Adhésion et formation de biofilm accrues.	(173)
		<i>wzb</i>	Approche spécifique	Phosphotyrosine phosphatase impliquée dans biosynthèse d'EPS.	Formation altérée de biofilm sur du polystyrène.	(174)

déterminants de la capacité d'adhésion de diverses souches de lactobacilles. Parmi celles-ci, la protéine de type lectine, spécifique du mannose, Msa, de *L. plantarum* WCFS1 (259) et la protéine Mub de *L. acidophilus* NCFM (40) ont été identifiées comme adhésines du mucus : elles partagent un domaine commun de 50 acides aminés décrit comme MucBP (MUCin-Binding Protein) dans la base de données Pfam (PF06458). Ce domaine se retrouve d'ailleurs dans de nombreuses protéines bactériennes (326). Une autre PSD caractérisée chez *L. salivarius* UCC118, la LspA (*large surface protein A*), s'est révélée active dans l'adhésion de cette souche au mucus et aux cellules épithéliales (57, 325). L'analyse de la base de données Pfam y a révélé huit domaines MucPB. De même, une PSD de type Lsp comportant 4 domaines MucPB s'est révélé être nécessaire à la souche *L. reuteri* 100-23 pour une bonne persistance dans l'intestin murin (333). Aussi, l'inactivation de sortases chez *L. salivarius* UCC118 (325) et *L. plantarum* WCFS1 (259) s'est traduite par une diminution de la capacité d'adhésion des souches, confirmant la nécessaire association des PSD avec ces enzymes pour assurer leur fonctionnalité.

Un autre type de protéines s'est révélé important dans le processus d'adhésion de certaines souches probiotiques : les protéines de surface ou couche S (S-layer). Cette couche est formée par des assemblages monomoléculaires paracritallins de protéines ou de glycoprotéines à la surface des bactéries, apportant rigidité à la structure cellulaire. Du fait de sa structure cristalline, la couche-S est composée de pores de taille et de morphologie identiques. Les sous-unités protéiques qui la constituent 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. Les fonctions proposées incluent : la détermination de la forme cellulaire, un rôle protecteur, le piégeage de molécules, un site d'adhésion de coenzymes, un rôle d'adhésion cellulaire ou encore de reconnaissance de surface. L'incidence de deux protéines de la couche-S, CdpA et SlpA, sur la capacité d'adhésion de *L. acidophilus* NCFM aux Caco-2 a notamment pu être démontrée à l'aide de mutants. Ces protéines, ajoutées à la PSD discutée ci-dessus et à une adhésine de la fibronectine (FbpA), élèvent au nombre de quatre les facteurs d'adhésions identifiés chez cette souche probiotique.

Récemment, des pili ont pour la première fois été évoqués dans les mécanismes d'adhésion d'un lactobacille au mucus, *L. rhamnosus* GG (147), et dans les processus de colonisation du tractus gastro-intestinal murin par une bifidobactérie, *B. breve* UCC2003 (230). Les pili sont des structures filiformes composées de centaines de copies d'une sous-unité protéique structurale. Des adhésines peuvent être associées à cette sous-unité protéique

majeure ou à des composés fimbriaux mineurs et ainsi se retrouver sur l'extrémité des pili ou sur toute leur longueur, comme rapporté chez *L. rhamnosus* GG pour des adhésines du mucus humain (147). D'une manière générale, les pili adhèrent aux domaines oligosidiques des récepteurs glycoprotéiniques ou glycolipidiques (147, 316) et sont présentés comme le premier vecteur pour l'implantation des bactéries pathogènes gram-positives chez l'hôte, préalablement à une association plus forte et plus localisée à la surface des cellules épithéliales (313). Bien que les épitopes spécifiques auxquels ces structures protéiques adhèrent n'aient pas été déterminés, les pili identifiés chez ces deux souches témoignent d'un mécanisme jamais décrit à ce jour quant à l'adhésion des bactéries probiotiques aux tissus de l'hôte.

Les facteurs d'adhésion mentionnés précédemment sont tous de nature protéique et contribuent de manière spécifique à la capacité d'adhésion des cellules bactériennes. Toutefois, d'autres molécules telles que les acides téichoïques et les EPS ont aussi été impliquées dans l'adhésion de certaines souches, à travers notamment la formation de biofilms. Nous avons vu précédemment l'importance des gènes *dltA* et *dltD*, qui participent à la D-alanylation des acides téichoïques, dans la tolérance au stress acide de *L. reuteri* 100-23 et *L. rhamnosus* GG, respectivement (cf. §3.1.1). En fait, les analyses phénotypiques des mutants correspondants ont également fait état d'une diminution de la formation de biofilm dans le tractus digestif murin pour *L. reuteri* 100-23 (335), et d'une augmentation de cette formation de biofilm sur du polystyrène chez *L. rhamnosus* GG (251). Cette pléiotropie laisse suggérer une contribution non spécifique des acides téichoïques à la capacité d'adhésion de ces souches, notamment à travers leur caractère hydrophobe fonction de leur degré de substitution par la D-alanine (77).

Les EPS, quant à eux, semblent jouer un rôle singulier dans la formation de biofilms. En participant à des interactions intercellulaires, ils peuvent faciliter la formation de microcolonies, sachant que cette dernière dépend également d'autres facteurs intrinsèques et extrinsèques (34). Chez *L. plantarum* WCFS1, un régulateur de réponse *lamA* associé à un SRDC contrôlant la production d'EPS s'est révélé capital pour la formation de biofilm (302). De plus, deux analyses mutationnelles ont confirmé le lien étroit entre la capacité de la souche *L. rhamnosus* GG à synthétiser des EPS et son aptitude à former ces biofilms (173, 174). Cette faculté peut représenter un avantage compétitif pour la colonisation de l'hôte. A l'inverse, les EPS peuvent également avoir un effet négatif sur les propriétés d'adhésion des cellules en masquant les adhésines de surface et limitant leur activité, comme suggéré par une

étude menée chez *L. johnsonii* NCC533 où l'inactivation d'un ensemble de gènes intervenant dans la biosynthèse d'EPS a amélioré la persistance de la souche *in vivo* (81).

3.2 Effets positifs sur la santé : les facteurs probiotiques

Bien que les facteurs d'adaptation soient primordiaux à la colonisation de l'hôte, étape essentielle dans l'interaction micro-organisme-hôte, le but ultime des investigations moléculaires relatives aux probiotiques reste la caractérisation des déterminants à l'origine des effets positifs des micro-organismes sur la santé de l'hôte : les facteurs probiotiques. Trois modes d'actions sont généralement distingués. D'abord, certains probiotiques peuvent exclure de manière compétitive ou inhiber des bactéries pathogènes. Ces effets anti-pathogènes sont de loin les plus étudiés (171, 286). Un second mode d'action repose sur l'amélioration de la fonction barrière de l'épithélium intestinal à travers la modulation de divers systèmes de signalisation et conduisant notamment à la production de mucus (195) ou de défensines (281, 282), au renforcement de la jonction occlusive (287), ou encore à la prévention de l'apoptose, c'est-à-dire de la mort cellulaire programmée (345). Le troisième mécanisme concerne la modulation de la réponse immunitaire, et se traduit à la fois par des effets localisés et systémiques (298). Ces catégories ne sont cependant pas nécessairement dissociées : un même facteur probiotique peut intervenir selon différents mécanismes, parfois imbriqués, pour exercer son action bénéfique sur la santé (172). Si de multiples études se sont intéressées à ces mécanismes, seul un nombre limité d'entre elles a pu démontrer l'existence de déterminants de l'activité probiotique en recourant à des mutants (Tableau 6).

3.2.1 Effets anti-pathogènes

3.2.1.1 Exclusion compétitive

Certaines bactéries pathogènes, comme *E. coli* à pili de type I, se fixent sur les récepteurs oligosaccharidiques de la muqueuse intestinale pour coloniser l'hôte (32). Ces récepteurs sont également susceptibles d'être utilisés par les bactéries probiotiques, avec pour conséquence l'inhibition de l'implantation des pathogènes. Ce mécanisme d'exclusion compétitive nécessite l'administration préventive du probiotique, la substitution d'un pathogène par un probiotique n'étant généralement pas observée (171). A ce titre, les différentes adhésines décrites précédemment participent vraisemblablement à ce mécanisme

particulier de l'activité probiotique, quand bien même des phénomènes non-spécifiques d'encombrement stérique auraient également lieu. Mack *et al.* ont notamment montré qu'un mutant spontané de la souche *L. plantarum* 299V ayant une expression réduite en adhésine spécifique du mannose, Msa, adhérait dix fois moins aux cellules épithéliales de type HT29 que la souche sauvage, et avait perdu la capacité d'inhiber l'adhésion d'*E. coli* entérohémorragiques (ECEH) (195). Bien que ces résultats n'aient pas été validés par une analyse mutationnelle ciblée, il est probable que cette adhésine constitue un facteur d'exclusion compétitive.

3.2.1.2 Production de bactériocines

La capacité des bactéries probiotiques d'exclure de manière compétitive les espèces indésirables est certainement accrue par la production de toxines antimicrobiennes. Parmi celles-ci, les plus souvent rencontrées sont les bactériocines, peptides antimicrobiens aux fonctions très diverses et que l'on retrouve chez les principales espèces bactériennes, en particulier chez les bactéries lactiques. Les bactériocines 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 manière à ne pas altérer significativement la flore microbienne endogène de l'hôte.

La majorité des bactériocines isolées chez les bactéries lactiques sont de petits peptides (< 10 kDa) résistants à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés et présentant comme unique modification post-traductionnelle possible des ponts disulfures (bactériocines de classe II selon la classification de Klaenhammer (155)). Elles agissent sur la membrane cytoplasmique des cellules sensibles en dissipant la force proton motrice (PMF) par la formation de petits pores transmembranaires. 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 (54). La production des bactériocines est contrôlée par un mécanisme appelé *quorum sensing* (QS) ou détection du quorum, par lequel l'expression des bactériocines repose sur la production de peptides phéromones ou facteurs d'induction (159).

Tableau 6. Gènes de bifidobactéries et de lactobacilles codant pour des fonctions probiotiques sur la base d'analyses mutationnelles.

Fonction probiotique	Micro-organisme	Gène	Stratégie d'identification	Fonction présumée	Phénotype du mutant	Source
Effets anti-pathogènes	<i>L. acidophilus</i> NCFM	<i>labT</i>	Analyse <i>in silico</i>	Transporteur ABC de lactacine B	Activité bactériocinogène réduite contre des souches phylogénétiquement proches	(86)
	<i>L. reuteri</i> ATCC55730	<i>luxS</i>	Approche spécifique	Rôle direct dans la production d'AI-2 et indirect pour les mécules antagonistes de type AI-3	Capacité réduite à inhiber l'expression des gènes de virulence d' <i>E. coli</i> pathogènes (type ECEH)	(141)
	<i>L. reuteri</i> 100-23	<i>luxS</i>	Approche spécifique	Rôle direct dans la production d'AI-2 et indirect pour les mécules antagonistes de type AI-3	Capacité réduite à induire l'expression des gènes de virulence d' <i>E. coli</i> pathogènes (type ECEH)	(308)
	<i>L. salivarius</i> UCC118	<i>abpT</i>	Analyse <i>in silico</i>	Transporteur ABC de la bactériocine Abp118	Efficacité réduite contre les infections murines par <i>L. monocytogenes</i>	(65)
Effet anti-apoptotique	<i>B. longum</i> JCM1275 ^T	BL0033	Analyse <i>in silico</i>	Transporteur ABC de sucres (dont fructose et mannose)	Diminution du catabolisme du fructose <i>in vitro</i> et de la production d'acétate <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> ; absence d'effet protecteur contre l'apoptose de Caco-2 induite par <i>E. coli</i> O157:H7 <i>in vitro</i> ; taux de survie réduit des souris ayant ingéré le mutant préalablement à une infection par <i>E. coli</i> O157:H7	(104)
Immuno-modulation	<i>L. casei</i> Shirota	<i>cpsIA-J</i>	Analyse <i>in silico</i>	Biosynthèse d'un polysaccharide de haut poids moléculaire associé à la paroi	Augmentation du potentiel pro-inflammatoire d'un modèle de macrophage murins	(348)
	<i>L. plantarum</i> NCIMB8826	<i>dltB</i>	Approche spécifique	d-Alanylation des acides téichoïques	Amélioration du potentiel anti-inflammatoire de PBMC <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> chez des modèles murins de colite et de perception de la douleur viscérale.	(91, 120)
	<i>L. plantarum</i> WCFS1	lp_2991	Analyse <i>in silico</i> et CGH	Régulateur transcriptionnel impliqué potentiellement dans la glycosylation des acides téichoïques	Amélioration du potentiel anti-inflammatoire des PBMC <i>in vitro</i> .	(217)
		<i>plnEFI</i>	Analyse <i>in silico</i> et CGH	Production de la plantarine EF et d'une protéine d'immunité spécifique	Amélioration du potentiel anti-inflammatoire des PBMC <i>in vitro</i> .	(217)
		<i>plnG</i>	Analyse <i>in silico</i> et CGH	Transporteur ABC de plantaricine	Amélioration du potentiel anti-inflammatoire des PBMC <i>in vitro</i> .	(217)
<i>plnGHST UVWX</i>	Analyse <i>in silico</i> et CGH	Opéron impliqué dans le transport de peptides phéromones et de plantaricine	Amélioration du potentiel anti-inflammatoire des PBMC <i>in vitro</i> .	(217)		

Plusieurs analyses mutationnelles de lactobacilles affectés dans leur capacité à produire des bactériocines ont été rapportées dans la littérature. Chez *L. acidophilus* NCFM, un opéron impliqué dans la sécrétion de lactacine B et incluant un SRDC et un transporteur ABC ont été identifiés (86). L'inactivation du transporteur (encodé par le gène *labT*) a complètement inhibé l'activité bactériocinogène de la bactérie contre des souches phylogénétiquement proches comme *L. delbrueckii* ATCC 4796. Cependant, aucune expérience *in vivo* incluant des pathogènes n'a été réalisée à ce jour pour compléter ces résultats encourageants. A l'inverse, Corr *et al.* ont récemment démontré l'activité antimicrobienne chez la souris d'une bactériocine produite par *L. salivarius* UCC118 (65). Précisément, il s'agit d'une bactériocine de classe II à large spectre, Abp118, dont la production est régulée par un peptide d'induction, AbpIP. Dans le but de déterminer son efficacité contre *L. monocytogenes*, le gène *abpT*, qui encode un transporteur de l'Abp118, a été inactivé, empêchant la sécrétion de bactériocine par la souche. Aussi, le mutant obtenu était-il incapable de réduire l'infection des souris par *Listeria*, à la différence de la souche sauvage. Afin de confirmer l'implication directe de la bactériocine dans cet effet anti-*Listeria in vivo*, un clone de *L. monocytogenes* résistant à l'action délétère de l'Abp118 a été construit par expression hétérologue de la protéine d'immunité AbpIM spécifique de cette bactériocine. Lors de l'infection de souris par cette souche immunisée, l'effet protecteur de *L. salivarius* UCC118 a disparu, ce qui atteste de l'activité anti-infectieuse de la bactériocine Abp118.

3.2.1.3 Communication de cellule à cellule

Le QS ne contrôle pas uniquement la production des bactériocines : il s'agit d'un mécanisme général de synchronisation de l'expression (ou de la répression) de gènes particuliers au sein d'une population bactérienne, qui implique la capacité de bactéries à communiquer avec leurs congénères via des signaux moléculaires appelés *autoinducers* (AI). Les molécules utilisées dépendent de l'espèce bactérienne considérée et peuvent être regroupées en trois grandes catégories que sont les AI-1, 2 et 3 (303). En particulier les AI-2 appartiennent à la famille des furanosyl borate diesters et agissent comme des signaux universels promouvant la communication interspèce (18). Leur biosynthèse est catalysée par l'enzyme LuxS, qui intervient également dans le cycle d'activation des groupements méthyles, comme mentionné précédemment. A ce jour chez les bactéries lactiques, seule la production d'AI-2 a pu être démontrée pour des souches comme *L. casei* ATCC 393, *L. johnsonii* VPI1088, *L. plantarum* NCIMB8826, et *L. rhamnosus* GG (73).

Récemment, il a été établi que les bactéries peuvent également exploiter les signaux du QS pour communiquer avec l'hôte (133). Cette communication « interrègne » implique à la fois des hormones, produites par les eucaryotes, et des molécules apparentées, secrétées par les bactéries. Une fonctionnalité similaire a notamment pu être attribuée à la norépinéphrine, synthétisée par l'hôte, et à un AI-3 produit par le microbiote : ces signaux moléculaires ont tous deux permis d'activer les gènes de virulence des ECEH, à travers l'induction de l'expression de l'activateur transcriptionnel *ler* (299). Si le mécanisme de régulation de l'AI-3 n'est pas encore bien compris, sa biosynthèse chez les ECEH semble indirectement liée à l'enzyme LuxS, à travers son rôle dans le cycle d'activation des méthyles (337).

De plus, certains lactobacilles se sont avérés capables d'interférer avec ce signal. Le surnageant d'une culture de *L. reuteri* ATCC 55730 a ainsi eu un effet inhibiteur sur l'expression de l'activateur transcriptionnel *ler* des ECEH, à la différence du surnageant du mutant *luxS* correspondant et du milieu de culture seul (141). De même, la souche *L. acidophilus* La-5 a réduit l'expression des gènes de virulence des ECEH (214). Au contraire, le surnageant d'une culture de *L. reuteri* 100-23 a induit l'expression du gène *ler*, cette induction disparaissant complètement pour son mutant *luxS* (308). Pour expliquer ce contraste, Medellin-Penin et son équipe ont émis l'hypothèse d'une production LuxS-dépendante de molécules indéterminées inhibitrices du gène *ler* pour *L. reuteri* ATCC 55730 et *L. acidophilus* La-5, et de molécules de type AI-3 inductrices de ce gène pour *L. reuteri* 100-23 (214). Néanmoins, la pléiotropie des effets liée à une inactivation du gène *luxS* chez ces bactéries risque de compliquer l'identification de tels composés.

3.2.2 Effet anti-apoptotique

Vu la complexité des mécanismes mis en jeu, l'amélioration de la fonction barrière de l'épithélium intestinal est certainement le mode d'action des probiotiques le plus difficile à démontrer. Avec force arguments, une équipe japonaise a récemment proposé un tel mécanisme dans l'effet protecteur de bifidobactéries contre les infections entéropathogènes (104).

En utilisant des modèles axéniques, Fukuda *et al.* ont d'abord corrélé la capacité de bifidobactéries à prévenir la mort de souris infectées par *E. coli* O157:H7 avec leur aptitude à produire et relarguer *in situ* de grandes quantités d'acétate par suite d'un métabolisme efficace des sucres. Les chercheurs ont ensuite démontré comment l'acétate exerce son action sur les cellules épithéliales par induction d'un effet anti-apoptotique bloquant la translocation de

shigatoxine vers le sang. Enfin, ils se sont intéressés aux fondements génétiques de la capacité de certaines bifidobactéries à exercer cet effet protecteur. Une analyse comparative *in silico* des génomes de cinq souches de bifidobactéries a notamment mis en évidence deux transporteurs ABC de sucres propres aux souches ayant une activité protectrice contre les ECEH. Des tests *in vitro* complémentaires ont suggéré l'implication d'un de ces transporteurs, codé par l'opéron BL0033-BL0036, dans l'effet protecteur d'une des souches étudiées contre les infections entéropathogènes, et ce à travers une consommation active de fructose et une production abondante d'acétate. Cette implication a alors été confirmée par analyse mutationnelle.

Cette étude est la première, et à notre connaissance la seule, à avoir mis à jour les bases moléculaires d'un effet probiotique en lien avec l'amélioration de la fonction barrière de l'épithélium intestinal.

3.2.3 Immunomodulation

Les interactions entre les bactéries probiotiques et le système immunitaire de l'hôte sont généralement étudiées sous l'unique angle des effets produits. Ainsi, l'influence particulière de lactobacilles et bifidobactéries sur diverses cellules du système immunitaires tels les macrophages, les cellules dendritiques, et les lymphocytes T régulateurs est largement documentée (171, 177). En revanche, les déterminants bactériens à l'origine de ces effets sont nettement moins bien compris.

La majorité des réponses immunitaires impulsées par les micro-organismes fait intervenir une famille de récepteurs appelés *pattern recognition receptors* ou PRR (216). Ces PRR jouent un rôle clé dans l'immunité innée et reconnaissent les ligands bactériens de surface (comme les lipopolysaccharides, le peptidoglycane, les acides lipotéichoïques, et les protéines de surface) mais aussi certains ligands cytosoliques libérés lors de la lyse cellulaire (comme des fragments d'ADN). Les interactions entre ligands et PRR ne sont cependant pas aussi spécifiques que celles qui lient les antigènes aux anticorps dans le cadre de l'immunité adaptative. En effet, certaines des structures bactériennes présentées précédemment comme ligands sont aussi bien présentes chez les pathogènes que chez les non-pathogènes ou les probiotiques. Il semble donc que le système immunitaire soit à même de différencier les informations relatives à ces interactions et de les intégrer, afin d'aboutir à une réponse unique. Cette intégration doit permettre d'assurer la nécessaire régulation entre tolérance aux bactéries commensales et réactivité contre les pathogènes. Un dérèglement dans ce processus est

susceptible d'entraîner une activation incontrôlée des réponses inflammatoires, comme observé dans un certain nombre de MICI (216).

Les acides téichoïques étant abondamment présents à la surface des lactobacilles et bifidobactéries et spécifiques des bactéries à Gram positif, ils ont fait l'objet d'une attention particulière dans la recherche des déterminants de l'interaction des probiotiques avec les PRR. En particulier, l'influence de la composition de ces acides sur la modulation de la réponse immunitaire a été étudiée par analyse mutationnelle. Chez *L. plantarum* NCIMB8826, l'inactivation du gène *dltB*, qui participe à la D-alanylation des acides téichoïques, s'est traduite par une diminution substantielle de leur teneur en D-alanine au profit du glucose. Sur le plan fonctionnel, le mutant a significativement accru le niveau de cytokine anti-inflammatoire IL-10 sécrétée par les PBMC *in vitro* et eu un effet protecteur dans un modèle murin de colite, contrairement à la souche sauvage (120). En revanche, si l'inactivation du gène *dltD* chez *L. rhamnosus* GG a permis d'éliminer complètement la D-alanine des acides téichoïques, elle n'a pas modifié les niveaux cytokiniques produits par les PBMC (251). Ce contraste peut être en partie expliqué par les différences de composition des acides aussi bien pour les souches sauvages que pour les mutants (120, 251). A noter également que chez *L. plantarum* WCFS1, l'inactivation d'un régulateur transcriptionnel potentiellement impliqué dans la glycosylation des acides téichoïques a amélioré le potentiel anti-inflammatoire des PBMC (217). Au final, il semble que les mutations affectant la composition des acides téichoïques peuvent également impacter d'autres éléments de l'enveloppe cellulaire des bactéries comme les protéines de surface, les EPS et/ou le peptidoglycane. Seule une caractérisation moléculaire détaillée de différents mutants pourrait donc permettre de comprendre le rôle précis des acides téichoïques et de leur composition dans la capacité des probiotiques à moduler la réponse immunitaire.

Dans la recherche des déterminants moléculaires de l'activité probiotique interagissant avec les PRR, les EPS, et en particulier les hétéropolysaccharides, font également figure de bons candidats. Ils affichent en effet un haut degré de complexité et une grande diversité parmi les espèces bactériennes couramment utilisées chez les candidats probiotiques. L'implication de ces EPS dans la formation de biofilms et l'avantage compétitif qu'ils peuvent représenter pour coloniser l'hôte ont déjà été mentionnés auparavant. Si aucune interaction spécifique entre un EPS et un PRR particulier n'a pu être établie, il semble cependant que ces polysaccharides puissent jouer un rôle dans l'immunomodulation. Chez *L. casei* Shirota, un mutant affecté dans sa capacité à produire de l'EPS a augmenté le potentiel

pro-inflammatoire d'un modèle de macrophages murins (348). Ces résultats indiquent que l'EPS de *L. casei* Shirota peut modérer les réactions immunitaires excessives faisant intervenir les macrophages.

L'implication d'autres ligands bactériens comme les protéines multifonctionnelles EF-Tu et GroEL, et certains fragments du peptidoglycane et de l'ADN dans les processus d'immunomodulation a également été proposée à travers différentes études ne s'appuyant pas sur des mutants (171). Récemment, l'activité immunomodulatrice d'une bactériocine a aussi été rapportée (217). Une équipe hollandaise a en effet corrélié les niveaux d'IL-10 et IL-12 secrétés par des cellules dendritiques *in vitro* après stimulation par 42 souches de *L. plantarum* avec l'occurrence dans leur génome d'un cluster codant pour la production et le transport de la plantaricine EF. Aussi, trois mutants successifs de *L. plantarum* WCFS1 affectés dans leur capacité à produire ou sécréter cette plantaricine ont amélioré le potentiel anti-inflammatoire de PBMC *in vitro*, confirmant les prévisions faites *in silico*. Bien que les mécanismes sous-jacents à cette stimulation n'aient pas été déterminés, il est possible que cette bactériocine interagisse avec des PRR spécifiques des cellules dendritiques de type *toll-like receptors* ou TLR, comme révélé pour différents peptides antimicrobiens d'origine humaine (105, 346).

4. Positionnement des travaux vis-à-vis de l'état de l'art

Ce tour d'horizon bibliographique montre que les bases moléculaires qui différencient les probiotiques du reste de la flore microbienne sont encore mal comprises. En particulier, les tests *in vitro*, traditionnellement utilisés pour la sélection préliminaire des souches d'intérêt probiotique, ne permettent pas d'élucider les mécanismes qui sous-tendent leur action. Une étape majeure a cependant été franchie avec l'avènement des technologies de séquençage à haut débit. Celles-ci ont favorisé l'apparition de stratégies et d'outils innovants pour l'analyse des déterminants des propriétés des probiotiques et de leurs activités. Parmi ces outils, la protéomique comparative représente une approche prometteuse pour la caractérisation moléculaire du potentiel probiotique. Des profils protéiques spécifiques ont en effet pu être observés chez des souches de *L. plantarum*, en lien avec leur différence de capacité d'adhésion aux glycoprotéines du mucus. Toutefois, aucun autre facteur d'adaptation à l'hôte ni aucune activité probiotique n'ont été étudiés à l'échelle d'une espèce par l'intermédiaire de cette approche. De plus, aucune corrélation directe n'a pu être établie entre les niveaux d'expression de protéines particulières et le phénotype d'une souche vis-à-vis d'une propriété probiotique donnée. L'établissement d'une telle corrélation est pourtant essentiel pour l'identification de biomarqueurs bactériens du potentiel probiotique.

Le présent travail a pour objectif de généraliser l'approche analytique protéomique développée au laboratoire pour l'étude de l'adhésion de *L. plantarum*, à l'examen des deux autres facteurs principaux d'adaptation à l'hôte (tolérance à l'acidité et à la bile) et de deux activités probiotiques majeures (réduction du cholestérol et immunomodulation). L'utilisation de deux modèles bactériens ayant une grande diversité phénotypique et génotypique, *L. casei* et *L. plantarum*, doit permettre de distinguer les déterminants inter- et intra-spécifiques de ces propriétés. Celles-ci sont évaluées par des tests *in vitro* en vue d'une caractérisation phénotypique préliminaire des souches. Cette étude se propose également de valider les profils caractéristiques mis en évidence comme marqueurs potentiels des caractères étudiés en analysant un plus grand nombre de souches que dans les travaux initiaux et en utilisant des

outils statistiques adaptés. Dans le cadre de la tolérance à l'acidité et à la bile, l'analyse de l'influence d'un stress sur les niveaux d'expression des marqueurs potentiels doit permettre de vérifier l'implication effective de certaines protéines dans la réponse des souches à l'action délétère d'un pH bas et des sels biliaries, respectivement.

L'originalité de ce travail tient au fait qu'il s'agit de la première étude transversale comparant les profils protéomiques de souches d'intérêt probiotique en relation avec leurs propriétés et activités évaluées *in vitro*. Ces travaux permettent d'évaluer les limites d'utilisation de la protéomique comparative en tant que stratégie analytique globale visant à sélectionner des souches probiotiques et à élucider certains de leurs mécanismes d'action.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. Caractérisation préliminaire des souches utilisées

1.1 Identification et culture

Les souches des espèces *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus plantarum* utilisées dans cette étude ainsi que leurs sources sont répertoriées dans le Tableau 7. Elles sont cultivées dans du bouillon MRSC, consistant en un milieu de Man-Rogosa-Sharpe (Biokar, Beauvais, France) supplémenté avec 0,05% (m/v) de monochlorhydrate de L-cystéine (Sigma, St. Louis, MO, USA), et incubées à 37°C en conditions anaérobies (Anaerocult A System, Merck, Darmstadt, Allemagne). Pour que les cellules soient dans le même état physiologique, trois repiquages successifs (1% v/v ; 12-15 h) sont réalisés avant leur utilisation à des fins expérimentales.

L'isolement des souches probiotiques à partir de produits commerciaux a été effectué sur gélose MRSC. Les lactobacilles présumés ont été identifiés phénotypiquement par galerie API 50 CHL (Biomérieux, Craponne, France) et génotypiquement par séquençage partiel de l'ARNr 16S, en utilisant les amorces 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 926r (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'), comme décrit précédemment (249). Une amplification PCR multiplexe ciblant le gène *recA* a également été réalisée pour les souches présumées de *L. plantarum* afin de les différencier des espèces phylogéniquement proches *L. pentosus*, *L. plantarum* ssp. *paraplantarum* et *L. plantarum* ssp. *argenteratensis* (35). Les souches types de *L. pentosus* (CIP 103156^T), *L. paraplantarum* (CIP 104668^T) et *L. plantarum* subsp. *argenteratensis* (CIP 108320^T) ont été incluses comme contrôles. L'identification des souches de *L. casei* a, quant à elle, été confirmée par amplification PCR de la région intergénique 23S-5S (55). La souche type de l'espèce phylogéniquement proche *L. rhamnosus* (CIP A157^T) a été incluse comme contrôle.

Tableau 7. Souches bactériennes étudiées dans ces travaux

Espèce bactérienne	Souche	Caractéristique	Source
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 334	collection	American Type Culture Collection
	ATCC 393 ^T	collection	American Type Culture Collection
	CRL 431	probiotique	Chr. Hansen, Hørsholm, Danemark
	DN-114 001	probiotique	Danone, Paris, France
	F-19	probiotique	Chr. Hansen, Hørsholm, Danemark
	Rosell-215	probiotique	Lallemand Inc., Montréal, Canada
	Shirota	probiotique	Yakult Honsha Co. Ltd, Tokyo, Japon
<i>Lactobacillus plantarum</i>	299V	probiotique	Probi, Lund, Suède
	CECT 748 ^T	collection	Collection Espagnole de Cultures Types
	CECT 749	collection	Collection Espagnole de Cultures Types
	CECT 4185	collection	Collection Espagnole de Cultures Types
	CIP A159	collection	Collection de l'Institut Pasteur
	LC 56	isolat	Ensilage de maïs
	LC 660	isolat	Ensilage d'herbes
	LC 800	isolat	Raifort
	LC 804	isolat	Olives
	WHE 92	isolat	Fromage de Munster

1.2 Résistance à l'acidité

La résistance des souches à l'acidité a été évaluée d'après leur capacité à survivre dans une solution simulant le jus gastrique, comme décrit précédemment (103). Les cellules provenant de 10 mL d'une culture en début de phase stationnaire (12-15 h) sont collectées par centrifugation ($6000 \times g$ pendant 5 min à 4°C), lavées deux fois au PBS, puis remises en suspension dans 10 mL d'une solution peptonée à 7,5 g/L (Biokar). Un millilitre de cette suspension bactérienne (densité bactérienne d'environ 10^9 UFC/mL) est ajouté dans un tube contenant 9 mL d'une solution peptonée à 7,5 g/L 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

(1,6 ; 1,8 ; et 2,0) avec du HCl. Un aliquote de cette solution est prélevé après 20 min d'incubation à 37°C. La viabilité des bactéries après exposition à pH acide est déterminée par des dilutions en cascade et un dénombrement sur boîtes de Pétri sur milieu MRSC gélosé. Trois expériences indépendantes sont réalisées et chaque test est effectué en triplicat. Les souches sont comparées pour les 3 pH testés sur la base de leur taux de survie, rapport de la population bactérienne dénombrée après 20 min de choc acide et de celle d'un témoin non traité (populations exprimées en log).

1.3 Tolérance à la bile

La tolérance des souches aux sels biliaires a été déterminée en évaluant leur capacité à être cultivées en présence bile bovine (Oxgall, Sigma), comme décrit précédemment (137). Des cultures en début de phase stationnaire (12-15 h) sont inoculées (0,1% v/v) dans du bouillon MRSC contenant 0,5%, 1,0%, 1,8% et 3,6% (m/v) de bile bovine pour les souches de *L. plantarum*, et 0,1%, 0,5%, 1,0%, 2,0% et 4,0% pour les souches de *L. casei*. Ces milieux de culture, ainsiensemencés à hauteur d'environ 10^6 UFC/mL, sont ensuite déposés dans les puits d'une microplaque et recouverts d'une couche de paraffine liquide pour assurer l'anaérobiose. La plaque est incubée à 37°C et l'absorbance à 600 nm (A_{600}) suivie toutes les 30 min pendant 48 h dans un lecteur automatique de microplaques (Bioscreen C MBR, Oy Growth Curves AB, Helsinki, Finlande). Trois expériences indépendantes sont réalisées et chaque test est effectué en triplicat. Les souches sont comparées sur la base de leur taux de croissance maximum dans chaque bouillon, relativement à un témoin cultivé en l'absence de bile.

1.4 Adhésion au mucus

Les tests d'adhésion aux glycoprotéines du mucus ont été réalisés selon la méthodologie utilisée par Izquierdo *et al.* (138). Les cellules issues d'une culture en début de phase stationnaire (12-15 h) sont collectées par centrifugation ($6000 \times g$ pendant 10 min à 4°C), lavées deux fois, puis remises en suspension dans un tampon PBS. Les suspensions bactériennes sont ajustées à une A_{600} de $2,00 \pm 0,05$ et incubées avec 100 μ M de diacétate de

carboxyfluoresceine ou cFDA (Sigma) pendant 30 min à 37°C pour le marquage des bactéries. Les bactéries sont ensuite lavées deux fois et remises en suspension dans du PBS. La suspension bactérienne de travail marquée est alors ajustée à une A_{600} de $0,50 \pm 0,05$.

De la mucine d'estomac porcine (Sigma) est diluée dans du PBS à une concentration de 0,5 mg/mL et 100 μ L de cette solution sont déposés dans les puits d'une microplaque en polystyrène (Sterilin, Staffordshire, UK). Les microplaques sont incubées pendant la nuit à 4°C pour permettre la fixation de la couche de mucine à la surface des puits. Afin d'enlever la partie du mucus n'ayant pas adhéré à la surface, les puits sont lavés deux fois avec 200 μ L de PBS. Cent microlitres de la suspension bactérienne de travail marquée sont ajoutés à chaque puits et les plaques sont incubées à 37°C pendant 1 h. Ensuite, les puits sont lavés deux fois avec 200 μ L de PBS pour enlever les bactéries qui n'ont pas adhéré. Les bactéries adhérentes sont lysées par incubation à 37°C pendant 1 h avec 200 μ L d'une solution à 1% (m/v) de dodécyl sulfate de sodium (SDS) dans du NaOH 0,1 M. La fluorescence contenue dans les bactéries adhérentes est alors libérée dans la solution et le contenu des puits est transféré dans une microplaque opaque pour l'analyse de fluorescence. La fluorescence est mesurée à 485 et 510 nm comme longueurs d'onde respectives d'excitation et d'émission à l'aide d'un fluorimètre Viktor 3 (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA). Le résultat obtenu est représentatif de la population de bactéries adhérentes par puits.

Parallèlement, 100 μ L de la suspension bactérienne de travail marquée sont lysés par incubation à 37°C pendant 1 h avec 100 μ L d'une solution 2% (m/v) de SDS dans du NaOH 0,2 M. La fluorescence est 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 retrouvée après adhésion à la mucine, par rapport à la fluorescence de la suspension bactérienne ajoutée par puits. Elle est déterminée en trois expériences indépendantes réalisées en triplicat et est utilisée pour la comparaison des souches.

1.5 Réduction du cholestérol

L'activité hypocholestérolémiant des souches a été évaluée en analysant leur aptitude à diminuer la teneur en cholestérol d'un milieu de culture modifié. Dix millilitres d'un bouillon MRSC contenant 0,5% (m/v) de bile bovine (Sigma) sont supplémentés stérilement avec une

forme hydrosoluble de cholestérol (polyoxyéthanyl-cholesteryl sebacate ; Sigma), de façon à atteindre une concentration finale de 100 mg/L de cholestérol dans le milieu, inoculés (1% v/v) par une culture en début de phase stationnaire (12-15 h), et incubés à 37°C en anaérobiose pendant 15 h. Les cellules sont ensuite collectées par centrifugation ($6000 \times g$ pendant 10 min à 4°C) et lavées trois fois avec du PBS. Des aliquotes du milieu de culture avant et après croissance bactérienne, des eaux de lavage et des cellules sont prélevés afin de déterminer leurs teneurs respectives en cholestérol.

Un étalon interne (5β -cholestan- 3α -ol, 95% ; Sigma) est introduit à hauteur de 100 mg/L dans chacun des échantillons prélevés. Les stérols sont ensuite récupérés par saponification des lipides à la potasse éthanolique, extraction liquide-liquide à l'heptane, et évaporation à sec du solvant sous flux d'azote, comme décrit précédemment (111). Ils sont convertis en triméthylsilyl esters pour les rendre plus volatils et dilués dans de l'isooctane selon la procédure utilisée par Julien-David *et al.* (145). Les solutions obtenues sont alors dosées par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Les analyses CPG sont réalisées à l'aide d'une chaîne Varian STAR 3400 (Varian, Les Ulis, France) disposant d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et équipée d'une colonne capillaire DB-5 (phase stationnaire: 5% phényl– 95% diméthylpolysiloxane ; épaisseur : 0,1 μm ; longueur : 30 m ; diamètre interne : 0,25 mm ; J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Les températures de la colonne et de l'injecteur sont maintenues, respectivement, à 280°C et 290°C durant toute l'analyse (16,5 min). Un microlitre d'échantillon est injecté manuellement en mode sans division (*splitless*). De l'hélium (Air Liquide, Paris, France) purifié à 99,9995% est utilisé comme gaz vecteur à un débit de 1 mL/min. L'acquisition et l'analyse des données sont effectuées à l'aide du logiciel Saturn Work Station version 5.11 (Varian).

Les teneurs des différentes fractions sont calculées à partir des aires des pics de cholestérol et de 5β -cholestan- 3α -ol selon la méthode de l'étalonnage interne. Trois expériences indépendantes sont effectuées en triplicat. Le coefficient de réponse relatif du cholestérol vis-à-vis de l'étalon interne est déterminé à l'aide de cinq contrôles indépendants (bouillon MRSC dépourvu de bile, supplémenté à hauteur de 100 mg/L de cholestérol, et non ensemencé). La teneur en cholestérol de la bile bovine est également analysée par l'intermédiaire de trois contrôles supplémentés en bile (0,5% m/v). Les résultats obtenus sont rapportés à la population bactérienne présente dans le milieu en fin de culture, estimée par dénombrement sur boîte de Pétri (milieu MRSC gélosé).

2. Analyse protéomique

Hormis quelques modifications, la majorité des protocoles décrits ci-après reprend les conditions opératoires utilisées par Esther Izquierdo dans sa thèse de doctorat (136). Tous les réactifs ainsi que l'eau utilisés dans cette section sont de qualité adaptée à la pratique de la biologie moléculaire. Les composés dont l'origine n'est pas mentionnée proviennent du même fournisseur : Euromedex, Souffelweyersheim, France.

2.1 Extraction des protéines

Quel que soit le caractère considéré, l'extraction des protéines a systématiquement été réalisée sur des cellules bactériennes cultivées en conditions standards de croissance (MRSC), permettant de mettre en évidence les différences constitutives entre les protéomes des souches étudiées. Concernant les propriétés de résistance aux stress, les protéomes totaux ont également été étudiés en conditions stressantes (stress acide : MRSC ajusté à pH 4,0 avec du HCl pour *L. plantarum* ; stress biliaire : MRSC supplémenté avec 0,5 et 3,6% de bile bovine pour *L. casei* et *L. plantarum*, respectivement), afin d'analyser l'influence du stress sur le niveau d'expression des protéines d'intérêt.

2.1.1 Protéines totales

Dix millilitres d'une culture en début de phase stationnaire (12-20 h selon les souches et les conditions considérées) sont centrifugés ($5000 \times g$ pendant 5 min à 4°C). Les culots bactériens obtenus sont lavés deux fois avec du PBS et remis en suspension dans 2 mL de cette même solution. La suspension bactérienne est alors déposée goutte à goutte dans un bécher contenant de l'azote liquide de manière à constituer des petites billes de glace emprisonnant les bactéries. Celles-ci sont introduites dans un cylindre en polycarbonate équipé d'un pilon en acier inoxydable. Le tout est placé dans un broyeur cryogénique Freezer/Mill 6870 (Spex CertiPrep, Stanmore, Royaume-Uni). Le programme de broyage utilisé inclut une étape d'immersion dans l'azote liquide de 2 min, suivie de trois cycles de broyage (24 impacts par seconde pendant 3 min) entrecoupés par une phase de

refroidissement (1 min). Cette lyse physique des cellules bactériennes permet de libérer les protéines en vue de leur solubilisation dans le tampon de travail.

Le broyat obtenu est transvasé dans un tube conique de 50 mL et laissé décongeler pendant 1 h. Les débris cellulaires insolubles restés en suspension sont centrifugés ($5000 \times g$ pendant 5 min à 4°C) et éliminés par filtration du surnageant sur une membrane Chromafil PET d'une porosité de $0,45 \mu\text{m}$ (Macherey-Nagel). Les protéines solubles contenues dans le filtrat sont précipitées par ajout de 5 volumes d'acétone à -20°C et incubation pendant 2 h à cette même température. Après centrifugation ($12000 \times g$ pendant 15 min à 4°C), les protéines du culot sont purifiées à l'aide d'un réactif commercial à base de phénol et de thiocyanate de guanidine (Trizol, Euromédex), selon le protocole indiqué par le fabricant.

Ce dernier consiste à dissoudre les protéines dans $500 \mu\text{L}$ de Trizol et à ajouter $100 \mu\text{L}$ de chloroforme. Le tout est mélangé à l'aide d'un vortex et incubé pendant 5 min à température ambiante. Dans ces conditions, les protéines et l'ADN se dénaturent et se solubilisent dans la phase organique contenant le phénol et le chloroforme, contrairement aux petites molécules et à l'ARN qui restent solubilisés dans la phase aqueuse. Après centrifugation ($12000 \times g$ pendant 15 min à 4°C), la phase aqueuse est éliminée par pipetage. L'ADN contenu dans la phase organique est ensuite précipité par ajout de $150 \mu\text{L}$ d'éthanol et homogénéisation du mélange par inversion. Après 3 min d'incubation à température ambiante, l'échantillon est centrifugé ($2000 \times g$ pendant 10 min à 4°C) et le surnageant ($\sim 300 \mu\text{L}$ contenant les protéines solubilisées) repris dans un tube conique de 2 mL. Les protéines sont alors précipitées par addition de 5 volumes d'acétone à -20°C et incubation pendant 1 h à cette même température. Après centrifugation ($12000 \times g$ pendant 15 min à 4°C), les culots protéiques obtenus sont lavés trois fois avec un mélange eau/acétone (80/20, v/v) puis dissouts dans $200 \mu\text{L}$ d'une solution tampon (tampon d'électrofocalisation ou IEF) contenant 7 M d'urée, 2 M de thiourée, 4% (m/v) de 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propane-sulfonate (CHAPS) et 20 mM de Tris-HCl ajusté à pH 8,8. Les échantillons sont conservés à -20°C .

2.1.2 Protéines de la paroi cellulaire

Quarante millilitres d'une culture en début de phase stationnaire (12-15 h) sont centrifugés ($5000 \times g$ pendant 5 min à 4°C). Les culots bactériens obtenus sont lavés deux fois avec du PBS et remis en suspension dans 2 mL d'une solution d'extraction dont la composition est adaptée à l'espèce considérée : 100 mM de Tris-HCl à pH 8,0, 5 mM

d'EDTA, et 1 mg/mL de lysozyme (Sigma) pour les souches de *L. plantarum* (138) ; 50 mM de Tris-HCl à pH 8,0, 5 mM de K_2HPO_4 , 1mM d'EDTA, 20% (m/v) de saccharose, 1 mg/mL de lysozyme et 50 U/mL de mutanolysine (Sigma) pour les souches de *L. casei* (61). Le tout est incubé pendant 2 h à 37°C. Cent microgrammes d'une phase échangeuse de cations (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, sont ensuite ajoutés à l'échantillon et le mélange est agité à température ambiante pendant 30 min. Après centrifugation ($2000 \times g$ pendant 2 min à température ambiante), le surnageant est filtré sur une membrane Chromafil PET d'une porosité de $0,45 \mu m$ (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) et les protéines sont précipitées par addition de 5 volumes d'acétone à $-20^\circ C$ et incubation durant 2 h à cette même température. Elles sont alors récupérées par centrifugation ($12000 \times g$ pendant 15 min à $4^\circ C$), purifiées à l'aide du réactif Trizol puis dissoutes dans 100 à 200 μL de tampon IEF, comme décrit précédemment (cf. §2.1.1).

2.1.3 Dosage des protéines

La quantité de protéines déposée sur le gel varie selon le type de protéine considéré, la taille du gel d'électrophorèse choisie, ainsi que la gamme de pH et la coloration utilisées. Aussi, cette quantité doit-elle être rigoureusement identique si l'on souhaite comparer qualitativement et surtout quantitativement les protéomes de souches différentes ou analyser l'influence d'un stress sur l'expression des protéines d'une même souche.

La concentration en protéines des échantillons est déterminée par un dosage colorimétrique à 595 nm utilisant le réactif de Bradford (Bio-Rad Protein Assay ; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Le bleu de Coomassie contenu dans ce réactif acide (0,01% (m/v) bleu de Coomassie G-250, 4,7% (v/v) éthanol, et 8,5% (v/v) acide orthophosphorique) se lie de façon non covalente (ponts hydrogènes, interactions hydrophobes et ioniques) aux protéines, entraînant une modification de sa longueur d'onde maximale d'absorption de 465 nm (couleur rouge-brun du milieu) à 595 nm (couleur bleue du milieu). Les solutions de mesure sont préparées avec 2 μL de HCl 0,1M, 0,5 à 2 μL d'échantillon selon la taille du culot obtenu, et 8 à 9,5 μL de tampon IEF pour atteindre un volume de 12 μL . Un millilitre du réactif de Bradford est ensuite ajouté aux échantillons juste avant analyse, et ce afin d'éviter leur dégradation par un phénomène de précipitation. L'absorbance des solutions à 595 nm est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-2401PC (Shimadzu, Champs sur Marnes, France). Elle est comparée aux valeurs obtenues 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 manière que les échantillons. La gamme étalon est réalisée en duplicat et chaque échantillon en triplicat.

2.2 Séparation des extraits par électrophorèse bidimensionnelle

Les extraits protéiques sont séparés par 2D-PAGE. La combinaison des techniques de focalisation électrique d'une part (première dimension, IEF) et de SDS-PAGE d'autre part (deuxième dimension), permet d'en dresser une cartographie détaillée.

2.2.1 Première dimension : focalisation électrique

La première des séparations s'effectue selon le point isoélectrique, pH auquel la charge électrique globale d'une protéine est nulle. Les extraits protéiques préparés précédemment et conservés à -20°C sont décongelés et dilués dans une solution de solubilisation des protéines adaptée à la 2D-PAGE et comportant : 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. Trois cents microlitres de solution sont ainsi préparés contenant 75 et 150 μg de protéines pour les protéomes de surface et les protéomes totaux, respectivement. La séparation des protéines est réalisée dans un appareil de type Protean IEF Cell (Bio-Rad) sur des bandelettes à gradient de pH immobilisé (ReadyStrip IPG, 17 cm, Bio-Rad) dont la gamme de pH s'étend de 4,0 à 7,0. Ces bandelettes sont composées d'un gel déshydraté de polyacrylamide fixé sur un support solide et comportant des groupements d'acide carboxylique et d'amines tertiaires qui assurent le gradient de pH. Le gel est réhydraté de manière active (50 V) pendant 15 h à température ambiante avec la solution protéique diluée. L'application d'un champ électrique fort permet alors aux protéines de migrer jusqu'au point de pH qui correspond à leur pI. Le programme de voltage appliqué est le même quelle que soit la quantité de protéines déposée et consiste en trois phases : (i) conditionnement (250 V, 500 V, 750 V puis 1000 V à chaque fois pendant 2 h) ; (ii) montée linéaire de 1000 à 10000 V en 5 h ; et (iii) focalisation à 10000 V jusqu'au seuil de $60000 \text{ V} \times \text{h}$. La bandelette est finalement maintenue sous une différence de potentiel de 500 V jusqu'à l'arrêt du programme afin d'éviter la diffusion des protéines au sein du gel. Pendant la migration, l'ampérage maximum toléré est fixé à 50 μA par bandelette et la température est maintenue à 20°C . Une

fois l'IEF terminée, les bandelettes sont soit directement utilisées pour la deuxième dimension soit conservées à -20°C.

2.2.2 Deuxième dimension : SDS-PAGE

La deuxième dimension utilise un gel de polyacrylamide pour séparer les protéines selon leur masse moléculaire. Au préalable, un conditionnement des protéines est réalisé sur les bandelettes focalisées. Ces dernières sont équilibrées 15 min dans 2 mL d'une solution contenant 6 M d'urée, 2% (m/v) de SDS, 375 mM de Tris-HCl ajusté à pH 8,8, 20% (v/v) de glycérol et 130 mM de DTT. Cette étape permet de réduire les protéines en rompant les ponts disulfures et de leur conférer une charge globale négative par saturation du gel en SDS. Les bandelettes sont ensuite placées pendant 20 min dans la même solution en substituant le DTT par de l'iodoacétamide 135 mM. Les protéines sont ainsi alkylées, prévenant leur éventuelle ré-oxydation au cours de l'électrophorèse. Afin de colorer la bandelette et suivre la migration des protéines lors de l'électrophorèse, 50 µL de bleu de bromophénol à 0,05% sont ajoutés à la solution d'alkylation.

Les bandelettes équilibrées sont placées en tête d'un gel de polyacrylamide (12% d'acrylamide) préalablement préparé à l'aide de N,N méthylène bisacrylamide (agent réticulant), et de deux substances réactives qui enclenchent la polymérisation : le TEMED (N,N,N',N'- tétraméthyléthylènediamine) et le persulfate d'ammonium. Un carré de papier imbibé de 5 µL d'une solution d'un marqueur de taille moléculaire Precision Plus Protein (Bio-Rad) est placé à l'extrémité gauche de chaque bandelette. Le tout est pris en masse dans un gel d'agarose (0,5%) à bas point de fusion préparé dans du tampon de migration (décrit ci-après). Les gels sont soumis à un champ électrique dans une cuve d'électrophorèse de type Protean II xi Cell (Bio-Rad) entraînant la migration des protéines chargées négativement de la cathode vers l'anode à travers le polyacrylamide. Ce dernier joue le rôle de tamis moléculaire : les protéines se répartissent le long du trajet de migration en fonction de leur masse moléculaire, les molécules de grande taille migrant plus lentement que les autres. La migration est réalisée dans un tampon constitué de Tris base 25 mM, de glycine 192 mM et de SDS 0,1% (m/v), selon un ampérage constant de 16 mA par gel pendant 30 min puis de 24 mA par gel pendant 4 h 30 environ (jusqu'à ce que le front de migration parvienne à 0,5 cm du bas du gel).

2.3 Analyse des gels

A la fin de l'électrophorèse, les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie colloïdal. Les gels sont d'abord démoulés et plongés pendant au moins 20 min sous agitation lente dans une solution de fixation à 45% de méthanol et 1% d'acide acétique. Ils sont ensuite immergés pendant 12 à 15 h toujours sous agitation lente dans une solution de coloration à 34% (v/v) de méthanol, 17% (m/v) de sulfate d'ammonium, 0,5% (v/v) d'acide acétique, et 0,1% (m/v) de bleu de Coomassie G-250. On procède alors à leur décoloration dans un bain d'eau chaude (55°C, agitation lente). L'eau du bain est changée toutes les 30 min jusqu'à ce qu'elle reste incolore (environ 5 lavages). Les gels sont finalement scannés avec un densitomètre calibré GS-800 (Bio-Rad).

L'analyse qualitative et quantitative des gels s'effectue à l'aide du logiciel PD Quest version 8.0.1 (Bio-Rad). Trois gels issus de cultures indépendantes (réplicats biologiques) sont utilisés par souche et par condition. Seuls les spots protéiques présents ou absents dans les trois gels sont validés et considérés pour la comparaison. Leur intensité est normalisée en la rapportant à l'ensemble des intensités des spots valides, et ce afin de s'affranchir de la variabilité inhérente à certains facteurs expérimentaux : perte d'échantillon au cours des préparations, mauvais transfert des protéines de la première vers la seconde dimension, variations dans la coloration des gels, etc. Dans le cadre de la comparaison des protéomes de souches différentes, une protéine est considérée comme différemment exprimée d'une souche à l'autre quand l'intensité du spot correspondant varie d'au moins le double entre les gels, comme décrit précédemment (138). Pour ce qui concerne l'analyse des modifications des niveaux d'expression des protéines d'une même souche par suite d'un stress acide ou biliaire, une protéine est considérée comme sur- ou sous-exprimée quand l'intensité du spot varie d'au moins 1,5 fois entre les gels, comme défini précédemment (276).

2.4 Digestion trypsique des protéines sélectionnées

Les zones de gels contenant les spots d'intérêt sont excisées et les morceaux obtenus (1 à 4 mm³) décolorés par lavage à l'aide d'un mélange 50/50 (v/v) d'acétonitrile et d'hydrogénocarbonate d'ammonium (NH₄HCO₃) 50 mM. Deux ou trois lavages sont nécessaires suivant l'intensité de la coloration et la taille des spots. Une fois incolores, les

morceaux de gels sont déshydratés par ajout de 50 μL d'acétonitrile, séchés à température ambiante après élimination du surnageant, puis réhydratés avec 25 μL d'une solution de trypsine (Promega, Madison, WI, USA) à 20 ng/ μL dans de l'eau ultrapure. Après 1 h d'incubation à température ambiante, 30 μL d'une solution de NH_4HCO_3 50 mM sont ajoutés et les échantillons sont incubés à 37°C pendant 15 à 18 h sous agitation. Ces conditions permettent la digestion trypsique des protéines, c'est-à-dire l'hydrolyse des liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé basique (lysine ou arginine) engage sa fonction acide. Les surnageants contenant les fragments tryptiques sont ensuite transférés dans des vials pour HPLC préalablement complétés par un insert contenant 0,75 μL d'acide formique. Les vials sont conservés à -20°C avant analyse par spectrométrie de masse.

2.5 Analyse des échantillons par LC-MS/MS

Les fragments tryptiques ont été analysés par LC-MS/MS au Département de Biochimie Analytique du Centre de Pharmacie de l'Université de Groningue (Pays-Bas). Pour ce faire, 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, ce système a été équipé d'une colonne analytique Zorbax 300SBC18 de 150 mm \times 75 μm et 5 μm de granulométrie (Agilent Technologies).

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) et 0,1% d'acide formique suivant un débit de charge de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 4 min. L'élution est réalisée en 24 min à un débit de 300 nL/min avec un gradient de 3 à 60% d'acétonitrile dans de l'eau ultrapure contenant 0,1% d'acide formique. Toutes les 10 injections, un échantillon de 100 fmol de Cytochrome C équin digéré à la trypsine est injecté comme témoin pour le contrôle qualité. L'ionisation est effectuée en mode positif selon la technique *electrospray* (ESI) avec un potentiel de capillaire fixé à 1850 V. Les autres paramètres de voltage sont comme suit : fragmenteur, 150 V ; skimmer : 65 V ; octopôle, 750 V. De l'azote est utilisé pour la désolvatation à un débit de 6 mL/min et une température de 325°C. La fragmentation s'effectue dans une chambre de collision (CID) selon une pente de 4,0 V/100 Da et une compensation (*offset*) de 2,5 V.

L'isolement des ions précurseurs est réalisée en mode intermédiaire (~4 uma). Trois spectres MS/MS sont enregistrés pour les ions précurseurs les plus abondants (dont l'intensité dépasse les 1000 coups). Les données sont collectées en mode centroïde en utilisant un intervalle dynamique de masses de 200 à 2000 m/z et deux vitesses de balayage différentes (0,25 et 1 spectre/s) à la fois en MS1 et en MS/MS. La correction des masses est effectuée à l'aide de masses 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 avec le logiciel MassHunter version B.02.0.197.0 (Agilent Technologies).

2.6 Identification des protéines

Les valeurs de masse obtenues par analyse LC-MS/MS sont comparées à des valeurs enregistrées dans la banque de données protéomiques et génomiques NCBIInr. Ces valeurs sont issues de spectres de masse générés *in silico* à partir des protéines figurant dans ces bases de données. Les génomes de plusieurs souches des espèces *L. casei* et *L. plantarum* étant répertoriés dans la banque NCBIInr, ceux-ci sont pris en compte dans la recherche, ce qui facilite les identifications protéiques. Sur la base du 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, une valeur (ou score) est calculée, qui traduit l'adéquation entre les deux jeux de données. Les scores les plus élevés correspondent aux identifications les plus fiables. Il est ainsi possible de caractériser une protéine connue (soit identifiée, soit répertoriée comme produit d'un gène) uniquement grâce à son spectre de masse.

Deux algorithmes différents, Phenix (Geneva Bioinformatics, Geneva, Suisse) et OMSSA (Open Mass Spectrometry Search Algorithm, (109)), sont utilisés pour effectuer les recherches. Seules les identifications confirmées par les deux méthodes sont validées. Dans les deux cas, les paramètres retenus pour la recherche sont comme suit : version de la base : r. 20090608 ; taxonomie : bactéries ; mode d'enregistrement ESI-Q-TOF ; charge de l'ion parent : +2, +3 (confiance = moyenne) ; phosphorylation, oxydation de méthionines, et carboxyamidométhylation des cystéines comme modifications partielles possibles ; trypsine comme enzyme de digestion ; possibilité de deux clivages manqués ; mode de clivage normal ; tolérance de l'ion parent de 0,6 Da ; seuils des peptides : longueur ≥ 6 acides aminés,

score $\geq 5,0$, identification significative $p \leq 10^{-4}$, recouvrement $\geq 0,2$; séries d'ions identifiées
b, b doublement chargé, y et y doublement chargé ; taux de faux positifs accepté : 5%.

3. Eléments statistiques

3.1 Comparaison de moyennes

Toutes les analyses statistiques relatives à la comparaison de moyennes ont été réalisées à l'aide du logiciel Statgraphics Plus version 5.1 (Manugistics, Rockville, MD, USA).

3.1.1 Classement des souches dans les tests *in vitro*

Pour pouvoir classer les souches suivant un caractère particulier, il faut d'abord s'assurer qu'elles soient, dans leur ensemble, statistiquement différentes ($p < 0,05$) vis-à-vis de ce caractère. Dans ce but, les données servant à la comparaison des souches sont soumises à une analyse de la variance (ANOVA). Pour les expériences où une seule condition est testée (cas de l'adhésion et de la réduction du cholestérol), on procède à une ANOVA à un facteur avec la souche comme unique variable. Pour celles ayant recours à plusieurs conditions (cas de la résistance à l'acidité et de la tolérance à la bile), une ANOVA à deux facteurs est réalisée : la souche, d'une part, et le pH (résistance à l'acidité) ou la concentration en bile (tolérance à la bile) d'autre part, font alors office de variables. En plus de l'effet souche, il est ainsi possible d'évaluer l'effet de ce second facteur et de leur interaction.

Une fois l'effet souche établi par ANOVA (cas de tous les tests *in vitro* considérés dans cette étude au seuil d'erreur α de 5%), un test de comparaison multiple basé sur l'analyse de la plus petite différence significative (LSD) est effectué dans le but d'examiner et de classer les moyennes statistiquement différentes ($p < 0,05$). Les souches sont alors regroupées en sous-ensembles homogènes pouvant servir à l'établissement de phénotypes différents pour le caractère étudié. Sur la base de cette répartition, trois souches aux phénotypes différents sont sélectionnées en vue de l'analyse de leurs protéomes.

3.1.2 Différences d'expression des spots

Les protéomes des trois souches retenues sont comparés deux à deux, spot par spot. Outre les critères de variation des intensités des spots définis dans le § 3.3, on vérifie que ces intensités sont statistiquement différentes ($p < 0,05$). A ce titre, les données sont soumises à un test de Student pour la comparaison d'échantillons indépendants ou appariés, selon que

l'on considère des souches différentes étudiées dans une même condition ou une même souche analysée dans des conditions différentes, respectivement.

Les protéomes des autres souches de l'espèce considérée peuvent également être analysés dans le but de valider les marqueurs potentiels du caractère étudié. Dans ce cas, la comparaison des intensités des spots s'opère par ANOVA à un facteur suivie d'un test LSD, comme décrit précédemment (§ 4.1.1). Elle aboutit à un classement des souches quant aux niveaux d'expression de chacune des protéines d'intérêt.

3.2 Classification hiérarchique

Le partitionnement de données (*cluster analysis*) permet, d'une part, de classer les souches en fonction de leurs profils protéiques, et d'autre part, de regrouper les spots dont la distribution des niveaux d'expression est similaire à travers l'ensemble des gels. Cette classification hiérarchique facilite ainsi la description des données, l'intérêt étant d'obtenir des groupes les plus contrastés possibles. Elle a été réalisée selon l'approche utilisée par Dumas *et al.* (90).

Au même titre que pour l'analyse d'image, seuls les spots présents ou absents dans les gels issus de trois répétitions indépendantes (réplicats biologiques) sont considérés comme fiables pour l'analyse. Les valeurs d'intensité utilisées pour les spots absents correspondent aux valeurs les plus faibles rencontrées dans le gel considéré. L'intensité de chaque spot protéique est divisée par la moyenne des intensités de ce spot pour l'ensemble des gels étudiés. La valeur obtenue est ensuite soumise à une transformation logarithmique en base 2. Les groupes sont alors constitués selon la méthode d'aggrégation de Ward, et la distance qui les sépare est calculée en utilisant la méthode de Pearson, ce qui minimise la variance intra-groupe. L'analyse est réalisée à l'aide du logiciel PermutMatrix (<http://www.lirmm.fr/~caraux/PermutMatrix>, (47)) qui permet de représenter les groupes et leurs distances sous la forme de dendogrammes.

3.3 Test de corrélation de Spearman

Dans la perspective de corréler l'expression de certaines protéines aux phénotypes observés *in vitro*, un test non-paramétrique de Spearman est effectué pour chaque spot différemment exprimé, comme décrit précédemment (102). Ce test permet de calculer le degré de liaison existant entre le classement des souches selon l'intensité du spot protéique considéré et le classement de ces mêmes souches selon le caractère évalué *in vitro*. Il n'est donc réalisable que lorsque l'ensemble des protéomes des souches de l'espèce étudiée ont été analysés (cas du protéome de surface chez *L. plantarum* et du protéome total chez *L. casei*).

Un rang (x_i) est affecté à la souche i sur la base d'une ANOVA à un facteur complétée d'un test LSD portant sur les niveaux d'expression d'un spot protéique particulier ($\alpha = 5\%$). En parallèle un autre rang (y_i) lui est attribué d'après l'analyse de la variance et le test de comparaison multiple des résultats du test *in vitro* évaluant le caractère d'intérêt ($\alpha = 5\%$). Lorsque des souches appartiennent à des groupes homogènes (souches statistiquement *ex-æquo* pour la variable testée, $p < 0,05$), le même rang leur est accordé, moyenne des rangs qui leur aurait été attribués autrement. Le coefficient de corrélation de Spearman (r) est alors calculé comme suit :

$$r = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 (y_i - \bar{y})^2}}$$

La significativité du coefficient de corrélation de Spearman est ensuite testée à travers la variable t , définie par la formule suivante :

$$t = r \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}}$$

n : nombre de souches incluses dans le test ($n=6$ pour *L. casei* et 10 pour *L. plantarum*).

Cette variable suit une loi de Student à $n-2$ degrés de liberté sous l'hypothèse nulle ($r=0$). La significativité du coefficient de corrélation r est alors évaluée par le niveau de confiance (NC) du test d'hypothèse correspondant. On considère que le niveau d'expression d'une protéine peut servir de marqueur du caractère étudié pour $NC \geq 95\%$.

3.4 Analyse factorielle discriminante

Dans le but de discriminer les phénotypes des souches relatifs à un caractère particulier, une analyse factorielle discriminante est réalisée avec le logiciel JMP 5.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) en utilisant les marqueurs identifiés par le test de corrélation de Spearman ($NC \geq 95\%$). Cette analyse permet à la fois de confirmer ces spots comme marqueurs phénotypiques du caractère considéré et d'illustrer les résultats sous forme graphique. Une analyse pas à pas est également effectuée afin d'identifier des variables indépendantes parmi ces marqueurs. La probabilité d'introduction et de rejet d'une variable est fixée à $p < 0,05$.

Chapitre 3 :

Résultats et

discussion

1. Conditions d'application de l'approche

Avec l'essor du marché des probiotiques (161) et la récente entrée en vigueur d'une législation restrictive sur les allégations santé (96), l'accent est aujourd'hui mis sur la recherche de techniques et de stratégies analytiques susceptibles, d'une part, de différencier les souches probiotiques des souches sans bénéfice santé pour l'hôte, et d'autre part, d'élucider certains des mécanismes d'action qui sous-tendent leur activité. Des travaux exploratoires réalisés dans notre laboratoire ont montré que l'analyse protéomique peut être utilisée dans l'identification de profils protéiques caractéristiques d'une propriété probiotique (138). Ces travaux ont permis de définir une stratégie analytique pour la recherche de biomarqueurs bactériens du potentiel probiotique et d'en évaluer la faisabilité technique à travers une application particulière relative aux propriétés d'adhésion de souches de *L. plantarum*.

Les résultats encourageants obtenus au cours de cette phase préliminaire de recherche nous ont conduits à envisager la validation de la méthodologie développée, à travers l'analyse d'autres aspects du concept probiotique. Il s'agit également d'examiner la pertinence et les limites de cette méthode en vue d'une application efficace. Aussi, compte-tenu du caractère général de l'approche utilisée, est-il nécessaire de définir le cadre précis de son évaluation (hypothèses de travail, conditions analytiques, et champ d'investigation).

1.1 Principe de l'approche

L'approche consiste à classer différentes souches d'une même espèce selon une propriété bactérienne ou une activité probiotique d'intérêt, évaluée *in vitro*. Pour chaque test considéré, la souche la plus performante, celle qui donne les moins bons résultats et une troisième aux résultats intermédiaires sont sélectionnées. Leurs protéomes sont alors extraits, séparés par gel 2D et comparés par analyse d'image afin d'examiner leurs différences. Parmi

les protéines exprimées différemment d'une souche à l'autre, celles pouvant être liées à un rôle dans le caractère étudié sont examinées dans le but de mettre en évidence un marqueur de ce caractère, c'est-à-dire d'établir une corrélation entre l'abondance relative de ces protéines dans les protéomes des souches étudiées et leur phénotype vis-à-vis de cette propriété ou activité. Ce marqueur doit dès lors pouvoir servir à évaluer le potentiel d'une nouvelle souche de l'espèce pour la propriété ou l'activité considérée (Figure 5).

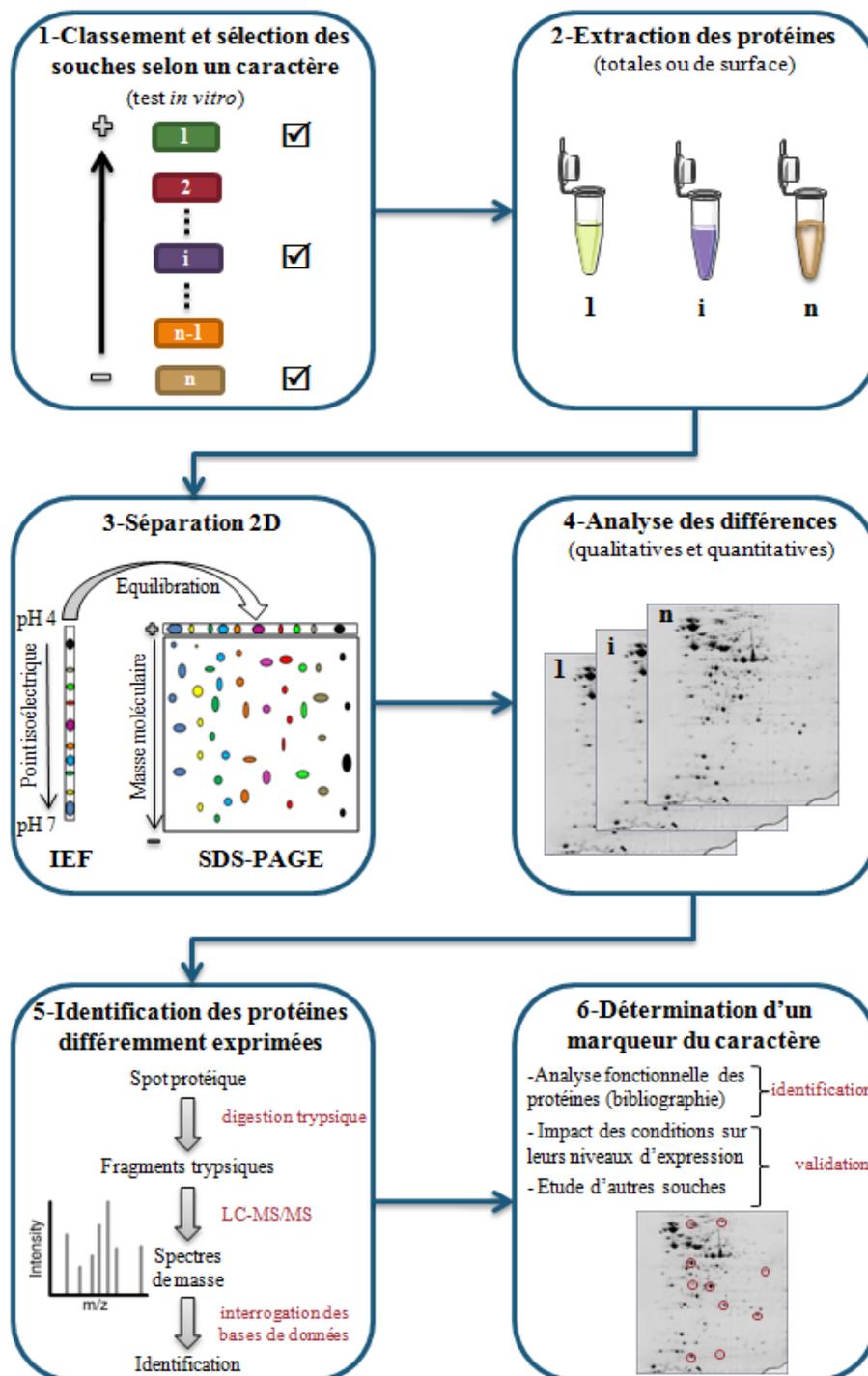


Figure 5. Principe de l'approche

1.2 Modèles bactériens

Les lactobacilles représentent le groupe le plus important de bactéries probiotiques disponibles sur le marché, bien que l'utilisation de souches appartenant à d'autres genres, tels que celui des bifidobactéries, connaisse une forte croissance (289). Ils sont également très largement étudiés au regard de nombreuses propriétés : les déterminants de l'activité probiotique identifiés à ce jour concernent principalement des souches appartenant à ce genre (cf. Chapitre 1) (171). Les lactobacilles constituent donc un modèle bactérien approprié pour la recherche de biomarqueurs du potentiel probiotique.

Dans le but de différencier les déterminants inter- et intra-spécifiques des caractères étudiés, il est essentiel d'étudier plusieurs espèces. Dans ces travaux, deux espèces de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs ayant chacune une grande diversité phénotypique et génotypique, *L. casei* (45) et *L. plantarum* (223), ont été utilisées. Les génomes de plusieurs souches appartenant à ces espèces sont en effet séquencés, annotés et disponibles en ligne (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), ce qui facilite l'identification des protéines et de leurs fonctions lors de l'analyse protéomique. Des souches réputées pour leurs activités probiotiques et fréquemment utilisées dans des produits commerciaux ont été isolées et incluses dans l'étude. D'autres souches de collection sans propriétés particulières rapportées et des isolats de laboratoire appartenant à ces espèces ont également été utilisés (cf. Tableau 7 ; Chapitre 2).

L'approche adoptée est basée sur la comparaison des profils protéomiques de souches différentes. Une telle comparaison nécessite que les profils en question soient suffisamment proches pour permettre l'appariement efficace des spots protéiques lors de l'analyse d'image, indépendamment des variations inter-gels liées à l'électrophorèse 2D. C'est pourquoi il a été choisi de rechercher les profils caractéristiques de propriétés ou d'activités probiotiques au sein d'une même espèce. A ce titre, il est essentiel que les souches utilisées soient identifiées avec précision, ce qui n'est pas toujours le cas pour les probiotiques commerciaux à usage nutritionnel (135). Si les tests phénotypiques par galerie API donnent une première indication quant au genre ou à l'espèce de la bactérie, une caractérisation génotypique s'impose en vue d'une identification non-équivoque (33, 236). Ainsi, toutes les souches utilisées dans ces travaux ont été identifiées par séquençage partiel de l'ARNr 16S.

Cette technique ne permet cependant pas de différencier l'espèce *L. plantarum* des espèces phylogéniquement proches *L. pentosus*, *L. plantarum* ssp. *paraplantarum* et *L. plantarum* ssp. *argentoratensis*, du fait d'une grande similarité (> 99%) de séquence de leur ARNr 16S (35). Afin de discriminer ces espèces, une PCR multiplexe a été réalisée ciblant le gène *recA*, fragment de 318 bp, dont l'amplification permet de confirmer l'appartenance d'une souche au taxon *L. plantarum* ssp. *plantarum*. L'identité des 10 souches de *L. plantarum* présumées a ainsi pu être confirmée (Figure 6, (35)).

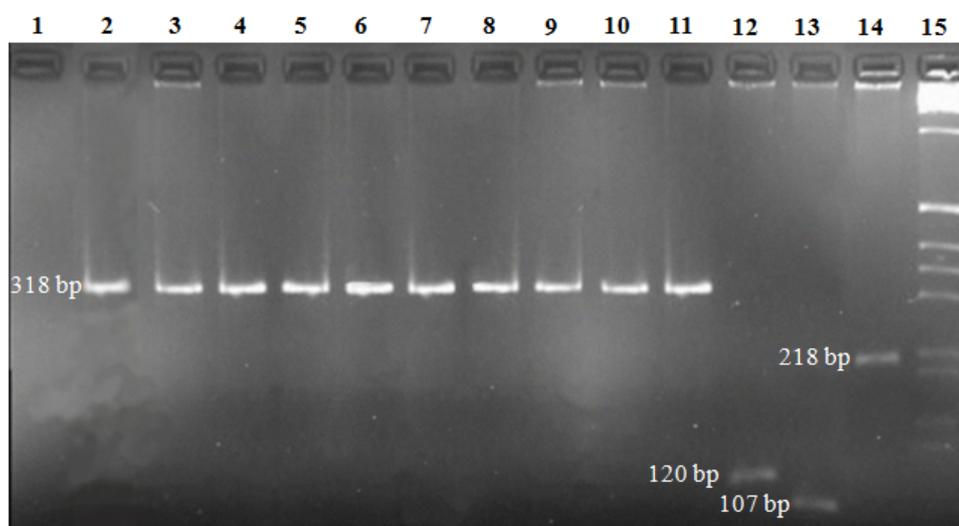


Figure 6. Profils électrophorétiques issus de l'amplification PCR-multiplexe du gène *recA*. Puits: 1, contrôle sans ADN; 2-11, *L. plantarum* 299V, CECT 748^T, CECT 749, CECT 4185, CIP A159, LC 56, LC 660, LC 800, LC 804 et WHE 92; 12, *L. plantarum* subsp. *argentoratensis* CIP 108320^T; 13, *L. paraplantarum* CIP 104668^T; 14, *L. pentosus* CIP 103156^T; 15, marqueur de masse moléculaire (X ; 0,07-12,2 kbp ; Roche Applied Science).

L'analyse de l'ARNr 16S ne permet pas non plus de différencier les espèces *L. casei*, *L. paracasei*, et *L. rhamnosus* qui possèdent 99% de séquences homologues (63). Cette étroite parenté phylogénique s'accompagne d'une controverse scientifique quant à la taxonomie du « groupe *casei* ». En effet, les données génétiques accumulées depuis le milieu des années 70 montrent que la plupart des souches désignées *L. casei* et *L. paracasei* forment un seul groupe d'homologie, distinct de la souche type *L. casei* ATCC 393^T (78). Sur la base des résultats concordants des nombreuses études à ce sujet, Dellaglio *et al.* ont soumis en 2002 un amendement à la description de *L. casei* (79). Ils proposaient : (i) de regrouper les espèces *L. casei* et *L. paracasei* en une seule espèce (*L. casei*) ; (ii) d'utiliser la souche ATCC 334

comme nouvelle souche type pour cette espèce élargie ; (iii) et de reclassifier la souche type de l'espèce *L. casei* (ATCC 393^T) en *L. zeaе*. Malgré les bases génétiques solides de cette demande, celle-ci a été rejetée en 2008 par la Commission Judiciaire du Comité International sur la Systématique des Bactéries, au motif d'une prévalence de la nomenclature initiale définie à partir d'éléments morphologiques, physiologiques et biochimiques (144). Dans ce contexte, nous nous sommes attachés à différencier les taxons *L. rhamnosus* d'une part, et *L. casei*/*L. paracasei* d'autre part, pour lesquels un consensus existe (125). Pour ce faire, une amplification PCR de la région intergénique 23S-5S a été réalisée pour les 7 souches appartenant au groupe *casei* (Figure 7, (55)). Deux bandes typiques de *L. casei-paracasei* à 250 et 170 bp ont systématiquement été détectées permettant d'exclure la présence de souches de *L. rhamnosus* parmi ces bactéries.

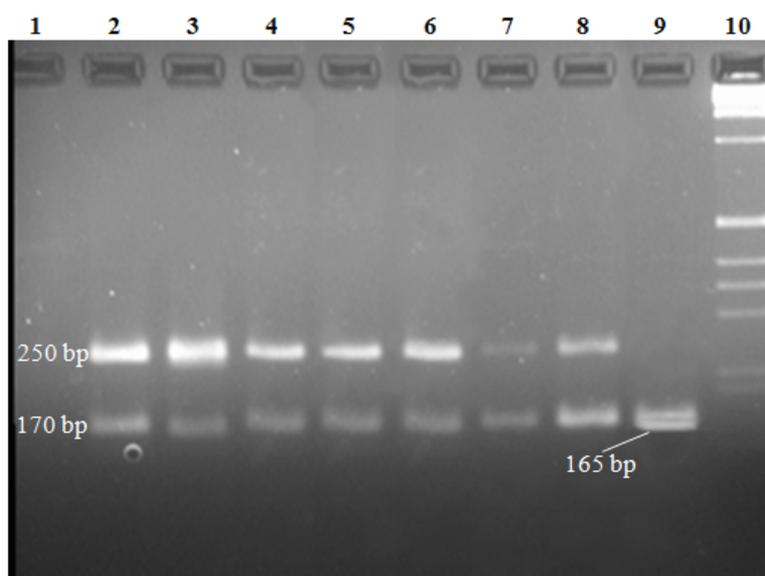


Figure 7. Profils électrophorétiques issus de l'amplification PCR de la région 23S-5S. Puits : 1, contrôle sans ADN ; 2-8, *L. casei* ATCC 334, ATCC 393^T, CRL 431, DN-114 001, F-19, Rosell-215, et Shirota ; 9, *L. rhamnosus* CIP A157^T ; 10, marqueur de masse moléculaire (X ; 0,07-12,2 kbp ; Roche Applied Science).

Lors de la réalisation des gels protéiques 2D, aucun problème d'appariement inter-souche des spots protéiques n'a été rencontré au sein de l'espèce *L. plantarum*. En revanche, les profils électrophorétiques de la souche *L. casei* ATCC 393^T se sont révélés très différents de ceux obtenus pour les 6 autres souches de *L. casei-paracasei*, au point de rendre impossible leur comparaison par analyse d'image (Figure 8). Ces observations de nature protéomique corroborent les données génétiques mentionnées ci-dessus. Il a ainsi été décidé

d'adopter la nomenclature proposée par Dellaglio *et al.*, et donc d'exclure la souche *L. casei* ATCC 393^T de nos travaux et de désigner les 6 souches retenues comme appartenant à l'espèce *L. casei*.

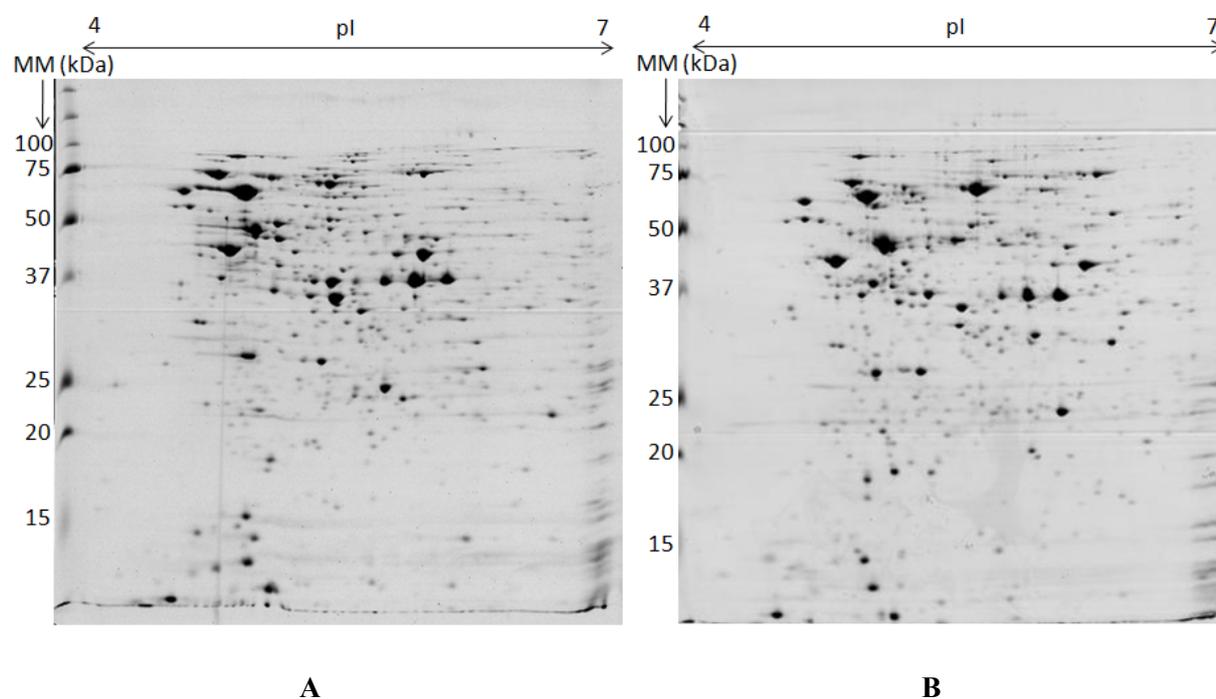


Figure 8. Photographies représentatives de gels 2D (12% d'acrylamide, pH 4,0-7,0, coloration au bleu de Coomassie) des extraits protéiques totaux (charge : 150 µg) de *L. casei* ATCC 334 (A) et ATCC 393^T (B), cultivées en conditions standard jusqu'au début de phase stationnaire.

Ces éléments soulignent l'importance d'utiliser des souches suffisamment proches d'un point de vue phylogénique pour pouvoir comparer leurs profils protéomiques. Si, à notre connaissance, aucun critère précis d'homologie n'a été défini pour permettre une telle comparaison, il semble qu'une analyse au sein de la même espèce soit pertinente, dans la mesure où son statut est clair et bien délimité.

1.3 Caractères étudiés

Trois propriétés bactériennes couramment utilisées pour sélectionner les probiotiques ont été considérées : la résistance à l'acidité, la tolérance à la bile et la capacité d'adhésion. Ces propriétés traduisent l'aptitude des bactéries à coloniser la muqueuse intestinale, ce qui constitue un pré-requis pour qu'elles puissent exercer un éventuel effet bénéfique sur la santé

de l'hôte. De plus, deux activités probiotiques notoires ont été envisagées : la réduction du taux de cholestérol et la modulation de l'immunité de l'hôte. L'étude de ces cinq caractères permet donc une large appréhension du concept probiotique en vue de valider l'approche méthodologique utilisée. Des tests *in vitro* servent à la classification phénotypique des souches sur la base de chaque caractère préalablement à l'analyse protéomique. En plus d'être représentatifs des fonctions et propriétés bactériennes étudiées, ces tests devaient en effet être assez sélectifs afin de permettre une bonne discrimination entre les souches.

La stratégie analytique développée consiste d'abord à comparer les protéomes de trois souches aux phénotypes différents pour le caractère étudié. Cette comparaison s'effectue pour des cellules bactériennes cultivées en conditions standard de croissance, afin de mettre en évidence les différences constitutives des souches étudiées en lien avec leurs phénotypes distincts. L'analyse protéomique d'autres souches doit ensuite servir à la validation des protéines différemment exprimées comme marqueurs potentiels de ce caractère. Cette étape de validation n'a pu être entreprise que pour les propriétés bactériennes de résistance à l'acidité, de tolérance à la bile, et de capacité d'adhésion. Ainsi, toutes les souches n'ont pas été intégrées dans les tests *in vitro* et les analyses protéomiques pour chacun des cinq caractères (Tableau 8). Par ailleurs, la sélection de souches présentant des activités immunomodulatrices différentes a été effectuée sur la base de données bibliographiques, n'ayant pu réaliser les tests *in vitro* adaptés à ce type d'analyse dont la mise en œuvre est délicate (102). Enfin, des conditions stressantes ont également été utilisées pour certaines analyses relatives à la résistance à l'acidité et à la tolérance à la bile afin de confirmer l'implication des protéines d'intérêt dans la réponse des cellules au stress considéré.

1.4 Extraction des protéines

1.4.1 Protéines totales

Les propriétés de résistance à l'acidité et de tolérance à la bile, ainsi que l'activité hypocholestérolémiante supposent l'analyse des protéomes totaux des souches sélectionnées. En effet, les mécanismes biochimiques impliqués dans ce type de processus ne sauraient *a priori* être cantonnés à des phénomènes de surface, ce que confirment les études réalisées à ce jour les concernant (cf. Chapitre 1). Le protocole d'extraction doit donc permettre de récupérer l'ensemble des protéines bactériennes. A ce titre, le broyage à l'azote liquide des

bactéries présente l'avantage de ne pas mettre en jeu d'enzymes ni de détergents susceptibles d'interférer avec la quantification des protéines ou avec l'IEF. De plus, la très basse température (-196°C) à laquelle il est effectué empêche toute dégradation par échauffement des molécules d'intérêt.

Tableau 8. Nombres de souches testées par caractère étudié et type d'analyse réalisée

Caractère étudié	Analyse	<i>L. casei</i>	<i>L. plantarum</i>
Résistance à l'acidité	Test <i>in vitro</i>	6	10
	Protéomique (totale)	6	3 ^a
Tolérance à la bile	Test <i>in vitro</i>	6	10
	Protéomique (totale)	6 ^a	3 ^a
Capacité d'adhésion	Test <i>in vitro</i>	6	10
	Protéomique (de surface)	3	6
Réduction du cholestérol	Test <i>in vitro</i>	0	3
	Protéomique (totale)	0	3
Immunomodulation	Test <i>in vitro</i>	0 ^b	0
	Protéomique (de surface)	3	0

^aAnalyses effectuées en conditions standard et stressantes

^bSélection des souches sur la base de données bibliographiques

Après broyage, le lysat bactérien obtenu est filtré (0,45 µm) pour en retirer les débris cellulaires, puis précipité à l'acétone glacée afin de concentrer les protéines. L'extrait brut ainsi récupéré est ensuite purifié dans le but d'éliminer les contaminants (sels, phospholipides, acides nucléiques) susceptibles de faire précipiter les protéines pendant la focalisation, d'empêcher leur bonne séparation ou encore de générer des traînées au niveau des gels. Cette opération est réalisée à l'aide d'un réactif (Trizol) contenant du thiocyanate de guanidine, du phénol et du chloroforme. L'utilisation du Trizol permet en effet d'obtenir une meilleure résolution des gels lors de l'étape de séparation électrophorétique des extraits protéiques, en comparaison à d'autres techniques de purification comme l'ultrafiltration ou la perméation sur gel (136). Le rendement en protéines ainsi extraites est d'environ 1 mg de protéines (mesuré par la méthode de Bradford) à partir d'une culture de 10 mL.

1.4.2 Protéines de surface

Lorsqu'il s'agit des propriétés d'adhésion et d'immunomodulation des bactéries, la grande majorité des déterminants cellulaires identifiés à ce jour sont superficiels (cf. Chapitre 1). Dans ces deux cas, la recherche de biomarqueurs s'est ainsi limitée aux protéines de surface. Chez *L. plantarum*, l'extraction sélective des protéines de surface a été réalisée suite à l'action du lysozyme, hydrolase de la famille des N-acétylmuramidases qui clive les liaisons covalentes du peptidoglycane entre l'acide N-acétyl-muramique et le quatrième atome de carbone de la N-acétyl-glucosamine (Figure 9). Une étude préalable effectuée dans notre laboratoire a en effet montré l'efficacité de cette enzyme pour extraire sélectivement les composants de la paroi cellulaire de *L. plantarum* tout en conservant la viabilité des cellules et l'intégrité des protéines (136).

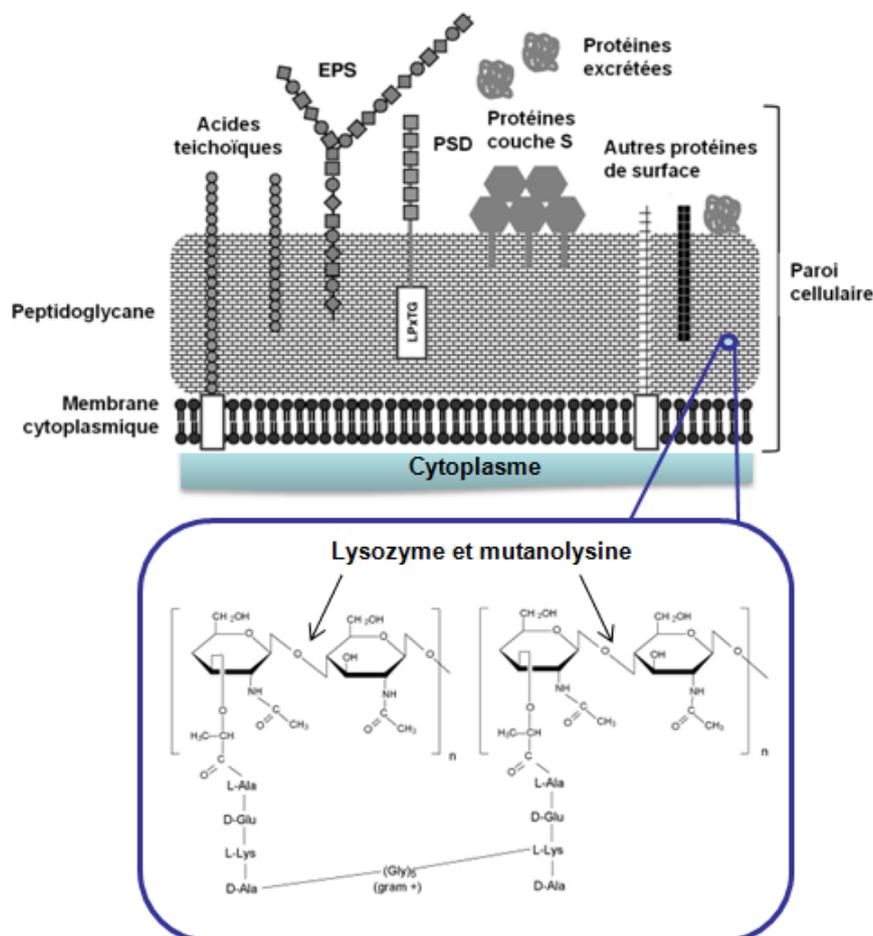


Figure 9. Schéma de la composition de l'enveloppe cellulaire des bactéries Gram-positives, structure du peptidoglycane et site d'action du lysozyme et de la mutanolysine. EPS : exopolysaccharide ; PSD : protéines sortase-dépendantes.

Dans le présent travail cependant, le lysozyme s'est révélé inadapté à l'extraction du protéome de surface des souches de *L. casei* (Figure 10), ce qui est en accord avec les résultats d'une étude précédente (181). Il a en effet été montré que pour une extraction efficace des protéines de surface, il était nécessaire d'associer au lysozyme la mutanolysine, une autre N-acétylmuramidase agissant sur les mêmes sites du peptidoglycane que le lysozyme (Figure 9) (61). De telles différences entre les espèces seraient dues à des disparités dans la composition et la structure du peptidoglycane (24, 134, 182).

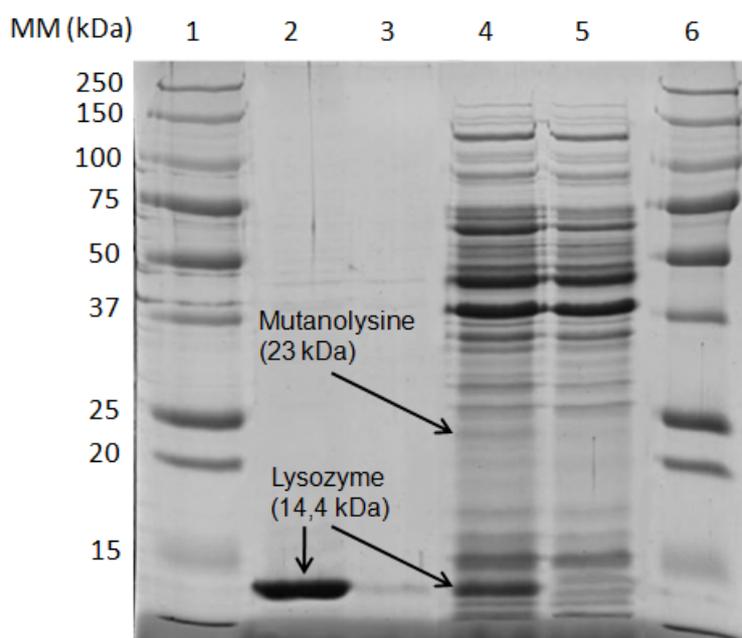


Figure 10. Analyse par SDS-PAGE (12% d'acrylamide) des extraits de la paroi cellulaire de la souche *L. casei* Shirota réalisés avec du lysozyme seul (2 et 3) ou associé à de la mutanolysine (4 et 5), avant (2 et 4) et après (3 et 5) leur élimination sélective à l'aide d'une phase échangeuse de cations SCX. Les puits 1 et 6 correspondent au marqueur de masse moléculaire Precision Plus Protein All Blue (10-250 kDa ; Biorad)

Le lysozyme et, dans certains cas, la mutanolysine étant des protéines ajoutées aux échantillons au cours de l'extraction, il est nécessaire de les éliminer le plus sélectivement possible, afin que seules les protéines bactériennes soient prises en compte lors du dosage. Or, leur taille (14,4 et 23,0 kDa, respectivement) est comparable à celle de petites protéines potentiellement intéressantes pour notre étude, ce qui rend impossible leur élimination par dialyse ou ultrafiltration. A cet effet, un échangeur de cation de type SCX, préalablement équilibré à pH 8,0, est plongé directement dans les échantillons tamponnés à pH 8,0. Dans ces conditions, toutes les protéines ayant un pI supérieur à 8,0 sont retenues par la phase

stationnaire (cas du lysozyme et de la mutanolysine dont les pI respectifs sont aux alentours de 11 et 10), contrairement aux autres molécules qui restent en solution (Figure 9). Cette élimination sélective n'est possible que dans la mesure où les protéines bactériennes analysées dans notre étude ont un pI compris entre 4,0 et 7,0, comme explicité ci-après. Quel que soit le protocole utilisé, les rendements d'extraction de protéines de la paroi cellulaire obtenus sont de l'ordre de 250 µg de protéines à partir de 40 mL de culture, soit 16 fois moins que pour l'extraction des protéines totales.

1.5 Séparation électrophorétique

Les extraits protéiques purifiés sont séparés par électrophorèse 2D. Cette technique est particulièrement intéressante compte-tenu de son fort pouvoir résolutif et des faibles coûts qui y sont associés. Elle est de ce fait accessible à la plupart des laboratoires, ce qui constitue un atout précieux dans la perspective d'un transfert technologique de la méthode développée. Toutefois, comme nous l'avons vu précédemment (cf. Chapitre 1), la 2D-PAGE présente un certain nombre de limites. En effet, les gels 2D ne permettent de visualiser que les protéines aux valeurs de pI comprises entre 3 et 10 et dont les masses s'échelonnent de 10 à 250 kDa (56). Ce périmètre d'investigation représente 83 et 87% du protéome théorique total de *L. casei* et *L. plantarum*, respectivement (Figure 11). Ces valeurs sont par ailleurs surestimées dans la mesure où : (i) seulement 50 à 80% des gènes microbiens sont exprimés dans un environnement donné (129) ; (ii) les protéines faiblement abondantes sont difficiles à détecter par 2D-PAGE (192, 264), et (iii) celles ayant un caractère hydrophobe sont peu solubles dans le tampon IEF (116).

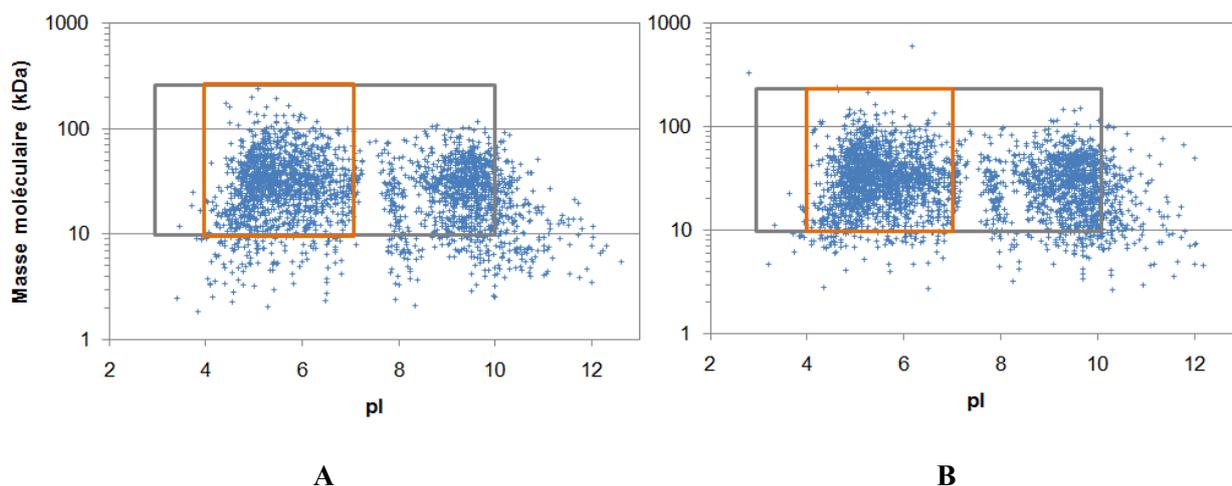


Figure 11. Protéomes théoriques totaux de *L. casei* ATCC 334 (A) et *L. plantarum* WCFS1 (B). Les masses moléculaires et pI des protéines ont été calculés d'après leurs séquences enregistrées dans la base de données UniProtKB (<http://www.uniprot.org>), à l'aide de l'outil Compute pI/Mw disponible en ligne (http://web.expasy.org/compute_pi). Les rectangles gris et orange délimitent les fenêtres d'investigation techniquement envisageables par 2D-PAGE et celles retenues dans cette étude, respectivement.

Les profils électrophorétiques des protéomes totaux de *L. casei* et *L. plantarum* réalisés dans un intervalle de pH 3-10 font état d'une faible proportion de protéines dans la zone de pI élevés (> 7) comparativement à la zone de bas pI (< 7) (Figure 12). S'il est possible d'augmenter la charge déposée sur les gels pour faire apparaître les protéines présentes en faibles quantités dans les extraits, ceci risque d'être préjudiciable à la qualité des gels et à l'analyse quantitative en provoquant des phénomènes de saturation pour les protéines déjà bien révélées initialement. En effet, à volume constant, la gamme dynamique du bleu de Coomassie colloïdal ne permet de différencier quantitativement les intensités des spots que dans une proportion allant de 1 à 10 (297). Bien que d'autres techniques de coloration ou de marquage fluorescent aux gammes dynamiques plus larges existent, celles-ci présentent des inconvénients liés à leur coût élevés et/ou à la toxicité des réactifs utilisés (297). De plus, la coloration au bleu de Coomassie est réputée pour sa bonne compatibilité avec la spectrométrie de masse.

Compte tenu des éléments cités ci-dessus, un intervalle de pI compris entre 4 et 7 semblait présenter le meilleur compromis entre quantité de protéines et qualité de l'analyse (Figure 12). De plus, à taille de gels constante, cette gamme permet d'obtenir une meilleure séparation des protéines comparativement à l'intervalle de pH 3-10, ce qui est primordial pour leur quantification relative par analyse d'image. La gamme 4-7 est d'ailleurs la plus couramment utilisée pour l'analyse de protéomes bactériens par 2D-PAGE (129) et a déjà

permis de discriminer des souches d'une même espèce en fonction de leurs phénotypes (41, 89, 90, 338). Dès lors, le champ d'investigation des biomarqueurs représenterait 50 et 53% du protéome théorique total de *L. casei* et *L. plantarum*, respectivement (Figure 11).

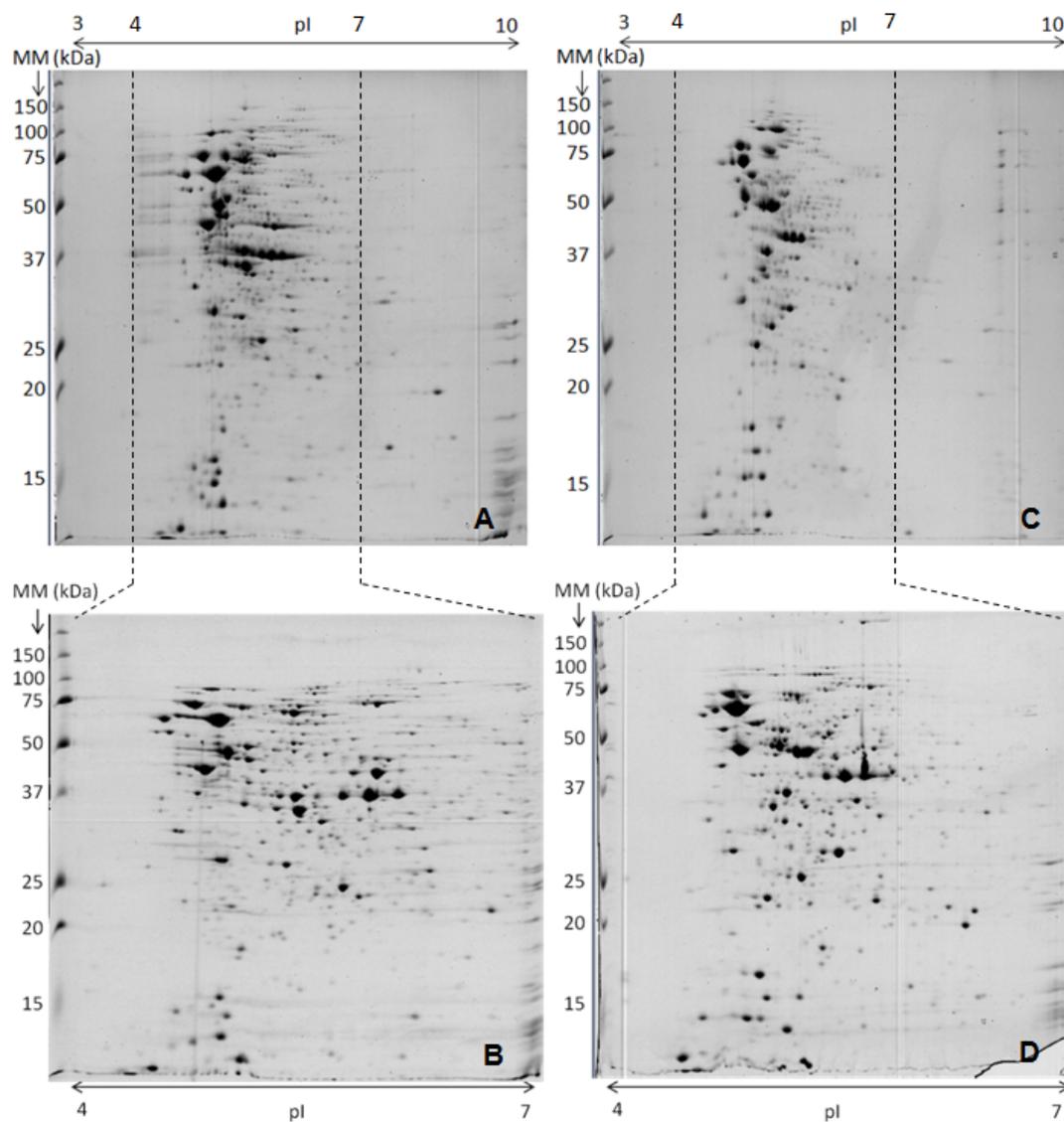


Figure 12. Photographies représentatives de gels 2D (12% d'acrylamide ; coloration au bleu de Coomassie) des extraits protéiques totaux (charge : 150 µg) de *L. casei* Rosell-215 (A et B) et *L. plantarum* 299V (C et D) cultivées en conditions standard jusqu'en début de phase stationnaire. Les gels ont été réalisés dans des intervalles de pH 3,0-10,0 (A et C) et 4,0-7,0 (B et D).

1.6 Analyse d'image et identification des protéines d'intérêt

Une fois les protéines séparées, les profils électrophorétiques sont comparés par analyse d'images en utilisant le logiciel PDQuest (Bio-Rad). Deux sortes de différences entre les gels sont recherchées : des spots protéiques présents dans un échantillon et absent dans un autre, et des spots protéiques présentant des différences d'intensité d'un gel à l'autre (Figure 13). Dans ce second cas, les critères appliqués pour établir une différence de niveau d'expression entre spots sont arbitraires et les valeurs choisies varient d'une étude à l'autre. Dans cette étude nous avons opté pour des valeurs couramment utilisées par ailleurs (138, 276), à savoir : (i) une variation d'intensité d'au moins un facteur 2 pour des comparaisons inter-souches et 1,5 pour des analyses intra-souches ; et (ii) une validation statistique de cette variation ($p < 0,05$). Dans ces conditions, toutes analyses confondues, 35 et 100 spots protéiques en moyenne ont été mis en évidence comme différemment exprimés d'une souche à l'autre lors de l'analyse des protéomes de surface et totaux, respectivement.

La recherche de biomarqueurs bactériens s'effectue précisément au niveau de ces différences constitutives. L'hypothèse qui sous-tend cette démarche est qu'une partie de la variabilité inter-souche au niveau protéomique pourrait permettre d'expliquer les différents phénotypes observés parmi les caractères étudiés. Les spots protéiques différemment exprimés d'au moins un facteur 2 ($p < 0,05$) sont donc excisés et les protéines digérées à la trypsine avant identification par LC-MS/MS. Le couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en tandem permet en effet d'abord de séparer les peptides issus de la digestion, puis d'obtenir leurs spectres de fragmentation. Cette approche génère ainsi bien plus de données qu'une empreinte peptidique classique par MALDI-TOF, et aboutit à des identifications plus fiables lors de la recherche dans les bases de données. Sur les deux vitesses de balayage utilisées en MS et MS/MS pour la collecte des données (0,25 et 1 spectre/s), la méthode d'acquisition lente (0,25 spectre/s) a systématiquement donné des scores plus élevés pour les identifications. Ceci tient vraisemblablement au meilleur rapport signal sur bruit obtenu avec un faible taux d'échantillonnage. Ce balayage ne doit cependant pas être trop lent, car des peptides abondants risqueraient de ne pas être fragmentés ce qui diminuerait les scores.

L'interrogation des bases de données s'effectue à l'aide de deux algorithmes orthogonaux (OMSSA et Phényx). Seules les identifications confirmées par les deux méthodes sont validées dans le but de limiter le nombre de faux positifs, protéines non

correctement identifiées malgré de bons attributs statistiques (149). En moyenne, pour toutes les propriétés testées, 90% des protéines analysées par LC-MS/MS ont été correctement identifiées. Ces identifications ont systématiquement révélé la présence d'une seule protéine par spot excisé, en accord avec d'autres études utilisant des conditions analytiques similaires : intervalle de pI compris entre 4 et 7, et gels de 17 ou 18 cm de large selon le matériel utilisé (44, 90, 138, 274–276, 338, 347). Aussi, cette présence d'une protéine par spot justifie leur quantification par analyse d'images. A l'inverse, 10% des protéines analysées par LC-MS/MS n'ont pu être correctement identifiées, du fait d'une absence d'identification (5%), de scores trop faibles (< 20 ; 3%) ou d'une divergence des résultats obtenus par les deux algorithmes (2%). Dans la majorité des cas (90% de ces 10%), il s'agit de protéines faiblement exprimées (intensités relatives inférieures à 0,02% de l'intensité totale des spots validés).

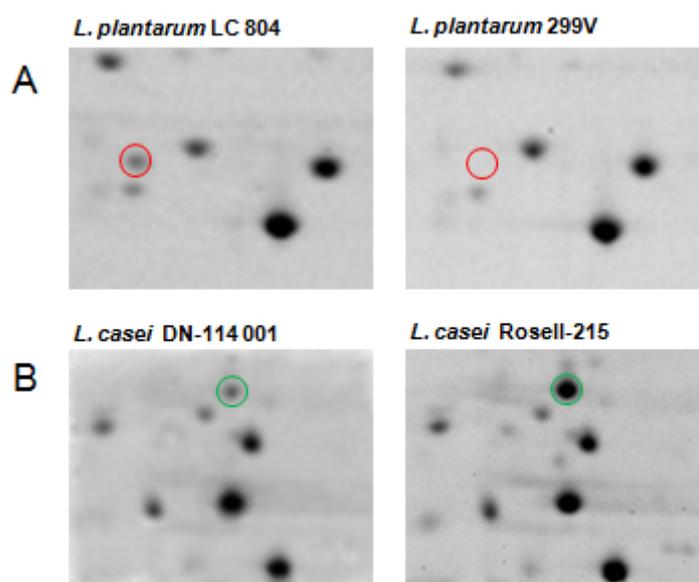


Figure 13. Exemples de différences obtenues après électrophorèse 2D des extraits protéiques totaux de souches de *L. plantarum* et *L. casei*. A) le spot marqué en rouge est présent chez la souche *L. plantarum* LC 804 et absent chez la souche *L. plantarum* 299V ; B) le spot marqué en vert est plus intense chez la souche *L. casei* Rosell-215 que chez la souche *L. casei* DN-114 001.

Une fois identifiées, les fonctions des protéines sont analysées après une étude bibliographique. Leur rôle dans les propriétés et activités considérées est recherché, en privilégiant les travaux basés sur des mutants. En effet, comme nous l'avons vu dans le Chapitre 1, la technique d'inactivation de gène est le meilleur moyen pour confirmer le rôle d'une protéine. Les niveaux d'expression des protéines d'intérêt sont alors examinés en

prenant en considération les phénotypes des souches, dans le but de mettre en évidence un profil spécifique du caractère étudié. Les profils protéomiques d'autres souches peuvent alors être analysés dans la perspective de confirmer un tel profil comme un marqueur du caractère en question. La description générale des données est réalisée à l'aide de classifications hiérarchiques des protéines et des souches, en utilisant la méthode d'aggrégation de Ward et la méthode métrique de Pearson. Il a en effet été démontré que ces paramètres génèrent les partitionnements les plus fiables dans le traitement de données protéomiques (218). Dans l'ensemble, ces partitionnements font état d'une bonne reproductibilité des données, tous les gels relatifs à une même souche étant systématiquement regroupés dans une même classe. La corrélation de l'expression protéique aux phénotypes observés *in vitro* est, quant à elle, effectuée par un test non-paramétrique de Spearman. Ce type de test est typiquement choisi pour l'analyse de données complexes d'origine biologique, où les hypothèses de normalité, d'homoscédasticité et de linéarité nécessaires à l'utilisation de modèles paramétriques ne sont pas respectées (212).

1.7 Conclusion

L'application de l'outil protéomique à la caractérisation des bactéries d'intérêt probiotique est un projet vaste offrant un large champ de possibilités quant aux techniques et conditions analytiques utilisées, ainsi qu'aux modèles bactériens et caractères étudiés. Dans ces travaux, une approche particulière basée sur la comparaison de profils électrophorétiques a été utilisée. Lors de la phase de développement analytique, il est apparu que seules des souches phylogéniquement proches (appartenant à la même espèce) pouvaient être comparées. L'identification de profils caractéristiques d'une propriété ou d'une activité ne pouvait donc se faire qu'au sein d'une même espèce. Selon le caractère étudié, l'analyse porte sur les protéomes totaux ou de surface des bactéries. Dans le premier cas, le protocole d'extraction utilisé est universel ; dans le second, il peut être nécessaire d'adapter les conditions d'extractions des protéines au type de micro-organisme et à la structure de sa paroi cellulaire. Le choix de la 2D-PAGE pour la séparation des protéomes tient à sa robustesse et à son coût faible, atouts majeurs dans l'optique d'une généralisation de la méthode pour le criblage de souches à potentiel probiotique. Cette méthode présente toutefois une limitation majeure due au fait que les gels 2D donnent une vision tronquée des protéomes extraits, n'incluant qu'une partie des gammes de masses moléculaires et de pI. Par ailleurs, certaines des protéines

entrant dans le champ d'investigation de la 2D-PAGE sont sous-représentées ou non détectées. Aussi, les paramètres utilisés dans ces travaux sont le fruit d'un compromis entre le nombre de spots visualisés et la qualité de leur séparation. La recherche de biomarqueurs bactériens du potentiel probiotique s'est donc effectuée à travers ce prisme analytique certes étroit, mais qui n'en reste pas moins reproductible et qui s'est déjà révélé efficace pour étudier le polymorphisme protéique des bactéries. La capacité de cette approche à mettre en évidence et identifier de tels biomarqueurs a été évaluée à l'aide de deux modèles microbiens et cinq caractères probiotiques (voir ci-après).

2. Résistance à l'acidité

L'une des principales conditions pour qu'une souche réponde à la définition de probiotique est qu'elle reste viable de la production à la consommation et pendant le transit gastro-intestinal (98). Avant de pouvoir adhérer et s'installer même de façon transitoire au niveau de la muqueuse intestinale, les bactéries probiotiques doivent survivre au passage par l'estomac. Elles y sont confrontées à la forte acidité des sucs gastriques, composés essentiellement d'acide chlorhydrique et de pepsine (324). Un pH de 1,5 est atteint à jeûn dans l'estomac et augmente à des valeurs comprises entre 3 et 5 au cours de l'alimentation (66). L'acidité du chyme est ensuite progressivement neutralisée lors de son passage dans le duodénum (292).

La résistance à l'acidité (capacité des souches à survivre au stress acide) est donc l'une des caractéristiques recherchées lors de la sélection des bactéries probiotiques. Elle est généralement évaluée *in vitro* à l'aide de modèles simplifiés simulant les conditions gastriques (cf. Chapitre 1). Si les données relatives aux mécanismes de résistance au stress acide sont abondantes, les déterminants bactériens de la variabilité inter-souche vis-à-vis de cette propriété sont encore mal compris. L'approche protéomique utilisée dans ces travaux a donc été appliquée à l'étude de la résistance à l'acidité chez *L. casei* et *L. plantarum* en vue de mettre en évidence des marqueurs potentiels de cette propriété bactérienne d'intérêt chez les candidats probiotiques.

2.1 Evaluation *in vitro* de la survie des souches aux conditions gastriques

La résistance de 6 souches de *L. casei* et 10 de *L. plantarum* à l'acidité a été évaluée d'après leur capacité à survivre dans un milieu gastrique simulé. Des cellules en début de phase stationnaire ont été exposées à différents pH acides (pH 1,6 ; 1,8 ; et 2,0) en présence de pepsine pendant 20 min, puis la proportion de cellules viables et cultivables a été déterminée par dénombrement sur milieu de culture gélosé. L'effet de l'acidité sur la viabilité et la croissance de *L. casei* et *L. plantarum* est indiqué dans les Tableaux 9 et 10, respectivement.

Tableau 9. Effet de l'exposition à un milieu acide sur la viabilité et la croissance des souches de *L. casei*

Valeurs du pH	Viabilité et croissance*							
	6,5 (témoin)		1,6		1,8		2	
Souches	log UFC/mL	(%)	log UFC/mL	(%)	log UFC/mL	(%)	log UFC/mL	(%)
ATCC 334	8,26 ± 0,07	100	-	-	4,93 ± 0,20	60 ± 3 ^b	7,43 ± 0,23	90 ± 3 ^b
CRL 431	8,80 ± 0,12	100	-	-	4,77 ± 0,15	54 ± 2 ^c	7,57 ± 0,25	86 ± 3 ^b
DN-114 001	8,53 ± 0,04	100	-	-	3,58 ± 0,27	42 ± 4 ^d	6,82 ± 0,17	80 ± 2 ^c
F-19	8,45 ± 0,16	100	-	-	4,80 ± 0,09	57 ± 2 ^{b,c}	7,44 ± 0,29	88 ± 4 ^b
Rosell-215	8,60 ± 0,09	100	3,89 ± 1,11	45 ± 12	6,97 ± 0,11	81 ± 3 ^a	8,34 ± 0,15	97 ± 2 ^a
Shirota	8,48 ± 0,14	100	-	-	4,53 ± 0,17	53 ± 2 ^c	7,38 ± 0,14	87 ± 3 ^b

*Les résultats sont déterminés par dénombrement sur milieu gélosé et exprimés en log UFC/mL ainsi qu'en pourcentage de bactéries cultivables par rapport à un témoin non traité. Les moyennes ± écart types de trois expériences indépendantes sont indiquées. Les moyennes dans la même colonne ne présentant pas de lettres communes (a à d) sont significativement différentes ($p < 0,05$). - : les dénombrements effectués n'ont pu mettre en évidence de cellules cultivables (< 1 log UFC/mL).

Tableau 10. Effet de l'exposition à un milieu acide sur la viabilité des souches de *L. plantarum*

Valeurs du pH	Viabilité et croissance*							
	6,5 (témoin)		1,6		1,8		2	
Souches	log UFC/mL	(%)	log UFC/mL	(%)	log UFC/mL	(%)	log UFC/mL	(%)
299V	8,82 ± 0,14	100	4,42 ± 0,61	50 ± 6 ^b	5,68 ± 0,63	64 ± 6 ^b	8,44 ± 0,18	96 ± 3 ^a
CECT 748 ^T	8,58 ± 0,13	100	4,31 ± 0,98	50 ± 11 ^{a,b}	5,71 ± 0,47	67 ± 6 ^b	8,44 ± 0,21	98 ± 2 ^a
CECT 749	8,53 ± 0,14	100	3,91 ± 0,77	46 ± 9 ^{b,c}	5,34 ± 0,12	63 ± 2 ^b	8,32 ± 0,11	97 ± 3 ^a
CECT 4185	8,53 ± 0,09	100	-	-	4,00 ± 0,23	47 ± 2 ^c	8,29 ± 0,26	97 ± 4 ^a
CIP A159	8,50 ± 0,02	100	3,59 ± 1,32	42 ± 14 ^{b,c}	5,25 ± 0,03	62 ± 1 ^b	8,19 ± 0,13	96 ± 2 ^a
LC 56	8,22 ± 0,19	100	3,33 ± 1,61	40 ± 17 ^{b,c}	4,77 ± 0,24	58 ± 2 ^b	7,89 ± 0,14	95 ± 3 ^a
LC 660	8,27 ± 0,03	100	4,69 ± 0,50	56 ± 5 ^{a,b}	5,30 ± 0,15	62 ± 2 ^b	8,13 ± 0,14	98 ± 2 ^a
LC 800	8,76 ± 0,07	100	4,15 ± 1,25	47 ± 12 ^{b,c}	5,96 ± 0,45	66 ± 6 ^b	8,60 ± 0,09	97 ± 3 ^a
LC 804	8,77 ± 0,06	100	6,20 ± 0,55	70 ± 5 ^a	8,51 ± 0,05	97 ± 1 ^a	8,67 ± 0,07	98 ± 2 ^a
WHE 92	8,70 ± 0,08	100	2,67 ± 0,93	31 ± 10 ^c	4,60 ± 0,38	53 ± 5 ^b	8,32 ± 0,23	96 ± 3 ^b

*Les résultats sont déterminés par dénombrement sur milieu gélosé et exprimés en log UFC/mL ainsi qu'en pourcentage de bactéries cultivables par rapport à un témoin non traité. Les moyennes ± écart types de trois expériences indépendantes sont indiquées. Les moyennes dans la même colonne ne présentant pas de lettres communes (a à c) sont significativement différentes ($p < 0,05$). - : les dénombrements effectués n'ont pu mettre en évidence de cellules cultivables (< 1 log UFC/mL).

Il apparaît que la résistance à l'acidité des deux espèces étudiées varie selon la souche et le pH considérés ($p < 0,05$). Au vu de la sensibilité des souches testées, il semble que *L. plantarum* soit plus résistante que *L. casei* aux conditions gastriques, ce qui est en adéquation avec les résultats d'autres études portant sur ces deux espèces (82, 295). Cette observation n'est cependant pas généralisable compte-tenu du caractère spécifique à la souche des propriétés et activités probiotiques (284), et comme le montre la plus forte résistance de *L. casei* Rosell-215 comparativement à *L. plantarum* CECT 4185.

En ce qui concerne *L. casei*, les pH 1,8 et 2,0 permettent le mieux de différencier les souches, Rosell-215 étant la plus résistante à l'acidité et DN-114 001 la plus sensible. De plus, parmi les souches testées, seule Rosell-215 a pu être cultivée après une exposition à pH 1,6. Les autres souches, parmi lesquelles *L. casei* ATCC 334 (unique souche non commercialisée comme probiotique dans cette étude), présentent des niveaux de résistance intermédiaires.

S'agissant de *L. plantarum*, les pH 1,6 et 1,8 sont les mieux à même de discriminer les souches, un pH de 2,0 étant quasiment sans effet sur ces dernières. Dans l'ensemble, la souche LC 804 montre la plus forte résistance à l'acidité et CECT 4185, seule souche qui n'a pu être cultivée après exposition à pH 1,6, s'avère la plus sensible. Les 8 autres souches, parmi lesquelles le probiotique commercial *L. plantarum* 299V, montrent des niveaux de résistance intermédiaires.

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, ce type de test est largement utilisé pour le criblage de souches à potentiel probiotique. Pour autant, il n'en reste pas moins réducteur et présente un certain nombre de limites. Ainsi, le dénombrement par culture sur gélose ne détermine que les cellules cultivables et sous-estime le nombre réel de cellules vivantes (166). De plus, cette approche ne tient pas compte du pouvoir tampon de la matrice alimentaire dans laquelle les cellules sont incorporées, et dont l'effet protecteur peut s'avérer significatif, en particulier dans les produits laitiers (204). Cependant, malgré ces limites, les études comparatives comme celle réalisée ici donnent une idée préliminaire de la résistance relative des souches aux conditions gastriques (137).

2.2 Analyse protéomique comparative de *L. casei*

Les protéomes totaux des six souches de *L. casei* cultivées en conditions standard de croissance ont été comparés afin d'établir un lien entre la résistance des cellules à l'acidité et leurs profils protéomiques constitutifs, et d'identifier des protéines susceptibles d'être impliquées dans la résistance de *L. casei* aux conditions gastriques.

Dans un premier temps, trois souches aux résistances à l'acidité différentes ont été sélectionnées d'après les résultats des tests *in vitro* : *L. casei* Rosell-215 (phénotype résistant), *L. casei* DN-114 001 (phénotype sensible) et *L. casei* ATCC 334 (phénotype intermédiaire). Des électrophorèses 2D ont été réalisées avec leurs extraits protéomiques totaux (Figure 14).

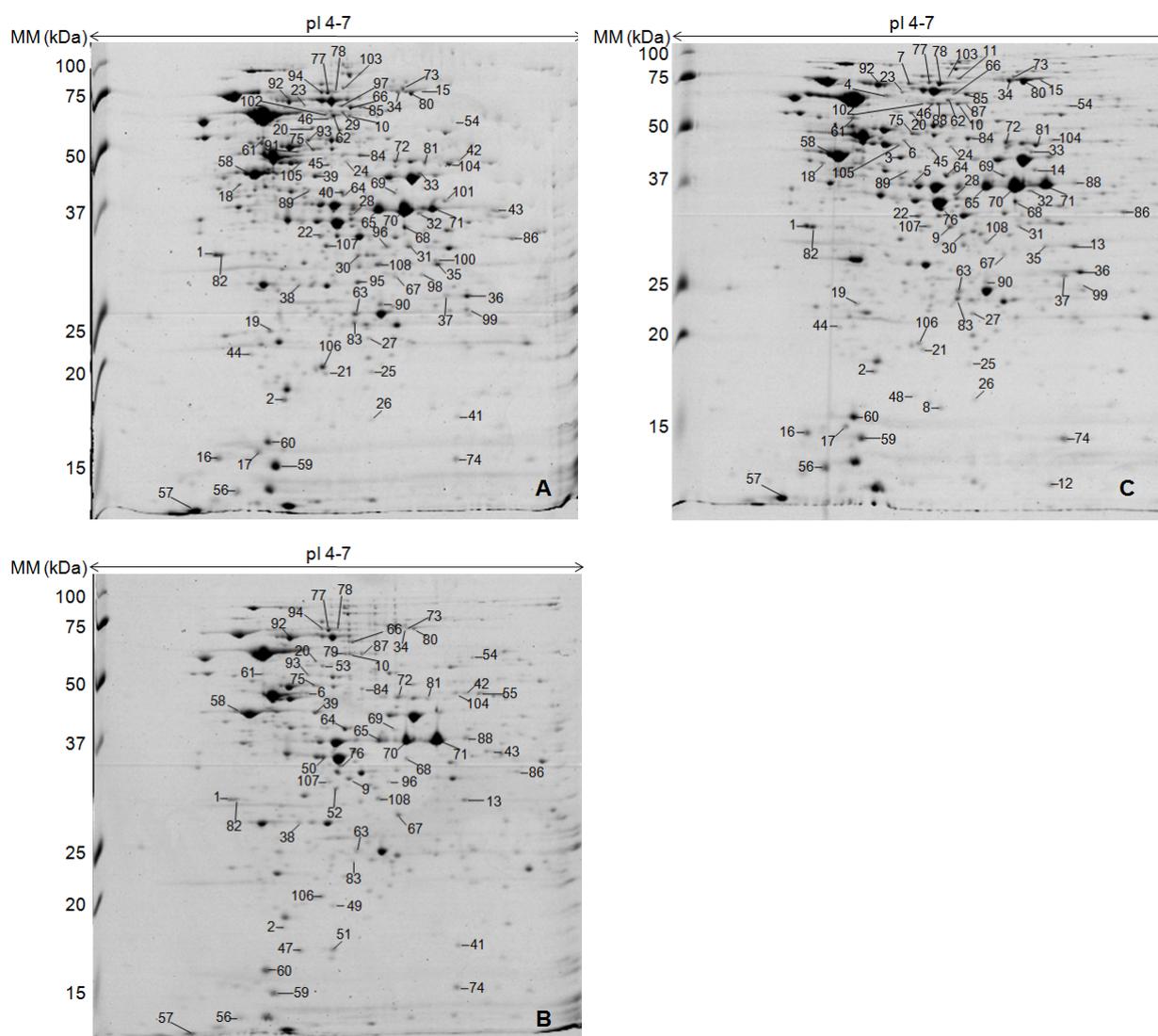


Figure 14. Photographies représentatives de gels 2D (12% d'acrylamide ; pH 4,0-7,0 ; coloration au bleu de Coomassie) des extraits protéomiques totaux (charge : 150 μ g) des souches *L. casei* DN-114 001 (A), ATCC 334 (B) et Rosell-215 (C), cultivées en conditions standard (MRSC) jusqu'en début de phase stationnaire. Les chiffres 1-108 représentent les protéines différemment exprimées entre les trois souches.

Malgré la similarité des profils des trois souches étudiées en conditions standard, l'analyse d'image a permis de mettre en évidence 108 spots correspondant à des protéines différemment exprimées dont 98 ont pu être identifiées par LC-MS/MS et recherche dans les bases de données protéomiques (Annexe 1). Les 72 protéines correspondantes, dont certaines présentent plusieurs isoformes, appartiennent à 15 catégories fonctionnelles couvrant la majorité des fonctions biochimiques rencontrées dans les cellules bactériennes (Figure 15). Cette variabilité à l'échelle protéomique reflète la biodiversité et la versatilité de l'espèce *L. casei*.

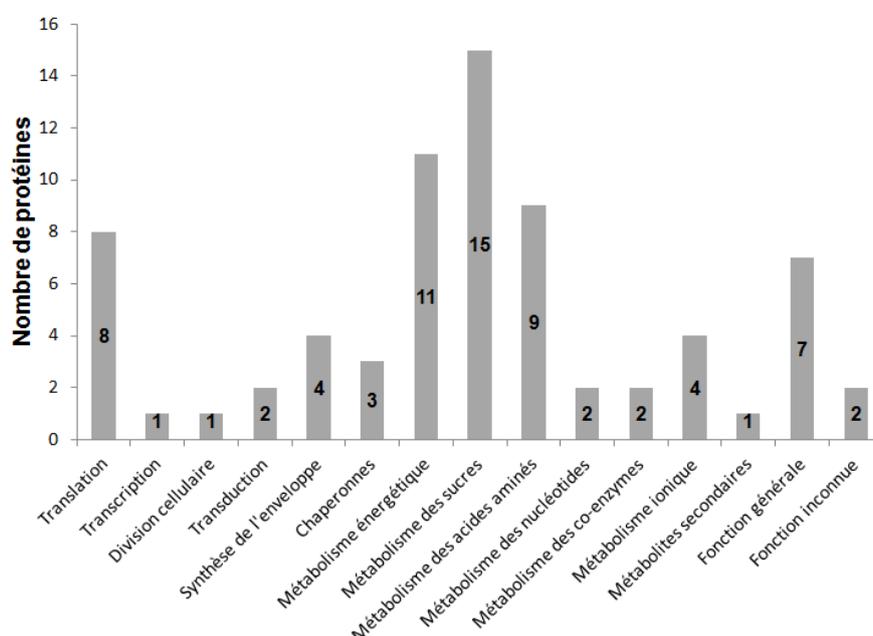


Figure 15. Distribution fonctionnelle des protéines exprimées différemment en conditions standard entre les souches *L. casei* DN-114 001, ATCC 334 et Rosell-215. Les 72 protéines identifiées ont été regroupées selon leur COG (Clusters of Orthologous Groups, (310, 311)).

Parmi ces différences constitutives, 15 protéines identifiées dans 27 spots ont été citées dans la littérature comme étant impliquées dans les processus de résistance à l'acidité d'autres bactéries, à travers l'étude de mutants (Tableau 11). Aussi, la recherche de marqueurs de résistance à l'acidité chez *L. casei* a-t-elle été ciblée sur ce groupe précis de protéines. Dans cette perspective, la distribution des niveaux d'expression des 15 protéines d'intérêt dans des conditions idéales de croissance pour les trois souches étudiées a été examinée à l'aide d'une classification hiérarchique (Figure 16).

Tableau 11. Protéines différemment exprimées en conditions standard entre les souches *L. casei* DN-114 001, ATCC 334 et Rosell-215 et potentiellement impliquées dans la résistance à l'acidité.

Catégorie fonctionnelle	Protéine identifiée	Numéro d'accès ^a	Symbole du gène	Référence	Spot ^b
Traduction, synthèse et structure des ribosomes	Aspartyl/asparaginyl-tRNA synthase	LSEI_1485	<i>asnC</i>	(42)	75
	Prolyl-tRNA synthase	LSEI_1579	<i>proS</i>	(42)	7
Transduction du signal	S-ribosyl-homocysteinase	LSEI_0765	<i>luxS</i>	(170)	74
Synthèse de la paroi cellulaire	D-fructose-6-phosphate amidotransférase	LSEI_1019	<i>glmS</i>	(42)	66 85 97
	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-épimérase	LSEI_2014	<i>rfbC</i>	(42)	106
Chaperonnes	ATP-binding subunit of Clp protease and DnaK/DnaJ chaperones	LSEI_2048	<i>clpL</i>	(331)	15 34 80
Production et conversion énergétiques	L-lactate déshydrogénase	LSEI_2549	<i>ldhL</i>	(42)	76
	F ₁ F ₀ -ATPase	LSEI_1163	<i>atpH</i>	(277)	26
	Phosphotransacétylase	LSEI_0996	<i>pta</i>	(343)	9
Métabolisme et transport des sucres	Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase	LSEI_0967	<i>gap</i>	(42, 275)	65
					71
					88
	Phosphoglycerate mutase	LSEI_0949	<i>pgm</i>	(42)	70
10					
					62
					79
					87
					102
	Mannose-6-phosphate isomérase type I	LSEI_0292	<i>manA</i>	(42)	32
Métabolisme et transport des nucléotides	Adenylosuccinate synthase	LSEI_0122	<i>purA</i>	(42)	72
Métabolisme des ions inorganiques	Copper resistance protein	LSEI_0905	<i>cutC</i>	(42)	19
Biosynthèse des métabolites secondaires	D-alanine-activating enzyme	LSEI_0794	<i>dltA</i>	(335)	20
					53

^aNuméro d'accès dans la banque de données NCBI pour *L. casei* ATCC 334.

^bNuméro de spot correspondant à la Figure 14.

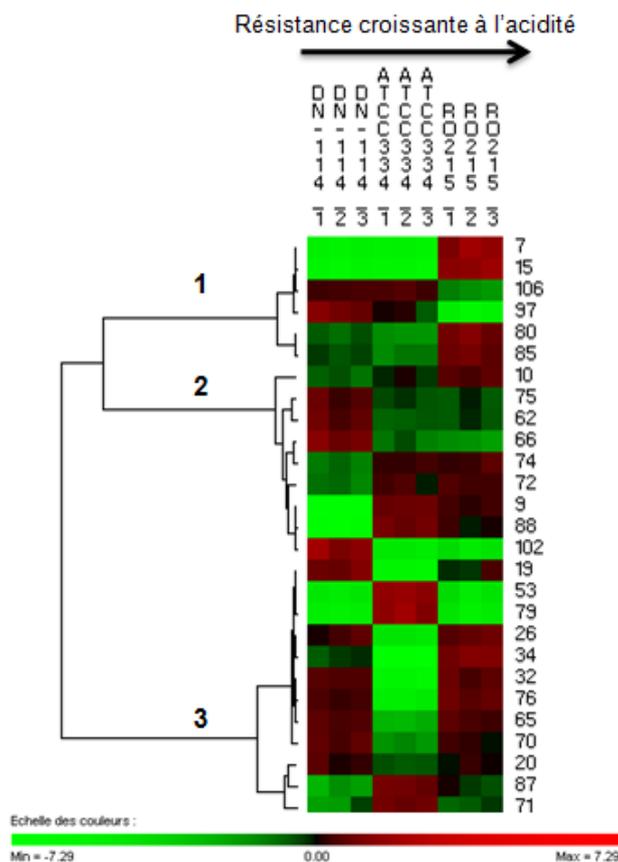


Figure 16. Classification hiérarchique de 27 spots protéiques potentiellement impliqués dans la résistance à l'acidité de *L. casei* et différemment exprimés dans les protéomes constitutifs totaux de trois souches de *L. casei* aux phénotypes différents pour cette propriété (DN-114 001 : sensible ; ATCC 334 : intermédiaire ; Rosell-215 : résistant). Les intensités des couleurs rouge et verte indiquent, respectivement, des niveaux d'expression croissants et décroissants. Les chiffres de 1 à 3 représentent les classes mises en évidence par la classification hiérarchique

L'analyse du dendrogramme relatif aux spots révèle trois classes majoritaires. Une première classe regroupe 6 spots protéiques dont les niveaux d'expression chez la souche la plus résistante (*L. casei* Rosell-215) sont différents des deux autres souches, qu'ils soient surexprimés (prolyl-tRNA synthase (ProS), spot 7 ; ATP-binding subunit of Clp protease and DnaK/DnaJ chaperones (ClpL), spots 15 et 80 ; et D-fructose-6-phosphate amidotransférase (GlmS), spot 85) ou sous-exprimés (GlmS, spot 97 ; et dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase (RfbC), spot 106). Une seconde catégorie rassemble 9 spots dont les niveaux d'expression chez les phénotypes résistant (*L. casei* Rosell-215) et intermédiaire (*L. casei* ATCC 334) sont similaires entre eux et différents du phénotype sensible (*L. casei* DN-114 001) (Phosphotransacétylase (Pta), spot 9 ; Phosphoglycerate mutase (Pgm), spots 10, 62, et 102 ; GlmS, spots 66 ; Adenylosuccinate synthase (PurA), spot 72, S-ribosyl-homocysteinase (LuxS), spot 74 ; Aspartyl/asparaginyl-tRNA synthase (AsnC), spot 75 ; et

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gap), spot 88). Enfin, une troisième classe réunit 12 spots aux niveaux d'expression équivalents entre les phénotypes résistant et sensible (Copper resistance protein (CutC), spot 19 ; D-alanine-activating enzyme (DltA), spots 20 et 53 ; F₁F₀ ATPase, delta subunit (AtpH), spot 26 ; Mannose-6-phosphate isomerase type (ManA), spot 32 ; ClpL, spot 34 ; Gap , spots 65, 70 et 71 ; L-lactate dehydrogenase (LdhL), spot 76 ; et Pgm, spots 79 et 87). A la différence des deux premières classes, cette dernière catégorie ne permet pas d'expliquer les différences de résistance au stress acide observées entre les souches *in vitro*. Les spots qui la composent ne représentent donc pas de bons candidats pour servir de marqueurs de cette propriété chez *L. casei*. De plus, 5 protéines (ClpL, DltA, Gap, GlmS et Pgm) existent sous plusieurs isoformes aux niveaux d'expression hétérogènes, ce qui suggère des rôles différents dans les processus de résistance à l'acidité de *L. casei*.

En vue de consolider les résultats obtenus et d'identifier des marqueurs potentiels de résistance à l'acidité chez *L. casei*, les niveaux d'expression des 15 spots appartenant aux deux premières classes ont également été étudiés pour les 3 autres souches initialement incluses dans les tests *in vitro* (CRL 431, F-19 et Shirota ; Figure 17).

La classification hiérarchique des spots d'intérêt fait ressortir deux classes principales. La première regroupe les spots surexprimés chez les phénotypes résistant et/ou intermédiaire (Pta, spot 9 ; ProS, spot 7 ; Pgm, spots 10 et 97 ; ClpL, spots 15 et 80 ; PurA, spot 72 ; LuxS, spot 74 ; et GlmS, spot 85). La seconde rassemble les spots à la fois surexprimés chez le phénotype sensible et sous-exprimés chez le phénotype résistant (Pgm, spots 62 et 102 ; GlmS, spots 66 et 97 ; AsnC, spot 75 ; et RfbC, spot 106). L'analyse du dendrogramme relatif aux souches montre que la distribution des niveaux d'expression des 15 spots d'intérêt est représentative de la différence de résistance des bactéries à l'acidité observée *in vitro*. Plus une souche est tolérante à l'acidité, plus son protéome constitutif comporte de spots sur- et sous-exprimés appartenant respectivement à la première et à la seconde classe. Ces 15 spots représentant 9 protéines, constituent donc un profil caractéristique de la résistance à l'acidité chez *L. casei* et peuvent servir à l'évaluation d'autres souches de l'espèce pour cette propriété.

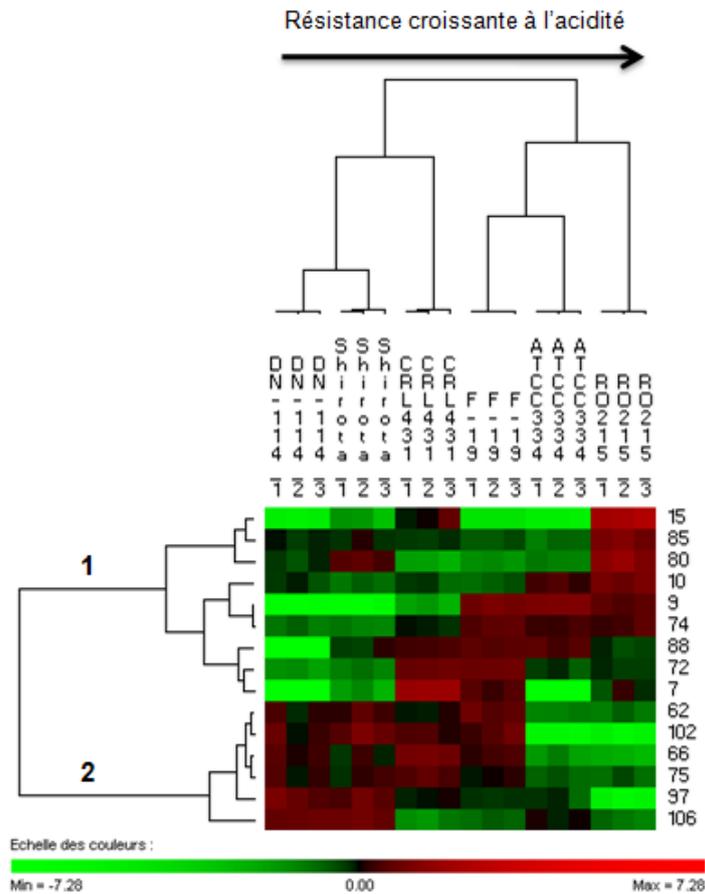


Figure 17. Représentation des niveaux d'expression des spots protéiques des deux premières classes de la Figure 16 dans les protéomes constitutifs totaux des six souches de *L. casei* utilisées dans cette étude. Les intensités croissantes des couleurs rouge et verte indiquent, respectivement, des niveaux d'expression croissants et décroissants.

En particulier, les niveaux d'expression de 5 protéines impliquées dans le métabolisme central (Pta et Pgm), la protection et la réparation des macromolécules (ClpL et LuxS), ainsi que la synthèse de la paroi cellulaire (GlmS) permettent d'expliquer la forte résistance relative de la souche Rosell-215 au choc acide. En effet, l'inactivation des gènes *pta* chez *E. coli* (343), *clpL* chez *L. reuteri* ATCC 55730 (331), et *luxS* chez *L. rhamnosus* GG (170) a affecté la résistance des cellules à un stress acide, ce qui suggère un lien direct entre les protéines qu'ils encodent et cette propriété. Ainsi, les niveaux relatifs élevés de ces protéines observés dans le protéome constitutif du phénotype résistant pourraient constituer un avantage en vue de sa survie en milieu acide. De même, la Pgm et la GlmS ont été surexprimées dans les protéomes constitutifs de mutants de la souche *L. lactis* MG 1363 résistants à l'acidité, comparativement à la souche sauvage (42). Si le rôle de la Pgm dans la résistance à l'acidité n'est pas élucidé, la GlmS intervient dans les premières étapes de la synthèse du

peptidoglycane et participe ainsi au maintien de l'intégrité de l'enveloppe cellulaire, une des stratégies utilisées par les bactéries pour résister à l'action délétère des bas pH (cf. Chapitre 1). L'activité de la Glms a notamment été corrélée à l'épaisseur de la paroi cellulaire et à la finesse de son maillage chez *Staphylococcus aureus*, en lien avec la résistance des cellules à la vancomycine (69). Néanmoins, l'implication exacte de ces modifications dans la résistance à l'acidité reste à déterminer.

Finalement, 3 (ClpL, GlmS, et Pgm) des 5 protéines reliées à la forte résistance relative de *L. casei* Rosell-215 ont été retrouvées sous différentes isoformes aux niveaux d'expression variables. Notamment, si les niveaux d'expression d'une isoforme de la GlmS (spot 85) sont représentatifs du phénotype résistant de la souche Rosell-215, ceux d'une autre isoforme (spot 97) ont pu être corrélés négativement à la survie des souches au stress acide observée *in vitro* (test de corrélation de Spearman ; $p < 0,05$). Cette dernière isoforme représente donc un marqueur potentiel de sensibilité à l'acidité chez *L. casei*. Ces éléments suggèrent qu'une même protéine peut avoir un rôle différent dans les processus de résistance à l'acidité selon l'isoforme considérée. Une étude plus approfondie des protéines ClpL, GlmS et Pgm et de leurs isoformes est donc nécessaire pour mieux comprendre l'influence des modifications post-traductionnelles sur leur activité et sur la résistance à l'acidité chez *L. casei*.

2.3 Analyse protéomique comparative de *L. plantarum*

Comme pour *L. casei*, un profil caractéristique de la résistance à l'acidité a été recherché chez *L. plantarum* afin de mettre en évidence les déterminants inter- et intra-spécifiques de cette propriété. Sur la base des résultats des tests *in vitro*, trois souches de *L. plantarum* aux phénotypes différents ont été sélectionnées (LC 804, résistant ; CIP A159, intermédiaire ; et CECT 4185, sensible). Des électrophorèses 2D ont été réalisées avec leurs protéomes totaux extraits de cellules cultivées en conditions standard (Figure 18, A-C).

L'analyse d'image a révélé 102 spots protéiques exprimés différemment entre les souches, dont 94 représentant 67 protéines ont pu être identifiés (Annexe 2). Ces protéines, appartenant à 14 catégories fonctionnelles, sont représentatives de la variabilité inter-souche au sein de l'espèce *L. plantarum* (Figure 19).

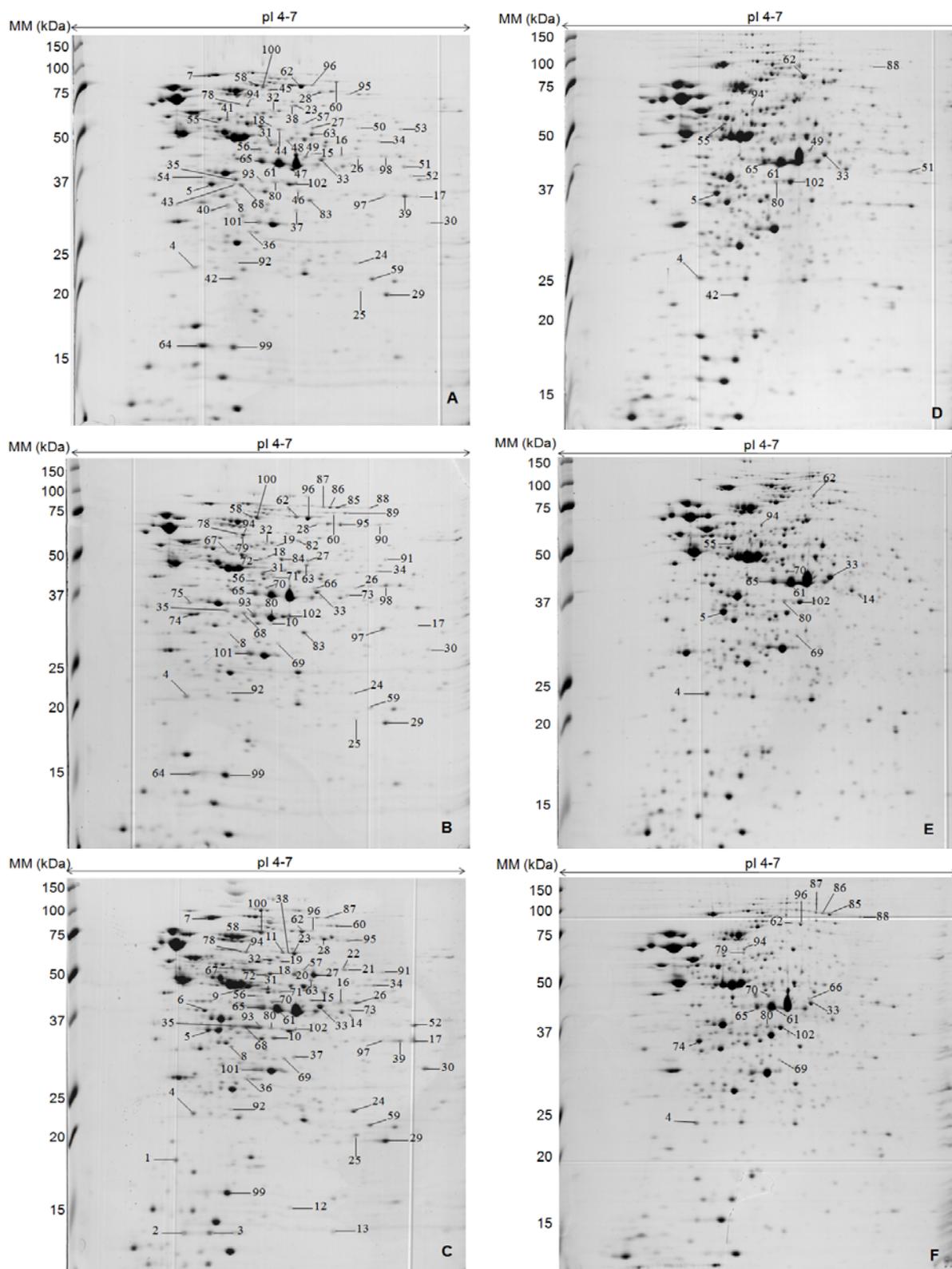


Figure 18. Photographies représentatives de gels 2D (12% d'acrylamide ; pH 4,0-7,0 ; coloration au bleu de Coomassie) des extraits protéiques totaux (charge : 150 μ g) des souches *L. plantarum* CECT 4185 (A et D), CIP A159 (B et E), et LC 804 (C et F), cultivées en conditions standard (A-C) et stressantes (pH 4,0 ; D-F) jusqu'en début de phase stationnaire. Les spots différemment exprimés entre les trois souches en conditions standard et identifiés par LC-MS/MS sont numérotés (1-102 ; A-C), avec un accent mis sur les changements d'expression après le stress acide pour les protéines potentiellement impliquées dans la résistance à l'acidité (D-F).

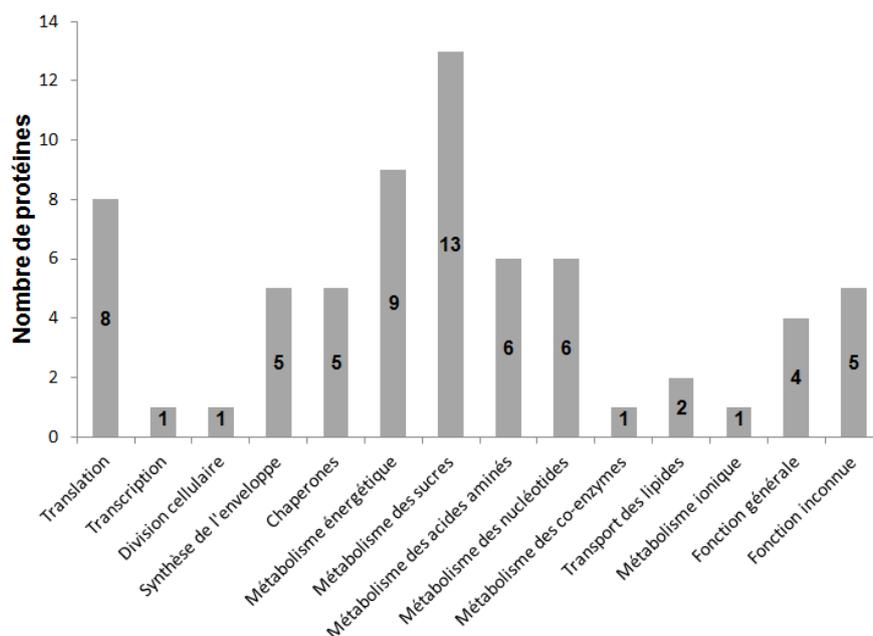


Figure 19. Distribution fonctionnelle des protéines différemment exprimées en conditions standard entre les souches *L. plantarum* CECT 4185, CIP A159, et LC 804. Les 67 protéines identifiées ont été regroupées selon leur COG (Clusters of Orthologous Groups, (310, 311)).

Globalement, les protéines différemment exprimées en conditions standard entre les trois souches de *L. plantarum* étudiées appartiennent aux mêmes catégories fonctionnelles que celles identifiées chez *L. casei* (Figure 15). De plus, la répartition de ces protéines dans les différentes catégories est très similaire entre les deux espèces. Malgré ces ressemblances, seules 13 protéines, impliquées dans la traduction (glycyl-tRNA synthase (GlyS) ; et seryl-tRNA synthase (SerS)), la synthèse de la paroi cellulaire (RfbC), les activités chaperonnes (ClpL ; et small heat shock protein 3 (Hsp3)), et les métabolismes énergétique (LdhL ; pyruvate dehydrogenase (PdhB) ; et Pta), des sucres (dihydroxyacetone kinase (Dak2) ; Gap ; mannitol-1-phosphate dehydrogenase (MtlD) ; et N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase (NagA)) et des nucléotides (PurA), sont communes aux deux profils (Annexes 1 et 2).

Parmi les différences constitutives entre *L. plantarum* LC 804, CIP A159, et CECT 4185, 17 protéines représentées par 28 spots ont été citées dans la littérature comme participant aux processus de résistance à l'acidité d'autres bactéries, à travers l'étude de mutants (Tableau 12). Six d'entre elles (ClpL, Gap, LdhL, Pta, PurA, et RfbC) ont été précédemment observées dans l'étude portant sur *L. casei*, dont quatre (ClpL, Pta, PurA, et RfbC) appartiennent au profil caractéristique de la résistance à l'acidité mis en évidence pour cette espèce.

Tableau 12. Protéines potentiellement impliquées dans la résistance à l'acidité parmi les spots différemment exprimés en conditions standard entre les souches *L. plantarum* CECT4185, CIP A159, et LC 804, et impact d'un stress acide sur leurs niveaux d'expression. Les protéines en gras ont été précédemment observées dans l'étude portant sur la résistance à l'acidité de *L. casei*.

Catégorie fonctionnelle	Protéine identifiée	Numéro d'accès ^a	Symbole du gène	Référence	Spot ^b	Facteur de variation : conditions acides vs. standard ^c		
						CECT4185	CIP A159	LC 804
Traduction, synthèse et structure des ribosomes	Lysyl-tRNA synthase	lp_0550	<i>lysS</i>	(42)	79	n.a.	n.a.	1,7
					94	1*	-1,1*	-1,1*
	30S ribosomal protein S2	lp_2055	<i>rpsB</i>	(42)	102	11,6	4,3	3,4
Synthèse de la paroi cellulaire	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	lp_1189	<i>rfbB</i>	(42)	14	n.a.	1,2*	n.a.
					51	1,1*	n.a.	n.a.
	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	lp_1188	<i>rfbC</i>	(42)	42	1,4	n.a.	n.a.
Protéines de stress, chaperonnes	Heat shock protein GrpE	lp_2028	<i>grpE</i>	(70)	4	2	2	2,3
	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpL	lp_3583	<i>clpL</i>	(331)	62	1,4	-11	-4,4
					96	--	--	-4,8
Production et conversion énergétiques	L-lactate dehydrogenase	lp_0537	<i>ldhL</i>	(42)	5	1,2*	-1,1*	n.a.
					74	n.a.	n.a.	1,2*
					80	-1,1*	1,1*	-18,4
Métabolisme et transport des sucres	Phospho-transacetylase	lp_0807	<i>pta</i>	(343)	43	--	n.a.	n.a.
	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	lp_0789	<i>gap</i>	(42, 275)	46	--	n.a.	n.a.
					61	-2,1	1,1*	1,0*
65					-1,6	1,4	1,0*	
Métabolisme et transport des acides aminés	Mannose-6-phosphate isomerase	lp_2384	<i>pmi</i>	(42)	49	-1,0*	n.a.	n.a.
					70	n.a.	1,1*	1,1*
	6-phospho-beta-glucosidase	lp_2778	<i>pbg5</i>	(42)	55	3,9	-1,7	n.a.
	Multiple sugar ABC transporter	lp_0180	<i>msmK1</i>	(42)	73	n.a.	--	--
	Phosphoketolase	lp_3551	<i>xpk2</i>	(255, 275)	85	n.a.	n.a.	1,2*
					86	n.a.	--	-2,0
				87	n.a.	--	-1,3*	
Méthionine synthase	lp_1375	<i>metE</i>	(275)	88	++	n.a.	2,1	
Métabolisme et transport des nucléotides	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	JDM1_2556	<i>guaB</i>	(42)	33	2,2	1,1*	1,1*
					66	n.a.	n.a.	-2,6
	Adenylosuccinate synthase	lp_3270	<i>purA</i>	(42)	63	--	--	--
Métabolisme et transport des lipides	S-malonyltransferase	lp_1673	<i>fabD</i>	(42)	69	n.a.	1,0	1,1

^aNuméro d'accès dans la banque de données NCBIInr.

^bNuméro de spot correspondant à la Figure 17.

^cRapport r des volumes des spots en conditions stressantes et standard pour la souche considérée. Le facteur de variation est égal à r si $r > 1$ et à $-1/r$ autrement. -- : spot non détecté en conditions stressantes ; ++ : spot non détecté en conditions standard ; n.a. : non applicable (spot non détecté dans les deux conditions). * : le facteur de variation n'est pas significativement différent de 1 ($p < 0,05$).

Une classification hiérarchique de ces 28 spots d'intérêt a permis de dégager deux classes principales de protéines (Figure 20). La première regroupe les protéines surexprimées chez le phénotype résistant (LC 804) : heat shock protein GrpE (GrpE), spot 4 ; inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (GuaB), spot 66 ; S-malonyltransferase (FabD), spot 69 ; mannose-6-phosphate isomerase (Pmi), spot 70 ; multiple sugar ABC transporter (MsmK1), spot 73 ; LdhL, spots 74 et 80 ; lysyl-tRNA synthase (LysS), spots 79 et 94 ; phosphoketolase (Xpk2), spots 85, 86, et 87 ; méthionine synthase (MetE), spot 88 ; ClpL, spot 96 ; et 30S ribosomal protein S2 (RpsB), spot 102. Cette classe de 11 protéines est représentative de la forte résistance relative de la souche *L. plantarum* LC 804 au stress acide. Elle inclut la chaperonne ClpL, également surexprimée chez le phénotype résistant de *L. casei* (Rosell-215), et qui représenterait donc un marqueur inter-espèce de la résistance à l'acidité. Les 10 autres protéines n'ont en revanche pas été reliées à la forte résistance relative de *L. casei* Rosell-215, dont deux participent aux processus communément utilisés par les bactéries pour lutter contre ce type de stress : la protection et la réparation des macromolécules (GrpE, (70)) et la modulation de la composition de la membrane en acides gras à longue chaîne (FabD, (42)).

La seconde catégorie mise en évidence par cette classification hiérarchique rassemble les protéines sous-exprimées chez la souche résistante (LC 804) : LdhL, spot 5 ; dTDP-glucose 4,6-dehydratase (RfbB), spots 14 et 51 ; GuaB, spot 33 ; RfbC, spot 42 ; Pta, spot 43 ; Gap, spots 46, 61 et 65 ; Pmi, spot 49 ; 6-phospho- β -glucosidase (Pbg5), spot 55 ; ClpL, spot 62 ; PurA, spot 63. Au vu de leurs niveaux d'expression, ces protéines semblent jouer un rôle secondaire voire contre-productif dans les processus de résistance à l'acidité de *L. plantarum*. Deux d'entre elles (ClpL, spot 62 ; et GuaB, spot 33) sont des isoformes de protéines par ailleurs surexprimées chez le phénotype résistant. A l'instar des observations faites pour *L. casei*, ceci suggère une contribution inégale de ces isoformes dans l'activité des protéines et dans la résistance de *L. plantarum* à l'acidité. Deux autres protéines (RfbB et RfbC) participent à la biosynthèse du dTDP-L-rhamnose, un précurseur important des polysaccharides de la paroi cellulaire (28). En particulier, la RfbC s'est non seulement retrouvée sous-exprimée chez le phénotype résistant (LC 804) mais aussi surexprimée chez le phénotype sensible (CECT 4185), conformément aux observations faites chez *L. casei*. Ces éléments laissent penser que la RfbC pourrait constituer un indicateur inter-espèce de sensibilité des souches à l'acidité, en lien avec une composition particulière de la paroi bactérienne.

d'analyse comparative, il est essentiel que les bactéries soient dans des états physiologiques proches, car l'expression des protéines est fonction de la phase de croissance des cellules, comme précédemment démontré pour *L. plantarum* WCFS1 (60). Lors du choc acide initial, les bactéries passent donc d'un milieu à pH compris entre 5,4 et 5,6 selon les souches considérées, à un milieu à pH 4,0, soit une variation (Δ pH) de 1,5 points de pH en moyenne.

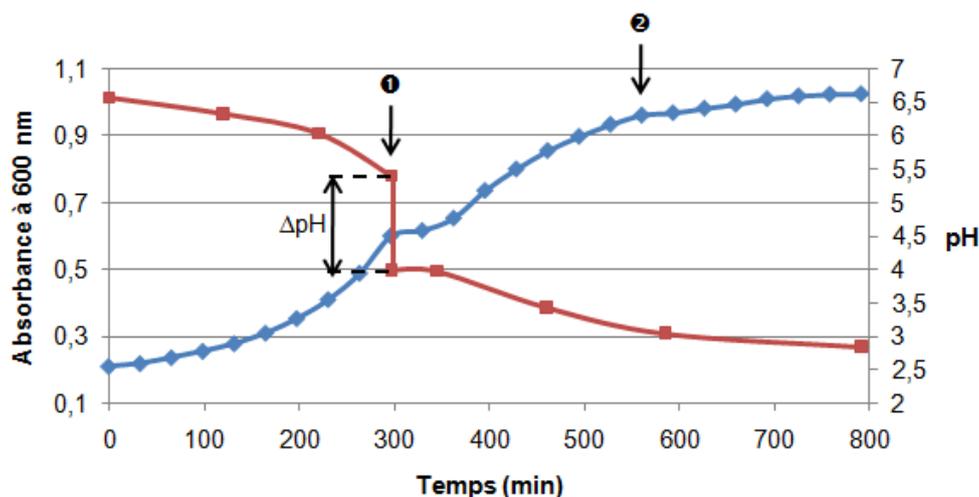


Figure 21. Graphique représentatif de l'effet d'un stress acide sur les cinétiques de croissance de *L. plantarum* LC 804 (en bleu) et d'acidification du milieu (en rouge). ❶ : les cellules en début de phase exponentielle dans du MRSC ont été collectées et remises en suspensions dans du MRSC ajusté à pH 4,0. ❷ : les cellules stressées en début de phase stationnaire sont récupérées en vue de l'analyse de leurs protéomes totaux.

Des électrophorèses 2D ont été effectuées avec les extraits protéiques totaux des trois souches stressées (Figure 18 (D-F)). Globalement, les profils obtenus sont relativement différents de ceux réalisés dans les conditions standard de croissance, ce qui suggère des changements quantitatifs pour la plupart des spots protéiques observés. Le Tableau 12 présente les modifications des niveaux d'expression des 17 protéines d'intérêt. Ces niveaux n'ont pas été modifiés (facteur de variation r inférieur à 1,5 en valeur absolue) pour les trois protéines impliquées dans la synthèse de la paroi cellulaire (RfbB, RfbC) et de la membrane (FabD) ni pour l'enzyme clé du métabolisme central Pmi, ce qui suggère un rôle mineur de ces protéines dans la réponse de *L. plantarum* au stress acide. A l'inverse, quatorze protéines ont vu leurs niveaux d'expression changer après croissance des cellules à pH 4 ($|r| \geq 1,5$). Trois protéines ont été induites (GrpE, MetE et RpsB), conformément à ce qui a été rapporté

dans des travaux précédents (42, 70, 275). Trois autres (MsmK1, Pta et PurA) ont été réprimées au point de ne plus être détectées, à l'opposé des observations faites pour *L. lactis* MG163 (41). Enfin, les modifications d'expression des 7 protéines restantes (ClpL, Gap, GuaB, LysS, LdhL, Pbg5, Xpk2) ont été fonction de la souche et de l'isoforme considérées. Cette régulation différentielle suggère que plusieurs stratégies coexistent dans les processus de résistance de *L. plantarum* à l'acidité, et que les voies de défense privilégiées dépendraient des souches. A noter que ces processus sont susceptibles de varier au cours du temps, comme il a été démontré pour la réponse de *E. faecalis* V583 à un stress biliaire (30). Il serait donc judicieux d'étudier la dynamique de ces réponses afin de mieux les comprendre.

2.4 Conclusion

L'approche méthodologique utilisée dans ces travaux a permis d'explorer la diversité protéique naturelle de souches de *L. casei* et *L. plantarum* en relation avec leur résistance à l'acidité évaluée *in vitro*. Des profils intra-spécifiques de cette propriété bactérienne ont été mis en évidence pour chacune des deux espèces étudiées, qui reflètent les différents phénotypes observés (résistant, intermédiaire, et sensible). Par ailleurs, les dissemblances inter-spécifiques observées pourraient expliquer la plus forte résistance de *L. plantarum* comparativement à *L. casei*. Globalement, les protéines impliquées interviennent dans la protection et la réparation des macromolécules, le maintien de l'intégrité de la membrane et de la paroi cellulaire, la traduction et le métabolisme central. Il semble cependant que l'activité et le rôle de certaines de ces protéines dans l'acido-résistance dépendent de l'isoforme considérée. A l'inverse, d'autres protéines paraissent avoir un rôle contre-productif dans la lutte des bactéries contre le stress acide. Seules la ClpL et la RfbC, respectivement sur- et sous-exprimées chez les phénotypes résistants des deux espèces, sont susceptibles de représenter des marqueurs de résistance et de sensibilité à l'acidité du genre *Lactobacillus*. Cette hypothèse doit néanmoins être vérifiée en étudiant d'autres souches de lactobacilles. Enfin chez *L. plantarum*, l'analyse des modifications d'expression protéique a donné un aperçu quant aux stratégies de réponse des cellules à un stress acide, réponse qui, au vu des expériences menées, semble spécifique à la souche considérée.

3. Tolérance à la bile

Après le passage dans l'estomac, les bactéries sont confrontées à l'action délétère des sels biliaires. Ce facteur majeur de stress pour les cellules bactériennes survient dès leur arrivée dans le duodénum et persiste durant tout leur séjour dans l'intestin (180). Dans la perspective d'une colonisation même transitoire de la muqueuse intestinale, il est donc nécessaire que les bactéries probiotiques puissent non seulement survivre au stress biliaire mais également se développer en leur présence. C'est pourquoi, la capacité de croissance en présence de bile (tolérance) représente l'un des principaux critères *in vitro* de sélection des candidats probiotiques (98).

Les effets de la bile sur les cellules bactériennes sont multiples. Ils englobent une action détergente, la baisse du pH intracellulaire, la dégradation de l'ADN, ainsi que des stress osmotique et oxydatif (21). Par conséquent, cette diversité des effets doit être prise en compte dans les études portant sur le stress biliaire. Bien que les mécanismes de survie des bactéries aux effets de la bile ne soient pas bien compris, un certain nombre de voies ont été mises en évidence (cf. Chapitre 1). Dans le but d'identifier des marqueurs potentiels de la tolérance à la bile chez *L. casei* et *L. plantarum*, l'approche protéomique a été utilisée.

3.1 Evaluation *in vitro* de la tolérance des souches à la bile

La tolérance de 6 souches de *L. casei* et de 10 de *L. plantarum* a été déterminée en évaluant leur capacité de croissance en présence de concentrations croissantes de bile bovine (*L. casei* : 0,1%, 0,5%, 1,0% ; 2,0% et 4% ; *L. plantarum* : 0,5%, 1,0%, 1,8% et 3,6%). Les souches ont été comparées sur la base de leurs taux de croissance maximum, calculés à partir de mesures d'absorbance relativement à un témoin cultivé en l'absence de bile. Cette approche s'est révélée efficace pour discriminer des souches d'une même espèce vis-à-vis de cette propriété (137, 275). Les résultats sont consignés dans les Tableaux 13 et 14.

Tableau 13. Effet de la concentration en bile bovine sur les taux de croissance relatifs de six souches de *L. casei*.

Souches	Taux de croissance relatifs* (% μ) par niveau de concentration en bile (% [m/v])					
	0,0	0,1	0,5	1,0	2,0	4,0
Rosell- 215	100	91,3 \pm 2,7 ^a	54,3 \pm 1,8 ^a	48,2 \pm 2,6 ^a	36,9 \pm 0,9 ^a	30,8 \pm 1,4 ^a
F-19	100	90,5 \pm 1,6 ^a	54,7 \pm 1,1 ^a	43,9 \pm 3,2 ^b	32,9 \pm 2,0 ^{a,b}	27,8 \pm 1,7 ^a
CRL 431	100	90,6 \pm 1,5 ^a	52,7 \pm 1,4 ^a	47,7 \pm 1,4 ^{a,b}	29,8 \pm 2,4 ^{b,c}	23,5 \pm 2,4 ^b
Shirota	100	84,6 \pm 2,0 ^b	48,5 \pm 1,1 ^b	38,0 \pm 2,9 ^c	28,9 \pm 2,4 ^c	18,4 \pm 2,7 ^{b,c}
DN-114 001	100	81,4 \pm 2,2 ^{b,c}	33,3 \pm 2,0 ^c	25,3 \pm 2,4 ^d	24,1 \pm 2,8 ^d	20,4 \pm 2,6 ^c
ATCC 334	100	80,7 \pm 0,5 ^c	20,7 \pm 2,4 ^d	15,6 \pm 1,1 ^e	0,6 \pm 0,7 ^e	0,7 \pm 1,0 ^d

*Les données sont présentées sous la forme de pourcentages des taux de croissance (h^{-1}) obtenus en l'absence de bile, auxquels la valeur de 100% a été attribuée. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes pour lesquelles trois répétitions ont été effectuées. Pour chaque concentration en bile, les moyennes avec des lettres différentes (a à f) sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Tableau 14. Effet de la concentration en bile bovine sur les taux de croissance relatifs de dix souches de *L. plantarum*.

Souche	Taux de croissance relatifs* (% μ) par niveau de concentration en bile (% [m/v])				
	0,0	0,5	1,0	1,8	3,6
299V	100	97,1 \pm 1,4 ^a	96,3 \pm 1,2 ^a	93,5 \pm 2,9 ^a	91,2 \pm 2,3 ^a
LC 660	100	93,9 \pm 0,8 ^a	94,2 \pm 2,0 ^a	89,6 \pm 1,7 ^a	85,5 \pm 3,0 ^b
CECT 748	100	81,7 \pm 1,0 ^b	80,3 \pm 0,6 ^b	80,5 \pm 1,8 ^b	79,1 \pm 0,9 ^c
CECT 4185	100	78,5 \pm 2,2 ^{b,c}	78,3 \pm 0,7 ^{b,c}	74,5 \pm 2,6 ^c	71,6 \pm 2,1 ^d
WHE 92	100	79,1 \pm 2,4 ^{b,c}	76,2 \pm 1,1 ^c	72,3 \pm 4,3 ^c	66,9 \pm 0,5 ^{d,e}
LC 804	100	76,2 \pm 1,7 ^{c,d}	76,6 \pm 0,9 ^c	72,8 \pm 1,3 ^c	68,4 \pm 1,5 ^e
LC 800	100	74,1 \pm 3,6 ^d	67,9 \pm 1,6 ^d	66,3 \pm 2,0 ^d	66,5 \pm 1,6 ^e
CECT 749	100	69,6 \pm 1,9 ^e	68,9 \pm 3,2 ^d	68,1 \pm 1,4 ^d	66,8 \pm 2,4 ^e
CIP A159	100	60,7 \pm 0,9 ^f	51,4 \pm 1,1 ^e	43,9 \pm 2,8 ^e	27,8 \pm 3,1 ^f
LC 56	100	58,2 \pm 0,5 ^f	45,5 \pm 2,5 ^f	39,4 \pm 1,4 ^e	19,9 \pm 3,7 ^g

*Les données sont présentées sous la forme de pourcentages des taux de croissance (h^{-1}) obtenus en l'absence de bile, auxquels la valeur de 100% a été attribuée. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes pour lesquelles trois répétitions ont été effectuées. Pour chaque concentration en bile, les moyennes avec des lettres différentes (a à g) sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Pour chacune des deux espèces étudiées, une analyse de la variance à deux facteurs a montré un effet significatif de la souche et de la concentration en bile ($p < 0,05$). Dans les deux cas, une augmentation de la concentration en bile s'est traduite par une diminution des taux de croissance relatifs. Globalement, les souches de *L. plantarum* se sont révélées plus tolérantes aux sels biliaires que les souches de *L. casei*, ce qui est en accord avec de précédentes observations (295). Cette tendance rappelle celle obtenue pour la résistance à l'acidité, ce qui suggère des capacités relatives analogues pour les souches à lutter contre ces deux stress environnementaux. Toutefois, si les profils de tolérance à la bile sont proches de ceux relatifs à la résistance à l'acidité chez *L. casei*, la souche *L. casei* Rosell-215 présentant notamment d'excellentes aptitudes pour les deux propriétés, il en va tout autrement pour l'espèce *L. plantarum* (cf. Tableaux 9 et 10). Il n'y a donc pas de correspondance systématique entre ces deux propriétés bactériennes, comme rapporté précédemment pour d'autres souches de lactobacilles (139).

Les souches de *L. casei* ont pu être regroupées en trois catégories traduisant leurs différences de tolérance à la bile : les souches Rosell-215, CRL 431 et F-19 présentent une tolérance élevée à la bile, les souches Shirota et DN-114 001 ont des niveaux de tolérance intermédiaires, et la souche ATCC 334 montre une faible tolérance à la bile. Un classement similaire a pu être effectué pour les souches de *L. plantarum* : *L. plantarum* 299V et LC 660 affichent une tolérance élevée à la bile, *L. plantarum* LC 56 et CIP A159 y sont peu tolérantes, et les 6 autres souches (CECT 748^T, CECT 749, CECT 4185, LC 800, LC 804, et WHE 92) montrent une tolérance intermédiaire. Ces différences, associées à celles concernant la résistance à l'acidité, suggèrent une capacité inégale des souches à résister aux conditions du tractus gastro-intestinal. Les données publiées montrent toutefois que les probiotiques utilisés dans ces travaux résistent bien à ces conditions (67, 143, 243, 351), si l'on excepte *L. casei* CRL-431 et *L. casei* Rosell-215 pour lesquels les données sont respectivement contradictoires (107, 169) et absentes.

3.2 Analyse protéomique comparative de *L. casei*

D'après les résultats du test *in vitro* de tolérance à la bile, les protéomes totaux des souches *L. casei* ATCC 334 (faible tolérance), *L. casei* DN-114 001 (tolérance intermédiaire) et *L. casei* Rosell-215 (tolérance élevée), cultivées en conditions standard de croissance,

peuvent être comparés afin d'établir un lien entre la tolérance des cellules à la bile et leurs profils protéomiques constitutifs. Or, ces derniers ont été analysés dans le cadre de l'étude de la résistance à l'acidité, les trois souches sélectionnées présentant également des phénotypes différents pour cette propriété (cf. § 2.1 et 2.2). Les 108 spots protéiques précédemment mis en évidence comme différemment exprimés entre ces trois souches peuvent donc servir à l'identification de marqueurs de la tolérance à la bile chez *L. casei*.

Par ailleurs, le sous-protéome d'intérêt a été étudié à la fois en conditions standard et en conditions stressantes (0,5% de bile) pour les six souches de *L. casei* utilisées dans ces travaux. La Figure 22 donne un exemple des profils électrophorétiques obtenus dans les deux cas pour trois souches aux tolérances à la bile différentes. Dans l'ensemble, ces profils diffèrent d'une condition à l'autre avec des changements quantitatifs pour la plupart des spots protéiques observés. Précisément, la majorité (~80%) des 108 protéines d'intérêt a vu ses niveaux varier de façon hétérogène selon la souche considérée (Annexe 1). Néanmoins, 16 d'entre elles ont été sous-exprimées pour toutes les souches ($r < -1,5$), 3 autres ont été systématiquement surexprimées ($r > 1,5$), tandis que deux dernières protéines n'ont pas été affectées suite au stress biliaire ($|r| \leq 1,5$). Cette régulation différentielle suggère que la réponse de *L. casei* au stress biliaire est spécifique à la souche, à l'instar des observations faites chez *L. plantarum* pour le stress acide.

Les données ont ensuite été soumises à analyse statistique en vue d'identifier des profils caractéristiques de la tolérance à la bile chez *L. casei*. Une classification hiérarchique a d'abord permis de regrouper les souches selon leurs profils correspondant aux 108 spots protéiques d'intérêt (Figure 23). Celles-ci ont ainsi pu être réparties en deux classes majoritaires pour chacune des deux conditions de culture : une première classe regroupe les souches DN-114 001 et Shirota, aux tolérances à la bile intermédiaires ; une seconde classe réunit les souches Rosell-215, CRL 431, F-19 et ATCC 334 dont les tolérances à la bile sont élevées pour les trois premières et faible pour la dernière. Ces résultats montrent que les niveaux d'expression des 108 spots d'intérêt pour les six souches étudiées ne permettent pas de rendre compte des différences de tolérance à la bile observées *in vitro*. Ils traduisent plutôt la diversité génétique et la versatilité de l'espèce *L. casei*. Une analyse plus fine, capable de dégager les spots protéiques aux niveaux d'expression les mieux corrélés à la tolérance des souches à la bile, est donc nécessaire.

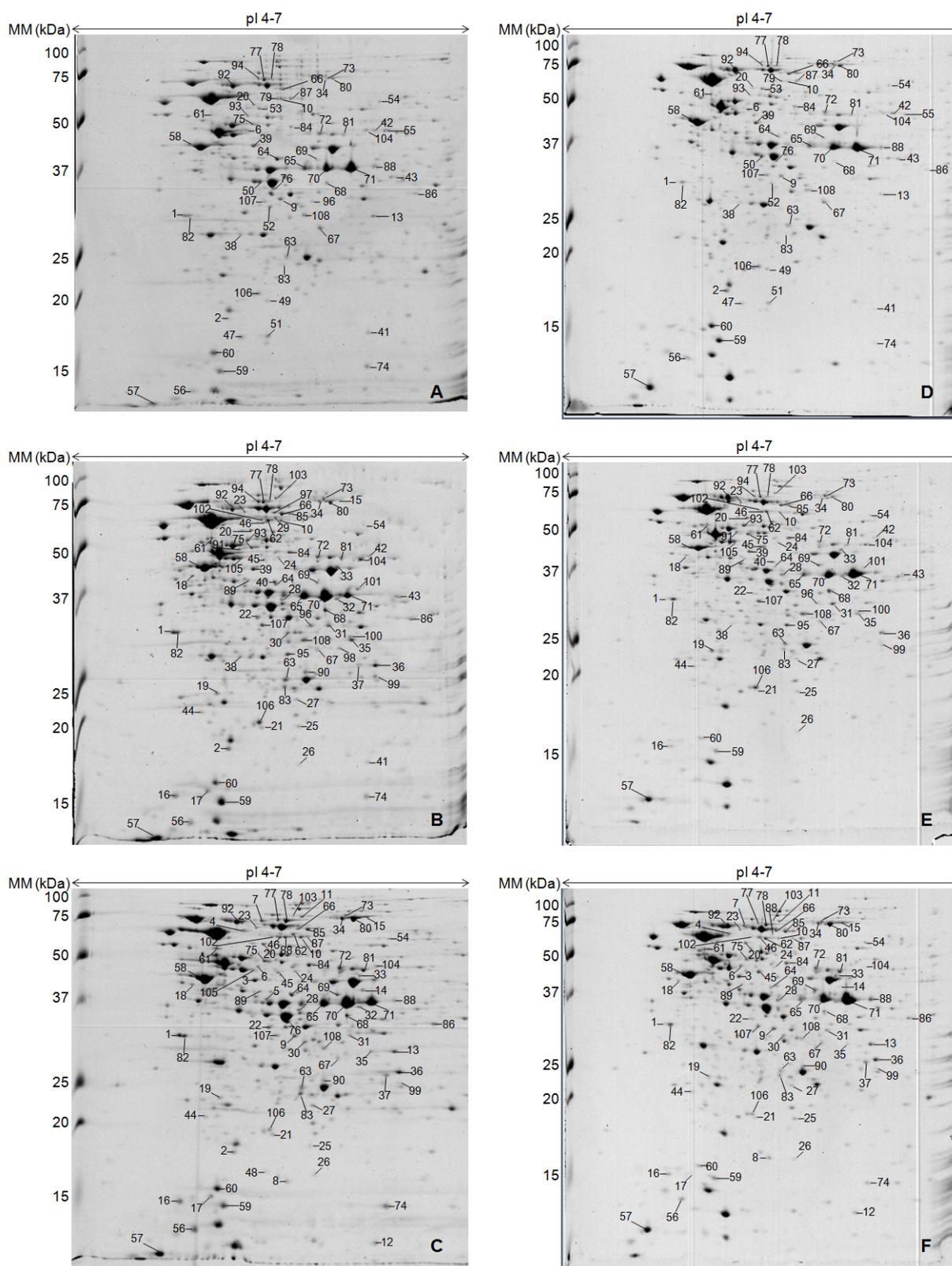


Figure 22. Photographies représentatives de gels 2D (12% d'acrylamide ; pH 4,0-7,0 ; coloration au bleu de Coomassie) des extraits protéiques totaux (charge : 150 µg) des souches *L. casei* ATCC 334 (A et D), DN-114 001 (B et E), et Rosell-215 (C et F), cultivées en conditions standard (A-C) et stressantes (0,5% m/v de bile ; D-F) jusqu'en début de phase stationnaire. Les chiffres 1-108 représentent les protéines différemment exprimées d'une souche à l'autre en conditions standard.

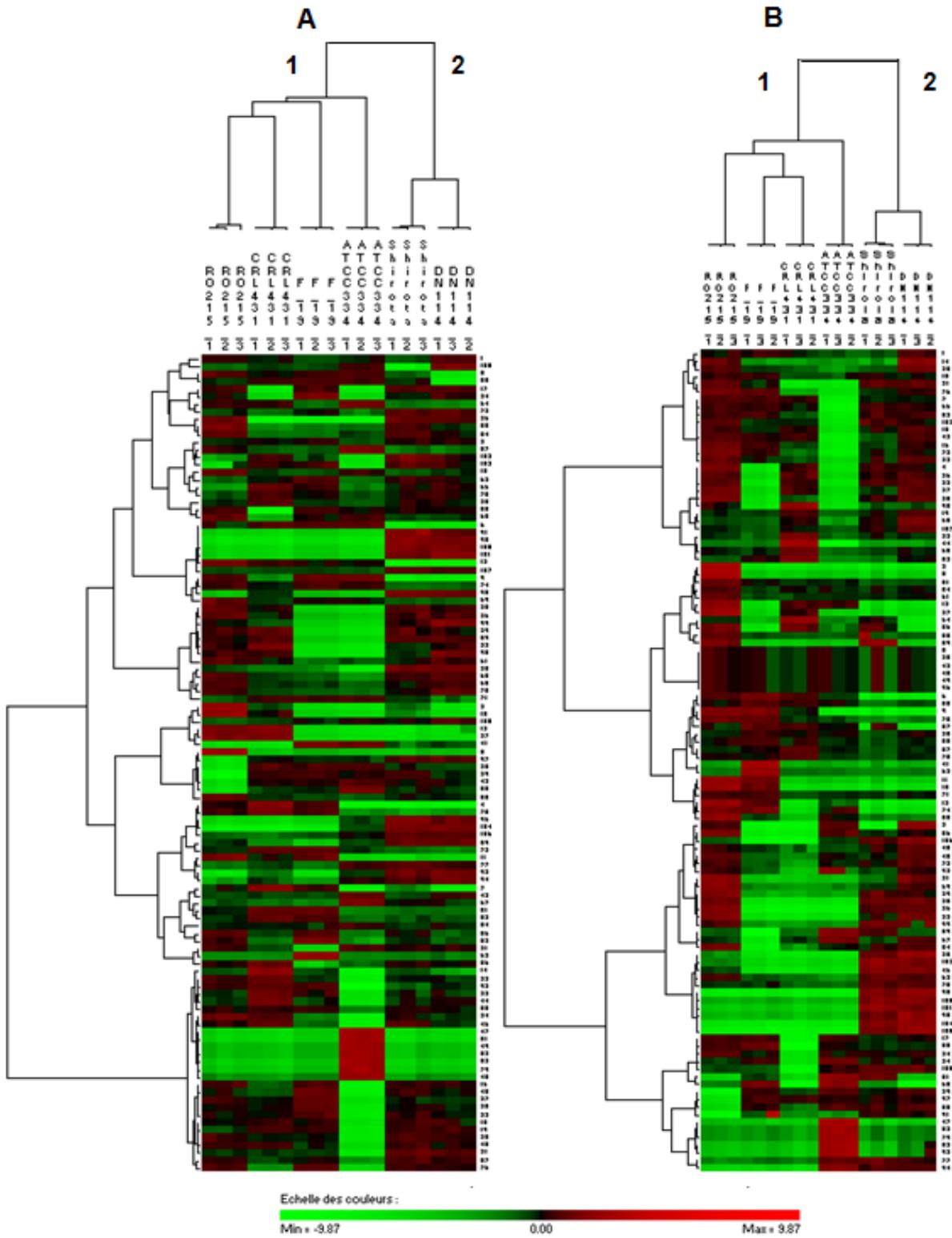


Figure 23. Classification hiérarchique des six souches de *L. casei* et des 108 spots protéiques d'intérêt en conditions standard (A) et stressantes (0,5% m/v de bile ; B). Les intensités croissantes des couleurs rouge et verte indiquent, respectivement, des niveaux d'expression croissants et décroissants.

Un test non-paramétrique de Spearman a été effectué dans le but d'identifier les spots protéiques dont les niveaux d'expression sont corrélés à la tolérance des souches à la bile. La Figure 24 montre les niveaux de confiance les plus élevés obtenus pour chaque spot en conditions standard et stressantes, quelle que soit la concentration de bile considérée. Plus le niveau de confiance est élevé, plus la corrélation est significative. Une analyse factorielle discriminante réalisée avec les spots protéiques dépassant le seuil de confiance de 95% (28 et 17 spots protéiques en conditions standard et stressantes, respectivement) a montré une très bonne discrimination des souches selon leur phénotype de tolérance à la bile (100% des souches correctement classées après validation croisée ; Figure 24).

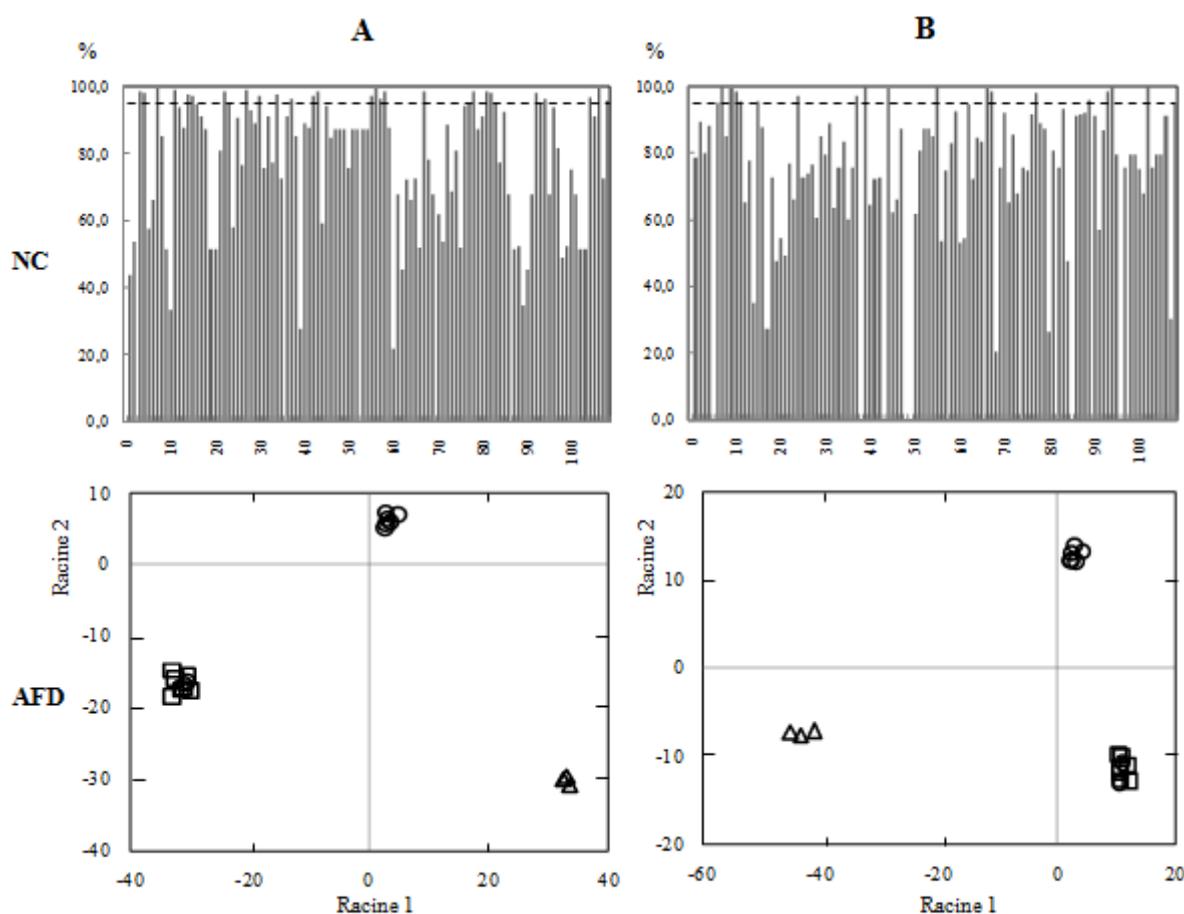


Figure 24. Corrélation entre les niveaux d'expression en conditions standard et stressantes des 108 spots protéiques d'intérêt, et la capacité des souches à tolérer la bile. La figure illustre, d'une part, les niveaux de confiance (NC) les plus élevés obtenus pour chaque spot lors du test de corrélation de Spearman quelle que soit la concentration en bile considérée, d'autre part, l'analyse factorielle discriminante (AFD) réalisée avec les spots protéiques pour lesquels $NC \geq 95\%$ en conditions standard (A) et stressantes (B). Phénotypes de tolérance à la bile : □, tolérance élevée ; ○, tolérance intermédiaire ; △, faible tolérance.

Les marqueurs potentiels de la tolérance à la bile chez *L. casei* ont été recherchés parmi les 28 (exceptés trois spots non-identifiés) et 17 spots protéiques dont l'expression en conditions standard et stressantes, respectivement, est corrélée ($p < 0,05$) à la capacité des souches à tolérer la bile. Les protéines ont été classées en fonction de leur implication dans les processus de tolérance à la bile rapportée dans la littérature (Figure 25). Trois niveaux de preuves ont été distingués selon la nature des données fournies.

D'abord, 12 protéines identifiées parmi 18 spots ont précédemment été mentionnées dans des études protéomiques relatives à la tolérance à la bile de lactobacilles (44, 162, 344) ou sont citées dans les présents travaux, dans le cadre de l'étude de la tolérance à la bile de *L. plantarum* (cf. § 3.3 ci-après). Parmi celles-ci, trois sont impliquées dans la synthèse de la paroi cellulaire (NagA, spots 3 et 39; glucosamine-6-phosphate isomerase (NagB), spot 83; et RfbC, spot 106), deux dans la protection et la détoxification des cellules (ClpL, spots 15 et 34; et ABC-type proline/glycine betaine transporter (OpuA), spot 24), et 7 dans le métabolisme central (Pta, spot 9; Pgm, spots 10 et 102; 6-phosphogluconate dehydrogenase (GndA), spots 55, 81 et 104; ribosomal protein L7/L12 (RplL), spot 57; enolase (Eno), spot 58; pyruvate kinase (Pyk), spot 77; et threonyl-tRNA synthase (ThRS), spots 78 et 94). Compte-tenu des niveaux de corrélation élevés obtenus pour ces protéines, celles-ci sont donc susceptibles de constituer un profil protéomique caractéristique de la tolérance intrinsèque à la bile (NagA, spot 3; ClpL, spots 15 et 34; GndA, spots 55, 81, et 104; RplL, spot 57, Eno, spot 58, ThRS, spots 78 et 94; NagB, spot 83; et RfbC, spot 106) et de la réponse au stress biliaire (Pta, spot 9; Pgm, spots 10 et 102; ClpL, spot 15; OpuA, spot 24; NagA, spot 39, GndA, spot 55; Pyk, spot 77; et ThRS, spot 94) chez *L. casei*, avec trois protéines (ClpL, spot 15; GndA, spot 55; et ThRS, spot 94) appartenant aux deux profils. Ces protéines représentent ainsi des marqueurs potentiels de la tolérance à la bile pour cette espèce. Par ailleurs, des analyses mutationnelles dirigées ont permis de vérifier l'importance de quatre d'entre elles (Pta, spot 9; ClpL, spots 15 et 34; OpuA, spot 24; and RfbC, spot 106) dans la tolérance bactérienne aux facteurs de stress liés à la bile (126, 296, 341, 343), ce qui conforte leur rôle supposé dans ces processus chez *L. casei*.

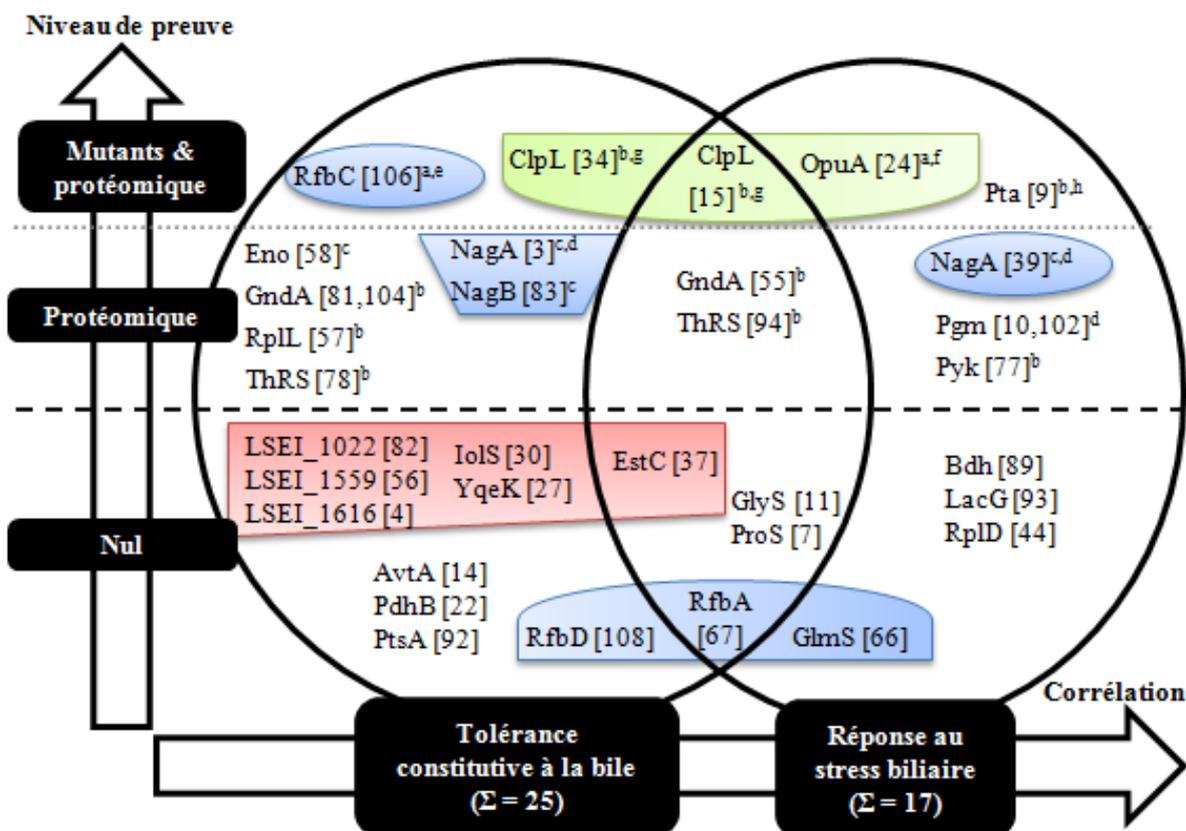


Figure 25. Marqueurs potentiels de la tolérance à la bile et de la réponse au stress biliaire chez *L. casei*. Les noms des protéines correspondent aux symboles conventionnels des gènes qui les encodent (Annexe 1). Les fonctions des protéines ont été divisées en quatre catégories (bleu : modification de l'enveloppe ; vert : protection et détoxification de la cellule ; rouge : fonction inconnue ; incolore : métabolisme central). Les nombres entre crochets indiquent les numéros des spots comme identifiés dans la Figure 22. Références bibliographiques : a : ces travaux (tolérance à la bile de *L. plantarum*, § 3.3) ; b : Burns *et al.*, 2010 (44) ; c : Koskeniemi *et al.*, 2011 (162) ; d : Wu *et al.*, 2010 (344) ; e : Han *et al.*, 2010 (126) ; f : Sleator *et al.*, 2005 (296) ; g : Whitehead *et al.*, 2008 (341) ; et h : Wolfe, 2005 (343).

Ensuite, 17 protéines n'ont pu être reliées à la tolérance à la bile d'après les données disponibles dans la littérature. Six protéines ont des fonctions inconnues (protéines LSEI_1616, LSEI_1559, et LSEI_1022 ; spots 4, 56, et 82, respectivement) ou mal caractérisées (protéine YqeK, spot 27 ; aryl-alcool dehydrogenase related enzyme (IolS), spot 30 ; et esterase C (EstC), spot 37). Trois autres sont impliquées dans la modification de la paroi cellulaire (GlmS, spot 66 ; dTDP-glucose pyrophosphorylase (RfbA), spot 67 ; et dTDP-4-dehydroxanthose reductase (RfbD), spot 108). Les 8 protéines restantes participent au métabolisme central (ProS, spot 7 ; GlyS, spot 11 ; MocR-like aminotransferase (AvtA), spot 14 ; PdhB, spot 22 ; 50S ribosomal protein L4 (RplD), spot 44 ; alcool-acétaldéhyde dehydrogenase (Pdh), spot 89 ; phosphoenolpyruvate-protein kinase (PtsA), spot 92 ; et 6-phospho- β -galactosidase (LacG), spot 93). Compte-tenu de la corrélation significative

($p < 0,05$) de leurs niveaux d'expression avec la capacité des souches à tolérer la bile, ces 17 protéines pourraient toutefois jouer un rôle clé dans les processus de tolérance de *L. casei* aux sels biliaries et ainsi faire partie des profils caractéristiques de la tolérance intrinsèque à la bile (protéines LSEI_1616, YqeK, LSEI_1559, et LSEI_1022 ; spots 4, 27, 56, et 82, respectivement ; ProS, spot 7 ; GlyS, spot 11 ; AvtA, spot 14 ; PdhB, spot 22 ; IolS, spot 30 ; EstC, spot 37 ; RfbA, spot 67 ; PtsA, spot 92 ; et RfbD, spot 108), et de la réponse au stress biliaire (ProS, spot 7 ; GlyS, spot 11 ; EstC, spot 37 ; RplD, spot 44 ; GlmS, spot 66 ; RfbA, spot 67 ; Bdh, spot 89 ; et LacG, spot 93) identifiés précédemment. Il serait donc intéressant de vérifier l'implication de ces protéines dans ces processus et de les prendre en considération dans les études concernant la tolérance à la bile.

Finalement, 4 des 5 protéines expliquant la forte résistance relative de *L. casei* Rosell-215 au choc acide (ClpL, GlmS, Pgm et Pta) représentent des marqueurs potentiels de la tolérance aux sels biliaries pour cette espèce. De plus, la RfbC, protéine liée à la sensibilité des souches au stress acide, se retrouve négativement corrélée à la tolérance à la bile. Malgré ces correspondances, les profils protéiques caractéristiques de la résistance à l'acidité et de la tolérance aux sels biliaries mis en évidence dans ces travaux chez *L. casei* sont globalement différents, ce qui laisse penser que des voies de défense distinctes sont mises en œuvre par les bactéries pour lutter contre ces deux types de stress.

3.3 Analyse protéomique comparative de *L. plantarum*

Comme pour *L. casei*, les protéines susceptibles d'être impliquées dans la tolérance de *L. plantarum* à la bile ont été recherchées, afin de mettre en évidence les déterminants intra-spécifiques de cette propriété. Cela a également permis d'identifier des déterminants inter-spécifiques, en comparaison avec les données de *L. casei*. A la différence de *L. casei* où six souches ont été analysées, seules trois souches de *L. plantarum* aux tolérances à la bile différentes ont été étudiées dans ces travaux (299V, tolérance élevée ; LC 804 ; tolérance intermédiaire ; et LC 56, faible tolérance). Dans ces conditions, il n'était pas possible d'utiliser le test de corrélation de Spearman pour évaluer de manière pertinente la corrélation entre le niveau d'expression des protéines et les phénotypes de tolérance à la bile des souches. C'est pourquoi, une approche plus ciblée, similaire à celle utilisée dans le cadre de l'étude de la tolérance à l'acidité a été adoptée. Dans cette approche, le champ d'investigation des

marqueurs potentiels de la tolérance à la bile se limite aux seules protéines différemment exprimées entre les souches et ayant été citées dans la littérature comme participant aux processus de tolérance à la bile.

Des électrophorèses 2D ont été réalisées avec les protéomes totaux des trois souches sélectionnées, extraits de cellules cultivées en conditions standard (Figure 26 ; A-C). L'analyse d'image a révélé 90 spots protéiques différemment exprimés d'une souche à l'autre, dont 80 représentant 68 protéines et 13 catégories fonctionnelles (Annexe 3). Parmi ces protéines, 15 ont été rapportées dans la littérature comme participant aux processus de tolérance aux différents facteurs de stress liés à la bile (Tableau 15). Cinq d'entre elles sont impliquées dans la réparation et la protection des protéines et de l'ADN (α -small heat-shock protein 1 (Hsp1), spot 1 ; α -small heat-shock protein 3 (Hsp3), spot 4 ; stress-induced DNA-binding protein (Dps), spot 34 ; chaperonin GroEL (GroEL), spot 76 ; et ATP-dependent Clp protease (ClpP), spot 77), et trois autres dans la modulation de la traduction (ribosomal protein S30EA (Rps30), spot 62 ; et bifunctional GMP synthase/glutamine amidotransferase protein (GuaA), spot 80) et dans le métabolisme des sucres (glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (Gpd), spot 26). Leur action n'est donc pas spécifiquement dirigée contre les effets délétères de la bile, mais couvre plutôt des fonctions générales du métabolisme bactérien pouvant intervenir dans de nombreux stress environnementaux. A l'inverse, les glutathione reductases 1 (GshR1, spot 24) et 4 (GshR4, spot 19) protègent les cellules contre le stress oxydatif, la cyclopropane-fatty-acyl phospholipid synthase (Cfa2, spots 64 et 72) et la RfbC participent au maintien de l'intégrité de la membrane et de la paroi cellulaire, respectivement, et la F_1F_0 -ATPase (AtpH, spot 90), la OpuA (spot 18), ainsi que la bile salt hydrolase 1 (Bsh1, spot 11) facilitent l'élimination des molécules toxiques. Ces 7 protéines contribuent donc de manière ciblée dans la lutte des bactéries contre les différents facteurs de stress liés à la bile.

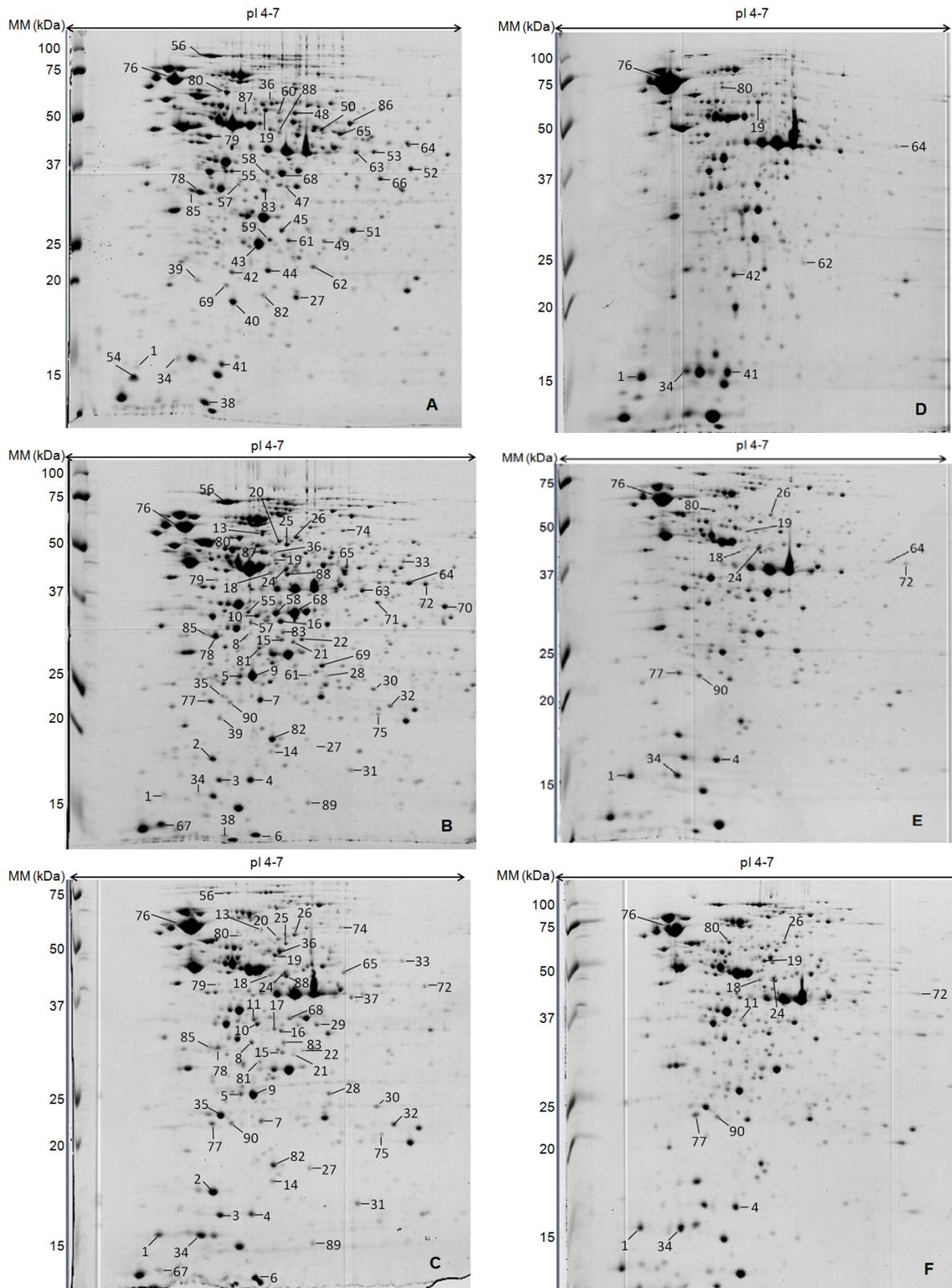


Figure 26. Photographies représentatives de gels 2D (12% d'acrylamide ; pH 4,0-7,0 ; coloration au bleu de Coomassie) des extraits protéiques totaux (charge : 150 µg) des souches *L. plantarum* LC 56 (A et D), LC 804 (B et E), et 299V (C et F), cultivées en conditions standard (A-C) et stressantes (3,6% m/v de bile ; D-F) jusqu'en début de phase stationnaire. Les spots différemment exprimés entre les trois souches en conditions standard et identifiés par LC-MS/MS sont numérotés (1-90 ; A-C), avec un accent mis sur les changements d'expression après le stress acide pour les protéines potentiellement impliquées dans la tolérance à la bile (D-F).

Tableau 15. Protéines potentiellement impliquées dans la tolérance à la bile parmi les spots différemment exprimés en conditions standard entre les souches *L. plantarum* LC 56, LC 804, et 299V, et impact d'un stress biliaire sur leurs niveaux d'expression. Les protéines en gras ont été également observées dans l'étude portant sur la tolérance à la bile de *L. casei*.

Catégorie fonctionnelle	Protéine identifiée	Numéro d'accès ^a	Symbole du gène	Stress ^b	Référence	Spot ^c	Facteur de variation : bile vs. standard ^d		
							LC 56	LC 804	299V
Traduction, structure et synthèse des ribosomes	Ribosomal protein S30EA	lp_0737		B	(276)	62	-3,2	n.a.	n.a.
Protéines de stress, chaperones	α -small heat shock protein	lp_0129	<i>hsp1</i>	O	(209)	1	34	11,4	2,1
		lp_3352	<i>hsp3</i>			4	n.a.	1,7	2,2
	chaperonin GroEL	lp_0728	<i>groEL</i>	B	(276)	76	3,7	1,9	-1,1*
	ATP-dependent Clp protease	lp_0786	<i>clpP</i>	D	(261)	77	n.a.	2	1,7
Production et conversion énergétiques	F ₁ F ₀ ATPase subunit delta	lp_2367	<i>atpH</i>	A, B	(163, 277)	90	n.a.	4,3	1,2*
	Glutathione reductase	lp_3267	<i>gshR4</i>	O	(140)	19	-1,8	-1,8	-1,3
		lp_0369	<i>gshR1</i>			24	n.a.	1,1*	-1,6
Métabolisme et transport des sucres	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	lp_2681	<i>gpd</i>	O, B	(122, 276)	26	n.a.	-1,2*	-1,4
Métabolisme et transport des acides aminés	glycine / betaine / carnitine / choline ABC transporter, ATP-binding protein	lp_1607	<i>opuA</i>	S, B	(27, 296)	18	n.a.	-1,6	1,5
Métabolisme et transport des nucléotides	bifunctional GMP synthase/glutamine amidotransferase protein	lp_0914	<i>guaA</i>	A	(262)	80	-7,6	-1,8	12,5
Métabolisme et transport des ions inorganiques	stress-induced DNA binding protein	lp_3128	<i>dps</i>	O	(206)	34	2,6	2	1,0*
						41	2,5	n.a.	n.a.
Synthèse de la paroi et de la membrane	Bile salt hydrolase	lp_3536	<i>bsh1</i>	B	(167)	11	n.a.	n.a.	-2,6
	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	lp_1188	<i>rfbC</i>	O, D	(126)	42	1,1*	n.a.	n.a.
	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	lp_3174	<i>cfa2</i>	A	(157, 288)	64	-6,9	-2,5	n.a.
						72	n.a.	-2,6	1,0*

^aNuméro d'accès dans la banque de données NCBI pour *L. plantarum* WCFS1

^bImplication de la protéine dans la tolérance aux stress acide (A), biliaire (B), oxydatif (O), osmotique (S), et/ou lié à l'action de détergents (D)

^cNuméro de spot correspondant à la Figure 26.

^dRapport r des volumes des spots en conditions stressantes et standard pour la souche considérée. Le facteur de variation est égal à r si r > 1 et à -1/r autrement. n.a. : non applicable. * : le facteur de variation n'est pas significativement différent de 1 (p < 0,05).

La distribution des niveaux d'expression des 15 protéines d'intérêt a été examinée dans des conditions standard de croissance pour les trois souches étudiées (Figure 27). La classification hiérarchique des 17 spots protéiques correspondants fait apparaître deux classes principales : la première regroupe 12 protéines surexprimées chez la souche la plus tolérante à la bile (Hsp1, spot 1 ; Hsp3, spot 4 ; Bsh1, spot 11 ; OpuA, spot 18 ; GshR4, spot 19 ; GshR1, spot 24 ; GpD, spot 26 ; Dps, spot 34 ; Cfa2, spot 72 ; GroES, spot 76 ; ClpP, spot 77 ; et AtpH, spot 90). La seconde rassemble 5 protéines sous-exprimées chez cette même souche (Dps, spot 41 ; RfbC, spot 42 ; RpS30, spot 62 ; Cfa2, spot 64 ; et GuaA, spot 80). Deux d'entre elles (Dps et Cfa2) sont communes aux deux classes, suggérant une contribution inégale des isoformes correspondantes à la tolérance de *L. plantarum* à la bile. Les trois protéines restantes ont été négativement corrélées à la tolérance constitutive à l'acidité (GuaA, (262) ; et RfbC, (§ 2.2 et 2.3)) et à la bile (RfbC, (§ 3.2) ; et RpS30, (276)) : elles pourraient ainsi conférer une certaine sensibilité aux souches vis-à-vis de ces facteurs de stress.

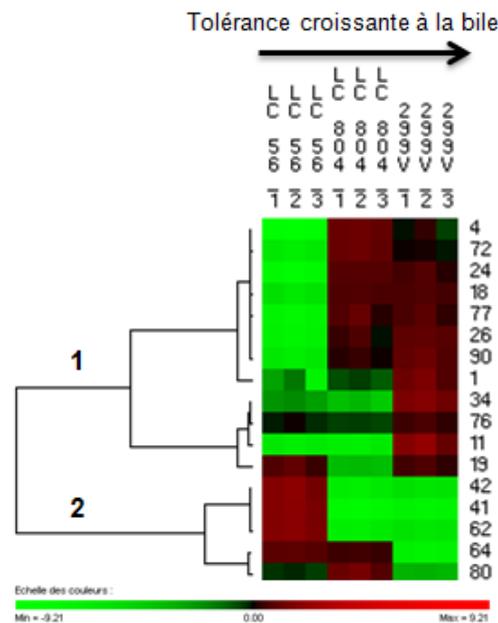


Figure 27. Classification hiérarchique de 17 spots protéiques potentiellement impliqués dans la tolérance à la bile de *L. plantarum* et différemment exprimés dans les protéomes constitutifs totaux de trois souches de *L. plantarum* aux phénotypes différents pour cette propriété (LC 56 : faible tolérance ; LC 804 : tolérance intermédiaire ; 299V : tolérance élevée). Les intensités croissantes des couleurs rouge et verte indiquent, respectivement, des niveaux d'expression croissants et décroissants. Les chiffres de 1 et 2 représentent les classes mises en évidence par la classification hiérarchique.

Dans l'ensemble, les niveaux d'expression des 15 protéines d'intérêt en conditions standard reflètent bien ceux de la tolérance à la bile des souches observées *in vitro*. Plus la souche considérée est tolérante, plus son protéome constitutif total contient de protéines liées à la tolérance en nombre, mais également en abondance relative. D'autre part, les protéines liées à la sensibilité sont naturellement moins exprimées chez la souche la plus tolérante à la bile. Ces 15 protéines constituent donc un profil caractéristique de la tolérance à la bile chez *L. plantarum*, dont deux (RfbC et OpuA), également identifiées dans l'étude portant sur *L. casei*, représentent des marqueurs inter-espèces potentiels de cette propriété. A noter que RfbC est la seule protéine commune aux profils de résistance à l'acidité et de tolérance à la bile de *L. plantarum*. Ce manque de similarité corrobore les différences de comportement des souches de *L. plantarum* observées dans les tests *in vitro* relatifs à ces deux propriétés.

Dans le but de valider l'implication des 15 protéines d'intérêt dans la réponse des cellules à la bile, l'impact d'un stress biliaire sur leurs niveaux d'expression a été étudié (Figure 26, D-F ; Tableau 15). Ces niveaux n'ont pas été modifiés pour la RfbC ni pour la Gpd ($|r| \leq 1,5$), ce qui suggère un rôle mineur de ces protéines dans la réponse de *L. plantarum* au stress biliaire. Au contraire, les treize autres protéines se sont révélées être directement impliquées dans la réponse bactérienne à ce stimulus ($|r| \geq 1,5$). Trois protéines de stress (Hsp1, Hsp3, et ClpP) ont été induites, en accord avec de précédents travaux (44, 187). A l'inverse, la RpS30 et la Bsh1, uniquement détectées chez les souches sensible et tolérante, respectivement, ont toutes deux été sous-exprimées après exposition des bactéries à la bile. Si des observations analogues ont été faites pour la RpS30 chez *B. animalis* subsp. *lactis* (276), des résultats contradictoires apparaissent dans la littérature concernant la Bsh1. En effet, les niveaux d'expression de cette protéine sont restés inchangés chez des souches de *L. acidophilus* et *L. salivarius* soumises à un stress biliaire (97, 254), tandis que le gène *bsh1* de *L. plantarum* WCFS1 a été surexprimé dans des conditions similaires (37). Ces différences suggèrent un rôle hétérogène pour cette protéine dans les processus de tolérance à la bile selon la souche et l'espèce étudiée. Enfin, les modifications d'expression des 8 protéines restantes ont été fonction de l'isoforme (Dps, spots 34 et 41 ; Cfa2, spots 64 et 72) ou de la souche (OpuA, spot 18 ; GshR4, spot 19 ; GshR1, spot 24, GroE1, spot 76 ; GuaA, spot 80 ; et AtpH, spot 90) considérées. Cette régulation différentielle suggère que, selon la souche considérée, certaines stratégies de défense contre le stress biliaire seraient privilégiées par rapport à d'autres, à l'instar des observations faites dans le cadre de l'étude sur la résistance à l'acidité.

3.4 Conclusion

L'approche analytique utilisée dans ces travaux a pu être appliquée à l'identification de possibles déterminants de la tolérance à la bile chez *L. casei* et *L. plantarum*. Dans le premier cas, l'examen systématique de la corrélation entre la tolérance des souches à la bile et l'expression protéique, a révélé des marqueurs potentiels de cette propriété. Dans le second modèle, une démarche plus ciblée, semblable à celle adoptée dans les travaux concernant la résistance à l'acidité, a permis de dégager un profil caractéristique de la tolérance à la bile chez *L. plantarum*. Globalement, la majorité des protéines constituant ces profils diffère d'une espèce à l'autre. Celles-ci interviennent dans la protection et la réparation des macromolécules, le maintien de l'intégrité de l'enveloppe, le métabolisme central, et la détoxification cellulaire. Notamment, la diversité des protéines impliquées dans ce dernier processus et mises en évidence uniquement chez *L. plantarum* (AtpH, Bsh1, GshR1, GshR4) pourrait expliquer la tolérance plus élevée à la bile de cette espèce comparativement à *L. casei*. Malgré ces différences, deux protéines (RfbC et OpuA), participant respectivement à la synthèse de la paroi et au transport des molécules toxiques, sont communes aux deux modèles. Elles représentent donc des marqueurs inter-espèces potentiels de la tolérance à la bile pour le genre *Lactobacillus*. De plus, 10 autres marqueurs putatifs de cette propriété chez *L. casei* ont précédemment été impliqués dans les processus de tolérance à la bile d'autres lactobacilles, ce qui suggère des analogies quant aux voies métaboliques utilisées par ces bactéries pour survivre à ce type de stress. Dans les deux modèles étudiés cependant, l'analyse des modifications d'expression protéique en conditions stimulantes a révélé le caractère propre à la souche de la réponse au stress biliaire.

Finalement, l'analyse comparative des profils de tolérance à la bile et de résistance à l'acidité a permis d'appréhender les facteurs communs aux deux propriétés. Pour chacune des deux espèces étudiées, ces profils sont très dissemblables, suggérant que les souches utilisent des voies de défenses différentes pour lutter contre ces deux stress environnementaux. Néanmoins, une protéine (RfbC), systématiquement sous-exprimée chez le phénotype résistant/tolérant, est commune à l'ensemble de ces profils. Cette faible expression relative pourrait constituer un indicateur inter-espèce de résistance à l'acidité et de tolérance à la bile.

4. Capacité d'adhésion

Il est communément admis que plus le temps de séjour d'une bactérie dans le tractus gastro-intestinal est long, plus il y a de chances qu'elle exerce un effet bénéfique (ou pathogène) pour l'hôte (284). Or, ce temps de résidence est en grande partie gouverné par la capacité de la souche à adhérer à l'épithélium intestinal (3). Une souche adhérente est ainsi plus difficilement évacuée de l'appareil digestif par le péristaltisme qu'une souche non adhérente. De plus, plusieurs des activités attribuées aux bactéries probiotiques, tels l'immunomodulation (280) ou le déplacement et l'inhibition des pathogènes (62), sont étroitement liées à cette propriété bactérienne. C'est pourquoi, la capacité d'adhésion (ou adhésivité) est l'une des caractéristiques les plus recherchées chez les candidats probiotiques (98).

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, l'adhésivité des bactéries est généralement étudiée à travers des modèles *in vitro*. Aussi, les deux principaux substrats d'adhésion utilisés sont le mucus et les lignées cellulaires. En particulier, la couche de mucus constitue le premier contact entre les bactéries ingérées et la muqueuse intestinale. Elle est, de ce fait, considérée comme un site important pour l'adhésion et la colonisation (221). Bien que la compréhension des processus d'adhésion des souches probiotiques à la muqueuse intestinale et leurs récepteurs n'en soit encore qu'à ses débuts, certains facteurs de surface intervenant dans l'adhésion ont été caractérisés en détail (cf. Chapitre 1). Par ailleurs, une étude menée dans notre laboratoire a permis d'établir un lien entre l'adhésivité élevée de *L. plantarum* WHE 92 et les niveaux d'expression de plusieurs protéines extraites de la paroi cellulaire de cette bactérie, comparativement à deux autres souches plus faiblement adhésives (138). Afin de confirmer ces résultats encourageants et d'identifier des marqueurs potentiels de cette propriété, les profils protéiques de surface d'autres souches de *L. plantarum*, mais aussi de *L. casei* ont été étudiés, au regard de leur capacité d'adhésion *in vitro*.

4.1 Adhésion des bactéries à la mucine

La capacité d'adhésion de 6 souches de *L. casei* et de 10 souches de *L. plantarum* à de la mucine d'estomac porcine a été évaluée *in vitro* selon le modèle utilisé précédemment (138). Celui-ci est basé sur un marquage des bactéries à la carboxyfluorescéine et l'évaluation de la population de cellules adhérentes par mesure de fluorescence. Il a en effet été montré que les taux d'adhésion déterminés par cette méthode sont comparables à ceux obtenus par dénombrement sur boîte de gélose (136). La capacité d'adhésion au mucus des souches de *L. casei* et *L. plantarum* étudiées est indiquée dans les Figures 28 et 29, respectivement. La souche *L. rhamnosus* GG, connue pour sa forte adhésivité aux glycoprotéines du mucus (244, 245), a servi de témoin.

Il apparaît que les taux d'adhésion obtenus varient largement selon l'espèce et la souche considérées. En ce qui concerne le témoin, *L. rhamnosus* GG, les taux d'adhésion obtenus ($9,5\% \pm 1,3\%$) sont plus faibles que ceux rapportés dans la littérature (de 19,3% jusqu'à 40%) (244–246). Toutefois, compte-tenu des grandes variations observées d'une étude à l'autre, la valeur déterminée dans ces travaux, étant relativement élevée comparativement à la plupart des autres souches testées, reste acceptable.

En ce qui concerne *L. casei*, la souche de collection *L. casei* ATCC 334 présente le taux d'adhésion le plus élevé ($10,8\% \pm 1,3\%$), similaire à celui du témoin positif *L. rhamnosus* GG ($9,5\% \pm 1,3\%$), et significativement supérieur à celui de toutes les souches commerciales utilisées : *L. casei* F-19, Rosell-215, CRL-431, DN-114 001 et Shirota. En particulier, les trois dernières souches s'avèrent faiblement adhésives, avec des taux d'adhésion compris entre $3,2\% \pm 1,0\%$ et $4,3\% \pm 1,5\%$. Bien que les probiotiques puissent exercer une certaine activité sans être liés à l'épithélium, la faible capacité d'adhésion observée pour ces trois souches commerciales laisse préfigurer des temps de séjour réduits et des effets bénéfiques plus modestes que ceux de *L. casei* F-19 et Rosell-215, aux taux d'adhésion plus élevés ($8,0\% \pm 1,6\%$ et $7,0\% \pm 1,5\%$, respectivement). Dans l'ensemble, les adhésivités relatives établies ici sont en adéquation avec les données publiées dans la littérature (139, 146, 154, 320).

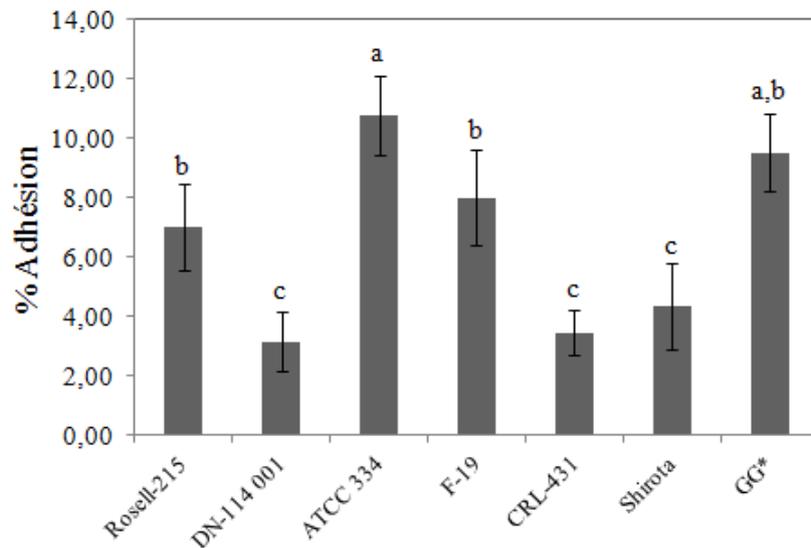


Figure 28. Taux d'adhésion des 6 souches de *L. casei* étudiées et du témoin (*) *L. rhamnosus* GG aux glycoprotéines du mucus. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type de trois expériences indépendantes. Les moyennes ne présentant pas de lettres communes (a à c) sont significativement différentes ($p < 0,05$).

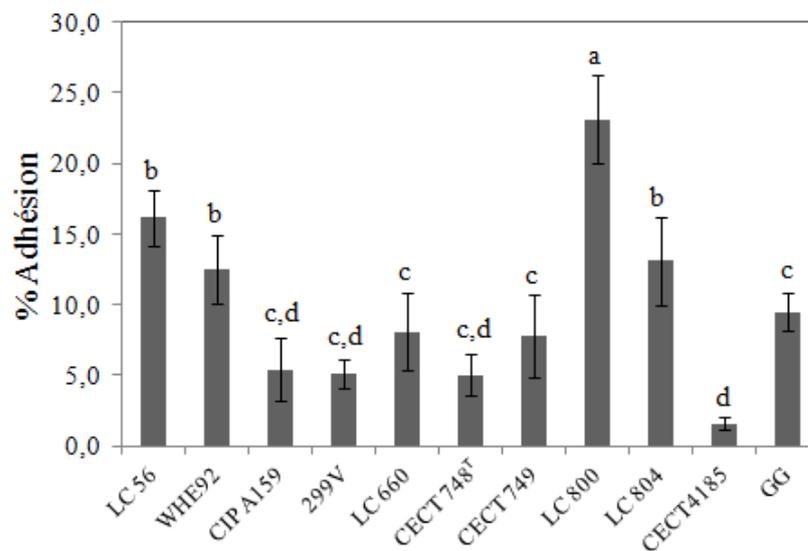


Figure 29. Taux d'adhésion des 10 souches de *L. plantarum* étudiées et du témoin (*) *L. rhamnosus* GG aux glycoprotéines du mucus. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type de trois expériences indépendantes. Les moyennes ne présentant pas de lettres communes (a à d) sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Pour ce qui est de *L. plantarum*, cinq souches (299V, CECT 748^T, CECT 749, CECT 4185 et WHE 92) ont déjà été évaluées dans des travaux précédents au laboratoire (138). Elles ont été incluses comme témoins dans la présente étude afin de s'affranchir d'un éventuel effet manipulateur et faciliter la comparaison des résultats. Globalement, les taux d'adhésion des souches témoins sont similaires à ceux obtenus précédemment. Parmi les cinq nouvelles souches étudiées, trois isolats de laboratoire montrent des taux d'adhésion comparables (LC 56, 16,1% ± 2,0% ; et LC 804, 13,1% ± 3,1%) ou supérieurs (LC 800, 23,1% ± 3,0%) à la souche WHE 92 (12,5% ± 2,4%), initialement identifiée comme fortement adhésive. Les deux souches restantes (CIP A159 et LC 660) ont des adhésivités modérées (5,4% ± 2,3% et 8,1% ± 2,7%, respectivement), non significativement différentes de celles du probiotique 299V (5,1% ± 1,0%) et des souches de collection CECT 748^T (5,0% ± 1,5%) et CECT 749 (7,7% ± 2,9%). Quant à la CECT 4185, elle reste la souche la plus faiblement adhésive (1,6% ± 0,5%). Il faut noter finalement que les souches testées présentent une plus grande diversité de taux d'adhésion (de 1,6 à 23,1%) par rapport celles de *L. casei* (de 3,2 à 10,8%).

4.2 Analyse protéomique comparative de *L. casei*

Dans le but d'identifier des protéines potentiellement impliquées dans l'adhésion de *L. casei* au mucus, les protéomes de surface de trois souches de *L. casei* aux adhésivités différentes ont été comparés : *L. casei* Shirota (faible adhésivité), *L. casei* F-19 (adhésivité intermédiaire) et *L. casei* ATCC 334 (forte adhésivité). Pour ce faire, les extraits protéiques de la paroi cellulaire de ces bactéries cultivées en conditions standard ont été séparés par gels d'électrophorèse 2D (Figure 30).

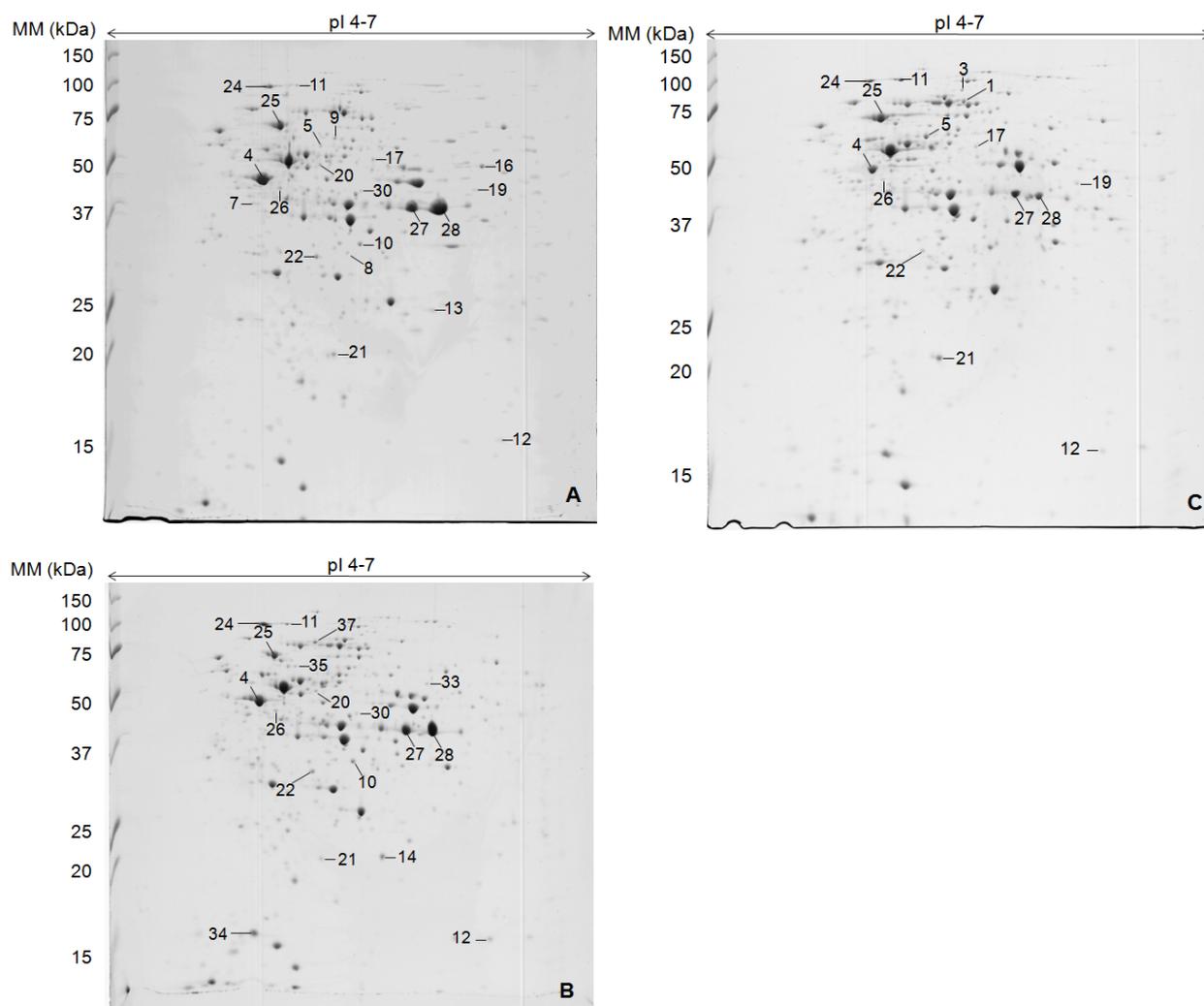


Figure 30. Photographies représentatives de gels 2D (12% d'acrylamide ; pH 4,0-7,0 ; coloration au bleu de Coomassie) des extraits protéiques de la paroi cellulaire (charge : 75 µg) des souches *L. casei* ATCC 334 (A), F-19 (B) et Shirota (C), cultivées en conditions standard (MRSC) jusqu'en début de phase stationnaire. Les chiffres 1-37 représentent les protéines différemment exprimées chez les trois souches.

Les profils électrophorétiques obtenus sont d'apparence comparable à ceux réalisés en utilisant l'extrait protéomique total (cf. § 3.2, Figure 22), avec notamment les mêmes protéines majoritaires qui semblent prédominer dans les deux extraits, ce qui confirme des observations faites pour une autre espèce, *L. plantarum*, dans les précédents travaux (136). Toutefois, on peut noter une plus petite variété et une plus faible abondance de protéines visibles dans le protéome de surface.

L'analyse d'image a révélé 37 spots protéiques différemment exprimés d'une souche à l'autre, dont 28 ont pu être identifiés par LC-MS/MS et recherche dans les bases de données protéomiques (Annexe 4). Parmi ces protéines, plusieurs sont des enzymes dont la localisation est généralement cytoplasmique ou membranaire. Cependant, il n'est pas rare que des

protéines intracellulaires soient retrouvées à la surface des bactéries où elles exercent des activités secondaires à leur fonctions principales (*moonlighting proteins*) (233, 273, 317). Chez *B. longum* NCIMB 8809 notamment, l'examen des protéines présentes dans l'enveloppe cellulaire a révélé un nombre important de protéines cytoplasmiques (270). La même observation a été faite au laboratoire concernant *L. plantarum* (138). Il n'est donc pas étonnant de retrouver de telles protéines dans des extraits de surface de l'espèce *L. casei*.

Cinq des protéines différemment exprimées chez les trois souches (enolase (Eno), spot 4 ; elongation factor G (FusA), spot 24 ; chaperonin GroEL (GroEL), spot 25 ; elongation factor Tu (Tuf), spot 26 ; et glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gap), spots 27 et 28) ont été rapportées dans la littérature comme jouant un rôle dans les processus d'adhésion d'autres bactéries (Tableau 16), dont trois (Gap, GroEL et Tuf) ont été liées à la capacité d'adhésion élevée de *L. plantarum* WHE 92 (138).

Parmi ces protéines figurent deux enzymes glycolytiques (Eno, spot 4 ; et Gap, spots 27 et 28) codées par des gènes appartenant au même opéron. Bien que ces enzymes ne possèdent pas de peptide signal N-terminal d'export ni de système d'ancrage, elles ont été identifiées à la surface de différentes bactéries pathogènes (10, 115, 151, 198) et de plusieurs lactobacilles (9, 20, 49, 153, 271, 300). En particulier, il a été montré chez *Lactobacillus crispatus* ST1 que leur présence au niveau de la paroi fait intervenir des interactions électrostatiques avec les acides lipoteichoïques et a lieu à pH acide (inférieur aux points isoélectriques respectifs des protéines) (9). Récemment, Muñoz-Provencio *et al.* (231) ont rapporté que l'enolase et la Gap extraites de l'enveloppe de *L. casei* BL 23 adhèrent au collagène et à la fibronectine, deux composants de la matrice extracellulaire. De plus, la Gap présente à la surface cellulaire de *L. plantarum* LA 318 agit comme une adhésine de la mucine humaine (153). Dans notre étude, ces enzymes ont été retrouvées en concentration plus importante dans le protéome de la paroi cellulaire de *L. casei* ATCC 334 que dans celui des deux autres souches testées (spots 4 et 28, Figure 31). Cette surexpression relative pourrait expliquer la forte adhésivité de cette souche observée *in vitro*. A noter cependant que deux isoformes de la Gap ont été identifiées, l'une (spot 28) surexprimée chez *L. casei* ATCC 334 (forte adhésivité), l'autre (spot 27) plus abondante chez *L. casei* F-19 (adhésivité intermédiaire) (Figure 31). Le rôle de ces isoformes et leur influence éventuelle sur la capacité d'adhésion n'étant pas clair, une étude plus approfondie des modifications post-traductionnelles de la Gap et de leur implication dans cette propriété bactérienne serait nécessaire.

Tableau 16. Protéines potentiellement impliquées dans les propriétés d'adhésion parmi celles différemment exprimées en conditions standard dans les protéomes de surface des souches *L. casei* Shirota, F-19 et ATCC 334. Les protéines en gras ont été précédemment liées à la capacité d'adhésion élevée de *L. plantarum* WHE 92 (138).

Catégorie fonctionnelle	Protéine identifiée	Numéro d'accès ^a	Symbole du gène	Substrat d'adhésion ^b	Références	Spot ^c
Traduction	Elongation factor G	LSEI_2508	<i>fusA</i>	M, C, F	(151, 231)	24
	Elongation factor Tu	LSEI_1332	<i>tuf</i>	E, M, C, F	(117, 231)	26
Chaperone	Chaperonin GroEL	LSEI_2238	<i>groEL</i>	E, M, C, F	(23, 130, 231)	25
Transport et métabolisme des sucres	Enolase	LSEI_0970	<i>eno</i>	F, C	(49, 231)	4
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	LSEI_0967	<i>gap</i>	M, C, F	(153, 231, 278)	27
						28

^aNuméro d'accès dans la banque de données NCBI pour *L. casei* ATCC 334.

^bC : collagène, E : cellules épithéliales ; F : fibronectine ; M : mucine.

^cNuméro de spot correspondant à la Figure 30.

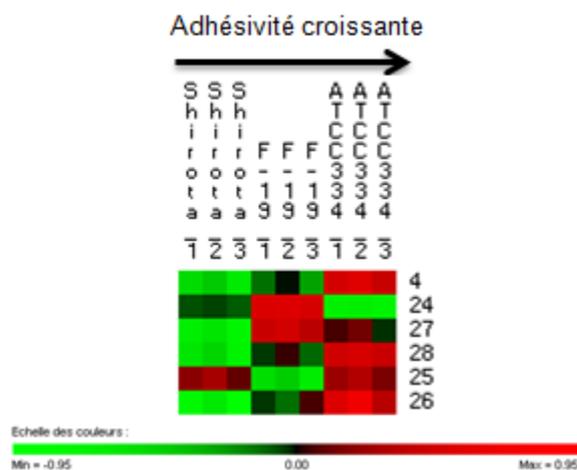


Figure 31. Représentation des niveaux d'expression de 6 spots protéiques potentiellement impliqués dans les mécanismes d'adhésion de *L. casei* et différemment exprimés dans les protéomes constitutifs de surface de trois souches de *L. casei* aux phénotypes différents pour cette propriété (Shirota : faible adhésivité ; F-19 : adhésivité intermédiaire ; ATCC 334 : forte adhésivité). Les intensités croissantes des couleurs rouge et verte indiquent, respectivement, des niveaux d'expression croissants et décroissants.

Deux facteurs d'élongation (FusA, spot 24 ; et Tuf, spot 26) ont également été rapportés comme étant impliqués dans les processus d'adhésion de souches probiotiques telles *L. casei* BL 23 (FusA et Tuf, (231)), *L. crispatus* M247 (Tuf, (293)), *L. johnsonii* NCC533 (Tuf, (117)), et *L. plantarum* WHE 92 (Tuf, (138)). Il a de plus été montré que ces facteurs

s'attachent aux glycoprotéines de la mucine (117, 151). Ainsi, la présence plus importante de la protéine Tuf dans le protéome de la paroi cellulaire de *L. casei* ATCC 334 par rapport aux deux autres souches, pourrait contribuer à sa capacité d'adhésion élevée (spot 26, Figure 31). Tel n'est en revanche pas le cas de la FusA, qui est surexprimée chez *L. casei* F-19, à l'adhésivité intermédiaire (spot 24, Figure 31). Ces résultats suggèrent des rôles plus ou moins importants pour ces facteurs dans les processus d'adhésion de *L. casei*, selon la souche considérée.

Outre ces enzymes glycolytiques et autres facteurs d'élongation, la chaperone GroEL peut aussi intervenir dans l'adhésion des bactéries à la muqueuse intestinale quand elle est associée à la surface cellulaire. Ce phénomène a principalement été décrit chez les bactéries pathogènes (102, 108, 263). Cependant, des mécanismes similaires sont susceptibles d'être utilisés par des bactéries lactiques dont les GroEL de surface sont capables de se lier à la mucine et à des lignées cellulaires comme chez *L. johnsonii* NCC533 (23), ou encore au collagène et à la fibronectine comme chez *L. casei* BL 23 (231). Une plus grande abondance de cette protéine a été observée dans les protéomes de la paroi cellulaire de des souches fortement (*L. casei* ATCC 334) et faiblement (*L. casei* Shirota) adhésives comparativement à la souche d'adhésivité intermédiaire (*L. casei* F-19) (spot 25, Figure 31). Cette distribution de niveau d'expression ne permet donc pas d'expliquer les différences de capacité d'adhésion entre les trois souches et suggère un rôle secondaire de la GroEL dans l'adhésion de *L. casei* au mucus.

4.3 Analyse protéomique comparative de *L. plantarum*

Les travaux précédents menés dans notre laboratoire ont permis de lier plusieurs protéines (Gap, Tuf, ainsi que les chaperonnes GroEL, GroES et DnaK) à la capacité d'adhésion élevée de *L. plantarum* WHE 92 (Figure 32). Ces protéines, rapportées dans la littérature comme étant impliquées dans l'adhésion bactérienne, ont en effet été retrouvées en quantité plus importante dans le protéome de la paroi cellulaire de *L. plantarum* WHE 92, comparativement à *L. plantarum* 299V et *L. plantarum* CECT 4185 aux adhésivités plus faibles (138). Afin de confirmer leur implication dans les mécanismes d'adhésion de *L. plantarum*, les protéomes de surface de trois autres souches ont été étudiés : deux souches (*L. plantarum* CECT 748^T et *L. plantarum* CECT 749) aux capacités d'adhésion intermédiaires,

et une troisième (*L. plantarum* LC 800) dont le taux d'adhésion s'est révélé significativement supérieur à celui de *L. plantarum* WHE 92 ($p < 0,05$).

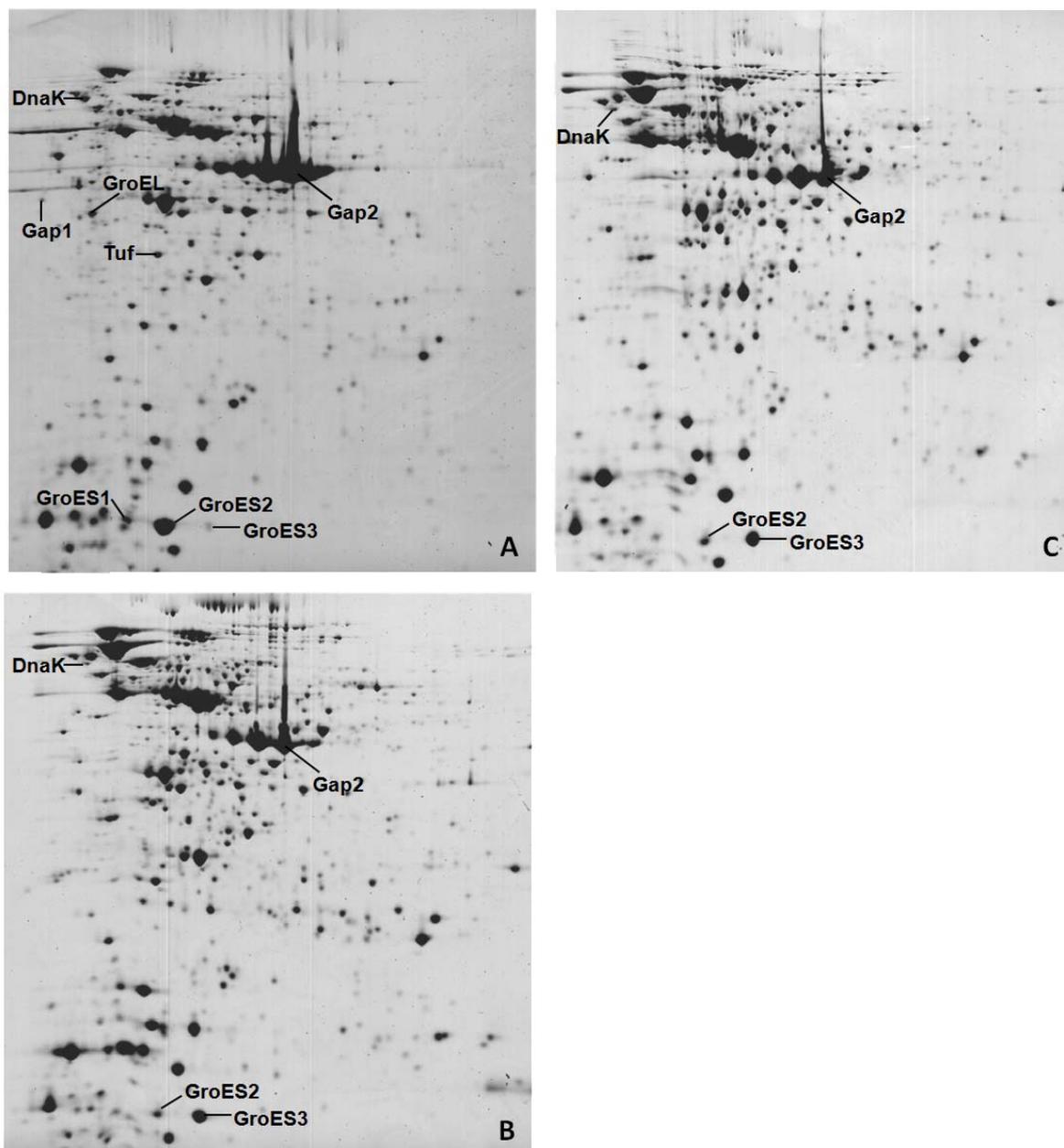


Figure 32. Photographies représentatives de gels 2D (12% d'acrylamide ; pH 4,0-7,0 ; coloration au bleu de Coomassie) des extraits protéiques de la paroi cellulaire (charge : 75 μ g) des souches *L. plantarum* WHE 92 (A), 299V (B) et CECT 4185 (C), cultivées en conditions standard (MRSC) jusqu'en début de phase stationnaire. Les protéines annotées ont été liées à la capacité d'adhésion élevée de *L. plantarum* WHE 92 (138).

4.4 Conclusion

Suite aux travaux exploratoires réalisés dans notre laboratoire, cette étude a permis d'approfondir la relation entre l'expression protéique à la surface des bactéries et leur adhésivité au mucus. Plusieurs protéines ont ainsi pu être liées à la capacité d'adhésion élevée des bactéries : Eno, Gap et Tuf pour *L. casei* ATCC 334 ; DnaK, Gap, GroEL, GroES et Tuf pour *L. plantarum* WHE 92. Ceci soutient leur utilisation potentielle comme marqueurs bactériens de l'adhésivité au mucus. Toutefois, ces résultats confirment l'idée d'un mécanisme d'adhésion complexe qui ne peut pas être attribué à un facteur unique, mais à la combinaison de l'activité de plusieurs molécules capables de s'attacher aux composants de la muqueuse intestinale. Cette capacité est certainement plus ou moins importante selon les facteurs protéiques considérés, par conséquent le degré d'implication de ces derniers dans les phénomènes d'adhésion serait variable.

Par ailleurs, il est nécessaire de rester prudent dans l'interprétation des résultats de ces analyses protéomiques. Il semble en effet que des souches différentes puissent privilégier des voies distinctes dans les phénomènes d'adhésion, comme constaté chez *L. plantarum* et par analogie aux observations faites dans les études relatives à la résistance à l'acidité et à la tolérance à la bile. Si de telles différences ne sont en soi pas étonnantes, compte-tenu de la versatilité et de la biodiversité de cette espèce, elles soulignent l'importance de valider les marqueurs potentiels de propriétés et activités bactériennes en étudiant de nombreuses souches. De plus, force est de reconnaître que les limitations inhérentes à la 2D-PAGE et la gamme relativement étroite de pI étudiée (4-7) ne permettent pas d'identifier tous ces marqueurs. Ce phénomène est d'ailleurs exacerbé dans le cas des protéines de surface autres que les protéines cytoplasmiques exportées, dont les masses moléculaires, pI, et autres propriétés de solubilité sont souvent peu compatibles avec l'électrophorèse 2D. A ce titre, il semble que les approches sans gels soient plus efficaces pour révéler de telles protéines (315). Enfin, le protocole utilisé pour l'extraction sélective des protéines de surface peut avoir une grande influence sur la nature des protéines identifiées, comme le montre une étude comparative récente du protéome de surface de *S. aureus* (88). Il serait donc nécessaire de vérifier si les mêmes marqueurs ressortent avec des protocoles d'extraction différents.

5. Activité hypocholestérolémiante

L'hypercholestérolémie représente un problème majeur de santé publique. Entre 1999 et 2003, on estime qu'elle a contribué à 45% de la prévalence des crises cardiaques en Europe de l'Ouest (352). Bien que des médicaments soient actuellement disponibles pour lutter contre cette pathologie (comme les statines ou les séquestrants d'acides biliaires), leur coût n'en reste pas moins relativement élevé et leur utilisation prolongée peut s'accompagner d'effets secondaires indésirables (283). Aussi, la prévention, à travers la pratique régulière d'une activité physique et le suivi d'un régime alimentaire adapté, reste-t-elle la meilleure alternative.

Plusieurs études cliniques menées chez l'animal et chez l'homme montrent que la consommation de produits laitiers fermentés permet de réduire le niveau de cholestérol sanguin (242). C'est pourquoi le criblage des souches à potentiel probiotique inclut de plus en plus l'examen de leur activité hypocholestérolémiante (150, 354). Toutefois, les résultats de certains travaux ont été infirmés, suscitant une certaine controverse vis-à-vis de cet effet probiotique (124, 188, 294). De plus, les bases moléculaires et les mécanismes associés à cette activité restent encore mal compris (175, 242). Afin d'identifier des déterminants potentiels de cet effet probiotique, l'outil protéomique utilisé dans ces travaux a été appliqué à l'étude de l'activité hypocholestérolémiante de souches de *L. plantarum*, plusieurs souches de cette espèce (parmi lesquelles la 299V) ayant montré d'excellentes aptitudes pour cette activité (142, 150, 232).

5.1 Acitivité hypocholestérolémiante de souches de *L. plantarum*

L'activité hypocholestérolémiante des trois souches de *L. plantarum* précédemment sélectionnées pour leurs phénotypes de tolérance à la bile différents (299V, tolérance élevée ; LC 804, tolérance intermédiaire ; et LC 56, faible tolérance) a été évaluée *in vitro*. Ces souches ont été mises en culture dans un milieu supplémenté à hauteur de 100 mg/L de cholestérol, teneur représentative de ce qui peut être ingéré au cours d'un repas (19). De la bile bovine a également été ajoutée au milieu à la concentration physiologique de 0,5% (m/v), afin

de se rapprocher des conditions *in vivo* (22). Les cellules ont été incubées jusqu'en phase stationnaire de croissance, puis collectées en vue d'un dénombrement sur boîte de gélose. Le cholestérol restant dans le milieu a ensuite été dosé par CPG. Les réductions spécifiques du cholestérol (réductions massiques du cholestérol rapportées aux populations bactériennes) pour les trois souches étudiées sont indiquées dans la Figure 34.

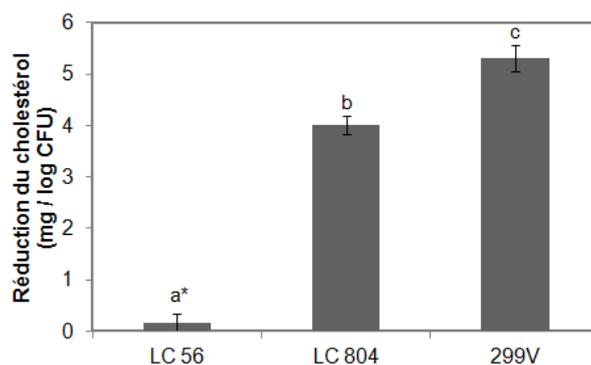


Figure 34. Réduction spécifique du cholestérol des souches *L. plantarum* LC 56, LC 804, et 299V cultivées jusqu'en phase stationnaire dans un milieu MRSC supplémenté à hauteur de 100 mg/L de cholestérol et 0,5% de bile bovine. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type de trois expériences indépendantes. Les lettres a à c indiquent que les moyennes sont statistiquement différentes ($p < 0,05$). * : moyenne statistiquement nulle ($p < 0,05$).

Il apparaît que la capacité des bactéries à réduire le cholestérol contenu dans le milieu diffère entre les trois souches ($p < 0,05$). *L. plantarum* 299V s'est révélée la plus performante pour cette activité, avec une réduction spécifique du cholestérol de $5,3 \pm 0,3$ mg / logCFU, suivie par la souche LC 804, pour laquelle des niveaux plus faibles ont été atteints ($4,0 \pm 0,2$ mg / logCFU). Quant à la souche LC 56, elle s'est avérée incapable de diminuer le cholestérol du milieu MRSC modifié ($p < 0,05$).

Ces résultats suggèrent des activités hypocholestérolémiantes différentes pour les souches *in vivo*, le test *in vitro* utilisé dans ces travaux simulant bien leur comportement en essais cliniques (175, 242). En particulier, la réduction spécifique élevée du cholestérol constatée *in vitro* pour la souche *L. plantarum* 299V corrobore les observations faites chez l'homme quant à sa capacité à réduire le cholestérol sanguin (43). De plus, les profils des souches pour cette activité sont similaires à ceux relatifs à la tolérance à la bile, ce qui suggère une certaine relation entre ces deux caractéristiques des probiotiques.

5.2 Analyse protéomique comparative

La recherche des déterminants de l'activité hypocholestérolémiant chez *L. plantarum* a été effectuée à l'aide des gels précédemment analysés dans le cadre de l'étude de la tolérance à la bile (§ 3.3 ; Figure 26, A-C). Parmi les protéines différemment exprimées entre les trois souches (Annexe 3), seule l'hydrolase d'acides biliaires conjugués Bsh1 a été rapportée comme ayant un rôle potentiel dans la réduction du cholestérol par les bactéries (158, 305, 306, 322). Bien qu'aucune analyse mutationnelle n'ait, à ce jour, permis de confirmer l'implication effective de ce type d'enzyme dans cet effet probiotique, deux mécanismes principaux ont été proposés pour expliquer son rôle.

D'abord, les sels biliaires déconjugués sous l'action des Bsh sont moins hydrosolubles et moins bien absorbés par la muqueuse intestinale en vue de leur réutilisation par l'organisme. Ce phénomène rendrait nécessaire la synthèse de sels biliaires supplémentaires (dont le cholestérol est un précurseur), conduisant à une réduction du cholestérol sérique (252). Si ce mécanisme indirect est plausible *in vivo*, il ne permet cependant pas d'expliquer la diminution du cholestérol observée *in vitro*, la synthèse d'acides biliaires à partir du cholestérol ne pouvant avoir lieu dans ces conditions.

Une second mode d'action évoque la co-précipitation des sels biliaires déconjugués et du cholestérol, les sels libres étant moins efficaces à solubiliser le cholestérol que leurs homologues conjugués (265). *In vivo*, ce phénomène se traduirait par une moins bonne absorption du cholestérol par la muqueuse intestinale, résultant en des niveaux plus faibles dans le sang. *In vitro*, le cholestérol ainsi précipité serait éliminé avec le culot bactérien suite à l'étape de centrifugation, conduisant à une diminution de sa concentration dans le milieu. Aussi, ce second mécanisme pourrait expliquer le lien apparent entre la tolérance des souches à la bile et leur activité hypocholestérolémiant.

Toutefois, la Bsh1 n'a pu être observée que dans le profil électrophorétique de la souche *L. plantarum* 299V (Figure 26, A-C; Annexe 3). Elle ne permet donc pas d'expliquer les très grandes différences de réductions spécifiques du cholestérol entre les souches LC 56 et LC 804. De plus, nous avons précédemment constaté que cette enzyme était sous-exprimée en réponse à un stress biliaire (Tableau 15), suggérant un rôle secondaire de la déconjugaison des acides biliaires dans les processus de tolérance à la bile de *L. plantarum* 299V. Ces éléments, associés au fait qu'une forme hydrosoluble de cholestérol (polyoxyéthanylcholesteryl

sebacate) a été utilisée dans ces travaux, soutiennent l'idée d'un rôle mineur (sinon nul) de la Bsh1 dans la réduction du cholestérol par co-précipitation avec les acides biliaires. Une mutation dirigée serait néanmoins nécessaire pour vérifier cette hypothèse.

Dans l'ensemble, un nombre très limité d'études s'est intéressé aux déterminants de l'activité hypocholestérolémiant des bactéries probiotiques et la majorité d'entre eux reste à découvrir (175). Il est donc possible qu'une ou plusieurs des protéines différemment exprimées entre les souches de *L. plantarum* soient impliquées dans cette activité, sans que leur rôle n'ait à ce jour été mis en évidence. Des travaux récents ont cependant rapporté l'implication de réductases intra- et extracellulaires de souches de *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* et *L. casei*, dans la conversion du cholestérol en coprostanol (5 β -cholestan-3 α -ol) (194), mais de telles enzymes ne sont pas ressorties de l'analyse protéomique comparative réalisée dans cette étude. En fait, aucun gène codant pour des réductases du cholestérol n'apparaît dans les génomes de *L. plantarum* séquencés à ce jour (160), ce qui laisse penser qu'une telle dégradation n'est pas possible chez cette espèce. Ce postulat a d'ailleurs été confirmé par des analyses par CPG : l'utilisation d'un étalon de coprostanol a en effet permis de montrer l'absence de ce composé suite à la culture des trois souches étudiées (Figure 35). D'ailleurs, aucun dérivé du cholestérol n'a été détecté, ce qui suggère que ce dernier n'a pas été converti en une ou plusieurs autres molécules, mais plutôt assimilé par les bactéries, soit par incorporation dans la membrane cellulaire durant la croissance bactérienne (152), soit par adhésion du cholestérol à leur surface (322), ou encore dégradé.

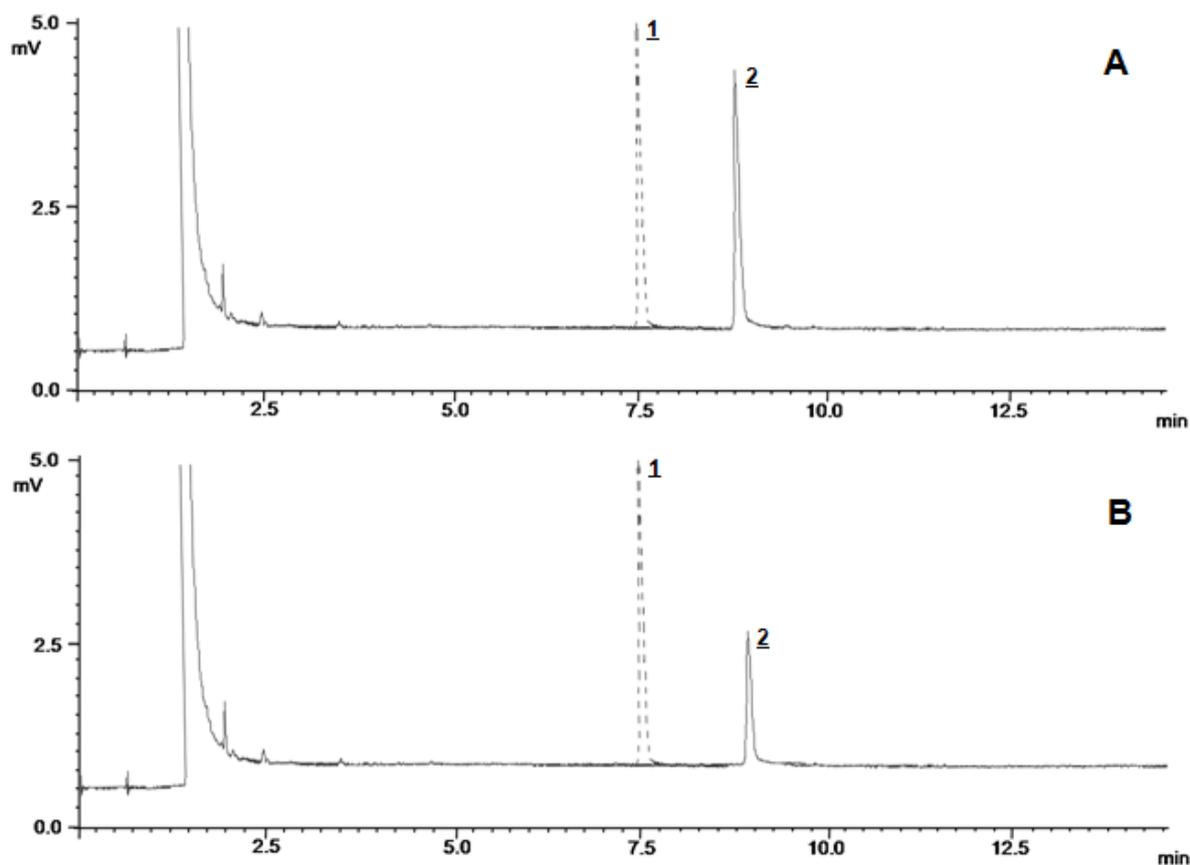


Figure 35. Exemples de chromatogrammes obtenus par CPG sur une colonne capillaire DB-5 couplée à un détecteur FID, pour un extrait des lipides insaponifiables contenus dans un milieu MRSC supplémenté en bile bovine (0,5% m/v) et en cholestérol (100 mg/L) avant (A) et après culture de la souche *L. plantarum* 299V. 1 : 5 β -cholestan-3 α -ol (étalon interne, 100 mg/L); 2 : cholestérol.

5.3 Analyses complémentaires

Afin de vérifier l'hypothèse d'une assimilation du cholestérol par les souches *L. plantarum* 299V et LC 804, des analyses complémentaires ont été réalisées sur la base du test *in vitro* décrit précédemment. Au lieu d'être dénombrées sur boîte de gélose, les cellules cultivées en présence de bile et de cholestérol ont été lavées trois fois avec du PBS. Des aliquotes du milieu de culture avant et après croissance bactérienne, des eaux de lavage et des cellules ont été prélevés afin de déterminer leur teneur respective en cholestérol (Tableau 17). Préalablement au dosage, les cellules ont été broyées à -196°C à l'aide d'un broyeur cryogénique. La souche *L. plantarum* LC 56, dont la capacité à réduire le cholestérol s'est avérée nulle statistiquement ($p < 0.05$), a également été incluse dans ces tests.

Tableau 17. Concentrations ($\mu\text{g/mL}$ de milieu de culture) en cholestérol du milieu de culture avant et après croissance bactérienne, des cellules après trois lavages au PBS et des eaux de lavage. Les moyennes \pm écart type de trois expériences indépendantes sont indiquées.

		LC 56	LC 804	299V
Milieu après culture		117,7 \pm 3,3	81,3 \pm 1,9	71,4 \pm 1,2
Eaux de lavage	1	1,0 \pm 0,5	23,8 \pm 1,5	28,6 \pm 2,9
	2	n.d.	10,1 \pm 0,9	11,4 \pm 1,7
	3	n.d.	2,8 \pm 1,4	2,4 \pm 2,0
Cellules		0,9 \pm 0,1	3,2 \pm 2,1	4,2 \pm 2,6
	Total	118,9 \pm 2,8*	121,5 \pm 3,1*	119,0 \pm 3,7*
Milieu avant culture		119,6 \pm 1,8*	120,8 \pm 2,2*	121,1 \pm 3,0*

*Moyennes non-différentes statistiquement ($p < 0.05$). n.d. : non détecté.

Tout le cholestérol disparu du milieu suite à la culture des souches *L. plantarum* LC 804 et 299V a été retrouvé dans les eaux de lavage (92 et 91%, respectivement) et, dans une moindre mesure, dans les cellules (8 et 9%, respectivement). Ces éléments suggèrent que le mécanisme principal de réduction du cholestérol du milieu par les bactéries est son adhésion à la surface des cellules, comme observé précédemment chez *L. bulgaricus* (Figure 36 ; (242)) Cette adhésion s'avère réversible et fait probablement intervenir des interactions hydrophobes (194). Il serait donc intéressant de mesurer l'hydrophobicité relative des souches en vue de confirmer ce mécanisme d'adhésion.



Figure 36. Cellules, observées par microscopie à balayage électronique, d'une souche de *L. bulgaricus* cultivée dans un milieu supplémenté (B, 100 mM) ou non (A) en cholestérol. D'après (242).

5.4 Conclusion

L'analyse protéomique comparative réalisée dans ces travaux n'a pas permis d'identifier de marqueurs potentiels de l'activité hypocholestérolémiant chez *L. plantarum*. En effet, très peu de facteurs impliqués dans cette activité ont, à ce jour, été révélés, et la majorité d'entre eux reste encore à découvrir (175, 242). Or, comme notre approche est tributaire de l'abondance des études publiées sur le sujet et en l'absence de données suffisantes, seules des analyses fonctionnelles, telles les mutations dirigées, peuvent confirmer l'implication des protéines dans les caractères étudiés.

Des analyses complémentaires ont montré que les différences de réduction spécifique du cholestérol observées *in vitro* pour les trois souches de *L. plantarum* sont liées à des phénomènes de surface, provoquant l'adhésion du cholestérol à la paroi bactérienne. Aussi, l'absence de corrélation entre l'adhésivité des souches aux glycoprotéines du mucus et leur capacité à réduire le cholestérol suggère que des facteurs distincts interviennent dans ces deux processus d'adhésion. Des interactions de nature hydrophobe pourraient notamment contribuer à l'adhésion du cholestérol à la surface des bactéries, mais cette hypothèse reste à vérifier.

Finalement, aucun des marqueurs potentiels de la tolérance à la bile chez *L. plantarum* n'a permis d'expliquer le comportement similaire des souches vis-à-vis de cette propriété bactérienne et de l'activité hypocholestérolémiant. Le lien entre ces deux caractéristiques des probiotiques est donc probablement fortuit, comme le suggèrent de précédents travaux montrant une absence de corrélation entre la tolérance de souches de *L. gasseri* à la bile et leur capacité de fixer le cholestérol (322).

6. Activité immunomodulatrice

Parmi les effets attribués aux bactéries probiotiques, ceux concernant la stimulation des fonctions immunitaires sont les plus étudiés car sans doute les plus prometteurs. Des activités immunorégulatrices bénéfiques de probiotiques ont notamment été rapportées dans des cas de diarrhées virales, de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), et d'allergies alimentaires se manifestant sous la forme d'eczéma atopique (339). Ces bénéfices ont pu être en partie imputés à la capacité des souches à réguler différenciellement la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires, et la balance Th1/Th2 (76).

Toutefois, comme pour l'ensemble des caractéristiques des probiotiques, l'activité immunomodulatrice est spécifique à la souche et ne peut être extrapolée à l'échelle d'une espèce ou d'un genre (215, 235, 350). De plus, si les effets de certains lactobacilles et bifidobactéries sur des cellules du système immunitaire est bien documentée (171, 177), les déterminants bactériens à l'origine de ces effets sont, comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, nettement moins bien connus. Dans le but d'identifier des marqueurs potentiels de cette activité probiotique, l'approche protéomique a été appliquée à l'étude de l'immunomodulation chez *L. casei*, 5 des 6 souches de *L. casei* utilisées dans ces travaux ayant été citées comme ayant une telle activité *in vivo* (voir ci-après).

6.1 Activité immunomodulatrice de souches de *L. casei*.

Dans cette étude, l'activité immunomodulatrice des 6 souches de *L. casei* n'a pu être testée. Néanmoins, différents travaux s'intéressant à cet effet probiotique chez *L. casei* ATCC 334, CRL 431, DN-114 001, F-19 et Shirota ont déjà été publiés (Tableau 18). Malgré la diversité des modèles utilisés et des paramètres étudiés, il semble que ces souches régulent différemment la réponse immunitaire de l'hôte. Ainsi, *L. casei* DN-114 001 et Shirota favorisent une réponse de type Th1 dans des modèles murins du syndrome des antiphospholipides (maladie auto-immune) et de l'allergie à l'ovalbumine, respectivement (8, 291). A l'inverse, *L. casei* ATCC 334 et CRL 431 stimulent une réponse de type Th2 chez des souris souffrant de polyarthrite, d'une part, et sensibilisées à l'ovalbumine, d'autre part (7,

250). Enfin, le profil cytokinique induit *in vitro* par *L. casei* F-19 chez des mononucléaires du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells* [PBMC]) suggère que cette souche stimule simultanément les deux types de réponse (220). Aussi, cette influence des souches sur la balance Th1/Th2 pourrait expliquer certains des effets immunostimulants observés dans des études cliniques menées chez l'homme (247, 307, 330, 340).

Tableau 18. Exemples d'activités immunomodulatrices rapportées dans la littérature pour les souches de *L. casei* utilisées dans ces travaux.

Souches	Modèles murins ou cellulaire				Etudes chez l'homme (DACP)	
	Type ^a	profil cytokinique ^b	Th1/Th2 ^c	Référence	Effet	Référence
ATCC 334	AIC	IL-6, TNF- α \searrow IL-10 \nearrow	Th2	(7)	-	-
CRL 431	OVA	TNF- α , INF γ \nearrow IL-4, IL-10 \nearrow	Th2	(250)	Augmentation de la production d'anticorps neutralisant les virus	(330)
F-19	PBMC	IL-6, TNF- α \nearrow IL-10 \nearrow	Th1 et Th2	(220)	Augmentation de la capacité de nourrissons sevrés à induire une réponse immunitaire en présence d'antigènes	(340).
DN-114 001	SAPL	INF γ \nearrow IL-10 \searrow	Th1	(8)	Augmentation de l'activité des lymphocytes NK	(247)
Shirota	OVA	INF γ \nearrow , IL-12 \nearrow IL-4, IL-5 \searrow	Th1	(291)	Augmentation de l'activité des lymphocytes NK en lien avec une production d'IL-12	(307)

^aModèles murins : AIC : arthrite induite par du collagène ; OVA : allergie à l'ovalbumine ; SAPL : syndrome des anti-phospholipides. Modèle cellulaire : PBMC : mononucléaires du sang périphérique.

^bLes flèches \nearrow et \searrow indiquent, respectivement, une augmentation et une diminution de la production de cytokines par rapport au contrôle. \nearrow : très forte augmentation.

^cNature de la réponse immunitaire occasionnée par les bactéries au vu du profil cytokinique obtenu.

6.2 Analyse protéomique comparative

Trois souches de *L. casei* aux activités immunorégulatrices différentes ont été sélectionnées : *L. casei* Shirota (« pro-Th1 »), *L. casei* ATCC 334 (« pro- Th2 ») et *L. casei* F-19 (« pro-Th1 et Th2 »). Leurs protéomes de surface ont déjà été analysés dans le cadre de l'étude de l'adhésion aux glycoprotéines du mucus, ces souches présentant également des phénotypes différents vis-à-vis de cette propriété bactérienne (§ 4.1 et 4.2). Les déterminants

potentiels de la modulation de l'immunité chez *L. casei* ont donc été recherchés parmi les 28 protéines différemment exprimées entre les trois souches et identifiées précédemment par LC-MS/MS (Annexe 4).

Quatre de ces protéines (GroEL, spot 25 ; Tuf, spot 26 ; Gap, spots 27 et 28 ; et Dps, spot 34 ; Figure 30) ont été rapportées dans la littérature comme ayant une influence sur la réponse immunitaire. En particulier, la Gap est considérée comme un facteur de virulence quand elle est exprimée à la surface de différents pathogènes de la famille des streptocoques (191, 197). Elle favorise la polarisation de la réponse T vers un profil Th2 à travers l'activation des lymphocytes B et la production de chimiokine anti-inflammatoire IL-10 par les cellules immunitaires (197). Cette activité immunorégulatrice représente la principale voie utilisée par les bactéries pathogènes pour échapper au système immunitaire inné de l'hôte (12, 329). Si un tel effet anti-inflammatoire est préjudiciable pour l'organisme dans le cas des pathogènes, il peut en revanche s'avérer utile dans le cas des probiotiques pour lutter contre les maladies auto-immunes (7, 250). Dans ces travaux, deux isoformes de la Gap (spots 27 et 28, Figures 30 et 31) ont été différemment exprimées dans les protéomes de la paroi cellulaire des trois *L. casei* sélectionnées. La première isoforme (spot 27) a été retrouvée en quantité plus abondante à la surface de la souche « pro-Th1 et Th2 » *L. casei* F-19. La seconde isoforme (spot 28) a été surexprimée chez la souche « pro-Th2 » *L. casei* ATCC 334. Ces résultats suggèrent que la Gap pourrait jouer un rôle dans l'activité immunorégulatrice de *L. casei* F-19 et ATCC 334.

Par ailleurs, certaines ferritines bactériennes de la famille des Dps ont été caractérisées comme fortement immunogènes chez les pathogènes *Helicobacter pylori*, *Treponema pallidum*, et *Borrelia burgdorferi* (16, 190, 353). Cette activité serait due à la distribution de charges surfaciques de ces protéines en lien avec leurs structures tertiaire et quaternaire (353). Ces protéines semblent ainsi pouvoir induire une réponse de type Th1 tout en exerçant une activité anti-Th2 (72). Leur fonction principale étant la protection et la réparation de l'ADN, elles sont donc normalement localisées à l'intérieur des cellules et n'exercent leur effet immunostimulant sur l'hôte qu'après la lyse des bactéries (72). Cependant, il arrive que ces protéines de stress se retrouvent à la surface des bactéries. Ainsi, la Dps identifiée uniquement dans le protéome de la paroi bactérienne de *L. casei* F-19 (spot 34 ; Figure 30) a une séquence à 69% identique à une ferritine localisée à la surface de *E. faecalis* T3 (numéro d'accès dans la base de données NCBI : EFCG_01994). A l'instar des observations faites chez les pathogènes, la Dps pourrait donc contribuer à l'induction par *L. casei* F-19 d'une réponse de

type Th1. Néanmoins, cette hypothèse reste à vérifier dans la mesure où l'activité « pro-Th1 » de ce type de protéine semble s'accompagner d'un effet « anti-Th2 » (72) et que *L. casei* F-19 est capable de stimuler simultanément les deux types de réponses (220). Il est également possible que cet effet « anti-Th2 » soit contrecarré par l'activité « pro-Th2 » de la Gap. Des tests complémentaires utilisant les protéines recombinantes Dps et Gap de *L. casei* F-19 dans des modèles cellulaires ou murins permettraient de confirmer leur rôle dans l'activité immunomodulatrice de cette souche.

Enfin, les GroEL et Tuf de *L. johnsonii* NCC 533 ont stimulé l'excrétion d'IL-8 (chimiokine pro-inflammatoire qui fonctionne comme un *chemoattractant* de polynucléaires neutrophiles (119)) par des cellules HT29 (cellules isolées d'adénocarcinomes du côlon humain, simulant la muqueuse intestinale) en présence du co-récepteur CD14 introduit dans le milieu sous sa forme soluble (23, 117). Aussi, cette induction d'IL-8 suggère une polarisation de la réponse T vers un profil Th1 par la GroEL et la Tuf. Cependant, les niveaux d'expression de ces protéines dans les protéomes de la paroi cellulaire des trois souches de *L. casei* considérées ne permettent pas d'expliquer leurs différences d'activité immunomodulatrice. En effet, des quantités équivalentes en GroEL (spot 25, Figures 30 et 31) ont été retrouvées à la surface des souches *L. casei* Shirota (« pro-Th1 ») et *L. casei* ATCC 334 (« pro-Th2 »). De plus, la plus grande abondance relative en Tuf (spot 26, Figures 30 et 31) dans le protéome de *L. casei* ATCC 334 est incompatible avec la capacité de cette souche à induire une réponse de type Th2. Ces protéines ne semblent donc pas jouer un rôle clé dans l'immunomodulation des souches étudiées.

6.3 Conclusion

L'analyse comparative des protéomes de surface de souches de *L. casei* a permis d'identifier de possibles déterminants de l'activité immunomodulatrice chez cette espèce. La Gap a ainsi pu être liée à l'effet « pro-Th2 » *L. casei* ATCC 334 et F-19, et la Dps pourrait participer à l'activité « pro-Th1 » de cette dernière souche. Ces protéines n'ont cependant jamais été impliquées dans de telles activités chez les probiotiques : elles sont avant tout connues pour être des facteurs de virulence chez les pathogènes. Néanmoins, l'état actuel des connaissances concernant les interactions entre l'hôte, d'une part, et les probiotiques et les

pathogènes d'autre part, montre que de nombreuses similitudes existent dans les facteurs et mécanismes mis en jeu par ces bactéries (172).

Ce travail n'a, en revanche, pas pu mettre en évidence de protéines expliquant l'activité « pro-Th1 » de *L. casei* Shirota. Il semble que cette activité ne soit pas due à des protéines situées à la surface de cette bactérie mais plutôt à son peptidoglycane (290). En effet, bon nombre des facteurs impliqués dans les processus d'immunomodulation et identifiés à ce jour ne sont pas des protéines de surface et ne peuvent donc être appréhendés par notre approche analytique. Ainsi, outre le peptidoglycane, les acides téichoïques (91, 120, 328), les EPS (348), ainsi que d'autres composés excrétés par les cellules bactériennes (217, 345) peuvent jouer un rôle clé dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte.

Finalement, il faut rester prudent dans les interprétations faites concernant l'activité immunomodulatrice des bactéries. En effet, des travaux récents menés chez l'homme montrent que cette activité est non seulement propre à la souche, mais que l'effet produit dépend également de l'individu considéré (323). Ces résultats aident à comprendre le manque de réussite des essais cliniques sur les humains, où les souches testées donnent des effets mesurables chez certaines personnes mais pas chez d'autres. A l'inverse, des effets nettement plus probants sont souvent constatés sur des modèles animaux, où la diversité génétique, l'état de santé, et l'alimentation des individus peuvent être contrôlés.

CONCLUSION GENERALE

Le récent essor des aliments fonctionnels en général et du segment des probiotiques en particulier a vu l'apparition de nombreuses allégations santé aux fondements incertains. En Europe, celles-ci sont depuis peu régies par la directive 1924/2006, qui exige que toute allégation soit étayée par des preuves scientifiques tangibles de nature clinique (98). Or, pour les probiotiques actuellement sur le marché, force est de constater que la majorité des fabricants ne fournissent pas ces preuves, compte-tenu du coût prohibitif des études cliniques et de l'absence de méthodes satisfaisantes et abordables susceptibles de différencier les « vrais » probiotiques du reste de la flore microbienne.

Ce constat montre la pertinence de développer des outils analytiques fiables permettant d'une part, la sélection préliminaire des souches les plus prometteuses en vue des essais cliniques, et d'autre part, la mise en évidence des mécanismes qui sous-tendent les activités probiotiques. Parmi ces outils, la protéomique représente une approche prometteuse pour la caractérisation moléculaire du potentiel probiotique. Des travaux exploratoires réalisés dans notre laboratoire ont notamment permis de définir une stratégie analytique pour la recherche de biomarqueurs bactériens du potentiel probiotique. Celle-ci est basée sur la comparaison de profils protéomiques de bactéries classées suivant leurs degrés d'expression d'une propriété ou d'une activité donnée. Sa faisabilité technique a pu être validée à travers une application particulière relative aux propriétés d'adhésion de souches de *L. plantarum* (138).

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes attachés à généraliser cette approche, à travers l'examen de trois propriétés bactériennes couramment utilisées pour sélectionner les probiotiques (la résistance à l'acidité, la tolérance à la bile, et la capacité d'adhésion), et de deux activités probiotiques majeures (l'activité anticholestérolémiante et la modulation de l'immunité de l'hôte). L'utilisation pour certaines propriétés de deux modèles bactériens, *L. casei* et *L. plantarum*, a permis de distinguer les déterminants inter- et intra-spécifiques. En outre, nous nous sommes employés à valider les profils caractéristiques mis en évidence comme marqueurs potentiels des propriétés étudiées, en analysant de nouvelles souches et en étudiant l'influence des conditions de culture sur les niveaux d'expression de ces protéines.

Concernant la résistance à l'acidité, des profils protéiques intra-spécifiques reflétant les différents phénotypes observés dans les tests *in vitro* ont été mis en évidence dans chacun des deux modèles bactériens. Globalement, les protéines identifiées sont impliquées dans la protection et la réparation des macromolécules (*L. casei* : ClpL et LuxS ; *L. plantarum* : ClpL et GrpE), le maintien de l'intégrité de l'enveloppe (*L. casei* : GlmS et RfbC ; *L. plantarum* :

FabD et RfbC), la traduction (*L. plantarum* : LysS et RpsB) et le métabolisme central (*L. casei* : Pgm et Pta ; *L. plantarum* : GuaB, MetE, MsnK1, Pmi, et Xpk2). Par ailleurs, l'hétérogénéité inter-espèce de ces profils pourrait expliquer la plus forte résistance des souches de *L. plantarum* à l'acidité comparativement aux souches de *L. casei*. La chaperone ClpL et l'enzyme RfbC intervenant dans la synthèse de la paroi cellulaire, respectivement sur- et sous-exprimées chez les phénotypes résistants des deux espèces, ont été identifiées comme susceptibles de constituer des marqueurs inter-espèces de cette propriété chez les lactobacilles.

De la même manière, des protéines clés potentiellement impliquées dans la tolérance à la bile de *L. casei* et *L. plantarum* ont pu être identifiées. Certaines d'entre elles sont des protéines générales de stress (*L. casei* : ClpL; *L. plantarum* : ClpP, Dps, GroEL, Hsp1, et Hsp3), du métabolisme central (*L. casei* : Eno, GndA, Pta, et Pyk ; *L. plantarum* : Gpd et GuaA), ou sont impliquées dans la traduction (*L. casei* : RplL et ThRS ; *L. plantarum* : Rsp30). Les autres interviennent spécifiquement dans les mécanismes de lutte contre les différents facteurs de stress liés à la bile, comme le maintien de l'intégrité de la membrane et de la paroi (*L. casei* : NagA, NagB, et RfbC ; *L. plantarum* : Cfa2, et RfbC) et la détoxification cellulaire (*L. casei* : OpuA ; *L. plantarum* : AtpH, Bsh1, GshR1 et GshR4). Notamment, la diversité des protéines impliquées dans ce dernier processus et révélées uniquement chez *L. plantarum* pourrait expliquer la tolérance plus élevée à la bile de cette espèce par rapport à *L. casei*. Par ailleurs, la RfbC et le transporteur OpuA sont communs aux deux modèles et représentent ainsi des marqueurs inter-espèces potentiels de la tolérance à la bile chez les lactobacilles.

L'étude de ces deux propriétés bactériennes d'intérêt chez les candidats probiotiques a également donné un aperçu quant aux stratégies de réponse des bactéries aux stress acide et biliaire. Bien que les protéomes constitutifs des souches reflètent leur propension naturelle à tolérer une exposition à l'acidité ou à la bile, ils ne permettent cependant pas d'augurer de la manière dont les protéines pouvant jouer un rôle dans ces processus de tolérance sont régulées suite à stress acide ou biliaire. Cette réponse spécifique à la souche laisse penser que plusieurs stratégies coexistent au sein d'une même espèce dans les processus de tolérance à ces facteurs de stress, certaines souches semblant favoriser des voies métaboliques particulières, tandis que d'autres paraissent les minimiser.

D'autre part, l'approche analytique utilisée dans ces travaux a permis d'approfondir la relation entre l'expression protéique à la surface des bactéries et leur capacité à adhérer au mucus. Les enzymes glycolytiques Eno et Gap, ainsi que le facteur d'élongation Tuf ont ainsi pu être liés à l'adhésivité élevée de la souche *L. casei* ATCC 334. Dans les précédents travaux menés dans notre laboratoire, les protéines Gap et Tuf avaient également été associées à la forte capacité d'adhésion de *L. plantarum* WHE92 (138). Elles pourraient de ce fait constituer des marqueurs bactériens de l'adhésion des lactobacilles au mucus. Cependant, l'analyse du protéome de la paroi cellulaire de *L. plantarum* LC 800 dont l'adhésivité est encore plus élevée que *L. plantarum* WHE92, a montré que ces deux souches privilégient des voies différentes dans les phénomènes d'adhésion au mucus. Cette étude a donc non seulement confirmé l'idée d'un mécanisme d'adhésion complexe des bactéries aux composants de la muqueuse intestinale, faisant intervenir plusieurs molécules, mais elle a aussi révélé que ces mécanismes peuvent être propres aux souches considérées.

Une certaine correspondance a par ailleurs été établie entre l'adhésion au mucus et l'activité immunomodulatrice de *L. casei*. Parmi les trois souches étudiées, une capacité d'adhésion croissante des cellules au mucus a ainsi pu être associée à une réponse immunitaire davantage polarisée vers un profil Th2, en raison notamment d'une plus grande abondance de la Gap dans le protéome de la paroi bactérienne. L'influence de cette protéine sur ces deux modes d'interaction avec l'hôte a en effet été rapportée précédemment (197, 273). En revanche, malgré la possible implication de la protéine de stress Dps dans l'activité « pro-Th1 » de *L. casei* F-19, cette étude n'est pas parvenue à mettre à jour de protéines expliquant le phénotype « pro-Th1 » de *L. casei* Shirota. En fait, d'autres molécules non-protéiques semblent contribuer à ce phénotype chez cette souche (290, 348).

Des phénomènes de surface paraissent également être à l'origine de la capacité des souches *L. plantarum* LC 804 et *L. plantarum* 299V à réduire le cholestérol *in vitro*. En effet, plus de 90% du cholestérol disparu suite à une croissance de ces bactéries a pu être retrouvé dans les eaux de lavage des cellules, suggérant une adhésion du cholestérol à la surface des bactéries. Bien que les déterminants potentiels de cette adhésivité n'aient pu être identifiés, faute notamment de données disponibles dans la littérature, il semble que les molécules intervenant dans ces processus diffèrent de celles impliquées dans l'adhésion aux glycoprotéines du mucus, aucune corrélation n'ayant été observée parmi les souches étudiées entre ces deux propriétés.

Les travaux réalisés ont permis d'aborder la caractérisation des propriétés bactériennes et des activités probiotiques sous un angle original, consistant en une approche protéomique comparative et fonctionnelle à l'échelle d'une espèce. Malgré certaines limites de cette approche, liées à l'utilisation de la 2D-PAGE et à l'analyse fonctionnelle des protéines par étude bibliographique, des marqueurs potentiels de caractéristiques particulières des probiotiques ont pu être identifiés. L'implication effective de ces protéines dans les caractères étudiés devra toutefois être confirmée par des tests complémentaires et par l'élargissement de l'étude à un nombre de souches plus important.

A terme, l'objectif est d'utiliser cet outil pour la sélection préliminaire de nouveaux candidats probiotiques. Dans cette perspective, il est donc nécessaire de constituer une bibliothèque de profils pour l'ensemble des espèces fournissant habituellement des souches probiotiques et ce, pour l'ensemble des propriétés et des activités bactériennes d'intérêt. Une fois cette bibliothèque établie, deux simples gels relatifs aux protéomes totaux et de surface d'une souche non caractérisée permettraient d'évaluer son intérêt potentiel en vue d'une activité probiotique particulière. Il s'agit là d'un travail de longue haleine, que nous avons seulement amorcé dans le cadre de cette étude.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Aires, J., P. Anglade, F. Baraige, M. Zagorec, M.-C. Champomier-Verges, and M.-J. Butel.** 2010. Proteomic comparison of the cytosolic proteins of three *Bifidobacterium longum* human isolates and *B. longum* NCC2705. *BMC Microbiol* **10**:29.
2. **Aires, J., and M.-J. Butel.** 2011. Proteomics, human gut microbiota and probiotics. *Expert Rev Proteomics* **8**:279-288.
3. **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. *Appl Environ Microbiol* **65**:351-354.
4. **Aloğlu, H., and Z. Öner.** 2006. Assimilation of cholesterol in broth, cream, and butter by probiotic bacteria. *Eur J Lipid Sci Tech* **108**:709-713.
5. **Altermann, E., L. B. Buck, R. Cano, and T. R. Klaenhammer.** 2004. Identification and phenotypic characterization of the cell-division protein CdpA. *Gene* **342**:189-197.
6. **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. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:3906-3912.
7. **Amdekar, S., V. Singh, R. Singh, P. Sharma, P. Keshav, and A. Kumar.** 2010. *Lactobacillus casei* reduces the inflammatory joint damage associated with collagen-induced arthritis (CIA) by reducing the pro-inflammatory cytokines. *J Clin Immunol* **31**:147-154
8. **Amital, H., B. Gilburd, and Y. Shoenfeld.** 2007. Probiotic supplementation with *Lactobacillus casei* (Actimel) induces a Th1 response in an animal model of antiphospholipid syndrome. *Ann NY Acad Sci* **1110**:661-669.
9. **Antikainen, J., V. Kupannen, K. Lahteenmaki, and T. K. Korhonen.** 2007. pH-dependent association of enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Lactobacillus crispatus* with the cell wall and lipoteichoic acids. *J Bacteriol* **189**:4539-4543.
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 Immunol Med Microbiol* **51**:526-534.
11. **Anukam, K. C., and T. E. Koyama.** 2007. Bile and acid tolerance of *Lactobacillus plantarum* KCA-1: A potential probiotic agent. *Int J Dairy Sci* **2**:275-280.
12. **Arala-Chaves, M. P.** 1992. Is prophylactic immunostimulation of the host against pathogenic microbial antigens an adequate strategy of immunoprotection? *Scand J Immunol* **35**:495-500.
13. **Azcarate-Peril, A., and T. R. Klaenhammer.** 2010. Genomics of lactic acid bacteria: the post-genomics challenge. *In* *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*, 1st ed. Wiley-Blackwell.
14. **Azcarate-Peril, M. A., E. Altermann, R. L. Hoover-Fitzula, R. J. Cano, and T. R. Klaenhammer.** 2004. Identification and inactivation of genetic loci involved with *Lactobacillus acidophilus* cid Tolerance. *Appl Environ Microbiol* **70**:5315-5322.
15. **Azcarate-Peril, M. A., O. McAuliffe, E. Altermann, S. Lick, W. M. Russell, and T. R. Klaenhammer.** 2005. Microarray analysis of a two-component regulatory system involved in acid resistance and proteolytic activity in *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* **71**:5794-5804.
16. **Babolin, C., A. Amedei, D. Ozoliņš, A. Žileviča, M. M. D'Elis, and M. de Bernard.** 2011. TpF1 from *Treponema pallidum* activates inflammasome and promotes the development of regulatory T cells. *J Immunol* **187**:1377-1384.
17. **Barrangou, R., E. Altermann, R. Hutkins, R. Cano, and T. R. Klaenhammer.** 2003.

- Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. Proc Natl Acad Sci USA **100**:8957-8962.
18. **Bassler, B. L., E. P. Greenberg, and A. M. Stevens.** 1997. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. J Bacteriol **179**:4043-4045.
 19. **Beaumier-Gallon, G., C. Dubois, M. Senft, M.-F. Vergnes, A.-M. Pauli, H. Portugal, and D. Lairon.** 2001. Dietary cholesterol is secreted in intestinally derived chylomicrons during several subsequent postprandial phases in healthy humans. Am J Clin Nutr **73**:870 -877.
 20. **Beck, H. C., S. M. Madsen, J. Glenting, J. Petersen, H. Israelsen, M. R. Nørrelykke, M. Antonsson, and A. M. Hansen.** 2009. Proteomic analysis of cell surface-associated proteins from probiotic *Lactobacillus plantarum*. FEMS Microbiol Lett **297**:61-66.
 21. **Begley, M., C. G. M. Gahan, and C. Hill.** 2005. The interaction between bacteria and bile. FEMS Microbiol Rev **29**:625-651.
 22. **Begley, M., C. Hill, and C. G. M. Gahan.** 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. Appl Environ Microbiol **72**:1729-1738.
 23. **Bergonzelli, G. E., D. Granato, R. D. Pridmore, L. F. Marvin-Guy, D. Donnicola, and I. E. Corthesy-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*. Infect Immun **74**:425-434.
 24. **Bernard, E., T. Rolain, P. Courtin, A. Guillot, P. Langella, P. Hols, and M.-P. Chapot-Chartier.** 2011. Characterization of O-acetylation of N-acetylglucosamine. J Biol Chem **286**:23950 -23958.
 25. **Betts, J. C., P. Dodson, S. Quan, A. P. Lewis, P. J. Thomas, K. Duncan, and R. A. McAdam.** 2000. Comparison of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv with clinical isolate CDC 1551. Microbiol **146**:3205-3216.
 26. **Bianchi, M. A., D. Del Rio, N. Pellegrini, G. Sanebastiano, E. Neviani, and F. Brighenti.** 2004. A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells. Lett Appl Microbiol **39**:301-305.
 27. **Biemans-Oldehinkel, E., N. A. B. N. Mahmood, and B. Poolman.** 2006. A sensor for intracellular ionic strength. Proc Natl Acad Sci USA **103**:10624 -10629.
 28. **Boels, I. C., M. M. Beerthuyzen, M. H. W. Kusters, M. P. W. V. Kaauwen, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos.** 2004. Identification and functional characterization of the *Lactococcus lactis* rfb operon, required for dTDP-Rhamnose biosynthesis. J Bacteriol **186**:1239-1248.
 29. **Boesten, R., F. Schuren, R. D. Wind, J. Knol, and W. M. de Vos.** 2011. Analysis of infant isolates of *Bifidobacterium breve* by comparative genome hybridization indicates the existence of new subspecies with marked infant specificity. Res Microbiol **162**:664-670
 30. **Bøhle, L. A., E. M. Færgestad, E. Veiseth-Kent, H. Steinmoen, I. F. Nes, V. G. Eijsink, and G. Mathiesen.** 2010. Identification of proteins related to the stress response in *Enterococcus faecalis* V583 caused by bovine bile. Proteome Sci **8**:37-37.
 31. **Boot, I. R., P. Cash, and C. O'Byrne.** 2002. Sensing and adapting to acid stress. Anton Leeuw Int J G **81**:33-42.
 32. **Bouguéneq, C. L.** 2005. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. Int J Med Microbiol **295**:471-478.
 33. **Boyd, M. A., M. A. D. Antonio, and S. L. Hillier.** 2005. Comparison of API 50 CH strips to whole-chromosomal DNA probes for identification of *Lactobacillus* species. J Clin Microbiol **43**:5309-5311.
 34. **Branda, S. S., A. Vik, L. Friedman, and R. Kolter.** 2005. Biofilms: the matrix revisited.

- Trends Microbiol **13**:20-26.
35. **Bringel, F., A. Castioni, D. K. Olukoya, G. E. Felis, S. Torriani, and F. Dellaglio.** 2005. *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. *nov.*, isolated from vegetable matrices. *Int J Syst Evol Micr* **55**:1629 -1634.
 36. **Bron, P. A., M. Meijer, R. S. Bongers, W. M. de Vos, and M. Kleerebezem.** 2007. Dynamics of competitive population abundance of *Lactobacillus plantarum* *ivi* gene mutants in faecal samples after passage through the gastrointestinal tract of mice. *J Appl Microbiol* **103**:1424-1434.
 37. **Bron, P. A., D. Molenaar, W. M. de Vos, and M. Kleerebezem.** 2006. DNA micro-array-based identification of bile-responsive genes in *Lactobacillus plantarum*. *J Appl Microbiol* **100**:728-738.
 38. **Bron, P. A., M. Marco, S. M. Hoffer, E. Van Mullekom, W. M. De Vos, and M. Kleerebezem.** 2004. Genetic characterization of the bile salt response in *Lactobacillus plantarum* and analysis of responsive promoters *in vitro* and *in situ* in the gastrointestinal tract. *J Bacteriol* **186**:7829-7835.
 39. **Bron, P. A., C. Grangette, A. Mercenier, W. M. de Vos, and M. Kleerebezem.** 2004. Identification of *Lactobacillus plantarum* genes that are induced in the gastrointestinal tract of mice. *J. Bacteriol* **186**:5721-5729.
 40. **Buck, B. L., E. Altermann, T. Svingerud, and T. R. Klaenhammer.** 2005. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol* **71**:8344-8351.
 41. **Budin-Verneuil, A., V. Pichereau, Y. Auffray, D. S. Ehrlich, and E. Maguin.** 2005. Proteomic characterization of the acid tolerance response in *Lactococcus lactis* MG1363. *Proteomics* **5**:4794-4807.
 42. **Budin-Verneuil, A., V. Pichereau, Y. Auffray, D. Ehrlich, and E. Maguin.** 2007. Proteome phenotyping of acid stress-resistant mutants of *Lactococcus lactis* MG1363. *Proteomics* **7**:2038-2046.
 43. **Bukowska, H., J. Pieczul-Mróz, M. Jastrzebska, K. Chelstowski, and M. Naruszewicz.** 1998. Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with *Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol. *Atherosclerosis* **137**:437-438.
 44. **Burns, P., B. Sánchez, G. Vinderola, P. Ruas-Madiedo, L. Ruiz, A. Margolles, J. Reinheimer, and C. G. de los Reyes-Gavilán.** 2010. Inside the adaptation process of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* to bile. *Int J Food Microbiol* **142**:132-141.
 45. **Cai, H., B. T. Rodriguez, W. Zhang, J. R. Broadbent, and J. L. Steele.** 2007. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology* **153**:2655-2665.
 46. **Callanan, M.** 2005. Mining the probiotic genome: advanced strategies, enhanced benefits, perceived obstacles. *Curr Pharm Des* **11**:25-36.
 47. **Caraux, G., and S. Pinloche.** 2005. PermutMatrix: a graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order. *Bioinformatics* **21**:1280 -1281.
 48. **Carr, T., and K. Descheemaeker.** 2001. Nutrition and Health. Blackwell Science Ltd.
 49. **Castaldo, C., V. Vastano, R. A. Siciliano, M. Candela, M. Vici, L. Muscariello, R. Marasco, and M. Sacco.** Surface displaced alfa-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein. *Microb Cell Fact* **8**:14-14.
 50. **Champomier-Verges, M.-C., M. Zagorec, and S. Fadda.** 2010. Proteomics: a tool for understanding lactic acid bacteria adaptation to stressful environments. *In Biotechnology of*

- lactic acid bacteria: novel applications, 1st ed. Wiley-Blackwell.
51. **Chan, E.-S., P.-P. Lee, P. Ravindra, K. Krishnaiah, and W.-P. Voo.** 2010. A standard quantitative method to measure acid tolerance of probiotic cells. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**:385-391.
 52. **Charteris, W. P., P. M. Kelly, L. Morelli, and J. K. Collins.** 1998. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* **84**:759-768.
 53. **Chateau, N., A. M. Deschamps, and A. H. Sassi.** 1994. Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. *Lett Appl Microbiol* **18**:42-44.
 54. **Chatterjee, C., M. Paul, L. Xie, and W. A. van der Donk.** 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem. Rev* **105**:633-684.
 55. **Chen, H., C. K. Lim, Y. K. Lee, and Y. N. Chan.** 2000. Comparative analysis of the genes encoding 23S-5S rRNA intergenic spacer regions of *Lactobacillus casei*-related strains. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 2**:471-478.
 56. **Chevalier, F.** 2010. Highlights on the capacities of “Gel-based” proteomics. *Proteome Sci* **8**:23.
 57. **Claesson, M. J., Y. Li, S. Leahy, C. Canchaya, J. P. van Pijkeren, A. M. Cerdeño-Tárraga, J. Parkhill, S. Flynn, G. C. O’Sullivan, J. K. Collins, D. Higgins, F. Shanahan, G. F. Fitzgerald, D. van Sinderen, and P. W. O’Toole.** 2006. Multireplicon genome architecture of *Lactobacillus salivarius*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:6718-6723.
 58. **Coburn, P. S., A. S. Baghdayan, G. T. Dolan, and N. Shankar.** 2007. Horizontal transfer of virulence genes encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. *Mol Microbiol* **63**:530-544.
 59. **Coconnier, M. H., T. R. Klaenhammer, S. Kernéis, 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. *Appl Environ Microbiol* **58**:2034-2039.
 60. **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.
 61. **Cole, J. N., S. P. Djordjevic, and M. J. Walker.** 2008. Isolation and solubilization of Gram-Positive bacterial cell wall-associated proteins by 2D-PAGE: sample preparation and fractionation, 1st ed. Humana Press Inc.
 62. **Collado, M. C., M. Gueimonde, M. Herná’ndez, Y. Sanz, and S. Salminen.** 2005. Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *J Food Prot* **68**:2672-2678.
 63. **Collins, M. D., U. Rodrigues, C. Ash, M. Aguirre, J. A. . Farrow, A. Martinez-Murcia, B. A. Phillips, A. M. Williams, and S. Wallbanks.** 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol Lett* **77**:5-12.
 64. **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. *J Dairy Sci* **70**:1-12.
 65. **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 antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc Natl Acad Sci* **104**:7617 -7621.
 66. **Cotter, P. D., and C. Hill.** 2003. Surviving the acid test: responses of Gram-Positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**:429-453.
 67. **Crittenden, R., M. Saarela, J. Mätto, A. C. Ouwehand, S. Salminen, L. Pelto, E. E.**

- Vaughan, W. M. de Vos, A. von Wright, R. Fondén, and T. Mattila-Sandholm. 2002. *Lactobacillus paracacei* subsp. *paracasei* F19: survival, ecology and safety in the human intestinal tract-a survey of feeding studies within the PROBDEMO Project. *Microb Ecol Health Dis* **S3**:22-26.
68. 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. *Lett Appl Microbiol* **21**:146-148.
69. Cui, L., H. Murakami, K. Kuwahara-Arai, H. Hanaki, and K. Hiramatsu. 2000. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:2276-2285.
70. De Angelis, M., L. Bini, V. Pallini, P. S. Cocconcelli, and M. Gobbetti. 2001. The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Microbiology* **147**:1863 -1873.
71. De Angelis, M., and M. Gobbetti. 2004. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics* **4**:106-122.
72. De Bernard, M., and M. M. D'Elios. 2010. The immune modulating activity of the *Helicobacter pylori* HP-NAP: Friend or foe? *Toxicon* **56**:1186-1192.
73. De Keersmaecker, S. C. J., and J. Vanderleyden. 2003. Constraints on detection of autoinducer-2 (AI-2) signalling molecules using *Vibrio harveyi* as a reporter. *Microbiology* **149**:1953-1956.
74. De Leeuw, E., X. Li, and W. Lu. 2006. Binding characteristics of the *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 surface layer to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol Lett* **260**:210-215.
75. De Preter, V., H. M. Hamer, K. Windey, and K. Verbeke. 2011. The impact of pre- and/or probiotics on human colonic metabolism: Does it affect human health? *Mol Nutr Food Res* **55**:46-57.
76. Delcenserie, V., D. Martel, M. Lamoureux, J. Amiot, Y. Boutin, and D. Roy. 2008. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr Issues Mol Biol* **10**:37-54.
77. Delcour, J., T. Ferain, M. Deghorain, E. Palumbo, and P. Hols. 1999. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Anton Leeuw Int J G* **76**:159-184.
78. Dellaglio, F., V. Bottazzi, and M. Vescovo. 1975. Deoxyribonucleic acid homology among *Lactobacillus* species of the subgenus *Streptobacterium* Orla-Jensen. *Intl J Syst Bacteriol* **25**:160 -172.
79. Dellaglio, F., G. E. Felis, and S. Torriani. 2002. The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins *et al.* 1989. Request for an Opinion. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:285-287.
80. Denou, E., B. Berger, C. Barretto, J.-M. Panoff, F. Arigoni, and H. Brussow. 2007. Gene expression of commensal *Lactobacillus johnsonii* strain NCC533 during *in vitro* growth and in the murine gut. *J Bacteriol* **189**:8109-8119.
81. Denou, E., R. D. Pridmore, B. Berger, J.-M. Panoff, F. Arigoni, and H. Brussow. 2008. Identification of genes associated with the long-gut-persistence phenotype of the probiotic *Lactobacillus johnsonii* strain NCC533 using a combination of genomics and transcriptome analysis. *J Bacteriol* **190**:3161-3168.
82. Dhewa, T., V. Bajpai, R. K. Saxena, S. Pant, and V. Mishra. 2010. Selection of *Lactobacillus* strains as potential probiotics on basis of *in vitro* attributes. *Int J Probio Prebio* **5**:45-51.
83. Dierick, J.-F., M. Dieu, J. Remacle, M. Raes, P. Roepstorff, and O. Toussaint. 2002. Proteomics in experimental gerontology. *Exp Gerontol* **37**:721-734.

84. **Diplock, A., P. Aggett, M. Ashwell, F. Bornet, E. Fern, and M. Roberfroid.** 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *Brit J Nutr* **81**:s1-s27.
85. **Dobrindt, U., F. Agerer, K. Michaelis, A. Janka, C. Buchrieser, M. Samuelson, C. Svanborg, G. Gottschalk, H. Karch, and J. Hacker.** 2003. Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J Bacteriol* **185**:1831-1840.
86. **Dobson, A. E., R. B. Sanozky-Dawes, and T. R. Klaenhammer.** 2007. Identification of an operon and inducing peptide involved in the production of lactacin B by *Lactobacillus acidophilus*. *J Appl Microbiol* **103**:1766-1778.
87. **Dozois, C. M., F. Daigle, and R. Curtiss 3rd.** 2003. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:247-252.
88. **Dreisbach, A., J. M. van Dijk, and G. Buist.** 2011. The cell surface proteome of *Staphylococcus aureus*. *Proteomics* **11**:3154-3168.
89. **Duffes, F., P. Jenoe, and P. Boyaval.** 2000. Use of two-dimensional electrophoresis to study differential protein expression in divercin V41-resistant and wild-type strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **66**:4318-4324.
90. **Dumas, E., B. Meunier, J.-L. Berdague, C. Chambon, M. Desvaux, and M. Hebraud.** 2008. Comparative analysis of extracellular and intracellular proteomes of *Listeria monocytogenes* strains reveals a correlation between protein expression and serovar. *Appl Environ Microbiol* **74**:7399-7409.
91. **Duncker, S. C., L. Wang, P. Hols, and J. Bienenstock.** 2008. The D-alanine content of lipoteichoic acid is crucial for *Lactobacillus plantarum*-mediated protection from visceral pain perception in a rat colorectal distension model. *Neurogastroenterol. Motil* **20**:843-850.
92. **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. 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. *Anton Leeuw Int J G* **76**:279-292.
93. **Dunne, C., L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan, and J. K. Collins.** 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am J Clin Nutr* **73**:386S -392S.
94. **E. A. Aissi, M. Lecocq, C. Brassart.** 2001. Adhesion of some bifidobacterial strains to human enterocyte-like cells and binding to mucosal glycoproteins. *Microb Ecol Health Dis* **13**:32-39.
95. **Enroth, H., T. Åkerlund, A. Sillén, and L. Engstrand.** 2000. Clustering of clinical strains of *Helicobacter pylori* analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. *Clin Diagn Lab Immunol* **7**:301-306.
96. **European Parliament and Europe Council.** 2006. Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. *OJ L 404*, 30.12.2006, p.9.
97. **Fang, F., Y. Li, M. Bumann, E. J. Raftis, P. G. Casey, J. C. Cooney, M. A. Walsh, and P. W. O'Toole.** 2009. Allelic variation of bile salt hydrolase genes in *Lactobacillus salivarius* does not determine bile resistance levels. *J Bacteriol* **191**:5743-5757.
98. **FAO/WHO.** 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.
http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics2/en/index.html

99. **Fisseha, M., and F. Arigoni.** 2005. Beyond genome sequences: approaches to genome-wide analysis of gut bacteria, p. 97-128. *In* Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects. Caister Academic Press.
100. **Flandrin, J.-L., and M. Montanari.** 1996. Histoire de l'alimentation. Fayard.
101. **Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, and J. M. Merrick.** 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**:496-512.
102. **Foligne, B., S. Nutten, C. Grangette, V. Dennin, D. Goudercourt, S. Poiret, J. Dewulf, D. Brassart, A. Mercenier, and B. Pot.** 2007. Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J. Gastroenterol* **13**:236-243.
103. **FSA.** 2004. Final technical report for FSA project ref G01022 - An evaluation of probiotic effects in the human gut: microbial aspects. London.
<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/probioticreport.pdf>
104. **Fukuda, S., H. Toh, K. Hase, K. Oshima, Y. Nakanishi, K. Yoshimura, T. Tobe, J. M. Clarke, D. L. Topping, T. Suzuki, T. D. Taylor, K. Itoh, J. Kikuchi, H. Morita, M. Hattori, and H. Ohno.** 2011. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* **469**:543-547.
105. **Funderburg, N., M. M. Lederman, Z. Feng, M. G. Drage, J. Jadowsky, C. V. Harding, A. Weinberg, and S. F. Sieg.** 2007. Human -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:18631-18635.
106. **Ganzle, M. G., and C. Schwab.** 2005. Exopolysaccharide production by intestinal lactobacilli, p. 97-128. *In* Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects. Caister Academic Press.
107. **Gaon, D., C. Garmendia, N. O. Murrielo, A. de Cucco Games, A. Cerchio, R. Quintas, S. N. González, and G. Oliver.** 2002. Effect of *Lactobacillus* strains (*L. casei* and *L. acidophilus* strains cerela) on bacterial overgrowth-related chronic diarrhea. *Medicina (B Aires)* **62**:159-163.
108. **Garduño, R. A., E. Garduño, and P. S. Hoffman.** 1998. Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect Immun* **66**:4602-4610.
109. **Geer, L. Y., S. P. Markey, J. A. Kowalak, L. Wagner, M. Xu, D. M. Maynard, X. Yang, W. Shi, and S. H. Bryant.** 2004. Open mass spectrometry search algorithm. *J Proteome Res* **3**:958-964.
110. **Gibson, G. R., H. M. Probert, J. V. Loo, R. A. Rastall, and M. B. Roberfroid.** 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* **17**:259-275.
111. **Gilliland, S. E., C. R. Nelson, and C. Maxwell.** 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* **49**:377-381.
112. **Gilliland, S. E., T. E. Staley, and L. J. Bush.** 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J Dairy Sci* **67**:3045-3051.
113. **Goh, Y. J., J.-H. Lee, and R. W. Hutkins.** 2007. Functional analysis of the fructooligosaccharide utilization operon in *Lactobacillus paracasei* 1195. *Appl Environ Microbiol* **73**:5716-5724.
114. **Görg, A., W. Weiss, and M. J. Dunn.** 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**:3665-3685.
115. **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. *Infect Immun* **66**:2052-2059.
116. **Graham, R. L., C. Graham, and G. McMullan.** 2007. Microbial proteomics: a mass

- spectrometry primer for biologists. *Microb Cell Fact* **6**:26.
117. **Granato, D., G. E. Bergonzelli, R. D. Pridmore, L. Marvin, M. Rouvet, and I. E. Corthésy-Theulaz.** 2004. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect Immun* **72**:2160-2169.
 118. **Granger, D. N., C. G. Kevil, and M. B. Grisham.** 2006. Recruitment of inflammatory and immune cells in the gut: physiology and pathophysiology, p. 1137-1162. *In Physiology of the Gastrointestinal Tract*, fourth ed., Academic Press, Burlington.
 119. **Granette, C.** 2011. Probiotiques et régulation de la réponse immunitaire: impact sur les maladies allergiques et les maladies inflammatoires intestinales. *Phytothérapie* **9**:93-99.
 120. **Granette, C., S. Nutten, E. Palumbo, S. Morath, C. Hermann, J. Dewulf, B. Pot, T. Hartung, P. Hols, and A. Mercenier.** 2005. Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:10321 -10326.
 121. **Graves, P. R., and T. A. J. Haystead.** 2002. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**:39-63.
 122. **Greenberg, J. T., P. Monach, J. H. Chou, P. D. Josephy, and B. Dimple.** 1990. Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **87**:6181-6185.
 123. **Grossklaus, R.** 2009. Codex recommendations on the scientific basis of health claims. *Eur J Nutr* **48**:15-22.
 124. **Halici, S., S. F. Zenk, J. Jantsch, and M. Hensel.** 2008. Functional analysis of the *Salmonella* pathogenicity island 2-mediated inhibition of antigen presentation in dendritic cells. *Infect Immun* **76**:4924-4933.
 125. **Hammes, W. P., and C. Hertel.** 2009. Genus *Lactobacillus*, p. 465-511. *In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer, New York.
 126. **Han, X., A. Dorsey-Oresto, M. Malik, J.-Y. Wang, K. Drlica, X. Zhao, and T. Lu.** 2010. *Escherichia coli* genes that reduce the lethal effects of stress. *BMC Microbiol* **10**:35.
 127. **Hatakka, K., M. Mutanen, R. Holma, M. Saxelin, and R. Korpela.** 2008. *Lactobacillus rhamnosus* LC705 together with *Propionibacterium freudenreichii* ssp *shermanii* JS administered in capsules is ineffective in lowering serum lipids. *J American Col Nutr* **27**:441 - 447.
 128. **He, F., H. Morita, A. C. Ouwehand, M. Hosoda, M. Hiramatsu, J.-ichi Kurisaki, E. Isolauri, Y. Benno, and S. Salminen.** 2002. Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by *Bifidobacterium* strains. *Microbiol Immunol* **46**:781-785.
 129. **Hecker, M., H. Antelmann, K. Büttner, and J. Bernhardt.** 2008. Gel-based proteomics of Gram-positive bacteria: a powerful tool to address physiological questions. *Proteomics* **8**:4958-4975.
 130. **Hennequin, C., F. Porcheray, A.-J. Waligora-Dupriet, A. Collignon, M.-C. Barc, P. Bourlioux, and T. Karjalainen.** 2001. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology* **147**:87 -96.
 131. **Hodges, K., V. K. Viswanathan, and G. Hecht.** 2006. Physiology of Host-Pathogen Interactions, p. 1163-1187. *In Physiology of the Gastrointestinal Tract*, fourth ed., Academic Press, Burlington.
 132. **Huberts, D. H. E. W., and I. J. van der Klei.** 2010. Moonlighting proteins: An intriguing mode of multitasking. *BBA Mol Cell Res* **1803**:520-525.
 133. **Hughes, D. T., and V. Sperandio.** 2008. Inter-kingdom signalling: communication between

- bacteria and their hosts. *Nat Rev Micro* **6**:111-120.
134. **Hungerer, K. D., J. Fleck, and D. J. Tipper.** 1969. Structure of the cell wall peptidoglycan of *Lactobacillus casei* RO94. *Biochemistry* **8**:3567-3577.
 135. **Huys, G., M. Vancanneyt, K. D'Haene, V. Vankerckhoven, H. Goossens, and J. Swings.** 2006. Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Res Microbiol* **157**:803-810.
 136. **Izquierdo Alegre, E.** 2009. Les protéines bactériennes en tant que biomarqueurs de l'activité probiotique. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, Strasbourg.
 137. **Izquierdo, E., M. Medina, S. Ennahar, E. Marchioni, and Y. Sanz.** 2008. Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for *Bifidobacterium longum* strains. *Curr Microbiol* **56**:613-618.
 138. **Izquierdo, E., P. Horvatovich, E. Marchioni, D. Aoude-Werner, Y. Sanz, and S. Ennahar.** 2009. 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. *Electrophoresis* **30**:949-956.
 139. **Jacobsen, C. N., V. Rosenfeldt Nielsen, A. E. Hayford, P. L. Moller, K. F. Michaelsen, A. Parregaard, B. Sandstrom, M. Tvede, and M. Jakobsen.** 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl Environ Microbiol* **65**:4949-4956.
 140. **Jansch, A., M. Korakli, R. F. Vogel, and M. G. Ganzle.** 2007. Glutathione reductase from *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T: contribution to oxygen tolerance and thiol exchange reactions in wheat sourdoughs. *Appl Environ Microbiol* **73**:4469-4476.
 141. **Jelcic, I., E. Hufner, H. Schmidt, and C. Hertel.** 2008. Repression of the locus of the enterocyte effacement-encoded regulator of gene transcription of *Escherichia coli* O157:H7 by *Lactobacillus reuteri* culture supernatants is LuxS and strain dependent. *Appl Environ Microbiol* **74**:3310-3314.
 142. **Jeun, J., S. Kim, S.-Y. Cho, H.-J. Jun, H.-J. Park, J.-G. Seo, M.-J. Chung, and S.-J. Lee.** 2010. Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice. *Nutrition* **26**:321-330.
 143. **Johansson, M. L., S. Nobaek, A. Berggren, M. Nyman, I. Björck, S. Ahrné, 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. *Int J Food Microbiol* **42**:29-38.
 144. **Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Bacteria.** 2008. The type strain of *Lactobacillus casei* is ATCC 393, ATCC 334 cannot serve as the type because it represents a different taxon, the name *Lactobacillus paracasei* and its subspecies names are not rejected and the revival of the name "*Lactobacillus zae*" contravenes Rules 51b (1) and (2) of the International Code of Nomenclature of Bacteria. Opinion 82. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**:1764 -1765.
 145. **Julien-David, D., S. Ennahar, M. Miesch, P. Geoffroy, F. Raul, D. Aoude-Werner, J.-M. Lessinger, and E. Marchioni.** 2008. Effects of oxidation on the hydrolysis by cholesterol esterase of sitosteryl esters as compared to a cholesteryl ester. *Steroids* **74**:832-836.
 146. **Juntunen, M., P. V. Kirjavainen, A. C. Ouwehand, S. J. Salminen, and E. Isolauri.** 2001. Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**:293-296.
 147. **Kankainen, M., L. Paulin, S. Tynkkynen, I. von Ossowski, J. Reunanen, P. Partanen, R. Satokari, S. Vesterlund, A. P. A. Hendrickx, S. Lebeer, S. C. J. De Keersmaecker, J. Vanderleyden, T. Hämäläinen, S. Laukkanen, N. Salovuori, J. Ritari, E. Alatalo, R.**

- Korpela, T. Mattila-Sandholm, A. Lassig, K. Hatakka, K. T. Kinnunen, H. Karjalainen, M. Saxelin, K. Laakso, A. Surakka, A. Palva, T. Salusjärvi, P. Auvinen, and W. M. de Vos.** 2009. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:17193-17198.
148. **Kaplan, H., and R. W. Hutkins.** 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**:2682-2684.
149. **Kapp, E. A., F. Schütz, L. M. Connolly, J. A. Chakel, J. E. Meza, C. A. Miller, D. Fenyo, J. K. Eng, J. N. Adkins, G. S. Omenn, and R. J. Simpson.** 2005. An evaluation, comparison, and accurate benchmarking of several publicly available MS/MS search algorithms: sensitivity and specificity analysis. *Proteomics* **5**:3475-3490.
150. **Kaushik, J. K., A. Kumar, R. K. Duary, A. K. Mohanty, S. Grover, and V. K. Batish.** 2009. Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. *PLoS one* **4**.
151. **Kesimer, M., N. Kiliç, R. Mehrotra, D. J. Thornton, and J. K. Sheehan.** 2009. Identification of salivary mucin MUC7 binding proteins from *Streptococcus gordonii*. *BMC Microbiol* **9**:163.
152. **Kimoto, H., S. Ohmomo, and T. Okamoto.** 2002. Cholesterol removal from media by *Lactococci*. *J Dairy Sci* **85**:3182-3188.
153. **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. *Res Microbiol.* **159**:685-691.
154. **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 Microbiol Lett* **167**:185-189.
155. **Klaenhammer, T. R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **12**:39-85.
156. **Klaenhammer, T. R., E. Altermann, E. Pfeiler, B. L. Buck, Y.-J. Goh, S. O'Flaherty, R. Barrangou, and T. Duong.** 2008. Functional genomics of probiotic Lactobacilli. *J Clin Gastroenterol* **42 Suppl 3 Pt 2**:S160-162.
157. **Klaenhammer, T. R., R. Barrangou, B. L. Buck, M. A. Azcarate-Peril, and E. Altermann.** 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev* **29**:393-409.
158. **Klaver, F. A., and R. van der Meer.** 1993. The assumed assimilation of cholesterol by Lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Appl Environ Microbiol* **59**:1120-1124.
159. **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.
160. **Kleerebezem, M., J. Boekhorst, R. van Kranenburg, D. Molenaar, O. P. Kuipers, R. Leer, R. Turchini, S. A. Peters, H. M. Sandbrink, M. W. E. J. Fiers, W. Stiekema, R. M. K. Lankhorst, P. A. Bron, S. M. Hoffer, M. N. N. Groot, R. Kerkhoven, M. de Vries, B. Ursing, W. M. de Vos, and R. J. Siezen.** 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:1990-1995.
161. **Koncept Analytics.** 2010. Global probiotics market: trends and opportunities. U.S. Patent 1206266. Koncept Analytics.
162. **Koskenniemi, K., K. Laakso, J. Koponen, M. Kankainen, D. Greco, P. Auvinen, K. Savijoki, T. A. Nyman, A. Surakka, T. Salusjärvi, W. M. de Vos, S. Tynkkynen, N. Kalkkinen, and P. Varmanen.** 2011. Proteomics and transcriptomics characterization of bile stress response in probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Mol Cel Proteomics* **10**.

163. **Krulwich, T. A., G. Sachs, and E. Padan.** 2011. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nat Rev Micro* **9**:330-343.
164. **Kubota, K., T. Kosaka, and K. Ichikawa.** 2005. Combination of two-dimensional electrophoresis and shotgun peptide sequencing in comparative proteomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **815**:3-9.
165. **Kullen, M. J., and T. R. Klaenhammer.** 1999. Identification of the pH-inducible, proton-translocating F1F0-ATPase (atpBEFHAGDC) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: gene structure, cloning and characterization. *Mol Microbiol* **33**:1152-1161.
166. **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.
167. **Lambert, J. M., R. S. Bongers, W. M. de Vos, and M. Kleerebezem.** 2008. Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin acylase family members in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Appl Environ Microbiol* **74**:4719-4726.
168. **Laparra, J. M., and Y. Sanz.** 2009. Comparison of *in vitro* models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett Appl Microbiol* **49**:695-701.
169. **Larsen, C. N., S. Nielsen, P. Kaestel, E. Brockmann, M. Bennedsen, H. R. Christensen, D. C. Eskesen, B. L. Jacobsen, and K. F. Michaelsen.** 2006. Dose-response study of probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* BB-12 and *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* CRL-341 in healthy young adults. *Eur J Clin Nutr* **60**:1284-1293.
170. **Lebeer, S., I. J. J. Claes, T. L. A. Verhoeven, C. Shen, I. Lambrichts, J. L. Ceuppens, J. Vanderleyden, and S. C. J. De Keersmaecker.** 2008. Impact of luxS and suppressor mutations on the gastrointestinal transit of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol* AEM.00133-08.
171. **Lebeer, S., J. Vanderleyden, and S. C. J. De Keersmaecker.** 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**:728-764.
172. **Lebeer, S., J. Vanderleyden, and S. C. J. De Keersmaecker.** 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Micro* **8**:171-184.
173. **Lebeer, S., T. L. A. Verhoeven, G. Francius, G. Schoofs, I. Lambrichts, Y. Dufrene, J. Vanderleyden, and S. C. J. De Keersmaecker.** 2009. Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase. *Appl Environ Microbiol* **75**:3554-3563.
174. **Lebeer, S., T. L. A. Verhoeven, M. Perea Velez, J. Vanderleyden, and S. C. J. De Keersmaecker.** 2007. Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol* **73**:6768-6775.
175. **Lee, J., Y. Kim, H. S. Yun, J. G. Kim, S. Oh, and S. H. Kim.** 2010. Genetic and proteomic analysis of factors affecting serum cholesterol reduction by *Lactobacillus acidophilus* A4. *Appl Environ Microbiol* **76**:4829-4835.
176. **Lee, J.-H., V. Karamychev, S. Kozyavkin, D. Mills, A. Pavlov, N. Pavlova, N. Polouchine, P. Richardson, V. Shakhova, A. Slesarev, B. Weimer, and D. O'Sullivan.** Comparative genomic analysis of the gut bacterium *Bifidobacterium longum* reveals loci susceptible to deletion during pure culture growth. *BMC Genomics* **9**:247-247.
177. **Lee, J.-H., and D. J. O'Sullivan.** 2010. Genomic Insights into Bifidobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**:378-416.
178. **Lee, K., H.-G. Lee, and Y.-J. Choi.** 2008. Proteomic analysis of the effect of bile salts on the intestinal and probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*. *J Biotechnol* **137**:14-19.

179. **Lee, K., H.-G. Lee, K. Pi, and Y.-J. Choi.** 2008. The effect of low pH on protein expression by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*. *Proteomics* **8**:1624-1630.
180. **Lee, S. P., and R. Kuver.** 2006. Gallbladder Function, p. 1535-1557. *In* Physiology of the Gastrointestinal Tract, fourth ed., Academic Press, Burlington.
181. **Lee-Wickner, L.-J., and B. M. Chassy.** 1984. Production and regeneration of *Lactobacillus casei* protoplasts. *Appl Environ Microbiol* **48**:994-1000.
182. **Lehman, T. J. A., J. B. Allen, P. H. Plotz, and R. L. Wilder.** 1985. Bacterial cell wall composition, lysozyme resistance, and the induction of chronic arthritis in rats. *Rheumatol Int* **5**:163-167.
183. **Lenaerts, K., F. G. Bouwman, W. H. Lamers, J. Renes, and E. C. Mariman.** 2007. Comparative proteomic analysis of cell lines and scrapings of the human intestinal epithelium. *BMC Genomics* **8**:91.
184. **Lesuffleur, T., A. Barbat, E. Dussaulx, and A. Zweibaum.** 1990. Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res* **50**:6334-6343.
185. **Lesuffleur, T., N. Porchet, J. P. Aubert, D. Swallow, J. R. Gum, Y. S. Kim, F. X. Real, and A. Zweibaum.** 1993. Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *J Cell Sci* **106 (Pt 3)**:771-783.
186. **Leteurtre, E., V. Gouyer, K. Rousseau, O. Moreau, A. Barbat, D. Swallow, G. Huet, and T. Lesuffleur.** 2004. Differential mucin expression in colon carcinoma HT-29 clones with variable resistance to 5-fluorouracil and methotrexate. *Biol Cell* **96**:145-151.
187. **Leverrier, P., D. Dimova, V. Pichereau, Y. Auffray, P. Boyaval, and G. Jan.** 2003. Susceptibility and adaptive response to bile salts in *Propionibacterium freudenreichii*: physiological and proteomic analysis. *Appl Environ Microbiol* **69**:3809-3818.
188. **Lewis, S. J., and S. Burmeister.** 2005. A double-blind placebo-controlled study of the effects of *Lactobacillus acidophilus* on plasma lipids. *Eur J Clin Nutr* **59**:776-780.
189. **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. *J Appl Microbiol* **104**:1082-1091.
190. **Li, X., U. Pal, N. Ramamoorthi, X. Liu, D. C. Desrosiers, C. H. Eggers, J. F. Anderson, J. D. Radolf, and E. Fikrig.** 2007. The Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* requires BB0690, a Dps homologue, to persist within ticks. *Mol Microbiol* **63**:694-710.
191. **Ling, E., G. Feldman, M. Portnoi, R. Dagan, K. Overweg, F. Mulholland, V. Chalifacspi, J. Wells, and Y. Mizrahi-Nebenzahl.** 2004. Glycolytic enzymes associated with the cell surface of *Streptococcus pneumoniae* are antigenic in humans and elicit protective immune responses in the mouse. *Clin Exp Immunol* **138**:290-298.
192. **Link, A. J., J. Eng, D. M. Schieltz, E. Carmack, G. J. Mize, D. R. Morris, B. M. Garvik, and J. R. Yates 3rd.** 1999. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* **17**:676-682.
193. **Lorca, G. L., G. Font de Valdez, and A. Ljungh.** 2002. Characterization of the protein-synthesis dependent adaptive acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**:525-532.
194. **Lye, H.-S., G. Rusul, and M.-T. Liong.** 2010. Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *J Dairy Sci* **93**:1383-1392.
195. **Mack, D. R., S. Ahrne, L. Hyde, S. Wei, and M. A. Hollingsworth.** 2003. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in

- vitro. Gut **52**:827-833.
196. **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. *Pediatr Res* **37**:75-80.
 197. **Madureira, P., M. Baptista, M. Vieira, V. Magalhães, A. Camelo, L. Oliveira, A. Ribeiro, D. Tavares, P. Trieu-Cuot, M. Vilanova, and P. Ferreira.** 2007. *Streptococcus agalactiae* GAPDH is a virulence-associated immunomodulatory protein. *J Immunol* **178**:1379-1387.
 198. **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. *Infect Immun* **72**:1341-1348.
 199. **Mahler, G. J., M. L. Shuler, and R. P. Glahn.** 2009. Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an *in vitro* digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability. *J Nutr Biochem* **20**:494-502.
 200. **Mainville, I., Y. Arcand, and E. R. Farnworth.** 2005. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *Int J Food Microbiol* **99**:287-296.
 201. **Makarova, K., A. Slesarev, Y. Wolf, A. Sorokin, B. Mirkin, E. Koonin, A. Pavlov, N. Pavlova, V. Karamychev, N. Polouchine, V. Shakhova, I. Grigoriev, Y. Lou, D. Rohksar, S. Lucas, K. Huang, D. M. Goodstein, T. Hawkins, V. Plengvidhya, D. Welker, J. Hughes, Y. Goh, A. Benson, K. Baldwin, J.-H. Lee, I. Díaz-Muñiz, B. Dosti, V. Smeianov, W. Wechter, R. Barabote, G. Lorca, E. Altermann, R. Barrangou, B. Ganesan, Y. Xie, H. Rawsthorne, D. Tamir, C. Parker, F. Breidt, J. Broadbent, R. Hutkins, D. O'Sullivan, J. Steele, G. Unlu, M. Saier, T. Klaenhammer, P. Richardson, S. Kozyavkin, B. Weimer, and D. Mills.** 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:15611 -15616.
 202. **Makarova, K. S., and E. V. Koonin.** 2007. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J Bacteriol* **189**:1199-1208.
 203. **Manson, J. E., H. Tosteson, P. M. Ridker, S. Satterfield, P. Hebert, G. T. O'Connor, J. E. Buring, and C. H. Hennekens.** 1992. The primary prevention of myocardial infarction. *N Engl J Med* **326**:1406-1416.
 204. **Marteau, P., M. Minekus, R. Havenaar, and J. H. Huis in't Veld.** 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J. Dairy Sci* **80**:1031-1037.
 205. **Marteau, P., R. Havenaar, J. H. J. Huisintveld, and Minekus.** 1995. A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small-intestine. *Altern Lab Anim* **23**:197-209.
 206. **Martinez, A., and R. Kolter.** 1997. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J Bacteriol.* **179**:5188-5194.
 207. **Mathé, T., T. Pilorin, and P. Hébel.** 2008. Du discours nutritionnel aux représentations de l'alimentation. U.S. Patent 258. Cahier de recherche, CREDOC.
 208. **Mattila-Sandholm, T., J. Mättö, and M. Saarela.** 1999. Lactic acid bacteria with health claims--interactions and interference with gastrointestinal flora. *Int Dairy J* **9**:25-35.
 209. **Matuszewska, E., J. Kwiatkowska, D. Kuczynska-Wisnik, and E. Laskowska.** 2008. *Escherichia coli* heat-shock proteins IbpA/B are involved in resistance to oxidative stress induced by copper. *Microbiology* **154**:1739-1747.
 210. **Mayo, B., D. van Sinderen, and M. Ventura.** 2008. Genome analysis of food grade lactic acid-producing bacteria: from basics to applications. *Curr Genomics* **9**:169-183.

211. **McAuliffe, O., R. J. Cano, and T. R. Klaenhammer.** 2005. Genetic analysis of two bile salt hydrolase activities in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol* **71**:4925-4929.
212. **McDonald, J.** 2011. *Handbook of Biological Statistics*. Sparky House Publishing.
213. **Meccas, J.** 2002. Use of signature-tagged mutagenesis in pathogenesis studies. *Curr Op Microbiol* **5**:33-37.
214. **Medellin-Pena, M. J., H. Wang, R. Johnson, S. Anand, and M. W. Griffiths.** 2007. Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **73**:4259-4267.
215. **Medina, M., E. Izquierdo, S. Ennahar, and Y. Sanz.** 2007. Differential immunomodulatory properties of Bifidobacterium logum strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. *Clin Exp Immunol* **150**:531-538.
216. **Medzhitov, R.** 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**:819-826.
217. **Meijerink, M., S. van Hemert, N. Taverne, M. Wels, P. de Vos, P. A. Bron, H. F. Savelkoul, J. van Bilsen, M. Kleerebezem, and J. M. Wells.** 2010. Identification of genetic loci in *Lactobacillus plantarum* that modulate the immune response of dendritic cells using comparative genome hybridization. *PLoS ONE* **5**:e10632.
218. **Meunier, B., E. Dumas, I. Picc, D. Béchet, M. Hébraud, and J.-F. Hocquette.** 2007. Assessment of hierarchical clustering methodologies for proteomic data mining. *J. Proteome Res* **6**:358-366.
219. **Meyer-Abich, K. M.** 2005. Human Health in Nature? Towards a Holistic Philosophy of Nutrition. *Public Health Nutrition* **8**:738-742.
220. **Miettinen, M., J. Vuopio-Varkila, and K. Varkila.** 1996. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infect Immun* **64**:5403-5405.
221. **Mikelsaar, M., R. Mändar, and E. Sepp.** 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.
222. **Mileti, E., G. Matteoli, I. D. Iliev, and M. Rescigno.** 2009. Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of lactobacilli using complex culture systems: prediction for *in vivo* efficacy. *PLoS ONE* **4**:e7056.
223. **Molenaar, D., F. Bringel, F. H. Schuren, W. M. de Vos, R. J. Siezen, and M. Kleerebezem.** 2005. Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays. *J Bacteriol* **187**:6119-6127.
224. **Molly, K., M. Vande Woestyne, and W. Verstraete.** 1993. Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl Microbiol. Biotechnol* **39**:254-258.
225. **Moreau, M.-C.** 2004. Bactéries lactiques probiotiques et immunité. *In* *Bactéries lactiques et probiotiques*. Tec & Doc Lavoisier.
226. **Morel-Deville, F., F. Fauvel, and P. Morel.** 1998. Two-component signal-transducing systems involved in stress responses and vancomycin susceptibility in *Lactobacillus sakei*. *Microbiology* **144**:2873 -2883.
227. **Morelli, L.** 2007. *In vitro* assessment of probiotic bacteria: from survival to functionality. *Int Dairy J* **17**:1278-1283.
228. **Morelli, L.** 2000. *In vitro* selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Curr Issues Intest microbiol* **1**:59-67.

229. **Morita, H., H. Toh, S. Fukuda, H. Horikawa, K. Oshima, T. Suzuki, M. Murakami, S. Hisamatsu, Y. Kato, T. Takizawa, H. Fukuoka, T. Yoshimura, K. Itoh, D. J. O'Sullivan, L. L. McKay, H. Ohno, J. Kikuchi, T. Masaoka, and M. Hattori.** 2008. Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. *DNA Res* **15**:151-161.
230. **Motherway, M. O., A. Zomer, S. C. Leahy, J. Reunanen, F. Bottacini, M. J. Claesson, F. O'Brien, K. Flynn, P. G. Casey, J. A. Moreno Munoz, B. Kearney, A. M. Houston, C. O'Mahony, D. G. Higgins, F. Shanahan, A. Palva, W. M. de Vos, G. F. Fitzgerald, M. Ventura, P. W. O'Toole, and D. van Sinderen.** 2011. Functional genome analysis of *Bifidobacterium breve* UCC2003 reveals type IVb tight adherence (Tad) pili as an essential and conserved host-colonization factor. *Proc Natl Acad Sci*.
231. **Muñoz-Provencio, D., G. Pérez-Martínez, and V. Monedero.** 2011. Identification of surface proteins from *Lactobacillus casei* BL23 able to bind to fibronectin and collagen. *Probio Antimicro Prot* **3**:15-20.
232. **Naruszewicz, M., M.-L. Johansson, D. Zapolska-Downar, and H. Bukowska.** 2002. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *Am J Clin Nutr* **76**:1249 -1255.
233. **Navarre, W. W., and O. Schneewind.** 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:174-229.
234. **Neuhaus, F. C., and J. Baddiley.** 2003. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**:686-723.
235. **Niers, L. E. M., H. M. Timmerman, G. T. Rijkers, G. M. van Bleek, N. O. P. van Uden, E. F. Knol, M. L. Kapsenberg, J. L. L. Kimpen, and M. O. Hoekstra.** 2005. Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines. *Clin Exp Allergy* **35**:1481-1489.
236. **Nigatu, A., S. Ahrné, and G. Molin.** 2000. Temperature-dependent variation in API 50 CH fermentation profiles of *Lactobacillus* species. *Curr Microbiol* **41**:21-26.
237. **Nolleaux, G., C. Devillé, B. El Moulaj, W. Zorzi, P. Deloyer, Y.-J. Schneider, O. Peulen, and G. Dandrifosse.** 2006. Development of a serum-free co-culture of human intestinal epithelium cell-lines (Caco-2/HT29-5M21). *BMC Cell Biol* **7**:20.
238. **O'Connell Motherway, M., J. O'Driscoll, G. F. Fitzgerald, and D. Van Sinderen.** 2009. Overcoming the restriction barrier to plasmid transformation and targeted mutagenesis in *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Microb Biotechnol* **2**:321-332.
239. **O'Farrell, P. H.** 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**:4007-4021.
240. **O'Sullivan, O., J. O'Callaghan, A. Sangrador-Vegas, O. McAuliffe, L. Slattery, P. Kaleta, M. Callanan, G. F. Fitzgerald, R. P. Ross, and T. Beresford.** 2009. Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. *BMC Microbiol* **9**:50.
241. **OECD.** 2011. Systèmes de santé: efficacité et politiques. OECD Publishing.
242. **Ooi, L.-G., and M.-T. Liang.** 2010. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of *in vivo* and *in vitro* findings. *Int J Mol Sci* **11**:2499-2522.
243. **Oozeer, R., A. Leplingard, D. D. G. Mater, A. Mogenet, R. Michelin, I. Seksek, P. Marteau, J. Doré, J.-L. Bresson, and G. Corthier.** 2006. Survival of *Lactobacillus casei* in the human digestive tract after consumption of fermented milk. *Appl Environ Microbiol* **72**:5615-5617.
244. **Ouwehand, A. C., S. Gråsten, P. Niemi, H. Mykkänen, and S. Salminen.** 2000. Wheat or rye supplemented diets do not affect faecal mucus concentration or the adhesion of probiotic

- micro-organisms to faecal mucus. *Lett Appl Microbiol* **31**:30-33.
245. **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 Microbiol Lett* **177**:35-38.
246. **Ouwehand, A. C., E. M. Tuomola, S. TÄ¶lkkÄ¶,** and **S. Salminen.** 2001. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *Int J Food Microbiol* **64**:119-126.
247. **Parra, M. D., B. E. Martínez de Morentin, J. M. Cobo, A. Mateos, and J. A. Martínez.** 2004. Daily ingestion of fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN114001 improves innate-defense capacity in healthy middle-aged people. *J Physiol Biochem* **60**:85-91.
248. **Parvez, S., K. A. Malik, S. Ah Kang, and H.-Y. Kim.** 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl Microbiol* **100**:1171-1185.
249. **Penny, C., T. Nadalig, M. Alioua, C. Gruffaz, S. Vuilleumier, and F. Bringel.** 2010. Coupling of denaturing high-performance liquid chromatography and terminal restriction fragment length polymorphism with precise fragment sizing for microbial community profiling and characterization. *Appl Environ Microbiol* **76**:648-651.
250. **Perdigón, G., C. Maldonado Galdeano, J. C. Valdez, and M. Medici.** 2002. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur J Clin Nutr* **56**:S21-S26.
251. **Perea Vélez, M., T. L. A. Verhoeven, C. Draing, S. Von Aulock, M. Pfitzenmaier, A. Geyer, I. Lambrichts, C. Grangette, B. Pot, J. Vanderleyden, and S. C. J. De Keersmaecker.** 2007. Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol* **73**:3595-3604.
252. **Pereira, D. I. A., and G. R. Gibson.** 2002. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl Environ Microbiol* **68**:4689-4693.
253. **Pereira, D. I. A., A. L. McCartney, and G. R. Gibson.** 2003. An *in vitro* study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *Appl Environ Microbiol* **69**:4743-4752.
254. **Pfeiler, E. A., M. A. Azcarate-Peril, and T. R. Klaenhammer.** 2007. Characterization of a novel bile-inducible operon encoding a two-component regulatory system in *Lactobacillus acidophilus*. *J Bacteriol* **189**:4624-4634.
255. **Pieterse, B., R. J. Leer, F. H. J. Schuren, and M. J. van der Werf.** 2005. Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. *Microbiology* **151**:3881-3894.
256. **Pinto, M., S. Robine-Leon, M. D. Appay, M. Keding, N. Triadou, E. Dussaulx, B. Lacroix, and P. Simon-Assman.** 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* **47**:323-330.
257. **Pontier, C., J. Pachot, R. Botham, B. Lenfant, and P. Arnaud.** 2001. HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: role of the mucus layer. *J Pharm Sci* **90**:1608-1619.
258. **Poulain, J.-P.** 2001. Manger aujourd'hui : attitudes, normes et pratiques. Privat.
259. **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*. *J Bacteriol* **187**:6128-6136.
260. **Pridmore, R. D., B. Berger, F. Desiere, D. Vilanova, C. Barretto, A.-C. Pittet, M.-C. Zwahlen, M. Rouvet, E. Altermann, R. Barrangou, B. Mollet, A. Mercenier, T. Klaenhammer, F. Arigoni, and M. A. Schell.** 2004. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:2512-

- 2517.
261. **Rajagopal, S., N. Sudarsan, and K. W. Nickerson.** 2002. Sodium dodecyl sulfate hypersensitivity of clpP and clpB mutants of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **68**:4117-4121.
262. **Rallu, F., A. Gruss, S. D. Ehrlich, and E. Maguin.** 2000. Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals. *Mol Microbiol* **35**:517-528.
263. **Ranford, J. C., A. R. Coates, and B. Henderson.** 2000. Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. *Expert Rev Mol Med* **2**:1-17.
264. **Regnier, F., and G. Huang.** 1996. Future potential of targeted component analysis by multidimensional liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chrom A* **750**:3-10.
265. **Reynier, M. O., J. C. Montet, A. Gerolami, C. Marteau, C. Crotte, A. M. Montet, and S. Mathieu.** 1981. Comparative effects of cholic, chenodeoxycholic, and ursodeoxycholic acids on micellar solubilization and intestinal absorption of cholesterol. *J. Lipid Res.* **22**:467-473.
266. **Roberfroid, M.** 2007. *Aliments fonctionnels: définitions, concepts et stratégies* Aliments fonctionnels, 2nd ed. Tec & Doc Lavoisier.
267. **Roberfroid, M., V. Coxam, N. Delzenne, and Collectif.** 2007. *Aliments fonctionnels*, 2nd ed. Tec & Doc Lavoisier.
268. **Rossi, M., C. Corradini, A. Amaretti, M. Nicolini, A. Pompei, S. Zanoni, and D. Matteuzzi.** 2005. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Appl Environ Microbiol* **71**:6150-6158.
269. **Rudel, L. L., and M. D. Morris.** 1973. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *J Lipid Res* **14**:364-366.
270. **Ruiz, L., Y. Coute, B. Sanchez, C. G. de los Reyes-Gavilan, J.-C. Sanchez, and A. Margolles.** 2009. The cell-envelope proteome of *Bifidobacterium longum* in an *in vitro* bile environment. *Microbiology* **155**:957-967.
271. **Saad, N., M. Urdaci, C. Vignoles, S. Chaignepain, R. Tallon, J. M. Schmitter, and P. Bressollier.** 2009. *Lactobacillus plantarum* 299v surface-bound GAPDH: a new insight into enzyme cell walls location. *J Microbiol Biotechnol* **19**:1635-1643.
272. **Salè, F. O., S. Marchesini, P. H. Fishman, and B. Berra.** 1984. A sensitive enzymatic assay for determination of cholesterol in lipid extracts. *Anal Biochem* **142**:347-350.
273. **Sánchez, 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 Immun Med Microbiol* **54**:1-17.
274. **Sánchez, B., M.-C. Champomier-Vergès, P. Anglade, F. Baraige, C. G. de los Reyes-Gavilán, A. Margolles, and M. Zagorec.** 2005. Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809. *J Bacteriol* **187**:5799-5808.
275. **Sánchez, B., M.-C. Champomier-Vergès, M. del C. Collado, P. Anglade, F. Baraige, Y. Sanz, C. G. de los Reyes-Gavilan, A. Margolles, and M. Zagorec.** 2007. Low-pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* biotype *longum*. *Appl Environ Microbiol* **73**:6450-6459.
276. **Sánchez, B., M.-C. Champomier-Vergès, B. Stuer-Lauridsen, P. Ruas-Madiedo, P. Anglade, F. Baraige, C. G. de los Reyes-Gavilan, E. Johansen, M. Zagorec, and A. Margolles.** 2007. Adaptation and response of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to bile: a proteomic and physiological approach. *Appl Environ Microbiol* **73**:6757-6767.
277. **Sánchez, B., C. G. De Los Reyes-Gavilán, and A. Margolles.** 2006. The F1F0-ATPase of

- Bifidobacterium animalis* is involved in bile tolerance. *Env Microbiol* **8**:1825-1833.
278. **Sánchez, B., J.-M. Schmitter, and M. C. Urdaci.** 2009. Identification of novel proteins secreted by *Lactobacillus plantarum* that bind to mucin and fibronectin. *J Mol Microbiol Biotechnol* **17**:158-162.
 279. **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. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:14422-14427.
 280. **Schiffrin, E., D. Brassart, A. Servin, F. Rochat, and A. Donnet-Hughes.** 1997. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am J Clin Nutr* **66**:515S -520S.
 281. **Schlee, M., J. Harder, B. Köten, E. F. Stange, J. Wehkamp, and K. Fellermann.** 2008. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta-defensin 2. *Clin Exp Immunol* **151**:528-535.
 282. **Schlee, M., J. Wehkamp, A. Altenhoefer, T. A. Oelschlaeger, E. F. Stange, and K. Fellermann.** 2007. Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immun* **75**:2399-2407.
 283. **Schuster, H.** 2004. Improving lipid management to titrate, combine or switch. *Int J Clin Pract* **58**:689-694.
 284. **Senok, A. C., A. Y. Ismaeel, and G. A. Botta.** 2005. Probiotics: facts and myths. *Clin Microbiol Inf* **11**:958-966.
 285. **Servin, A. L., and M.-H. Coconnier.** 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **17**:741-754.
 286. **Servin, A. L.** 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* **28**:405-440.
 287. **Seth, A., F. Yan, D. B. Polk, and R. K. Rao.** 2008. Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. *Am J Phys - Gastr Liver Phys* **294**:G1060 -G1069.
 288. **Shabala, L., and T. Ross.** 2008. Cyclopropane fatty acids improve *Escherichia coli* survival in acidified minimal media by reducing membrane permeability to H⁺ and enhanced ability to extrude H⁺. *Res Microbiol* **159**:458-461.
 289. **Shah, N. P.** 2007. Functional cultures and health benefits. *Int Dairy J* **17**:1262-1277.
 290. **Shida, K., J. Kiyoshima-Shibata, M. Nagaoka, K. Watanabe, and M. Nanno.** 2006. Induction of interleukin-12 by *Lactobacillus* strains having a rigid cell wall resistant to intracellular digestion. *J Dairy Sci* **89**:3306-3317.
 291. **Shida, K., K. Makino, A. Morishita, K. Takamizawa, S. Hachimura, A. Ametani, T. Sato, Y. Kumagai, S. Habu, and S. Kaminogawa.** 1998. *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int Arch Allergy Immunol* **115**:278-287.
 292. **Shulkes, A., G. S. Baldwin, and A. S. Giraud.** 2006. Regulation of Gastric Acid Secretion, p. 1223-1258. *In Physiology of the Gastrointestinal Tract*, fourth ed., Academic Press, Burlington.
 293. **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*. *Biochim Biophys Acta* **1784**:335-342.
 294. **Simons, L. A., S. G. Amansec, and P. Conway.** 2006. Effect of *Lactobacillus fermentum* on serum lipids in subjects with elevated serum cholesterol. *Nutr Met Cardr Dis* **16**:531-535.

295. **Singhal, K., H. Joshi, and B. L. Chaudhary.** 2010. Bile and acid tolerance ability of probiotic *Lactobacillus* strains. *J Pharma Techn* **2**:17-25.
296. **Sleator, R. D., H. H. Wemekamp-Kamphuis, C. G. M. Gahan, T. Abee, and C. Hill.** 2005. A PrfA-regulated bile exclusion system (BilE) is a novel virulence factor in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **55**:1183-1195.
297. **Smith, R.** 2009. Two-dimensional electrophoresis: an overview. *In* Two-Dimensional Electrophoresis Protocols, 1st ed. Humana Press.
298. **Smits, H. H., A. Engering, D. van der Kleij, E. C. de Jong, K. Schipper, T. M. M. van Capel, B. A. J. Zaat, M. Yazdanbakhsh, E. A. Wierenga, Y. van Kooyk, and M. L. Kapsenberg.** 2005. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J. Allergy Clin. Immunol* **115**:1260-1267.
299. **Sperandio, V., A. G. Torres, B. Jarvis, J. P. Nataro, and J. B. Kaper.** 2003. Bacteria–host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci* **100**:8951 -8956.
300. **Spurbeck, R. R., and C. G. Arvidson.** 2010. *Lactobacillus jensenii* surface-associated proteins inhibit *Neisseria gonorrhoeae* adherence to epithelial cells. *Infect Immun* **78**:3103-3111.
301. **Stock, A. M., V. L. Robinson, and P. N. Goudreau.** 2000. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**:183-215.
302. **Sturme, M. H. J., J. Nakayama, D. Molenaar, Y. Murakami, R. Kunugi, T. Fujii, E. E. Vaughan, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos.** 2005. An agr-like two-component regulatory system in *Lactobacillus plantarum* is involved in production of a novel cyclic peptide and regulation of adherence. *J Bacteriol* **187**:5224-5235.
303. **Surette, M. G., and B. L. Bassler.** 1998. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci* **95**:7046 -7050.
304. **Tagu, E. par D., and C. Moussard.** 2006. Principes des techniques de biologie moléculaire, 2nd ed. Quae éditions.
305. **Tahri, K., J. P. Grill, and F. Schneider.** 1996. Bifidobacteria strain behavior toward cholesterol: coprecipitation with bile salts and assimilation. *Curr Microbiol* **33**:187-193.
306. **Tahri, K., J. P. Grill, and F. Schneider.** 1997. Involvement of trihydroxyconjugated bile salts in cholesterol assimilation by bifidobacteria. *Curr Microbiol* **34**:79-84.
307. **Takeda, K., T. Suzuki, S.-I. Shimada, K. Shida, M. Nanno, and K. Okumura.** 2006. Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota. *Clin Exp Immunol* **146**:109-115.
308. **Tannock, G. W., S. Ghazally, J. Walter, D. Loach, H. Brooks, G. Cook, M. Surette, C. Simmers, P. Bremer, F. Dal Bello, and C. Hertel.** 2005. Ecological behavior of *Lactobacillus reuteri* 100-23 is affected by mutation of the *luxS* Gene. *Appl Environ Microbiol* **71**:8419-8425.
309. **Taranto, M. P., J. L. Vera, J. Hugenholtz, G. F. De Valdez, and F. Sesma.** 2003. *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produces cobalamin. *J Bacteriol* **185**:5643-5647.
310. **Tatusov, R. L., E. V. Koonin, and D. J. Lipman.** 1997. A genomic perspective on protein families. *Science* **278**:631-637.
311. **Tatusov, R. L., N. D. Fedorova, J. D. Jackson, A. R. Jacobs, B. Kiryutin, E. V. Koonin, D. M. Krylov, R. Mazumder, S. L. Mekhedov, A. N. Nikolskaya, B. S. Rao, S. Smirnov, A. V. Sverdlov, S. Vasudevan, Y. I. Wolf, J. J. Yin, and D. A. Natale.** 2003. The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* **4**:41.
312. **Teitelbaum, J. E., and W. A. Walker.** 2002. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu Rev Nutr* **22**:107-138.

313. **Telford, J. L., M. A. Barocchi, I. Margarit, R. Rappuoli, and G. Grandi.** 2006. Pili in Gram-positive pathogens. *Nat Rev Micro* **4**:509-519.
314. **Thomas, D. W., F. R. Greer, J. J. S. Bhatia, S. A. Abrams, S. R. Daniels, M. B. Schneider, J. Silverstein, N. Stettler, L. A. Heitlinger, R. D. Baker Jr., D. A. Gremse, R. Gugig, and J. R. Lightdale.** 2010. Clinical report - Probiotics and prebiotics in pediatrics. *Pediatrics* **126**:1217-1231.
315. **Tjalsma, H., L. Lambooy, P. W. Hermans, and D. W. Swinkels.** 2008. Shedding & shaving: disclosure of proteomic expressions on a bacterial face. *Proteomics* **8**:1415-1428.
316. **Tomich, M., P. J. Planet, and D. H. Figurski.** 2007. The tad locus: postcards from the widespread colonization island. *Nat Rev Microbiol* **5**:363-375.
317. **Ton-That, H., L. A. Marraffini, and O. Schneewind.** 2004. Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1694**:269-278.
318. **Tuomola, E. M., and S. J. Salminen.** 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int J Food Microbiol* **41**:45-51.
319. **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. *Lett Appl Microbiol* **28**:159-163.
320. **Tuomola, E. M., A. C. Ouwehand, and S. J. Salminen.** 2000. Chemical, physical and enzymatic pre-treatments of probiotic lactobacilli alter their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins. *Int J Food Microbiol* **60**:75-81.
321. **Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. Hamady, C. M. Fraser-Liggett, R. Knight, and J. I. Gordon.** 2007. The Human Microbiome Project. *Nature* **449**:804-810.
322. **Usman, and A. Hosono.** 1999. Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. *J Dairy Sci* **82**:243-248.
323. **van Baarlen, P., F. Troost, C. van der Meer, G. Hooiveld, M. Boekschoten, R. J. M. Brummer, and M. Kleerebezem.** 2011. Human mucosal *in vivo* transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**:4562-4569.
324. **van de Guchte, M., P. Serror, C. Chervaux, T. Smokvina, S. D. Ehrlich, and E. Maguin.** 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Anton Leeuwen Int J G* **82**:187-216.
325. **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. *Appl Environ Microbiol* **72**:4143-4153.
326. **Vélez, M. P., S. C. J. De Keersmaecker, and J. Vanderleyden.** 2007. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Lett* **276**:140-148.
327. **Ventura, M., D. van Sinderen, G. F. Fitzgerald, and R. Zink.** 2004. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Anton Leeuwen Int J G* **86**:205-223.
328. **Vidal, K., A. Donnet-Hughes, and D. Granato.** 2002. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus johnsonii* strain La1 and *Lactobacillus acidophilus* strain La10 antagonize the responsiveness of human intestinal epithelial HT29 cells to lipopolysaccharide and gram-negative bacteria. *Infect Immun* **70**:2057-2064.
329. **Vilanova, M., P. Ferreira, A. Ribeiro, and M. Arala-Chaves.** 1999. The biological effects induced in mice by p36, a proteinaceous factor of virulence produced by African swine fever virus, are mediated by interleukin-4 and also to a lesser extent by interleukin-10. *Immunology* **96**:389-395.
330. **Vrese, M., P. Rautenberg, C. Laue, M. Koopmans, T. Herremans, and J. Schrezenmeir.**

2004. Probiotic bacteria stimulate virus-specific neutralizing antibodies following a booster polio vaccination. *Eur J Nutr* **44**:406-413.
331. **Wall, T., K. Båth, R. A. Britton, H. Jonsson, J. Versalovic, and S. Roos.** 2007. The early response to acid shock in *Lactobacillus reuteri* involves the ClpL chaperone and a putative cell wall-altering esterase. *Appl Environ Microbiol* **73**:3924-3935.
332. **Walter, E., S. Janich, B. J. Roessler, J. M. Hilfinger, and G. L. Amidon.** 1996. HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an in vitro model for the intestinal epithelium: *in vitro-in vivo* correlation with permeability data from rats and humans. *J Pharm Sci* **85**:1070-1076.
333. **Walter, J., P. Chagnaud, G. W. Tannock, D. M. Loach, F. Dal Bello, H. F. Jenkinson, W. P. Hammes, and C. Hertel.** 2005. A high-molecular-mass surface protein (Lsp) and methionine sulfoxide reductase B (MsrB) contribute to the ecological performance of *Lactobacillus reuteri* in the murine gut. *Appl Environ Microbiol* **71**:979-986.
334. **Walter, J., N. C. K. Heng, W. P. Hammes, D. M. Loach, G. W. Tannock, and C. Hertel.** 2003. Identification of *Lactobacillus reuteri* genes specifically induced in the mouse gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* **69**:2044-2051.
335. **Walter, J., D. M. Loach, M. Alqumber, C. Rockel, C. Hermann, M. Pfitzenmaier, and G. W. Tannock.** 2007. D-alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus reuteri* 100-23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Environ Microbiol* **9**:1750-1760.
336. **Walter, J., C. Schwab, D. M. Loach, M. G. Gänzle, and G. W. Tannock.** 2008. Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Microbiology* **154**:72-80.
337. **Walters, M., M. P. Sircili, and V. Sperandio.** 2006. AI-3 Synthesis Is Not Dependent on luxS in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**:5668-5681.
338. **Wang, X., X. He, Z. Jiang, J. Wang, X. Chen, D. Liu, F. Wang, Y. Guo, J. Zhao, F. Liu, L. Huang, and J. Yuan.** 2010. Proteomic analysis of the *Enterococcus faecalis* V583 strain and clinical isolate V309 under vancomycin treatment. *J Proteome Res* **9**:1772-1785.
339. **Weichselbaum, E.** 2009. Probiotics and health: a review of the evidence. *Nutr Bull* **34**:340-373.
340. **West, C. E., L. Gothefors, M. Granström, H. Käyhty, M.-L. K. C. Hammarström, and O. Hernell.** 2008. Effects of feeding probiotics during weaning on infections and antibody responses to diphtheria, tetanus and Hib vaccines. *Pediatr Allergy Immunol* **19**:53-60.
341. **Whitehead, K., J. Versalovic, S. Roos, and R. A. Britton.** 2008. Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. *Appl Environ Microbiol* **74**:1812-1819.
342. **Winzer, K., K. R. Hardie, and P. Williams.** 2003. LuxS and autoinducer-2: their contribution to quorum sensing and metabolism in bacteria. *Adv Appl Microbiol* **53**:291-396.
343. **Wolfe, A. J.** 2005. The Acetate Switch. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**:12-50.
344. **Wu, R., Z. Sun, J. Wu, H. Meng, and H. Zhang.** 2010. Effect of bile salts stress on protein synthesis of *Lactobacillus casei* Zhang revealed by 2-dimensional gel electrophoresis. *J Dairy Sci* **93**:3858-3868.
345. **Yan, F., H. Cao, T. L. Cover, R. Whitehead, M. K. Washington, and D. B. Polk.** 2007. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology* **132**:562-575.
346. **Yang, D., A. Biragyn, D. M. Hoover, J. Lubkowski, and J. J. Oppenheim.** 2004. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol* **22**:181-215.

347. **Yang, F., J. Wang, X. Li, T. Ying, S. Qiao, D. Li, and G. Wu.** 2007. 2-DE and MS analysis of interactions between *Lactobacillus fermentum* I5007 and intestinal epithelial cells. *Electrophoresis* **28**:4330-4339.
348. **Yasuda, E., M. Serata, and T. Sako.** 2008. Suppressive effect on activation of macrophages by *Lactobacillus casei* strain Shirota genes determining the synthesis of cell wall-associated polysaccharides. *Appl Environ Microbiol* **74**:4746-4755.
349. **Yasui, K., Y. Kano, K. Tanaka, K. Watanabe, M. Shimizu-Kadota, H. Yoshikawa, and T. Suzuki.** 2009. Improvement of bacterial transformation efficiency using plasmid artificial modification. *Nucl Acids Res* **37**:e3.
350. **Young, S. L., M. A. Simon, M. A. Baird, G. W. Tannock, R. Bibiloni, K. Spencely, J. M. Lane, P. Fitzharris, J. Crane, I. Town, E. Addo-Yobo, C. S. Murray, and A. Woodcock.** 2004. Bifidobacterial species differentially affect expression of cell surface markers and cytokines of dendritic cells harvested from cord blood. *Clin Diagn Lab Immunol* **11**:686-690.
351. **Yuki, N., K. Watanabe, A. Mike, Y. Tagami, R. Tanaka, M. Ohwaki, and M. Morotomi.** 1999. Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract: Selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies. *Int J Food Microbiol* **48**:51-57.
352. **Yusuf, S., S. Hawken, S. Ounpuu, T. Dans, A. Avezum, F. Lanas, M. McQueen, A. Budaj, P. Pais, J. Varigos, and L. Lisheng.** 2004. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* **364**:937-952.
353. **Zanotti, G., E. Papinutto, W. Dundon, R. Battistutta, M. Seveso, G. Giudice, R. Rappuoli, and C. Montecucco.** 2002. Structure of the neutrophil-activating protein from *Helicobacter pylori*. *J Mol Biol* **323**:125-130.
354. **Zeng, X. Q., D. D. Pan, and Y. X. Guo.** 2010. The probiotic properties of *Lactobacillus buchneri* P2. *J Appl Microbiol* **108**:2059-2066.

PUBLICATION 1

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance

Erwann Hamon^{1,2}, Peter Horvatovich³, Esther Izquierdo¹, Françoise Bringel⁴, Eric Marchioni¹, Dalal Aoudé-Werner² and Saïd Ennahar^{1*}

Abstract

Background: Lactic acid bacteria are commonly marketed as probiotics based on their putative or proven health-promoting effects. These effects are known to be strain specific but the underlying molecular mechanisms remain poorly understood. Therefore, unravelling the determinants behind probiotic features is of particular interest since it would help select strains that stand the best chance of success in clinical trials. Bile tolerance is one of the most crucial properties as it determines the ability of bacteria to survive in the small intestine, and consequently their capacity to play their functional role as probiotics. In this context, the objective of this study was to investigate the natural protein diversity within the *Lactobacillus plantarum* species with relation to bile tolerance, using comparative proteomics.

Results: Bile tolerance properties of nine *L. plantarum* strains were studied *in vitro*. Three of them presenting different bile tolerance levels were selected for comparative proteomic analysis: *L. plantarum* 299 V (resistant), *L. plantarum* LC 804 (intermediate) and *L. plantarum* LC 56 (sensitive). Qualitative and quantitative differences in proteomes were analyzed using two-dimensional electrophoresis (2-DE), tryptic digestion, liquid chromatography-mass spectrometry analysis and database search for protein identification. Among the proteins correlated with differences in the 2-DE patterns of the bacterial strains, 15 have previously been reported to be involved in bile tolerance processes. The effect of a bile exposure on these patterns was investigated, which led to the identification of six proteins that may be key in the bile salt response and adaptation in *L. plantarum*: two glutathione reductases involved in protection against oxidative injury caused by bile salts, a cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase implicated in maintenance of cell envelope integrity, a bile salt hydrolase, an ABC transporter and a F₀F₁-ATP synthase which participate in the active removal of bile-related stress factors.

Conclusions: These results showed that comparative proteomic analysis can help understand the differential bacterial properties of lactobacilli. In the field of probiotic studies, characteristic proteomic profiles can be identified for individual properties that may serve as bacterial biomarkers for the preliminary selection of strains with the best probiotic potential.

Background

Research efforts are currently underway in order to better understand the host-microbe interactions that occur in the human gastrointestinal (GI) tract [1,2]. Evidence suggests that the upset of the GI microflora balance underlies many diseases and that therapies often start

with the restoration of a healthy balance [3]. In this respect, probiotics (*i.e.* “live organisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host” [4]) are gaining widespread recognition as new prevention strategies or therapies for multiple GI diseases [5].

Lactic acid bacteria (LAB) are indigenous inhabitants of the human GI tract [6]. They also have a long history of traditional use in many industrial and artisanal plant, meat, and dairy fermentations. Based on their putative

* Correspondence: ennahar@unistra.fr

¹Equipe de Chimie Analytique des Molécules Bio-Actives, IPHC-DSA, Université de Strasbourg, CNRS, 67400, Illkirch, France
Full list of author information is available at the end of the article

or proven health-promoting effects, these bacteria are commonly marketed as probiotics [7]. Some LAB strains have clearly been shown to exert beneficial health effects [8]. However, these effects are known to be strain specific [9], and the underlying molecular mechanisms remain poorly understood [10]. The level of evidence provided varies greatly depending on studies, and effects associated with most of the marketed products remain unsubstantiated. Current legislations agree to call for scientific substantiation of health claims associated with foods, mainly through well-designed human intervention clinical studies [11]. Therefore, scientific evidence that would help understand the mechanisms behind the activities of probiotics and narrow down the expensive and time-consuming clinical trials to strains that stand the best chance of success are of great interest. Such evidence may include data from epidemiological studies, from *in vivo* and *in vitro* trials, as well as from mechanistic, genomic and proteomic studies.

Proteomics plays a pivotal role in linking the genome and the transcriptome to potential biological functions. As far as probiotics are concerned, comparative proteomics can be used in the identification of proteins and proteomic patterns that may one day serve as bacterial biomarkers for probiotic features [12]. Comparison of differentially expressed proteins within the same strain in different conditions have been performed, shedding light on bacterial adaptation factors to GI tract conditions, such as bile [13-16], acidic pH [18,19], and adhesion to the gut mucosa [20,21]. On the other hand, 2-DE coupled with mass spectrometry (MS) has been used to analyze bacterial protein polymorphisms and to distinguish between closely related pathogenic organisms [22-25], but this approach has rarely been employed to compare strains based on their probiotic features. We previously reported the first study of this kind which highlighted key proteins involved in the adhesion properties of *Lactobacillus plantarum* to mucin [12]. Recently, hydrophobicity and cell agglutination properties in *Bifidobacterium longum* were investigated through the protein patterns of four strains [26]. Both studies focused on cell surface properties related to adhesion. To our knowledge, proteomics has not been used to compare intra-species strains as regards other GI tract adaptation factors.

Yet, the ability to survive exposure to bile is one of the commonly used criteria to select potential probiotic strains, since bile is a major challenge for bacteria entering the GI tract [4]. In addition to affecting membrane characteristics, bile has numerous other effects on bacterial cells including detergent action, DNA damage, acid, oxidative and osmotic stresses [27]. Thus, when it comes to the study of bile stress, the overall bile, oxidative, acid, detergent and salt (BOADS) stresses should

be taken into account. Although mechanisms of survival to bile stress are not fully understood, several genes and molecules involved in this process have been identified in lactobacilli [28].

The latter remain the most prominent group of probiotic bacteria, despite the increasing use of other genera such as bifidobacteria. Widely studied with regard to numerous properties, they represent a suitable bacterial model. Among the most common species, *L. plantarum* is part of a number of ethnic as well as commercial probiotic preparations where it has a long history of safe use [29]. In addition, it is an important member of the GI tract microbiota and is a flexible and versatile species with one of the largest genomes known within LAB [30].

The present paper investigates the natural protein diversity within the *L. plantarum* species with relation to bile tolerance and subsequent ability to resist GI tract conditions. This investigation is based on the study of the proteomic profiles of three *L. plantarum* strains selected according to their *in vitro* bile tolerance properties.

Results

In this study, three strains showing different levels of bile tolerance ability *in vitro* were chosen out of nine *L. plantarum* subsp. *plantarum* cultures (Table 1). The selected strains were cultured in non-stressing conditions so as to investigate their inherent proteome differences, with a specific focus on proteins that may play a role in bile tolerance processes. In addition, changes in protein expression during bile salt exposure were analyzed in order to assess the effective involvement of the proteins of interest in the bile stress response of the three strains.

Bile salt tolerance

L. plantarum strains were exposed to bile stress using increasing Oxgall concentrations. The effects of 0.5%,

Table 1 Sources of bacterial strains

Bacterial strain ^a	Provider	Origin
LC 56	Aerial ^b	Corn silage
LC 660	Aerial ^b	Grass silage
WHE 92	Aerial ^b	Munster cheese
LC 800	Aerial ^b	Horseradish
LC 804	Aerial ^b	Olives
CECT 748 ^T	CECT ^c	Pickled cabbage
CECT 749	CECT ^c	Pickled cabbage
CECT 4185	CECT ^c	Silage of vegetable matter
299 V	Probi ^d	Human intestinal mucosa

a) Identification based on PCR amplification targeting the *recA* gene [51].

b) Aerial, Illkirch, France.

c) Spanish Type Culture Collection, Valencia, Spain.

d) Probi, Lund, Sweden.

1.0%, 1.8% and 3.6% Oxgall (w/v) on the maximum growth rates were investigated (Table 2). Two-way analysis of variance (ANOVA) revealed significant effects of both the bile concentration and the strain ($p < 0.05$). A stepwise increase in the Oxgall concentration resulted in a gradual decrease in the maximal growth rate for all strains except *L. plantarum* CECT 748^T and CECT 749 ($p < 0.05$). Strains could be assigned to three groups according to their bile sensitivity. *L. plantarum* 299 V and LC 660 showed the best ability to grow in Oxgall-supplemented culture broth with relative growth rates that ranged from 85.5 ± 3.0 to $97.1 \pm 1.4\%$, as compared to standard conditions. *L. plantarum* LC 56 was the most sensitive strain to bile salts, with relative growth rates from 19.9 ± 3.7 to $58.2 \pm 0.5\%$. The six other strains tested were moderately bile tolerant and had relative growth rates in the range of 66.8 ± 2.5 to $81.7 \pm 1.0\%$. *L. plantarum* LC 56 (highest decrease in growth rate), *L. plantarum* LC 804 (intermediate decrease in growth rate) and *L. plantarum* 299 V (smallest decrease in growth rate) were used for comparative proteomic analysis in standard conditions and following bile salt exposure.

Comparative proteomic analysis of *L. plantarum* strains in standard growth conditions

L. plantarum LC 56, LC 804 and 299 V were cultured under non-stressing conditions and cell proteins were extracted. Protein loads of 150 μ g representing total proteomes of each of the three strains were separated by 2-DE. Three independent biological replicates were carried out per strain. Figure 1(A-C) shows representative

2-DE patterns for the three strains when cultured in standard conditions. Inter-strain discrepancies between inherent proteomic patterns were investigated with regard to the different bile tolerance abilities of the strains, so as to pinpoint proteins that may be implicated in the bile tolerance process.

Although the overall inherent protein patterns of the three *L. plantarum* strains were similar, 90 out of an average of 400 detected protein spots displayed different abundance levels in standard conditions (Additional file 1). The corresponding gel spots were excised and subjected to tryptic digestion followed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis and proteomic database search using Phenix and OMSSA to elucidate their identity and likely function. Proteins in a total of 80 spots were identified, some of which were found in more than one spot, indicating the presence of protein isoforms. Proteins fell into 13 functional categories, covering most of the biochemical functions encountered in bacterial cells. Sequence alignment analysis focused on the three sequenced *L. plantarum* strains WCFS1, JDM1 and ATCC 14917 revealed a systematic occurrence of the corresponding genes with high levels of similarity ($> 98\%$, results not shown).

Among the proteins with differential abundance levels between strains that were identified in non-stressing conditions, 15 have previously been reported to be involved in BOADS stress tolerance processes (Table 3): (i) five proteins (α -small heat shock protein 1 (Hsp1), spot 1; bile salt hydrolase 1 (Bsh1), spot 11; glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (Gpd), spot 26; GroEL chaperonin (GroEL), spot 76; F0F1 ATP synthase subunit δ (AtpH), spot 90) were exclusively detected or significantly more abundant ($p < 0.05$) in the resistant strain (299 V); (ii) three proteins (glycine/betaine/carnitine/choline ABC transporter (OpuA), spot 18; glutathione reductase 1 (GshR1), spot 24; and ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, spot 77) were present at the same level in both resistant and intermediate strains (299 V and LC 804), but not observed in the sensitive strain (LC 56); (iii) two proteins (α -small heat shock protein 3 (Hsp3), spot 4; and bifunctional GMP synthase (GuaA), spot 80) were present solely or to a higher extent in the intermediate strain; (iv) one protein (glutathione reductase 4 (GshR4), spot 19) showed the same expression level in the resistant and sensitive strains, while it was barely detected in the intermediate strain; (v) two proteins (stress-induced DNA binding protein (Dps), spots 34 and 41; cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase (Cfa2), spots 64 and 72) displayed different expression levels between strains depending on the considered isoform; and (vi) two proteins (dTDP-4-

Table 2 Effect of bovine bile concentration on the relative growth rates of *L. plantarum* strains

Strains	Relative growth rate* (% μ) with Oxgall concentrations (% [w/v])				
	Control	0.5	1.0	1.8	3.6
299 V	100	97.1 ± 1.4^a	96.3 ± 1.2^a	93.5 ± 2.9^a	91.2 ± 2.3^a
LC 660	100	93.9 ± 0.8^a	94.2 ± 2.0^a	89.6 ± 1.7^a	85.5 ± 3.0^b
CECT 748	100	81.7 ± 1.0^b	80.3 ± 0.6^b	80.5 ± 1.8^b	79.1 ± 0.9^c
CECT 4185	100	78.5 ± 2.2^b	78.3 ± 0.7^b	74.5 ± 2.6^c	71.6 ± 2.1^d
WHE 92	100	79.1 ± 2.4^b	76.2 ± 1.1^c	72.3 ± 4.3^c	66.9 ± 0.5^d
LC 804	100	76.2 ± 1.7^c	76.6 ± 0.9^c	72.8 ± 1.3^c	68.4 ± 1.5^e
LC 800	100	74.1 ± 3.6^d	67.9 ± 1.6^d	66.3 ± 2.0^d	66.5 ± 1.6^e
CECT 749	100	69.6 ± 1.9^e	68.9 ± 3.2^d	68.1 ± 1.4^d	66.8 ± 2.4^e
LC 56	100	58.2 ± 0.5^f	45.5 ± 2.5^e	39.4 ± 1.4^e	19.9 ± 3.7^f

*Data are expressed as a percentage of the growth rate (h^{-1}) obtained in the absence of bile, which was assigned a value of 100%. Means \pm standard deviations of three independent experiments with three replicates per assay are given. Means in the same column with different letters (a through f) differ ($p < 0.05$).

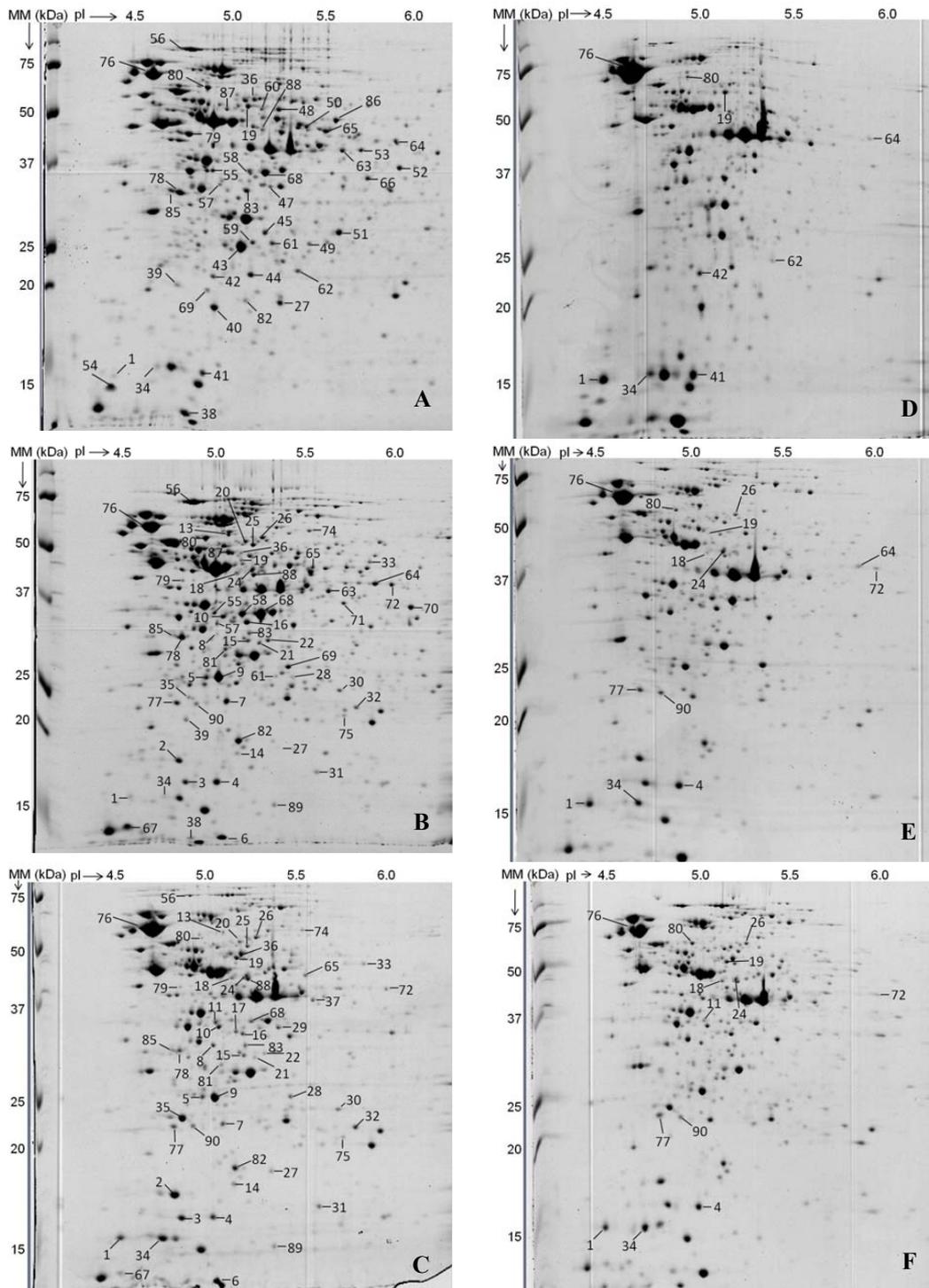


Figure 1 2-DE gels of whole cell proteomes from *L. plantarum* LC 56, LC 804 and 299 V cultured in standard and bile-stressing conditions. The figure shows representative 2-DE gel pictures (pH range: 4-7) of whole-cell protein lysates from early stationary phase of *L. plantarum* LC 56 (A and D), LC 804 (B and E), and 299 V (C and F) cultured without (A-C) and with (D-F) 3.6% (w/v) Oxgall. Spots exhibiting differential expression between strains in standard growth conditions and identified by LC-MS analysis are labeled (A-C), with a focus on expression changes after bile exposure for proteins previously reported as being involved in bile tolerance processes (D-F).

Table 3 Impact of a 3.6%-Oxgall exposure on specific proteomic patterns putatively related to bile tolerance

Functional category	Protein	Stress ^{a)}	Gene ^{b)}	Spot number	Normalized volume with 3.6% Oxgall ^{c)}			Variation factor: bile vs. standard conditions ^{d)}		
					LC 56	LC 804	299 V	LC 56	LC 804	299 V
Translation, ribosomal structure and biogenesis	Ribosomal protein S30EA	B [14]	lp_0737	62	0.049 ± 0.004	-	-	-3.2	-	-
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	α-Small heat shock protein	O [55]	lp_0129 (<i>hsp1</i>)	1	0.952 ± 0.059	1.008 ± 0.190	0.597 ± 0.082	34	11.4	2.1
			lp_3352 (<i>hsp3</i>)	4	-	1.172 ± 0.159	0.744 ± 0.171	-	1.7	2.2
	Chaperonin GroEL	B [14]	lp_0728 (<i>groEL</i>)	76	27.427 ± 1.216	14.137 ± 0.142	11.931 ± 0.715	3.7	1.9	-1.1*
Energy production and conversion	ATP-dependent Clp protease	D [56]	lp_0786 (<i>clpP</i>)	77	-	0.360 ± 0.072	0.282 ± 0.020	-	2.0	1.7
	FOF1 ATP synthase subunit delta	B [44]	lp_2367	90	-	0.243 ± 0.051	0.110 ± 0.012	-	4.3	1.2*
			Glutathione reductase	O [57]	lp_3267 (<i>gshR4</i>)	19	0.179 ± 0.023	0.011 ± 0.001	0.210 ± 0.008	-1.8
				lp_0369 (<i>gshR1</i>)	24	-	0.314 ± 0.025	0.148 ± 0.009	-	1.1*
Carbohydrate transport and metabolism	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	B [14], O [58]	lp_2681 (<i>gpd</i>)	26	-	0.098 ± 0.005	0.116 ± 0.025	-	-1.2*	-1.4
Amino-acid transport and metabolism	Glycine/betaine/carnitine/choline ABC transporter	B [48], S [58]	lp_1607 (<i>opuA</i>)	18	-	0.034 ± 0.003	0.081 ± 0.007	-	-1.6	1.5
Nucleotide transport and metabolism	Bifunctional GMP synthase/glutamine amidotransferase protein	A [35]	lp_0914 (<i>guaA</i>)	80	0.039 ± 0.003	0.104 ± 0.009	0.209 ± 0.016	-7.6	-1.8	12.5
Inorganic ion transport and metabolism	Stress-induced DNA binding protein	O [59]	lp_3128 (<i>dps</i>)	34	0.278 ± 0.026	0.074 ± 0.003	1.212 ± 0.124	2.6	2.0	1.0*
				41	0.957 ± 0.077	-	-	2.5	-	-
Cell wall/membrane/envelope biogenesis	Bile salt hydrolase	B [49]	lp_3536 (<i>bsh1</i>)	11	-	-	0.061 ± 0.008	-	-	-2.6
				dTDP-4-Dehydro-rhamnose 3,5-epimerase	O, D [60]	lp_1188 (<i>rfbC</i>)	42	0.151 ± 0.010	-	-
	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	A [42,43]	lp_3174 (<i>cfa2</i>)	64	0.0312 ± 0.002	0.069 ± 0.007	-	-6.9	-2.5	-
				72	-	0.046 ± 0.004	0.052 ± 0.001	-	-2.6	1.0*

a) Reported implication of the protein in bile (B), oxidative (O), acid (A), detergent (D) and/or salt (S) stress tolerance with the corresponding references.

b) Gene accession number in the NCBI database for *L. plantarum* WCFS1 with the general symbol of the gene in brackets.

c) Normalized relative volumes, expressed as a percentage of total valid spots. Values are means ± standard deviations; n ≥ 3 for each strain. -, not detected.

d) r = volume with bile salt/volume without bile salt for the considered strain. When r > 1, variation factor = r. When r < 1, variation factor = -1/r.

* means of volumes with and without Oxgall are not statistically different (Student's t test for paired samples, p < 0.05).

These patterns gather differentially expressed proteins in standard growth conditions among *L. plantarum* LC 56, LC 804, and 299 V that have previously been reported to be involved in BOADS stress tolerance based on dedicated mutant analysis. The impact of exposure to bile is assessed through protein expression comparison for early stationary cells cultured with and without Oxgall, using normalized relative volumes. Normalized volumes in standard conditions are listed in Additional file 1.

dehydrorhamnose 3,5-epimerase (RfbC), spot 42; and ribosomal protein S30EA, spot 62) were only detected in the sensitive strain. These 15 proteins belonged to 8 functional categories, including cell membrane biogenesis, molecular transport, energy metabolism, as well as chaperone activity.

Bile influence on expression levels of proteins reportedly involved in bile tolerance

Cells were cultured in stressing conditions using 3.6% Oxgall for 14 h (strain 299 V), 16 h (strain LC 804) and 20 h (strain LC 56), which allowed the harvesting of all cells at the early-stationary phase, as in non-stimulating conditions (data not shown). As protein expression is growth-phase dependent, having cells in a comparable physiological state was in fact key in this investigation. Analysis of changes in protein expression during bile salt exposure was focused on the 15 proteins previously reported to play a role in BOADS stress tolerance. Figure 1(D-F) illustrates representative 2-DE patterns for the three strains when cultured with 3.6% Oxgall. While these patterns looked similar to each other, they were quite different from those obtained in standard conditions, suggesting quantitative changes for most of the protein spots observed. Table 3 reports changes in spot intensities between standard and bile stress conditions for the 15 proteins of interest in this study. Thirteen out of the 15 proteins linked to BOADS stress tolerance in previous studies appeared to respond to the presence of bile (absolute value of fold-change factor $r > 1.5$, as previously described [14]), suggesting a direct involvement of these proteins in the bile tolerance process of the studied *L. plantarum* strains. These proteins could be divided into three groups. Three proteins showed higher expression levels in stressing conditions: Hsp1, spot 1 ($2.1 \leq r \leq 34$); Hsp3, spot 4 ($1.7 \leq r \leq 2.2$); and ClpP, spot 77 ($1.7 \leq r \leq 2.0$). Conversely, two other proteins were repressed when challenged with Oxgall: Bsh1, spot 11 ($r = -2.6$); and ribosomal protein S30EA, spot 62 ($r = -3.2$). The third group includes eight proteins with modifications in expression levels that depended on strains (OpuA, spot 18; GshR4, spot 19; GshR1, spot 24; GroEL, spot 76; GuaA, spot 80; and AtpH, spot 90) or resulted in a different expression of protein isoforms (Dps, spots 34 and 41; Cfa2, spots 64 and 72). The expression levels of two proteins (Gpd, spot 26; and RfbC, spot 42) however were not impacted following exposure to 3.6% Oxgall (absolute value of variation factor $r \leq 1.5$), suggesting a minor role for these in the bile tolerance process of the considered *L. plantarum* strains.

Discussion

This paper reports the application of 2-DE and MS analysis to investigate LAB proteins that are key in the bile

tolerance process, a major factor when it comes to probiotics adaptation to the GI tract. Although 2-DE has known limitations and only explores part of bacterial proteomes as compared to other gel-less analyses [31], it is a widely used and affordable technique which proved to be valuable in discriminating strains according to their bacterial features [22-25]. With regard to probiotic research, two previous studies used a similar approach to explore adhesion properties of *L. plantarum* [12] and *B. longum* [26]. However, this is the first time that an attempt is made towards getting a broad picture of bile tolerance at the species level rather than focusing on a single strain.

L. plantarum, a versatile species with marketed probiotic strains, was chosen as a model for this study. An *in vitro* test was used to assess bile tolerance of nine strains, including *L. plantarum* 299 V, a probiotic with outstanding bile resistance properties [32]. These properties were confirmed in our study, as this strain showed the best ability to grow in bile supplemented culture broths. Considerable variations in growth rates were observed between strains, with the highest effect of bile on *L. plantarum* LC 56, which is in accordance with previous reports showing a strain-specific behavior of LAB with regard to bile tolerance [33,34]. Strains LC 56 (weak bile tolerance), LC 804 (intermediate bile tolerance) and 299 V (strong bile tolerance) were selected for the proteomic investigation. For that purpose, we focused on the whole cell proteomes, since the ability of an organism to tolerate bile may require a wide array of proteins implicated in either membrane- or cytosol-based functions and mechanisms [27].

The differentially expressed proteins among the three selected strains cultured in standard conditions all appeared to be encoded by highly conserved genes in the *L. plantarum* species. These core-genome proteins are of great interest in the search for bacterial biomarkers as their relative abundance is likely to be assessed for any *L. plantarum* strain. In our case, 10 proteins displayed increasing levels of expression from the sensitive strain (LC 56) to the resistant one (299 V), suggesting a positive correlation of these proteins with bile resistance. Conversely, 4 proteins showed decreasing levels of expression as the considered strain was more tolerant to bile, indicating a link with bile sensitivity. Therefore, these proteins might represent potential biomarker candidates of bile tolerance in *L. plantarum* and should be further studied, especially the ones with unknown functions (protein of unknown function lp_2652, spot 31; putative alkaline shock proteins 1 and 2, spots 3 and 2 respectively).

Particular interest was in differentially expressed proteins with a reported putative involvement, not specifically in bile tolerance, but in the overall BOADS stress

tolerance, since the deleterious effects of bile not only include a detergent action, but also low-pH, oxidative and osmotic stresses [27]. This led to the identification of 15 proteins likely to be implicated in bile tolerance of the selected strains. Two of these proteins (GuaA and ribosomal protein S30EA) have previously been negatively correlated to constitutive acid [35] and bile [14] tolerance, respectively, suggesting they could impart bacterial sensitivity to these stress factors. Interestingly, they were not detected (ribosomal protein S30EA) or naturally underexpressed (GuaA) in the resistant strain. On the other hand, the 13 remaining proteins have been linked to BOADS stress resistance in previous studies. Ten of them were overexpressed in the resistant or intermediate strains, while only one of them displayed higher expression levels in the bile sensitive strain. These results showed that the natural protein diversity observed among *L. plantarum* strains cultured in standard conditions can reflect their ability to tolerate bile. The more resistant a strain is to bile, the more it naturally expresses proteins that can help in the bile resistance process, but also the less it produces proteins that may impart sensitivity to this stress. These proteins could therefore constitute an inherent and characteristic proteomic profile that is indicative of bile tolerance.

To confirm the putative involvement of the 15 proteins of interest in the bile tolerance process and get an overview on how bile salts affect their levels of expression, proteomic analysis of strains response to bile exposure was performed. Thirteen proteins appeared to be directly implicated in bile stress adaptation, since their expression was significantly affected by exposure to bile salt ($p < 0.05$). Five of them (ClpP, Dps, GroEL, Hsp1, and Hsp3) are general stress-response proteins involved in repair and protection of proteins and DNA. They were up-regulated in response to bile challenge, which is in accordance with previous findings [14,16,36-38]. This set of proteins intervenes in numerous stress-management response systems, suggesting they have unspecific contributions to bile stress tolerance, which may result in multifaceted stress-dependent mechanisms of action, as this was recently reviewed for Dps [39]. Two other proteins (GuaA and ribosomal protein S30EA) are part of regulatory systems modulating protein translation during environmental stresses. GuaA, involved in guanine nucleotide metabolism, indirectly governs intracellular GTP level responsible for translation efficiency [35], while ribosomal protein S30EA limits protein synthesis by reducing translation initiation [40]. Both proteins were down-regulated in the sensitive strain following bile exposure, which is consistent with previous studies [14,38]. All in all, 7 out of the 13 proteins directly involved in bile tolerance of the three-selected *L. plantarum* strains were not dedicated to one of the

damaging effects of bile, but covered a wide range of environmental stresses instead.

In contrast, other factors contribute in a specific way to bile tolerance. This is the case of GshR1 and GshR4 which help protect the cell against oxidative injury [41]. This coincides with the lower global levels of glutathione reductases in the sensitive strain in both standard and stimulating conditions found in our study. Another protein, the Cfa2, catalyzes the cyclopropane ring formation in phospholipid biosynthesis, which may help maintain integrity of the cell envelope. In *Escherichia coli*, the cytoplasmic membrane of a *cfa*-mutant displayed increased overall permeability to protons compared to the native strain [42]. This could for instance explain the higher acid sensitivity of a *cfa*-mutant of *L. acidophilus* NCFM [43]. In our study, a Cfa2 isoform was absent in the sensitive strain, while another isoform was not detected in the resistant one, suggesting different functional properties of the isoforms with regard to bile tolerance.

Another specific mechanism of bile adaptation is the active removal of bile-related stress factors. Such is the case of the F0F1-ATP synthases which facilitate the extrusion of protons from the cytoplasm by proton motive force [28]. Previous findings reported that a bile-adapted *B. animalis* strain was able to tolerate bile by inducing proton pumping by a F0F1-ATP synthase, therefore tightly regulating the internal pH [44]. In our study, a representative F0F1-ATP synthase, AtpH, was absent in the weak strain and was up-regulated in the intermediate strain, which is consistent with the up-regulation of the corresponding gene reported for *L. plantarum* WCFS1 when exposed to porcine bile [45]. ABC transporters are also a major part of the efflux systems involved in the transport of harmful-compounds and cell detoxification [46]. A representative ABC transporter, OpuA, was more abundant in the resistant strain, less abundant in the intermediate one, and not detected in the sensitive one. This protein is known to be implied in the *L. plantarum* response to osmotic stress, one of the numerous deleterious effects of bile [47]. In addition, deletion of an *opuA* gene in *Listeria monocytogenes* was shown to significantly increase bacterial sensitivity to physiological concentrations of human bile [48]. This protein is therefore likely to be a key determinant of the high bile resistance of strain 299 V.

When it comes to bile tolerance, Bsh is probably what first comes to mind, since it involves the direct hydrolysis of bile salts. Although the ecological significance of microbial Bsh activity is not yet fully understood, the suggestion was made that it may play a major detoxification role [27]. *L. plantarum* strains carry four *bsh* genes (*bsh1* to *bsh4*). *Bsh2*, *bsh3* and *bsh4* are highly conserved among *L. plantarum* species, while *bsh1* is not and seems

to be the major determinant of the global Bsh activity of *L. plantarum* strains. Besides, a *bsh1*-mutant of *L. plantarum* WCFS1 displayed a decreased tolerance to glycine-conjugated bile salts [49]. In our study, a Bsh1 homologue could only be found in the most resistant strain in standard conditions, but its amount decreased following the strain's exposure to bile. This result contrasts with the *bsh1* gene up-regulation in *L. plantarum* WCFS1 following bile challenge [45]. Strains from *L. acidophilus* and *L. salivarius* on the other hand did not seem to up-regulate their Bsh1 production following bile exposure [38,50]. Such discrepancy in regulation trends of *bsh* genes suggests that, depending on the considered strains and species, Bsh activity may or may not be a major determinant of bile resistance.

Finally, it appeared that the six bile tolerance factors described above may contribute in various ways to the bile tolerance of *L. plantarum* strains. In particular, strains appeared to regulate key proteins differently following exposure to bile, which suggests that several strategies coexist in the bile adaptation process of *L. plantarum* species, some strains favoring certain specific pathways, while others downplaying them.

Conclusions

This work used comparative and functional proteomics to analyze cell-free protein extracts from three *L. plantarum* strains with different bile resistance properties. This approach showed that the natural protein diversity among *L. plantarum* strains cultured in standard conditions can reflect their ability to tolerate bile. The results provided an overview of proteomic patterns related to bile tolerance, and showed a clear effect of bile salts on the level of expression of certain proteins within these patterns. Particularly, 13 out of the 15 proteins of interest were shown to be directly involved in the bile tolerance of *L. plantarum*, six of which could be part of specific bile adaptation pathways, including protection against oxidative stress (GshR1 and GshR4), maintenance of cell envelope integrity (Cfa2), and active removal of bile-related stress factors (Bsh1, OpuA, and AtpH). Also, analysis of changes in protein expression gave insight into the way the different strains use these pathways for their survival, suggesting complex, strain-specific and probably conflicting molecular mechanisms in the cell's adaptation strategy to bile.

Finally, this study showed that comparative proteomic analysis can help understand the differential bacterial properties of LAB. In the field of probiotic studies, characteristic proteomic profiles can be identified for individual properties which may serve as bacterial biomarkers for the preliminary selection of strains with the best probiotic potential. This would certainly increase the chances of success of clinical trials through a more focused approach.

Methods

Strain characterization and standard culture conditions

Lactobacillus strains used in this study were identified at the species level by *recA* PCR (data not shown) [51]. All cultures were maintained as frozen stocks held at -80°C in Cryobank cryogenic beads (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For experimental use, strains were cultured anaerobically (Anaerocult A system, Merck, Darmstadt, Germany) at 37°C in Man-Rogosa-Sharpe broth (Biokar, Beauvais, France) supplemented with 0.05% (w/v) L-cysteine hydrochloride monohydrate (MRSC; Merck) to early stationary phase, using three successive subcultures (1% v/v inoculation; 12-15 h).

Bile salt tolerance

Tolerance to bile was assessed by investigating the ability of strains to grow in the presence of different concentrations of bovine bile (Oxgall, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), as previously described [52]. Fresh cultures were inoculated (0.1%, v/v) into MRSC broth containing 0.5%, 1.0%, 1.8%, and 3.6% (w/v) Oxgall and incubated anaerobically at 37°C. Bacterial growth was monitored in honeycomb plates (Oy Growth Curves AB, Helsinki, Finland) by measuring the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) every 30 min for 48 h using an automated turbidimetric system (Bioscreen C MBR, Oy Growth Curves AB). Three independent experiments were carried out and each assay was performed in triplicate. Comparison of cultures was based on their growth rates in each broth, expressed as a percentage of that of the control which was assigned a value of 100% [52]. Using Statgraphics plus 5.1 software (Manugistics, Rockville, MD, USA), data were subjected to two-way ANOVA with strain and bile concentration as variables. Multiple comparison test using least significant difference procedure was carried out to compare means for which the ANOVA test indicated significant mean differences ($p < 0.05$).

Whole cell protein extraction

The following experiments (including 2-DE) were performed for bacterial cells cultured in two different broths (MRSC and MRSC supplemented with 3.6% Oxgall). Early stationary phase cells from a 10-mL broth culture were harvested and washed three times with phosphate-buffered saline (PBS). Cell pellets were resuspended in 2 mL of PBS and cryobeads of these suspensions were prepared in liquid nitrogen. The bacterial beads were ground in liquid nitrogen using a cryogenic grinder (6870 Freezer/Mill, Spex CertiPrep, Stanmore, UK) with three steps of 3 min at a rate of 24 impacts/s. After sample centrifugation (5000 g for 5 min, 4°C), supernatants were filtered through a 0.45- μ m pore size filter (Chromafil PET; Macherey-Nagel, Düren, Germany). Protein purification was

carried out with Trizol reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France) as previously described [12]. Protein concentrations were determined using Bradford protein assay (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions.

2-DE

Protein extracts (150 µg) were loaded onto 17-cm strips with a pH range of 4 to 7 (Bio-Rad), focused for 60,000 V.h, and then separated on a 12% SDS-polyacrylamide gel as reported previously [12]. The gels were stained with Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad) and scanned on a GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad).

Image analysis

Image analysis of the 2-DE gels was performed using the PD Quest 8.0.1 software (Bio-Rad). Three gels were produced from independent cultures of each strain and only spots that were present on the three gels were selected for inter-strain comparison. Spot intensities were normalized to the sum of intensities of all valid spots in one gel. For analysis of changes in protein expression during bile salt exposure, a protein was considered to be under- or overproduced when changes in normalized spot intensities were of least 1.5-fold at a significance level of $p < 0.05$ (Student's *t* test for paired samples), as previously described [14]. Regarding proteome comparison between strains, proteins were considered differentially produced when spot intensities passed the threshold of a twofold difference (one-way ANOVA, p -value < 0.05), as described previously [12].

LC-MS analysis

Spots of interest were subjected to tryptic in-gel digestion and analyzed by chip-liquid chromatography-quadrupole time of flight (chip-LC-QTOF) using an Agilent G6510A QTOF mass spectrometer equipped with an Agilent 1200 Nano LC system and an Agilent HPLC Chip Cube, G4240A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), as described previously [12].

Briefly, one microliter of sample was injected using an injection loop of 8 µL, a loading flow rate of 3 µL/min for 4 min and a solvent made of ultra-pure water and acetonitrile (HPLC-S gradient grade, Biosolve, Valkenswaard, The Netherlands) (97/3 v/v) with 0.1% formic acid (98-100%, Merck). For the analytical elution, a 24 min gradient from 3 to 60% of acetonitrile in ultra-pure water with 0.1% formic acid was applied at a flow rate of 300 nL/min. ESI in positive mode with 1850 capillary voltage was used. The data were collected in centroid mode using extended dynamic range at mass range of m/z 200-2000 both in MS1 and MS/MS and using two method with different scanning speed: one slow with a scan rate of 1 spectra/s for both MS1 and MS/MS, and

one fast scan rate of 0.25 spectra/s for both MS1 and MS/MS. For data acquisition and data export, MassHunter version B.02.0.197.0 (Agilent Technologies) was used.

Protein identification

After data acquisition, files were uploaded to the in-house installed version of Phenyx (Geneva Bioinformatics, Geneva, Switzerland) for searching the NCBI nr (r. 20090608) database with the following criteria: taxonomy: bacteria; scoring model: ESI-QTOF; parent charge: +2, +3 (trust = medium); single round; methionine oxidation, cysteine carboxyamidomethylation (cysteine treated with iodoacetamide), and phosphorylation as partial modifications; trypsin as digestion enzyme; allowance of two missed cleavages; cleavage mode: normal; parent ion tolerance: 0.6 Da; peptide thresholds: length ≥ 6 , score threshold ≥ 5.0 , identification significance p -value $\leq 1.0E-4$, accession number score threshold 6.0, coverage threshold ≥ 0.2 , identified ion series: b; b++; y; y++; allowance of conflict resolution. A publicly available MS/MS search algorithm (Open Mass Spectrometry Search Algorithm, OMSSA, [53]) was used with the same search criteria as described above to confirm protein identities and limit the risk of false positives. On the basis of consensus scoring, only proteins recognized by both database search algorithms at a false positive rate of 5% were considered to be correctly identified [54].

Additional material

Additional file 1: Identification of differentially expressed protein spots among *L. plantarum* LC 56, LC 804 and 299 V in standard growth conditions. The table lists proteins with at least a twofold difference of expression (p -value < 0.05) between the three strains cultured in MRSC. Identification was achieved following excision of differentially expressed spots between gels, tryptic digestion of the corresponding proteins, analysis of the peptide solutions obtained with LC-MS, and proteomic database search. Scores result from proteomic database search using Phenyx.

Acknowledgements

This work was supported by the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche", and by the "Ministère de l'Agriculture et de la Pêche" through the "Unité Mixte Technologique 06.03: Méthodes analytiques et nutrimarqueurs".

Author details

¹Equipe de Chimie Analytique des Molécules Bio-Actives, IPHC-DISA, Université de Strasbourg, CNRS, 67400, Illkirch, France. ²Aérial, Parc d'Innovation, Illkirch-Graffenstaden, France. ³Department of Analytical Biochemistry, Centre for Pharmacy, University of Groningen, Groningen, The Netherlands. ⁴Laboratoire de Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie, Université de Strasbourg, CNRS, 67083, Strasbourg, France.

Authors' contributions

EH carried out strain characterization, bile tolerance assays, as well as proteomic experiments, and drafted the manuscript. PH performed LC-MS

analysis, participated in the protein identification, and helped write the manuscript. EI helped perform bile tolerance and proteomic experiments, data analysis and interpretation. FB participated in strain characterization and in revision of the manuscript. EH, EM, DAW, and SE conceived and designed the study. SE helped write the manuscript and revised it. All authors read and approved its final version.

Received: 15 October 2010 Accepted: 29 March 2011

Published: 29 March 2011

References

- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI: **The human microbiome project.** *Nature* 2007, **449**:804-810.
- Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI: **Host microbial mutualism in the human intestine.** *Science* 2005, **307**:1915-1920.
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Vaneechoutte M, Doerffel Y: **Active Crohn's disease and ulcerative colitis can be specifically diagnosed and monitored based on the biostructure of the fecal flora.** *Inflamm Bowel Dis* 2008, **14**:147-161.
- FAO/WHO: **Guidelines for the evaluation of probiotics in food.** London; 2002.
- Preidis GA, Versalovic J: **Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era.** *Gastroenterology* 2009, **136**:2015-2031.
- Reuter G: **The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession.** *Curr Issues Intest Microbiol* 2001, **2**:43-53.
- Bernardeau M, Guguen M, Vernoux JP: **Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments.** *FEMS Microbiol Rev* 2006, **30**:487-513.
- Weichselbaum E: **Probiotics and health: a review of the evidence.** *Nutr Bull* 2009, **34**:340-373.
- Senok AC, Ismaeel AY, Botta GA: **Probiotics: facts and myths.** *Clin Microbiol Infect* 2005, **11**:958-966.
- Oelschlaeger TA: **Mechanisms of probiotic actions - a review.** *Int J Med Microbiol* 2010, **300**:57-62.
- Grossklaus R: **Codex recommendations on the scientific basis of health claims.** *Eur J Nutr* 2009, **48**(Suppl 1):15-22.
- Izquierdo E, Horvatovich P, Marchioni E, Aoude-Werner D, Sanz Y, Ennahar S: **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.** *Electrophoresis* 2009, **30**:949-956.
- Sanchez B, Champomier-Verges MC, Anglade P, Baraige F, Reyes-Gavilan CGD, Margolles A, Zagorec M: **Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809.** *J Bacteriol* 2005, **187**:5799-5808.
- Sanchez B, Champomier-Verges MC, Stuer-Lauridsen B, Ruas-Madiedo P, Anglade P, Baraige F, Reyes-Gavilan CGD, Johansen E, Zagorec M, Margolles A: **Adaptation and response of *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* to bile: a proteomic and physiological approach.** *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**:6757-6767.
- Lee K, Lee HG, Choi YJ: **Proteomic analysis of the effect of bile salts on the intestinal and probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*.** *J Biotechnol* 2008, **137**:14-19.
- Leverrier P, Dimova D, Pichereau V, Auffray Y, Boyaval P, Jan GL: **Susceptibility and adaptive response to bile salts in *Propionibacterium freudenreichii*: physiological and proteomic analysis.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**:3809-3818.
- Sanchez B, Champomier-Verges MC, Collado MD, Anglade P, Baraige F, Sanz Y, Reyes-Gavilan CGD, Margolles A, Zagorec M: **Low-pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* biotype *longum*.** *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**:6450-6459.
- Lee K, Lee HG, Pi K, Choi YJ: **Effect of low pH on protein expression by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*.** *Proteomics* 2008, **8**:1624-1630.
- Lorca GL, de Valdez GF, Ljungh A: **Characterization of the protein synthesis dependent adaptive acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus*.** *J Mol Microbiol Biotechnol* 2002, **4**:525-532.
- Yang F, Wang JJ, Li XJ, Ying TY, Qiao SY, Li D, Wu G: **2-DE and MS analysis of interactions between *Lactobacillus fermentum* I5007 and intestinal epithelial cells.** *Electrophoresis* 2007, **28**:4330-4339.
- Beck HC, Madsen SM, Glenting J, Petersen J, Israelsen H, Norrelykke MR, Antonsson M, Hansen AM: **Proteomic analysis of cell surface-associated proteins from probiotic *Lactobacillus plantarum*.** *FEMS Microbiol Lett* 2009, **297**:61-66.
- Enroth H, Akerlund T, Sillen A, Engstrand L: **Clustering of clinical strains of *Helicobacter pylori* analyzed by two-dimensional gel electrophoresis.** *Clin Diagn Lab Immunol* 2000, **7**:301-306.
- Betts JC, Dodson P, Quan S, Lewis AP, Thomas PJ, Duncan K, McAdam RA: **Comparison of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv with clinical isolate CDC 1551.** *Microbiology* 2000, **146**:3205-3216.
- Duffes F, Jenoe P, Boyaval P: **Use of two-dimensional electrophoresis to study differential protein expression in divercin V41-resistant and wildtype strains of *Listeria monocytogenes*.** *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**:4318-4324.
- Wang XS, He X, Jiang Z, Wang J, Chen XN, Liu DW, Wang F, Guo Y, Zhao J, Liu F, Huang L, Yuan J: **Proteomic analysis of the *Enterococcus faecalis* V583 strain and clinical isolate V309 under vancomycin treatment.** *J Proteome Res* 2010, **9**:1772-1785.
- Aires J, Anglade P, Baraige F, Zagorec M, Champomier-Verges MC, Butel MJ: **Proteomic comparison of the cytosolic proteins of three *Bifidobacterium longum* human isolates and *B. longum* NCC2705.** *BMC Microbiol* 2010, **10**:29.
- Begley M, Gahan CGM, Hill C: **The interaction between bacteria and bile.** *FEMS Microbiol Rev* 2005, **29**:625-651.
- Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ: **Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2008, **72**:728-764.
- de Vries MC, Vaughan EE, Kleerebezem M, de Vos WM: ***Lactobacillus plantarum*- survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract.** *Int Dairy J* 2006, **16**:1018-1028.
- Molenaar D, Bringel F, Schuren FH, de Vos WM, Siezen RJ, Kleerebezem M: **Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays.** *J Bacteriol* 2005, **187**:6119-6127.
- Kubota K, Kosaka T, Ichikawa K: **Combination of two-dimensional electrophoresis and shotgun peptide sequencing in comparative proteomics.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005, **815**:3-9.
- FAO: **An evaluation of probiotic effects in the human gut: microbial aspects.** London; 2004.
- Gilliland SE, Staley TE, Bush LJ: **Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct.** *J Dairy Sci* 1984, **67**:3045-3051.
- Usman Hosono A: **Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains.** *J Dairy Sci* 1999, **82**:243-248.
- Rallu F, Gruss A, Ehrlich SD, Maguin E: **Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals.** *Mol Microbiol* 2000, **35**:517-528.
- Burns P, Sanchez B, Vinderola G, Ruas-Madiedo P, Ruiz L, Margolles A, Reinheimer J, Reyes-Gavilan CGD: **Inside the adaptation process of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* to bile.** *Int J Food Microbiol* 2010, **142**:132-141.
- Whitehead K, Versalovic J, Roos S, Britton RA: **Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730.** *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**:1812-1819.
- Pfeiler EA, Azcarate-Peril MA, Klaenhammer TR: **Characterization of a novel bile-inducible operon encoding a two-component regulatory system in *Lactobacillus acidophilus*.** *J Bacteriol* 2007, **189**:4624-4634.
- Chiancone E, Ceci P: **The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: detoxification of iron and hydrogen peroxide and DNA binding.** *Biochim Biophys Acta* 2010, **1800**:798-805.
- Vila-Sanjurjo A, Schuwirth BS, Hau CW, Cate JHD: **Structural basis for the control of translation initiation during stress.** *Nat Struct Mol Biol* 2004, **11**:1054-1059.
- Carmel-Harel O, Storz G: **Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress.** *Annu Rev Microbiol* 2000, **54**:439-461.
- Shabala L, Ross T: **Cyclopropane fatty acids improve *Escherichia coli* survival in acidified minimal media by reducing membrane permeability**

- to H⁺ and enhanced ability to extrude H⁺. *Res Microbiol* 2008, **159**:458-461.
43. Klaenhammer TR, Barrangou R, Buck BL, Azcarate-Peril MA, Altermann E: **Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health.** *FEMS Microbiol Rev* 2005, **29**:393-409.
 44. Sanchez B, Reyes-Gavilan CGD, Margolles A: **The F1F0-ATPase of *Bifidobacterium animalis* is involved in bile tolerance.** *Environ Microbiol* 2006, **8**:1825-1833.
 45. Bron PA, Molenaar D, Vos WM, Kleerebezem M: **DNA micro-array-based identification of bile-responsive genes in *Lactobacillus plantarum*.** *J Appl Microbiol* 2006, **100**:728-738.
 46. Leverrier P, Vissers JPC, Rouault A, Boyaval P, Jan G: **Mass spectrometry proteomic analysis of stress adaptation reveals both common and distinct response pathways in *Propionibacterium freudenreichii*.** *Arch Microbiol* 2004, **181**:215-230.
 47. Poolman B, Glaasker E: **Regulation of compatible solute accumulation in bacteria.** *Mol Microbiol* 1998, **29**:397-407.
 48. Sleator RD, Wemekamp-Kamphuis HH, Gahan CGM, Abee T, Hill C: **A PrfA-regulated bile exclusion system (Bile) is a novel virulence factor in *Listeria monocytogenes*.** *Mol Microbiol* 2005, **55**:1183-1195.
 49. Lambert JM, Bongers RS, de Vos WM, Kleerebezem M: **Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin acylase family members in *Lactobacillus plantarum* WCFS1.** *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**:4719-4726.
 50. Fang F, Li Y, Bumann M, Raftis EJ, Casey PG, Cooney JC, Walsh MA, O'Toole PW: **Allelic variation of bile salt hydrolase genes in *Lactobacillus salivarius* does not determine bile resistance levels.** *J Bacteriol* 2009, **191**:5743-5757.
 51. Bringel F, Castioni A, Olukoya DK, Felis GE, Torriani S, Dellaglio F: ***Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2005, **55**:1629-1634.
 52. Izquierdo E, Medina M, Ennahar S, Marchioni E, Sanz Y: **Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for *Bifidobacterium longum* strains.** *Curr Microbiol* 2008, **56**:613-618.
 53. Geer LY, Markey SP, Kowalak JA, Wagner L, Xu M, Maynard DM, Yang X, Shi W, Bryant SH: **Open mass spectrometry search algorithm.** *J Proteome Res* 2004, **3**:958-964.
 54. Kapp EA, Schutz F, Connolly LM, Chakel JA, Meza JE, Miller CA, Fenyó D, Eng JK, Adkins JN, Omenn GS, Simpson RJ: **An evaluation, comparison, and accurate benchmarking of several publicly available MS/MS search algorithms: sensitivity and specificity analysis.** *Proteomics* 2005, **5**:3475-3490.
 55. Matuszewska E, Kwiatkowska J, Kuczynska-Wisnik D, Laskowska E: ***Escherichia coli* heat-shock proteins lbpA/B are involved in resistance to oxidative stress induced by copper.** *Microbiology* 2008, **154**:1739-1747.
 56. Rajagopal S, Sudarsan N, Nickerson KW: **Sodium dodecyl sulfate hypersensitivity of *clpP* and *clpB* mutants of *Escherichia coli*.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**:4117-4121.
 57. Jansch A, Korakli M, Vogel RF, Ganzle MG: **Glutathione reductase from *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451(T): contribution to oxygen tolerance and thiol exchange reactions in wheat sourdoughs.** *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**:4469-4476.
 58. Greenberg JT, Monach P, Chou JH, Josephy PD, Demple B: **Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, **87**:6181-6185.
 59. Biemans-Oldehinkel E, Mahmood NABN, Poolman B: **A sensor for intracellular ionic strength.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:10624-10629.
 60. Martinez A, Kolter R: **Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps.** *J Bacteriol* 1997, **179**:5188-5194.
 61. Han XL, Dorsey-Oresto A, Malik M, Wang JY, Drlica K, Zhao XL, Lu T: ***Escherichia coli* genes that reduce the lethal effects of stress.** *BMC Microbiol* 2010, **10**:35.

doi:10.1186/1471-2180-11-63

Cite this article as: Hamon *et al.*: Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC Microbiology* 2011 **11**:63.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



PUBLICATION 2

Investigation of Biomarkers of Bile Tolerance in *Lactobacillus casei* Using Comparative Proteomics

Erwann Hamon,^{†,§} Peter Horvatovich,^{||} Magali Bisch,[†] Françoise Bringel,[#] Eric Marchioni,[†] Dalal Aoudé-Werner,[§] and Saïd Ennahar^{*,†}

[†]Equipe de Chimie Analytique des Molécules Bio-Actives, IPHC-DSA, Université de Strasbourg, CNRS, 67400, Illkirch-Graffenstaden, France

[§]Aérial, Parc d'Innovation, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France

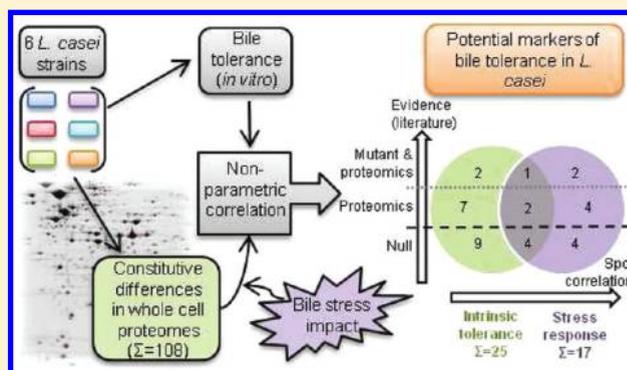
^{||}Department of Analytical Biochemistry, Centre for Pharmacy, University of Groningen, 9700 AD Groningen, The Netherlands

[#]Laboratoire de Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie, Université de Strasbourg, CNRS, 67083 Strasbourg, France

S Supporting Information

ABSTRACT: The identification of cell determinants involved in probiotic features is a challenge in current probiotic research. In this work, markers of bile tolerance in *Lactobacillus casei* were investigated using comparative proteomics. Six *L. casei* strains were classified on the basis of their ability to grow in the presence of bile salts in vitro. Constitutive differences between whole cell proteomes of the most tolerant strain (*L. casei* Rosell-215), the most sensitive one (*L. casei* ATCC 334), and a moderately tolerant strain (*L. casei* DN-114 001) were investigated. The ascertained subproteome was further studied for the six strains in both standard and bile stressing conditions. Focus was on proteins whose expression levels were correlated with observed levels of bile tolerance in vitro, particularly those previously reported to be involved in the bile tolerance process of lactobacilli. Analysis revealed that 12 proteins involved in membrane modification (NagA, NagB, and RmlC), cell protection and detoxification (ClpL and OpuA), as well as central metabolism (Eno, GndA, Pgm, Pta, Pyk, Rp11, and ThRS) were likely to be key determinants of bile tolerance in *L. casei* and may serve as potential biomarkers for phenotyping or screening purposes. The approach used enabled the correlation of expression levels of particular proteins with a specific probiotic trait.

KEYWORDS: bile tolerance, biomarker, comparative proteomics, *Lactobacillus casei*, probiotics



INTRODUCTION

Increasing evidence indicates that the gut microbiome is a critical determinant of human health.¹ Interest in the beneficial functions of human gastrointestinal (GI) flora has led to the selection of microbial strains with putative health-promoting capacities for the treatment of conditions in which the GI flora balance or normal function is disturbed.² For safety reasons, research efforts mainly focused on species occurring in the human GI tract and with a long history of safe use in food fermentations. As a result, the vast majority of strains recognized as probiotics³ are members of only a handful of species among lactobacilli, despite the increasing use of strains from other genera such as bifidobacteria.⁴

The beneficial health effects of lactobacilli are acknowledged to be strain-specific, but the precise molecular mechanisms and the strain-dependent factors involved remain poorly understood.⁵ With the advent of high-throughput sequencing technologies, several complementary “-omic” approaches have emerged as powerful tools to investigate the basis of strain

variability.⁶ In particular, comparative proteomics has been used to analyze bacterial protein polymorphism and to discriminate strains according to their phenotypes.^{7–9} With regard to probiotics, specific proteomic patterns could be observed at the strain's level in relation to bile tolerance¹⁰ and adhesion capacity.^{11,12} Yet, to our knowledge, no direct correlation could be established between expression levels of particular proteins and a specific probiotic trait. Being able to establish such a link is however critical when it comes to identifying potential markers of probiotic features.

To date, the ability to withstand bile exposure is one of the commonly used criteria in the selection process of probiotic strains, since bile is a major challenge for bacteria entering the GI tract.³ The impact of bile salts on bacterial cells encompasses a wide range of deleterious effects that should be taken into

Special Issue: Microbial and Plant Proteomics

Received: August 26, 2011

Published: October 31, 2011

account when studying bile stress and that include detergent action, DNA damage, intracellular acidification, and oxidative and osmotic stresses.¹³ As of today, the mechanisms of survival to bile exposure of lactobacilli, the major probiotic group, are not fully understood.⁵ Investigations have to be carried out intra- and interspecies in order to identify phenomena that are linked to the probiotic trait and not only to a particular species behavior. In a previous study, we reported proteins that may be behind the tolerance of *Lactobacillus plantarum* to bile salts.¹⁰ To get a wider perspective of the bile tolerance behavior within the *Lactobacillus* genus, additional closely related species have to be investigated. Only then will the actual biomarkers of bile tolerance emerge.

Among the relevant species, *L. casei* is one of the most widely studied and used probiotics.¹⁴ It also belongs to the same phylogenetic group within the genus *Lactobacillus* as *L. plantarum*.¹⁵ Additionally, *L. casei* strains have been isolated from diverse habitats such as raw and fermented dairy products, intestinal tracts and reproductive systems of humans and animals, as well as fresh and fermented plant products.¹⁶ Such remarkable ecological adaptability has been linked to a high level of phenotypic and genotypic diversity,¹⁷ which partly explains the taxonomic controversy about this species.¹⁸ However, the implications of this strain variability have not been examined with regard to probiotic properties.

The present work investigates the potential markers of bile tolerance in *L. casei*. It is based on the study of the proteomic profiles of six *L. casei* strains with different bile tolerance levels. Results are discussed in light of previous findings concerning tolerance of lactobacilli to bile-related stress.

MATERIAL AND METHODS

Strain Characterization and Standard Culture Conditions

Six *L. casei* strains were used in this study: one collection strain (*L. casei* ATCC 334) and five probiotic strains commonly used in commercial products (*L. casei* CRL 431 and F-19, Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark; *L. casei* DN-114 001, Danone, Paris, France; *L. casei* Rosell-215, Lallemand, Montreal, Canada; and *L. casei* Shirota, Yakult, Tokyo, Japan). Strains were identified at the species level using rRNA restriction fragment length polymorphism¹⁹ and 16S rRNA sequence analysis (data not shown). All cultures were maintained as frozen stocks held at -80°C in Cryobank cryogenic beads (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For experimental use, strains were cultured anaerobically (Anaerocult A system, Merck, Darmstadt, Germany) at 37°C in de Man-Rogosa-Sharpe broth (Biokar, Beauvais, France) supplemented with 0.05% (w/v) L-cysteine hydrochloride monohydrate (MRSC; Merck) to early stationary phase, using three successive subcultures (1% v/v inoculation; 12–15 h).

Bile Salt Tolerance

Tolerance to bile was assessed by investigating the ability of strains to grow in the presence of different concentrations of bovine bile (Oxgall, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), as previously described.¹⁰ Fresh cultures were inoculated (0.1%, v/v) into MRSC broth containing 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%, and 4.0% (w/v) Oxgall and incubated anaerobically at 37°C . Bacterial growth was monitored in honeycomb plates (Oy Growth Curves AB, Helsinki, Finland) by measuring the optical density (OD) at 600 nm every 30 min for 48 h using an automated turbidimetric system (Bioscreen C MBR, Oy Growth Curves AB). Three independent experiments were carried out, and each assay was

performed in triplicate. Comparison of cultures was based on their growth rates in each broth, expressed as a percentage of that of the control, which was assigned a value of 100%. Using JMP 5.0 software (SAS Institute, Cary, NC, USA), data were subjected to two-way analysis of variance (ANOVA) with strain and bile concentration as variables. A multiple comparison test using least significant difference (LSD) procedure was carried out to compare means for which the ANOVA test indicated significant differences ($p < 0.05$).

Protein Extraction, Two-Dimensional Electrophoresis, Image Analysis, and Protein Identification

Preparation of total protein extracts and two-dimensional electrophoresis (2-DE) were performed as previously reported.¹⁰ Experiments were carried out for bacterial cells cultured in two different broths (MRSC and MRSC supplemented with 0.5% Oxgall). Significant differences in protein expression were established with at least three independent gels per strain and per condition using a GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad) and the PD Quest 8.0.1 software (Bio-Rad). Spot intensities (representative of protein abundances) were normalized to the sum of intensities of all valid spots in one gel. For analysis of changes in protein expression during bile salt exposure, a protein was considered to be under- or overproduced when changes in normalized spot intensities were at least 1.5-fold at a significance level of $p < 0.05$ (Student's *t* test for paired samples), as previously described.²⁰ Regarding proteome comparison between strains, proteins were considered differentially produced when spot intensities passed the threshold of a 2-fold difference at a significance level of $p < 0.05$ (Student's *t* test for unpaired samples), as previously defined.¹⁰ Both thresholds were arbitrarily chosen.

Spots of interest were subjected to tryptic in-gel digestion and analyzed by chip-liquid chromatography-quadrupole time-of-flight (chip-LC-QTOF) using an Agilent G6510A QTOF mass spectrometer equipped with an Agilent 1200 Nano LC system and an Agilent HPLC Chip Cube, G4240A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), as described previously.¹⁰ Protein identification was performed against the three genomes of *L. casei* (ATCC 334, BL 23, and Zhang) available at the NCBI Web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), based on consensus scoring between in-house installed versions of Phenyx (Geneva Bioinformatics, Geneva, Switzerland) and OMSA²¹ MS/MS search algorithms to confirm protein identities and limit the risk of false positives.²² Annotations were made according to the cluster of orthologous genes (COG) functional groups.

Cluster Analysis

The following statistics (including the Spearman rank correlation test) were performed on the protein spots (a total of 108) that were differentially expressed in standard growth conditions between three *L. casei* strains showing different bile tolerance phenotypes in vitro (*L. casei* Rosell-215, resistant; *L. casei* DN-114 001, intermediate; and *L. casei* ATCC 314, sensitive). The expression of these proteins was also studied under stressing conditions as compared to standard conditions for the six *L. casei* strains considered in this work.

Cluster analysis was carried out as previously described.⁸ When a protein spot was reliably absent in one strain, the absent values were replaced by the lowest value for the gel. Each protein spot volume was divided by the average value of all existing values for this protein spot in all gels and then subjected to a base 2 logarithmic transformation.²³ The hierarchical clustering analysis

Table 1. Effect of Bovine Bile Concentration on the Relative Growth Rates of *L. casei* Strains

strains	relative growth rate ^a (% μ) with oxgall concentrations (%)					
	control	0.1	0.5	1.0	2.0	4.0
Rosell-215	100	91.3 \pm 2.7 [†]	54.3 \pm 1.8 [†]	48.2 \pm 2.6 [†]	36.9 \pm 0.9 [†]	30.8 \pm 1.4 [†]
F-19	100	90.5 \pm 1.6 [†]	54.7 \pm 1.1 [†]	43.9 \pm 3.2 [§]	32.9 \pm 2.0 ^{†,§}	27.8 \pm 1.7 [†]
CRL 431	100	90.6 \pm 1.5 [†]	52.7 \pm 1.4 [†]	47.7 \pm 1.4 ^{†,§}	29.8 \pm 2.4 [§]	23.5 \pm 2.4 [§]
Shirota	100	84.6 \pm 2.0 [§]	48.5 \pm 1.1 [§]	38.0 \pm 2.9 [#]	28.9 \pm 2.4 [#]	18.4 \pm 2.7 [#]
DN-114 001	100	81.4 \pm 2.2 ^{§,#}	33.3 \pm 2.0 [#]	25.3 \pm 2.4 [*]	24.1 \pm 2.8 [*]	20.4 \pm 2.6 ^{§,#}
ATCC 334	100	80.7 \pm 0.5 [#]	20.7 \pm 2.4 [*]	15.6 \pm 1.1	0.6 \pm 0.7	0.7 \pm 1.0 [*]

^aData are expressed as a percentage of the growth rate (h^{-1}) obtained in the absence of bile, which was assigned a value of 100%. Means \pm standard deviations of three independent experiments with three replicates per assay are given. Means in the same column with different symbols differ ($p < 0.05$).

was carried out with PermutMatrix, which allows a representation of clustering results as dendrograms of the samples and of the protein spots.²⁴ Clustering results were calculated using an algorithm resulting from the combination of Ward's aggregation method and the Pearson-based distance metrics.²³

Spearman Rank Correlation Test

Correlation between the expression levels of protein spots and the bile tolerance observed *in vitro* was assessed using a Spearman rank correlation test, as previously described.²⁵ This nonparametric analysis was performed for selected proteins under both standard and stressing conditions in relation to the strain's relative growth rates determined at the five tested bile concentrations. This consisted of assigning each strain a rank based on an ANOVA as well as an LSD test ($p < 0.05$) carried out on the mean intensities of a specific spot. The strains were assigned another rank according to an LSD test of their relative growth rates at one of the five bile concentrations ($p < 0.05$). Tied values, i.e., when strains belonged to homogeneous groups, were given a rank equal to the average of their positions in the ascending order of the values. The Spearman correlation coefficient was then computed, and its significance was tested ($p < 0.05$) using JMP 5.0 software. In order to discriminate the bile tolerance phenotypes of the strains, a factorial discriminant analysis (FDA) was carried out using significant spots for which the confidence level of the Spearman rank correlation test passed a threshold of 95%. A stepwise FDA was also performed to select a subset of independent variables among these significant spots. The probability of introduction and rejection of the spots was fixed at a p -value of < 0.05 .

RESULTS

Bile Salt Tolerance

Strains of *L. casei* were exposed to bile stress using increasing Oxgall concentrations (0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%, and 4.0% w/v), and their growth rates were measured (Table 1). Two-way ANOVA revealed significant effects of the strain, the bile concentration, and their interaction ($p < 0.05$). A stepwise increase in the Oxgall concentration resulted in a gradual decrease in the maximal growth rate for all strains ($p < 0.05$). Strains could be assigned to three groups according to their bile tolerance phenotype: a tolerant phenotype including strains *L. casei* Rosell-215, CRL 431, and F-19 with a strong capacity to grow in Oxgall-supplemented culture broth and relative growth rates that ranged from 23.5 \pm 2.4% to 91.3 \pm 2.7%, as compared to standard conditions; a sensitive phenotype including *L. casei* ATCC 334, the most sensitive strain to bile salts, with relative

growth rates from 0.7 \pm 1.0% to 80.7 \pm 0.5%; an intermediate phenotype that included *L. casei* Shirota and DN-114 001 which were moderately bile-tolerant and had relative growth rates in the range of 18.4 \pm 2.7% to 84.6 \pm 2.0%. The proteomes of these strains were extracted and analyzed following growth in standard medium and in bile-salt-containing medium.

Constitutive Differences between Proteomes in Standard Growth Conditions

The six *L. casei* strains were cultured under nonstressing conditions, and whole cell proteins were extracted and analyzed by 2-DE in a pI range of 4.0–7.0. In these conditions, the estimated coverage of the theoretical proteome of *L. casei* was 54.5%, as extrapolated from the *in silico* proteomic data obtained from the three *L. casei* genomes available at NCBI (data not shown). Proteomic patterns of *L. casei* ATCC 334 (highly sensitive to bile), *L. casei* DN-114 001 (moderately sensitive to bile), and *L. casei* Rosell-215 (highly tolerant to bile) were analyzed in an attempt to establish a link between a strain's constitutive proteome and its level of tolerance to bile. Figure 1A–C shows representative 2-D patterns for these strains when cultured in standard conditions. Although the inherent proteomic patterns were overall similar, 108 out of an average of 485 detected protein spots displayed different expression levels (Supplementary Table). Gel spots were excised, and proteins were subjected to tryptic digestion followed by chip-LC-QTOF analysis and proteomic database search using Phenyx and OMSSA tools. Of the 108 spots, 98 representing 72 different proteins were identified, some of which were found in more than one spot, suggesting the presence of protein isoforms. Sequence alignment analysis showed that 95% of the corresponding genes were present ($>98\%$ similarity) in the three sequenced *L. casei* genomes (strains ATCC 334, BL 23, and Zhang), while five genes (*estC*, *greA*, *lacG*, *pepT2*, and *LCABL_25770*) were present in only two genomes (Supplementary Table). The identified proteins fell into 15 functional categories covering most of the biochemical functions encountered in bacterial cells (Figure 2). This subproteome of interest was also examined for the three other strains studied (*L. casei* F-19, *L. casei* CRL 431, and *L. casei* Shirota) for further statistical analysis.

Bile Influence on Protein Levels of Expression

Strains were grown under stressing conditions using 0.5% (w/v) Oxgall. This sublethal concentration was chosen because its effect was moderate, which allowed all strains to grow at rates ranging from 20.7 \pm 2.4% to 54.3 \pm 1.8% as compared to standard growth conditions. As with standard conditions, cells were harvested at the early stationary phase, which corresponded

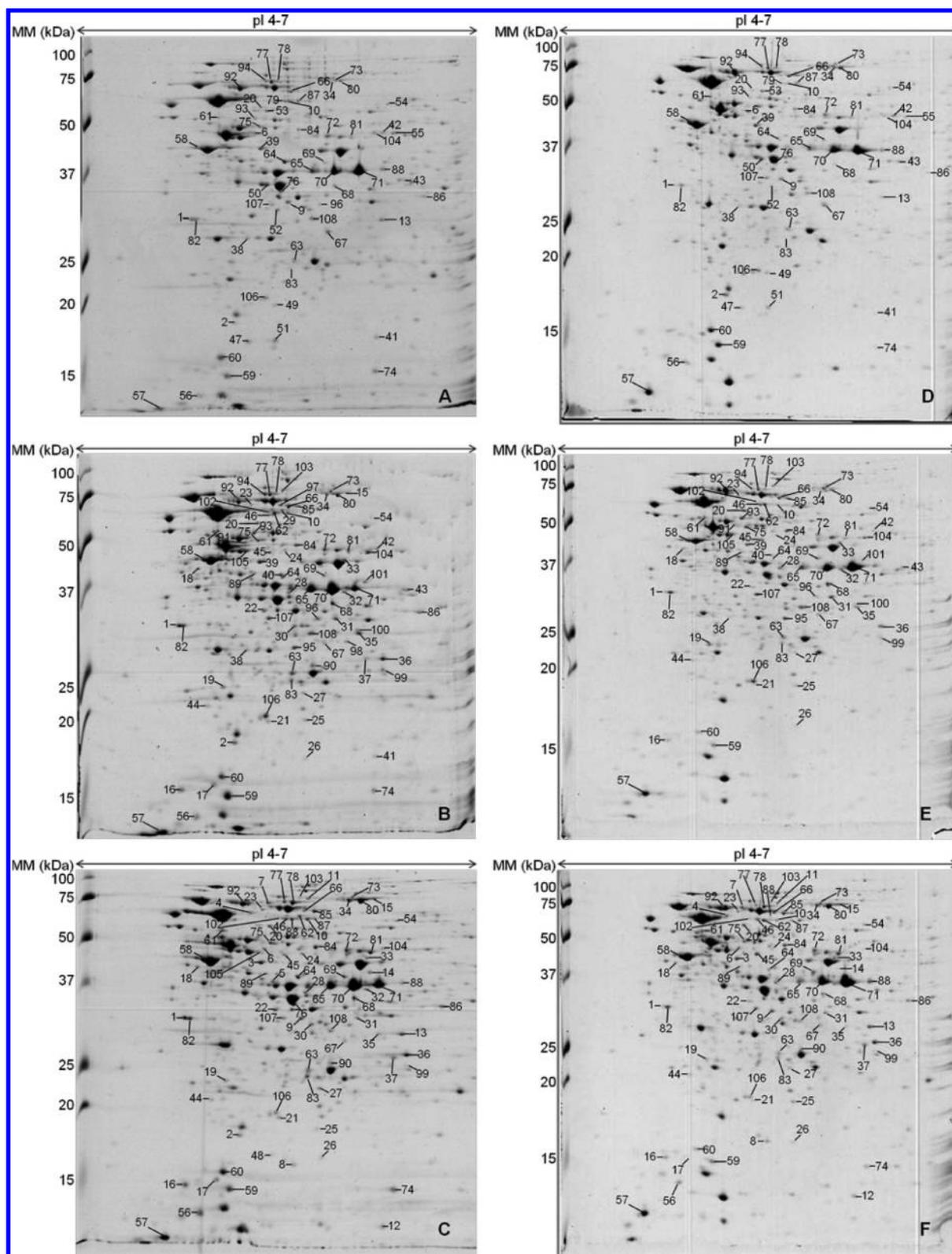


Figure 1. Representative 2-DE gel pictures (pH range 4–7) of whole-cell protein lysates from early stationary phase of *L. casei* ATCC 334 (A and D), DN-114 001 (B and E), and Rosell-215 (C and F) cultured without (A–C) and with (D–F) 0.5% (w/v) Oxgall. Spots exhibiting constitutive differential expression between strains in standard growth conditions and identified by Chip-LC-QTOF analysis are labeled.

to incubations for up to 16 to 19 h depending on strains (data not shown). Figure 1D–F shows representative 2-D patterns of the three selected strains with different bile tolerance phenotypes

when cultured with 0.5% Oxgall. Overall these patterns were relatively different from those obtained in standard conditions, suggesting quantitative change for most of the protein spots

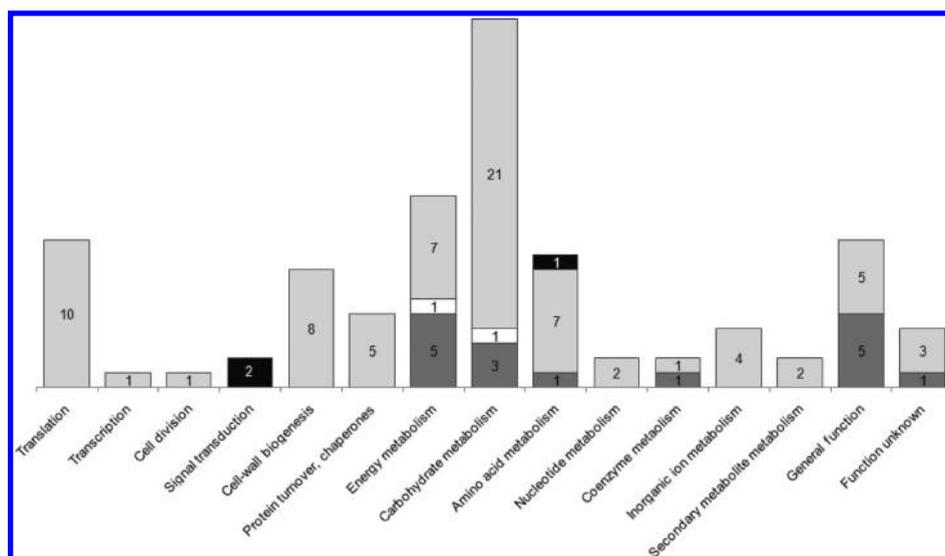


Figure 2. Functional distribution of differentially expressed protein spots of *L. casei* strains in standard conditions and impact of a bile stress on their expression levels. The 98 identified protein spots were grouped according to their COG functional categories and divided into four classes, based on the overall modification of their levels of expression following bile challenge (white, not affected; light gray, strain-dependent variation; dark gray, underexpressed; and black, overexpressed).

observed. Analysis of the subproteome of interest (108 proteins) was extended to the six *L. casei* strains studied (Supplementary Table; Figure 2). Results showed that the majority (~80%) of protein spots displayed modifications in expression levels that varied from one strain to another in response to bile stress. Still, 16 spots were repressed for all strains ($r < -1.5$), three others were systematically overexpressed (fold-change factor $r > 1.5$), while the last two were not affected following bile challenge ($|r| \leq 1.5$).

Correlation between Protein Expression and Bile Tolerance Observed in Vitro

The 108 spots of interest as expressed in standard and stimulating conditions were further studied through statistical analysis with the objective of identifying characteristic proteomic profiles of bile tolerance in *L. casei*. Data were first scrutinized by the hierarchical clustering analysis developed by Meunier et al.²³ This made it possible, on the one hand, to sort gels according to the global patterns of the 108 spots of interest and, on the other hand, to gather spots with similar expression profiles across the gels (Supplementary Figure). Good data reproducibility could be observed as all gels of one strain were clustered together. However, the clustering of strains according to the expression levels of the 108 protein spots whether under standard conditions or in the presence of bile did not quite match their bile-tolerance pattern. In fact, although in both cases two distinct clusters could be identified that included highly tolerant and intermediate phenotypes, the most sensitive strain (ATCC 334) was associated with the most tolerant strains (Rosell-215, CRL 431, and F-19). Using a Spearman rank correlation test, data were further analyzed to identify particular protein spots whose expression could be correlated with bile tolerance. Figure 3 shows the highest confidence levels obtained for each spot in both standard and stressing conditions whatever the considered bile concentration. The higher the confidence level, the more significant is the correlation. An FDA performed with protein spots above the 95% confidence threshold (28 and 17 spots in standard and stimulating conditions, respectively)

showed a very good discrimination of the strains according to their bile tolerance phenotype (100% of strains well classified after leave-one-out cross validation; data not shown). The discrimination between the three phenotypes was always very clear when only four selected protein spots from these subsets were used for the FDA (100% of strains well classified after leave-one-out cross validation; Figure 3).

Identification of Potential Biomarkers of Bile Tolerance in *L. casei*

Marker candidates of bile tolerance in *L. casei* were investigated among the 28 (except three unidentified spots) and 17 protein spots whose expression in standard and stressing conditions, respectively, was correlated ($p < 0.05$) to the capacity of strains to tolerate bile. Proteins were sorted in light of their reported involvement in bile tolerance processes of lactobacilli and possibly other microorganisms (Figure 4). Three levels of evidence were distinguished depending on data found in literature. Seventeen proteins could not be linked to bile resistance processes based on previous research: six are not fully characterized (putative uncharacterized protein (Yqek), spot 27; aryl-alcohol dehydrogenase related enzyme (IoIS), spot 30; and esterase C (EstC), spot 37) or with unknown functions (proteins of unknown function LSEI_1616, LSEI_1559, and LSEI_1022; spots 4, 56, and 82, respectively); three proteins are reported to be involved in membrane modification (D-fructose-6-phosphate amidotransferase (GlmS), spot 66; dTDP-glucose pyrophosphorylase (RmlA), spot 67; and dTDP-4-dehydrorhamnose reductase (RmlD), spot 108); the eight remaining proteins are reported to be key components of central metabolism (prolyl-tRNA synthetase (ProS), spot 7; glycyl-tRNA synthetase (GlyS), spot 11; MocR-like aminotransferase (AvtA), spot 14; pyruvate dehydrogenase complex E1 component (PdhB), spot 22; 50S ribosomal protein L4 (RplD), spot 44; alcohol-acetaldehyde dehydrogenase (Pdh), spot 89; phosphoenolpyruvate-protein kinase (PtsA), spot 92; and 6-phospho- β -galactosidase (LacG), spot 93). Then, 12 proteins identified in 18 spots were previously mentioned in proteomic

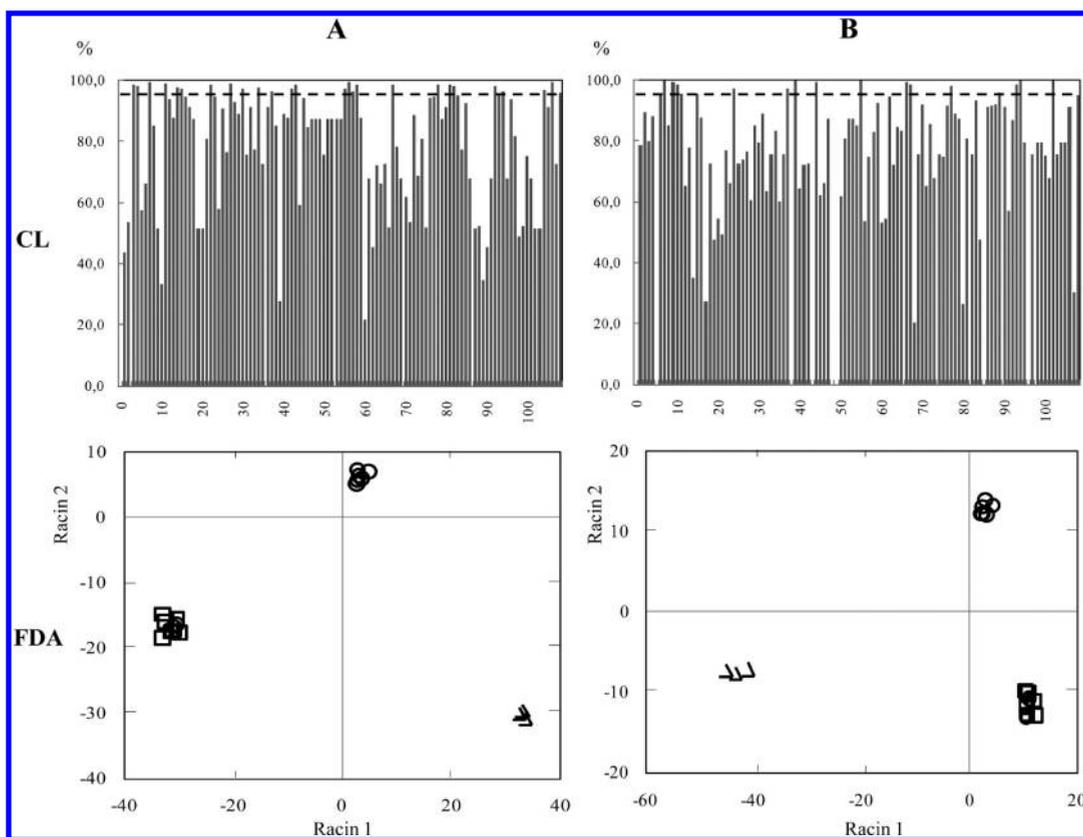


Figure 3. Correlation between protein expression and bile tolerance abilities of *L. casei* strains in standard and stressing conditions. Representation of the highest confidence levels (CL) obtained for each spot in the Spearman rank correlation test whatever the considered bile concentration, and the FDA carried out with the four most representative spots (among those with CL \geq 95%, as delineated by the dotted line) in both standard (A) and stressing (B) conditions. Bile tolerance phenotypes: \square , resistant; \circ , intermediate; \triangle , sensitive.

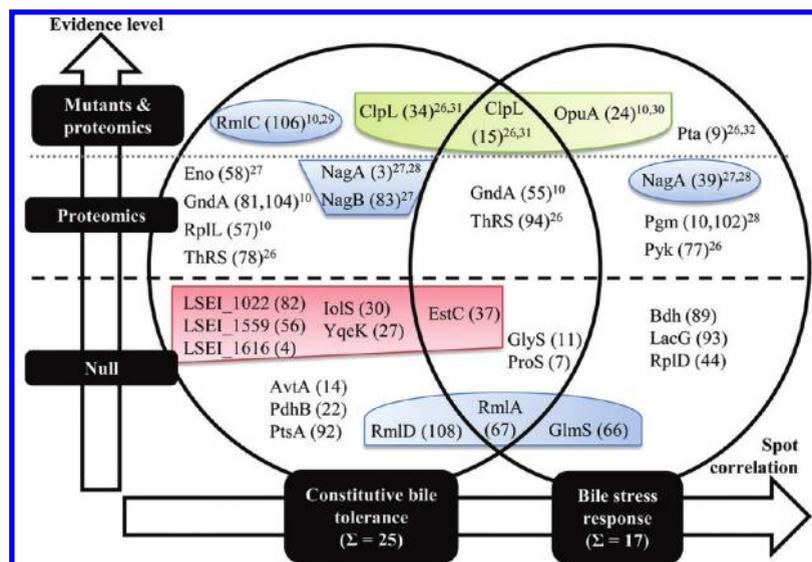


Figure 4. Marker candidates of bile tolerance and bile stress response in *L. casei*. Protein names were abbreviated according to conventional gene symbols as in the Supplementary Table (Supporting Information). Protein functions were divided into four categories (blue, membrane modification; green, cell protection and detoxification; red, unknown function; other proteins, central metabolism). Numbers in brackets refer to corresponding spots, and superscript numbers refer to scientific substantiation.

studies related to bile tolerance of lactobacilli.^{10,26–28} Among these proteins, three are implicated in cell-wall biogenesis

(*N*-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase (NagA), spots 3 and 39; glucosamine-6-phosphate isomerase (NagB), spot 83;

and dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase (RmlC), spot 106), two in cell protection and detoxification (ATP-binding subunit of Clp protease and DnaK/DnaJ chaperones (ClpL), spots 15 and 34; and ABC-type proline/glycine betaine transporter (OpuA), spot 24), and seven in central metabolism (phosphotransacetylase (Pta), spot 9; phosphoglucomutase (Pgm), spots 10 and 102; 6-phosphogluconate dehydrogenase (GndA), spots 55, 81, and 104; ribosomal protein L7/L12 (RplL), spot 57; enolase (Eno), spot 58; pyruvate kinase (Pyk), spot 77; and threonyl-tRNA synthetase (ThRS), spots 78 and 94). According to their correlation patterns, these protein spots may therefore constitute characteristic proteomic profiles of intrinsic bile tolerance (NagA, spot 3; ClpL, spots 15 and 34; GndA, spots 55, 81, and 104; RplL, spot 57; Eno, spot 58; ThRS, spots 78 and 94; NagB, spot 83; and RmlC, spot 106) and bile stress response (Pta, spot 9; Pgm, spots 10 and 102; ClpL, spot 15; OpuA, spot 24; NagA, spot 39; GndA, spot 55; Pyk, spot 77; and ThRS, spot 94) in *L. casei*, with three spots (ClpL, spot 15; GndA, spot 55; and ThRS, spot 94) belonging to both profiles. They may serve as potential markers of bile tolerance in this species. In addition to proteomic data, complementary substantiation based on dedicated mutant analyses was found in literature regarding five of these protein spots (Pta, spot 9; ClpL, spots 15 and 34; OpuA, spot 24; and RmlC, spot 106),^{29–32} which reinforces their putative key role in the bile tolerance process of *L. casei*.

DISCUSSION

This paper reports the application of 2-DE and MS analysis to investigate markers of bile tolerance in lactobacilli. Despite known limitations, 2-DE has proven to be an effective technique for the investigation of bacterial proteomes.³³ With regard to probiotics, this technique has been used to study cell adhesion and bile tolerance in *L. plantarum*.^{10,11} By choosing *L. casei* as a study case and by investigating a larger number of proteins through statistical tools, the present work gives a deeper insight into the possibilities of 2-DE and MS analysis, and explores the presence of interspecies probiotic traits within lactobacilli.

The sensitivity of *L. casei* strains to bile was determined by calculating growth rates from OD measurements in the presence of bovine bile. This approach has proven to be reliable in assessing a strain's ability to grow in a given medium,³⁴ and has been successfully used in bile tolerance studies.^{10,35–37} It has to be pointed out however that bacterial behavior may be different in the human GI tract due to unequal bovine and human bile salt compositions, and to the interference of other parameters, like acid stress, which may affect bacterial survival.^{13,20} Growth rates varied significantly from one strain to another, which is in accordance with previous reports showing a strain-specific behavior of lactobacilli with regard to bile tolerance.^{38,39} This suggests differences in the strains' capacity to resist GI tract conditions, even though they (except *L. casei* Rosell-215) are generally reported to survive these conditions,^{40–42} with some contradictory data for *L. casei* CRL 431.^{43,44}

In an attempt to explain the observed differences between *L. casei* strains in bile tolerance capacity, potential proteomic markers were searched among the constitutive proteins, as previously shown for *L. plantarum*,¹⁰ but also among inducible stress proteins. With regard to constitutive proteins, differences between strains covered a wide range of biochemical functions,

and most of them did not seem to be linked to bile tolerance, but rather reflected the biodiversity of *L. casei*. As for induced stress proteins, their nature as well as their levels of expression varied between strains following bile challenge, which suggests that different strategies may exist in the bile tolerance process of *L. casei* species, as previously observed with *L. plantarum*.¹⁰ An in-depth investigation of the correlation between constitutive and inducible stress proteins of interest and bile tolerance enabled the unravelling of potential determinants behind this bacterial feature.

Cell surface features appeared to be key in bile tolerance of *L. casei*, since expression levels of several proteins implicated in membrane modification were correlated with this bacterial feature. Among them, RmlC (spot 106), which was related to intrinsic bile tolerance, is part of an operon involved in dTDP-rhamnose biosynthesis, a sugar nucleotide precursor of capsular and exopolysaccharides (EPS) in bacterial cells.⁴⁵ In *Escherichia coli*, a *rmlC* mutant was sensitive to detergent and oxidative stresses,²⁹ two of the deleterious effects of bile salts. Moreover, this protein also showed differences in expression in the inherent proteomic patterns of *L. plantarum*¹⁰ and *Lactococcus lactis*⁴⁶ strains with different levels of bile and acid tolerance, respectively. Therefore, RmlC represents a potential biomarker of constitutive bile tolerance in *L. casei*. Actually, the whole operon seems to be essential in this property since expression levels of RmlA (spot 67) and RmlD (spot 108) in standard conditions were also correlated with a strain's level of tolerance to bile. By affecting the composition and production of EPS which loosely coats bacterial cells,⁴⁵ this set of proteins may help protect bacterial cells against bile challenge and govern part of bacterial resistance to this stress, as previously reported for *Bifidobacterium*.⁴⁷

Two additional proteins, NagA (spots 3 and 39), and NagB (spot 83), are required in the early steps of cell-wall biogenesis.⁴⁸ Previous proteomic studies revealed that these proteins were involved in the bile stress responses of *L. casei* Zhang²⁸ and *L. rhamonus* GG.²⁷ Interestingly, inactivation of *nagA* or *nagB* affected the susceptibility of *Staphylococcus aureus* to cell wall synthesis inhibitors, suggesting an interdependence between efficiency of cell wall precursor formation and resistance levels.⁴⁹ In our case, a NagA isoform and NagB were related to intrinsic bile tolerance, whereas a second NagA isoform was associated with bile stress response. This suggests that corresponding cell-wall biosynthesis pathway intervenes in both facets of this bacterial property.

Cell protection activities of ClpL molecular chaperone proved to be another fundamental element in *L. casei* tolerance to bile. This protein targets misfolded proteins for degradation by the ClpP peptidases and presents protein reactivation and remodelling properties.⁵⁰ In *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 200, ClpL showed constitutive differences in its expression levels between the parental strain and its bile-resistant derivative.²⁶ In addition, mutant analyses in *L. reuteri* also revealed the importance of this ATPase in bile³¹ and acid⁵¹ stress tolerance. Interestingly, while a 15-min bile shock induced the corresponding *clpL* gene, the latter was not overexpressed after a 6-h exposure, when cells had resumed growth in the presence of 0.5% bile,³¹ which suggest that ClpL is involved only at the early stages of bile challenge. In this study, two isoforms of this protein, spots 15 and 34, were identified, and consequently designated as potential markers of constitutive bile tolerance in *L. casei*. All things being equal, a strain naturally expressing higher amounts of

both gene products like *L. casei* Rosell-215 might stand a better chance of surviving the initial step of bile challenge, and most probably also the following steps, even though ClpL would not intervene in subsequent bile adaptation. Yet, in our case, ClpL in spot 15 also seemed to play a role in the adaptation process since its expression levels following a bile salt exposure were affected in three strains and were correlated to the in vitro tests.

When it comes to bile stress response, regulation of cellular processes as well as cell detoxification turned out to play a prominent role in *L. casei*. This is in regard to two proteins whose expression was affected following bile exposure. The first one, Pta (spot 9), is an enzyme involved in the anabolism of acetyl phosphate, a central molecule that functions as a global signal, regulating numerous cellular processes of chaperone activity and osmoregulation.⁵² Deletion of a *pta* gene in *E. coli* was shown to affect bacterial resistance to acid stress.³² Besides, this protein was involved in *L. delbrueckii* subsp. *lactis* response to bile challenge, but not in its stable bile-resistant phenotype,²⁶ which is in accordance with the results obtained in this study. The second protein, OpuA (spot 24), is a representative ABC transporter whose encoding gene was proven to contribute to the resistance of *Listeria monocytogenes* to physiological concentrations of human bile.³⁰ This protein, known to be involved in the *L. plantarum* response to osmotic stress,⁵³ another bile-related stress factor, was also reported to be a likely key determinant of the strong resistance to bile of *L. plantarum* 299 V.¹⁰ Based on these reports and the data reported here, proteins Pta and OpuA may serve as potential markers of bile adaptation in *L. casei*.

In addition to the specific strategies evoked above, key components of central metabolism were also found to be related to bile tolerance in *L. casei*. In particular, two proteins (RplL and ThRS) involved in translation and four proteins (Eno, GndA, Pgm, and Pyk) involved in carbohydrate metabolism, have previously been shown to participate to the response of lactobacilli to bile,^{10,26–28} as well as to the stability of the resistant phenotype (Pyk and ThRS).²⁶ Interestingly, two of them (GndA and ThrS) were involved in both constitutive tolerance and stress response facets of this bacterial feature, suggesting a dual and influential role in the bile tolerance processes of *L. casei*. However, the latter remains to be deciphered.

With regard to bile tolerance factors, bile salt hydrolase (BSH) is probably what first comes to mind, since it involves the direct hydrolysis of bile salts. However, none of the potential markers of bile tolerance identified in this work refer to BSH activity. This is in agreement with data from our previous study of *L. plantarum* strains, which suggested that BSHs were not key determinants of tolerance to bile salts.¹⁰ In fact, it appears that there is no systematic correlation between the capacity of a strain to grow in a bile-supplemented medium and its ability to hydrolyze bile salts.¹³ Besides, discrepancies in regulation trends of *bsh* genes were observed in lactobacilli following bile exposure,^{10,54–56} which suggests different adaptation strategies to bile in bacterial cells that may or may not include BSH as a major player.

Finally, most of the putative determinants of bile tolerance identified in this study for *L. casei* differed from those previously highlighted in *L. plantarum*.¹⁰ Particularly, a higher number of cell detoxification factors were found in *L. plantarum*. These discrepancies, together with differential cell-envelope compositions,⁵⁷ might explain the apparently higher tolerance of *L. plantarum* to bile salts as compared to *L. casei*.

CONCLUSION

This work used comparative proteomics to correlate protein expression and bile tolerance capacities of six *L. casei* strains. This approach revealed specific proteomic patterns related to constitutive bile tolerance and bile stress response in *L. casei*. Particularly, pattern overlaps highlighted the close connexion between both facets of this bacterial property. Literature-based functional analysis revealed some likely determinants behind this probiotic feature, 12 out of 29 proteins of which may serve as bacterial biomarkers for the screening of new bile-resistant strains. The latter were involved in membrane modification, cell protection and detoxification, as well as central metabolism. They have previously been shown to take part in bile tolerance processes of lactobacilli, suggesting analogies in the pathways these bacteria use to survive bile stress. However, analysis of changes in protein expression following bile exposure confirmed the strain specific nature of the bile stress response. As for the 17 remaining proteins of these patterns with no previous report regarding bile stress tolerance, they might also play a key role in these processes, thus opening new ways toward the understanding of bile tolerance factors in lactobacilli. Finally, this work represents a further step toward the setting up of a list of biomarkers for each individual probiotic feature. Future efforts will aim at extending the use of this approach to study other probiotic properties.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +33-3-68854322. Fax: +33-3-68854325. E-mail: ennahar@unistra.fr.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” and by the “Ministère de l’Agriculture et de la Pêche” through the “Unité Mixte Technologique 06.03: Méthodes analytiques et nutrimarqueurs”.

REFERENCES

- (1) Morowitz, M. J.; Deneff, V. J.; Costello, E. K.; Thomas, B. C.; Poroyko, V.; Relman, D. A.; Banfield, J. F. Strain-resolved community genomic analysis of gut microbial colonization in a premature infant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108* (3), 1128–1133.
- (2) Lebeer, S.; Vanderleyden, J.; De Keersmaecker, S. C. J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8* (3), 171–184.
- (3) *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*; FAO/WHO: London, 2002.
- (4) Shah, N. P. Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J.* **2007**, *17* (11), 1262–1277.
- (5) Lebeer, S.; Vanderleyden, J.; De Keersmaecker, S. C. J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72* (4), 728–764.
- (6) Cardenas, E.; Tiedje, J. M. New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19* (6), 544–549.

- (7) Enroth, H.; Åkerlund, T.; Sillén, A.; Engstrand, L. Clustering of clinical strains of *Helicobacter pylori* analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2000**, *7* (2), 301–306.
- (8) Dumas, E.; Meunier, B.; Berdague, J.-L.; Chambon, C.; Desvauz, M.; Hébraud, M. Comparative analysis of extracellular and intracellular proteomes of *Listeria monocytogenes* strains reveals a correlation between protein expression and serovar. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74* (23), 7399–7409.
- (9) Wang, X.; He, X.; Jiang, Z.; Wang, J.; Chen, X.; Liu, D.; Wang, F.; Guo, Y.; Zhao, J.; Liu, F.; Huang, L.; Yuan, J. Proteomic analysis of the *Enterococcus faecalis* V583 strain and clinical isolate V309 under vancomycin treatment. *J. Proteome Res.* **2010**, *9* (4), 1772–1785.
- (10) Hamon, E.; Horvatovich, P.; Izquierdo, E.; Bringel, F.; Marchioni, E.; Aoudé-Werner, D.; Ennahar, S. Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC Microbiol.* **2011**, *11*, 63.
- (11) Izquierdo, E.; Horvatovich, P.; Marchioni, E.; Aoudé-Werner, D.; Sanz, Y.; Ennahar, S. 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. *Electrophoresis* **2009**, *30* (6), 949–956.
- (12) Aires, J.; Anglade, P.; Baraige, F.; Zagorec, M.; Champomier-Verges, M.-C.; Butel, M.-J. Proteomic comparison of the cytosolic proteins of three *Bifidobacterium longum* human isolates and *B. longum* NCC2705. *BMC Microbiol.* **2010**, *10*, 29.
- (13) Begley, M.; Gahan, C. G. M.; Hill, C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* **2005**, *29* (4), 625–651.
- (14) Saxelin, M.; Tynkkynen, S.; Mattila-Sandholm, T.; de Vos, W. M. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16* (2), 204–211.
- (15) Bringel, F.; Castioni, A.; Olukoya, D. K.; Felis, G. E.; Torriani, S.; Dellaglio, F. *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2005**, *55* (4), 1629–1634.
- (16) Kandler, O.; Weiss, N. Genus *Lactobacillus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*; Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G., Eds.; The Williams & Wilkins Co.: Baltimore, MD, 1986; Vol. 2, pp 1209–1234.
- (17) Cai, H.; Rodriguez, B. T.; Zhang, W.; Broadbent, J. R.; Steele, J. L. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology* **2007**, *153* (8), 2655–2665.
- (18) Dellaglio, F.; Felis, G. E.; Torriani, S. The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins *et al.* 1989. Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2002**, *52* (1), 285–287.
- (19) Chen, H.; Lim, C. K.; Lee, Y. K.; Chan, Y. N. Comparative analysis of the genes encoding 23S-5S rRNA intergenic spacer regions of *Lactobacillus casei*-related strains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2000**, *50* (2), 471–478.
- (20) Sanchez, B.; Champomier-Verges, M.-C.; Stuer-Lauridsen, B.; Ruas-Madiedo, P.; Anglade, P.; Baraige, F.; de los Reyes-Gavilan, C. G.; Johansen, E.; Zagorec, M.; Margolles, A. Adaptation and response of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to bile: a proteomic and physiological approach. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73* (21), 6757–6767.
- (21) Geer, L. Y.; Markey, S. P.; Kowalak, J. A.; Wagner, L.; Xu, M.; Maynard, D.; Yang, M.; Shi, X.; Bryant, W. S. H. Open mass spectrometry search algorithm. *J. Proteome Res.* **2004**, *3* (5), 958–964.
- (22) Kapp, E. A.; Schütz, F.; Connolly, L. M.; Chakel, J. A.; Meza, J. E.; Miller, C. A.; Fenyó, D.; Eng, J. K.; Adkins, J. N.; Omenn, G. S.; Simpson, R. J. An evaluation, comparison, and accurate benchmarking of several publicly available MS/MS search algorithms: sensitivity and specificity analysis. *Proteomics* **2005**, *5* (13), 3475–3490.
- (23) Meunier, B.; Dumas, E.; Piec, I.; Béchet, D.; Hébraud, M.; Hocquette, J.-F. Assessment of hierarchical clustering methodologies for proteomic data mining. *J. Proteome Res.* **2007**, *6* (1), 358–366.
- (24) Caraux, G.; Pinloche, S. PermutMatrix: a graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order. *Bioinformatics* **2005**, *21* (7), 1280–1281.
- (25) Foligne, B.; Nutten, S.; Grangette, C.; Dennin, V.; Goudercourt, D.; Poiret, S.; Dewulf, J.; Brassart, D.; Mercenier, A.; Pot, B. Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13* (2), 236–243.
- (26) Burns, P.; Sanchez, B.; Vinderola, G.; Ruas-Madiedo, P.; Ruiz, L.; Margolles, A.; Reinheimer, J.; de los Reyes-Gavilan, C. G. Inside the adaptation process of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* to bile. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *142* (1–2), 132–141.
- (27) Koskeniemi, K.; Laakso, K.; Koponen, J.; Kankainen, M.; Greco, D.; Auvinen, P.; Savijoki, K.; Nyman, T. A.; Surakka, A.; Salusjärvi, T.; de Vos, W. M.; Tynkkynen, S.; Kalkkinen, N.; Varmanen, P. Proteomics and transcriptomics characterization of bile stress response in probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10* (2), M110.002741.
- (28) Wu, R.; Sun, Z.; Wu, J.; Meng, H.; Zhang, H. Effect of bile salts stress on protein synthesis of *Lactobacillus casei* Zhang revealed by 2-dimensional gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93* (8), 3858–3868.
- (29) Han, X.; Dorsey-Oresto, A.; Malik, M.; Wang, J.-Y.; Drlica, K.; Zhao, X.; Lu, T. *Escherichia coli* genes that reduce the lethal effects of stress. *BMC Microbiol.* **2010**, *10*, 35.
- (30) Sleator, R. D.; Wemekamp-Kamphuis, H. H.; Gahan, C. G. M.; Abee, T.; Hill, C. A PrfA-regulated bile exclusion system (BilE) is a novel virulence factor in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **2005**, *55* (4), 1183–1195.
- (31) Whitehead, K.; Versalovic, J.; Roos, S.; Britton, R. A. Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74* (6), 1812–1819.
- (32) Wolfe, A. J. The acetate switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2005**, *69* (1), 12–50.
- (33) Hecker, M.; Antelmann, H.; Büttner, K.; Bernhardt, J. Gel-based proteomics of Gram-positive bacteria: a powerful tool to address physiological questions. *Proteomics* **2008**, *8* (23–24), 4958–4975.
- (34) Augustin, J.-C.; Rosso, L.; Carlier, V. Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *J. Microbiol. Methods* **1999**, *38* (1–2), 137–146.
- (35) Pereira, D. I. A.; Gibson, G. R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68* (9), 4689–4693.
- (36) Sanchez, B.; Champomier-Verges, M.-C.; Collado, M.; Anglade, P.; Baraige, F.; Sanz, Y.; de los Reyes-Gavilan, C. G.; Margolles, A.; Zagorec, M. Low-pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* biotype *longum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73* (20), 6450–6459.
- (37) Izquierdo, E.; Medina, M.; Ennahar, S.; Marchioni, E.; Sanz, Y. Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for *Bifidobacterium longum* strains. *Curr. Microbiol.* **2008**, *56* (6), 613–618.
- (38) Chateau, N.; Deschamps, A. M.; Sassi, A. H. Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. *Lett. Appl. Microbiol.* **1994**, *18* (1), 42–44.
- (39) Jacobsen, C. N.; Rosenfeldt Nielsen, V.; Hayford, A. E.; Møller, P. L.; Michaelsen, K. F.; Parregaard, A.; Sandstrom, B.; Tvede, M.; Jakobsen, M. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65* (11), 4949–4956.
- (40) Yuki, N.; Watanabe, K.; Mike, A.; Tagami, Y.; Tanaka, R.; Ohwaki, M.; Morotomi, M. Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain Shiota, in the gastrointestinal tract: selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies. *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, *48* (1), 51–57.
- (41) Crittenden, R.; Saarela, M.; Mäntö, J.; Ouwehand, A. C.; Salminen, S.; Peltó, L.; Vaughan, E. E.; de Vos, W. M.; von Wright, A.; Fondén, R.; Mattila-Sandholm, T. *Lactobacillus paracasei* subsp.

paracasei F-19: survival, ecology and safety in the human intestinal tract—a survey of feeding studies within the PROBDEMO Project. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2002**, *S3*, 22–26.

(42) Oozeer, R.; Leplingard, A.; Mater, D. D. G.; Mogenet, A.; Michelin, R.; Seksek, L.; Marteau, P.; Doré, J.; Bresson, J.-L.; Corthier, G. Survival of *Lactobacillus casei* in the human digestive tract after consumption of fermented milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72* (8), 5615–5617.

(43) Gaon, D.; Garmendia, C.; Murrielo, N. O.; de Cucco Games, A.; Cerchio, A.; Quintas, R.; González, S. N.; Oliver, G. Effect of *Lactobacillus* strains (*L. casei* and *L. acidophilus* strains cerela) on bacterial overgrowth-related chronic diarrhea. *Medicina (Buenos Aires, Argent.)* **2002**, *62* (2), 159–163.

(44) Larsen, C. N.; Nielsen, S.; Kaestel, P.; Brockmann, E.; Bennedsen, M.; Christensen, H. R.; Eskesen, D. C.; Jacobsen, B. L.; Michaelsen, K. F. Dose-response study of probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* BB-12 and *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* CRL 431 in healthy young adults. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2006**, *60* (11), 1284–1293.

(45) Boels, I. C.; Beerthuyzen, M. M.; Kusters, M. H. W.; Kaauwen, M. P. W. V.; Kleerebezem, M.; de Vos, W. M. Identification and functional characterization of the *Lactococcus lactis rfb* operon, required for dTDP-rhamnose biosynthesis. *J. Bacteriol.* **2004**, *186* (5), 1239–1248.

(46) Budin-Verneuil, A.; Pichereau, V.; Auffray, Y.; Ehrlich, D.; Maguin, E. Proteome phenotyping of acid stress-resistant mutants of *Lactococcus lactis* MG1363. *Proteomics* **2007**, *7* (12), 2038–2046.

(47) Alp, G.; Aslim, B. Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium* spp. isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe* **2010**, *16* (2), 101–105.

(48) Vincent, F.; Yates, D.; Garman, E.; Davies, G. J.; Brannigan, J. A. The three-dimensional structure of the N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase, NagA, from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (4), 2809–2816.

(49) Komatsuzawa, H.; Fujiwara, T.; Nishi, H.; Yamada, S.; Ohara, M.; McCallum, N.; Berger-Bächi, B.; Sugai, M. The gate controlling cell wall synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **2004**, *53* (4), 1221–1231.

(50) Frees, D.; Savijoki, K.; Varmanen, P.; Ingmer, H. Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **2007**, *63* (5), 1285–1295.

(51) Wall, T.; Båth, K.; Britton, R. A.; Jonsson, H.; Versalovic, J.; Roos, S. The early response to acid shock in *Lactobacillus reuteri* involves the ClpL chaperone and a putative cell wall-altering esterase. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73* (12), 3924–3935.

(52) Mizrahi, I.; Biran, D.; Ron, E. Z. Involvement of the Pta-AckA pathway in protein folding and aggregation. *Res. Microbiol.* **2009**, *160* (1), 80–84.

(53) Poolman, B.; Glaasker, E. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **1998**, *29* (2), 397–407.

(54) Pfeiler, E. A.; Azcarate-Peril, M. A.; Klaenhammer, T. R. Characterization of a novel bile-inducible operon encoding a two-component regulatory system in *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bacteriol.* **2007**, *189* (13), 4624–4634.

(55) Bron, P. A.; Molenaar, D.; de Vos, W. M.; Kleerebezem, M. DNA micro-array-based identification of bile-responsive genes in *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *100* (4), 728–738.

(56) Fang, F.; Li, Y.; Bumann, M.; Raftis, E. J.; Casey, P. G.; Cooney, J. C.; Walsh, M. A.; O'Toole, P. W. Allelic variation of bile salt hydrolase genes in *Lactobacillus salivarius* does not determine bile resistance levels. *J. Bacteriol.* **2009**, *191* (18), 5743–5757.

(57) Kleerebezem, M.; Hols, P.; Bernard, E.; Rolain, T.; Zhou, M.; Siezen, R. J.; Bron, P. A. The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* **2010**, *34* (2), 199–230.

ANNEXES

Annexe 1. Différences d'expression entre les protéomes constitutifs totaux des souches *L. casei* ATCC 334, DN-114 001 et Rosell-215 : identification, impact d'un stress biliaire, et corrélation à la tolérance différentielle des souches à la bile observée *in vitro*.

Catégorie fonctionnelle	Protéine	Numéro d'accès ^a	Symbole du gène	Spot ^b	Peptides identifiés	Recouvrement (%)	Volume normalisé en conditions standard (MRSC) ^c						Facteur de variation (bile vs.standard) ^d						
							ATCC 334	DN-114 001	Shirota	F-19	CRL 431	Rosell-215	ATCC 334	DN-114 001	Shirota	F-19	CRL 431	Rosell-215	
Traduction, synthèse et structure des ribosomes	Aspartyl/asparaginyl-tRNA synthase	LSEI_1485	<i>asnC</i>	75	19/22	36	0,113 ± 0,015	0,216 ± 0,043	0,200 ± 0,036	0,189 ± 0,013	0,264 ± 0,027	0,110 ± 0,025	-1,6	-1,0	1,1	-1,6	-3,6	1,0	
	Arginyl-tRNA synthase	LSEI_1728	<i>argS</i>	54	19/25	30	0,047 ± 0,008	0,034 ± 0,007	0,028 ± 0,003	0,033 ± 0,010	0,033 ± 0,001	0,032 ± 0,002	-1,9	-1,3	-1,2	-1,7	-1,3	1,2	
	50S ribosomal protein L4	LSEI_2502	<i>rplD</i>	44	7/7	29	-	0,046 ± 0,002	0,036 ± 0,009	0,033 ± 0,010	0,105 ± 0,009	0,034 ± 0,005	n.a.	1,1	1,3	2,7	10,0	2,6	
	Seryl-tRNA synthase	LSEI_1836	<i>serRS</i>	84	16/25	32	0,084 ± 0,015	0,118 ± 0,014	0,191 ± 0,015	0,045 ± 0,004	0,045 ± 0,004	0,218 ± 0,007	1,0	1,2	-1,9	--	-1,9	-1,1	
	Ribosomal protein L7/L12	LSEI_2272	<i>rplL</i>	57	18/20	67	0,276 ± 0,043	1,568 ± 0,188	1,939 ± 0,281	1,338 ± 0,107	0,932 ± 0,166	1,526 ± 0,074	8,1	1,4	-1,4	1,9	4,2	1,3	
	Threonyl-tRNA synthase	LSEI_1703	<i>thrS</i>	78	29/37	38	0,065 ± 0,015	0,056 ± 0,014	0,041 ± 0,021	0,403 ± 0,064	0,676 ± 0,032	0,347 ± 0,062	1,7	1,3	1,2	-1,3	-4,7	-1,0	
					94	20/33	22	0,091 ± 0,010	0,193 ± 0,018	0,119 ± 0,019	0,015 ± 0,001	0,054 ± 0,022	0,012 ± 0,006	1,0	-4,0	-2,5	--	--	--
					103	8/13	9	-	0,058 ± 0,020	0,103 ± 0,030	0,027 ± 0,010	0,058 ± 0,006	0,008 ± 0,003	n.a.	1,1	-1,2	--	--	1,3
Transcription	Transcription elongation factor GreA	LSEI_1668	<i>greA</i>	2	13/25	51	0,071 ± 0,007	0,130 ± 0,017	0,135 ± 0,018	0,140 ± 0,014	0,116 ± 0,008	0,100 ± 0,008	2,7	2,9	--	--	--	1,7	
Division cellulaire	Cell division initiation protein	LSEI_1478	<i>gpsB</i>	17	7/8	22	-	0,123 ± 0,012	0,132 ± 0,018	0,112 ± 0,018	-	0,110 ± 0,017	++	-1,0	-1,4	1,3	n.a.	1,3	
Transduction du signal	Universal stress protein UspA-like	LSEI_2147	<i>usp1</i>	16	2/3	15	-	0,080 ± 0,007	0,052 ± 0,009	0,092 ± 0,006	0,049 ± 0,005	0,133 ± 0,008	n.a.	2,1	3,4	2,3	1,5	1,5	
	S-ribosyl-homocysteinase	LSEI_0765	<i>luxS</i>	74	6/10	36	0,036 ± 0,011	-	-	0,064 ± 0,010	-	0,066 ± 0,007	5,5	++	++	3,9	++	3,3	
Synthèse de la paroi cellulaire	D-fructose-6-phosphate amidotransferase	LSEI_1019	<i>glmS</i>	66	43/52	43	0,064 ± 0,020	0,247 ± 0,046	0,196 ± 0,041	0,245 ± 0,027	0,381 ± 0,022	0,038 ± 0,006	--	-1,5	1,0	-1,3	-2,6	5,2	
				85	14/20	18	0,050 ± 0,008	0,085 ± 0,009	0,088 ± 0,013	0,064 ± 0,005	0,079 ± 0,004	0,196 ± 0,026	1,9	1,1	3,3	1,7	1,3	1,4	
				97	20/27	30	0,044 ± 0,012	0,098 ± 0,020	0,089 ± 0,018	0,049 ± 0,001	0,055 ± 0,003	-	1,4	-1,6	-1,5	1,5	1,2	n.a.	
	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	LSEI_2012	<i>ribD</i>	108	9/14	21	1,162 ± 0,012	0,227 ± 0,034	0,147 ± 0,019	0,130 ± 0,025	0,101 ± 0,007	0,073 ± 0,007	1,0	1,0	1,6	-1,5	--	2,4	

Catégorie fonctionnelle	Protéine	Numéro d'accès ^a	Symbole du gène	Spot ^b	Peptides identifiés	Recouvrement (%)	Volume normalisé en conditions standard (MRSC) ^c						Facteur de variation (bile vs.standard) ^d					
							ATCC 334	DN-114 001	Shirota	F-19	CRL 431	Rosell-215	ATCC 334	DN-114 001	Shirota	F-19	CRL 431	Rosell-215
	dTDP-glucose pyrophosphorylase	LSEI_2015	<i>ribA</i>	67	9/10	35	0,195 ± 0,019	0,057 ± 0,018	0,071 ± 0,004	0,020 ± 0,003	0,028 ± 0,004	0,042 ± 0,010	-1,5	1,5	-1,9	--	1,6	1,1
				95	23/27	50	-	0,164 ± 0,008	0,220 ± 0,033	-	-	-	n.a.	1,9	-1,0	n.a.	n.a.	n.a.
				98	12/14	23	-	0,040 ± 0,003	0,049 ± 0,003	-	0,015 ± 0,001	-	n.a.	1,3	-1,8	n.a.	--	n.a.
	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	LSEI_2014	<i>ribC</i>	106	11/14	51	0,328 ± 0,029	0,311 ± 0,011	0,180 ± 0,012	0,106 ± 0,011	0,068 ± 0,016	0,088 ± 0,016	-1,3	1,7	-1,1	--	--	1,2
Modifications post-traductionnelles renouvellement des protéines, chaperonnes	Small heat shock protein	LSEI_2800	<i>hsp3</i>	59	28/35	68	0,374 ± 0,03	1,123 ± 0,153	1,095 ± 0,147	0,027 ± 0,005	0,136 ± 0,003	0,440 ± 0,068	2,5	-5,7	-2,3	--	1,1	-2,2
		LSEI_0687	<i>hsp1</i>	60	8/14	37	0,580 ± 0,054	0,327 ± 0,051	0,285 ± 0,044	0,425 ± 0,056	0,051 ± 0,007	0,821 ± 0,124	1,0	--	-5,1	1,0	--	-11,2
	ATP-binding subunit of Clp protease and DnaK/DnaJ chaperones	LSEI_2048	<i>clpL</i>	15	22/31	28	-	-	0,008 ± 0,003	-	0,039 ± 0,013	0,145 ± 0,023	n.a.	n.a.	--	++	--	-1,1
				34	24/38	32	-	0,093 ± 0,015	0,122 ± 0,020	0,038 ± 0,004	0,176 ± 0,009	0,260 ± 0,033	++	-2,7	-3,6	1,3	--	-8,5
				80	56/75	56	0,132 ± 0,011	0,252 ± 0,039	0,443 ± 0,047	0,107 ± 0,012	0,074 ± 0,014	0,818 ± 0,154	2,6	-2,1	-3,8	2,2	-2,3	1,3
Production et conversion énergétiques	Pyruvate dehydrogenase complex, E1 component, beta subunit	LSEI_1306	<i>pdhB</i>	21	31/38	51	0,076 ± 0,009	0,057 ± 0,010	0,055 ± 0,009	-	0,032 ± 0,002	0,063 ± 0,008	--	-1,9	-7,9	n.a.	--	-1,5
				22	32/42	44	-	0,067 ± 0,014	0,076 ± 0,005	0,065 ± 0,005	0,167 ± 0,011	0,107 ± 0,016	++	-1,5	-1,6	-2,2	-1,3	-2,3
	Pyruvate oxidase	LSEI_0433	<i>cidC</i>	29	11/15	20	-	0,059 ± 0,015	0,081 ± 0,030	-	0,101 ± 0,012	0,071 ± 0,012	n.a.	-6,8	-6,7	n.a.	--	-3,7
	L-lactate dehydrogenase	LSEI_2549	<i>ldh</i>	76	48/58	68	0,104 ± 0,015	4,226 ± 0,340	4,777 ± 0,483	6,262 ± 0,121	0,865 ± 0,045	5,531 ± 0,625	-1,8	-1,9	-3,0	-2,1	-2,8	-1,5
	Malate dehydrogenase	LSEI_2607	<i>hicD3</i>	107	15/19	48	0,059 ± 0,009	0,149 ± 0,011	0,178 ± 0,003	0,072 ± 0,004	0,068 ± 0,004	0,064 ± 0,008	1,3	1,5	-1,3	1,0	1,8	1,7
	Phospho-transacetylase	LSEI_0996	<i>pta</i>	9	10/14	23	0,211 ± 0,007	-	-	0,191 ± 0,016	0,024 ± 0,006	0,145 ± 0,011	--	n.a.	n.a.	-1,2	2,4	1,1
	Aryl-alcohol dehydrogenase related enzyme	LSEI_2825	<i>iolS</i>	30	18/26	53	-	0,083 ± 0,009	0,100 ± 0,009	0,065 ± 0,004	0,064 ± 0,002	0,091 ± 0,022	n.a.	1,2	-1,1	--	--	1,1
				52	14/19	36	0,127 ± 0,023	-	-	-	-	-	-4,4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	F ₁ F ₀ -ATPase, delta subunit	LSEI_1163	<i>atpH</i>	26	4/5	13	-	0,026 ± 0,006	0,027 ± 0,011	-	0,015 ± 0,003	0,032 ± 0,004	n.a.	1,7	1,2	n.a.	3,2	1,4
					6	8/13	21	0,113 ± 0,010	-	-	0,099 ± 0,005	0,101 ± 0,015	0,054 ± 0,022	-2,6	n.a.	n.a.	1,2	-1,3
	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	LSEI_2278	<i>gabD</i>	6	8/13	21	0,113 ± 0,010	-	-	0,099 ± 0,005	0,101 ± 0,015	0,054 ± 0,022	-2,6	n.a.	n.a.	1,2	-1,3	1,5
	D-lactate dehydrogenase	LSEI_0145	<i>ldhD</i>	50	11/11	26	0,384 ± 0,040	0,391 ± 0,014	0,398 ± 0,052	0,514 ± 0,021	-	0,517 ± 0,051	-1,1	-1,3	-1,4	1,3	n.a.	-1,1
	Alcohol-acetaldehyde dehydrogenase	LSEI_2125	<i>bdh</i>	89	10/14	25	-	0,042 ± 0,008	0,042 ± 0,001	-	0,041 ± 0,006	0,030 ± 0,004	n.a.	--	1,1	n.a.	--	1,1
	Dihydroxyacetone kinase	LSEI_0420	<i>dhak2</i>	49	12/12	57	0,066 ± 0,008	-	-	-	-	-	--	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Catégorie fonctionnelle	Protéine	Numéro d'accès ^a	Symbole du gène	Spot ^b	Peptides identifiés	Recouvrement (%)	Volume normalisé en conditions standard (MRSC) ^c						Facteur de variation (bile vs.standard) ^d					
							ATCC 334	DN-114 001	Shirota	F-19	CRL 431	Rosell-215	ATCC 334	DN-114 001	Shirota	F-19	CRL 431	Rosell-215
Transport et métabolisme des sucres	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	LSEI_0967	<i>gapA</i>	65	38/50	61	0,279 ± 0,038	2,17 ± 0,182	1,757 ± 0,115	0,726 ± 0,052	1,030 ± 0,102	2,085 ± 0,259	1,3	-3,2	-3,5	-1,2	1,4	-3,1
				71	70/85	68	9,651 ± 0,735	2,341 ± 1,579	5,074 ± 0,300	8,789 ± 0,942	8,660 ± 0,994	3,596 ± 0,698	-1,6	3,0	1,1	1,1	-1,9	2,7
				88	14/24	37	0,170 ± 0,017	-	0,106 ± 0,022	0,176 ± 0,006	0,151 ± 0,007	0,095 ± 0,013	-1,2	++	-1,1	1,3	1,2	1,8
				70	78/94	74	2,573 ± 0,365	11,466 ± 1,461	6,154 ± 0,254	3,239 ± 0,076	4,226 ± 0,269	8,405 ± 0,996	1,5	-2,7	-2,3	1,5	1,7	-1,7
	Enolase	LSEI_0970	<i>eno</i>	58	42/51	60	0,189 ± 0,017	0,570 ± 0,068	0,674 ± 0,032	0,733 ± 0,040	0,726 ± 0,075	0,666 ± 0,120	4,5	-1,0	-2,1	1,7	1,3	1,2
	Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	LSEI_2885	<i>mtlD</i>	40	23/30	59	-	0,111 ± 0,011	0,145 ± 0,017	0,239 ± 0,018	0,068 ± 0,005	0,110 ± 0,028	++	-1,5	-2,8	-6,4	-3,7	-1,9
	6-phosphogluconate dehydrogenase	LSEI_1681	<i>gndA</i>	55	10/13	21	0,156 ± 0,009	0,046 ± 0,010	0,054 ± 0,012	0,054 ± 0,003	0,045 ± 0,007	-	-2,9	1,3	-1,2	-1,3	-2,7	n.a.
				81	26/40	39	0,083 ± 0,008	0,119 ± 0,012	0,123 ± 0,015	0,523 ± 0,040	0,517 ± 0,042	0,255 ± 0,014	1,5	-1,2	-1,5	-3,6	-4,3	1,1
				104	35/48	53	0,082 ± 0,002	0,320 ± 0,027	0,315 ± 0,022	-	-	-	--	-1,5	-1,9	n.a.	n.a.	n.a.
	Glucosamine-6-phosphate isomerase	LSEI_2889	<i>nagB</i>	83	18/22	52	0,027 ± 0,018	0,075 ± 0,019	0,115 ± 0,012	0,356 ± 0,015	0,054 ± 0,007	0,176 ± 0,024	--	1,2	-1,3	-3,8	-1,2	-2,0
	Pyruvate kinase	LSEI_1365	<i>pyk</i>	77	56/65	53	0,310 ± 0,044	0,301 ± 0,035	0,393 ± 0,029	0,083 ± 0,012	0,165 ± 0,022	0,086 ± 0,013	-1,3	-1,8	-1,5	-1,4	-3,0	-1,8
	Phosphoglycerate mutase 1	LSEI_2134	<i>gpmA</i>	63	10/16	31	0,159 ± 0,006	0,207 ± 0,063	0,188 ± 0,014	2,369 ± 0,063	0,148 ± 0,016	0,142 ± 0,001	1,1	-1,2	-1,4	-1,4	1,3	1,2
				90	12/18	36	-	0,165 ± 0,033	0,057 ± 0,005	-	0,092 ± 0,01	0,096 ± 0,021	n.a.	-5,7	-2,4	n.a.	1,9	-1,8
	Phospho-glucumutase	LSEI_0949	<i>pgm</i>	10	24/32	32	0,113 ± 0,013	0,073 ± 0,012	0,048 ± 0,007	0,055 ± 0,008	0,066 ± 0,015	0,177 ± 0,018	-3,9	-2,0	-1,1	-1,1	-2,5	-3,8
				62	26/35	41	0,103 ± 0,006	0,272 ± 0,054	0,323 ± 0,06	0,404 ± 0,055	0,244 ± 0,016	0,124 ± 0,025	-3,2	-1,4	-1,3	-4,6	-4,0	1,5
				79	20/31	28	0,099 ± 0,024	-	-	-	-	-	-3,4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
				87	16/27	28	0,116 ± 0,012	0,017 ± 0,006	0,018 ± 0,006	0,024 ± 0,004	0,025 ± 0,004	0,053 ± 0,010	-3,0	--	2,1	2,8	2,1	-1,5
				102	9/22	18	-	0,067 ± 0,020	0,091 ± 0,020	0,078 ± 0,019	0,065 ± 0,009	0,015 ± 0,025	n.a.	-1,2	-1,0	-1,7	-1,3	5,6
	Mannose-6-phosphate isomerase type I	LSEI_0292	<i>manA</i>	32	16/18	22	-	0,065 ± 0,003	0,089 ± 0,018	0,112 ± 0,019	0,069 ± 0,003	0,071 ± 0,011	n.a.	1,4	-1,1	--	1,0	1,2
	N-acetyl-glucosamine-6-phosphate deacetylase	LSEI_1808	<i>nagA</i>	3	23/27	31	-	-	0,027 ± 0,006	-	0,039 ± 0,007	0,300 ± 0,009	n.a.	n.a.	--	n.a.	--	-1,1
39				15/19	32	0,297 ± 0,025	0,233 ± 0,029	0,378 ± 0,003	0,377 ± 0,025	0,340 ± 0,018	-	-1,2	-1,0	-2,6	-2,0	-3,2	n.a.	
Dihydroxyacetone kinase, DhaL subunit	LSEI_0420	<i>dhak2</i>	25	8/10	33	-	0,045 ± 0,007	0,061 ± 0,010	-	0,039 ± 0,005	0,069 ± 0,008	n.a.	1,6	-1,3	n.a.	-1,7	1,3	
6-phospho-beta-galactosidase	LSEI_A04	<i>lacG</i>	93	17/23	30	0,057 ± 0,004	0,187 ± 0,027	0,163 ± 0,042	-	0,028 ± 0,004	-	1,5	-14,3	n.a.	--	--	n.a.	
Phosphotransferase system, mannose/fructose-specific component IIA	LSEI_2829	<i>manL</i>	68	15/21	32	0,087 ± 0,005	0,236 ± 0,020	0,175 ± 0,027	0,132 ± 0,017	0,142 ± 0,010	0,258 ± 0,002	-3,5	1,2	-1,4	-1,9	-1,0	-2,9	

Catégorie fonctionnelle	Protéine	Numéro d'accès ^a	Symbole du gène	Spot ^b	Peptides identifiés	Recouvrement (%)	Volume normalisé en conditions standard (MRSC) ^c						Facteur de variation (bile vs.standard) ^d					
							ATCC 334	DN-114 001	Shirota	F-19	CRL 431	Rosell-215	ATCC 334	DN-114 001	Shirota	F-19	CRL 431	Rosell-215
	Phosphoenolpyruvat e-protein kinase	LSEI_1759	<i>ptsA</i>	92	9/13	17	-	0,626 ± 0,068	0,327 ± 0,091	1,064 ± 0,128	1,289 ± 0,024	0,901 ± 0,068	++	1,8	2,0	-1,9	-14,0	1,3
	Tagatose 1,6-diphosphate aldolase	LSEI_2597	<i>lacD</i>	5	13/18	36	0,093 ± 0,006	-	0,032 ± 0,007	0,083 ± 0,008	0,061 ± 0,003	0,107 ± 0,019	--	n.a.	--	--	--	--
Transport et métabolisme des acides aminés	Aminopeptidase P	LSEI_1643	<i>pepQ1</i>	69	8/10	30	0,064 ± 0,008	0,032 ± 0,006	0,033 ± 0,005	0,067 ± 0,002	0,049 ± 0,004	0,126 ± 0,037	-2,5	3,5	2,0	-2,3	-2,7	1,9
	Dipeptidase PepV	LSEI_0813	<i>pepV</i>	105	12/16	25	0,141 ± 0,010	0,271 ± 0,039	-	0,071 ± 0,009	0,080 ± 0,007	0,049 ± 0,006	--	1,5	++	--	--	--
	Glutamine transport ATP-binding protein	LSEI_2022	<i>glnQ</i>	99	3/4	12	-	0,096 ± 0,020	0,038 ± 0,007	-	0,018 ± 0,002	0,032 ± 0,004	n.a.	-10,5	-3,6	n.a.	--	-4,2
	Oligoendopeptidase F	LSEI_0745	<i>pepF</i>	23	12/15	19	-	0,037 ± 0,015	0,034 ± 0,012	0,056 ± 0,013	0,094 ± 0,009	0,036 ± 0,007	n.a.	1,3	-1,2	-2,0	-4,5	1,5
	HTH containing DNA-binding domain and MocR-like aminotransferase	LSEI_2648	<i>avtA</i>	14	14/15	25	-	0,018 ± 0,008	0,081 ± 0,004	0,087 ± 0,017	0,491 ± 0,04	0,076 ± 0,008	n.a.	-1,1	--	--	--	-8,2
	Bifunctional beta-cystathionase/maltose regulon repressor	LSEI_0894	<i>malY</i>	33	10/13	19	-	0,090 ± 0,024	0,056 ± 0,006	-	0,183 ± 0,012	0,086 ± 0,018	n.a.	1,1	-1,3	n.a.	--	1,3
	Peptidase T	LCABL_03060	<i>pepT2</i>	91	12/18	45	-	0,056 ± 0,008	0,113 ± 0,040	-	-	-	n.a.	4,1	2,0	++	++	++
	ABC-type proline/glycine betaine transport system, ATPase component	LSEI_0066	<i>opuA</i>	24	5/6	13	-	0,038 ± 0,009	0,026 ± 0,001	0,075 ± 0,009	-	0,029 ± 0,006	++	1,1	1,4	-2,2	n.a.	2,0
	Dipeptidase A	LSEI_1983	<i>pepD3</i>	61	17/18	33	0,041 ± 0,009	0,097 ± 0,023	0,068 ± 0,011	0,027 ± 0,005	0,075 ± 0,018	0,116 ± 0,030	1,5	-1,4	-1,2	1,8	-1,4	1,1
Transport et métabolisme des nucléotides	Adenylosuccinate synthase	LSEI_0122	<i>purA</i>	72	19/22	34	0,236 ± 0,046	0,096 ± 0,018	0,137 ± 0,018	0,548 ± 0,017	0,542 ± 0,032	0,256 ± 0,019	--	1,0	-1,7	-4,9	-12,6	-1,2
	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	LSEI_1468	<i>nrdE</i>	73	19/23	23	0,035 ± 0,013	0,146 ± 0,025	0,141 ± 0,023	0,086 ± 0,008	0,036 ± 0,004	0,064 ± 0,018	3,1	1,4	-1,1	-1,2	-1,6	2,5
Transport et métabolisme des coenzymes	Pyruvate oxidase	LSEI_0433	<i>cidC</i>	29	11/15	20	-	0,059 ± 0,015	0,081 ± 0,03	-	0,101 ± 0,012	0,071 ± 0,012	n.a.	-6,8	-6,7	n.a.	--	-3,7
	Putative uncharacterized protein yqeK	LSEI_1687	<i>yqeK</i>	27	12/17	46	-	0,034 ± 0,001	0,038 ± 0,007	0,084 ± 0,002	0,042 ± 0,002	0,058 ± 0,008	n.a.	1,3	-1,8	--	-1,2	-1,0
Transport et métabolisme des ions inorganiques	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, ATPase component	LSEI_2062	<i>oppD</i>	101	6/9	20	-	1,098 ± 0,004	0,062 ± 1,007	-	-	-	n.a.	-1,9	1,2	n.a.	n.a.	n.a.
	Copper resistance protein	LSEI_0905	<i>cutC</i>	19	9/9	34	-	0,087 ± 0,015	0,084 ± 0,010	0,079 ± 0,006	0,091 ± 0,004	0,045 ± 0,012	++	2,0	1,3	1,2	1,9	2,2

Catégorie fonctionnelle	Protéine	Numéro d'accès ^a	Symbole du gène	Spot ^b	Peptides identifiés	Recouvrement (%)	Volume normalisé en conditions standard (MRSC) ^c						Facteur de variation (bile vs.standard) ^d					
							ATCC 334	DN-114 001	Shirota	F-19	CRL 431	Rosell-215	ATCC 334	DN-114 001	Shirota	F-19	CRL 431	Rosell-215
	Putative Toxic anion resistance protein YaaN	LSEI_1284	<i>yaaN</i>	45	18/20	37	-	0,036 ± 0,006	0,046 ± 0,008	0,028 ± 0,006	0,045 ± 0,003	0,041 ± 0,001	++	5,6	2,3	2,4	-1,1	4,9
	Aluminum resistance protein	LSEI_1655	<i>alu2</i>	18	6/10	14	-	0,057 ± 0,020	0,062 ± 0,011	0,054 ± 0,008	0,060 ± 0,008	0,048 ± 0,001	n.a.	1,0	-1,5	-1,6	-1,4	1,1
Transport, catabolisme et biosynthèse des métabolites secondaires	D-alanine-activating enzyme	LSEI_0794	<i>dltA</i>	20	26/36	18	0,054 ± 0,003	0,098 ± 0,020	0,104 ± 0,021	0,077 ± 0,004	0,159 ± 0,02	0,083 ± 0,008	-2,9	1,5	-2,5	-1,4	-4,1	1,2
				53	6/7	7	0,070 ± 0,006	-	-	-	-	-	1,2	++	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Fonction générale	Esterase C	LCABL_035_50	<i>estC</i>	36	20/27	67	-	0,337 ± 0,042	0,406 ± 0,059	-	-	0,447 ± 0,079	n.a.	-1,8	-2,9	n.a.	n.a.	-1,7
				37	5/6	15	-	-	-	-	0,111 ± 0,007	0,121 ± 0,025	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-3,8	-1,2
	Phosphoesterase, DHH family protein	LSEI_0781	-	-	3/5	10	-	0,065 ± 0,010	0,069 ± 0,006	0,125 ± 0,001	0,066 ± 0,004	0,070 ± 0,005	++	1,5	-1,2	-1,1	1,5	1,2
					2,5-diketo-D-gluconate reductase	LSEI_0758	<i>dkg</i>	13	23/29	45	0,116 ± 0,007	-	-	0,129 ± 0,022	0,157 ± 0,015	0,293 ± 0,023	-4,4	n.a.
	35	11/13	23	-				0,202 ± 0,010	0,222 ± 0,028	0,023 ± 0,009	0,030 ± 0,004	0,061 ± 0,013	n.a.	-1,1	-2,5	--	--	-4,2
	100	10/13	35	-				0,092 ± 0,010	0,096 ± 0,019	-	-	-	n.a.	-3,0	-3,3	n.a.	n.a.	n.a.
	Aldo/keto reductase	LCABL_25_770	-	-	31	15/22	49	-	0,105 ± 0,013	0,124 ± 0,020	0,051 ± 0,002	0,050 ± 0,007	0,053 ± 0,007	n.a.	-1,1	-1,4	1,0	--
LSEI_0225					<i>ycgG</i>	86	15/20	60	0,077 ± 0,012	0,166 ± 0,008	0,190 ± 0,020	0,010 ± 0,007	0,335 ± 0,044	0,180 ± 0,017	-3,8	--	-2,8	--
Dihydroxyacetone kinase-like protein	LSEI_1616	-	-	4	10/13	21	-	-	-	0,226 ± 0,03	0,544 ± 0,057	0,174 ± 0,012	n.a.	++	++	--	-8,8	-1,7
Dioxygenase	LSEI_2117	<i>fabK</i>	96	16/25	22	0,024 ± 0,005	0,075 ± 0,017	0,107 ± 0,004	-	-	-	--	--	--	n.a.	n.a.	n.a.	
Fonction inconnue ou présumée	Protein of unknown function LSEI_1022	LSEI_1022	-	1	12/16	37	0,179 ± 0,029	0,296 ± 0,018	0,115 ± 0,020	0,117 ± 0,005	0,182 ± 0,023	0,228 ± 0,005	-8,2	-5,9	-5,3	-2,7	-5,4	-5,8
				82	9/14	27	0,166 ± 0,028	0,218 ± 0,024	0,245 ± 0,067	0,548 ± 0,016	0,717 ± 0,067	0,311 ± 0,033	-1,1	2,2	-1,3	-1,0	1,6	-1,1
Protein of unknown function LSEI_1559	LSEI_1559	-	-	56	6/8	33	0,072 ± 0,010	0,111 ± 0,023	0,227 ± 0,034	0,321 ± 0,025	0,149 ± 0,010	0,350 ± 0,032	1,6	-1,5	-4,1	--	--	-2,0

^aNuméro d'accès dans la base de données NCBIInr.

^bNuméro de spot correspondant à la Figure 14.

^cVolume normalisé, exprimé sous la forme d'un pourcentage du volume de l'ensemble des spots validés. Les moyennes ± écart type de trois répliquats biologiques sont indiquées. '-': non détecté.

^dRapport r des volumes des spots en conditions stressantes et standard pour la souche considérée. Le facteur de variation est égal à r si r > 1 et à -1/r autrement. -- : spot non détecté en conditions stressantes ; ++ : spot non détecté en conditions standard ; n.a. : non applicable (spot non détecté dans les deux conditions).

Annexe 2. Identification des protéines différemment exprimées dans les extraits protéiques totaux de *L. plantarum* CECT 4185, CIP A159 et LC 804 cultivées en conditions standard.

Catégorie fonctionnelle	Protéine	Numéro d'accès ^a	Symbole du gène	Spot ^b	Peptides identifiés	Recouvrement (%)	Volume normalisé en conditions standard (MRSC) ^c		
							CECT 4185	CIP A159	LC 804
Traduction, synthèse et structure des ribosomes	cysteine-tRNA ligase	lp_0610	<i>cysS</i>	19	04/05	11	-	0,044±0,002	0,039±0,004
	seryl-tRNA synthase	lp_1012	<i>serS2</i>	32	10/10	16	0,046±0,003	0,231±0,009	0,065±0,005
	glutamy-tRNA amidotransferase, subunit A	lp_1148	<i>gatA</i>	41	21/22	42	0,101±0,005	-	-
				67	13/19	13	-	0,092±0,003	0,120±0,004
	histidyl-tRNA synthase	lp_1981	<i>hisS</i>	44	14/18	30	0,085±0,003	-	-
				72	12/12	30	0,010±0,002	0,091±0,006	0,076±0,010
	threonine-tRNA ligase 1	lp_1514	<i>thrS</i>	58	23/31	27	0,253±0,008	0,048±0,009	0,069±0,003
				100	16/18	25	0,114±0,010	0,276±0,012	0,249±0,017
	glycine-tRNA ligase	lp_1964	<i>glyRS</i>	60	06/11	12	0,072±0,003	0,069±0,004	0,021±0,004
				89	08/10	16	-	-	0,073±0,003
lysyl-tRNA synthase	lp_0550	<i>lysS</i>	79	05/09	12	-	-	0,082±0,004	
			94	10/15	31	0,084±0,004	0,087±0,005	0,258±0,007	
30S ribosomal protein S2	lp_2055	<i>rpsB</i>	102	16/17	38	0,059±0,010	0,148±0,011	0,224±0,009	
Transcription	transcription regulator	lp_1153	-	59	24/33	47	0,147±0,010	0,153±0,005	0,071±0,004
Division cellulaire	cell shape determining protein MreB	lp_2359	<i>mreB2</i>	93	05/07	10	0,041±0,003	0,046±0,004	0,408±0,010
Synthèse de la paroi cellulaire/la membrane/l'enveloppe	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	lp_1189	<i>rfbB</i>	14	04/04	11	-	0,050±0,002	-
				51	11/12	28	0,083±0,011	-	-
	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	lp_1188	<i>rfbC</i>	42	07/08	36	0,153±0,006	-	-
	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate synthase	lp_2197	<i>murD</i>	53	05/05	13	0,038±0,004	-	-
				91	03/07	5	0,005±0,002	0,032±0,004	0,039±0,003
UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	lp_0467	<i>glmU</i>	57	09/11	25	0,046±0,003	0,023±0,004	0,009±0,002	
UDP-galactopyranose mutase	lp_1176	<i>glf1</i>	98	11/12	32	0,041±0,003	0,013±0,002	0,186±0,011	
Modifications post-traductionnelles renouvellement des protéines, chaperonnes	heat shock protein GrpE	lp_2028	<i>grpE</i>	4	07/09	33	0,033±0,003	0,077±0,004	0,065±0,004
	methionine sulfoxide reductase B	lp_1836	<i>msrA3</i>	12	03/04	20	-	0,039±0,003	-
	PyrD protein	lp_2699	<i>pyrD</i>	30	11/19	41			
	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpL	lp_3583	<i>clpL</i>	62	69/76	43	0,527±0,021	0,264±0,011	0,179±0,009
96				39/40	32	0,031±0,008	0,029±0,005	0,688±0,014	

Catégorie fonctionnelle	Protéine	Numéro d'accès ^a	Symbole du gène	Spot ^b	Peptides identifiés	Recouvrement (%)	Volume normalisé en conditions standard (MRSC) ^c				
							CECT 4185	CIP A159	LC 804		
	small heat shock protein	lp_3352	<i>hsp3</i>	99	31/36	53	0,417±0,027	1,104±0,065	1,657±0,143		
Production et conversion énergétiques	L-lactate dehydrogenase	lp_0537	<i>ldhL</i>	5	47/51	65	0,899±0,017	1,739±0,148	-		
				74	29/34	60	-	-	0,846±0,094		
				80	08/15	13	0,077±0,006	0,081±0,005	2,196±0,149		
	oxidoreductase	lp_0137	<i>tas</i>	8	10/13	22	0,078±0,003	0,053±0,004	0,025±0,004		
	glutathione reductase	lp_1253	<i>gshR2</i>	9	83/98	69	-	0,971±0,026	-		
				lp_3267	<i>gshR4</i>	18	35/41	55	0,017±0,004	0,367±0,037	0,032±0,009
						84	31/37	51	-	-	0,218±0,007
	citrate lyase, alpha chain	lp_1109	<i>citF</i>	48	07/08	13	0,089±0,003	-	-		
				38	05/07	8	0,037±0,005	0,053±0,004	0,010±0,003		
					82	10/15	21	-	-	0,067±0,004	
	phosphotransacetylase	lp_0807	<i>pta</i>	43	15/17	36	0,047±0,004	-	-		
	acetate kinase	lp_0210	<i>ack1</i>	47	03/05	14	0,682±0,061	-	-		
	pyruvate dehydrogenase complex, E1 component, beta subunit	lp_2153	<i>pdhB</i>	54	10/13	21	0,057±0,007	-	-		
				75	04/04	14	-	-	0,084±0,010		
Métabolisme et transport des sucres	dihydroxyacetone kinase	lp_0169	<i>dak2</i>	1	21/26	35	-	0,183±0,011	-		
	glycerone kinase	lp_0168	<i>dak1B</i>	6	24/25	36	-	0,471±0,094	-		
	maltose phosphorylase	lp_1730	<i>map3</i>	7	06/12	11	0,167±0,023	0,084±0,007	-		
	N-acetyl-glucosamine-6-phosphate deacetylase	lp_0562	<i>nagA</i>	31	07/10	19	0,129±0,013	0,361±0,017	0,216±0,013		
	mannose PTS, EIIAB	lp_0575	<i>pts9AB</i>	39	17/22	38	0,297±0,017	0,202±0,010	-		
				97	15/19	21	0,053±0,004	0,032±0,004	0,279±0,016		
	1-phospho-fructokinase	lp_2096	<i>fruk</i>	35	14/16	58	0,332±0,010	0,621±0,014	0,161±0,008		
				68	07/08	16	0,021±0,004	0,187±0,009	0,124±0,008		
	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	lp_0789	<i>gapB</i>	46	05/07	16	0,077±0,004	-	-		
				61	60/74	71	6,427±0,321	3,566±0,273	4,007±0,199		
				65	48/58	57	1,480±0,178	0,755±0,033	0,604±0,024		
	mannose-6-phosphate isomerase	lp_2384	<i>pmi</i>	49	09/12	18	0,134±0,009	-	-		
				70	10/17	13	-	0,117±0,007	0,108±0,008		
6-phospho-beta-glucosidase	lp_2778	<i>pbg5</i>	55	03/05	10	0,030±0,004	0,053±0,004	-			
mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	lp_0233	<i>mtlD</i>	56	15/16	36	0,098±0,010	0,046±0,004	0,077±0,003			

Catégorie fonctionnelle	Protéine	Numéro d'accès ^a	Symbole du gène	Spot ^b	Peptides identifiés	Recouvrement (%)	Volume normalisé en conditions standard (MRSC) ^c		
							CECT 4185	CIP A159	LC 804
	multiple sugar ABC transporter, ATP binding protein	lp_0180	<i>msmK1</i>	73	08/10	24	-	0,028±0,005	0,061±0,003
	phosphoketolase	lp_3551	<i>xpk2</i>	85	07/13	7	-	-	0,139±0,011
				86	09/11	12	-	0,011±0,002	0,124±0,006
				87	08/11	9	-	0,030±0,004	0,066±0,004
	fructose-bisphosphate aldolase	lp_0330	<i>fba</i>	101	21/23	46	0,241±0,014	0,263±0,010	0,548±0,019
Métabolisme et transport des acides aminés	glutaminase of carbamoyl-phosphate synthase	lp_2701	<i>pyrAA</i>	26	08/10	29	0,030±0,004	0,155±0,006	0,057±0,005
	dihydrodipicolinate reductase	lp_1874	<i>dapB</i>	40	10/10	44	0,073±0,004	-	-
	aromatic amino acid aminotransferase	lp_1280	<i>araT1</i>	71	07/07	24	-	0,048±0,004	0,077±0,004
	L-iditol 2-dehydrogenase	lp_3545	<i>gutB</i>	76	07/08	20	-	-	0,056±0,002
				77	16/20	40	-	-	0,090±0,001
	5-methyl-tetrahydroteroyl triglutamate homocysteine methyltransferase	lp_1375	<i>metE</i>	88	10/12	17	-	-	0,026±0,002
	asparagine synthase	lp_0980	<i>asnB1</i>	90	04/08	7	-	-	0,038±0,003
Métabolisme et transport des nucléotides	aspartate carbamoyltransferase	lp_2703	<i>pyrB</i>	17	09/12	29	0,022±0,003	0,161±0,004	0,009±0,002
	orotate phosphoribosyltransferase	lp_2697	<i>pyrE</i>	24	31/36	45	0,049±0,005	0,282±0,009	0,034±0,003
	pyrimidine regulatory protein PyrR	lp_2704	<i>pyrR</i>	29	15/16	41	0,319±0,017	1,005±0,103	0,475±0,023
	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	JDM1_2556	<i>guaB</i>	33	30/35	48	0,254±0,009	0,589±0,015	0,322±0,008
				66	06/07	24	-	-	0,088±0,005
	dihydroorotase, carbamoylaspartic dehydrase	lp_2702	<i>pyrC</i>	34	12/13	34	0,028±0,003	0,087±0,003	0,061±0,004
	adenylosuccinate synthase	lp_3270	<i>purA</i>	63	28/31	37	0,282±0,013	0,069±0,005	0,133±0,007
Métabolisme et transport des coenzymes	dihydropteroate synthase	lp_3294	<i>folP</i>	16	07/10	18	0,489±0,008	0,061±0,005	-
Métabolisme et transport des lipides	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase	JDM1_1529	<i>ispD</i>	36	08/11	30	0,086±0,004	0,077±0,004	-
	S-malonyltransferase	lp_1673	<i>fabD</i>	69	03/05	17	-	0,044±0,003	0,047±0,010
Métabolisme et transport des ions inorganiques	catalase	lp_3578	<i>kat</i>	11	05/06	19	-	0,080±0,004	-
				23	35/47	39	0,038±0,004	0,402±0,015	0,060±0,005
Fonction générale	oxidoreductase	lp_3403	-	10	24/36	44	-	0,234±0,007	-
				83	21/27	46	0,204±0,038	-	0,225±0,033

Catégorie fonctionnelle	Protéine	Numéro d'accès ^a	Symbole du gène	Spot ^b	Peptides identifiés	Recouvrement (%)	Volume normalisé en conditions standard (MRSC) ^c		
							CECT 4185	CIP A159	LC 804
	NADH peroxidase	lp_2544	<i>npr2</i>	20	08/13	33	-	0,170±0,007	-
				27	24/33	44	0,083±0,005	0,398±0,021	0,091±0,007
	oxidoreductase	lp_0221	-	37	04/05	16	0,055±0,011	0,053±0,008	-
				lp_2346	-	52	05/06	18	0,036±0,003
Fonction inconnue ou présumée	hypothetical protein lp_2113	lp_2113	-	2	22/24	50	-	0,210±0,013	-
				3	18/22	50	-	0,298±0,015	-
	hypothetical protein lp_1972	lp_1972	-	13	04/07	16	-	0,069±0,005	-
	hypothetical protein lp_0513	lp_0513	-	15	06/06	16	0,031±0,004	0,040±0,003	-
	hypothetical protein lp_0139	lp_0139	-	28	08/10	6	0,122±0,008	0,158±0,019	0,037±0,004
				95	08/09	10	0,011±0,003	0,056±0,004	0,214±0,007
	alkaline shock protein	lp_0929	<i>asp1</i>	64	29/38	66	0,522±0,027	0,092±0,030	0,233±0,031

^aNuméro d'accès dans la base de données NCBI nr.

^bNuméro de spot correspondant à la Figure 18.

^cVolume normalisé, exprimé sous la forme d'un pourcentage du volume de l'ensemble des spots validés. Les moyennes ± écart type de trois réplicats biologiques sont indiquées. '-': non détecté.

Annexe 3. Identification des protéines différemment exprimées dans les extraits protéiques totaux de *L. plantarum* LC 56, LC 804 et 299V cultivées en conditions standard.

Catégorie fonctionnelle	Protéine identifiée	Numéro d'accès ^a	Symbole du gène	Spot ^b	Peptides identifiés	Recouvrement (%)	Volume normalisé en conditions standard (MRSC) ^c		
							LC 56	LC 804	299V
Traduction, synthèse et structure des ribosomes	elongation factor P	gij28378297	<i>efp</i>	7	12/14	24	-	0,487±0,014	0,159±0,022
				44	22/29	56	0,397±0,038	-	-
	lysyl-tRNA synthase	gij28377434	<i>lysS</i>	13	18/26	29	-	0,085±0,008	0,038±0,019
	seryl-tRNA synthase	gij28377821	<i>serS2</i>	20	24/28	39	-	0,140±0,021	0,056±0,007
	aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit β	gij28377927	<i>gatB</i>	25	61/71	58	-	0,171±0,016	0,089±0,014
	tyrosyl-tRNA synthase	gij28379288	<i>tyrS</i>	33	15/18	27	-	0,069±0,010	0,053±0,007
	ribosomal protein L10	gij28377497	<i>rpI</i>	40	33/36	48	0,664±0,056	-	-
				82	43/45	62	0,065±0,007	0,725±0,032	0,413±0,015
	ribosomal protein L12/L7	gij28377498	<i>rpL</i>	54	11/15	56	0,316±0,035	-	-
	elongation factor G	gij28377830	<i>fusA2</i>	56	89/110	61	0,867±0,071	1,275±0,149	0,038±0,010
				83	77/91	63	0,286±0,031	0,076±0,006	0,075±0,009
	ribosomal protein S30EA	gij28377598	-	62	10/10	38	0,154±0,017	-	-
30S ribosomal protein S2	gij28378686	<i>fusA</i>	68	64/69	63	0,563±0,016	3,278±0,382	0,104±0,017	
methionyl-tRNA formyltransferase	gij28378316	<i>fmt</i>	81	12/16	26	-	0,117±0,006	0,046±0,003	
Transcription	response regulator	gij28377004	<i>rrp1</i>	21	19/21	33	-	0,082±0,005	0,032±0,004
	transcription regulator (putative)	gij28377930	-	32	19/21	52	-	0,088±0,009	0,213±0,026
	transcription antitermination protein NusG	gij28377493	<i>nusG</i>	39	5/8	30	0,069±0,021	-	-
	cold shock protein CspC	gij28377809	<i>cspC</i>	67	12/15	79	-	0,594±0,041	0,101±0,011
Synthèse de la paroi cellulaire et de la membrane	bile salt hydrolase	gij28379847	<i>bsh1</i>	11	20/23	54	-	-	0,156±0,054
	dihydrodipicolinate synthase	gij28378743	<i>dapA1</i>	15	17/21	44	-	0,068±0,005	0,058±0,008
	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	gij28377962	<i>rfbC</i>	42	9/12	35	0,141±0,028	-	-
	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	gij28379564	<i>cfa2</i>	64	10/13	21	-	0,153±0,006	0,031±0,004
72				12/13	29	-	0,099±0,009	0,050±0,002	
Protéines de stress, chaperonnes	α-small heat shock protein	gij28377077	<i>hsp1</i>	1	23/26	59	0,028±0,015	0,088±0,013	0,282±0,057
		gij28379699	<i>hsp3</i>	4	28/38	79	-	0,707±0,043	0,342±0,082

Catégorie fonctionnelle	Protéine identifiée	Numéro d'accès ^a	Symbole du gène	Spot ^b	Peptides identifiés	Recouvrement (%)	Volume normalisé en conditions standard (MRSC) ^c		
							LC 56	LC 804	299V
	co-chaperonin GroES	gij28377590	<i>groES</i>	6	54/62	66	-	0,649±0,029	0,444±0,071
				38	18/21	59	0,758±0,084	0,089±0,011	-
	UDP-glucose pyrophosphorylase	gij28377616	<i>galU</i>	66	22/24	49	0,266±0,044	-	-
	chaperonin GroEL	gij28377591	<i>groEL</i>	76	150/178	69	7,367±0,298	9,379±0,638	12,992±1,464
	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	gij28377639	<i>clpP</i>	77	24/26	67	-	0,177±0,048	0,165±0,030
Production et conversion énergétiques	phosphotransacetylase	gij28377658	<i>eutD</i>	10	17/18	39	-	0,277±0,030	0,271±0,044
	glutathione reductase	gij28379636	<i>gshR4</i>	19	35/38	53	0,320±0,058	0,020±0,001	0,277±0,034
		gij28270115	<i>gshR1</i>	24	21/25	47	-	0,286±0,003	0,239±0,042
	phosphotransacetylase	gij28377658	<i>pta</i>	47	11/12	26	0,064±0,008	-	-
	L-lactate dehydrogenase	gij28377422	<i>ldhL1</i>	58	10/10	11	0,137±0,016	0,695±0,060	-
	F ₁ F ₀ ATP synthase subunit delta	gij28378941	<i>atpH</i>	90	9/9	41	-	0,057±0,005	0,093±0,016
Métabolisme et transport des sucres	phosphoglyceromutase	gij28379560	<i>gpmA</i>	5	18/20	39	-	0,245±0,029	0,168±0,013
				9	60/70	73	-	1,931±0,201	1,684±0,148
				43	52/57	73	3,113±0,263	-	-
	6-phosphofructokinase	gij28378549	<i>pfkA</i>	16	31/39	49	-	0,462±0,068	0,121±0,013
	citrate lyase, beta chain	gij28377896	<i>citE</i>	17	27/32	56	-	-	0,092±0,014
	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	gij28379186	<i>gpd</i>	26	52/56	59	-	0,119±0,014	0,166±0,008
	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	gij28377642	<i>gapB</i>	29	25/33	49	-	-	0,112±0,019
	1-phosphofructokinase	gij28378718	<i>fruK</i>	55	19/21	44	0,163±0,006	0,153±0,011	-
	galactokinase	gij28379798	<i>galK</i>	79	49/52	49	0,684±0,058	0,026±0,008	0,024±0,005
	6-phosphogluconate dehydrogenase	gij28378252	<i>gnd2</i>	87	26/33	47	-	0,334±0,031	0,126±0,014
Métabolisme et transport des acides aminés	glycine/betaine/carnitine/choline ABC transporter, ATP-binding protein	gij28378307	<i>opuA</i>	18	15/21	34	-	0,056±0,001	0,054±0,004
	cystathionine beta-lyase	gij28377181	<i>metC1</i>	37	16/20	33	-	-	0,087±0,006
	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase	gij28378858	<i>dapD</i>	45	15/16	24	0,205±0,022	-	-

Catégorie fonctionnelle	Protéine identifiée	Numéro d'accès ^a	Symbole du gène	Spot ^b	Peptides identifiés	Recouvrement (%)	Volume normalisé en conditions standard (MRSC) ^c		
							LC 56	LC 804	299V
	glycine hydroxymethyltransferase	gij28378947	<i>glyA</i>	50	9/11	23	0,190±0,024	-	-
				86	6/6	18	0,278±0,045	-	-
	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	gij28379104	<i>asd2</i>	63	22/26	50	0,222±0,008	0,174±0,022	-
	glycine hydroxymethyltransferase	gij28378947	<i>glyA</i>	65	35/42	33	0,296±0,014	0,111±0,010	0,069±0,008
	oligopeptide ABC transporter, ATP-binding protein	gij28378031	<i>oppF</i>	71	38/43	69	-	0,124±0,017	-
	acetolactate synthase	gij28377817	<i>als</i>	74	32/44	48	-	0,062±0,007	0,038±0,005
Métabolisme et transport des nucléotides	adenylate kinase	gij28377853	<i>adk</i>	28	13/16	42	-	0,023±0,004	0,081±0,016
			<i>adk</i>	61	13/13	26	0,104±0,042	0,025±0,006	-
	orotate phosphoribosyltransferase	gij28379197	<i>pyrE</i>	30	16/17	42	-	0,083±0,012	0,077±0,008
	aspartate carbamoyltransferase	gij28379203	<i>pyrB</i>	52	14/17	25	0,213±0,017	-	-
				70	17/19	39	-	0,280±0,041	-
	glutaminase of carbamoyl-phosphate synthase	gij28379201	<i>pyrAA</i>	53	7/12	13	0,184±0,017	-	-
	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	gij28379221	<i>purC</i>	59	9/11	13	0,197±0,013	-	-
	bifunctional GMP synthase/glutamine amidotransferase protein	gij28377744	<i>guaA</i>	80	55/57	48	0,295±0,027	0,191±0,009	0,017±0,002
Métabolisme et transport des lipides	[acyl-carrier protein] S-malonyltransferase	gij28378363	<i>fabD</i>	22	22/24	71	-	0,133±0,011	0,038±0,004
	stress-induced DNA binding protein	gij28379536	<i>dps</i>	34	40/52	74	0,106±0,020	0,037±0,011	1,200±0,210
				41	13/14	39	0,388±0,059	-	-
	acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase α -sub	gij28378370	<i>accA2</i>	49	4/6	10	0,070±0,003	-	-
	enoyl-(acyl carrier protein) reductase	gij28378371	<i>fabI</i>	51	7/8	22	0,481±0,033	-	-
	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] synthase II	gij28378365	<i>fabF</i>	88	23/28	43	0,064±0,007	0,257±0,009	0,301±0,011
Fonction générale	oxidoreductase (putative)	gij28377171	-	27	24/26	55	0,343±0,028	0,065±0,009	0,076±0,007
	β -phosphoglucomutase	gij28376999	<i>pgmB1</i>	35	63/68	77	-	0,036±0,002	1,128±0,125
	NADH peroxidase	gij28379083	<i>npr2</i>	48	17/20	26	0,236±0,041	-	-

Catégorie fonctionnelle	Protéine identifiée	Numéro d'accès ^a	Symbole du gène	Spot ^b	Peptides identifiés	Recouvrement (%)	Volume normalisé en conditions standard (MRSC) ^c		
							LC 56	LC 804	299V
Fonction inconnue ou supposée	alkaline shock protein (putative)	gi 28377758	<i>asp2</i>	2	34/39	64	-	0,381±0,011	1,660±0,013
	alkaline shock protein (putative)	gi 28377757	<i>asp1</i>	3	57/63	83	-	0,213±0,057	0,925±0,046
	protein of unknown function lp_2652	gi 28379164	-	31	14/17	72	-	0,055±0,005	0,113±0,006
	protein of unknown function lp_1583	gi 28378286	-	57	17/19	33	0,045±0,014	0,089±0,011	-
	protein of unknown function lp_2253	gi 28378848	-	78	32/39	50	0,429±0,093	0,577±0,089	0,186±0,034
	protein of unknown function lp_2253	gi 28378848	-	85	30/36	47	0,256±0,015	0,109±0,025	0,094±0,011
	protein of unknown function lp_1972	gi 28378614	-	89	28/37	48	-	0,073±0,011	0,062±0,008

^aNuméro d'accès dans la base de données NCBIInr.

^bNuméro de spot correspondant à la Figure 26.

^cVolume normalisé, exprimé sous la forme d'un pourcentage du volume de l'ensemble des spots validés. Les moyennes ± écart type de trois réplicats biologiques sont indiquées. '-': non détecté.

Annexe 4. Identification des protéines différemment exprimées dans les extraits protéiques de la paroi cellulaire de *L. casei* Shirota, F-19 et ATCC 334 cultivées en conditions standard.

Catégorie fonctionnelle	Protéine	Numéro d'accès ^a	Symbole du gène	Spot ^b	Peptides identifiés	Recouvrement (%)	Volume normalisé en conditions standard (MRSC) ^c		
							Shirota	F-19	ATCC 334
Traduction	glycyl-tRNA synthetase, beta subunit	LSEI_1503	<i>glyRS</i>	3	4/10	6	0,062±0,003	-	-
	Seryl-tRNA synthetase	LSEI_1836	<i>serRS</i>	17	2/5	5	0,035±0,004	-	0,110±0,005
	elongation factor G	LSEI_2508	<i>fusA</i>	24	21/31	22	0,839±0,011	1,249±0,019	0,543±0,008
	elongation factor Tu	LSEI_1332	<i>tuf</i>	26	9/10	13	0,070±0,008	0,117±0,007	0,172±0,021
	valyl-tRNA synthetase	LSEI_1251	<i>valS</i>	16	18/23	13	-	-	0,051±0,007
	prolyl-tRNA synthetase	LSEI_1579	<i>proS</i>	37	20/28	25	-	0,251±0,017	-
Chaperonnes	Oligoendopeptidase O	LSEI_1472	<i>pepO</i>	1	18/21	25	0,197±0,012	-	-
	Chaperonin GroEL	LSEI_2238	<i>groEL</i>	25	71/89	60	3,512±0,214	2,137±0,154	3,627±0,207
Production et conversion énergétique	inorganic pyrophosphatase /exopolyphosphatase	LSEI_1414	<i>ppa</i>	7	10/16	19	-	-	0,092±0,005
	Aryl-alcohol dehydrogenase related enzyme	LSEI_2825	<i>iolS</i>	8	7/11	18	-	-	0,074±0,004
	dihydroliipoamide dehydrogenase	LSEI_1308	<i>pdhB</i>	33	5/6	8	-	0,065±0,006	-
Transport et métabolisme des sucres	Enolase	LSEI_0970	<i>eno</i>	4	10/15	23	2,667±0,198	3,512±0,313	5,312±0,249
	6-phospho-beta-galactosidase	LSEI_A04	<i>lacG</i>	5	19/28	22	0,437±0,011	-	0,085±0,008
	galactose mutarotase-like protein	LSEI_2598	<i>yqhA</i>	22	16/27	52	0,086±0,007	0,283±0,014	0,374±0,012
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	LSEI_0967	<i>gap</i>	27	27/48	51	2,373±0,130	4,982±0,199	3,883±0,204
				28	42/80	68	3,516±0,301	5,173±0,244	7,226±0,179
Métabolisme et transport des acides aminés	cysteine sulfinatase desulfurase	LSEI_1289	<i>csd2</i>	19	3/5	4	0,045±0,009	-	0,091±0,014
	glutamine synthetase	LES_1652	<i>glnA</i>	20	11/19	21	-	0,093±0,010	0,110±0,013
	acetylornithine deacetylase/succinyl-diaminopimelate desuccinylase (Lmo0265 protein)	LSEI_1792	<i>dapE</i>	30	4/6	7	-	0,054±0,007	0,059±0,003
	dipeptidase A	LSEI_1983	<i>pepD3</i>	35	4/9	6	-	0,048±0,006	-
	aminopeptidase N	LSEI_0470	<i>pepN</i>	11	15/24	20	0,097±0,009	0,051±0,013	0,023±0,004
	Biosynthèse des métabolites secondaires	D-alanine-activating enzyme	LSEI_0794	<i>dlta</i>	9	4/6	5	-	-
Transport et métabolisme des nucléotides	Adenylate kinase (ATP-AMP transphosphorylase)	LCABL_26500	<i>adk</i>	13	6/10	28	-	-	0,142±0,007
	nucleoside diphosphate kinase	LSEI_0748	<i>ndk</i>	12	4/8	33	0,038±0,009	0,051±0,007	0,016±0,003

Catégorie fonctionnelle	Protéine	Numéro d'accès ^a	Symbole du gène	Spot ^b	Peptides identifiés	Recouvrement (%)	Volume normalisé en conditions standard (MRSC) ^c		
							Shirota	F-19	ATCC 334
Métabolisme et transport des ions inorganiques	stress induced DNA binding protein / putative ferritin-like protein	lp_3128	<i>dps</i>	34	22/30	54	-	1,014±0,019	-
	Copper resistance protein	LSEI_0905	<i>cutC</i>	21	11/19	23	0,643±0,014	0,056±0,007	0,388±0,015
Fonction générale	protoporphyrinogen oxidase	LCABL_13780	<i>hemK</i>	10	8/13	16	-	0,349±0,014	0,382±0,010
	putative translation-associated GTPase	LSEI_0215	<i>ychF</i>	14	9/12	20	-	0,041±0,008	-

^aNuméro d'accès dans la base de données NCBIInr.

^bNuméro de spot correspondant à la Figure 30.

^cVolume normalisé, exprimé sous la forme d'un pourcentage du volume de l'ensemble des spots validés. Les moyennes ± écart type de trois réplicats biologiques sont indiquées. '-': non détecté.