



Caractérisation des propriétés d'adhésion de *Streptococcus thermophilus* LMD-9 aux cellules épithéliales intestinales

Mounira Kebouchi

► To cite this version:

Mounira Kebouchi. Caractérisation des propriétés d'adhésion de *Streptococcus thermophilus* LMD-9 aux cellules épithéliales intestinales: 1. Rôle des protéines de surface dans la résistance aux sels biliaires et dans l'adhésion 2. Impact de l'adhésion sur l'expression des gènes eucaryotes et bactériens. Ingénierie des aliments. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT: 2017LORR0209 . tel-01923777

HAL Id: tel-01923777

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01923777>

Submitted on 22 Jul 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

École doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environnement (RP2E)

THÈSE

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR de l'Université de Lorraine

Discipline « Procédés Biotechnologiques et Alimentaires »

Soutenue le 06 avril 2017

Mounira KEBOUCHI

Caractérisation des propriétés d'adhésion de *Streptococcus thermophilus* LMD-9 aux cellules épithéliales intestinales :

- 1. Rôle des protéines de surface dans la résistance aux sels biliaires et dans l'adhésion**
 - 2. Impact de l'adhésion sur l'expression des gènes eucaryotes et bactériens**
-

Membres du jury :

Rapporteurs

Mme Stéphanie BLANQUET-DIOT, Dr, HDR, Université d'Auvergne

M. Jean-François CAVIN, Professeur, Université de Bourgogne-Franche Comté

Examineurs

Mme Muriel THOMAS, Dr, HDR, INRA, Jouy-en-Josas

Mme Magali GENAY, Dr, Maître de Conférences, Université de Lorraine

Mme Annie DARY-MOUROT, Professeur, Université de Lorraine (Co-directrice de thèse)

M. Yves LE ROUX, Professeur, Université de Lorraine (Directeur de thèse)

*Unité de Recherche « Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux » (UR AFPA),
Université de Lorraine - INRA, Unité sous Contrat 340*

*Équipe « Protéolyse & Biofonctionnalités des Protéines et des Peptides » (PB2P)
Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy*

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

École doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environnement (RP2E)

THÈSE

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR de l'Université de Lorraine

Discipline « Procédés Biotechnologiques et Alimentaires »

Soutenue le 06 avril 2017

Mounira KEBOUCHI

Caractérisation des propriétés d'adhésion de *Streptococcus thermophilus* LMD-9 aux cellules épithéliales intestinales :

- 1. Rôle des protéines de surface dans la résistance aux sels biliaires et dans l'adhésion**
 - 2. Impact de l'adhésion sur l'expression des gènes eucaryotes et bactériens**
-

Membres du jury :

Rapporteurs

Mme Stéphanie BLANQUET-DIOT, Dr, HDR, Université d'Auvergne

M. Jean-François CAVIN, Professeur, Université de Bourgogne-Franche Comté

Examineurs

Mme Muriel THOMAS, Dr, HDR, INRA, Jouy-en-Josas

Mme Magali GENAY, Dr, Maître de Conférences, Université de Lorraine

Mme Annie DARY-MOUROT, Professeur, Université de Lorraine (Co-directrice de thèse)

M. Yves LE ROUX, Professeur, Université de Lorraine (Directeur de thèse)

Unité de Recherche « Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux » (UR AFPA),

Université de Lorraine - INRA, Unité sous Contrat 340

Équipe « Protéolyse & Biofonctionnalités des Protéines et des Peptides » (PB2P)

Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes parents

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier de nombreuses personnes sans qui cette thèse n'aurait pu voir le jour.

Tout d'abord, je remercie le directeur du laboratoire **Guido RICHEN** pour m'avoir permis de réaliser mes travaux de thèse au sein de l'unité de recherche UR AFPA.

Je tiens à adresser également mes remerciements à **Annie DARY-MOUROT**, responsable de l'équipe PB2P, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse dans de meilleures conditions.

J'exprime toute ma reconnaissance à **Stéphanie BLANQUET-DIOT**, **Muriel THOMAS** et **Jean-François CAVIN** pour leur participation à mon jury de thèse ainsi que pour l'intérêt porté à ce travail.

Annie DARY-MOUROT, **Magali GENAY** et **Yves Le ROUX** ont dirigé et encadré ce travail de recherche. Je tiens à les remercier pour m'avoir permis de mener ce projet à bien, pour leurs précieux conseils, leurs corrections minutieuses du manuscrit et pour leur soutien quand ça n'allait pas. Je remercie Annie pour son accueil, la confiance et la gentillesse qu'elle m'a accordées dès mon arrivée au laboratoire, pour ses conseils scientifiques avisés, sa rigueur ainsi que pour le temps qu'elle a consacré à encadrer ce travail de recherche. Je remercie Magali pour son aide précieuse dans mes manip d'adhésion, ses précieux conseils, ses encouragements et son soutien. Je remercie également Yves pour son encadrement, ses conseils et ses encouragements qu'il a su me prodiguer au cours de ma thèse avec beaucoup de confiance et de pédagogie, pour le temps qu'il a consacré à diriger ce travail et pour m'avoir soutenue tout au long de ma thèse. J'ai beaucoup appris en travaillant avec vous tous pendant ces années et je vous en remercie.

Je remercie **Claire SOLIGOT-HOGNON** pour son implication dès le début dans mes travaux de thèse, pour son expertise dans la culture cellulaire et pour m'avoir appris à le faire. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi. Je me souviens de ces journées longues des tests d'adhésion qui étaient interminables mais tu as toujours été là. Un grand Merci pour tes qualités humaines et ton professionnalisme, ta gentillesse, ta sympathie, ta patience, ta compassion, ta bonne humeur et pour les bons moments partagés avec toi tout au long de ma thèse.

Je remercie également **Emilie LORSON** pour son aide précieuse notamment lors des centaines de PCR qu'elle a réalisées après les manip R-IVET. Un grand merci pour les bons moments que tu nous as fait vivre au labo, pour ta bonté, ta sympathie et ta bonne humeur. Je joins à ces remerciements, **Ophélie URIOT** pour le temps qu'elle m'a consacré pour discuter et échanger sur la technique R-IVET. Je la remercie pour sa gentillesse et son soutien notamment dans les derniers moments de ma thèse.

Je tiens à remercier **Zeeshan HAFEEZ** pour son amitié et ses encouragements surtout pendant la phase de rédaction de ma thèse. Tu es d'une positivité incroyable et tu m'as appris à garder toujours la confiance et la foi. Je te remercie avec ton épouse **Samina** pour les repas pakistanais et les moments conviviaux que j'ai partagés avec vous.

Je remercie tous les autres membres de l'équipe PB2P ainsi que les membres de l'UR AFPA en particulier tout le personnel technique sur le site de l'ENSAIA, pour leur gentillesse et leur bonne humeur. Je vous remercie tous d'avoir créé une bonne ambiance et de m'avoir permis de réaliser mes manip dans de meilleures conditions.

Je tiens à remercier tous les doctorants Xavier LECOMTE, Fleur AWUSSI, et Simon BENOIT et ceux que j'ai rencontré à l'ENSAIA, Elena DOMINGUEZ, Maïlie SAINT-HILAIRE, Sarah YEHYA et Marie-Laure LASTEL. Un grand merci plus particulièrement à Moulouk KHALDI pour son écoute et sa sympathie.

Je tiens à adresser un grand Merci à **Serge GEORGE**, le stagiaire que j'ai encadré pendant la première année de ma thèse, pour l'intérêt qu'il a porté à mon sujet de thèse.

Je tiens également à remercier tout les membres de l'équipe de recherche de l'institut Pasteur de Paris « Unité de Biologie des Spirochètes » pour leurs précieux conseils, leurs encouragements et leur aide dans la recherche d'une thèse durant mon Master 2. Un grand MERCI à **Nadia BENAROUJ**, qui a su me transmettre sa passion à la recherche et qui m'a beaucoup aidée à aller de l'avant sur le plan personnel et professionnel.

Je n'aurai pas pu surmonter cette Thèse jusqu'au bout sans les personnes qui me sont les plus proches. Je tiens à remercier profondément toute ma famille et tous mes amis pour leurs soutiens et leurs encouragements. Je tiens à remercier plus particulièrement **MES PARENTS** qui m'ont encouragée à continuer mes études et qui m'ont énormément aidée tout au long de mon parcours. Un gros merci à **ma maman** qui a toujours été convaincue que j'y arriverai et m'a beaucoup soutenue surtout dans les moments les plus difficiles. Je la remercie de m'avoir appris à être courageuse dans toutes les circonstances et de ne jamais baisser les bras malgré les difficultés rencontrées. Je joins à ces remerciements mon très cher ami **Midine**, sans qui je ne serai pas arrivée là. Je te remercie pour tes précieux conseils, ta sympathie, d'avoir toujours été là et d'avoir toujours cru en moi. Merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ta compassion durant toutes mes années de thèse.

Enfin, une pensée toute particulière pour ma grand-mère qui, je pense, aurait été fière que j'y sois arrivée....

A toutes et à tous, UN GRAND MERCI !

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VII
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	9
CHAPITRE I : LES BACTÉRIES LACTIQUES PROBIOTIQUES	11
I. 1. Les bactéries lactiques.....	13
I. 2. Les probiotiques.....	17
I. 3. Les effets bénéfiques des probiotiques et leurs mécanismes d'action.....	18
I. 4. Les critères de sélection des souches probiotiques.....	25
I. 4. 1. La survie aux conditions du tube digestif.....	27
I. 4. 2. L'adhésion bactérienne à la muqueuse intestinale.....	35
CHAPITRE II : L'ADHÉSION BACTÉRIENNE À LA MUQUEUSE INTESTINALE : INTERACTIONS AVEC LE MUCUS.....	45
<i>Revue. Mucins: The major component of the gastrointestinal mucus and an important element in interactions between intestinal mucosa, probiotic bacteria and dietary particles</i>	<i>49</i>
CHAPITRE III : <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i>, UNE BACTÉRIE PROBIOTIQUE ?	103
III. 1. <i>Streptococcus thermophilus</i> : position taxonomique au sein du genre <i>Streptococcus</i>	105
III. 2. Utilisation de <i>Streptococcus thermophilus</i> dans l'industrie agroalimentaire.....	107
III. 3. Effets probiotiques de <i>Streptococcus thermophilus</i>	107
III. 4. Survie de <i>Streptococcus thermophilus</i> aux conditions de stress du tube digestif .	109

III. 5. Les propriétés adhésives de <i>Streptococcus thermophilus</i> et sa capacité de colonisation du tube digestif	112
III. 5. 1. Les propriétés adhésives de <i>Streptococcus thermophilus</i> aux surfaces biotiques et abiotiques.....	112
III. 5. 2. La capacité de colonisation du tube digestif par <i>Streptococcus thermophilus</i> liée à son activité métabolique.....	113
III. 6. Les protéines de surface à domaine LPxTG chez <i>Streptococcus thermophilus</i>	114
III. 6. 1. Les sortases et l'art d'accrocher les protéines à la paroi bactérienne.....	115
III. 6. 2. La protéase de paroi PrtS.....	116
III. 6. 3. La cyclo-nucléotide phosphodiesterase (CpdB).....	117
III. 6. 4. La protéine à domaine MucBP	118
III. 7. Objectifs de la thèse et stratégies.....	120
PARTIE II : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE & RÉSULTATS	123
CHAPITRE I : ÉTUDE DE LA CAPACITÉ D'ADHÉSION DE <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i> LMD-9 ET SA RÉSISTANCE AU STRESS BILIAIRE.....	125
I. Mise au point des conditions expérimentales	128
I. 1. Etude de la croissance de la souche sauvage <i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9 et des trois mutants en milieu LM17	128
I. 2. Etude de la survie de <i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9 au stress biliaire	129
I. 3. Impact des conditions expérimentales de l'adhésion sur la survie de <i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9 et des trois mutants.....	131
I. 4. Conclusion	133

II. Implication des protéines de surface dépendantes de la sortase dans l'adhésion de <i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9 aux cellules épithéliales intestinales et dans la résistance aux sels biliaires	135
---	-----

<i>Publication 1: Implication of sortase-dependent proteins of Streptococcus thermophilus</i> LMD-9 in adhesion to human intestinal epithelial cell lines and bile salts tolerance	137
--	-----

CHAPITRE II : IMPACT DE L'ADHÉSION DE *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* LMD-9 SUR L'EXPRESSION DE CERTAINS GÈNES EUCARYOTES ET BACTÉRIENS. 153

I. Impact de l'adhésion de <i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9 sur l'expression de certains gènes codant des mucines dans les différentes lignées cellulaires	157
---	-----

I. 1. Introduction.....	157
-------------------------	-----

I. 2. Matériel et méthodes	158
----------------------------------	-----

I. 2. 1. Souches bactériennes et conditions de culture.....	158
---	-----

I. 2. 2. Culture cellulaire et adhésion.....	159
--	-----

I. 2. 3. Quantification du taux de transcrits des gènes <i>MUC2</i> et <i>MUC5AC</i> dans les différentes lignées cellulaires après une adhésion bactérienne	159
--	-----

I. 3. Résultats.....	162
----------------------	-----

I. 3. 1. Evaluation de l'expression des gènes <i>MUC2</i> et <i>MUC5AC</i> dans les cellules productrices de mucus HT29-MTX et HT29-CL.16E	162
--	-----

I. 3. 2. Evaluation de l'expression des gènes <i>MUC2</i> et <i>MUC5AC</i> dans les cellules entérocytaires Caco-2.....	164
---	-----

I. 4. Discussion et conclusion	165
--------------------------------------	-----

II. Impact de l'adhésion sur l'expression des gènes bactériens chez <i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9 : Identification des gènes induits durant l'adhésion aux cellules intestinales humaines <i>in vitro</i>	169
---	-----

<i>Publication 2: Highlighting induced-genes in Streptococcus thermophilus LMD-9 during adhesion to Caco-2 cells using recombinase-based in vivo expression technology.....</i>	<i>171</i>
II. 1. Introduction	173
II. 2. Materials and methods	175
II. 2. 1. R-IVET approach	175
II. 2. 2. R-IVET library growth conditions.....	176
II. 2. 3. Cell culture conditions.....	177
II. 2. 4. Identification of Streptococcus thermophilus LMD-9 functions induced during adhesion to Caco-2 TC7 cells	177
II. 2. 5. Sequence analysis.....	178
II. 3. Results and discussion.....	179
II. 3. 1. Optimization of counter selection conditions of the R-IVET library	179
II. 3. 2. R-IVET library survival in adhesion experiment conditions	181
II. 3. 3. Sequence analysis and identification of genes induced during adhesion to Caco-2 TC7 cells using R-IVET approach.....	182
II. 4. Conclusion.....	189
PARTIE III : DISCUSSION ET CONCLUSION	199
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	215
LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	257
LISTE DES FIGURES	259
LISTES DES TABLEAUX.....	261
VALORISATION DES TRAVAUX DE THÈSE.....	262

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A.	<i>Akkermansia</i>
AAD	Antibiotic-associated diarrhea
ABC	ATP-binding cassette transporters
ABC	ATP Binding Cassette
ADN	Acide aéroxyribonucléique
AFM	Atomic force microscope
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acides ribonucléiques messenger
ARNr 16S	Acide ribonucléique ribosomal de coefficient de sédimentation 16 Svedlberg
ARNt	acides ribonucléiques totaux
ATP	Adenosine TriPhosphate
B.	<i>Bifidobacterium</i>
Ba.	<i>Bacteroides</i>
BL	Bactérie lactique
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSH	Bile Salt Hydrolase
C.	<i>Clostridium</i>
CD	cluster de différenciation
CEPs	Cell surface proteins
CFU	Colony forming unit
CK	cysteine-knot
CpdB	cyclo-nucléotide phosphodiesterase
CV animals	Conventionnal animals
D domain	Von Willebrand domain
DACP	Double aveugle contre placebo
DO_{650 nm}	Densité optique à une longueur d'onde de 650 nanomètre
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Minimal Essential Medium
DVC-FISH	Direct viable count - fluorescent <i>in situ</i> hybridization
E.	<i>Escherichia</i>
E.	<i>Enterococcus</i>
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EFTU	Facteur d'élongation TU
EFSA	European Food Safety Authority

EGF	Epidermal growth factor
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPS	Exopolysaccharide
ER	Endoplasmic reticulum
<i>F.</i>	<i>Faecalibacterium</i>
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FISH	fluorescent in situ hybridization
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GF	Germ free
GIT	Gastro intestinal tract
GRAS	Generally Recognized as Safe
H	Hydrophobicité
h	Heure
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
IEC	Intestinal epithelial cells
IBS	intestinal bowel syndrome
IVET	<i>in vivo</i> expression technology
kDa	Kilodalton
LAB	Lactic acid bacteria
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>L.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Leuc.</i>	<i>Leuconostoc</i>
M cells	Microfold cells
MapA	Mucus adhesion-promoting protein
Mbpl	Mucus binding protein
MDR	multidrug resistance
min	Minute
Msa	Mannose-specific adhesion protein
MUC	Mucin
MUB	Mucin binding protein
MucBP	MUCin binding domain
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	Open reading frame

PAS	Periodic acid Schiff
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PG	Peptidoglycane
PTS	proline-threonine-serine
QPS	Qualified Preemption of safety
R-IVET	Recombinase- <i>in vivo</i> expression technology
Rpm	rotation per minute
S.	<i>Streptococcus</i>
SCOT	selective capture of transcribed sequence
SEA	sperm protein, enterokinase, and agrin
SIMS	Stable isotope mass spectrometry
Sp	Signal peptide
Spec^R	Phénotype spectinomycine résistant
Spec^SKan^R	Phénotype spectinomycine sensible et kanamycine résistant
SrtA	Sortase A
STM	signature tagged mutagenesis
SVF	sérum de veau foetal
TGI	Tractus gastro-intestinal
THG	Transfert horizontal de gène
UFC	Unité Formant Colonie
VNTR	variable number of tandem repeat

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Ces dernières années, de nombreuses études ont révélé le lien entre une alimentation saine et la prévalence de maladies chroniques, tant chez l'Homme que chez les animaux. Dans ce contexte a émergé un intérêt pour développer des aliments « santé » ou aliments fonctionnels dont le marché mondial a été estimé à 43,27 milliards de dollars en 2013. Ce chiffre a augmenté en valeur de 26,7 % par rapport à 2009 et devrait continuer de s'accroître dans les années à venir pour atteindre 54 milliards de dollars en 2017 (selon le rapport publié de [leatherhead food research.com/market](http://leatherheadfoodresearch.com/market)).

De nombreuses définitions du terme « aliments fonctionnels » ont été proposées mais, à ce jour, il n'existe pas de définition juridique précise dans la législation européenne. Généralement, ils sont considérés comme des aliments destinés à être consommés au sein d'une alimentation équilibrée et qui contiennent des composés biologiquement actifs pouvant améliorer la santé ou réduire le risque de maladies. Il ne s'agit en aucun cas de gélules, capsules ou comprimés mais plutôt d'aliments comportant des minéraux, des vitamines, des acides gras spécifiques, des fibres alimentaires, des substances phytochimiques, des antioxydants ou encore des micro-organismes (EUFIC, 2006). En effet, outre leur utilisation dans la fabrication et la conservation d'aliments, certains de ces micro-organismes exercent des effets bénéfiques sur la santé du consommateur et ils sont qualifiés de probiotiques.

Plusieurs définitions du mot probiotique ont été proposées au fil du temps mais la définition retenue aujourd'hui est celle attribuée par un mixte d'experts de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) et de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) en 2001 : "les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, exercent des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, au-delà des effets nutritionnels traditionnels" (FAO/OMS, 2001).

Le concept de micro-organismes probiotiques pouvant agir positivement sur la santé de l'Homme vient à l'origine des observations réalisées par le scientifique russe Elie Metchnikoff, lauréat du prix Nobel, qui observa en 1905 qu'un certain nombre de personnes en Bulgarie vivaient plus longtemps et en meilleure santé. Après plusieurs recherches, il découvrit une consommation importante de yaourt et mit en évidence un lien entre une alimentation riche en produits laitiers fermentés contenant des micro-organismes vivants et cette longévité. Ainsi, Metchnikoff observa l'effet bénéfique des bactéries trouvées dans le yaourt, dont le bacille bulgare (*Lactobacillus (Lb.) bulgaricus*) et il en déduisit que l'apport de bactéries lactiques (BL) pouvait améliorer la santé et augmenter la durée de vie (Metchnikoff,

1907). A la même époque, d'autres observations des effets santé des bactéries ont également été rapportées notamment sur des diarrhées infantiles. Depuis, d'autres travaux de recherche sur les BL ont vu le jour. Ainsi, en 1930 le scientifique japonais Minoru Shirota a pu isoler une BL, *Lb. casei*, des selles d'enfants. Il a ainsi développé le Yakult, un produit laitier fermenté fabriqué avec *Lb. casei* souche shirota, en suggérant que la consommation quotidienne de cette bactérie pourrait être bénéfique pour la santé des intestins et la prévention de maladies intestinales (Karimi and Pena, 2003). Le nouveau concept de probiotiques est donc né en Asie notamment dans l'industrie laitière mais il faudra attendre les années 1980 pour que cela soit adopté en Europe. En outre, plusieurs études scientifiques ont contribué à la détermination des effets positifs des BL probiotiques sur l'hôte humain et animal. C'est pourquoi l'utilisation de ces bactéries dans la fabrication de divers aliments fermentés pouvant avoir un effet santé après leur consommation, s'est largement répandue.

Toutefois, depuis 2007 et l'entrée en vigueur de la nouvelle réglementation européenne répertoriant un ensemble de lignes directrices strictes et de critères pertinents pour l'évaluation scientifique des allégations établies par un comité d'experts de la FAO et de l'OMS, le marché des probiotiques a subi un ralentissement à cause de la restriction dans l'attribution des allégations santé (Laser Reuterswärd, 2007). Par la suite, grâce à la diversification de produits alimentaires et des formules à base de probiotiques, ce marché a pu rebondir et même poursuivre sa croissance. En effet, après Yakult et son *Lb. casei* shirota au Japon, on a vu apparaître des produits comme Activia (ex-Bio, le bifidus actiRegularis) et Actimel (*Lb. casei* defensis) de Danone. De nouveaux produits alimentaires (produits allégés) et des modes de consommation sont ensuite apparus conduisant ainsi à la diversification des produits probiotiques (Alcimed, 2009).

Outre leur incorporation dans les produits alimentaires, les probiotiques sont également utilisés dans l'industrie pharmaceutique pour l'élaboration des produits santé commercialisés sous forme de comprimés et/ou de gélules *via* l'incorporation de préparations bactériennes lyophilisées. Ces produits sont prescrits dans le but d'atténuer certaines maladies intestinales et/ou de restaurer la flore microbienne intestinale ou encore dans le renforcement du système immunitaire (Savaiano et al., 1984 ; Basu et al., 2009). Vu cette large utilisation de ces micro-organismes, en 2015, le marché mondial des probiotiques (aliments fonctionnels, compléments alimentaires et ingrédients) a été estimé à 33,19 milliards de dollars et devrait

suivre une croissance pour atteindre 46,55 milliards de dollars en 2020 (MarketsandMarkets, 2015).

Les probiotiques regroupent différents types de micro-organismes dont la plupart sont des BL qui sont, comme évoqué ci-dessus, utilisées dans l'industrie laitière (Ljungh and Wadström, 2006 ; Lebeer et al., 2008). Avec 27,2 milliards d'euros de chiffre d'affaire en 2013, ce secteur occupe le deuxième rang de l'industrie agro-alimentaire française. Parmi les produits laitiers, le yaourt, contenant les bactéries *Streptococcus (S.) thermophilus* et *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* est un produit très apprécié en Europe, notamment en France où 21 kilos de yaourts par personne et par an sont consommés (Ministère chargé de l'agriculture et de l'agroalimentaire, 2013).

Afin d'étayer encore davantage le concept des probiotiques, il est indispensable de développer des outils analytiques fiables permettant, d'une part la sélection préliminaire *in vitro* des souches les plus intéressantes, et d'autre part la mise en évidence *in vivo* des activités probiotiques de ces souches. Dans cette optique, la FAO et l'OMS ont établi des critères stricts à suivre afin de réaliser une sélection pertinente de nouveaux candidats probiotiques (FAO/OMS, 2002). D'une manière globale, ces critères consistent en la capacité de survivre aux conditions drastiques du tractus gastro-intestinal (TGI) notamment à l'acidité gastrique et aux sels biliaries. De plus, une capacité à produire des molécules antibactériennes leur permettant d'avoir un avantage compétitif au niveau du TGI ainsi qu'une capacité d'adhésion aux tissus intestinaux, sont également recherchées (FAO/OMS, 2002). A l'heure actuelle, plusieurs travaux de recherche en effectuant des criblages *in vitro* sont menés, afin de mettre en évidence l'existence de ces critères dans différents micro-organismes et ainsi découvrir de nouvelles souches potentiellement probiotiques.

L'adhésion bactérienne est un prérequis afin que les micro-organismes puissent coloniser, au moins transitoirement, la muqueuse intestinale, et ainsi exercer certains effets thérapeutiques sur l'hôte. Ce processus est complexe impliquant des déterminants moléculaires de surface à la fois procaryotes et eucaryotes. Sa compréhension nécessite l'étude des interactions moléculaires établies entre les deux types de cellules ainsi que la détermination des protéines impliquées. C'est pourquoi, à l'heure actuelle, les études sur l'adhésion bactérienne sont complétées par des études transcriptomiques « détermination du niveau d'expression et du profil de réponse génétique » et protéomiques « étudier le niveau de synthèse des protéines » afin de mieux comprendre les interactions des bactéries probiotiques

avec les cellules intestinales. Dans le cadre de mon travail de thèse, nous nous sommes intéressés à une des deux bactéries présentes dans le yaourt, *S. thermophilus*, afin d'étudier les critères qui permettraient de la considérer comme un potentiel probiotique. Nous avons étudié plus particulièrement sa capacité d'adhésion *in vitro* à différentes lignées cellulaires ainsi que l'implication de certaines protéines de surface dans ce processus. Le rôle de ces protéines dans la résistance aux sels biliaires a été également mis en évidence. Par ailleurs, nous avons déterminé l'impact de l'adhésion bactérienne sur le taux d'expression des gènes au niveau, d'une part des cellules eucaryotes en ciblant certains gènes codant les mucines et d'autre part des gènes chez *S. thermophilus* LMD-9 qui seraient induits durant l'adhésion. Ce travail sera donc structuré comme suit :

- Une première partie sera consacrée à l'étude bibliographique qui sera présentée en trois chapitres. Dans le chapitre 1 seront présentées les BL probiotiques, leurs fonctions et leurs critères de sélection *in vitro*. Deux critères de sélection en particulier, la résistance au stress biliaire et l'adhésion bactérienne aux tissus intestinaux, seront décrits plus en détail. Dans le chapitre 2 seront présentés, sous la forme d'une revue, les mucines et leurs rôles dans l'interaction avec les bactéries de la flore intestinale et les bactéries exogènes. Enfin, dans le chapitre 3 seront présentés les caractéristiques de la BL *S. thermophilus*, son utilisation dans l'industrie laitière, ses effets bénéfiques sur la santé, sa capacité d'adhésion à des surfaces biotiques et abiotiques et certaines entités moléculaires de surface qui pourraient être impliquées dans le processus d'adhésion.
- Une deuxième partie sera consacrée à la présentation des résultats. Cette partie sera subdivisée en deux chapitres. Nous aborderons tout d'abord l'étude de l'adhésion de *S. thermophilus* LMD-9 *in vitro* aux cellules épithéliales intestinales et sa résistance au stress biliaire ainsi que l'impact de l'inactivation de certains gènes codant des protéines de surface sur ces deux processus. Ces résultats seront présentés sous la forme d'un article publié (*Publication 1*). Dans le deuxième chapitre, nous présenterons les résultats obtenus lors de l'étude de l'impact de l'adhésion de la souche LMD-9 sur l'expression des gènes codant les mucines MUC2 et MUC5AC au niveau des cellules épithéliales d'une part, et d'autre part sur les cellules bactériennes en identifiant les gènes induits chez la souche LMD-9 durant le processus d'adhésion (*Publication 2* ; en cours de rédaction).
- Enfin nous terminerons par une partie conclusion et perspectives.

PARTIE I :

SYNTÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

LES BACTÉRIES LACTIQUES PROBIOTIQUES

- I. Les bactéries lactiques probiotiques
 - I. 1. Les bactéries lactiques
 - I. 2. Les probiotiques
 - I. 3. Les effets bénéfiques des probiotiques et leurs mécanismes d'action
 - I. 4. Les critères de sélection des souches probiotiques
 - I. 4. 1. La résistance aux conditions de stress du tube digestif
 - I. 4. 2. L'adhésion bactérienne
-

Chapitre I. Les bactéries lactiques probiotiques

I. 1. Les bactéries lactiques

En se basant sur des données de paléontologie, des données moléculaires basées sur les séquences des ADN (Acides désoxyribonucléiques) ribosomiques et les séquences signatures des protéines conservées ainsi que sur certaines caractéristiques du métabolisme carboné des micro-organismes, les bactéries lactiques (BL) seraient apparues sur Terre il y a près de trois milliards d'années (Tailliez, 2001 ; Carr et al., 2002 ; Pessione, 2012). Ces bactéries ont la particularité de produire par fermentation de sucre, de l'acide lactique. L'utilisation de certaines d'entre-elles en alimentation date de l'arrivée de l'agriculture dans les populations humaines. Ainsi, l'utilisation des BL pour la fabrication des aliments a abouti à une évolution de leur génome dont la plus remarquable est certainement la perte de gènes de pathogénicité, comme c'est le cas de la BL *Streptococcus (S.) thermophilus*. Ainsi, les BL utilisées en alimentation ont généralement un statut GRAS (Generally Recognised As Safe) attribué par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA ; American Food and Drug Administration, 2002 ; FDA, 2012) et sont largement présentes dans notre alimentation quotidienne, que ce soit dans les produits laitiers fermentés (fromage, yaourt), certains produits végétaux (choucroute) ou produits carnés (saucisses) (Tableau 1).

Les BL sont des bactéries à coloration Gram positive, généralement immobiles, asporulées, hétérotrophes et anaérobies mais aéro-tolérantes avec une morphologie en bacille ou en coque et un faible pourcentage en guanine-cytosine (GC). Ces bactéries sont caractérisées par l'absence de cytochrome-oxydase, de nitrite-oxydase et de catalase (bien que certaines souches peuvent produire une pseudo-catalase fonctionnant uniquement en présence d'hème exogène présent dans le milieu) (Tailliez, 2001). En ce qui concerne leur métabolisme, ces bactéries utilisent essentiellement la glycolyse comme principale source d'énergie. Ainsi, elles sont capables de fermenter le lait et de produire des métabolites à partir du lactose. En fonction des métabolites produits, les BL sont qualifiées de homofermentaires si elles produisent majoritairement de l'acide lactique, ou de hétérofermentaires si elles produisent, en plus de l'acide lactique, des composés supplémentaires tels que du dioxyde de carbone, de l'acide acétique et de l'éthanol. Ces bactéries présentent une certaine exigence en facteurs de croissance (acides aminés,

peptides, vitamines, glucides fermentescibles...). Le lait constitue donc un milieu propice pour la croissance de certaines souches de BL.

Tableau 1 : Exemples de bactéries lactiques utilisées dans les aliments fermentés traditionnels D'après Drouault & Corthier, 2001; Liu et al., 2014

Bactéries lactiques	Matière première	Aliments fermentés
Produits laitiers		
<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Lactococcus</i> (L.) <i>lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> (Leuc.) <i>lactis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>S. thermophilus</i>	Lait de vache et de buffle	Mozzarella, fromage
<i>Lactobacillus</i> (Lb.) <i>acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Lait de vache	Emmental, camembert
<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Saccharomyces florentinus</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>S. durans</i> .	Lait de vache, de jument ou de chèvre	Kéfir
<i>S. thermophilus</i> et <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Lait de vache	Yaourt
<i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. casei</i> subsp. <i>pseudoplanarum</i> , <i>Pediococcus</i> (P.) <i>pentosaceus</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. rhamnosus</i>	Lait	Cheddar
Produits carnés		
<i>Pediococcus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i>	Viande de porc et de bœuf	Saucisse sèche
Pédiocoques	Viande de porc	Saucisse semi-sèche
Produits végétaux		
<i>Oenococcus oeni</i> , <i>Pediococcus parvulus</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>P. damnosus</i>	Raisins	Vin
Pédiocoques, <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>	Olives	Olives vertes
Autres produits		
<i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Weissella cibaria</i>	Farine	Pain au levain

Les techniques de biologie moléculaire et de génomique ont permis de revoir la classification des BL et d'introduire de nouveaux genres (Stiles and Holzapfel, 1997 ; Zhang et al., 2011). Ces données sont à l'origine d'une classification comprenant les genres *Aerococcus*, *Alliococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Figure 1). Bien que la plupart des souches bactériennes du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* soient de véritables pathogènes

(*Streptococcus*) ou pathogènes opportunistes (*Enterococcus*), celles utilisées en alimentation ne présentent aucune pathogénicité.

Selon l'arbre phylogénétique présenté en Figure 1, on constate une hétérogénéité phylogénétique au sein des BL avec des groupes plus ou moins reliés les uns aux autres. Ainsi, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera*, *Aerococcus* sont étroitement apparentés les uns aux autres. Les genres *Lactococcus* et *Streptococcus* apparaissent relativement apparentés alors que le genre *Lactobacillus* est phylogénétiquement distinct.

A l'heure actuelle, près de 400 espèces de BL ont été reconnues (Euzéby, 1997 ; Zhang et al., 2011). Ces bactéries sont très utilisées dans l'industrie agro-alimentaire (Tableau 1). De plus, compte-tenu de leur capacité à inhiber la croissance de certaines souches de la flore pathogène, *via* la production d'acides organiques et de bactériocines, les BL ayant un potentiel bio-protecteur sont également utilisées dans la bio-préservation des produits alimentaires (Liu et al., 2014). Ces bactéries sont également considérées comme des usines moléculaires produisant des molécules d'intérêt technologique et industriel tels que l'acide lactique, les exopolysaccharides (EPS), les bactériocines, la vitamine B et sont utilisées pour produire des « alicaments » (Hugenholtz et al., 2002 ; De Vuyst and Leroy, 2007 ; Thakur et al., 2015 ; Zannini et al., 2016). En plus de leur intérêt industriel, un nombre croissant d'études a pu mettre en évidence plusieurs effets bénéfiques des produits alimentaires fabriqués avec des BL sur la santé de l'Homme. De plus, l'utilisation des BL s'est également élargie dans le domaine médical. Ainsi, elles sont utilisées comme vecteur pour la production des molécules biothérapeutiques et comme adjuvants de vaccins (Borchers et al., 2009 ; Wyszynska et al., 2015). Les BL peuvent donc jouer un double rôle : agents de la fermentation alimentaire et agents bénéfiques pour la santé. L'existence d'un lien entre BL et santé humaine a contribué à l'apparition de l'appellation du mot « probiotique ».

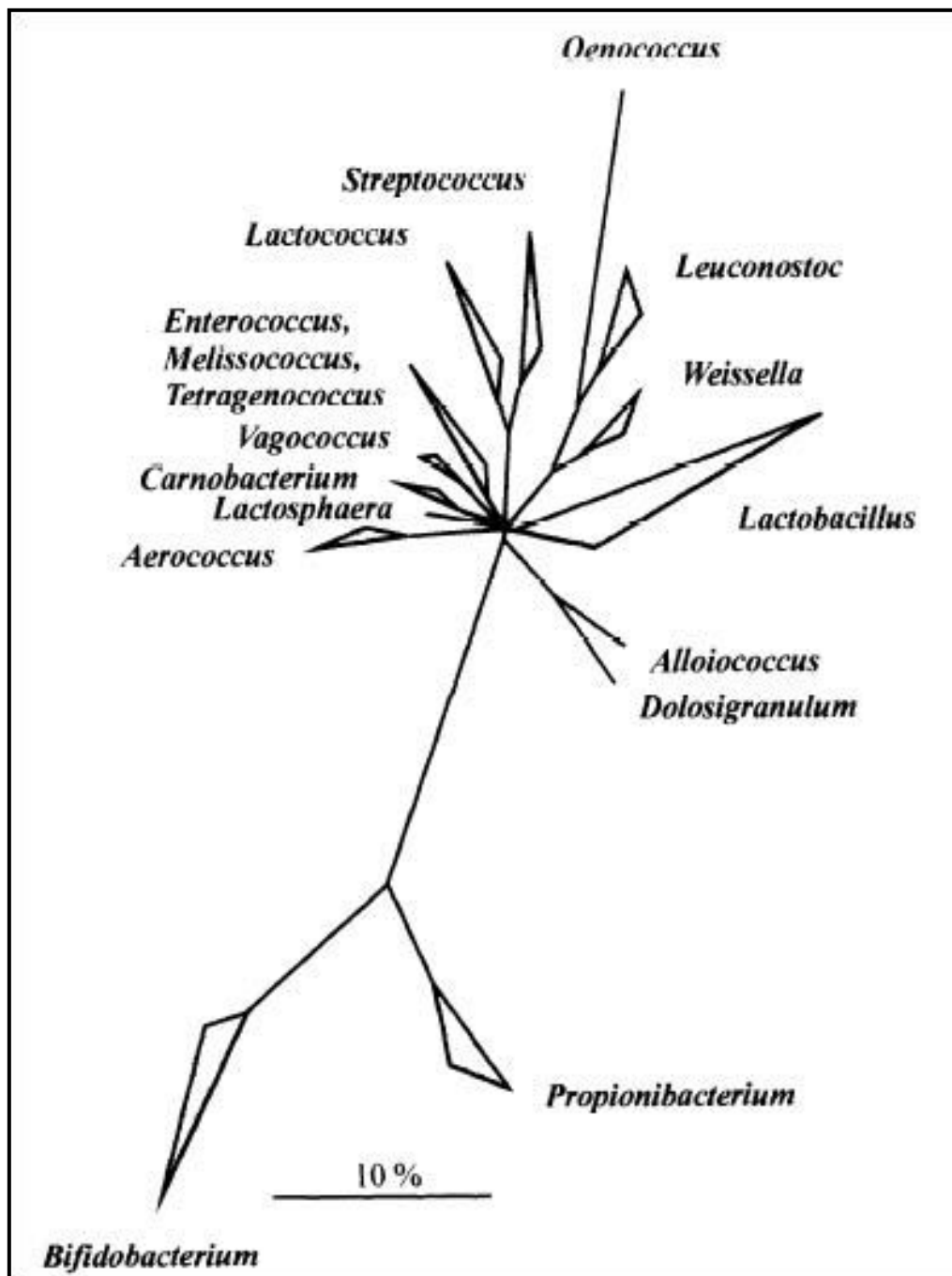


Figure 1 : Arbre phylogénétique, basé sur l'analyse comparative de séquences du gène codant l'ARNr 16S, présentant les grands groupes des bactéries lactiques et les groupes non reliés *Propionibacterium* et *Bifidobacterium* (Stiles and Holzapfel, 1997 ; Holzapfel et al., 2001).

I. 2. Les probiotiques

Le tractus gastro-intestinal (TGI) humain est colonisé dès la naissance par différentes espèces bactériennes (Norin et al., 1985 ; Solís et al., 2010). Cette première colonisation aboutit à l'établissement d'un complexe microbien endosymbiotique qui semble se stabiliser au plan fonctionnel et structural vers l'âge de deux ans (Mackie et al., 1999). A l'âge adulte, le TGI héberge jusqu'à 10^{14} cellules bactériennes qui constituent le microbiote intestinal de l'Homme et forment un écosystème complexe impliqué dans différentes fonctions physiologiques. En effet, le microbiote intestinal accomplit d'innombrables fonctions métaboliques (digestion de certains nutriments, synthèse de molécules comme les vitamines...), assure des fonctions de barrière (renforcement de l'épithélium intestinal et protection contre l'invasion par les micro-organismes pathogènes) et des fonctions trophiques (Rabot et al., 2010 ; Gérard, 2011). Généralement, un déséquilibre au niveau du microbiote intestinal peut conduire à des situations pathologiques (Chow et al., 2010 ; Gagnière et al., 2016).

Plusieurs études menées chez l'Homme en utilisant la méthodologie en double aveugle contre placebo (DACP) ont pu mettre en évidence l'impact de la consommation de produits fermentés contenant des micro-organismes probiotiques sur la composition du microbiote intestinal (Tableau 2). Ainsi, Yamano et ses collaborateurs ont montré que la consommation d'un lait fermenté avec *Lb. johnsonii* La1 par des personnes en bonne santé modulait la composition du microbiote intestinal en augmentant les populations de Bifidobactéries et de Lactobacilles et en réduisant celles de Clostridium (Yamano et al., 2006). L'apport de micro-organismes vivants exogènes conduisant donc à moduler (restaurer ou améliorer) les fonctions physiologiques de la flore endogène fait partie de l'action de certains probiotiques. Ces micro-organismes utilisés également en alimentation proviennent principalement d'isolats humains et sont constitués majoritairement de souches bactériennes appartenant aux genres *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. rhamnosus*, et *Lb. salivarius*) et *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* et *B. lactis*). Moins couramment utilisées sont les souches appartenant aux genres *Bacillus* (*Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* var. *toyoi*), *Enterococcus* (*E. faecium* et *E. faecalis*), *Streptococcus* (*S. thermophilus* et *S. salivarius*) et *Lactococcus*. D'autres micro-organismes tels que la levure *Saccharomyces boulardii* et une souche d'*Escherichia* (*E.*) *coli* Nissle 1917 sont également utilisés comme probiotiques (Schneider, 2008 ; Pavlović et al., 2012). Malgré

l'efficacité démontrée de la majorité des souches appartenant à ces genres bactériens notamment *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* (Tableau 2), leurs mécanismes d'action restent encore méconnus.

I. 3. Les effets bénéfiques des probiotiques et leurs mécanismes d'action

Divers probiotiques peuvent apporter des améliorations sur les fonctions physiologiques et métaboliques au niveau intestinal, bucco-dentaire ou même vaginal (Meurman and Stamatova, 2007 ; Butel, 2014 ; Santos et al., 2016 ; Al-Ghazzewi and Tester, 2016). Un certain nombre d'études cliniques ont pu mettre en évidence certains de ces effets positifs sur la santé humaine (Figure 2, Tableau 2). Toutefois, d'autres effets sont basés seulement sur des tests *in vitro* ou *in vivo* sur des modèles animaux (Tableau 2).

L'un des effets bénéfiques majeurs des probiotiques démontré et qui a été largement mis en avant chez l'Homme concerne l'amélioration de la digestion du lactose. Ce sucre est hydrolysé par une enzyme « lactase ou β -galactosidase », largement produite chez les BL, qui permet la libération de sucres simples faciles à digérer. Ainsi, une amélioration des symptômes liés à l'intolérance au lactose a été observée chez des personnes consommant des laits fermentés ou des yaourts contenant des bactéries vivantes de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *S. thermophilus* en comparaison avec un lait standard non fermenté (Kolars et al., 1984 ; de Vrese et al. 2001 ; Bourlioux et al., 2011 ; Savaiano, 2014).

D'autres effets positifs sur les douleurs abdominales liées à des constipations chroniques ont été également rapportés. Il s'agit d'une régulation de transit et une amélioration de la fréquence de défécation. Cet effet bénéfique a d'ailleurs été montré chez des personnes adultes après une consommation d'une boisson contenant la souche probiotique *Lb. casei* shirota (Koebnick et al., 2003) et chez les personnes âgées après une consommation d'un mélange de deux souches probiotiques *Lb. rhamnosus* LC705 et *Propionibacterium freudenreichii* JS (Ouweland et al., 2002c).

Les probiotiques peuvent également agir de façon efficace sur les épisodes diarrhéiques dus à des infections microbiennes ou induits par des traitements antibiotiques (Beausoleil et al., 2007; Guarino et al., 2009; Guarino et al., 2015). En effet, les probiotiques protègent et aident à réduire l'effet de certaines infections par une production de molécules antibactériennes tels que les bactériocines, une compétition pour les nutriments et les sites

d'adhésion et une stimulation de la réponse adaptative du système immunitaire par une production d'anticorps protecteurs (les immunoglobulines G et A) et par l'activation des cellules T CD4⁺ (cluster de différenciation ; CD 4) ou CD8⁺ (Gourbeyre et al., 2011). De plus, certaines études randomisées contrôlées chez l'Homme ont pu mettre en évidence l'efficacité des souches probiotiques, telles que par exemple *Lb. acidophilus* CL1285, *Lb. casei* LBC80R et *Lb. casei* shirota dans la prévention et le traitement des déséquilibres gastro-intestinaux liés à l'antibiothérapie indiquant ainsi le rôle des probiotiques dans la restauration et la stabilité du microbiote intestinal de l'hôte (Tableau 2) (Gao et al., 2010; Wong et al., 2014).

Les probiotiques agissent également dans le traitement de certaines pathologies gastro-intestinales comme les maladies inflammatoires de l'intestin (maladie de Crohn, colite ulcéraire, syndrome de l'intestin irritable (SII)...) (Kajander et al. 2005 ; Ringel-Kulka et al., 2011 ; Yoon et al., 2014). En effet, l'administration de probiotiques permet de soulager les symptômes associés aux troubles intestinaux comme les ballonnements, les flatulences, les douleurs abdominales.... Une étude en DACP a d'ailleurs montré qu'un traitement par un mélange de souches bactériennes probiotiques de *B. longum*, *B. bifidum*, *B. lactis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus* et *S. thermophilus* sur des patients atteints du SII et d'une altération du microbiote intestinal atténuait les symptômes et modulait la composition de la flore intestinale (Yoon et al., 2014). D'autres essais réalisés avec une seule souche bactérienne se sont avérés efficace sur l'atténuation des symptômes du SII comme par exemple *Lb. rhamnosus* GG et *B. lactis* Bi-07 (Francavilla et al., 2010 ; Ringel et al., 2010).

Les probiotiques peuvent agir sur la barrière intestinale en stimulant la production de mucines et en maintenant l'intégrité structurale des jonctions serrées intercellulaires (Caballero-Franco et al., 2007 ; Anderson et al., 2010). Cet effet a été largement étudié *in vitro* en utilisant des lignées cellulaires d'origine humaine. Ainsi, il a été observé que l'adhésion de certains lactobacilles *in vitro* aux cellules Caco-2 stimulait la production de mucines au niveau de l'expression des gènes et la quantité de protéines. Cette surproduction de mucine augmenterait l'épaisseur de la couche de mucus renforçant ainsi la barrière épithéliale (Mack et al., 1999; Mack et al., 2003).

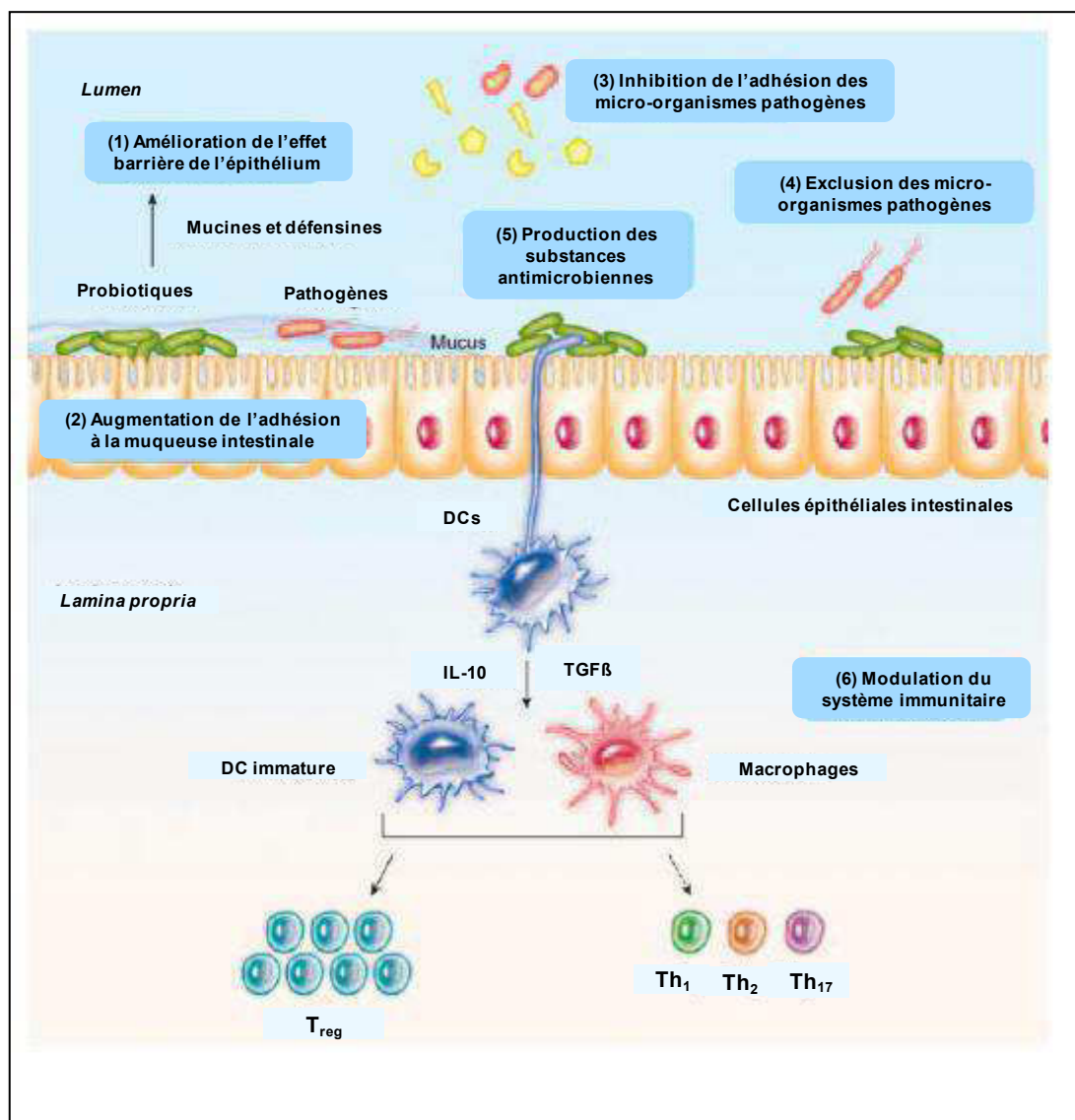


Figure 2 : Les principaux effets bénéfiques des probiotiques sur la muqueuse intestinale. DCs (dendritic cells) ; les cellules dendritiques, IL- ; interleukines, Th (T helper) ; les lymphocytes T auxiliaires, Treg ; les lymphocytes T régulateurs (Bermudez-Brito et al., 2012).

D'autres études, réalisées en quantifiant certaines protéines des jonctions serrées, ont rapporté que *Lb. plantarum* WCFS1 induisait une augmentation significative de la quantité de protéines zonula occludens (ZO-1) et de l'occludine *in vivo* chez l'Homme et *in vitro* en utilisant les cellules Caco-2 (Karczewski et al., 2010). Le renforcement de la barrière épithéliale *via* des bactéries probiotiques conduirait également à la diminution de la perméabilité de l'épithélium suite à une infection. Une étude a montré *in vitro*, après traitement des cellules Caco-2 avec la bactérie pathogène *E. coli* Entero-invasive (ATCC 43893, sérotype O124:NM,) entraînant la perméabilité du tapis cellulaire, que l'adhésion de *Lb. plantarum* CGMCC No.1258 induisait une augmentation de la quantité des différentes

protéines occlusives (Qin et al., 2009). En plus du renforcement de la barrière intestinale, ces données suggèrent que les probiotiques joueraient également un rôle protecteur au niveau de l'épithélium intestinal.

D'autres effets bénéfiques ont également été rapportés mais restent plus ou moins controversés comme la réduction des réactions allergiques alimentaires ainsi qu'une diminution de la pression artérielle et du taux de cholestérol (Gourbeyre et al., 2011 ; Pagnini et al., 2010 ; Pavlović et al., 2012 ; Bosch et al., 2014 ; Upadrasta and Madempudi, 2016). L'hypocholestérolémie est généralement associée à la capacité d'assimilation et de dégradation du cholestérol par des souches probiotiques (Gourbeyre et al., 2011). De plus, la diminution du cholestérol pourrait s'effectuer, en partie, par la déconjugaison des sels biliaires lors du cycle entéro-hépatique sous l'action enzymatique de la Bile Salt Hydrolase (BSH) (Ooi and Liong, 2010 ; Pavlović et al., 2012). En effet, le processus de dégradation du cholestérol a été principalement observé dans des tests *in vitro* mais cette propriété n'est nécessairement pas corrélée à une hypocholestérolémie chez l'humain (Bosch et al., 2012). Cependant, certaines études ont pu mettre en évidence le rôle de certaines souches probiotiques dans la diminution du cholestérol sériques chez l'Homme (Anderson and Gilliland, 1999 ; Ataie-Jafari et al., 2009). Par exemple, une consommation quotidienne de 4 à 6 semaines de yaourt additionné de *Lb. acidophilus* et *B. lactis* réduisait significativement le taux de cholestérol sérique en comparaison avec une consommation d'un yaourt ordinaire chez des sujets présentant une hypercholestérolémie modérée (Ataie-Jafari et al., 2009).

Malgré le nombre important d'études scientifiques réalisées sur les souches probiotiques pour déterminer leurs effets bénéfiques, ceux-ci, à l'exception de la digestion du lactose, n'ont pas obtenu d'allégation santé et nécessitent encore d'autres études cliniques chez l'Homme. En effet, l'entrée de la nouvelle législation européenne plus restrictive demande la justification scientifique des allégations santé des souches probiotiques (Guidance to compliance with Regulation (EC) 1924/2006 on nutrition and health claims made on foods, version 2, 2011). De plus, bien que les probiotiques font l'objet de nombreuses études, les mécanismes physiologiques et biochimiques par lesquels ils agissent restent largement méconnus. D'après la littérature, il semble que l'activité des souches probiotiques dépendent en partie de leur capacité d'adaptation aux conditions environnementales du TGI (Lebeer et al., 2008). Ainsi, la caractérisation moléculaire des souches d'intérêt probiotique implique l'identification d'une part, des facteurs bactériens permettant l'adaptation aux conditions de

l'environnement intestinal notamment la résistance aux stress du TGI (acidité gastrique et les sécrétions biliaires), du métabolisme (pour s'adapter à l'environnement nutritionnel de l'hôte) ainsi qu'à des facteurs promoteurs permettant l'adhésion à la muqueuse intestinale (pour faciliter la colonisation et la persistance au niveau du TGI) et d'autre part des facteurs contribuant directement à leurs effets santé (facteurs probiotiques) (Figure 3) (Lebeer et al., 2008). Il est donc crucial d'effectuer préalablement des criblages afin de sélectionner de meilleurs candidats probiotiques et de mieux connaître les facteurs impliqués dans les processus d'adaptation (protéines de résistance aux stress du TGI, facteurs d'adhésion...).

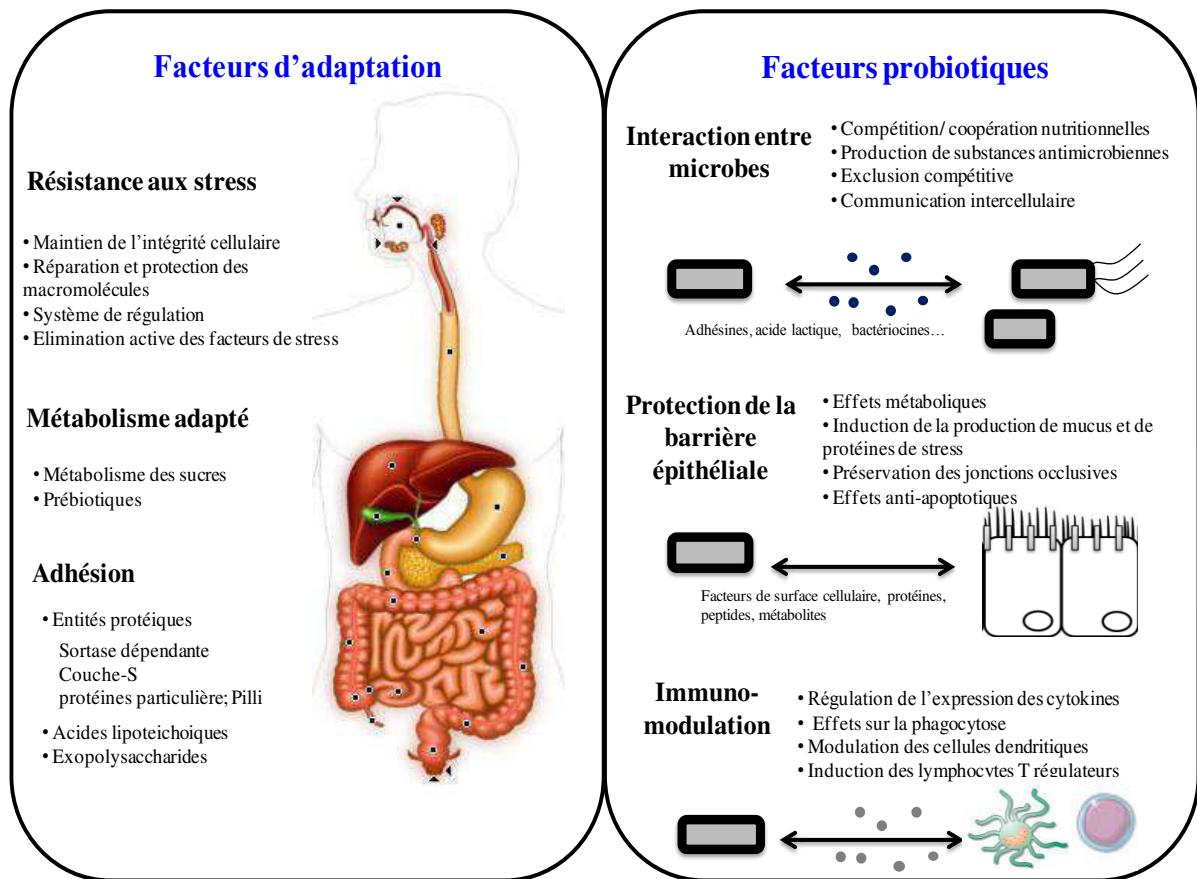


Figure 3 : Illustration schématique des mécanismes d'adaptation et d'action des souches probiotiques. Les études moléculaires sur les probiotiques visent à identifier les facteurs qui favorisent la survie, l'adaptation et la colonisation de l'hôte (facteurs d'adaptation) et les facteurs qui contribuent directement aux effets favorables à la santé (effets probiotiques). Comme la majorité des études sur les micro-organismes probiotiques se focalisent sur leurs interactions avec le TGI, cette niche est alors représentée. Les effets favorisant la santé peuvent être médiés par des mécanismes d'actions probiotiques, qui comprennent l'inhibition des pathogènes, la restauration de l'équilibre microbien, l'amélioration de la fonction de barrière épithéliale et des effets immunomodulateurs par l'intermédiaire d'interactions avec des cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques (Lebeer et al., 2008)

Tableau 2 : Exemples de micro-organismes à activité probiotique (effets démontrés *in vitro* et/ou *in vivo*) utilisés dans la fabrication d'aliments et compléments alimentaires

Souches probiotiques	Effets probiotiques démontrés <i>in vivo</i> et/ou <i>in vitro</i>	Références	Utilisation
Les lactobacilles			
<i>Lb. johnsoni</i> (La1 et No. 1088)	Activité antibactérienne <i>in vivo</i> chez la souris contre le développement de <i>Helicobacter pylori</i>	(Aiba et al., 2015)	Yaourts à boire (Nestlé ; Suisse)
	Stimulation du système immunitaire chez l'Homme	(Donnet-Hughes et al., 1999 ; Ashraf and Shah, 2014)	
	Augmentation de la fréquence de défécation et amélioration de la composition du microbiote intestinal chez l'Homme (DACP) par une augmentation des populations de lactobacilles et de bifidobactéries et la diminution de celles des <i>Clostridium</i> .	(Yamano et al., 2006)	
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	Prévention et traitement des infections et des diarrhées aiguës à rotavirus ou associées à l'usage d'antibiotiques chez les enfants (essais randomisés contrôlés)	(Basu et al., 2009 ; Korpela et al., 2016; Sindhu et al., 2014)	Yaourts à boire Compléments alimentaires
	Stimulation du système immunitaire chez des personnes âgées	(Solano-Aguilar et al., 2016)	
	Traitement et prévention des allergies chez les enfants	(Cosenza et al., 2015)	
	Diminution des inflammations des intestins chez des patients après intervention contre les pouchites	(Kuisma et al., 2003)	
	Amélioration de la barrière intestinale <i>in vivo</i> chez des rats et chez les enfants	(Lam et al., 2007; Sindhu et al., 2014)	
<i>Lb. casei</i> shirota	Stimulation du système immunitaire chez des personnes en bonne santé	(Nagao et al., 2000)	Laits fermentés Formules infantiles Compléments alimentaires
	En combinaison avec <i>B. breve</i> , elle facilite la digestion du lactose chez l'Homme	(Almeida et al., 2012; Wong et al., 2014)	
	Traitement des diarrhées associées à l'usage d'antibiotiques chez l'Homme		
<i>Lb. acidophilus</i> NCFM	En combinaison avec <i>Bifidobacterium lactis</i> Bi-07, diminution des ballonnements abdominaux et des inflammations intestinales chez l'Homme (DACP)	(Ringel-Kulka et al., 2011)	Yaourts Formules infantiles Compléments alimentaires
	Stimulation du système immunitaire <i>in vitro</i> dans les cellules dendritiques murines	(Weiss et al., 2010)	
	Diminution des diarrhées infantiles et amélioration de la digestion du lactose	(Sanders and Klaenhammer, 2001)	
<i>Lb. plantarum</i>	Stimulation de la réponse immunitaire et inhibition de l'adhésion des bactéries pathogènes <i>in vitro</i> en utilisant des cellules épithéliales et mononucléaires	(Ferreira Dos Santos et al., 2016 ; Wu et al., 2016)	Saucisses, céréales Compléments alimentaires
	Protection de la barrière épithéliale		
	Modulation de la composition du microbiote intestinal et amélioration de la défécation chez l'Homme (DACP)	(Higashikawa et al., 2010 ; Xie et al., 2016)	
	Renforcement de l'effet barrière de l'épithélium par une induction des protéines occlusives <i>in vivo</i> chez l'Homme et <i>in vitro</i> dans les cellules Caco-2	(Anderson et al., 2010 ; Karczewski et al., 2010)	

Tableau 2 : Exemples de micro-organismes à activité probiotique (effets démontrés *in vitro* et/ou *in vivo*) utilisés dans la fabrication d'aliments et compléments alimentaires (Suite)

Souches probiotiques	Effets probiotiques démontrés <i>in vivo</i> et/ou <i>in vitro</i>	Références	Utilisation
Les bifidobactéries			
<i>B. longum</i> BB536	Traitement des symptômes de la rhinite allergique saisonnière induite par les pollens de cèdre du Japon, allergies	(Xiao et al., 2007)	Laits fermentés Formules infantiles, Compléments alimentaires
	Activité anxiolytique, seule ou en combinaison avec d’autres souches probiotiques, <i>in vivo</i> chez la souris et chez l’Homme	(Bercik et al., 2011 ; Wang et al., 2016) (Namba et al., 2010 ; Odamaki et al., 2012) (Ishizeki et al., 2013)	
	Diminution des bactéries nuisibles au niveau intestinal et stimulation de la réponse immunitaire	(Ogata et al., 1997 ; Ogata et al., 1999)	
	Traitement de la constipation chez l’Homme et amélioration de la flore intestinale par une augmentation des populations de bifidobactéries et de lactobacilles		
<i>B. lactis</i>	Amélioration de la flore intestinale et de la fréquence de défécation ainsi qu’une atténuation des douleurs abdominales chez l’Homme	(Eskesen et al., 2015 ; Tanaka et al., 2015) (Maneerat et al., 2013 ; Merenstein et al., 2015)	Yaourts, fromages Formules infantiles, Compléments alimentaires
	Amélioration de la réponse immunitaire chez les personnes âgées	(de Vrese et al., 2011 ; İşlek et al., 2014)	
	Diminution de la fréquence des diarrhées à rotavirus ou associées aux antibiotiques		
<i>B. breve</i>	Effets positif sur la constipation infantile avec une augmentation de la fréquence de défécation et atténuation des douleurs abdominales.	(Tabbers et al., 2011) (Sánchez et al., 2015)	Laits fermentés Formules infantiles, Compléments alimentaires
	Modulation de la réponse immunitaire <i>in vitro</i> dans les cellules HT-29		
Autres			
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Traitement des troubles intestinaux et diminution des diarrhées associées aux antibiotiques	(Kelesidis and Pothoulakis, 2012 ; Dinleyici et al., 2014 ; Sharif et al., 2016)	Compléments alimentaires
	Activité antimicrobienne et antitoxine (inhibition de la croissance des bactéries nuisibles et des parasites, production de protéase à sérine clivant les toxines de <i>Clostridium (C.) difficile</i>)		
	Régulation de la réponse immunitaire		
	Action trophique sur la muqueuse intestinale		
<i>Lactococcus lactis</i>	Stimulation de la réponse immunitaire	(Beecher et al., 2009)	Lait, fromages, yaourts Compléments alimentaires
	Amélioration de la composition du microbiote intestinal <i>in vivo</i> chez des rats chez lesquels le microbiote intestinal humain a été introduit	(Bernbom et al., 2006)	

I. 4. Les critères de sélection des souches probiotiques

Les critères de sélection des probiotiques se basent sur une première évaluation des propriétés des bactéries *via* des tests *in vitro* le plus souvent. Si les souches identifiées ont vocation à être incorporées dans la fabrication de produits alimentaires, alors leur résistance aux stress technologiques doit être également évaluée (Saarela et al., 2000) (Figure 4). Ces premières évaluations doivent absolument être complétées par des études *in vivo* en utilisant des modèles animaux puis par des études cliniques sur l'Homme en DACP afin de montrer l'efficacité des souches sur la santé et ainsi obtenir des allégations (FAO/OMS, 2002). Plusieurs critères de sélection stricts et des lignes directrices ont été établis par le comité d'experts FAO/OMS en 2002 afin de caractériser les meilleurs candidats au rôle de probiotique (Figure 4) (FAO/OMS, 2002). Parmi les critères de sélection énoncés dans le rapport établi par ce comité d'experts ; (i) absence de toxicité et de pathogénicité (souches d'origine humaine ou alimentaire ayant un statut GRAS), (ii) stabilité phénotypique et génotypique, (iii) effet antagoniste vis-à-vis des micro-organismes pathogènes par production de molécules antimicrobiennes (bactériocines), (iv) stimulation du système immunitaire, (v) survie aux conditions du TGI (tolérance à l'acidité gastrique et biliaire), (vi) capacité d'adhésion à différentes lignées cellulaires et/ou au mucus. Dans les sections suivantes seuls les deux derniers critères seront détaillés.

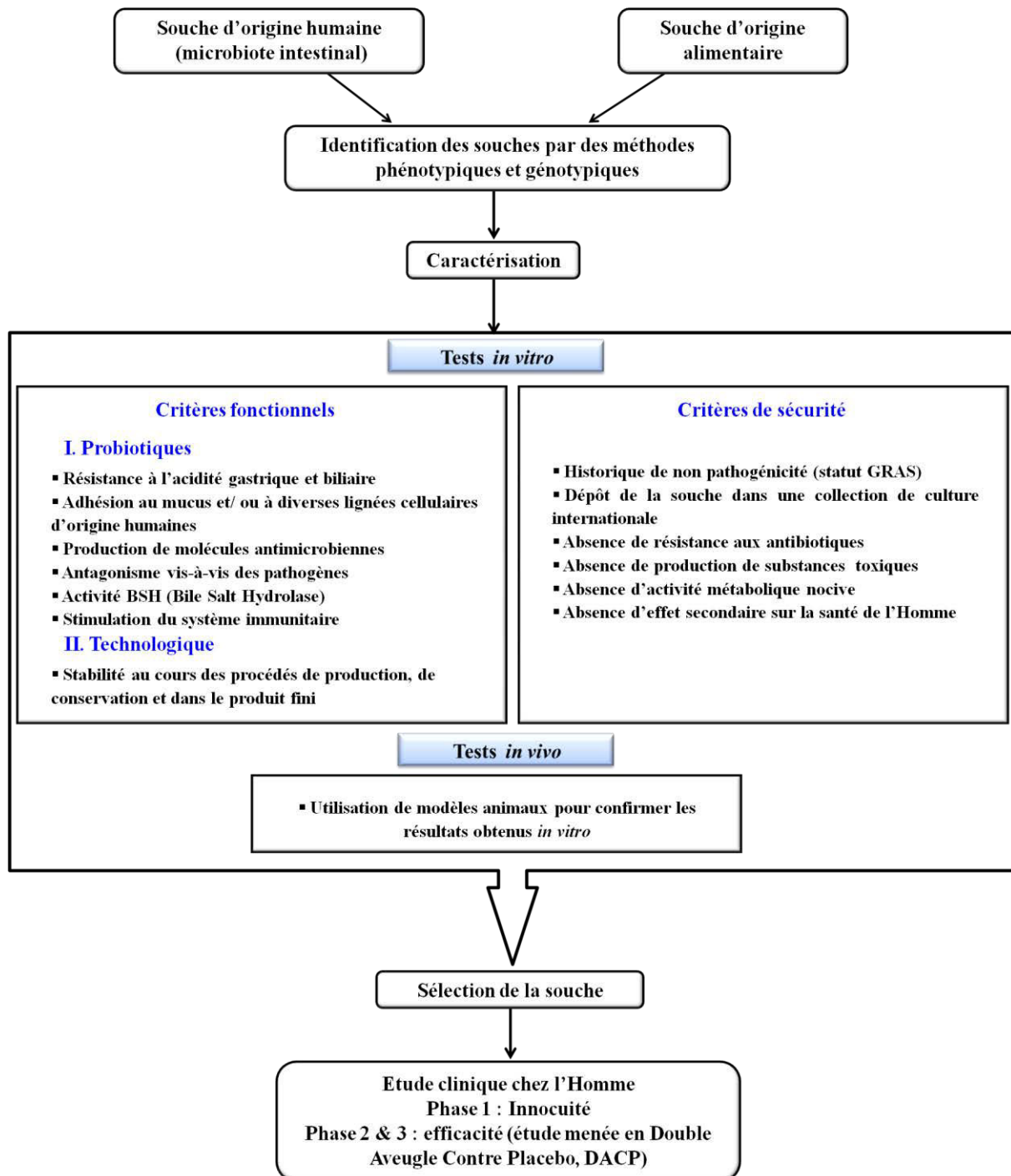


Figure 4 : Lignes directrices et critères stricts pour l'évaluation et la sélection de potentiels micro-organismes probiotiques (FAO/OMS, 2002).

I. 4. 1. La survie aux conditions du tube digestif

Le tube digestif est un écosystème complexe composé de différentes cellules et hébergeant plus de 10^{14} cellules bactériennes. Cependant, il produit différentes substances toxiques pour les bactéries. Ainsi, chez l'Homme, 2,5 litres de jus gastrique sont sécrétés par jour générant ainsi un pH acide de 1,5. Le pH gastrique augmente de 3 à 5 durant l'alimentation (Cotter and Hill, 2003). En plus de l'acidité gastrique, le foie sécrète chez l'Homme dans le duodénum approximativement 1 litre de bile par jour (Begley et al., 2005).

Pour que les bactéries issues de l'alimentation ou consommées *via* des compléments alimentaires agissent au niveau de leurs cibles, elles doivent garder une certaine viabilité en résistant aux conditions du TGI tels que le pH gastrique, les sécrétions pancréatiques et les sels biliaires. Ainsi et afin de pouvoir réaliser des criblages à haut débit, les chercheurs ont essayé de reproduire *in vitro* les conditions de stress du TGI (FAO/OMS, 2002 ; Morelli, 2007). Globalement, les tests réalisés *in vitro* pour évaluer la résistance des bactéries au stress acide s'effectuent par l'utilisation de cultures bactériennes, centrifugées et lavées puis exposées à un milieu acidifié. Un dénombrement sur milieu gélosé est alors réalisé pour déterminer le nombre de bactéries ayant survécu au stress acide. Toutefois, cette technique ne permet de détecter que les bactéries viables et cultivables. Pour le stress biliaire, les mêmes tests sont appliqués pour sélectionner de potentielles souches probiotiques sauf que le milieu contient des sels biliaires (Jacobsen et al., 1999 ; Iyer et al., 2010a). Il faut noter que les résultats des différentes études peuvent être variables selon la composition du milieu, les conditions de croissance initiales de la culture bactérienne, le nombre initial des cellules bactériennes, le temps d'exposition au stress, la valeur du pH ainsi que le type et la concentration des sels biliaires utilisés. C'est la raison pour laquelle toute comparaison pertinente entre les différentes études s'avère difficile.

Pour se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques rencontrées dans le TGI, d'autres tests ont pu être développés pour sélectionner de meilleurs candidats probiotiques. Afin de confirmer les résultats, ces tests consistent à utiliser des modèles *in vitro* simulant les différents compartiments du tube digestif (Mans Minekus, 1995 ; Mainville et al., 2005 ; Palencia et al., 2008 ; Uriot et al., 2016). Ces tests doivent être complétés par des études *in vivo* dans des modèles animaux (FAO/OMS, 2002).

Plusieurs études menées *in vitro* et *in vivo* ont rapporté que la survie aux conditions du TGI était très variable selon le genre, l'espèce et la souche. En effet, ces études ont montré que cette propriété était spécifique à chaque souche et ne peut être extrapolée aux autres souches du même genre ou de la même espèce (Vinderola and Reinheimer, 2003 ; Jensen et al., 2012). En effet, certaines souches bactériennes sont très sensibles aux conditions du TGI et elles sont rapidement éliminées lors du transit intestinal alors que d'autres présentent une certaine capacité de résistance leur permettant de survivre et de persister, à long ou à court terme, dans le TGI. A ce titre, elles peuvent contribuer à des effets thérapeutiques au niveau du tube digestif.

Dans la plupart des études réalisées, les lactobacilles, à l'exception de quelques souches, s'avèrent plus résistantes que les streptocoques et les lactocoques (Conway et al., 1987 ; Vinderola and Reinheimer, 2003 ; Palencia et al., 2008). Cependant, une étude a montré que les souches de *L. lactis* 660 et ATCC 11454 présentaient une meilleure résistance au stress acide que les lactobacilles et cette résistance était suivie d'une capacité d'adhésion élevée aux cellules Caco-2, notamment pour la souche ATCC11454 (Monteagudo-Mera et al., 2012). Les bactéries du yaourt *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *S. thermophilus* seraient, selon certaines études, sensibles aux stress acide et biliaire (Conway et al., 1987 ; Vinderola and Reinheimer, 2003). Toutefois, d'autres travaux ont montré que ces deux bactéries survivaient aux conditions du TGI (Brigidi et al., 2003 ; Mater et al., 2005).

➤ La survie au stress biliaire

a) La physiologie des sels biliaires et leurs mécanismes de sécrétion

La bile est une solution aqueuse sécrétée par le foie et composée d'acides organiques et inorganiques dont les principaux constituants sont les acides biliaires, le cholestérol, les phospholipides (principalement la phosphatidylcholine). Sa composition est variable et dépend de l'état nutritionnel de chaque individu (Figure 5) (Coleman, 1987 ; Begley et al., 2005).

Les sels biliaires représentent approximativement 50 % de la fraction organique de la bile (Figure 5a). Ils sont synthétisés dans le foie à partir de l'hydroxylation du cholestérol par de multiples processus enzymatiques. Après plusieurs modifications, deux sels biliaires sont synthétisés : l'acide cholique et l'acide chenodésoxycholique. Avant leur sécrétion, ces sels

biliaires subissent une conjugaison à la taurine ou à la glycine pour former des acides biliaires conjugués ou sels biliaires primaires (Figure 5c). Les sels biliaires synthétisés sont excrétés dans la bile qui est ensuite stockée et concentrée dans la vésicule biliaire. Celle-ci n'est pas essentielle dans la sécrétion de la bile mais facilite son stockage et la digestion des graisses. En fait, seule la moitié des sels biliaires contenus dans la bile hépatique est stockée et concentrée dans la vésicule biliaire, l'autre moitié entre dans le duodénum et subit un cycle entéro-hépatique (Figure 5b) (Begley et al., 2005 ; Boyer, 2013) qui consiste en un recyclage des sels biliaires. Une fois dans l'intestin, les sels biliaires subissent une déconjugaison par les bactéries du microbiote intestinal et notamment par les BL de ce microbiote et celles éventuellement ingérées lors de la consommation. Cette déconjugaison s'effectue par l'action enzymatique de la BSH (Bile Salt Hydrolase) conduisant ainsi à la formation des sels biliaires secondaires à savoir le désoxycholate, le lithocholate et l'urodésoxycholate (Figure 5c) (Lundeen and Savage, 1990 ; Begley et al., 2006). Dans les intestins, 95 % des sels biliaires sont réabsorbés *via* un mécanisme de transport actif. Transportés par la veine porte jusqu'au foie, les sels biliaires sont ensuite recyclés (Carey et Duane, 1994).

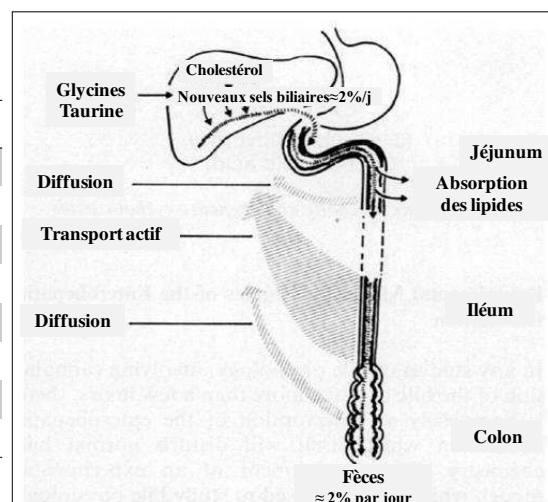
b) La fonction des sels biliaires au niveau intestinal

Au niveau du TGI, le flux biliaire joue un rôle physiologique majeur dans la digestion des nutriments, plus particulièrement dans l'émulsification et la solubilisation des composés lipophiles provenant de l'alimentation pour faciliter leur absorption (Maldonado-Valderrama et al., 2011 ; Moghimipour et al., 2015). Le flux biliaire permet également d'éliminer une grande variété de molécules pouvant être toxiques pour l'organisme (fonction de détoxification), comme par exemple la bilirubine, l'excès de cholestérol, des ions inorganiques (fer, cuivre) ainsi que certains xénobiotiques et médicaments (Begley et al., 2005 ; Kristiansen et al., 2007 ; Ridlon et al., 2016). Les sels biliaires présentent une activité antimicrobienne pouvant influencer sur la composition du microbiote intestinal ainsi que la survie de certains micro-organismes pathogènes (Begley, 2005; Ridlon et al., 2014). En effet, les sels biliaires sont des détergents biologiques qui affectent la composition lipidique et protéique de la membrane des bactéries, perturbant ainsi son intégrité et sa fonctionnalité (Taranto et al., 2006 ; Ruiz et al., 2007).

(a)

Composition des sels biliaires (en pourcentage du nombre de moles)	
Sels biliaires	% de sel biliaire total
Sufoglycolithocholates	2
Taurodeoxycholates	4
Glycochenodeoxycholates	25
Glycodeoxycholates	13
Chenodeoxycholates	37
Deoxycholates	17
Sulfolithocholates	2

(b)



(c)

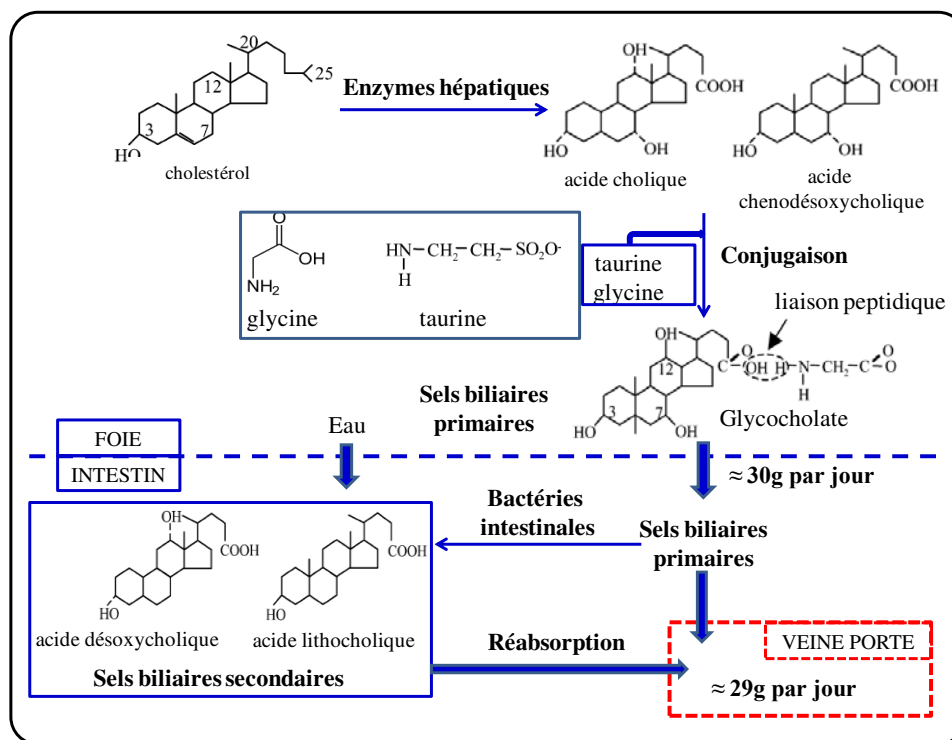


Figure 5 : Composition de la bile et voie de synthèse des sels biliaires. a) Composition en sels biliaires de la bile humaine (Kristiansen et al., 2007). b) Cycle entéro-hépatique des sels biliaires (Dowling, 1973). c) Représentation schématique de la formation des sels biliaires primaires et secondaires (Adapté de Carey et al., 1994 et de Begley et al., 2005).

c) Impact des sels biliaires sur la survie des bactéries et la composition du microbiote intestinal

La composition et la structure des sels biliaires dans la bile déterminent leurs fonctions physiologiques, leur cytotoxicité et leur activité antimicrobienne. En effet, ce sont

des molécules amphiphiles avec des propriétés détergentes. Cette propriété est directement reliée à leur capacité à émulsifier et à solubiliser les graisses. Ainsi, les sels biliaires sont de véritables inhibiteurs de la croissance bactérienne. Ils ont comme cible privilégiée la membrane cytoplasmique des bactéries. A de fortes concentrations, ils induisent une dissolution instantanée des lipides membranaires et déclenchent une dissociation des protéines de la membrane conduisant ainsi à la perte de l'intégrité membranaire, la fuite du contenu cellulaire et la mort de la bactérie (Begley et al., 2005). Les sels biliaires à de faibles concentrations affectent également les propriétés physico-chimiques de la membrane à savoir son hydrophobicité et son potentiel zêta (le potentiel zêta représente la charge électrique d'une particule en suspension) (Kociubinski et al., 2002 ; Khaleghi et al., 2010). L'impact des sels biliaires sur les propriétés structurales et fonctionnelles de la membrane plasmique a d'ailleurs été démontré chez certaines bactéries (Taranto et al., 2006 ; Ruiz et al., 2007). Les sels biliaires affectent la composition en acides gras et en phospholipides ainsi que la fonctionnalité de la membrane chez *B. animalis ssp. lactis* IPLA 4549 (Ruiz et al., 2007). Quant à la structure de la membrane, des changements au niveau de la surface cellulaire de certaines souches de BL ont été observés par microscopie électronique (Taranto et al., 2006 ; Ruiz et al., 2007 ; Khaleghi et al., 2010). De plus, des études protéomiques et transcriptomiques ont montré que l'exposition des lactobacilles (*Lb. plantarum* WCFS1, *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 et *Lb. casei* BL23) à la bile et aux sels biliaires modulait l'expression d'une panoplie de gènes et de la quantité de différentes protéines dont les protéines membranaires et les protéines de biosynthèse des acides gras (Bron et al., 2006 ; Koskenniemi et al., 2011 ; Alcántara and Zúñiga, 2012).

En plus de leurs effets drastiques sur la membrane bactérienne, les sels biliaires peuvent également être internalisés dans la cellule bactérienne et générer d'autres stress tels que le stress acide et oxydatif (Begley et al., 2005). Ce dernier peut avoir un impact sur l'ADN, la conformation des protéines ainsi que le métabolisme des sucres (Begley et al., 2005 ; Ridlon et al., 2014). Toutefois, la cytotoxicité des sels biliaires dépend de leur composition, leur concentration, leur type ainsi que leur structure (Bajor et al., 2010). Les sels biliaires hydrophobes sont plus toxiques puisqu'ils présentent une grande affinité pour les lipides membranaires. De plus, les sels biliaires conjugués sont des acides forts et plus toxiques. Par contre, ils sont incapables de traverser la membrane plasmique à moins qu'un transporteur membranaire soit disponible (Begley et al., 2005 ; Ruiz et al., 2013). Quant aux sels biliaires non conjugués ou libres, ils peuvent traverser facilement la bicouche lipidique et

entrer dans la cellule bactérienne par un mouvement de flip-flop passif. La capacité de diffusion passive des sels biliaries au travers de la membrane dépend du nombre de groupes hydroxyles (OH). Ainsi, les sels biliaries avec deux groupements hydroxyles entrent plus facilement dans la bactérie que les sels biliaries à trois groupements hydroxyles (Cabral et al., 1987 ; Begley et al., 2005 ; Taranto et al., 2006 ; Bajor et al., 2010).

Le microbiote intestinal est très variable d'un individu à un autre. Il peut être affecté par l'alimentation, l'âge, les différentes maladies ainsi que par une prise de médicaments (notamment les antibiotiques). Compte-tenu des effets des sels biliaries décrits ci-dessus, la concentration et la composition du pool de sels biliaries au niveau intestinal semblent être des facteurs importants dans la régulation de la structure et la composition du microbiote intestinal chez l'Homme (Floch et al., 1972 ; Ridlon et al., 2014). Récemment, Kakiyama et al. (2013) ont suggéré un lien entre une maladie hépatique (la cirrhose), la concentration des sels biliaries fécaux et la composition du microbiote intestinal. Dans cette étude, les auteurs ont montré que la diminution du taux de sels biliaries chez des patients atteints d'une cirrhose par rapport aux personnes en bonne santé induisait une dysbiose intestinale. Cette dysbiose a été caractérisée par une diminution significative des bactéries à coloration Gram positive au niveau du microbiote intestinal. Une corrélation a donc été supposée entre la cirrhose, la diminution du taux de sels biliaries secondaires au niveau des intestins et le déséquilibre au niveau de la composition du microbiote intestinal (Kakiyama et al., 2013). Une autre étude chez des rats en bonne santé a également montré qu'un taux élevé en sels biliaries dans les intestins conduisait à une diminution significative des bactéries appartenant aux phylums des Bacteroidetes et des Actinobactéries (Islam et al., 2011). Dans l'ensemble de ces études (notamment celle réalisée chez des patients cirrhotiques), la diminution du taux des sels biliaries au niveau intestinal favoriserait l'augmentation de la proportion des bactéries pro-inflammatoires et potentiellement pathogènes, comme les entérobactéries, dans le microbiote. Au contraire, leur augmentation semble favoriser l'apparition de bactéries à coloration Gram positive comme les Firmicutes ou les bactéries possédant une activité enzymatique BSH (Islam et al., 2011 ; Ridlon et al., 2014).

➤ *Les mécanismes moléculaires de la résistance bactérienne au stress biliaire*

Les bactéries ayant une capacité de survie aux conditions du TGI peuvent coloniser, au moins de façon temporaire, l'environnement intestinal (FAO/OMS, 2002 ; Morelli, 2007).

Les mécanismes associés à cette résistance ont souvent été étudiés chez les lactobacilles (Figure 6) et les bifidobactéries (Ruiz et al., 2013).

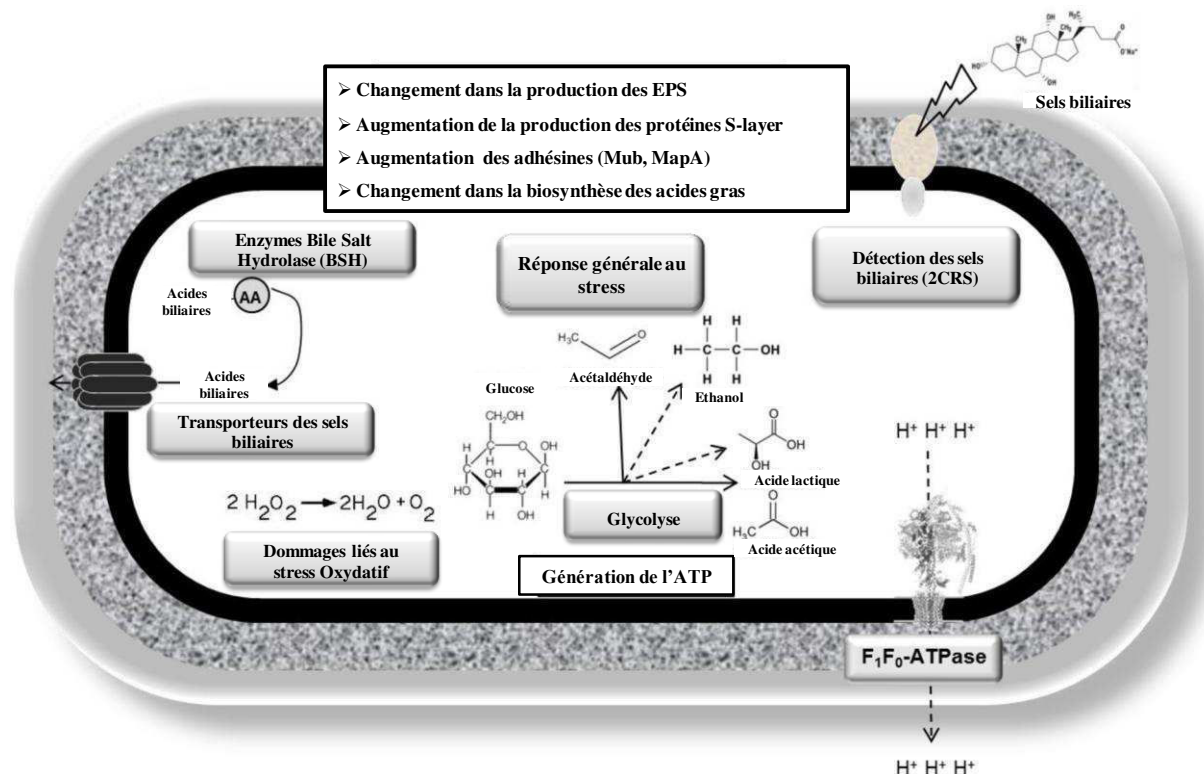


Figure 6 : Les mécanismes moléculaires majeurs de la résistance au stress biliaire caractérisés chez les lactobacilles (Ruiz et al., 2013).

Grâce à leur caractère lipophile, les sels biliaires ont comme cible privilégiée l'enveloppe cellulaire de la bactérie. Ainsi, l'un des mécanismes de résistance bactérien consiste à modifier les propriétés fonctionnelles et structurales de la membrane et de la paroi cellulaire (Gómez Zavaglia et al., 2002; Taranto et al., 2006 ; Ruiz et al., 2007 ; Alp and Aslim, 2010). En effet, des changements au niveau de la composition lipidique de la membrane suivant l'exposition des bactéries aux sels biliaires ont déjà été observés chez les lactobacilles et les bifidobactéries (Taranto et al., 2003 ; Taranto et al., 2006 ; Kociubinski et al., 2002 ; Ruiz et al., 2007). Ces altérations sont en relation avec l'adaptation et la réponse des bifidobactéries aux sels biliaires puisqu'ils sont considérés comme responsables des modifications des propriétés physico-chimiques de l'enveloppe cellulaire (Ruiz et al., 2007). Comme chez les bifidobactéries, le même phénotype a également été observé chez les lactobacilles (Taranto et al., 2003 ; Taranto et al., 2006). Des études transcriptomiques et protéomiques effectuées avec ces bactéries après leur exposition à la bile ont montré une augmentation de la production des enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides gras

(Koskenniemi et al., 2011 ; Alcántara and Zúñiga, 2012). Ces données indiquent l'importance de l'adaptation au stress biliaire par une modulation de la composition de la surface cellulaire.

Un autre mécanisme impliqué dans la résistance au stress biliaire est la production d'EPS qui forment une couche protectrice chez les différentes cellules bactériennes (Alp and Aslim, 2010 ; Fanning et al., 2012). Toutefois, la production des EPS dépend de la souche et des conditions de culture des bactéries (Boke, 2010 ; Zhang et al., 2014). Le rôle des EPS dans la résistance au stress biliaire a largement été décrit chez les bifidobactéries chez lesquelles la production d'EPS était induite en réponse au stress biliaire (Mozzi et al., 2009 ; Ruas-Madiedo et al., 2009). Fanning et ses collaborateurs ont montré chez *B. breve* UCC2003 que des souches qui produisaient des EPS (EPS⁺) étaient plus résistantes au stress acide et biliaire que des souches déficientes dans la production d'EPS (EPS⁻) (Fanning et al., 2012). Chez les lactobacilles, le rôle des EPS dans la résistance au stress biliaire est variable en fonction des souches. En effet, des études transcriptomiques et protéomiques chez *Lb. casei* Zhang et *Lb. plantarum* 299v ont pu mettre en évidence leur implication dans la résistance aux stress acide et biliaire (Marco et al., 2010 ; Wu et al., 2010). Toutefois, il a été montré avec des techniques transcriptomiques que les gènes codant les enzymes de biosynthèse des EPS étaient réprimés chez *Lb. acidophilus* NCFM après son exposition à la bile (Pfeiler et al., 2007). De même, Koskenniemi et ses collaborateurs ont rapporté une diminution de la production de ces enzymes au niveau transcriptomique et protéomique chez *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 après une exposition à la bile (Koskenniemi et al., 2011). Par ailleurs, il a été montré que l'inactivation du gène *welG* codant l'enzyme de biosynthèse d'EPS chez *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 réduisait significativement la production d'EPS à la surface bactérienne mais augmentait la capacité d'adhésion de la bactérie aux cellules Caco-2 et au mucus (Lebeer et al., 2009). Ainsi, il a été suggéré que la présence d'une couche épaisse d'EPS à la surface des lactobacilles envelopperait les adhésines et les protéines de surface conduisant ainsi à la diminution de leur capacité d'adhésion. Ainsi, au passage du TGI, l'exposition aux sels biliaires réduirait la biosynthèse des EPS ce qui permettrait une meilleure exposition des protéines de surface facilitant ainsi l'adhésion de ces bactéries à la muqueuse intestinale (Lebeer et al., 2009 ; Koskenniemi et al., 2011).

D'autres études moléculaires ont pu mettre en évidence le rôle des autres composants de la membrane bactérienne dans la résistance au stress biliaire. Ces études ont montré que l'expression des gènes codant les protéines MUB (mucus-binding protein) et mapA (mucus

adhesion promoting protein) étaient induite chez *Lb. plantarum* après une exposition à la bile suggérant ainsi leur implication dans la résistance au stress biliaire (Pfeiler et al. 2007; Weiss and Jespersen, 2010 ; Duany et al. 2012).

Une fois internalisés, les sels biliaires peuvent être hydrolysés. En effet, certaines souches bactériennes possèdent l'enzyme BSH qui catalyse l'hydrolyse des sels biliaires et libère la glycine/taurine du noyau stéroïde conduisant ainsi à la diminution de l'activité détergente des sels biliaires (Begley et al., 2006). Bien que l'activité enzymatique BSH soit plus répandue chez les lactobacilles, aucune relation directe avec leur résistance à la bile *in vitro* ou même *in vivo* n'a été mise en évidence. Ainsi, l'inactivation du gène *bsh* chez certains lactobacilles n'affecte pas nécessairement la survie des souches en présence des sels biliaires (Lambert et al., 2008 ; Fang et al., 2009).

Les sels biliaires déconjugués peuvent diffuser passivement au travers la membrane lipidique. Cette internalisation conduit à l'accumulation des sels biliaires dans la cellule bactérienne. Un autre mécanisme de résistance aux sels biliaires implique l'action des pompes d'efflux de la famille des multidrug resistance (MDR) responsables de l'extrusion des sels biliaires (Pfeiler and Klaenhammer, 2009). Ces pompes font partie de la super-famille des protéines à cassette fixant l'ATP (Adenosine TriPhosphate) : les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette). Un bon nombre de ces protéines ont été déterminées chez *Lb. acidophilus* NCFM (LBA0552, LBA1429, LBA1446, and LBA1679) et l'inactivation de l'un des gènes codant ces protéines augmentait la sensibilité de la bactérie à la bile (Pfeiler and Klaenhammer, 2009). Chez *Lb. reuteri* CRL 1098, le rôle des pompes d'efflux dans la résistance aux sels biliaires a été déterminé. Le mécanisme implique l'utilisation par les pompes d'efflux de l'ATP (Adenosine TriPhosphate) comme principale source d'énergie pour l'extrusion active des sels biliaires (Bustos et al., 2011).

Dans l'ensemble, les mécanismes intrinsèques de la résistance aux sels biliaires semblent être souche-dépendants et ne peuvent être extrapolés à d'autres souches.

I. 4. 2. L'adhésion bactérienne à la muqueuse intestinale

Outre la résistance aux conditions du TGI, l'adhésion bactérienne aux différentes lignées cellulaires et/ou au mucus est l'un des critères utilisés pour sélectionner des bactéries probiotiques, capables de persister et éventuellement de coloniser la muqueuse intestinale

(FAO/OMS, 2002). Dans un premier temps, le processus d'adhésion à une surface biotique ou abiotique s'effectue *via* des interactions physico-chimiques (interactions électrostatiques, forces de van der Waals ou interactions hydrophobes) (Van Oss et al., 1988) qui sont instantanées et réversibles. Dans un second temps, le micro-organisme s'adapte à la surface et met en place toute une machinerie protéique et non protéique lui permettant d'établir durablement des interactions spécifiques. Ces interactions conduisent à une colonisation *in vivo*, au moins temporaire, de la muqueuse intestinale. Une fois adhérents, les probiotiques peuvent exercer certaines activités bénéfiques sur la santé humaine comme l'immunomodulation et l'inhibition de l'adhésion des micro-organismes pathogènes (Servin and Coconnier, 2003 ; Lam et al., 2007 ; Lebeer et al., 2012 ; Walsham et al., 2016). Toutefois, ce processus n'est pas un prérequis pour produire certains effets probiotiques comme par exemple l'amélioration de la digestion du lactose.

Les propriétés adhésives des bactéries dépendent des caractéristiques physico-chimiques de la surface des cellules bactériennes (hydrophobie, charge nette de surface) ainsi que sa composition (polysaccharides, acides téichoïques ou lipotéichoïques et protéines) (Sengupta et al., 2013). D'autres facteurs peuvent également influencer sur la capacité d'adhésion des bactéries et le temps de résidence au niveau intestinal comme les mouvements péristaltiques, la compétition des bactéries pour les éléments nutritifs et la disponibilité des sites d'adhésion au niveau de la muqueuse intestinale. En ce qui concerne les composants de la surface cellulaire, l'expression et la production de ces molécules peuvent être variables en fonction des souches et des conditions expérimentales (Deepika et al., 2009 ; Deepika et al., 2012). Il est donc indispensable d'étudier les propriétés adhésives et les mécanismes moléculaires de l'adhésion au niveau souche et non espèce.

a) Méthodes d'évaluation de l'adhésion bactérienne

L'adhésion bactérienne étant difficile à mettre en évidence *in vivo*, différentes méthodes *in vitro* ont été développées pour pouvoir évaluer ce processus et sélectionner de bons candidats probiotiques. Ces méthodes consistent à utiliser soit des modèles cellulaires ou ses composants (Ouwehand and Salminen, 2003), soit des méthodes physiques comme la mesure de l'hydrophobicité de surface cellulaire (Rosenberg et al., 1980). Pour déterminer les propriétés adhésives *in vitro* des souches, des lignées cellulaires d'origine humaine pouvant mimer l'épithélium intestinal ont été largement utilisées (Coconnier et al., 1992 ; Schillinger et al., 2005 ; Turpin et al., 2012). Cette technique consiste, dans un premier temps, à

maintenir les cellules eucaryotes en culture jusqu'au stade de différenciation permettant la formation d'une monocouche cellulaire polarisée. Dans un second temps, une co-incubation de la suspension bactérienne avec la monocouche cellulaire est réalisée pour permettre leur attachement, suivie d'un lessivage des bactéries non adhérentes, d'une lyse des cellules eucaryotes et d'un dénombrement bactérien sur milieu gélosé, en microscopie ou parfois par cytométrie en flux afin de déterminer le nombre de bactéries adhérentes (Ouwehand and Salminen, 2003 ; Grootaert et al., 2011).

Les différentes lignées cellulaires, utilisées dans ces tests, ont été généralement obtenues à partir d'adénocarcinome du colon humain puis commercialisées (Tableau 3). Les lignées cellulaires les plus utilisées sont les Caco-2 et HT-29. Celles-ci ont la capacité de se différencier *in vitro* en entérocytes formant une monocouche cellulaire polarisée avec une barrière en brosse et présentent des caractéristiques de cellules épithéliales de l'intestin grêle (Fogh et al., 1977 ; Chopra et al., 2010 ; Liévin-Le Moal and Servin, 2013). C'est la raison pour laquelle elles ont été largement utilisées pour sélectionner de potentiels souches probiotiques (Coconnier et al., 1992).

Ces dernières décennies, d'autres lignées cellulaires ont été développées (Tableau 3). Selon les différentes étapes de culture cellulaire, les conditions de stress et les traitements médicamenteux effectués, différents clones de cellules entérocytes-like et des cellules caliciformes ont été dérivés de ces lignées parentales. A titre d'exemple, les cellules HT29-D4, HT29.74, HT29-19E, HT29-MTX, HT29-FU, HT29-MTX-E12, HT29-CL.16E, Caco-2/1, Caco-2/16, Caco-2/AQ et Caco-2 TC7 (pour revue détaillée sur les propriétés de ces lignées cellulaires voir Liévin-le Moal et Servin (2013)).

Comme l'épithélium intestinal est couvert d'une couche de mucus qui tapisse le glycocalyx et les microvillosités des cellules, d'autres lignées cellulaires comme HT29-MTX ont été utilisées pour se rapprocher le plus possible des caractéristiques de la muqueuse intestinale. Les cellules HT29-MTX ont été obtenues après un traitement des cellules HT-29 au méthotrexate. Ces cellules ont acquis la capacité de se différencier en cellules caliciformes capables de sécréter une couche de mucus (Lesuffleur et al., 1991 ; 1993 ; 1995). Celles-ci permettent d'évaluer les interactions des bactéries avec le mucus et ses composants. En outre, d'autres lignées cellulaires productrices de mucus ont été également dérivées de la lignée parentale HT-29 après traitement au 5-fluorouracil (HT29-FU) (Lesuffleur et al., 1991) ou encore au butyrate de sodium (HT29-CL.16E) (Augeron and Laboisie, 1984). Cependant, ces

dernières lignées sont rarement utilisées dans l'évaluation des propriétés adhésives des bactéries.

Une autre méthode de mesure de l'adhésion bactérienne consiste à utiliser des biopsies issues de l'Homme après consommation de probiotiques. Certaines études ont été réalisées en récupérant des échantillons lors d'examens de coloscopies (Ouwehand et al., 2002b ; Vesterlund et al., 2005). C'est ainsi que Alander et ses collaborateurs ont pu identifier le segment intestinal préférentiel d'adhésion de la souche *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 comme étant la partie descendante du côlon (Alander et al., 1997). Ces travaux suggèrent que la composition du microbiote intestinal pourrait avoir un effet sur la capacité d'adhésion des souches probiotiques. Cependant, l'utilisation de cette technique reste très limitée pour des raisons d'éthique et la difficulté à trouver des individus donneurs.

Une fois dans le tube digestif, les bactéries interagissent avec la couche de mucus qui tapisse l'épithélium intestinal. Ainsi, le mucus seul immobilisé sur un support a été également utilisé pour mesurer l'interaction des bactéries avec ses composants. Le mucus utilisé est isolé soit à partir d'échantillons fécaux de l'Homme ou d'intestins d'animaux, soit par récupération du mucus sécrété *in vitro* par les cellules caliciformes (Granato et al., 2004). Un autre moyen pour étudier l'adhésion des bactéries avec le mucus consiste à utiliser la mucine porcine commerciale (Laparra and Sanz, 2009).

Une autre façon d'évaluer les propriétés adhésives des bactéries consiste à étudier les propriétés physiques de surface. Il s'agit d'une méthode permettant de mesurer l'hydrophobicité de surface des bactéries en utilisant différents solvants organiques tels que l'hexadécane, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, l'octane et le xylène (Rosenberg et al., 1980 ; Iyer et al., 2010a). Cette technique consiste en une exposition de la suspension bactérienne, dont la densité optique (DO) initiale a été déterminée, avec le solvant organique. Après une agitation vigoureuse du mélange, des microgouttelettes de solvants se forment, sur lesquelles les bactéries s'adsorbent plus au moins selon leurs propriétés de surface (Saad, 2010). Après repos et séparation des différentes phases, la mesure de la DO de la phase aqueuse est effectuée. L'hydrophobicité de surface bactérienne (H %) est ainsi déterminée d'après la relation suivante (Rosenberg et al., 1980 ; Saad, 2010) : $H \% = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$, d'où A_0 et A correspondent aux mesures de DO avant et après extraction avec le solvant, respectivement (Vinderola and Reinheimer, 2003). Ainsi, la bactérie est dite hydrophobe lorsque le pourcentage d'adhésion au solvant est supérieur à 50 %, hydrophile quand ce pourcentage est

inférieur à 20 % et moyennement hydrophobe si le pourcentage est compris entre les deux (Lee and Yii, 1996). En outre, si l'hydrophobicité est élevée, cela signifie que la capacité d'adhésion de la bactérie est importante. Bien que certaines études ont montré une corrélation entre le profil d'hydrophobicité et la capacité d'adhésion des bactéries à des surfaces biotiques ou abiotiques (Valeriano et al., 2014), d'autres au contraire n'ont montré aucun lien entre les deux phénotypes (Flint et al., 1997; Ouwehand et al., 1999 ; Schillinger et al., 2005 ; Muñoz-Provencio et al., 2009). C'est la raison pour laquelle ces tests doivent être complétés par d'autres essais *in vitro* afin de mettre en évidence la capacité d'adhésion des bactéries.

Tableau 3 : Caractérisation des lignées cellulaires utilisées pour étudier l'adhésion bactérienne

Lignées cellulaires	Origine	Caractéristiques	Gènes codant les mucines	Références
Caco-2 TC7	Adénocarcinome de côlon humain (petit intestin, ne produit pas de mucus)	Différenciation spontanée en cellules entérocytaires formant une monocouche cellulaire polarisée mimant une barrière intestinale fonctionnelle	<i>MUC1, MUC3, MUC4, MUC2, MUC5AC, MUC6</i> et <i>MUC13</i>	Fogh et al., 1975 Bernet-Camard et al., 1996 ; Van klinken et al., 1995 ; Bu et al., 2011
HT-29	Adénocarcinome de côlon humain (petit intestin, ne produit pas de mucus)	Différenciation spontanée en cellules entérocytaires et cellules caliciformes (moins abondantes) formant une monocouche cellulaire polarisée mimant une barrière intestinale fonctionnelle.	<i>MUC1, MUC2, MUC3</i>	Augeron and Labois, 1984 ; Dahiya et al., 1992
HT29-MTX	Cellules HT29, provenant d'un adénocarcinome humain, traitées au méthotrexate (intestin grêle, forte production de mucus)	Différenciation en cellules caliciformes formant une monocouche cellulaire homogène polarisée qui présente une légère bordure en brosse enrobée par des hydrolases intestinales et sécrète des mucines d'immunoréactivité gastrique	<i>MUC1, MUC2, MUC3, MUC5AC</i>	Lesuffleur et al., 1990 ; Lesuffleur et al., 1993 ; Lesuffleur et al., 1995 ; Huet et al., 1995
HT29-Cl.16E	Cellules HT29 traitées au butyrate de sodium (petit intestin, forte production de mucus)	Différenciation en cellules caliciformes (goblet cells) polarisées sécrétant un mucus d'immunoréactivité colique	<i>MUC3, MUC2</i>	Augeron and Labois, 1984 ; Maoret et al., 1989 ; Jarry et al., 1994 ; Velcich et al., 1995

b) Les mécanismes moléculaires de l'adhésion bactérienne

Comme indiqué précédemment, la première étape du processus d'adhésion fait appel à des interactions aspécifiques de type Van der Waals, électrostatiques et hydrophobes. Après une adaptation à la surface cible, les bactéries s'attachent de façon spécifique grâce aux

propriétés structurales et fonctionnelles des composants de la surface cellulaire. L'adhésion bactérienne a été étudiée initialement chez les bactéries pathogènes puisqu'elle constitue l'une des étapes cruciales dans le processus infectieux. Ainsi, plusieurs études ont pu décrypter les mécanismes moléculaires de leur adhésion aux cellules hôtes. Parmi les molécules impliquées dans ce processus, les adhésines filamenteuses comme les fimbriae, qui sont composées de plusieurs sous-unités protéiques et qui sont ancrées à la surface bactérienne. Les fimbriae se fixent à des récepteurs spécifiques de la cellule établissant ainsi les étapes initiales de l'adhésion. Après l'attachement, la fimbria se rétracte, ce qui permet de mettre les bactéries en contact serré avec les cellules hôtes (Kline et al., 2009 ; Nobbs et al., 2009; Hung and Christodoulides, 2013). Chez les bactéries non pathogènes et plus particulièrement les bactéries potentiellement probiotiques, des structures semblables à des flagelles ou à des fimbriae ont déjà été observées et caractérisées chez certaines souches de lactobacilles où elles joueraient un rôle prépondérant dans l'adhésion (McGroarty, 1994 ; Lebeer et al., 2012 ; Reunanen et al., 2012). En effet, il a été montré que l'inactivation du gène *spaCBA* codant un pilus chez *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 réduisait significativement sa capacité d'adhésion aux cellules Caco-2 (Lebeer et al., 2012).

En plus des adhésines filamenteuses, la surface des bactéries pathogènes et non pathogènes est parsemée d'autres entités protéiques présentant un motif LPxTG et qui sont ancrées à la paroi *via* l'action enzymatique de transpeptidases, les sortases (le mécanisme d'ancrage sera décrit plus en détail dans la section III. 6). Ces enzymes sont impliquées dans l'adhésion et la colonisation de l'épithélium intestinal de ces bactéries. Ainsi, l'inactivation du gène *srtA* codant la Sortase A chez *S. agalactiae* NEM316 réduisait significativement la capacité d'adhésion de la souche *in vitro* aux cellules Caco-2 et sa persistance *in vivo* dans des modèles de souris gnotobiotiques (Lalioui et al., 2005). Le même phénotype a été également observé chez *S. gordonii* SP204 (Bolken et al., 2001), *S. suis* NCTC 10234 (Vanier et al., 2008) et *S. sanguinis* ATCC 10556 (Yamaguchi et al., 2006).

Par ailleurs, l'enzyme SrtA semble avoir le même rôle chez les BL à potentiel probiotique puisque la délétion du gène *srtA* conduisait à une diminution significative de la capacité d'adhésion de plusieurs lactobacilles tels que *Lb. casei* BL23 (Muñoz-Provencio et al., 2012), *Lb. salivarius* UCC118 (van Pijkeren et al., 2006), *Lb. plantarum* WCFS1 (Pretzer et al., 2005) et *Lb. reuteri* ATCC PTA 6475 (Jensen et al., 2014). Les protéines à motif LPxTG telles que les protéines à domaine MUB et les protéases de paroi joueraient également

un rôle clé dans l'adhésion de ces bactéries (Mackenzie et al., 2010). D'autres protéines de surface appelées protéines de la couche S (S-layer proteins) sont importantes dans l'adhésion des lactobacilles (Lebeer et al., 2008). Toutefois ces protéines ne sont pas présentes chez tous les lactobacilles (Avall-Jääskeläinen and Palva, 2005). Des études ont montré que l'inactivation du gène *slpA* diminuait significativement la capacité d'adhésion de *Lb. acidophilus* NCFM aux cellules Caco-2 (Buck et al., 2005). Par ailleurs, un traitement chimique permettant l'élimination de la couche S réduisait également la capacité d'adhésion de certaines souches de lactobacilles ainsi que leurs activités probiotiques (Frece et al., 2005 ; Zhang et al., 2013).

D'autres protéines appelées « protéines de ménage », ayant des fonctions essentiellement intracellulaires, semblent intervenir dans le processus d'adhésion chez certaines souches de BL probiotiques. Il s'agit des protéines GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), fréquemment détectées dans le protéome extracellulaire, l'énolase, le facteur d'élongation TU (EFTU) et GroEL. Des études ont montré que la protéine GAPDH de *Lb. plantarum* LA 318 et *Lb. reuteri* ZJ617 adhéraient aux mucines coliques et aux cellules Caco-2, respectivement (Kinoshita et al., 2008 ; Zhang et al., 2015). De façon similaire, les protéines GroEL et EF-TU sont impliquées dans l'adhésion de *Lb. johnsonii* NCC 533 aux cellules HT-29 et Caco-2 ainsi qu'aux mucines des cellules HT29-MTX (Granato et al., 2004 ; Bergonzelli et al., 2006). La fonction adhésive de ces protéines serait pH dépendant, c'est-à-dire plus efficace à bas pH (Granato et al., 2004 ; Bergonzelli et al., 2006 ; Kainulainen et al., 2012). De plus, il a été montré que les protéines GroEL et GAPDH étaient induites chez *S. thermophilus* LMD-9 après son passage dans le tube digestif de rats gnotobiotiques suggérant ainsi qu'elles seraient impliquées dans l'adhésion et la colonisation de l'épithélium intestinal (Rul et al., 2011). Une autre protéine, l'énolase, aurait une spécificité d'adhésion à la fibronectine humaine et au collagène (Castaldo et al., 2009 ; Kainulainen et al., 2012).

En plus des protéines de surface, d'autres entités non protéiques à la surface bactérienne pourraient être impliquées dans l'adhésion des bactéries pathogènes et non pathogènes à potentiel probiotique. Il s'agit de polysaccharides capsulaires, du peptidoglycane, des EPS et des acides lipotéichoïques. Une étude a montré que les acides lipotéichoïques jouaient un rôle de facteur d'adhésion chez *Lb. johnsonii* NCC 533 (Granato et al., 1999). Les EPS seraient également impliqués dans ce processus mais de façon souche et

espèce dépendante (Ruas-Madiedo et al., 2006). Ainsi, chez *B. breve* A28 et *B. bifidum* A10, les EPS jouaient un rôle prépondérant dans l'adhésion aux cellules Caco-2 (Alp et al., 2010).

Dans l'ensemble, de nombreuses molécules protéiques et non protéiques bactériennes seraient importantes dans l'établissement des interactions avec la muqueuse intestinale et plus particulièrement le mucus qui est composé de glycoprotéines de haut poids moléculaire et qui jouerait un rôle de récepteurs interagissant avec les bactéries du microbiote intestinal.

Conclusion

Les travaux sur les micro-organismes probiotiques sont en plein essor notamment en lien avec le microbiote intestinal et leurs effets bénéfiques rapportés. Récemment un autre effet a suscité un grand intérêt, il s'agit du pouvoir anxiolytique de certaines souches probiotiques. En effet, des probiotiques comme les lactobacilles et les bifidobactéries, ayant une action sur le système nerveux central, ont montré une efficacité (chez l'Homme et l'animal) dans l'amélioration des troubles de comportements psychiatriques comme l'anxiété, la dépression, le trouble obsessionnel-compulsif et les capacités de mémoire (Wang et al., 2016). D'ailleurs, une étude en DACP chez des ouvriers travaillant en pétrochimie a montré, après une comparaison entre i) un yaourt probiotique (un yaourt conventionnel supplémenté par les souches *Lb. acidophilus* LA5 et *B. lactis* BB12), ii) une administration de capsules probiotiques (contenant *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. bulgaricus*, *B. breve*, *B. longum* et *S. thermophilus*) et iii) une consommation d'un yaourt traditionnel avec un placebo, que les deux premiers produits étaient plus efficaces pour atténuer la détresse, l'anxiété et la dépression de ces travailleurs par rapport à un yaourt traditionnel (Mohammadi et al., 2016). Toutefois, ces effets bénéfiques nécessitent d'être mieux caractérisés au travers d'autres études cliniques chez l'Homme.

Par ailleurs, la capacité de certaines souches de BL à interagir avec les composants des produits alimentaires consommés pourrait conduire à la libération de molécules bioactives, comme les peptides, qui elles-mêmes seraient de bons facteurs agissant à la fois au niveau de l'épithélium intestinal et sur le bon fonctionnement du système nerveux (Pessione and Cirrincione, 2016). En effet, certains peptides à activité biologique peuvent agir au niveau de la muqueuse intestinale et ils s'avèrent efficaces sur l'induction et la production de mucus *in vitro* (Plaisancié et al., 2013 ; 2015). Ainsi, l'étude des interactions entre le microbiote

intestinal, les bactéries probiotiques et la muqueuse intestinale contribueraient à la compréhension des effets bénéfiques des probiotiques.

CHAPITRE II :

L'ADHÉSION BACTÉRIENNE À LA MUQUEUSE INTESTINALE : INTERACTIONS AVEC LE MUCUS

- II. L'adhésion bactérienne à la muqueuse intestinale : propriétés d'interaction des bactéries avec les mucines du tractus gastro-intestinal
- *Revue.* Mucins: The major component of the gastrointestinal mucus and an important element in interactions between intestinal mucosa, probiotic bacteria and dietary particles
-

Chapitre II. L'adhésion bactérienne à la muqueuse intestinale : propriétés d'interaction des bactéries avec les mucines du tractus gastro-intestinal

Cette partie est rédigée sous la forme d'une revue de littérature qui est soumise au *Journal of Functional Foods*:

Mounira Kebouchi, Yves Le Roux, Claire Soligot, Annie Dary-Mourot, Magali Genay

Introduction à la publication

L'adhésion bactérienne à la muqueuse intestinale peut être nécessaire pour que certaines souches probiotiques puissent exercer certains effets thérapeutiques sur l'hôte. Ces dernières décennies, les travaux de recherche réalisés pour étudier la capacité d'adhésion des bactéries lactiques (BL) se sont intéressés aux interactions spécifiques établies entre les cellules bactériennes et la muqueuse intestinale. En effet, l'adhésion bactérienne dépend des propriétés de surface des bactéries notamment la composition, la structure et l'organisation de la paroi cellulaire. Ainsi, diverses molécules bactériennes impliquées dans ce processus ont alors été identifiées. Par ailleurs, la capacité d'adhésion des bactéries est également influencée par la composition et la structure de la muqueuse intestinale. En effet, la muqueuse est constituée de différentes composantes pouvant jouer un rôle crucial dans l'adhésion des bactéries (Figure 7). Ainsi, la première barrière interagissant avec les bactéries consiste en une substance viscoélastiques appelée mucus. Le mucus est principalement composé de glycoprotéines à haut poids moléculaire qui s'organisent selon un squelette protéique, lié à un réseau complexe de chaînes latérales oligosaccharidiques. Ces chaînes d'oligosaccharides constituent une cible potentielle d'interaction avec les adhésines bactériennes et/ou une source d'énergie pour le microbiote intestinal.

Cette revue résume ainsi les différents types de mucines retrouvées spécifiquement dans le tube digestif et leur rôle dans l'établissement des interactions avec les bactéries afin d'aboutir à une compréhension mécanistique fine de l'adhésion des bactéries lactiques à la muqueuse intestinale. En outre, les molécules bioactives, pouvant être libérées par les bactéries dans l'aliment, pourraient également influencer la structure et la composition de la couche du mucus.

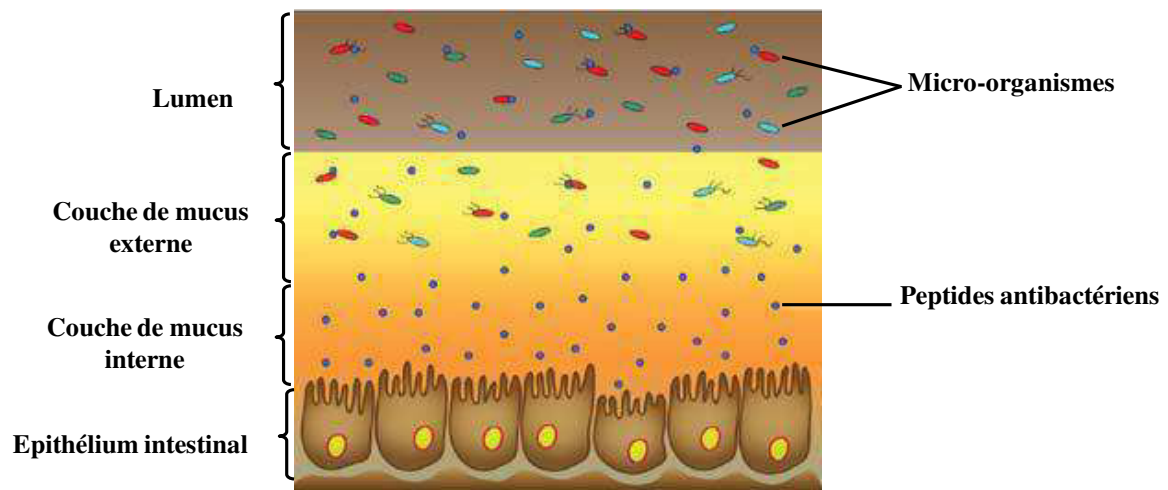


Figure 7 : Représentation schématique des constituants de la muqueuse intestinale humaine. L'épithélium intestinal est protégé par la couche de mucus interne. La production de peptides antibactériens par les cellules épithéliales contribue au maintien de la stérilité de cette couche contrairement à la couche externe qui est colonisée par les bactéries commensales (Nuding et al., 2013).

Revue. Mucins: The major component of the gastrointestinal mucus and an important element in interactions between intestinal mucosa, probiotic bacteria and dietary particles

Mounira Kebouchi, Yves Le Roux, Claire Soligot, Annie Dary-Mouroto, Magali Genay[#]

Université de Lorraine, Unité de Recherche « *Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux* » (UR AFPA), Équipe « *Protéolyse & Biofonctionnalités des Protéines & des Peptides* » (PB2P), Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France

INRA, Unité de Recherche « Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux » (UR AFPA), Unité Sous Contrat 340, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France

[#]Corresponding author. *Université de Lorraine, Unité de Recherche « Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux » (UR AFPA), Équipe « Protéolyse & Biofonctionnalités des Protéines & des Peptides » (PB2P), Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France Phone: +33 (0) 3 83 68 42 66. E-mail: magali.genay@univ-lorraine.fr*

Abstract

The mucus layer, covering the intestinal epithelium, forms a protective barrier against a variety of harmful bacteria and prevents their translocation into tissue. This layer is mainly composed by mucins which are used as nutrients source and attachment sites by the resident bacteria. Thus, the mucus layer is in constant interactions with bacteria which could modulate the structure, composition and thickness of this layer. Beside the intestinal microbiota, an exogenous intake of probiotic bacteria and dietary particles derived from food after digestion could also influence the mucus layer properties. Indeed, this impact could occur on mucin gene expression, mucin exocytosis, mucin glycosylation or even on the level of mucins in the mucus layer. This review introduces some aspects of the interactions established between the mucus components and the probiotic bacteria as well as the dietary particles and their effects on mucins production and mucus layer properties.

Key word: mucus, mucins, intestinal mucosa, gut microbiome, probiotic bacteria

1. Introduction

The human digestive tract is a complex organ consisting of a stable alliance between the epithelial barrier, immune system and resident microbiota. This organ harbors different intestinal epithelial cells including absorptive enterocytes, goblet cells, Paneth cells and immune cells. The major roles of the human digestive tract consist of absorption and assimilation of nutrients and molecules derived from ingested food and exclusion of undigested food and some microbes with their metabolic products. In the other hand, it plays a protective role against harmful molecules and pathogenic microorganisms and contributes to the sensory functions in the gut including the innate and adaptive immune response (McCracken & Lorenz, 2001; Dharmani, Srivastava, Kissoon-Singh, & Chadee, 2009).

The epithelium in the digestive tract is lined with a slime layer called mucus which is secreted by goblet cells and characterized by a variable thickness ranging from 200 μm to 700 μm along the gastrointestinal tract (GIT) of rats (Atuma, Strugala, Allen, & Holm, 2001). Furthermore, the human GIT harbors over 10^{13} of resident bacteria per gram of faeces colonizing the mucus layer (Martins dos Santos, Müller, & de Vos, 2010; Li et al., 2015). The intestinal microbiota varies in number of microbes and species throughout the digestive tract (Li et al., 2015). Indeed, in the stomach and the small intestine, there are few resident bacteria (Bik et al., 2006) due to the presence of high concentrations of hydrochloric acid and bile salts but the number of bacteria increases to a large degree in the distal ileum and the colon (Lopetuso, Scaldaferri, Franceschi, & Gasbarrini, 2014).

The host-bacterial associations have co-evolved over time creating a relationship with mutual benefits (Bäckhed et al., 2005; Chow et al., 2010). This association is specifically held in the mucus digestive tract as it forms their natural habitat (Bäckhed et al., 2005). Thus, the microbiota takes advantages from the GIT, but it also performs several functions in the intestine such as the capacity to degrade a variety of ingestible polysaccharides (Ramakrishna, 2013) including cellulose, hemicelluloses and other plant-derived products and the protection of the intestinal mucosa (for review see Bäckhed et al., 2005; Leser and Mølbak, 2009). The later has been widely highlighted with *in vivo* studies by comparing the intestinal epithelium of germ free (GF) and conventional animals (CV) showing how the presence and the absence of the gut microbiota affects the general structure of the intestinal epithelium, the mucus layer composition and the cell epithelial differentiation (Falk et al., 1998). Szentkuti et al. (1990)

have shown that the in GF mice, the thickness and composition of the mucus layer in distal colon was different from that observed in CV mice (Szentkuti et al., 1990).

Moreover, the secreted mucus forms a stratified layer of mucus in CV mice unlike that of GF mice (Szentkuti et al., 1990). More recently, it has been shown by comparing GF, CV and monoassociated birds that gut microbial community affects goblet cells number and development as well as mucin types (Cheled-Shoval et al., 2014). Indeed, the absence of bacteria in the GIT of GF birds resulted in reduction in goblet cell number and in mucin production and secretion. Furthermore, a significant decrease in mucin 2 (the mucin 2 is defined as MUC2 in human and as Muc2 in mice and other animals) transcripts level was also observed in GF birds as compared with CV and monoassociated birds (Cheled-Shoval et al., 2014).

In the same way, Johansson et al. (2015) have reported that the mucus layer in GF was penetrable to bacteria-sized beads unlike that of conventionalized mice. This study has also shown by quantitative proteomic that the amount of Muc2 mucins was significantly lower in GF colon as compared to conventionalized mice (Johansson et al., 2015). Moreover, conventionalization of GF mice after 6 weeks leads to changes in the mucus properties so it becomes impenetrable to bacteria-sized beads indicating the importance of intestinal microbiota in the maturation and protection of the intestinal mucus (Johansson et al., 2015). It should be noted that the microbiota composition could be influenced by the diet leading to changes in the mucus thickness and properties (Jakobsson et al., 2015).

The modifications occurred on intestinal mucus properties especially on mucins secretion and production as well as their gene expression (Andrianifahanana, Moniaux, & Batra, 2006; Davis & Dickey, 2008) is not limited to the resident bacteria but an exogenous intake of probiotic microorganisms (*via* the consumption of fermented milk and food supplements) and molecules derived from food could also have an impact on the intestinal mucosa components. After focusing on mucus, mucin structure and their organization in the GIT, this review will discuss the bacteria-mucus components interactions and mucin-dietary protein interactions, summarizing the recent insights about the impact of bacteria and dietary molecules on mucus secretion which is an essential element for the health of the digestive tract.

2. Mucus layer properties and functions in the gastrointestinal tract

Mucus is continuously secreted at various epithelial surfaces including the GIT. In human, its secretion is constantly renewed and can reach approximately 10 liter per day (Moore, 1976). This mucus layer constitutes a protective barrier between the luminal microbiota and the epithelial cells and its defect may lead to colonic inflammatory diseases (Gustafsson et al., 2012; Johansson, Sjövall, & Hansson, 2013).

The mucus layer organization and composition differ along the GIT. *In vivo* studies characterizing the thickness and properties of the intestinal mucus have shown the presence of two mucus layers covering the intestinal mucosa in intestinal segment-dependent manner (Johansson et al., 2008; Ermund, Gustafsson, Hansson, & Keita, 2013). In the stomach and the colon, the mucus layer is well defined and it is composed by two layers, whereas the small intestine contains only one mucus layer, that is rather discontinuous, disorganized and thinner than those of stomach and colon (Atuma, Strugala, Allen, & Holm, 2001; Ermund, Gustafsson, Hansson, & Keita, 2013). In the two last segments, ie the stomach and the colon, the two mucus layers are characterized by: -i) an inner layer which is dense, strongly attached to the epithelium and that requires scraping to be removed, ii) an outer loose layer which is more hydrophobic and readily releasable (Johansson et al., 2008; Gustafsson et al., 2012). These two layers differ slightly in their composition and organization. The firmly attached mucus layer is less hydrated, devoid of bacteria and has more stratified appearance (Johansson et al., 2008; Johansson et al., 2011; Gustafsson et al., 2012). However, the loose layer, formed by an expansion of the inner layer and which faces the lumen, is completely disorganized and more hydrated (Johansson et al., 2008). In addition, this layer is thicker than the inner layer and colonized by the commensal bacteria in the colon (Atuma, Strugala, Allen, & Holm, 2001; Johansson et al., 2008; Hansson & Johansson, 2010; Ermund, Gustafsson, Hansson, & Keita, 2013).

Other studies on mucus organization performed using histological techniques *in vivo* and by *ex vivo* experiments on human colon and mouse small and large intestine have reported that the inner mucus layer was thicker in human colon than those of rodents (Gustafsson et al., 2012). These studies have also reported that this layer was impermeable to bacteria or microparticles with a size of 0.5 μm (Gustafsson et al., 2012; Ermund, Gustafsson, Hansson, & Keita, 2013) and that it is mainly formed and constantly renewed approximately every 1-2 hours by surface goblet cells in the colon (Gustafsson et al., 2012; Johansson, 2012;

Johansson, Sjövall, & Hansson, 2013). Moreover, in the stomach and colon, this layer is converted into the outer mucus layer probably by proteolytic cleavage within the mucins leading to an expansion in volume and the formation of the loose mucus layer (Johansson et al., 2008; Johansson, Sjövall, & Hansson, 2013; Johansson et al., 2011). The outer mucus layer is easily permeable to bacteria and is not firmly attached to the inner layer (Gustafsson et al., 2012; Ermund, Gustafsson, Hansson, & Keita, 2013). In small intestine, only the loose mucus is constantly secreted from the crypt openings and contains antibacterial molecules thus protecting the epithelium against bacteria (Vaishnava et al., 2011; Ermund, Gustafsson, Hansson, & Keita, 2013).

The mucus secretion is largely produced by several types of goblets cells which are lining the GIT. Their proportion among all epithelial cells increases along the proximal (~4%) to distal axis (~16%) of the gut tube (van der Flier & Clevers, 2009; McGuckin, 2015). Although the knowledge about the cell biology of goblet cells is still limited, the studies have reported that they are derived by sequential differentiation (Gordon, 1989). Goblet cells migrate up the crypt; they manufacture, store and release mucins by different regulated pathways depending on the intestinal segment and the environmental stimuli (for the discussion of the signaling pathway of the cell differentiation of different cells in the GIT and mucins exocytosis, the readers are referred to the following reviews; Karam, 1999; van der Flier and Clevers, 2009; Birchenough, Johansson, Gustafsson, Bergström, & Hansson, 2015).

Mucus is characterized by its viscosity and rheological properties. These properties are due to its composition which predominantly includes water (~95%) and glycoproteins called mucins. In addition, the mucus is also composed by electrolytes, enzymes, salts, DNA, lipids, growth factors and antibacterial molecules such as defensins, immunoglobulins, lysozyms and trefoil factors (Vaishnava et al., 2011; McGuckin et al., 2015). In the small intestine and the colon, these antibacterial molecules are concentrated in the mucus layer near the epithelium keeping then bacteria at a distance and preventing them to gain access to essential organs (Meyer-Hoffert et al., 2008). Thus, the mucus serves as a flexible scaffold for a wide variety of bacteriostatic and bactericidal proteins that act together as a primary protection barrier (Birchenough, Johansson, Gustafsson, Bergström, & Hansson, 2015). This barrier protects also the epithelial mucosa against mechanical injuries and maintains the epithelium hydration (Cornick, Tawiah, & Chadee, 2015). It is also considered as a molecular sieve allowing the exchange of nutrients, drugs and beneficial molecules and preventing those

harmful such as enteric pathogenic bacteria, viruses and parasites (Ermund, Gustafsson, Hansson, & Keita, 2013; Pelaseyed et al., 2014; Cornick, Tawiah, & Chadee, 2015).

In the GIT, the mucus is considered as a lubricant facilitating the passage of the chyme from the stomach to the colon (Lai, Wang, Wirtz, & Hanes, 2009; Cornick, Tawiah, & Chadee, 2015). The mucins composing the mucus are highly glycosylated and the glycan moieties could serve as attachment site and as nutrient sources for commensal and probiotic bacteria allowing their colonization and development in the intestine (Sonnenburg et al., 2005; Arike & Hansson, 2016). Indeed, it has been recently demonstrated in mice that the *O*-glycans moieties of mucins play an important role in shaping the microbial communities in the intestinal ecosystem of mice (Staubach et al., 2012). Moreover, the loss of a mucin glycosylation especially the Core 1-derived *O*-glycans (the predominant form of mucin *O*-glycans in mice) leads to the development of spontaneous colitis in mice model (Fu et al., 2011). Furthermore, the alteration of mucus glycosylation impacts also the intestinal microbiota composition and the gut architecture in mice models (Sommer et al., 2014). All of these data indicate the importance of mucin *O*-glycans in the contribution of symbiotic interactions between the microbiota and the intestinal mucosa as well as in the protection of the intestinal epithelium.

3. Various mucins, their properties and biosynthesis mechanisms

Mucins are the major building blocks of the mucus gel. They consist of large proteins highly glycosylated with an average molecular weight of 2×10^6 Daltons (Hollingsworth and Swanson, 2004). They are expressed in different organs in the body but their expression, composition and functional properties varied considerably among host tissues.

In the adult human digestive tract, a wide variety of mucins are expressed and secreted at the epithelium surfaces (Andrianifahanana, Moniaux, & Batra, 2006; Johansson et al., 2011; Johansson, Sjövall, & Hansson, 2013). These mucins are grouped into three distinct subfamilies: i) secreted gel-forming mucins (MUC2, MUC5AC, MUC5B, and MUC6), ii) secreted non-gel forming mucins (MUC7), and iii) cell-bound membrane mucins (MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC13, MUC16, and MUC17) (Andrianifahanana, Moniaux, & Batra, 2006). Despite their distinct functions and structural properties, these mucins share some similarities in their structure. In secreted mucins, the polypeptide core harbors an N-terminal peptide signal (except for MUC6), a high frequencies of proline-threonine-serine

amino acids called PTS domain and a C-terminal domain which is rich in cystein residues (for more details see the sections below) (Ambort, Johansson, Gustafsson, Ermund, & Hansson, 2012; Bäckström, Ambort, Thomsson, Johansson, & Hansson, 2013). In the PTS domain, the repeated number of PTS residues and the length of this domain vary between different mucins along the GIT and also between species (Ambort, Johansson, Gustafsson, Ermund, & Hansson, 2012; Bansil, Celli, Hardcastle, & Turner, 2013). This domain is characterized by a variable number of tandem repeat (VNTR) and is linked to a wide variety of carbohydrates via *O*-glycosidic bonds in the Golgi apparatus. These glycan moieties account for over 80 % of the total molecular mass of the mucin and are able to bind water molecules which give the mucus gel-like properties (*O*-glycosylation mechanisms discussed in Bergstrom & Xia, 2013; Tailford, Crost, Kavanaugh, & Juge, 2015).

3.1. Secreted mucins

Based on their capacity or not to form a mucus gel, these mucins are classified into oligomerized and non-oligomerized secreted mucins. The oligomerized mucins are the main component of the mucus gel in the GIT. In human, four of these mucins have been identified: MUC2, MUC5AC, MUC5B, and MUC6 (Table 3). Among these mucins, MUC2 is the major component of the mucus in the small and large intestine and is the first to have been identified and structurally well characterized (J. R. Gum, Hicks, & Kim, 1997; Y. S. Kim & Ho, 2010; Johansson et al. 2008; Nilsson et al., 2014).

The core protein of MUC2 is approximately 5,200 amino acids (J. R. Gum, Hicks, & Kim, 1997, Perez-Vilar & Hill, 1999) but once fully glycosylated and polymerized, its molecular weight could reach more than 100 MDa (Johansson et al. 2011). The MUC2 structure presents von willebrand D domains, D1, D2, D'D3 at the N-terminal domain and D4 at the C-terminal domain (Figure 8a). In addition to D4 domain, C-terminal contains a cysteine-rich domain called cysteine-knot (CK) (Figure 8). The N- and C-terminal domains are flanked by a PTS-rich domain which is highly *O*-glycosylated (Ouwerkerk, de Vos, & Belzer, 2013; Tailford, Crost, Kavanaugh, & Juge, 2015). All secreted gel-forming mucins are alike in terms of structure and biophysical properties (Figure 8). The major differences are located at the PTS-rich domain which presents a variable number of proline, threonine and serine residues (Ambort, Johansson, Gustafsson, Ermund, & Hansson, 2012). Furthermore, the type and the number of sugar residues added will be different depending on the mucin and

physiological and pathological conditions (Freitas and Cayuela, 2000). In addition, the glycosylation pattern can vary between species, individuals and between specific tissues and organs. These sugar residues protect the core protein of these mucins from the microbial protease degradation (Brockhausen, Schachter, & Stanley, 2009; Corfield, 2015).

Secreted mucins are oligomerized and this process is initiated in the ER by the dimers formation (Godl et al., 2002; Ambort, Johansson, Gustafsson, Ermund, & Hansson, 2012). The peptides dimerization is formed *via* disulfide bonds in the CK domain and the dimers are then *N*-glycosylated (Figure 9). Once this process is complete, dimers migrate into the Golgi apparatus where they undergo the *O*-glycosylation at the PTS domains (Figure 9). The mucin *O*-glycosylation is carried out by adding *O*-linked glycans (N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine, galactose, fucose or sialic acid sugar residue) which catalyzed by an array of transmembrane enzymes found at Golgi apparatus, glycosyltransferases (Ambort, Johansson, Gustafsson, Ermund, & Hansson, 2012; McGukin et al., 2015).

Once dimers are heavily *O*-glycosylated, they are assembled to oligomers/multimers forming a network by inter-dimeric-disulphide bonds established between N- and C-termini of these mucins (Asker, Axelsson, Olofsson, & Hansson, 1998; Perez-Vilar & Hill, 1999, Godl et al., 2002; J. Perez-Vilar & Mabolo, 2007; Juan Perez-Vilar, 2007). The polymerized mucins are then packaged into goblet cells granules. It has been recently shown that MUC2 amino-terminal domain is packed in goblet cells granules as condensed concatenated rings under effect of low pH (6,2) and high Ca^{2+} concentration (Godl et al., 2002; Ambort, Johansson, Gustafsson, Nilsson, et al., 2012). After mucins packaging, the newly synthesized mucins are released at a basal level from granules by fusion with the apical cell membrane (J. Perez-Vilar & Mabolo, 2007) (Figure 9). This process could be either constitutive or inducible following the presence of stimuli (microbes, hormones, peptides, inflammatory cytokines) at the apical environment (Andrianifahanana, Moniaux, & Batra, 2006; Davis & Dickey, 2008). Once excreted, the secreted mucins are spread out and expand in volume by proteolytic cleavage and hydration process forming therefore a stratified firm and loose mucus layer (Johansson et al., 2008).

Secreted non-gel forming mucins are glycoproteins that do not form oligomers and the best characterized among these mucins is the salivary mucin MUC7 (Bobek, Tsai, Biesbrock, & Levine, 1993; Mehrotra, Thornton, & Sheehan, 1998). This mucin is a small glycoprotein (357 amino acid residues) found mainly in saliva and respiratory tract (Bobek, Tsai,

Biesbrock, & Levine, 1993; Gururaja et al., 1998). It does not share common structure and rheological properties with other secreted mucins (Figure 8b). It has a large PTS-domain with the presence of high number of serine and threonine residues but lack the cysteine-rich N- and C-terminal motifs of the gel-forming mucins which do not allow the formation of disulfide bond (Gururaja et al., 1998). Therefore, this mucin is unable of oligomerizing and forming a mucus gel. Despite its inability to form mucus gel, MUC7 is able to self-aggregate and play several beneficial roles including interaction with pathogenic microbes in the oral cavity and respiratory tract (Mehrotra, Thornton, & Sheehan, 1998, for comprehensive review see Frenkel & Ribbeck, 2015b). Furthermore, MUC7 presents a histatin-like domain at the N-terminus, which is rich in histidine residue and has a candidacidal activity (Gururaja et al., 1999).

3.2. Cell membrane-bound mucins

In addition to secreted mucins, cell membrane-bound mucins are also expressed along the digestive system and they are specifically found at the apical surfaces of epithelial cells. These mucins include MUC1, MUC3A/B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC16 and MUC17 which are mentioned in Table 3 (Y. S. Kim & Ho, 2010; Johansson et al. 2011).

Cell-membrane bound mucins have a distinct structure of secreted mucins but present some similarities (Figure 8c). These mucins are characterized by the presence of peptide signal as in the secreted mucins but lack von willebrand D domains. They have, in addition, the transmembrane domains and cytoplasmic “tail” domain at the C-terminus which varies from 22 amino acids residues in MUC4 to 80 amino acids in MUC17 (Moniaux et al., 1999; Moniaux, Escande, Porchet, Aubert, & Batra, 2001; Bafna, Kaur, & Batra, 2010; Barnett, Roy, McNabb, & Cookson, 2012). They also possess an extracellular domain which is mainly composed by tandem repeated sequences that are highly *O*-glycosylated. This domain forms a large and long filament that may exceed 200-1500 nm above the cell surface and, with other cell membrane glycoproteins, forms the glycocalyx at mucosal surfaces (Moniaux, Escande, Porchet, Aubert, & Batra, 2001; Bafna, Kaur, & Batra, 2010; Y. S. Kim & Ho, 2010).

In addition to domains above-mentioned, the extracellular part of these mucins contains either SEA module (for sperm protein, enterokinase, and agrin) or NIDO-AMOP-vWD domain (for a nidogen homology region (NIDO), the adhesion-associated domain in

MUC4 and other proteins (AMOP), and a vonWillebrand (vWD)). Among the transmembrane mucins produced in the GIT, MUC4 is the only mucin having one NIDO-AMOP-vWD domain (Hatstrup & Gendler, 2008; Johansson, Sjövall, & Hansson, 2013). The latter two domains are often associated with epidermal growth factor (EGF)-like domains which are important for mediating interaction with other transmembrane proteins (Hatstrup & Gendler, 2008). EGF-like domains have been shown to inhibit apoptosis and stimulate cells migration in human MUC17 and the mouse Muc3. The SEA domain has a proteolytic cleavage site which may the shedding of the glycosylated extracellular domains of the mucins from the surface to the mucus layer where they are able to influence the mucus layer viscosity (Wreschner et al., 2002; Macao, Johansson, Hansson, & Härd, 2006; Tailford, Crost, Kavanaugh, & Juge, 2015).

The process of biosynthesis and secretion of transmembrane mucins is generally similar to that of the secreted mucins especially for the N-glycosylation in the ER and the O-glycosylation at PTS sequence in the Golgi apparatus. The difference with secreted mucins is that the O-glycosylated mucins are transferred through the membrane where they are ready inserted *via* a cytoplasmic domain (Figure 9). The heavily glycosylated domain which is exposed at the mucosal surfaces can undergo a proteolytic cleavage at the SEA domain and this domain is therefore released in the mucus gel (Macao, Johansson, Hansson, & Härd, 2006; Jonckheere, Skrypek, Frénois, & Van Seuning, 2013).

Table 4: Mucins in the digestive system, their localization, cell expression and physiological functions

Mucins	Expression in each digestive tract segment	Cell type expression (Johansson et al., 2013)	Function	References
Secreted mucins				
- Gel-forming mucins				
MUC2	Small intestine (jejunum and ileum), colon	Goblet cells, Paneth cells	Formation of a protective barrier, lubrication, entrapment	(Johansson et al., 2008; Stappenbeck, 2009; Johansson et al., 2011; Kawashima, 2012)
MUC5AC	Stomach	Mucous cells	Formation of a protective barrier, lubricant activity, entrapment	(Allen and Flemström, 2005; Ho et al., 2004)
MUC5B	Salivary glands, submandibular glands (mouth)	Mucous cells, Goblet cells	Lubrication, pathogens entrapment	(Troxler et al., 1995; Frenkel and Ribbeck, 2015a; Frenkel and Ribbeck, 2015b)
MUC6	Stomach, ileum	Mucous cells	Protection, lubrication, entrapment	(Toribara et al., 1993; Ho et al., 2004)
- Non gel-forming mucins				
MUC7	Salivary glands (mouth)	Mucous cells	Clearance of harmful substances and pathogenic bacteria	(Bobek, Tsai, Biesbrock, & Levine, 1993; Mehrotra, Thornton, & Sheehan, 1998; Frenkel and Ribbeck, 2015b)
Cell-membrane bound mucins				
MUC1	All intestinal segments	Epithelial cells	Cellular signal transduction, adhesion properties to bacteria, barrier activity	(Moniaux, Escande, Porchet, Aubert, & Batra, 2001; Linden et al., 2008; Bafna et al., 2010; Albrecht & Carraway, 2011)
MUC3A/B	Small intestine, colon	Enterocytes	Adhesion modulation and cell signaling	(Gum et al., 1997; Bafna et al., 2010. Desseyn et al., 2008)
MUC4	Salivary glands, small intestine, colon	Epithelial cells, Goblet cells	Lubrication, epithelial cell differentiation	(Moniaux et al., 1999; Rong et al., 2005; Albrecht & Carraway, 2011)
MUC12	Colon	Enterocytes	Epithelial cell regulation	(Williams et al., 1999; Desseyn et al., 2008)
MUC13	Small intestine, colon	Enterocytes	Epithelial barrier function	(Williams et al., 2001; Maher et al., 2011) Sheng et al., 2011)
MUC16	Mouth	Epithelial cells	Apical surface protection	(O'Brien et al., 2002; Desseyn et al., 2008)
MUC17	Stomach, duodenum, colon	Enterocytes	Extracellular matrix constituent, apical surface protection	(Gum et al., 2002; Desseyn et al., 2008)

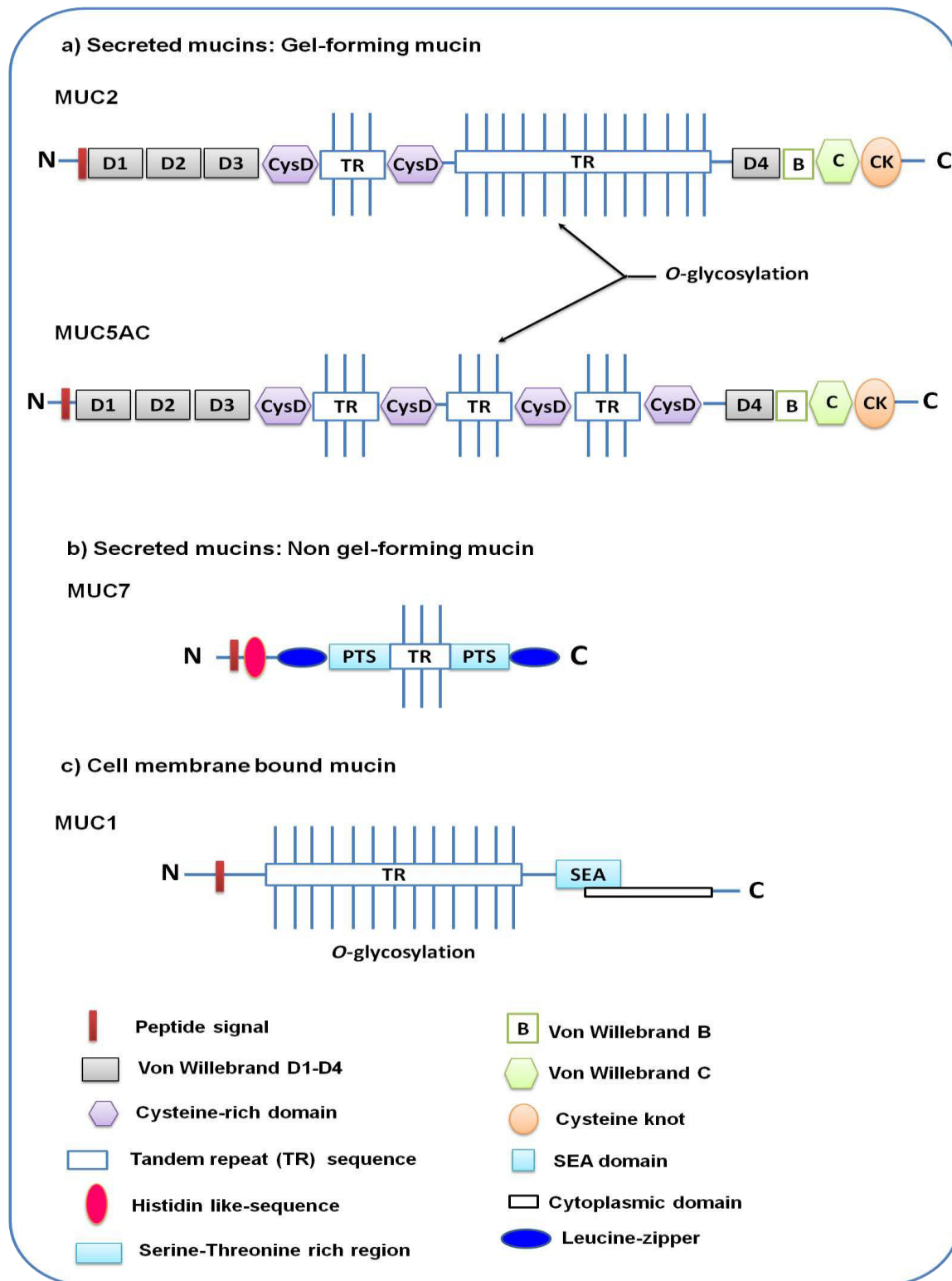


Figure 8: Schematic representation of mucin peptide domains organization. a) Secreted gel-forming mucins MUC2 and MUC5AC. MUC2 is the major component of the mucus barrier of the small and large intestine whereas MUC5AC is the major component of the stomach. b) Secreted non-gel forming mucins MUC7 found in saliva. c) Cell membrane bound mucins. MUC1 is shown as an example, and expressed in all epithelial tissue.

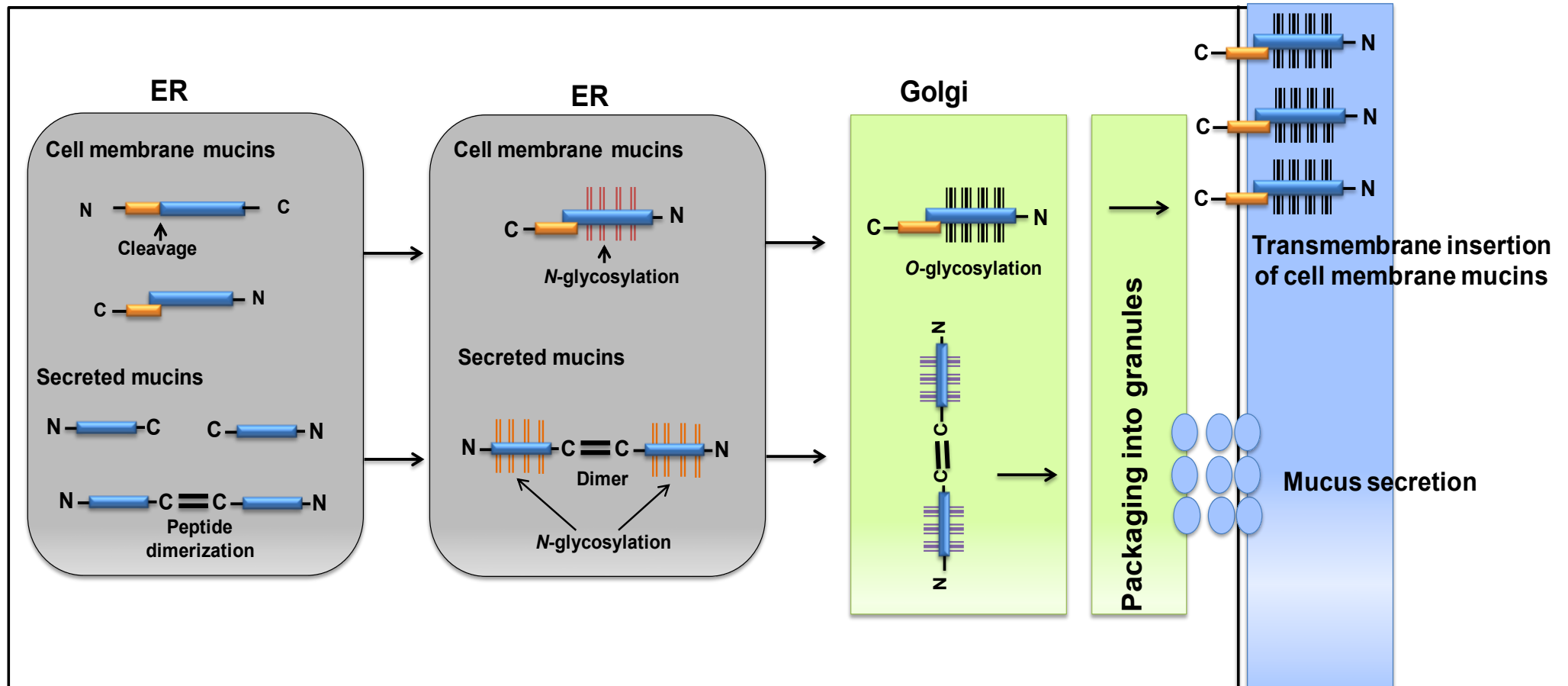


Figure 9: Schematic illustration of mucin biosynthesis. Cell membrane mucins undergo a cleavage in the endoplasmic reticulum (ER). Both transmembrane and secreted mucins are N-glycosylated in the ER and then transferred to the Golgi apparatus where they are O-glycosylated. Once O-glycosylated, cell membrane mucins are inserted into the membrane *via* C-terminal transmembrane domain and secreted mucins are oligomerized and packed into granules for secretion.

4. Mucins along the gastro-intestinal tract

4. 1. Salivary mucins

Saliva is a secretion produced in mouth by three major exocrine glands; the parotid, submandibular and sublingual and other minor salivary glands. It has a multitude functions including moistening and lubrication, digestion, protection of oral mucosa and tooth against caries, harmful microbes and molecules (Dawes et al., 2015). In human, a decrease of salivary flow (salivary hypo function, xerostomia) is associated with an increase of orodental diseases, speech impairment and oral infections (Turner & Ship, 2007; Frenkel and Ribbeck, 2015b; Turner, 2016;).

The whole saliva is composed in part by mucins which play a major role in the maintenance of its rheological properties and promote aggregation and clearance of pathogenic bacteria from the oral cavity (Slomiany, Murty, Piotrowski, & Slomiany, 1996; van 't Hof, Veerman, Nieuw Amerongen, & Ligtenberg, 2014; Frenkel and Ribbeck, 2015b). The salivary mucins consist of MUC1, MUC4, MUC5B, and MUC7. As pointed above (Table 3), MUC1 and MUC4 are transmembrane mucins lining the duct of parotid, submandibular, and minor salivary glands (A. Sengupta et al., 2001; Liu et al., 2002) whereas MUC5B and MUC7 are secreted mucins and consist of primary mucins of saliva. The transmembrane mucins could be involved in cell signal transduction and binding secreted mucins (Frenkel and Ribbeck, 2015b). Secreted mucins MUC5B and MUC7 are highly glycosylated mucins characterized by distinct structural properties which may explain their distinct functions.

MUC5B is a gel-forming mucin that creates the viscoelastic properties of oral saliva. This gel coats the tissues of the oral cavity providing local protection at the floor of the mouth against mechanical forces during eating and speaking (Amerongen, Bolscher, & Veerman, 1995). It coated the dental surfaces by the formation of the enamel pellicle and protect against cariogenic bacteria by decreasing their attachment and their ability to form biofilms (Al-Hashimi & Levine, 1989; Frenkel and Ribbeck, 2015a). The role of MUC5B is not restricted to the tissue protection against mechanical forces but also against an array of diseases (Frenkel and Ribbeck, 2015b).

As previously mentioned, MUC7 is non oligomeric mucin lacking the cysteine-rich N- and C-terminal motifs of the gel-forming mucins (Gururaja et al., 1998). Although, it does not

have the gel forming property, this mucin plays an important role in the saliva since it contributes to lubrication and aid in swallowing the food (Amerongen, Bolscher, & Veerman, 1995). It is also implicated in the protection of oral cavity against microbes through the aggregation of various bacterial species leading to their removal after swallowing. This mucin binds streptococcal species *via* glycan moieties and is able to inhibit *in vitro* bacterial growth and biofilm formation ability (Stinson et al., 1982; Plummer & Douglas, 2006). Knowledge about the antibacterial action mechanisms by which the salivary mucins exert their activity is still limited and further researchers are needed to elucidate the salivary mucins-microbes interactions.

4. 2. Stomach mucins

The gastric mucosa in mice is covered by an inner and outer mucus layers. The inner one is firmly attached to the epithelium (Ermund et al., 2013). The thickness of gastric mucus is about 200-400 μm (Atuma, Strugala, Allen, & Holm, 2001) consisting of a biophysical (thickness of mucus layer) and chemical (through bicarbonate secretion in the mucus gel creating a pH gradient) barrier in the stomach (Ambort, Johansson, Gustafsson, Ermund, & Hansson, 2012; Ermund et al., 2013).

Human gastric mucus contains two secreted mucins MUC5AC and MUC6 and one transmembrane mucin MUC1 (Figure 10). Indeed, a study of Ho and coworkers performed by double-labeling immunofluorescence/confocal microscopy in histologically normal surgical resection specimens have shown that the gastric mucus layer is composed of an alternating layers of MUC5AC and MUC6 (Ho et al., 2004). Furthermore, in the stomach, the acidic pH is low, due to the secretion of hydrochloric acid in the lumen. The gastric mucus layer protects the cell surface epithelium from the diffusion of hydrochloric acid through bicarbonate which is secreted by epithelial cells in the mucus gel (A. Allen, Flemström, Garner, & Kivilaakso, 1993; Adrian Allen & Flemström, 2005). This layer protects also the epithelium from the digestive enzymes and pathogenic microorganisms (Pelaseyed et al., 2014).

4. 3. Intestinal mucins

➤ *Mucins in the small intestine*

In the small intestine, the mucus is composed mainly by MUC2 mucin and forms only one loose, unattached mucus layer having similar properties with the outer mucus layer of the

colon (Figure 10) (Gustafsson et al., 2012; Ermund et al., 2013; Johansson, Sjövall, & Hansson, 2013). This layer is continuously secreted by goblet cells but the mucus layer is not anchored to the epithelium as in the colon and it is constantly moved with peristaltic waves and renewed rapidly over time in order to protect the epithelium against bacteria (Johansson, Sjövall, & Hansson, 2013; Pelaseyed et al., 2014). Moreover, Muc2-deficient mice frequently leads to the development of adenoma in the small intestine that progress to invasive adenocarcinoma in these animals (Velcich et al., 2002).

The mucus gel in the small intestine contains few bacteria (Ermund et al., 2013). The mucus gel in the small intestine is devoid from resident bacteria thus allowing the nutrients absorption (Johansson et al., 2011). Indeed, at this site, in addition to MUC2 mucin, antibacterial molecules such as peptides or lysozymes are also secreted at high concentration and mixed into mucus gel (Bevins, 2006;). These antibacterial molecules play an important role in killing trapped bacteria preventing the direct contact of the epithelium with these microorganisms (Ouellette, 2010, Vaishnava et al., 2011). Moreover, RegIII γ is among antibacterial molecules produced in the small intestine by different intestinal epithelial cells including enterocytes and Paneth cells (Cash, Whitham, Behrendt, & Hooper, 2006; Vaishnava, Behrendt, Ismail, Eckmann, & Hooper, 2008). Vaishnava et al. (2011) have shown that RegIII γ -deficient mice lead to the colonization of the small intestinal epithelium by bacteria and provoke the activation of the adaptive immune response by producing high amount of immunoglobulin A (IgA) (Vaishnava et al., 2011). These findings indicate the importance of mucus gel containing antibacterial molecules in the protection of the small intestinal epithelium.

➤ *Mucins in the colon*

Mouse colon epithelium is covered by mucus layer which is about 150 μ m thick (Johanson et al., 2008). As in the stomach, the mucus is characterized by two distinct layers composed by Muc2 mucin (Figure 10). The inner mucus layer which is attached to the epithelium and devoid by bacteria but partly penetrable by beads (in the proximal colon) and the outer layer which is more hydrated and easily penetrable by beads the size of bacteria (Ermund et al., 2013). Muc2 mucin constitutes the core molecule of the mucus network and its synthesis deficiency leads to several intestinal diseases. Indeed, Muc2-deficient mice have totally lacked protective inner mucus layer and colonic bacteria have direct contact with the epithelial surfaces and far down in the crypts leading to development of colitis and later colon

cancer (Van der Sluis et al., 2006; Johansson et al., 2008). These findings indicate the importance of this mucin in building the mucus barrier and protecting the epithelium against colonic bacteria. As revealed by histological and immunostaining analyses of intestinal mouse segments, the inner mucus layer is highly organized, firmly attached to the epithelium and totally devoid of bacteria (Johansson et al., 2008). In human, an inner mucus layer that is able to keep the bacteria at a distance from the intestinal epithelium was also observed (Johansson et al., 2014). Studies on mucus barrier properties in both mouse and human biopsies using fluorescent beads of the size of bacteria have shown that the inner mucus layer was impenetrable (Gustafsson et al., 2012).

In the colon, mucus inner layer is expanded by four times in volume probably by proteolytic cleavages and the capacity of glycans to bind water leading to the formation of the loose outer mucus layer (Johansson et al., 2008; Johansson et al., 2011). This outer mucus layer forms the habitat for colonic bacteria and plays a role in shaping the mucus layer in the colon (Johansson et al., 2008; Johansson et al., 2011; Gustafsson et al., 2012).

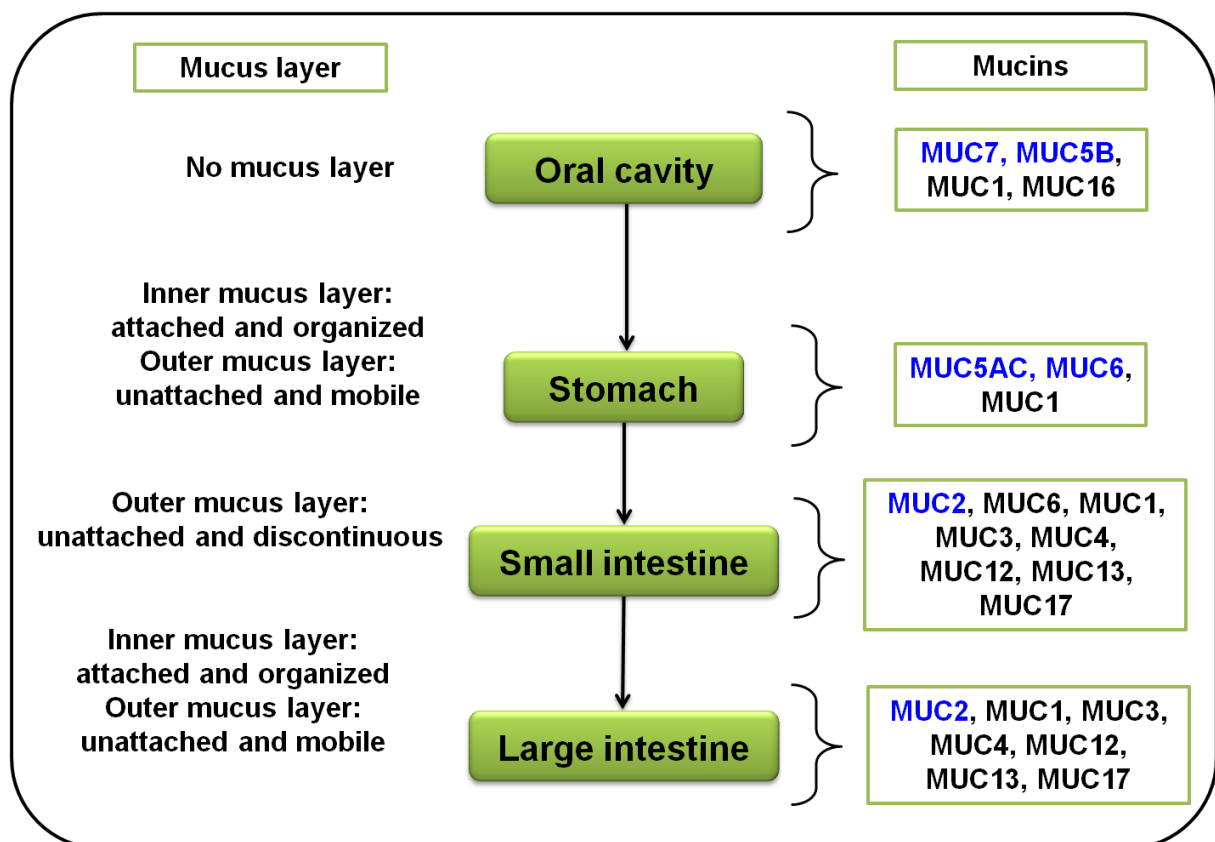


Figure 10: Schematic distribution of mucus and mucins along the gastrointestinal tract. Secreted mucins are indicated in blue and cell membrane-bound mucins in black characters

5. Bacterial adhesion to mucus and mucins

The outer mucus layer provides receptors for the adhesion of probiotic and commensal bacteria and an ecological niche enabling thereby their own colonization. In turn, bacteria colonizing the mucus layer also bring benefits for the host by strengthening the epithelial barrier, inhibiting the pathogenic bacteria adhesion, maintaining the intestinal immune system homeostasis, digesting some nutrients, or producing antimicrobial molecules or vitamins (for review see Leser and Mølbak, 2009).

In human, the bacterial colonization starts at birth and continues until adulthood. These commensal bacteria colonize over time the outer mucus layer easily by penetrating this layer and by using mucins *O*-glycans as attachment sites (Juge, 2012). Therefore, the ecological niche provided by mucus in the intestine leads to the establishment of a symbiotic relationship between host and microbiota. A disruption of this relationship leads to a microbial imbalance and may in some cases induce diseases such as obesity, ulcerative colitis and Crohn disease (McCracken & Lorenz, 2001; Manichanh, Borruel, Casellas, & Guarner, 2012; Gagnière et al., 2016).

The human GIT harbors approximately 10^{14} bacterial cells and it is composed mainly by the phyla Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria and Verrucomicrobia but other microorganisms such as yeast, fungi, and protozoa are also part of the intestinal microbiota (Liévin-Le Moal and Servin, 2006; Li et al., 2015). This composition may be variable between individuals depending especially on diet, the state of health of each individual and environmental conditions (Rajilić-Stojanović, Smidt, & de Vos, 2007; Qin et al., 2010; Nuding, Antoni, & Stange, 2013).

➤ *Bacterial adhesion model studies*

Bacterial adhesion to intestinal mucosa starts weakly through physicochemical interactions (e.g., hydrophobic and van der Waals interactions) which are mediated by the cell surface components such as polysaccharides, teichoic and lipoteichoic acids (Granato et al., 1999; Alp, Aslim, Suludere, & Akca, 2010). After an adaptation to the host environment, the bacteria set up a machinery of specific proteins (adhesins) at the cell surface allowing the establishment of strong interactions with the gut epithelium (Juge, 2012; R. Sengupta et al., 2013). This mechanism has been widely studied *in vitro* by using human intestinal cell lines

models either in pathogenic and non pathogenic bacteria (Gagnon, Zihler Berner, Chervet, Chassard, & Lacroix, 2013; Shokryazdan et al., 2014; Kebouchi et al., 2016). These cell lines exhibit the functional characteristics of intestinal cells found in the small and large intestines (Chopra, Dombkowski, Stemmer, & Parker, 2010; Tassell & Miller, 2011; Liévin-Le Moal & Servin, 2013). Among them, Caco-2 and HT-29 are human colorectal cell lines with enterocyte-like phenotype isolated in 1972 by J. Fogh (Sloan Kettering Institute for Cancer Research, Rye, NY) (Fogh & Trempe, 1975; Fogh, Fogh, & Orfeo, 1977). Furthermore, depending on different culture stages, stress conditions and drug treatments, different clones (other enterocyte-like cell subpopulations and goblet cells) have been isolated from these parental cell lines such as HT29-D4, HT29.74, HT29-19E, HT29-MTX, HT29-FU, HT29-MTX-E12, Caco-2/1, Caco-2/16, Caco-2/AQ and Caco-2 TC7 (see Liévin-Le Moal & Servin (2013) for comprehensive review on differentiated human colon cell lines properties).

Most cell lines commonly used to study adhesion of probiotics or pathogenic bacteria are Caco-2 TC7, HT-29 cells, gel mucus-secreting cells HT29-MTX, and more recently HT29-CL.16E and HT29-MTX-E12 (Alemka et al., 2010 ; Dolan, Naughton, Tegtmeyer, May, & Clyne, 2012; Couvigny et al., 2015; Jiang et al., 2016; Kebouchi et al., 2016). To be more representative of physiological conditions, the bacterial adhesion to a mixture of epithelial cells with mucus-secreting cells were also already investigated (Kim, Hegde, & Jayaraman, 2010; Laparra & Sanz, 2009).

Besides these cell models, other *in vitro*, *ex-vivo* and *in vivo* models have been already used to study the bacterial adhesion and colonization such as the immobilized mucus (e.g, pig gastric mucus) (Roos & Jonsson, 2002; (Collado, Meriluoto, & Salminen, 2007; Valeriano, Parungao-Balolong, & Kang, 2014), whole intestinal tissue segment (Henriksson, Szewzyk, & Conway, 1991; Ouwehand et al., 2002; Vesterlund, Palta, Karp, & Ouwehand, 2005) and animal models (Thomas et al., 2011). All these models present advantages and drawbacks. For instance, although cultured cell models do not reflect totally conditions encountered in the GIT, they provide useful advantages in screening of large number of potential probiotics and also in elucidating the type of interactions and molecules that mediate the host-microbe interactions especially in the intestine.

➤ ***Bacterial cell surface components involved in adhesion***

All studies recently conducted on adhesion have highlighted the important role of specific cell surface components of bacteria in adhesion to the intestinal mucus layer and in modulating the mucin genes expression (see section below). Depending on bacteria (Gram negative or Gram positive), the exposure of cell surface components is different. The cell surface molecules found in microbial structures like flagella, fimbriae and pili, which are predominantly present in Gram negative bacteria, have been shown to promote the bacterial attachment to mucus components (Tasteyre, Barc, Karjalainen, Bourlioux, & Collignon, 2002; Erdem, Avelino, Xicohtencatl-Cortes, & Girón, 2007; Tassell & Miller, 2011). These cell surface structures are also present in some lactic acid bacteria (LAB) and play a key role in host-mucus components interactions (Le et al., 2013; R. Sengupta et al., 2013; Otto, 2014; Vargas García et al., 2015). For instance, it has been reported in *Lactobacillus (Lb.) rhamnosus* GG, the most known and widely used probiotic bacterium, that the inactivation of *SpaC* gene encoding a pilian subunit located on the top of the pili structure reduced significantly the binding capacity to human intestinal mucus (Kankainen et al., 2009). The same phenotype with the same strain has also been reported in *SpaCBA* pilus knockout mutant to Caco-2 cells and deficiencies in biofilm formation was also observed in this mutant (Lebeer et al., 2012). This indicated the importance of this structure in the establishing of strong interactions between *Lb. rhamnosus* GG and the intestinal mucosa, allowing its persistence for long time period (Van den Abbeele et al., 2012, for a comprehensive review of the *Lb. rhamnosus* GG host-interaction see Segers & Lebeer, 2014).

Other bacterial cell surface compounds which may be involved in the adhesion with the intestinal mucosa are the cell surface proteins (CSPs). Among them, mucin-binding proteins (MUB) are found in LAB and predominantly in lactobacilli (Boekhorst, Helmer, Kleerebezem, & Siezen, 2006). These proteins are characterized by the presence of repeated MUB domains belonging to the MucBP domain family (Pfam PF06458). Furthermore, these proteins has an N-terminal YSIRK signal peptide targeting the protein to the secretion system and a C-terminal LPxTG motif recognized by the sortase enzyme enabling the covalent attachment of the protein to peptidoglycan of the bacterial wall (Juge, 2012; Call & Klaenhammer, 2013). The best studied MUB protein in lactobacilli is from *Lb. reuteri* in which the first three dimensional structure (3D) of repeated MucBP domain and subsequent discovery of immunoglobulin binding domain has been reported suggesting a broad binding

functions (Roos & Jonsson, 2002; Mackenzie et al., 2010). This 353-kDa mature protein is involved in bacterial interactions with mucus components but this interaction shows specificity depending on mucin carbohydrates (Roos & Jonsson, 2002). Otherwise, the presence of this protein is not limited to lactobacilli but it is also detected in *Streptococcus* (S.) *thermophilus* (Goh, Goin, O'Flaherty, Altermann, & Hutkins, 2011), a lactic acid bacterium widely used in dairy industry, where its involvement in bacterial adhesion has been demonstrated (Couvigny et al. 2015; Kebouchi et al., 2016). Furthermore, Kebouchi et al. (2016) have shown that a mutant strain of *S. thermophilus* LMD-9 lacking *mucBP* gene presented different adhesion profile depending on different human intestinal cell lines Caco-2/TC7, HT29-MTX or HT29-CL.16E. Indeed, these cell lines present different surface properties especially in mucins expression and production. These data suggest that MucBP protein may present some affinity and specificity to specific mucins and mucopoligosaccharides found in these cell lines (Kebouchi et al., 2016).

Other cell surface proteins with predicted mucin-binding activity have been described in LAB, as for example GroEL, Msa (mannose-specific adhesion protein), MapA (mucus adhesion-promoting protein) and MbpL (mucus-binding protein) (Pretzer et al., 2005; Bergonzelli et al., 2006; Gross, Snel, Boekhorst, Smits, & Kleerebezem, 2010). In *Lb. johnsonii* La1 (NCC 533), the protein GroEL was shown to bind to mucus and to intestinal cells HT-29 (Bergonzelli et al., 2006), whereas in *Lb. plantarum* WCFS1, Msa is responsible for the binding to mannose suggesting its possible interaction with specific intestinal mucins oligosaccharides in the GIT (Pretzer et al., 2005; Gross, Snel, Boekhorst, Smits, & Kleerebezem, 2010). Moreover, MapA protein of *Lb. fermentum* 104R has shown to bind to mucus isolated from the piglets small intestine and to purified gastric mucin from pig (Rojas, Ascencio, & Conway, 2002), and that of *Lb. reuteri* 104R has shown the same phenotype to Caco-2 cells (Miyoshi, Okada, Uchimura, & Satoh, 2006). In *Lactococcus lactis* BGKP1, Lukić et al. (2012) showed that MbpL is involved in adhesion to mucus producing-cells HT29-MTX and to pig gastric mucin, and they speculated that this protein could have an affinity to MUC5AC mucins which are predominantly produced by HT29-MTX cells (Lukić et al., 2012). Another protein, the Elongation Factor Tu (EF-Tu) that is an important factor in protein synthesis, was detected at the surface of *Lb. johnsonii* NCC533 (La1) and reported to be an adhesive factor mediating attachment to human epithelial cells Caco-2 and mucin (Granato et al., 2004). Beside its involvement in adhesion in lactobacilli, the recombinant EF-Tu protein provides beneficial effects by inhibiting the enteropathogen adhesion but the

molecular mechanism remains unknown (Akhilesh S. Dhanani, Gaudana, & Bagchi, 2011; A. S. Dhanani & Bagchi, 2013).

Other cell surface molecules such as exopolysaccharides have also shown to be involved in adhesion of *Bifidobacterium breve* A28 to Caco-2 cells (Alp, Aslim, Suludere, & Akca, 2010). All these data highlight the importance of bacterial cell surface molecules and mucus components in host-bacteria interactions which depends notably on the mucins diversity, the type and the number of oligosaccharides added to mucins at the *O*-glycosylation stage and the mucus layer thickness throughout the GIT. Furthermore, once bacteria are in contact with the intestinal mucosa, they could have an impact on mucins expression and secretion as well as on the mucus structure by degrading the mucus layer with specific enzymes.

6. Effect of bacteria on mucus degradation

The establishment of mucus-degrading bacteria in the host intestine starts few months after birth and is completed gradually with age (Midtvedt, Carlstedt-Duke, & Midtvedt, 1994). This process is not linked only with the individual age but also with the diet. Thereby, Midtvedt et al. have observed that the establishment of mucin degradation is delayed in children breast-fed at least 4 months than in those fed with formula milk (Midtvedt, Carlstedt-Duke, & Midtvedt, 1994). Moreover, these bacteria take part in regenerating the mucus layer which recognized as mucus turn-over in the GIT throughout life under normal physiological conditions of each individual (Norin, Gustafsson, Lindblad, & Midtvedt, 1985).

Mucins, with their carbohydrates decoration, constitute a substrate for intestinal bacteria and provide attachment sites for pathogen and commensal bacteria (Szentkuti & Enss, 1998; Ouwerkerk, de Vos, & Belzer, 2013). These carbohydrates surround the peptide fractions of mucins by various *O*-glycans making them more resistant against intestine and bacterial proteases (Ouwerkerk, de Vos, & Belzer, 2013). However, the presence of mucus-degrading bacteria could have an influence on mucus-secreting goblet cells development as well as the mucin glycosylation profile by degrading the mucin oligosaccharides by specific enzymes, releasing sugar residues which are used as nutrients by the resident bacteria (Figure 11) (Tailford, Crost, Kavanaugh, & Juge, 2015). It has been shown that *Bacteroides* (*Ba.*) *thetaiotaomicron*, the mucolytic bacterium, influences the development of goblet cells by stimulating in mono-associated rats the expression of *klf4* gene encoded a transcription

factor involved in goblet cell differentiation unlike in GF rats. This study has also been reported that this bacterium induced the expression of some genes encoding mucins (*muc2* and *muc4*) in the gnotobiotic rats as compared with GF model. Furthermore, the presence of both strains *Ba. thetaiotaomicron* VPI-5482 (ATCC 29148) and *Faecalibacterium* (*F.*) *prausnitzii* A2-165 (DSM 17677), belonging to the intestinal microbiota and which are metabolically complementary, in gnotobiotic rats were able to modulate the mucin glycosylation and goblet cells development in the colonic epithelium of gnotobiotic rats as compared to the GF rats (Wrzosek et al., 2013). All these data indicate the importance of these bacteria in the composition and structure of the mucus layer in the intestine.

Mucolytic-bacteria produce a wide range of carbohydrate-degrading enzymes, such as glycosidases, sulphatases, sialidases and proteases (Ouwerkerk, de Vos, & Belzer, 2013; Corfield, 2015). Other bacterial proteins involved in the internalization of carbohydrates are sugar transporters, permeases and ABC (Adenosine triphosphate-Binding Cassette) transporters.

Among intestinal bacteria known to have a mucolytic activity are those naturally present in human intestinal mucus. For instance, *Akkermansia* (*A.*) *muciniphila*, a Gram negative bacterium strictly anaerobic belonging to Verrucomicrobia phylum, is one of the bacteria having large enzymatic machinery for mucins oligosaccharides breakdown (Derrien, Vaughan, Plugge, & de Vos, 2004; Derrien, Belzer, & de Vos, 2016). Derrien and coworkers (2004) have isolated this bacterium from human intestine using a medium containing gastric mucin as the sole carbon and nitrogen source (Derrien, Vaughan, Plugge, & de Vos, 2004). More recently, Berry et al. (2013) have used nano-SIMS (stable isotope mass spectrometry) and FISH to determine *in vivo* which intestinal microbial cells use the host-derived compounds, and shown that *A. muciniphila* is among the first users of labeled mucus in the mouse mucosa (Berry et al., 2013). Furthermore, it has been reported that *Akkermansia* species are found in all animals (Derrien, Belzer, & de Vos, 2016; Belzer & de Vos, 2012). This bacterium hydrolyzes mucins oligosaccharides and releases sugar residues such as N-acetyl glucosamine, N-acetylgalactosamine, fucose, sialic acid, sulphate and also disaccharides (Derrien, Belzer, & de Vos, 2016)). This process provides an availability of oligosaccharides in the intestine for other bacteria such as *Bifidobacterium infantis* which harbors ABC transporters allowing internalization of carbohydrates (Garrido, Kim, German, Raybould, & Mills, 2011). *Ba. thetaiotaomicron* uses the starch utilization system (Sus-like

system) to hydrolyze these released sugar residues (For comprehensive review see Koropatkin, Cameron, & Martens, 2012). Some other intestinal bacteria such as *B. bifidum*, *Bacteroides fragilis*, *Ruminococcus gnavus* present also a mucolytic activity (Macfarlane & Gibson, 1991; Crociani, Alessandrini, Mucci, & Biavati, 1994; Png et al., 2010; Ouwerkerk, de Vos, & Belzer, 2013).

The bacteria-host mucosa interactions lead to various benefits including the degradation of mucus components which is important for the mucus structure and its renewal. This interaction has also a crucial role in strengthening the epithelium barrier by an overproduction of mucus at the epithelium barrier. The bacteria and/or their metabolites could modulate the expression and/or the secretion of mucins (Liévin-Le Moal & Servin, 2002; Smirnova, Guo, Birchall, & Pearson, 2003). However, it must be noted that in some cases the mucus degradation by commensal intestinal bacteria could constitute an initial stage of bacterial pathogenesis, since it would disturb the mucus structure at the mucosal surface and therefore circumvent the protective function of the mucus barrier (Derrien et al., 2010).

7. Impact of bacteria and molecules derived from dietary proteins on mucins regulation and secretion

The mucin genes expression and protein exocytosis could be either constitutive or inducible following the presence of environmental stimuli at the intestinal mucosa surface (Andrianifahanana, Moniaux, & Batra, 2006; Davis & Dickey, 2008). For instance, bacteria (e.g. commensal and probiotic bacteria) and/or bioactive molecules, which can be released by bacteria in certain fermented foods or derived directly from food after digestion, interacting with host-cells are widely reported to modulate the mucin gene expression and secretion (Mack, Michail, Wei, McDougall, & Hollingsworth, 1999; McNamara & Basbaum, 2001; Moncada, Kammanadiminti, & Chadee, 2003).

7.1. Effect of bacteria on mucin gene expression and secretion

The modulation of mucin genes expression and mucin secretion has been shown to occur either by direct contact of bacteria with mucosal surfaces or by bacterial products (Liévin-Le Moal et al., 2002; Smirnova, Guo, Birchall, & Pearson, 2003; Sb, Mr, H, & Sn, 2012). Studies on mucins genes regulation were initially conducted on pathogenic bacteria which use this strategy to avoid mucus layer by increasing or decreasing the mucin gene

expression for their own benefits (Moncada, Kammanadiminti, & Chadee, 2003). For example, *Helicobacter pylori* is known to inhibit mucin biosynthesis in the gastric mucosa in order to reach the epithelium (Moncada, Kammanadiminti, & Chadee, 2003; Kobayashi, Lee, Nakayama, & Fukuda, 2009).

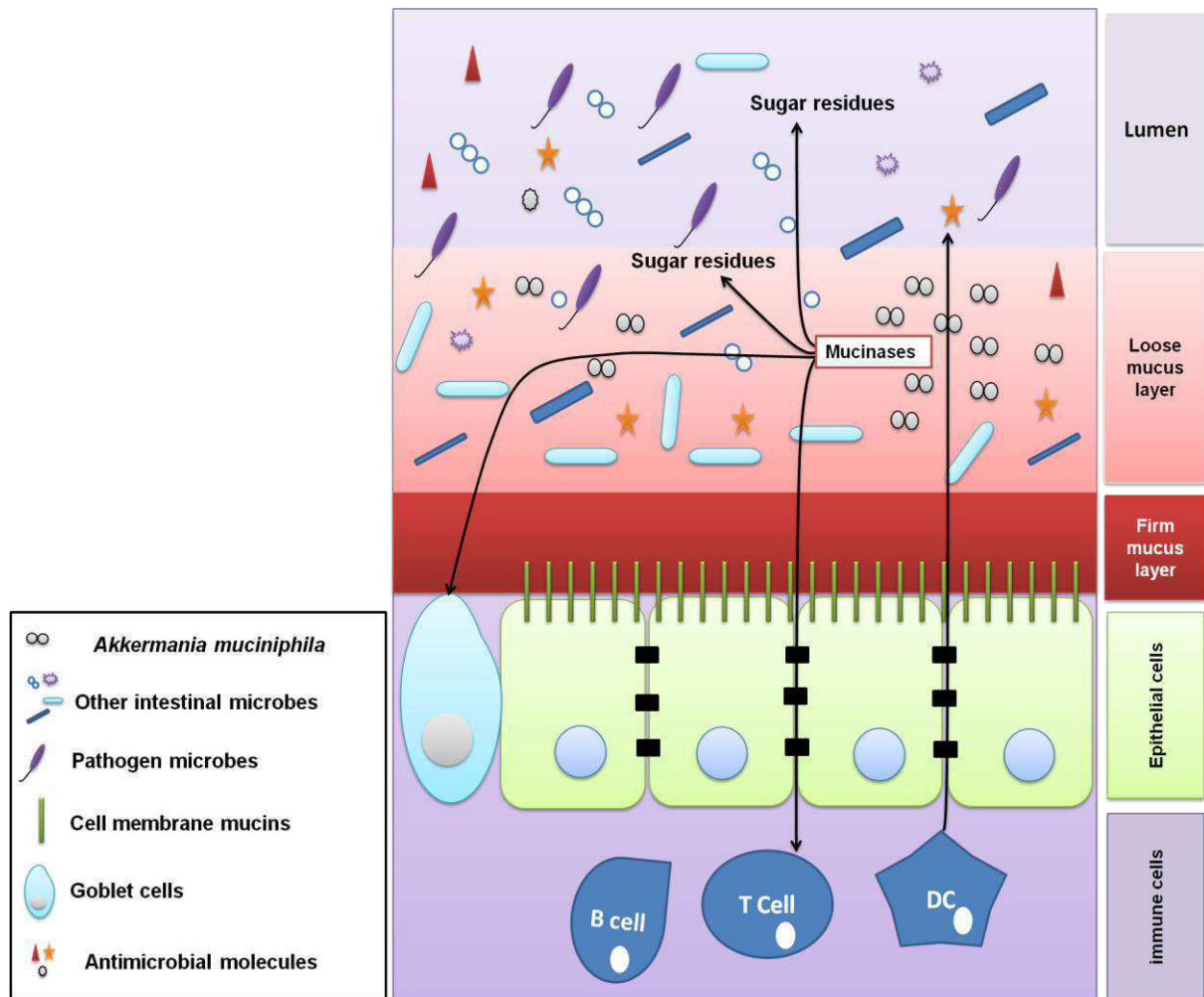


Figure 11: Schematic illustration of the intestinal mucosa and its interaction with the microbiota. *Akkermansia muciniphila* produce specific enzymes degrading mucins oligosaccharides, releasing thus sugar residues which can be used as nutrients by other intestinal microbes. This bacterium and or the product released after mucin oligosaccharide degradation could have an impact on the intestinal cells by stimulating the production of antimicrobial molecules such as peptides, defensins...

Recently, other investigations have highlighted the impact of probiotic bacteria on mucin expressions. It has been demonstrated that *Lb. plantarum* 299v increased the transcription and excretion of mucins MUC2 and MUC3 in goblet cells and this mechanism inhibits the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to the intestinal surface (Mack, Michail, Wei, McDougall, & Hollingsworth, 1999). Other *in vitro* studies have reported in

bifidobacteria and other lactobacilli that the expression of genes encoding mucins and the protein level were modulated (Mack, Ahrne, Hyde, Wei, & Hollingsworth, 2003; Khailova et al., 2009). For example, the oral administration of *B. bifidum* OLB6378 to neonatal rats decreased the *Muc2* gene expression level (Khailova et al., 2009). Otherwise, the expression of *MUC2* gene was induced at transcriptional and translational levels in cultured cells Caco-2 by *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 (Mattar et al., 2002). All these finding highlight the importance of the microbiota as well as the probiotic intake in enhancing the mucus layer at the mucosal surface, in the maintenance of the epithelium at the GIT and in preventing the binding of enteric pathogens (Sherman, Ossa, & Johnson-Henry, 2009).

Beside their effects on mucin production, some bacteria may also influence their glycosylation pattern and the development of goblet cells in the intestine. Wrzosek et al. have recently shown that *Ba. thetaiotaomicron* increased goblet cells differentiation, gene mucin expression and modify the mucin glycosylation (Wrzosek et al., 2013).

7. 2. Impact of molecules derived from dietary proteins on mucin secretion

Dietary proteins or their hydrolysates may regulate mucin expression and secretion in the intestinal mucosa. These proteins may harbor bioactive fractions released either after digestion or under the effect of LAB in fermented milk. Among those, milk proteins are an important source of bioactive molecules. These proteins provide peptides with different healthy effects on the host including blood-pressure lowering, immunomodulatory, antimicrobial, cholesterol-lowering and antioxidant effects.

Several studies performed *in vitro* and *in vivo* have also demonstrated their impacts on the modulation of mucin secretion (Claustre et al., 2002; Plaisancié et al., 2013; Plaisancié et al., 2015). It has been shown that the luminal administration of casein and lactalbumine hydrolysates separately in the isolated perfused rat jejunum induced release of mucins. However, the administration of native caseins did not significantly stimulate mucin secretion (Claustre et al., 2002). Other studies using the human intestinal mucus-producing cells HT29-MTX have also reported the modulation of mucin gene expression and stimulation by the total peptide pool derived from a fermented milk (yogurt) (Plaisancié et al., 2013; Plaisancié et al., 2015). Indeed, these peptides stimulate *MUC2* and *MUC4* gene expression as well as mucin secretion in HT29-MTX cells (Plaisancié et al., 2013). Interestingly, this study has identified peptide fractions carrying biological activity for further tests in rat models. Thereby, the oral

administration of the peptide fraction [94-123] of β -casein to rat pups enhanced the number of goblet cells and Paneth cells along the small intestine which were associated with higher expression of intestinal mucins (Muc2 and Muc4) and antibacterial factors (Plaisancié et al., 2013). Furthermore, from the peptide [94-123] of β -casein, other peptides having biological activity (an angiotensin converting enzyme-inhibitory peptide) were identified. These peptides up-regulated MUC4 expression in HT29-MTX cells whereas no effect was observed on levels of secreted mucins MUC2 and MUC5AC. In contrast, other peptide fractions identified increased the gene expression of MUC2 and MUC5AC mucins (Plaisancié et al., 2015). All these findings indicate that peptides derived from yogurt may play an important role in protection against damaging agents of intestinal luminal (Plaisancié et al., 2013). The presence of bioactive peptides including those probably released from LAB in dairy products from milk proteins could thereby improve gut health in the host.

8. Concluding remarks

The mucus layer is continuously renewed and colonized by variable microbes. These microbes use their adhesins to be able to attach to mucus components. The mucosa environment constitutes a real ecological niche for microbes since mucins represent a constant source of nutrients. This review summarizes the current knowledge about the variety of mucins, their structure and their interactions with the microbiota and dietary proteins. In this review, we have also tried to describe the influence of the intestinal microbiota as well as molecules derived from food, on mucus structure and composition as well as secretion, gene expression and glycosylation pattern of mucins.

The studies on the interactions between probiotic bacteria and the intestinal mucosa can use as the first approach the *in vitro* cell line models for an initial screening of the adherent bacteria and to determine the role of bacteria during the adhesion process especially the induction of the immune response and strengthening the epithelial barrier. This approach must be supplemented by the *in vivo* studies in order to elucidate the specific interaction between these bacteria and mucins O-glycan. Another factor which could influence the mucus organization and the variability of intestinal bacteria is the diet. Other understanding studies on the interactions of intestinal bacteria and/or probiotic bacteria with the diet should be investigated for demonstrating their molecular impact on mucins and even on the mucus layer thickness and organization and then for designing perhaps new functional foods.

References

- Albrecht, H., & Carraway, K. L. (2011). MUC1 and MUC4: switching the emphasis from large to small. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 26(3), 261–271. <https://doi.org/10.1089/cbr.2011.1017>
- Alemka, A., Clyne, M., Shanahan, F., Tompkins, T., Corcionivoschi, N., & Bourke, B. (2010). Probiotic Colonization of the Adherent Mucus Layer of HT29MTXE12 Cells Attenuates *Campylobacter jejuni* Virulence Properties. *Infection and Immunity*, 78(6), 2812–2822. <https://doi.org/10.1128/IAI.01249-09>
- Al-Hashimi, I., & Levine, M. J. (1989). Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle. *Archives of Oral Biology*, 34(4), 289–295.
- Allen, A., & Flemström, G. (2005). Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 288(1), C1-19. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00102.2004>
- Allen, A., Flemström, G., Garner, A., & Kivilaakso, E. (1993). Gastroduodenal mucosal protection. *Physiological Reviews*, 73(4), 823–857.
- Alp, G., Aslim, B., Suludere, Z., & Akca, G. (2010). The role of hemagglutination and effect of exopolysaccharide production on bifidobacteria adhesion to Caco-2 cells in vitro. *Microbiology and Immunology*, 54(11), 658–665. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00227.x>
- Ambort, D., Johansson, M. E. V., Gustafsson, J. K., Ermund, A., & Hansson, G. C. (2012). Perspectives on mucus properties and formation--lessons from the biochemical world. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014159>
- Ambort, D., Johansson, M. E. V., Gustafsson, J. K., Nilsson, H. E., Ermund, A., Johansson, B. R., ... Hansson, G. C. (2012). Calcium and pH-dependent packing and release of the gel-forming MUC2 mucin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(15), 5645–5650. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120269109>
- Amerongen, A. V., Bolscher, J. G., & Veerman, E. C. (1995). Salivary mucins: protective functions in relation to their diversity. *Glycobiology*, 5(8), 733–740.

- Andrianifahanana, M., Moniaux, N., & Batra, S. K. (2006). Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1765(2), 189–222. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.01.002>
- Arike, L., & Hansson, G. C. (2016). The Densely O-Glycosylated MUC2 Mucin Protects the Intestine and Provides Food for the Commensal Bacteria. *Journal of Molecular Biology*, 428(16), 3221–3229. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.010>
- Asker, N., Axelsson, M. A., Olofsson, S. O., & Hansson, G. C. (1998). Dimerization of the human MUC2 mucin in the endoplasmic reticulum is followed by a N-glycosylation-dependent transfer of the mono- and dimers to the Golgi apparatus. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(30), 18857–18863.
- Asker, N., Bäckström, D., Axelsson, M. A., Carlstedt, I., & Hansson, G. C. (1995). The human MUC2 mucin apoprotein appears to dimerize before O-glycosylation and shares epitopes with the “insoluble” mucin of rat small intestine. *The Biochemical Journal*, 308 (Pt 3), 873–880.
- Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., & Holm, L. (2001). The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(5), G922-929.
- Augeron, C., & Labois, C. L. (1984). Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Research*, 44(9), 3961–3969.
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5717), 1915–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1104816>
- Bäckström, M., Ambort, D., Thomsson, E., Johansson, M. E. V., & Hansson, G. C. (2013). Increased understanding of the biochemistry and biosynthesis of MUC2 and other gel-forming mucins through the recombinant expression of their protein domains. *Molecular Biotechnology*, 54(2), 250–256. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9562-3>
- Bafna, S., Kaur, S., & Batra, S. K. (2010). Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. *Oncogene*, 29(20), 2893–2904. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.87>

- Bansil, R., Celli, J. P., Hardcastle, J. M., & Turner, B. S. (2013). The Influence of Mucus Microstructure and Rheology in *Helicobacter pylori* Infection. *Frontiers in Immunology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00310>
- Barnett, A. M., Roy, N. C., McNabb, W. C., & Cookson, A. L. (2012). The interactions between endogenous bacteria, dietary components and the mucus layer of the large bowel. *Food & Function*, 3(7), 690–699. <https://doi.org/10.1039/c2fo30017f>
- Belzer, C., & de Vos, W. M. (2012). Microbes inside--from diversity to function: the case of *Akkermansia*. *The ISME Journal*, 6(8), 1449–1458. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.6>
- Bergonzelli, G. E., Granato, D., Pridmore, R. D., Marvin-Guy, L. F., Donnicola, D., & Corthésy-Theulaz, I. E. (2006). GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*, 74(1), 425–434. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.425-434.2006>
- Bergstrom, K. S. B., & Xia, L. (2013). Mucin-type O-glycans and their roles in intestinal homeostasis. *Glycobiology*, 23(9), 1026–1037. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt045>
- Bernet-Camard, M. F., Coconnier, M. H., Hudault, S., & Servin, A. L. (1996). Differential expression of complement proteins and regulatory decay accelerating factor in relation to differentiation of cultured human colon adenocarcinoma cell lines. *Gut*, 38(2), 248–253.
- Berry, D., Stecher, B., Schintlmeister, A., Reichert, J., Brugiroux, S., Wild, B., ... Wagner, M. (2013). Host-compound foraging by intestinal microbiota revealed by single-cell stable isotope probing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(12), 4720–4725. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219247110>
- Bevins, C. L. (2006). Paneth cell defensins: key effector molecules of innate immunity. *Biochemical Society Transactions*, 34(2), 263–266. <https://doi.org/10.1042/BST0340263>
- Bik, E. M., Eckburg, P. B., Gill, S. R., Nelson, K. E., Purdom, E. A., Francois, F., ... Relman, D. A. (2006). Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), 732–737. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506655103>

- Birchenough, G. M. H., Johansson, M. E. V., Gustafsson, J. K., Bergström, J. H., & Hansson, G. C. (2015). New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunology*, 8(4), 712–719. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.32>
- Bobek, L. A., Tsai, H., Biesbrock, A. R., & Levine, M. J. (1993). Molecular cloning, sequence, and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (MUC7). *The Journal of Biological Chemistry*, 268(27), 20563–20569.
- Boekhorst, J., Helmer, Q., Kleerebezem, M., & Siezen, R. J. (2006). Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 1), 273–280. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28415-0>
- Brockhausen, I., Schachter, H., & Stanley, P. (2009). O-GalNAc Glycans. In A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, ... M. E. Etzler (Eds.), *Essentials of Glycobiology* (2nd ed.). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1896/>
- Bu, X.-D., Li, N., Tian, X.-Q., & Huang, P.-L. (2011). Caco-2 and LS174T cell lines provide different models for studying mucin expression in colon cancer. *Tissue & Cell*, 43(3), 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2011.03.002>
- Call, E. K., & Klaenhammer, T. R. (2013). Relevance and application of sortase and sortase-dependent proteins in lactic acid bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4, 73. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00073>
- Cash, H. L., Whitham, C. V., Behrendt, C. L., & Hooper, L. V. (2006). Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5790), 1126–1130. <https://doi.org/10.1126/science.1127119>
- Cheled-Shoval, S. L., Gamage, N. S. W., Amit-Romach, E., Forder, R., Marshal, J., Van Kessel, A., & Uni, Z. (2014). Differences in intestinal mucin dynamics between germ-free and conventionally reared chickens after mannan-oligosaccharide supplementation. *Poultry Science*, 93(3), 636–644. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03362>
- Chopra, D. P., Dombkowski, A. A., Stemmer, P. M., & Parker, G. C. (2010). Intestinal epithelial cells in vitro. *Stem Cells and Development*, 19(1), 131–142. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0109>

- Chow, J., Lee, S. M., Shen, Y., Khosravi, A., & Mazmanian, S. K. (2010). Host-bacterial symbiosis in health and disease. *Advances in Immunology*, 107, 243–274. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381300-8.00008-3>
- Claustre, J., Toumi, F., Trompette, A., Jourdan, G., Guignard, H., Chayvialle, J. A., & Plaisancié, P. (2002). Effects of peptides derived from dietary proteins on mucus secretion in rat jejunum. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 283(3), G521–528. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00535.2001>
- Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2007). Development of new probiotics by strain combinations: is it possible to improve the adhesion to intestinal mucus? *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2710–2716. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-456>
- Corfield, A. P. (2015). Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1850(1), 236–252. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.05.003>
- Cornick, S., Tawiah, A., & Chadee, K. (2015). Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers*, 3(1–2), e982426. <https://doi.org/10.4161/21688370.2014.982426>
- Couvigny, B., Thériat, C., Gautier, C., Renault, P., Briandet, R., & Guédon, E. (2015). Streptococcus thermophilus Biofilm Formation: A Remnant Trait of Ancestral Commensal Life? *PLoS ONE*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128099>
- Crociani, F., Alessandrini, A., Mucci, M. M., & Biavati, B. (1994). Degradation of complex carbohydrates by Bifidobacterium spp. *International Journal of Food Microbiology*, 24(1–2), 199–210.
- Dahiya, R., Lesuffleur, T., Kwak, K. S., Byrd, J. C., Barbat, A., Zweibaum, A., & Kim, Y. S. (1992). Expression and characterization of mucins associated with the resistance to methotrexate of human colonic adenocarcinoma cell line HT29. *Cancer Research*, 52(17), 4655–4662.
- Davis, C. W., & Dickey, B. F. (2008). Regulated airway goblet cell mucin secretion. *Annual Review of Physiology*, 70, 487–512. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100638>

- Dawes, C., Pedersen, A. M. L., Villa, A., Ekström, J., Proctor, G. B., Vissink, A., ... Wolff, A. (2015). The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Archives of Oral Biology*, 60(6), 863–874. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.03.004>
- Derrien, M., Belzer, C., & de Vos, W. M. (2016). Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions. *Microbial Pathogenesis*. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.005>
- Derrien, M., van Passel, M. W., van de Bovenkamp, J. H., Schipper, R. G., de Vos, W. M., & Dekker, J. (2010). Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes*, 1(4), 254–268. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.4.12778>
- Derrien, M., Vaughan, E. E., Plugge, C. M., & de Vos, W. M. (2004). Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 5), 1469–1476. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02873-0>
- Desseyn, J.-L., Tetaert, D., & Gouyer, V. (2008). Architecture of the large membrane-bound mucins. *Gene*, 410(2), 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.12.014>
- Dhanani, A. S., & Bagchi, T. (2013). The expression of adhesin EF-Tu in response to mucin and its role in Lactobacillus adhesion and competitive inhibition of enteropathogens to mucin. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 546–554. <https://doi.org/10.1111/jam.12249>
- Dhanani, A. S., Gaudana, S. B., & Bagchi, T. (2011). The ability of Lactobacillus adhesin EF-Tu to interfere with pathogen adhesion. *European Food Research and Technology*, 232(5), 777–785. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1443-7>
- Dharmani, P., Srivastava, V., Kissoon-Singh, V., & Chadee, K. (2009). Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *Journal of Innate Immunity*, 1(2), 123–135. <https://doi.org/10.1159/000163037>
- Dolan, B., Naughton, J., Tegtmeyer, N., May, F. E. B., & Clyne, M. (2012). The Interaction of Helicobacter pylori with the Adherent Mucus Gel Layer Secreted by Polarized HT29-MTX-E12 Cells. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047300>

- Erdem, A. L., Avelino, F., Xicohtencatl-Cortes, J., & Girón, J. A. (2007). Host Protein Binding and Adhesive Properties of H6 and H7 Flagella of Attaching and Effacing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 189(20), 7426–7435. <https://doi.org/10.1128/JB.00464-07>
- Ermund, A., Gustafsson, J. K., Hansson, G. C., & Keita, Å. V. (2013). Mucus Properties and Goblet Cell Quantification in Mouse, Rat and Human Ileal Peyer's Patches. *PLoS ONE*, 8(12), e83688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083688>
- Falk, P. G., Hooper, L. V., Midtvedt, T., & Gordon, J. I. (1998). Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(4), 1157–1170.
- Fogh, J., Fogh, J. M., & Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 59(1), 221–226.
- Fogh, J. and Trempe, G. (1975). New human tumor cell lines. In *Human Tumor Cells In vitro* (ed. J. Fogh), pp. 115-141. Plenum Press, New York.
- Frenkel, E. S., & Ribbeck, K. (2015a). Salivary mucins in host defense and disease prevention. *Journal of Oral Microbiology*, 7, 29759.
- Frenkel, E. S., & Ribbeck, K. (2015b). Salivary mucins protect surfaces from colonization by cariogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(1), 332–338. <https://doi.org/10.1128/AEM.02573-14>
- Gagnière, J., Raisch, J., Veziant, J., Barnich, N., Bonnet, R., Buc, E., ... Bonnet, M. (2016). Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(2), 501–518. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.501>
- Gagnon, M., Zihler Berner, A., Chervet, N., Chassard, C., & Lacroix, C. (2013). Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate *Salmonella* adhesion and invasion. *Journal of Microbiological Methods*, 94(3), 274–279. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.027>
- Garrido, D., Kim, J. H., German, J. B., Raybould, H. E., & Mills, D. A. (2011). Oligosaccharide binding proteins from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveal a

preference for host glycans. *PloS One*, 6(3), e17315. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017315>

Godl, K., Johansson, M. E. V., Lidell, M. E., Mörgelin, M., Karlsson, H., Olson, F. J., ... Hansson, G. C. (2002). The N terminus of the MUC2 mucin forms trimers that are held together within a trypsin-resistant core fragment. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 47248–47256. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208483200>

Goh, Y. J., Goin, C., O'Flaherty, S., Altermann, E., & Hutkins, R. (2011). Specialized adaptation of a lactic acid bacterium to the milk environment: the comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* LMD-9. *Microbial Cell Factories*, 10 Suppl 1, S22. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S22>

Gordon, J. I. (1989). Intestinal epithelial differentiation: new insights from chimeric and transgenic mice. *The Journal of Cell Biology*, 108(4), 1187–1194.

Göttke, M. U., Keller, K., Belley, A., Garcia, R. M., Hollingsworth, M. A., Mack, D. R., & Chadee, K. (1998). Functional heterogeneity of colonic adenocarcinoma mucins for inhibition of *Entamoeba histolytica* adherence to target cells. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45(2), 17S–23S.

Granato, D., Bergonzelli, G. E., Pridmore, R. D., Marvin, L., Rouvet, M., & Corthésy-Theulaz, I. E. (2004). Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infection and Immunity*, 72(4), 2160–2169.

Granato, D., Perotti, F., Masserey, I., Rouvet, M., Golliard, M., Servin, A., & Brassart, D. (1999). Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1071–1077.

Gross, G., Snel, J., Boekhorst, J., Smits, M. A., & Kleerebezem, M. (2010). Biodiversity of mannose-specific adhesion in *Lactobacillus plantarum* revisited: strain-specific domain composition of the mannose-adhesin. *Beneficial Microbes*, 1(1), 61–66. <https://doi.org/10.3920/BM2008.1006>

- Gum, J. R., Crawley, S. C., Hicks, J. W., Szymkowski, D. E., & Kim, Y. S. (2002). MUC17, a novel membrane-tethered mucin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(3), 466–475. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6475>
- Gum, J. R., Hicks, J. W., & Kim, Y. S. (1997). Identification and characterization of the MUC2 (human intestinal mucin) gene 5'-flanking region: promoter activity in cultured cells. *The Biochemical Journal*, 325 (Pt 1), 259–267.
- Gururaja, T. L., Levine, J. H., Tran, D. T., Naganagowda, G. A., Ramalingam, K., Ramasubbu, N., & Levine, M. J. (1999). Candidacidal activity prompted by N-terminus histatin-like domain of human salivary mucin (MUC7)1. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1431(1), 107–119.
- Gururaja, T. L., Ramasubbu, N., Venugopalan, P., Reddy, M. S., Ramalingam, K., & Levine, M. J. (1998). Structural features of the human salivary mucin, MUC7. *Glycoconjugate Journal*, 15(5), 457–467.
- Gustafsson, J. K., Ermund, A., Johansson, M. E. V., Schütte, A., Hansson, G. C., & Sjövall, H. (2012). An ex vivo method for studying mucus formation, properties, and thickness in human colonic biopsies and mouse small and large intestinal explants. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(4), G430-438. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00405.2011>
- Hansson, G. C., & Johansson, M. E. (2010). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut Microbes*, 1(1), 51–54. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.1.10470>
- Hattrup, C. L., & Gendler, S. J. (2008). Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annual Review of Physiology*, 70, 431–457. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100659>
- Henriksson, A., Szewzyk, R., & Conway, P. L. (1991). Characteristics of the adhesive determinants of *Lactobacillus fermentum* 104. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), 499–502.
- Ho, S. B., Takamura, K., Anway, R., Shekels, L. L., Toribara, N. W., & Ota, H. (2004). The adherent gastric mucous layer is composed of alternating layers of MUC5AC and MUC6 mucin proteins. *Digestive Diseases and Sciences*, 49(10), 1598–1606.

- Hollingsworth, M. A., & Swanson, B. J. (2004). Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Reviews. Cancer*, 4(1), 45–60. <https://doi.org/10.1038/nrc1251>
- Huet, G., Kim, I., de Bolos, C., Lo-Guidice, J. M., Moreau, O., Hemon, B., ... Degand, P. (1995). Characterization of mucins and proteoglycans synthesized by a mucin-secreting HT-29 cell subpopulation. *Journal of Cell Science*, 108 (Pt 3), 1275–1285.
- Jakobsson, H. E., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Schütte, A., Ermund, A., Boysen, P., Bemark, M., ... Johansson, M. E. V. (2015). The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Reports*, 16(2), 164–177. <https://doi.org/10.15252/embr.201439263>
- Jarry, A., Merlin, D., Velcich, A., Hopfer, U., Augenlicht, L. H., & Labois, C. L. (1994). Interferon-gamma modulates cAMP-induced mucin exocytosis without affecting mucin gene expression in a human colonic goblet cell line. *European Journal of Pharmacology*, 267(1), 95–103.
- Jiang, M., Zhang, F., Wan, C., Xiong, Y., Shah, N. P., Wei, H., & Tao, X. (2016). Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 isolated from human breast milk. *Journal of Dairy Science*, 99(3), 1736–1746. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10434>
- Johansson, M. E. V. (2012). Fast renewal of the distal colonic mucus layers by the surface goblet cells as measured by in vivo labeling of mucin glycoproteins. *PloS One*, 7(7), e41009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041009>
- Johansson, M. E. V., Ambort, D., Pelaseyed, T., Schütte, A., Gustafsson, J. K., Ermund, A., ... Hansson, G. C. (2011). Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 68(22), 3635–3641. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0822-3>
- Johansson, M. E. V., Gustafsson, J. K., Holmén-Larsson, J., Jabbar, K. S., Xia, L., Xu, H., ... Hansson, G. C. (2014). Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut*, 63(2), 281–291. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303207>
- Johansson, M. E. V., & Hansson, G. C. (2011). Keeping Bacteria at a Distance. *Science*, 334(6053), 182–183. <https://doi.org/10.1126/science.1213909>

- Johansson, M. E. V., Jakobsson, H. E., Holmén-Larsson, J., Schütte, A., Ermund, A., Rodríguez-Piñeiro, A. M., ... Hansson, G. C. (2015). Normalization of Host Intestinal Mucus Layers Requires Long-Term Microbial Colonization. *Cell Host & Microbe*, 18(5), 582–592. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.10.007>
- Johansson, M. E. V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., & Hansson, G. C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), 15064–15069. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803124105>
- Johansson, M. E. V., Sjövall, H., & Hansson, G. C. (2013). The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 10(6), 352–361. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.35>
- Jonckheere, N., Skrypek, N., Frénois, F., & Van Seuningen, I. (2013). Membrane-bound mucin modular domains: from structure to function. *Biochimie*, 95(6), 1077–1086. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.11.005>
- Juge, N. (2012). Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends in Microbiology*, 20(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.10.001>
- Karam, S. M. (1999). Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 4, D286-298.
- Kawashima, H. (2012). Roles of the gel-forming MUC2 mucin and its O-glycosylation in the protection against colitis and colorectal cancer. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 35(10), 1637–1641.
- Kebouchi, M., Galia, W., Genay, M., Soligot, C., Lecomte, X., Awussi, A. A., ... Le Roux, Y. (2016). Implication of sortase-dependent proteins of *Streptococcus thermophilus* in adhesion to human intestinal epithelial cell lines and bile salt tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7322-1>
- Khailova, L., Dvorak, K., Arganbright, K. M., Halpern, M. D., Kinouchi, T., Yajima, M., & Dvorak, B. (2009). *Bifidobacterium bifidum* improves intestinal integrity in a rat model of necrotizing enterocolitis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 297(5), G940-949.

- Kim, J., Hegde, M., & Jayaraman, A. (2010). Co-culture of epithelial cells and bacteria for investigating host-pathogen interactions. *Lab on a Chip*, 10(1), 43–50. <https://doi.org/10.1039/b911367c>
- Kim, Y. S., & Ho, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports*, 12(5), 319–330. <https://doi.org/10.1007/s11894-010-0131-2>
- Kobayashi, M., Lee, H., Nakayama, J., & Fukuda, M. (2009). Roles of gastric mucin-type O-glycans in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Glycobiology*, 19(5), 453–461. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp004>
- Koropatkin, N. M., Cameron, E. A., & Martens, E. C. (2012). How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(5), 323–335. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2746>
- Lai, S. K., Wang, Y.-Y., Wirtz, D., & Hanes, J. (2009). Micro- and macrorheology of mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(2), 86–100. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.012>
- Laparra, J. M., & Sanz, Y. (2009). Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Letters in Applied Microbiology*, 49(6), 695–701. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02729.x>
- Le, D. T. L., Tran, T.-L., Duviau, M.-P., Meyrand, M., Guérardel, Y., Castelain, M., ... Mercier-Bonin, M. (2013). Unraveling the role of surface mucus-binding protein and pili in muco-adhesion of *Lactococcus lactis*. *PloS One*, 8(11), e79850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079850>
- Lebeer, S., Claes, I., Tytgat, H. L. P., Verhoeven, T. L. A., Marien, E., von Ossowski, I., ... Vanderleyden, J. (2012). Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 185–193. <https://doi.org/10.1128/AEM.06192-11>
- Leser, T. D., & Mølbak, L. (2009). Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environmental Microbiology*, 11(9), 2194–2206. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01941.x>

- Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaulx, E., & Zweibaum, A. (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 Research*, 50(19), 6334–6343.
- Lesuffleur, T., Kornowski, A., Augeron, C., Dussaulx, E., Barbat, A., Labois, C., & Zweibaum, A. (1991). Increased growth adaptability to 5-fluorouracil and methotrexate of HT-29 sub-populations selected for their commitment to differentiation. *International Journal of Cancer*, 49(5), 731–737.
- Lesuffleur, T., Porchet, N., Aubert, J. P., Swallow, D., Gum, J. R., Kim, Y. S., ... Zweibaum, A. (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. *Journal of Cell Science*, 106 (Pt 3), 771–783.
- Lesuffleur, T., Roche, F., Hill, A. S., Lacasa, M., Fox, M., Swallow, D. M., ... Real, F. X. (1995). Characterization of a mucin cDNA clone isolated from HT-29 mucus-secreting cells. The 3' end of MUC5AC? *The Journal of Biological Chemistry*, 270(23), 13665–13673.
- Li, H., Limenitakis, J. P., Fuhrer, T., Geuking, M. B., Lawson, M. A., Wyss, M., ... Macpherson, A. J. (2015). The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. *Nature Communications*, 6, 8292. <https://doi.org/10.1038/ncomms9292>
- Liévin-Le Moal, V., & Servin, A. L. (2006). The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(2), 315–337. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.315-337.2006>
- Liévin-Le Moal, V., & Servin, A. L. (2013). Pathogenesis of Human Enterovirulent Bacteria: Lessons from Cultured, Fully Differentiated Human Colon Cancer Cell Lines. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: MMBR, 77(3), 380–439. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00064-12>
- Lindén, S. K., Driessen, K. M., & McGuckin, M. A. (2007). Improved in vitro model systems for gastrointestinal infection by choice of cell line, pH, microaerobic conditions, and optimization of culture conditions. *Helicobacter*, 12(4), 341–353. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2007.00509.x>

- Lindstedt, G., Lindstedt, S., & Gustafsson, B. E. (1965). MUCUS IN INTESTINAL CONTENTS OF GERMFREE RATS. *The Journal of Experimental Medicine*, 121(2), 201–213.
- Liu, B., Lague, J. R., Nunes, D. P., Toselli, P., Oppenheim, F. G., Soares, R. V., ... Offner, G. D. (2002). Expression of membrane-associated mucins MUC1 and MUC4 in major human salivary glands. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 50(6), 811–820.
- Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Franceschi, F., & Gasbarrini, A. (2014). The gastrointestinal microbiome - functional interference between stomach and intestine. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 28(6), 995–1002. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2014.10.004>
- Lukić, J., Strahinić, I., Jovčić, B., Filipić, B., Topisirović, L., Kojić, M., & Begović, J. (2012). Different roles for lactococcal aggregation factor and mucin binding protein in adhesion to gastrointestinal mucosa. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(22), 7993–8000. <https://doi.org/10.1128/AEM.02141-12>
- Macao, B., Johansson, D. G. A., Hansson, G. C., & Härd, T. (2006). Autoproteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(1), 71–76. <https://doi.org/10.1038/nsmb1035>
- Macfarlane, G. T., & Gibson, G. R. (1991). Formation of glycoprotein degrading enzymes by *Bacteroides fragilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 61(2–3), 289–293.
- Mack, D. R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., & Hollingsworth, M. A. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut*, 52(6), 827–833.
- Mack, D. R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., & Hollingsworth, M. A. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *The American Journal of Physiology*, 276(4 Pt 1), G941–950.
- Mackenzie, D. A., Jeffers, F., Parker, M. L., Vibert-Vallet, A., Bongaerts, R. J., Roos, S., ... Juge, N. (2010). Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 11), 3368–3378. <https://doi.org/10.1099/mic.0.043265-0>

- Maher, D. M., Gupta, B. K., Nagata, S., Jaggi, M., & Chauhan, S. C. (2011). Mucin 13: structure, function, and potential roles in cancer pathogenesis. *Molecular Cancer Research: MCR*, 9(5), 531–537. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0443>
- Maoret, J. J., Font, J., Augeron, C., Codogno, P., Bauvy, C., Aubery, M., & Laboisse, C. L. (1989). A mucus-secreting human colonic cancer cell line. Purification and partial characterization of the secreted mucins. *The Biochemical Journal*, 258(3), 793–799.
- Martins dos Santos, V., Müller, M., & de Vos, W. M. (2010). Systems biology of the gut: the interplay of food, microbiota and host at the mucosal interface. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(4), 539–550. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.08.003>
- Mattar, A. F., Teitelbaum, D. H., Drongowski, R. A., Yongyi, F., Harmon, C. M., & Coran, A. G. (2002). Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatric Surgery International*, 18(7), 586–590. <https://doi.org/10.1007/s00383-002-0855-7>
- McCracken, V. J., & Lorenz, R. G. (2001). The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cellular Microbiology*, 3(1), 1–11.
- McNamara, N., & Basbaum, C. (2001). Signaling networks controlling mucin production in response to Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Glycoconjugate Journal*, 18(9), 715–722.
- Mehrotra, R., Thornton, D. J., & Sheehan, J. K. (1998). Isolation and physical characterization of the MUC7 (MG2) mucin from saliva: evidence for self-association. *The Biochemical Journal*, 334 (Pt 2), 415–422.
- Midtvedt, A. C., Carlstedt-Duke, B., & Midtvedt, T. (1994). Establishment of a mucin-degrading intestinal microflora during the first two years of human life. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 18(3), 321–326.
- Miyoshi, Y., Okada, S., Uchimura, T., & Satoh, E. (2006). A mucus adhesion promoting protein, MapA, mediates the adhesion of *Lactobacillus reuteri* to Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(7), 1622–1628. <https://doi.org/10.1271/bbb.50688>

- Moncada, D. M., Kammanadiminti, S. J., & Chadee, K. (2003). Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends in Parasitology*, 19(7), 305–311.
- Moniaux, N., Escande, F., Porchet, N., Aubert, J. P., & Batra, S. K. (2001). Structural organization and classification of the human mucin genes. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 6, D1192-1206.
- Moniaux, N., Nollet, S., Porchet, N., Degand, P., Laine, A., & Aubert, J. P. (1999). Complete sequence of the human mucin MUC4: a putative cell membrane-associated mucin. *The Biochemical Journal*, 338 (Pt 2), 325–333.
- Nilsson, H. E., Ambort, D., Bäckström, M., Thomsson, E., Koeck, P. J. B., Hansson, G. C., & Hebert, H. (2014). Intestinal MUC2 mucin supramolecular topology by packing and release resting on D3 domain assembly. *Journal of Molecular Biology*, 426(14), 2567–2579. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.04.027>
- Norin, K. E., Gustafsson, B. E., Lindblad, B. S., & Midtvedt, T. (1985). The establishment of some microflora associated biochemical characteristics in feces from children during the first years of life. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 74(2), 207–212.
- Nuding, S., Antoni, L., & Stange, E. F. (2013). The host and the flora. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 31(3–4), 286–292. <https://doi.org/10.1159/000354680>
- O'Brien, T. J., Beard, J. B., Underwood, L. J., & Shigemasa, K. (2002). The CA 125 gene: a newly discovered extension of the glycosylated N-terminal domain doubles the size of this extracellular superstructure. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 23(3), 154–169. <https://doi.org/64032>
- Otto, M. (2014). Physical stress and bacterial colonization. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(6), 1250–1270. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12088>
- Ouellette, A. J. (2010). Paneth cells and innate mucosal immunity. *Current Opinion in Gastroenterology*, 26(6), 547–553. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32833dccde>
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., Tölkö, S., Roberts, P., Ovaska, J., & Salminen, E. (2002). Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(1), 184–186.

- Ouwerkerk, J. P., de Vos, W. M., & Belzer, C. (2013). Glycobiome: bacteria and mucus at the epithelial interface. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 27(1), 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.001>
- Pelaseyed, T., Bergström, J. H., Gustafsson, J. K., Ermund, A., Birchenough, G. M. H., Schütte, A., ... Hansson, G. C. (2014). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological Reviews*, 260(1), 8–20. <https://doi.org/10.1111/imr.12182>
- Perez-Vilar, J. (2007). Mucin granule intraluminal organization. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 36(2), 183–190. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0291TR>
- Perez-Vilar, J., & Hill, R. L. (1999). The structure and assembly of secreted mucins. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(45), 31751–31754.
- Perez-Vilar, J., & Mabolle, R. (2007). Gel-forming mucins. Notions from in vitro studies. *Histology and Histopathology*, 22(4), 455–464.
- Plaisancié, P., Boutrou, R., Estienne, M., Henry, G., Jardin, J., Paquet, A., & Léonil, J. (2015). β -Casein(94-123)-derived peptides differently modulate production of mucins in intestinal goblet cells. *The Journal of Dairy Research*, 82(1), 36–46. <https://doi.org/10.1017/S0022029914000533>
- Plaisancié, P., Claustre, J., Estienne, M., Henry, G., Boutrou, R., Paquet, A., & Léonil, J. (2013). A novel bioactive peptide from yoghurts modulates expression of the gel-forming MUC2 mucin as well as population of goblet cells and Paneth cells along the small intestine. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(1), 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.05.004>
- Plummer, C., & Douglas, C. W. I. (2006). Relationship between the ability of oral streptococci to interact with platelet glycoprotein Iba α and with the salivary low-molecular-weight mucin, MG2. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 48(3), 390–399. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00161.x>
- Png, C. W., Lindén, S. K., Gilshenan, K. S., Zoetendal, E. G., McSweeney, C. S., Sly, L. I., ... Florin, T. H. J. (2010). Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa

augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *The American Journal of Gastroenterology*, 105(11), 2420–2428. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.281>

Pretzer, G., Snel, J., Molenaar, D., Wiersma, A., Bron, P. A., Lambert, J., ... Kleerebezem, M. (2005). Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*, 187(17), 6128–6136. <https://doi.org/10.1128/JB.187.17.6128-6136.2005>

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., ... Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>

Rajilić-Stojanović, M., Smidt, H., & de Vos, W. M. (2007). Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environmental Microbiology*, 9(9), 2125–2136. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01369.x>

Ramakrishna, B. S. (2013). Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 28 Suppl 4, 9–17. <https://doi.org/10.1111/jgh.12294>

Rodríguez-Piñeiro, A. M., Bergström, J. H., Ermund, A., Gustafsson, J. K., Schütte, A., Johansson, M. E. V., & Hansson, G. C. (2013). Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. II. Gastrointestinal mucus proteome reveals Muc2 and Muc5ac accompanied by a set of core proteins. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 305(5), G348–356. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00047.2013>

Rojas, M., Ascencio, F., & Conway, P. L. (2002). Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2330–2336.

Rong, M., Rossi, E. A., Zhang, J., McNeer, R. R., van den Brande, J. M. H., Yasin, M., ... Carraway, K. L. (2005). Expression and localization of Muc4/sialomucin complex (SMC) in the adult and developing rat intestine: implications for Muc4/SMC function. *Journal of Cellular Physiology*, 202(1), 275–284. <https://doi.org/10.1002/jcp.20121>

Roos, S., & Jonsson, H. (2002). A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 2), 433–442.

- Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., & Margolles, A. (2017). Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(1). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600240>
- Sb, R., Mr, M., H, D., & Sn, D. (2012). Differential expression of gastric MUC5AC in colonic epithelial cells: TFF-3 wired IL1 β /Akt crosstalk induced mucosal immune response against *Shigella dysenteriae* infection. *Journal of Cell Science*, 125(3). Retrieved from <https://works.bepress.com/muralimalligaraman/14/>
- Segers, M. E., & Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG--host interactions. *Microbial Cell Factories*, 13 Suppl 1, S7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S7>
- Sengupta, A., Valdramidou, D., Huntley, S., Hicks, S. J., Carrington, S. D., & Corfield, A. P. (2001). Distribution of MUC1 in the normal human oral cavity is localized to the ducts of minor salivary glands. *Archives of Oral Biology*, 46(6), 529–538.
- Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., & Roy, N. C. (2013). The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators of Inflammation*, 2013, 237921. <https://doi.org/10.1155/2013/237921>
- Sheng, Y. H., Lourie, R., Lindén, S. K., Jeffery, P. L., Roche, D., Tran, T. V., ... McGuckin, M. A. (2011). The MUC13 cell-surface mucin protects against intestinal inflammation by inhibiting epithelial cell apoptosis. *Gut*, 60(12), 1661–1670. <https://doi.org/10.1136/gut.2011.239194>
- Sherman, P. M., Ossa, J. C., & Johnson-Henry, K. (2009). Unraveling mechanisms of action of probiotics. *Nutrition in Clinical Practice: Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, 24(1), 10–14. <https://doi.org/10.1177/0884533608329231>
- Shokryazdan, P., Sieo, C. C., Kalavathy, R., Liang, J. B., Alitheen, N. B., Faseleh Jahromi, M., & Ho, Y. W. (2014). Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains with Antimicrobial Activity against Some Human Pathogenic Strains. *BioMed Research International*, 2014, e927268. <https://doi.org/10.1155/2014/927268>
- Slomiany, B. L., Murty, V. L., Piotrowski, J., & Slomiany, A. (1996). Salivary mucins in oral mucosal defense. *General Pharmacology*, 27(5), 761–771.

- Smirnova, M. G., Guo, L., Birchall, J. P., & Pearson, J. P. (2003). LPS up-regulates mucin and cytokine mRNA expression and stimulates mucin and cytokine secretion in goblet cells. *Cellular Immunology*, 221(1), 42–49.
- Sommer, F., Adam, N., Johansson, M. E. V., Xia, L., Hansson, G. C., & Bäckhed, F. (2014). Altered mucus glycosylation in core 1 O-glycan-deficient mice affects microbiota composition and intestinal architecture. *PloS One*, 9(1), e85254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085254>
- Sonnenburg, J. L., Xu, J., Leip, D. D., Chen, C.-H., Westover, B. P., Weatherford, J., ... Gordon, J. I. (2005). Glycan Foraging in Vivo by an Intestine-Adapted Bacterial Symbiont. *Science*, 307(5717), 1955–1959. <https://doi.org/10.1126/science.1109051>
- Staubach, F., Künzel, S., Baines, A. C., Yee, A., McGee, B. M., Bäckhed, F., ... Johnsen, J. M. (2012). Expression of the blood-group-related glycosyltransferase B4galnt2 influences the intestinal microbiota in mice. *The ISME Journal*, 6(7), 1345–1355. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.204>
- Stinson, M. W., Levine, M. J., Cavese, J. M., Prakobphol, A., Murray, P. A., Tabak, L. A., & Reddy, M. S. (1982). Adherence of *Streptococcus sanguis* to salivary mucin bound to glass. *Journal of Dental Research*, 61(12), 1390–1393.
- Szentkuti, L., & Enss, M. L. (1998). Comparative lectin-histochemistry on the pre-epithelial mucus layer in the distal colon of conventional and germ-free rats. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 119(1), 379–386.
- Szentkuti, L., Riedesel, H., Enss, M. L., Gaertner, K., & Von Engelhardt, W. (1990). Pre-epithelial mucus layer in the colon of conventional and germ-free rats. *The Histochemical Journal*, 22(9), 491–497.
- Tailford, L. E., Crost, E. H., Kavanaugh, D., & Juge, N. (2015). Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Frontiers in Genetics*, 6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00081>
- Tassell, M. L. V., & Miller, M. J. (2011). Lactobacillus Adhesion to Mucus. *Nutrients*, 3(5), 613–636. <https://doi.org/10.3390/nu3050613>
- Thomas, M., Wrzosek, L., Ben-Yahia, L., Noordine, M.-L., Gitton, C., Chevret, D., ... Rul, F. (2011). Carbohydrate metabolism is essential for the colonization of *Streptococcus*

thermophilus in the digestive tract of gnotobiotic rats. *PloS One*, 6(12), e28789. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028789>

Toribara, N. W., Robertson, A. M., Ho, S. B., Kuo, W. L., Gum, E., Hicks, J. W., ... Kim, Y. S. (1993). Human gastric mucin. Identification of a unique species by expression cloning. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(8), 5879–5885.

Troxler, R. F., Offner, G. D., Zhang, F., Iontcheva, I., & Oppenheim, F. G. (1995). Molecular cloning of a novel high molecular weight mucin (MG1) from human sublingual gland. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 217(3), 1112–1119. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2884>

Turner, M. D. (2016). Hyposalivation and Xerostomia: Etiology, Complications, and Medical Management. *Dental Clinics of North America*, 60(2), 435–443. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2015.11.003>

Turner, M. D., & Ship, J. A. (2007). Dry mouth and its effects on the oral health of elderly people. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 138 Suppl, 15S–20S.

Vaishnava, S., Behrendt, C. L., Ismail, A. S., Eckmann, L., & Hooper, L. V. (2008). Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(52), 20858–20863. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808723105>

Vaishnava, S., Yamamoto, M., Severson, K. M., Ruhn, K. A., Yu, X., Koren, O., ... Hooper, L. V. (2011). The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6053), 255–258. <https://doi.org/10.1126/science.1209791>

Valeriano, V. D., Parungao-Balolong, M. M., & Kang, D.-K. (2014). In vitro evaluation of the mucin-adhesion ability and probiotic potential of *Lactobacillus mucosae* LM1. *Journal of Applied Microbiology*, 117(2), 485–497. <https://doi.org/10.1111/jam.12539>

van der Flier, L. G., & Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual Review of Physiology*, 71, 241–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163145>

- Van der Sluis, M., De Koning, B. A. E., De Bruijn, A. C. J. M., Velcich, A., Meijerink, J. P. P., Van Goudoever, J. B., ... Einerhand, A. W. C. (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*, 131(1), 117–129. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.04.020>
- van Klinken, B. J., Oussoren, E., Weenink, J. J., Strous, G. J., Büller, H. A., Dekker, J., & Einerhand, A. W. (1996). The human intestinal cell lines Caco-2 and LS174T as models to study cell-type specific mucin expression. *Glycoconjugate Journal*, 13(5), 757–768.
- van 't Hof, W., Veerman, E. C. I., Nieuw Amerongen, A. V., & Ligtenberg, A. J. M. (2014). Antimicrobial defense systems in saliva. *Monographs in Oral Science*, 24, 40–51. <https://doi.org/10.1159/000358783>
- Vargas García, C. E., Petrova, M., Claes, I. J. J., De Boeck, I., Verhoeven, T. L. A., Dilissen, E., ... Lebeer, S. (2015). Piliation of *Lactobacillus rhamnosus* GG promotes adhesion, phagocytosis, and cytokine modulation in macrophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(6), 2050–2062. <https://doi.org/10.1128/AEM.03949-14>
- Velcich, A., Palumbo, L., Jarry, A., Labois, C., Racevskis, J., & Augenlicht, L. (1995). Patterns of expression of lineage-specific markers during the in vitro-induced differentiation of HT29 colon carcinoma cells. *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, 6(6), 749–757.
- Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., ... Augenlicht, L. (2002). Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5560), 1726–1729. <https://doi.org/10.1126/science.1069094>
- Vesterlund, S., Paltta, J., Karp, M., & Ouwehand, A. C. (2005). Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. *Research in Microbiology*, 156(2), 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.08.012>
- Williams, S. J., McGuckin, M. A., Gotley, D. C., Eyre, H. J., Sutherland, G. R., & Antalis, T. M. (1999). Two Novel Mucin Genes Down-Regulated in Colorectal Cancer Identified by Differential Display. *Cancer Research*, 59(16), 4083–4089.
- Williams, S. J., Wreschner, D. H., Tran, M., Eyre, H. J., Sutherland, G. R., & McGuckin, M. A. (2001). Muc13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic

cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 18327–18336. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008850200>

Wreschner, D. H., McGuckin, M. A., Williams, S. J., Baruch, A., Yoeli, M., Ziv, R., ... Gordon, S. (2002). Generation of ligand-receptor alliances by “SEA” module-mediated cleavage of membrane-associated mucin proteins. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 11(3), 698–706. <https://doi.org/10.1110/ps.16502>

Wrzosek, L., Miquel, S., Noordine, M.-L., Bouet, S., Joncquel Chevalier-Curt, M., Robert, V., ... Thomas, M. (2013). *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biology*, 11, 61. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-61>

CHAPITRE III :

***STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*, UNE BACTÉRIE PROBIOTIQUE ?**

- III. *Streptococcus thermophilus*, une bactérie probiotique ?
 - III. 1. *Streptococcus thermophilus* : position taxonomique au sein du genre *Streptococcus*
 - III. 2. Utilisation de *Streptococcus thermophilus* dans l'industrie agroalimentaire
 - III. 3. Effets probiotiques de *Streptococcus thermophilus*
 - III. 4. Survie de *Streptococcus thermophilus* aux conditions du tube digestif
 - III. 5. L'adhésion de *Streptococcus thermophilus* et sa capacité de colonisation du tube digestif
 - III. 6. Les protéines de surface à domaine LPxTG chez *Streptococcus thermophilus*
 - III. 7. Objectifs de la thèse et stratégies
-

Chapitre III. *Streptococcus thermophilus*, une bactérie probiotique ?

III. 1. *Streptococcus thermophilus* : position taxonomique au sein du genre *Streptococcus*

Streptococcus (S.) thermophilus est une bactérie lactique (BL) thermophile largement utilisée dans l'industrie agro-alimentaire notamment dans la fabrication des produits laitiers fermentés. Elle appartient au genre *Streptococcus* et au phylum des *Firmicutes*. C'est une bactérie à coloration Gram positive, dépourvue d'activité catalase et ayant un génome à bas pourcentage en bases guanine-cytosine (entre 35,7 et 39,8 %) (Farrow and Collins, 1984 ; Tettelin *et al.*, 2002).

La classification initiale des streptocoques est assez complexe. Elle a été établie principalement en se basant sur des différences macroscopiques de pouvoir hémolytique des espèces (système Lancefield) qui ont été par la suite rapprochées à des différences immunologiques de polysaccharides de paroi (groupes A, B, C, F et G) ou d'acide lipotéichoïque (groupe D) (Facklam, 2002). Bien qu'elle présente des inconvénients, cette classification a été largement utilisée en microbiologie clinique notamment pour classer les streptocoques bêta-hémolytiques. A titre d'exemple, *S. pyogenes*, auquel on associe souvent le nom GAS pour « Groupe A *Streptococcus* » par rapport à la présence de l'antigène A, n'est finalement pas le seul streptocoque à le posséder. En effet, cet antigène est également exprimé par *S. anginosus* et *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*. De plus, d'autres souches de streptocoques pourraient également porter plusieurs antigènes à la fois (Facklam, 2002 ; Moschioni *et al.*, 2010).

Grâce aux techniques de biologie moléculaire, d'autres classifications réalisées sur la base de typage moléculaire ont permis d'établir les relations phylogénétiques entre les espèces. Ainsi, une étude récente sur la classification des streptocoques, effectuée en se basant sur les analyses comparatives des gènes codant les ARNs (acides ribonucléiques) ribosomiques 16S, a permis d'identifier 5 groupes majeurs appartenant au groupe *Streptococcus* : *S. mitis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. agalactiae* et *S. pyogenes* (Moschioni *et al.*, 2010) (Figure 12). Cette étude présente une classification qui est parfaitement reliée avec le potentiel pathogène des souches ainsi qu'avec leur niche écologique préférentielle (Kawamura *et al.*, 1995 ; Moschioni *et al.*, 2010). La seule exception concerne le groupe *mitis* qui contient *S. pneumoniae*, pathogène avéré, parmi d'autres espèces commensales des voies respiratoires hautes telles que *S. mitis*, *S. oralis* ou *S. infantis*.

Selon la dernière classification établie par Moschioni et al. (2010), *S. thermophilus* appartient au groupe *salivarius* qui comprend 3 autres espèces : *S. salivarius*, *S. vestibularis* et *S. peroris*. A l'exception de *S. thermophilus* et *S. macedonicus*, tous les autres streptocoques sont pathogènes (Facklam, 2002 ; Hols et al., 2005).

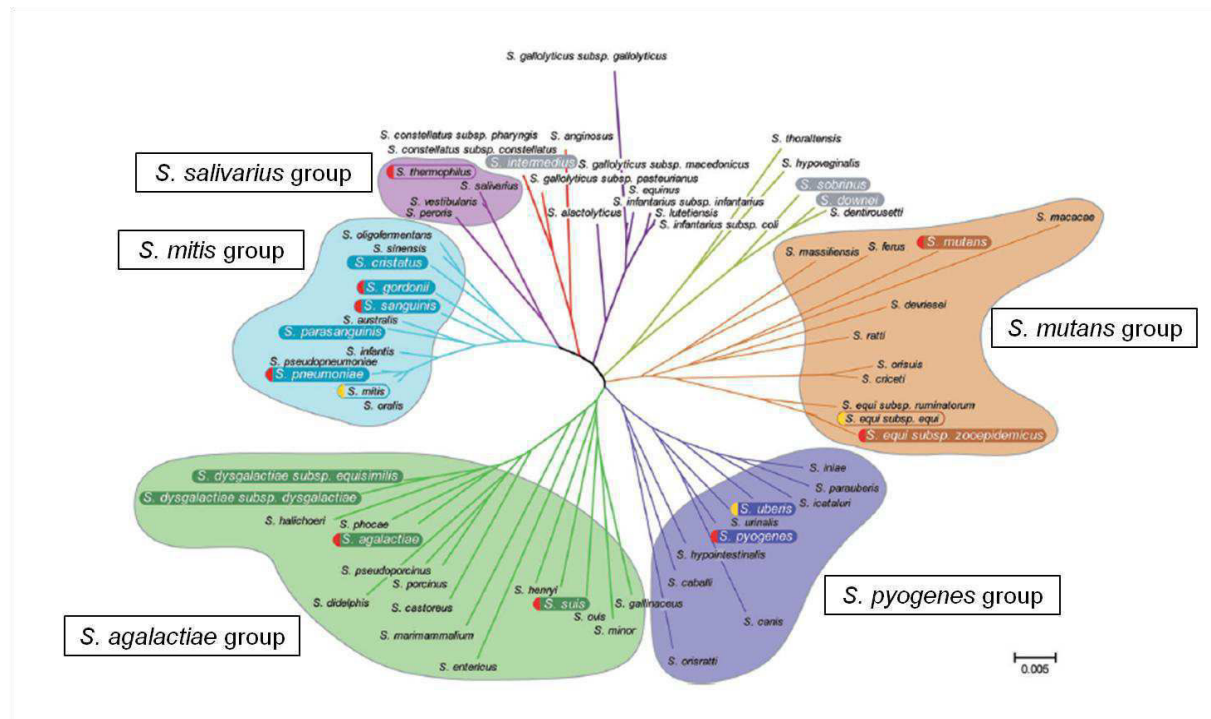


Figure 12 : Arbre phylogénétique des streptocoques établi en se basant sur la comparaison des gènes codant les ARNs ribosomiques 16S. Les espèces pour lesquelles un ou plusieurs génomes complets sont disponibles sont marquées par un demi-cercle, rouge si la séquence a été récupérée à partir du site NCBI (National Center for Biotechnology Information) et jaune à partir du Sanger Institute ou du J.C. Venter Institute (Moschioni et al., 2010).

Bien que *S. thermophilus* soit une espèce phylogénétiquement proche des streptocoques pathogènes (Figure 12), à ce jour elle n'a été impliquée dans aucune maladie infectieuse. Il faut noter qu'à l'heure actuelle, 12 génomes de souches de *S. thermophilus* ont été complètement séquencés (recherche NCBI, Juillet 2016). La comparaison du génome de 4 souches de *S. thermophilus* a révélé que les gènes liés à la virulence chez les streptocoques pathogènes étaient absents ou inactivés chez *S. thermophilus* (Bolotin et al., 2004 ; Makarova et al., 2006 ; Goh et al., 2011 ; Sun et al., 2011). De plus, *S. thermophilus* est le seul streptocoque ayant le statut GRAS attribué par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA ; American Food and Drug Administration, 2002 ; FDA 2012) ainsi que le statut QPS (Qualified Presumption of Safety) attribué par l'EFSA.

III. 2. Utilisation de *Streptococcus thermophilus* dans l'industrie agroalimentaire

Au sein du genre *Streptococcus*, seule *S. thermophilus* est utilisée dans l'industrie agro-alimentaire. Elle est la seconde bactérie la plus utilisée, après *L. lactis* (Hols et al., 2005), dans l'industrie laitière pour la fabrication de produits laitiers fermentés tels que le fromage et le yaourt. Selon la législation française, (décret n°88-1203 du 30 décembre 1988 relatif aux laits fermentés et au yaourt), la dénomination du yaourt (ou yoghourt) est réservée au « lait fermenté obtenu, selon des usages loyaux et constants, par le développement des seules BL thermophiles spécifiques dites *S. thermophilus* et *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* qui doivent êtreensemencées et se trouver vivantes dans le produit fini à raison d'au moins 10 millions de bactéries par gramme rapportées à la partie lactée ». *S. thermophilus* est donc principalement utilisée en co-culture avec *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pour la fabrication du yaourt mais également avec *L. lactis* pour la fabrication de certains fromages de type suisse, français et italien (gruyère, emmental, provolone, ...) (Giraffa et al., 2001).

S. thermophilus est une bactérie thermophile anaérobie aérotoleérante dont la température optimale de croissance est comprise entre 37°C et 42°C. Cependant, selon les souches, elle peut également se développer, certes plus lentement, à des températures comprises entre 19°C et 30°C. En ce qui concerne les températures élevées, plusieurs souches de *S. thermophilus* résistent jusqu'à 55°C ce qui a d'ailleurs permis leur utilisation de manière ubiquitaire dans les fromages à pâte pressée cuite (Emmental, Gruyère, Parmesan et Granatypes...) pour lesquels les températures de cuisson du caillé sont de l'ordre de 55°C. *S. thermophilus* produit majoritairement de l'acide lactique à partir du lactose mais également d'autres métabolites intéressants d'un point de vue technologique, tels que le formate, le diacétyle et l'acétaldéhyde qui interviennent dans la flaveur de l'aliment. De plus, de nombreuses souches de *S. thermophilus* produisent des exopolysaccharides (EPS) intervenant dans les propriétés rhéologiques des produits laitiers fermentés (Broadbent et al., 2003 ; Ruas-Madiedo et al., 2009).

III. 3. Effets probiotiques de *Streptococcus thermophilus*

Outre sa large utilisation dans l'industrie agro-alimentaire, *S. thermophilus* peut exercer des effets bénéfiques sur la santé de l'Homme et pourrait être ainsi considérée comme un probiotique (Collins et al., 1998, Iyer et al., 2010a). Le statut probiotique d'une souche bactérienne dépendrait, en partie, de sa capacité à survivre aux conditions de stress du tube

digestif. Des études menées *in vivo* avec *S. thermophilus* dans différents modèles animaux ont permis de montrer sa viabilité dans les différents compartiments du tube digestif et dans les fèces (Lick *et al.*, 2001 ; Dilmi-Bouras et Sadoun, 2002 ; Drouault *et al.*, 2002 ; Rul *et al.*, 2011 ; Thomas *et al.*, 2011 ; Ben-Yahia *et al.*, 2012). Cette survie a été confirmée chez l'Homme puisqu'elle a été également retrouvée vivante dans l'estomac et les fèces (Pochart *et al.*, 1989 ; Brigidi *et al.*, 2003 ; Mater *et al.*, 2005 ; Elli *et al.*, 2006 ; García-Hernández *et al.*, 2012). De plus, d'autres études menées *in vitro* ont rapporté qu'elle était capable d'adhérer modérément aux cellules iléales humaines et porcines ainsi qu'aux cellules épithéliales HT-29 (Resta-Lenert and Barrett, 2003 ; Couvigny *et al.*, 2015).

D'autres études ont également observé que certaines souches de *S. thermophilus* possédaient l'activité BSH, permettant l'hydrolyse des sels biliaires conjugués (Iyer *et al.*, 2010a ; Ziar *et al.*, 2014). Enfin, cette bactérie peut également coloniser, du moins transitoirement, le tube digestif humain et celui de certains animaux (Mater *et al.*, 2005 ; Elli *et al.*, 2006, Rul *et al.*, 2011). Ainsi, une fois ingérée, elle peut exercer des effets positifs sur la santé de l'Homme. Par exemple, la consommation de souches de *S. thermophilus* via le yaourt permet d'améliorer la digestion du lactose chez des individus présentant une intolérance au lactose (Pochart *et al.*, 1989 ; Marteau *et al.*, 1990 ; Rizkalla *et al.*, 2000 ; Rabot *et al.* 2010 ; Savaiano 2014). Pour cet effet bénéfique, en 2010, une allégation santé a été attribuée au yaourt par l'EFSA (EFSA 2010). Un autre effet démontré chez l'Homme concerne l'effet positif de *S. thermophilus* sur la dermatite atopique. En effet, il a été rapporté qu'une application d'une crème mélangée à un lysat cellulaire de la souche S244 réduisait l'érythème, le prurit et les desquamations chez tous les patients atteints de la dermatite atopique (Di Marzio *et al.*, 1999 ; Di Marzio *et al.*, 2003).

D'autres effets positifs ont également été rapportés dans différents modèles animaux notamment sur la stimulation de la réponse immunitaire, la production de molécules antibactériennes (acide lactique, thermophiline, ...) (Kolling *et al.*, 2012 ; Rossi *et al.*, 2013), la production d'antioxydants (Bruno-Bárcena *et al.*, 2004) ainsi que la prévention de la gastrite chronique (Rodriguez *et al.*, 2009 ; Rodriguez *et al.*, 2010). Cette bactérie est également capable de produire des vitamines comme la vitamine B (Iyer *et al.*, 2010b). De plus, certaines souches de *S. thermophilus* peuvent produire des EPS qui, en plus d'apporter une texture et des propriétés rhéologiques au lait fermenté, peuvent induire des effets sur la santé notamment dans l'immuno-modulation, la diminution du cholestérol et la prévention de

la gastrite chronique (Ruas-Madiedo et al., 2002 ; Rodríguez et al., 2009). Le Tableau 6 synthétise ces effets positifs démontrés chez *S. thermophilus* *in vivo* et *in vitro*, seule ou lorsqu'elle est associée à d'autres bactéries (Tableau 6).

Certaines souches de *S. thermophilus* sont dotées d'un système protéolytique qui leur permet d'hydrolyser les caséines du lait et de les utiliser comme source de nutriments. Au cours de cette hydrolyse, des peptides à activité biologique peuvent ainsi être produits (Miclo et al., 2012 ; Hafeez et al., 2014). Par ailleurs, *S. thermophilus* peut être utilisée dans la production de protéines hétérologues (Lecomte et al., 2016). Ainsi, elle pourrait être utilisée dans la fonctionnalisation des aliments notamment les produits laitiers fermentés voire dans la production des molécules biothérapeutiques.

III. 4. Survie de *Streptococcus thermophilus* aux conditions de stress du tube digestif

L'utilisation massive de *S. thermophilus* dans l'industrie agro-alimentaire et les effets bénéfiques qu'elle peut conférer à la santé du consommateur nécessite l'étude et la compréhension de sa physiologie dans les conditions de stress du tractus gastro-intestinal (TGI).

Les données rapportées sur la survie de *S. thermophilus*, indiquant une sensibilité élevée et/ou une résistance modérée, sont très variables en fonctions des souches. Ainsi, certaines de ces études *in vivo* décrivant le devenir de *Lb. delbruecki* subsp. *bulgaricus* et *S. thermophilus*, ont montré qu'elles survivaient partiellement au passage du TGI (Lick et al., 2001 ; Mater et al., 2005 ; Elli et al., 2006 ; Qin et al., 2010). Ainsi, Lick et ses collaborateurs ont pu détecter *S. thermophilus* à une concentration de 10^6 - 10^7 Unité Formant Colonie par gramme (UFC.g⁻¹) du contenu intestinal dans tous les mini-porcs testés (Lick et al., 2001). De façon similaire, Brigidi et al. (2005) ont retrouvé chez l'Homme une souche de *S. thermophilus* dans les fèces à des concentrations de 10^5 - 10^7 UFC.g⁻¹ suivant que la bactérie était ingérée *via* le yaourt ou *via* le mélange probiotique commercial VSL#3.

Tableau 5 : Exemples d'effets bénéfiques démontrés *in vitro* et *in vivo* en utilisant *S. thermophilus* seule ou en combinaison avec d'autres souches probiotiques.

	Composition de la matrice	Effets bénéfiques	Références
<i>S. thermophilus</i> seule	Lait fermenté avec <i>S. thermophilus</i> produisant des EPS (CRL 1190 et CRL 804)	Prévention de la gastrite chronique <i>in vivo</i> chez la souris	Rodríguez et al., 2009
	<i>S. thermophilus</i> TH-4	Diminution de la mucite intestinale <i>in vivo</i> chez les rats après traitement avec des substances anticancéreuses	Whitford et al., 2009 ; Wang et al., 2013
	<i>S. thermophilus</i> LMD-9	Atténuation de l'infection due à <i>C. difficile</i> <i>in vivo</i> chez la souris	Kolling et al., 2012
	<i>S. thermophilus</i> S244 mélangée avec une crème de base	Atténuation de la dermatite atopique chez les patients ayant appliqué la crème	Di Marzio et al., 1999 ; Di Marzio et al., 2003
	<i>S. thermophilus</i>	En fonction des souches, stimulation de la production de l'interleukine 10 après incubation avec les cellules mononucléaires humaines du sang périphérique	Junjua et al., 2016
	<i>S. thermophilus</i> S85	Production de la β -galactosidase active au niveau intestinal <i>in vivo</i> chez la souris gnotoxénique	Drouault et al., 2002
<i>S. thermophilus</i> en combinaison avec d'autres bactéries	Yaourt contenant <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> S85 et <i>S. thermophilus</i> S85	Amélioration de la digestion du lactose <i>in vivo</i> chez l'Homme adulte hypolactasique	Kolars et al., 1984; Marteau et al., 1990 ; Savaiano, 2014
	Yaourt contenant les souches <i>B. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> et <i>L. lactis</i>	Atténuation des symptômes liés au syndrome du côlon irritable (SCI) chez les femmes et amélioration de la composition de leur microbiote intestinal	(Veiga et al., 2014)
	Mélange probiotique sous forme de capsules contenant <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> et <i>S. thermophilus</i>	Atténuation des symptômes liés au syndrome du côlon irritable chez les patients et amélioration de la composition de leur microbiote intestinal en utilisant l'approche en double aveugle contre placebo (DACP)	(Ki Cha et al., 2012)
	Formule infantile supplémentée avec <i>B. breve</i> c50 et <i>S. thermophilus</i> 065	Diminution des épisodes diarrhéiques chez des enfants âgés de 4 à 6 mois après une consommation de la formule supplémentée en comparaison avec la formule standard	(Thibault et al., 2004)
VSL#3	4 souches de lactobacilles (<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lb. plantarum</i>), 3 souches de bifidobactéries (<i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i>), 1 souche de <i>S. thermophilus</i>	Traitement des diarrhées à rotavirus chez les enfants en utilisant la méthodologie DACP	(Dubey et al., 2008)
		Prévention de lésions hépatiques par la protection de la barrière intestinale <i>in vivo</i> chez des rats ayant reçu une quantité d'alcool	(Chang et al., 2013)

Par ailleurs, Mater et al. (2005) et Elli et al. (2006) ont également pu récupérer des bactéries viables de *S. thermophilus* dans les fèces humaines après une consommation quotidienne de yaourt commercial (Mater et al., 2005 ; Elli et al., 2006). Récemment, une étude utilisant la technique de numération directe des bactéries viables combinée avec l'hybridation *in situ* en fluorescence (DVC-FISH ; Direct Viable Count combined with fluorescent *in situ* hybridization) a montré que *S. thermophilus* CECT 801 survivait *in vivo* chez l'Homme et *in vitro* aux conditions simulées du TGI (García-Hernández et al., 2012). Ces données indiquent que *S. thermophilus* peut survivre au passage du TGI. Toutefois, cette capacité de survie dépend des souches et des conditions expérimentales utilisées. En effet, certaines études réalisées *in vitro* ont rapporté que certaines souches de *S. thermophilus* présentaient un profil de survie très variable à l'acidité et aux sels biliaires allant de souches très sensibles, moyennement résistantes à résistantes (Junjua et al., 2016). Par exemple, Vinderola et Reinheimer (2003) ont montré une sensibilité élevée des souches de *S. thermophilus* au pH acide et à la bile (Vinderola and Reinheimer, 2003). Au contraire, d'autres études ont montré qu'elle présentait une survie élevée ou modérée aux jus gastrique et pancréatique et aux sels biliaires (Iyer et al., 2010a ; García-Hernández et al., 2012 ; Ziar et al., 2014).

La résistance des bactéries aux conditions du TGI peut être améliorée grâce à l'effet tampon de l'aliment (Huang and Adams, 2004). Ainsi, certaines études ont remarqué que la survie de certaines souches de *S. thermophilus* (CECT 801, LMD-9) aux sels biliaires et au pH acide était améliorée lorsque la bactérie était contenue dans du lait fermenté (Conway et al., 1987 ; García-Hernández et al., 2012 ; Uriot et al., 2016). Toutes ces données indiquent qu'en fonction des souches et des conditions expérimentales, *S. thermophilus* pourrait résister aux stress du TGI mais les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance restent encore largement méconnus. Toutefois, il a été montré chez certaines souches de *S. thermophilus* que les EPS avaient un rôle dans la résistance au stress biliaire (Mozzi et al., 2009 ; Boke, 2010). De plus, des études transcriptomiques et protéomiques ont pu identifier des protéines induites, comme par exemple les protéines chaperonnes GroEL et GroES et les régulateur CtsR et HrcA, mais uniquement lorsque *S. thermophilus* était exposée au stress acide (Arena et al., 2006 ; Zotta et al., 2009 ; Mozzi et al., 2009). A notre connaissance, à ce jour, aucune étude transcriptomique ou protéomique n'a été réalisée sur *S. thermophilus* lorsqu'elle est exposée au stress biliaire.

III. 5. Les propriétés adhésives de *Streptococcus thermophilus* et sa capacité de colonisation du tube digestif

III. 5. 1. Les propriétés adhésives de *Streptococcus thermophilus* aux surfaces biotiques et abiotiques

L'adhésion bactérienne a été largement étudiée chez les lactobacilles et les bifidobactéries. Dans le cas de *S. thermophilus*, peu d'études se sont intéressées à l'adhésion de cette bactérie. En effet, les premiers travaux avaient montré qu'elle adhérerait faiblement aux surfaces biotiques (Conway et al., 1987). Quant aux surfaces abiotiques, des études ont rapporté que les souches de *S. thermophilus* (NCTC 573 et NCTC 10353) adhéraient aux surfaces d'acier inoxydable et étaient capables de former des biofilms (Flint et al., 1997). De plus, il a été montré que cette capacité d'adhésion n'était pas liée aux propriétés de surface des souches notamment l'hydrophobicité, la charge de la surface cellulaire et la production de polysaccharides (Flint et al., 1997). D'autres études ont également rapporté que la souche *S. thermophilus* B adhérerait à des surfaces abiotiques en produisant des surfactants (Busscher et al., 1990). Dans la même optique, une étude récente a montré que différentes souches de *S. thermophilus* étaient capables d'adhérer aux polystyrènes et qu'elles étaient capables de former des biofilms (Couvigny et al., 2015).

D'autres travaux de recherche se sont focalisés sur l'analyse des propriétés physico-chimiques de surface de *S. thermophilus* par mesure de l'hydrophobicité, qui pourrait refléter le potentiel d'adhésion de cette bactérie (Iyer et al., 2010a). Ainsi, une hydrophobicité élevée se traduit par une capacité d'adhésion élevée des bactéries. Toutefois, cette corrélation n'est pas toujours simple à mettre en évidence et s'avère dépendante des souches et du type de solvants utilisés. Ainsi, Iyer et ses collaborateurs (2010) ont montré que l'hydrophobicité était très variable en fonction des souches de *S. thermophilus* (RD102 et RD104) et du solvant organique utilisé (n-hexadécane, octane ou xylène) (Iyer et al., 2010a). Cette même étude a rapporté que les valeurs du pourcentage d'hydrophobicité étaient comprises entre 12 et 24,5 %, c'est-à-dire une hydrophobicité moyenne selon les études de Lee et Yii (1996) (Iyer et al., 2010a; Lee and Yii, 1996). Vinderola et Reinheimer (2003) ont également rapporté le même niveau d'hydrophobicité et que ce niveau était supérieur à celui obtenu avec les bactéries probiotiques *Lb. casei* et *Lb. rhamnosus* (Vinderola and Reinheimer, 2003).

Par ailleurs, des études visant à déterminer la capacité d'adhésion de *S. thermophilus* aux cellules épithéliales intestinales ont également été réalisées. Ces études ont montré que cette bactérie adhérerait faiblement ou moyennement en fonction des souches. Par exemple, Conway PL. (1987) a montré que cette bactérie adhérerait très faiblement *in vitro* aux cellules iléales humaines et porcines mais que le taux d'adhésion augmentait lorsque la bactérie était cultivée en milieu lait (Conway et al., 1987). D'autres travaux, au contraire, ont montré que différentes souches de *S. thermophilus* adhéraient aux cellules Caco-2 et HT29 (Palencia et al., 2008 ; Couvigny et al., 2015 ; Guigas *et al.*, 2015) et qu'elles avaient la capacité, lorsqu'elles étaient cultivées avec *Lb. acidophilus* ATCC4356, d'inhiber l'adhésion de la souche d'*E. coli* entéroinvasive 029:NM (Resta-Lenert and Barrett, 2003). En outre, la capacité d'adhésion de certaines souches de *S. thermophilus*, notamment la souche JIM8232, était associée à leur capacité à former des biofilms (Couvigny et al., 2015).

III. 5. 2. La capacité de colonisation du tube digestif par *Streptococcus thermophilus* liée à son activité métabolique

La colonisation de la muqueuse intestinale par des BL dépendrait de leur capacité d'adhésion. Les données de la littérature ont rapporté que *S. thermophilus* pouvait adhérer aux cellules épithéliales *in vitro* (Resta-Lenert and Barrett, 2003 ; Palencia et al., 2008 ; Couvigny et al., 2015 ; Guigas *et al.*, 2015). En ce qui concerne sa capacité de colonisation du tube digestif, très peu d'études ont été réalisées. Certains travaux ont pu montrer que *S. thermophilus* était capable de coloniser le tube digestif de rats gnotobiotiques et que la colonisation de cette bactérie était associée à son métabolisme carboné (Rul et al., 2011 ; Thomas et al., 2011). En effet, le métabolisme carboné chez *S. thermophilus* permet une croissance rapide dans certaines conditions et une adaptation à de nouvelles niches écologiques notamment lors de son incorporation dans la fabrication d'aliments et le passage dans le tractus digestif. D'ailleurs, l'adaptation de cette bactérie en milieu lait est associée principalement à sa capacité de fermentation du lactose, la principale source de carbone du lait, ce qui justifie sa large utilisation dans l'industrie laitière. Le lactose est transporté à l'intérieur de la cellule par une perméase membranaire spécifique appelée LacS. Il a été observé, en comparant des rats gnotobiotiques recevant ou non du lactose, que ce glucide induisait une colonisation rapide par les souches de *S. thermophilus* LMD-9 et LMG18311 dès le moment du gavage, alors qu'une adaptation était nécessaire en absence du lactose (Thomas et al., 2011). Cette même étude a également montré que l'inactivation du gène *lacS*

retardait cette colonisation du tube digestif des rats axéniques par la souche LMD-9 (Thomas et al., 2011). En outre, Rul et ses collaborateurs ont rapporté que les souches LMD-9 et LMG18311 étaient métaboliquement actives dans le tractus digestif et qu'elles réalisaient une glycolyse massive conduisant ainsi à une production importante de L-Lactate (Rul et al., 2011). Cette étude a également permis d'identifier, par une analyse protéomique réalisée après un passage de la souche LMD-9 dans le tube digestif, 11 protéines induites dont 8 impliquées dans le métabolisme carboné (Rul et al., 2011). Ces données indiquent ainsi que l'aptitude de *S. thermophilus* à coloniser le tube digestif est liée à son métabolisme glycolytique. De plus, le processus de colonisation dépendrait sur la capacité d'adhésion de *S. thermophilus*.

Il semble que les premières étapes d'adhésion de *S. thermophilus* dépendent des propriétés de surface cellulaire de cette bactérie. En effet, Flint et ses collaborateurs (1997) ont pu mettre en évidence, après un traitement des bactéries à la trypsine, le rôle des protéines de surface de *S. thermophilus* dans le processus d'adhésion (Flint et al., 1997). Récemment, une étude a identifié une protéine de surface à domaine MucBP chez *S. thermophilus* JIM8232 et dont l'inactivation du gène induisait une diminution significative de la capacité d'adhésion de la souche aux cellules HT-29 (Couvigny et al., 2015). Ces données indiquent donc l'importance des protéines de surface dans l'adhésion de *S. thermophilus*.

III. 6. Les protéines de surface à domaine LPxTG chez *Streptococcus thermophilus*

S. thermophilus est une espèce clonale qui a émergé récemment et évolué par perte et/ou acquisition de fonctions *via* des événements de transfert horizontal de gènes (THG) conduisant à son adaptation à une nouvelle niche écologique, le lait (Bolotin et al., 2004). Bien que cette bactérie soit une espèce phylogénétiquement proche des streptocoques pathogènes, l'analyse comparative des génomes a montré que 25 % des gènes liés à la virulence étaient absents chez *S. thermophilus* (Bolotin et al., 2004 ; Hols et al., 2005 ; Goh et al., 2011) et que la plupart des gènes liés à la virulence restants étaient soit non fonctionnels (gènes tronqués ; environ 10 % du génome), soit des orthologues codant des protéines impliquées dans des fonctions cellulaires basiques (Bolotin et al., 2004 ; Hols et al., 2005). Parmi les gènes qui auraient été acquis par THG à partir d'autres espèces figure le gène codant la protéase pariétale PrtS. Bien que cette protéase soit impliquée dans la virulence, notamment dans l'adhésion aux cellules hôte de certains streptocoques pathogènes (Nobbs et al., 2009), elle ne présente aucune pathogénicité chez *S. thermophilus* (Delorme et al., 2010).

Les protéines de surface sont des protéines qui sont soit liées à la membrane, soit ancrées à la paroi de la bactérie. Celles ancrées à la paroi possèdent un domaine LPxTG qui est reconnu par la sortase A et permet leur ancrage de façon covalente au peptidoglycane (PG). Chez *S. thermophilus*, il existe trois protéines ayant un domaine d'ancrage et qui est probablement reconnu par la sortase A (Goh et al., 2011).

III. 6. 1. Les sortases et l'art d'accrocher les protéines à la paroi bactérienne

Les sortases sont des transpeptidases liées de manière covalente à la membrane cytoplasmique par leur extrémité N-terminale et éventuellement leur partie C-terminale. Ces enzymes ont comme fonction principale l'ancrage à la paroi bactérienne des protéines ayant un motif spécifique. Chez les bactéries à coloration Gram positive, les sortases ont été classées en 4 groupes (A, B, C et D) suivant leurs homologues de séquences et leurs fonctions (Dramsi et al., 2005). De plus, il ressort qu'il y a souvent plus d'un gène codant une sortase putative par génome. La sortase A, que nous détaillerons ci-après, a été la première sortase décrite chez *Staphylococcus aureus* et reste, à ce jour, la sortase la mieux caractérisée biochimiquement et structuralement chez les bactéries à coloration Gram positive. Cette enzyme reconnaît en effet un motif LPxTG (leucine (L), proline (P), X (peut représenter n'importe quel acide aminé), thréonine (T) et glycine (G)) porté par certaines protéines dans la partie C-terminale et catalysent une réaction de transpeptidation conduisant à l'ancrage des protéines dans la paroi bactérienne. .

a) Les caractéristiques de la sortase A et ses mécanismes d'action

Chez *S. thermophilus*, le gène codant la sortase A est présent chez toutes les souches dont le génome a été entièrement séquencé (données issues d'une recherche sur BLASTn, juillet 2016). Toutefois, ce gène est présent sous la forme de pseudogène ou de gène tronqué chez certaines souches comme, par exemple, les souches LMG18311 et CNRZ1066 (Hols et al., 2005; Goh et al. 2011). Chez la souche LMD-9, l'analyse du génome a révélé la présence d'une séquence codante complète du gène *srtA* (STER_1255). Par ailleurs, Goh et al. (2011) ont rapporté que ce gène présentait environ 90 % d'homologie avec la sortase de *S. salivarius* SK126 (Goh et al., 2011).

Contrairement aux autres bactéries à coloration Gram positive, la sortase A de la souche LMD-9 est peu caractérisée. Toutefois, une étude récente a mis en évidence son rôle dans

l'ancrage de la protéase PrtS à la paroi bactérienne (Dandoy et al., 2011 ; Awussi et al., en préparation).

b) Les mécanismes moléculaires de la fonction de la sortase A

Les sortases A possèdent dans leur partie N-terminale, un peptide signal hydrophobe qui permet leur sécrétion et leur ancrage à la membrane cytoplasmique. Au niveau du domaine C-terminal se trouve la séquence consensus TLXTC contenant la cystéine catalytique. Le mécanisme d'action (Figure 13) consiste en une reconnaissance par l'enzyme SrtA du motif LPxTG porté par une protéine préalablement synthétisée puis sécrétée *via* la machinerie du système de sécrétion Sec. Après reconnaissance du motif, SrtA clive, *via* sa cystéine nucléophile, entre les résidus thréonine et glycine. Ce clivage conduit à la formation d'un intermédiaire acyl-enzyme dans lequel la thréonine du motif LPxTG se trouve liée à la cystéine de la sortase (Figure 13) (Ton-That et al., 1999 ; Ton-That et al., 2000). Cet intermédiaire subit ensuite l'attaque nucléophile d'un groupement amine de la chaîne peptidique du lipide II permettant de libérer l'enzyme SrtA. Ainsi, la protéine cible se retrouve liée de façon covalente au lipide II. Ce dernier sera ensuite utilisé par les Penicillin Binding Proteins pour être incorporé au peptidoglycane (PG). De ce fait, la protéine est alors ancrée au PG (Schneewind et al., 1995 ; Ton-That et al., 1997). Chez *S. thermophilus* LMD-9, trois gènes codant des protéines à motif LPxTG dépendantes de la sortase A ont été identifiés. Ils codent la protéase de paroi PrtS, la cyclo-nucléotide phosphodiesterase (CpdB) et la protéine à domaine MucBP (Goh et al., 2011).

III. 6. 2. La protéase de paroi PrtS

PrtS est une protéine appartenant à la sous famille des protéases à sérine de la famille des subtilisines (Fernandez-Espla et al., 2000). Malgré sa localisation au niveau du chromosome et son rôle clé dans l'hydrolyse des caséines du lait, l'analyse de la distribution du gène *prtS* au sein des souches de *S. thermophilus* a révélé que sa présence est variable en fonction des souches (Galia et al., 2009 ; Delorme et al., 2010). De plus, Delorme et ses collaborateurs ont rapporté que ce gène n'était retrouvé que dans les souches ayant émergé récemment telles que celles utilisées dans l'industrie laitière (Delorme et al., 2010). Cette même étude a montré que ce gène était organisé en îlot génomique avec en amont les gènes *potC*, *potD* et *eriC*. Cet îlot génomique est flanqué de part et d'autre de séquences d'insertion (SI). Par ailleurs, l'analyse de la présence du gène *prtS* chez deux souches de *S. salivarius* a

montré qu'il n'existait pas de gène homologue de *prtS*. Les auteurs ont également révélé que la protéine PrtS présentait environ 95 % d'identité avec PrtS de *S. suis* (Delorme et al., 2010). Toutefois, le gène codant *prtS* chez *S. suis*, également présent dans un îlot génomique, n'est pas flanqué par des SI. Ces données indiquent que le gène *prtS* a été acquis par THG à partir de souches de *Streptococcus* proches de *S. suis*. Cet îlot génomique serait par la suite transféré à d'autres souches de *S. thermophilus* ce qui expliquerait sa distribution variable au sein de l'espèce *thermophilus* (Delorme et al., 2010).

Bien que la protéase PrtS soit impliquée dans la virulence de certains streptocoques pathogènes, chez *S. thermophilus* son rôle principal semble consister à hydrolyser les caséines du lait en oligopeptides, une fonction clé liée à son adaptation en milieu lait (Goh et al., 2011). En outre, il semblerait que cette activité ne dépende pas de son ancrage à la paroi puisque l'inactivation du gène *srtA* n'affecte pas l'activité protéolytique de PrtS (Dandoy et al., 2011). Il faut noter que la protéase PrtS pourrait également être impliquée dans d'autres fonctions cellulaires chez *S. thermophilus* comme la résistance au stress biliaire (Kebouchi et al., 2016).

III. 6. 3. La cyclo-nucléotide phosphodiesterase (CpdB)

La cyclo-nucléotide phosphodiesterase (CpdB) est une nucléotidase qui catalyse la conversion des nucléotides en nucléosides pour être utilisés comme source de carbone par les bactéries (Goh et al., 2011). Cette protéine est également requise pour l'homéostasie de l'Adénosine Monophosphate cyclique (AMPC), un régulateur clé des gènes de virulence chez les bactéries pathogènes comme *Pseudomonas (P.) aeruginosa*. En effet, CpdB agirait comme un régulateur de l'expression de l'AMPC. Chez *P. aeruginosa*, l'inactivation du gène diminue l'expression des gènes de virulence et atténue la virulence de la bactérie (Fuchs et al., 2010). Cette protéine est également considérée comme un facteur de virulence chez certains streptocoques pathogènes (Li et al., 2009).

Le gène complet codant cette enzyme a été retrouvé dans le génome de la souche LMD-9 (STER_0198) contrairement aux autres souches LMG 18311 et CNRZ1066, où le gène est tronqué (Goh et al., 2011). De plus, la comparaison des séquences génomiques a révélé que ce gène était orthologue au gène *sntA* de *S. suis*, qui code une protéine présentant un tripeptide RGD (une séquence composée de résidus Arg-Gly-Asp) impliqué dans l'adhésion aux récepteurs des cellules hôtes (Osaki et al., 2002). Ce motif est également

présent au niveau de la protéine CpdB de la souche LMD-9 suggérant ainsi qu'elle pourrait jouer un rôle dans l'interaction avec les cellules hôtes (Goh et al., 2011).

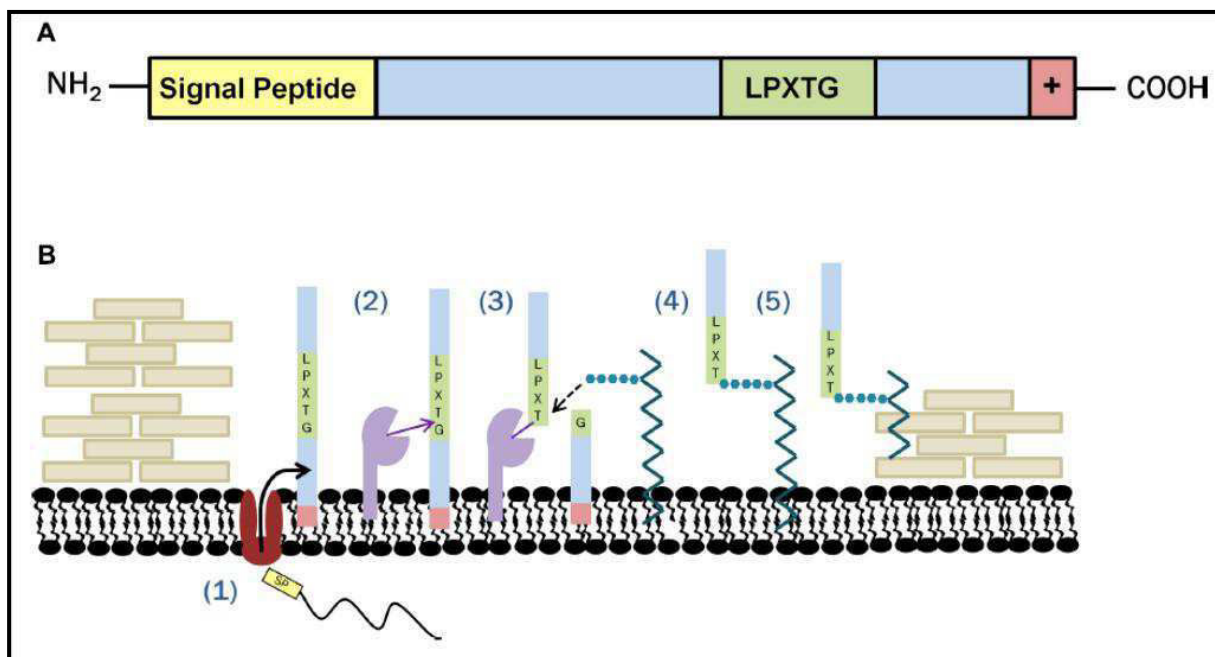


Figure 13 : Mécanisme d'ancrage des protéines à domaine LPxTG par la sortase A chez les bactéries à coloration Gram positive. A) Séquence de la protéine substrat de la sortase A, présentant un peptide signal (SP ; signal peptide) à l'extrémité N-terminale et un motif LPxTG à l'extrémité C-terminale. B) L'ancrage covalent au peptidoglycane des protéines à motif LPxTG par la sortase A est accompli par une série de 5 étapes : 1) Le système de sécrétion Sec reconnaît le peptide signal de la protéine et l'exporte au niveau de la membrane cytoplasmique. La protéine reste attachée à la membrane *via* des interactions hydrophobes. 2) La sortase reconnaît le motif et clive entre les résidus glycine et thréonine *via* une réaction de transpeptidation. 3) L'attaque nucléophile par le peptide II conduit à la libération de la sortase. 4) La protéine reste ensuite accrochée au lipide II. 5) Enfin, la protéine est incorporée au peptidoglycane (Call & Klaenhammer, 2013).

III. 6. 4. La protéine à domaine MucBP

S. thermophilus possède également un gène codant une protéine de surface présentant des homologies avec la protéine à domaine MucBP chez les lactobacilles (Goh et al., 2011). Ce gène est présent chez certaines souches de *S. thermophilus* dont la souche LMD-9 (STER_0576) suggérant ainsi que soit le gène aurait été acquis par transfert horizontal, soit les autres souches auraient perdu ce gène au cours de leur adaptation à de nouvelles niches écologiques comme le lait.

La protéine MucBP (MUCin Binding Protein), de 1009 résidus d'acides aminés, se caractérise par la présence d'un domaine MucBP, d'un peptide signal YSIRK à l'extrémité N-

terminale et d'un motif d'ancrage LPxTG en C-terminal (Goh et al., 2011). La présence effective de cette protéine au niveau de la surface bactérienne a été récemment mise en évidence chez la souche LMD-9 (Lecomte et al., 2014).

Ayant un domaine de fixation aux mucines, le rôle de la protéine MucBP dans l'adhésion par une analyse mutationnelle du gène a été déjà mis en évidence chez plusieurs BL (Roos and Jonsson, 2002 ; Mackenzie et al., 2010) dont la souche *S. thermophilus* JIM8232, puisque l'inactivation du gène *mucBP* diminuait significativement sa capacité d'adhésion aux cellules HT-29 (Couvigny et al., 2015). Comme cette protéine présente 91 % d'identité avec celle de la souche LMD-9, la protéine MucBP pourrait jouer un rôle clé dans l'adhésion de cette souche (Couvigny et al., 2015).

III. 7. Objectifs de la thèse et stratégies

Le fait que *S. thermophilus* (i) soit très utilisée dans l'industrie agro-alimentaire pour la fabrication des produits laitiers, (ii) soit capable d'hydrolyser les caséines du lait et de produire des peptides à activité biologique et (iii) puisse être utilisée comme outil de production de protéines hétérologues, nous incite à mieux déterminer ses propriétés probiotiques afin de pouvoir développer, à long terme, des aliments fonctionnels à visée biothérapeutique. Pour obtenir certains effets probiotiques, il faut que la bactérie soit capable d'adhérer, au moins transitoirement, à la muqueuse intestinale et de résister aux stress rencontrés dans le TGI. Les mécanismes moléculaires de ces deux propriétés pourraient être liés à la présence ou absence de certaines protéines à la surface bactérienne. Il est donc crucial de déterminer les molécules potentiellement impliquées dans l'adhésion et la résistance au stress biliaire.

Mon travail de thèse avait donc pour objectif d'étudier *in vitro* d'une part la capacité d'adhésion de *S. thermophilus* LMD-9 à différentes lignées cellulaires et sa capacité à résister au stress biliaire. De plus, afin de mettre en évidence le rôle de certaines protéines de surface dans ces deux processus, nous avons comparé la capacité des mutants inactivés dans des gènes codant les protéines SrtA (la sortase A), PrtS (la protéase PrtS) et MucBP avec celle de la souche sauvage LMD-9 dans l'adhésion *in vitro* aux cellules épithéliales intestinales et dans la résistance aux sels biliaires. D'autre part, nous avons également étudié l'impact de l'adhésion bactérienne sur l'expression, d'une part au niveau des gènes eucaryotes et d'autre part au niveau des gènes bactériens.

Comme le tube digestif est composé de différentes cellules et également tapissé d'une couche de mucus, trois lignées cellulaires d'origine humaine ayant des propriétés de surface différentes, ont été employées. Ainsi, l'utilisation d'une lignée cellulaire entérocytaire et deux autres productrices de mucus permet de mieux caractériser la capacité d'adhésion de *S. thermophilus* LMD-9 et des mutants qui en dérivent en fonction de la composition de surface des cellules intestinales (présence ou absence de mucus, mucines différentes en fonction du type cellulaire...). Nous avons par la suite étudié la survie aux sels biliaires (cholate, desoxycholate et taurocholate) de la souche sauvage LMD-9 et des trois mutants.

Le processus d'adhésion implique une interaction entre les bactéries et les cellules intestinales et cette interaction peut avoir un impact sur l'expression des gènes à la fois

eucaryotes mais aussi bactériens. D'une part, au niveau des cellules intestinales, cet effet pourrait se traduire par une modulation de l'expression des gènes codant les mucines par exemple et qui aboutirait à la surproduction ou à la sous production de mucus et d'autre part, sur l'induction de certains gènes bactériens au contact des cellules intestinales. Nous avons donc étudié l'effet de l'adhésion de *S. thermophilus* LMD-9 sur l'expression des gènes *MUC2* et *MUC5AC* codant les mucines intestinales par qRT-PCR semi-quantitative en temps réel afin de mettre en évidence son rôle dans le renforcement de l'effet barrière de l'épithélium intestinal. Au niveau des cellules bactériennes, l'adhésion pourrait induire l'expression de certains gènes. Ainsi, nous avons également recherché si certains promoteurs étaient induits chez *S. thermophilus* LMD-9 durant l'adhésion aux cellules intestinales, en utilisant la technique R-IVET (Recombinase-based *In vivo* Expression Technology).

PARTIE II :

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE & RÉSULTATS

CHAPITRE I :

ÉTUDE DE LA CAPACITÉ D'ADHÉSION DE *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* LMD-9 ET SA RÉSISTANCE AU STRESS BILIAIRE

I. Mise au point des conditions expérimentales

- I. 1. Etude de la croissance de la souche sauvage *Streptococcus thermophilus* LMD-9 et des trois mutants en milieu LM17
- I. 2. Etude de la survie de *Streptococcus thermophilus* LMD-9 au stress biliaire
- I. 3. Impact des conditions expérimentales de l'adhésion sur la survie de *Streptococcus thermophilus* LMD-9 et des trois mutants

II. Implication des protéines de surface dépendantes de la sortase dans l'adhésion de *Streptococcus thermophilus* LMD-9 aux cellules épithéliales intestinales et dans la résistance aux sels biliaires

Chapitre I. Etude de la capacité d'adhésion de *Streptococcus thermophilus* LMD-9 et sa résistance au stress biliaire

Objectifs :

Ce travail vise à étudier la capacité d'adhésion *in vitro* de *Streptococcus* (*S.*) *thermophilus* LMD-9 à différentes lignées cellulaires d'origine humaine et à identifier certains acteurs impliqués dans ce processus. Dans ce but, le rôle de deux protéines de paroi à motif LPxTG, qui est reconnu spécifiquement par la sortase A, dans l'adhésion de la souche LMD-9 a été analysé. Ainsi, nous avons utilisé deux mutants inactivés dans les gènes *prtS* (Lecomte et al., 2014) et *mucBP* préalablement construits à partir de la souche sauvage LMD-9. De plus, un mutant *srtA* obtenu dans un autre travail (Awussi et al., en préparation) a également été utilisé. Par ailleurs et compte tenu de l'importance de la résistance au stress biliaire pour la survie d'un probiotique dans le tube digestif, celle de la souche sauvage LMD-9 et des trois mutants a été évaluée. Avant de réaliser les expériences d'adhésion et de survie au stress biliaire, des tests préliminaires ont été nécessaires afin (i) d'analyser le profil de croissance des différentes souches utilisées dans nos conditions de culture, (ii) de définir les conditions de survie de la souche sauvage LMD-9 et celle des mutants en présence des différentes concentrations de sels biliaires et (iii) de déterminer si la survie de la souche sauvage LMD-9 et celle des mutants était potentiellement affectée par les conditions expérimentales de l'adhésion (à savoir l'utilisation du milieu de culture des cellules eucaryotes Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) et du triton X-100 à 0,1 %).

I. Mise au point des conditions expérimentales

I. 1. Etude de la croissance de la souche sauvage *Streptococcus thermophilus* LMD-9 et des trois mutants en milieu LM17

Afin de placer le plus possible les quatre souches étudiées dans les mêmes conditions physiologiques lors des tests d'adhésion, nous avons comparé la croissance des trois mutants en milieu LM17 à celle de la souche sauvage LMD-9 (Figure 14). Pour cela, un suivi de croissance a été réalisé par mesure de la Densité Optique à 650 nm (DO_{650nm}) pendant 720 min (12 heures). Les résultats montrent que les profils de croissance des trois mutants sont similaires à celui de la souche sauvage LMD-9 (Figure 14) et que la phase stationnaire semble être atteinte au bout de 720 min, soit 12 h pour toutes les souches. Ces données nous permettent de postuler que les souches seront dans un état physiologique très similaire lors de la réalisation des études d'adhésion et de survie au stress biliaire et que l'inactivation des gènes *prtS*, *srtA* et *mucBP* n'affecte pas la croissance de *S. thermophilus* LMD-9 en milieu LM17.

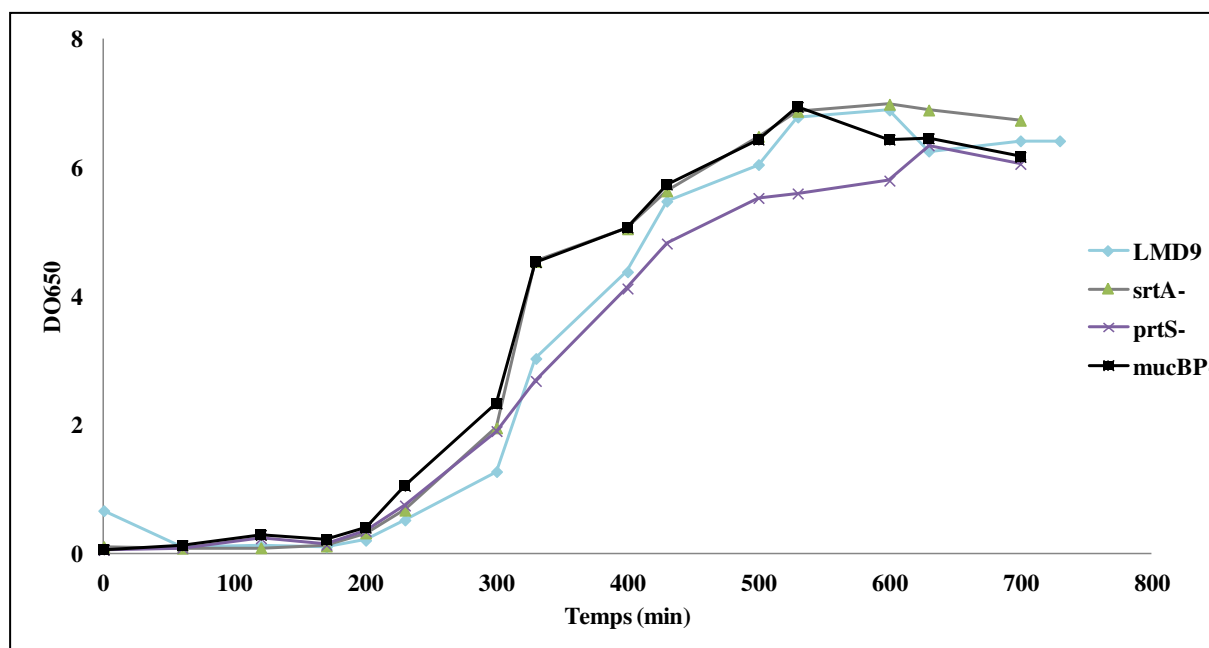


Figure 14 : Etude du profil de croissance de la souche sauvage *S. thermophilus* LMD-9 ainsi que des mutants *srtA*, *prtS* et *mucBP* pendant 12 h à 42°C en milieu LM17. La souche sauvage de *S. thermophilus* LMD-9 est représentée par des losanges bleus (♦), le mutant *srtA* par des triangles verts (▲), le mutant *prtS* par des croix violettes (×) et le mutant *mucBP* par des carrés noirs (■). La croissance bactérienne a été suivie pendant 12 heures en mesurant la Densité Optique à 650 nm.

I. 2. Etude de la survie de *Streptococcus thermophilus* LMD-9 au stress biliaire

La survie à la bile est un critère de sélection *in vitro* des bactéries probiotiques puisqu'elle conditionne leur aptitude à survivre aux conditions drastiques du tube digestif et à coloniser l'environnement intestinal. Dans la littérature, la plupart des études sur la survie au stress acide et/ou biliaire pour la sélection de potentielles souches probiotiques sont réalisées sur des lactobacilles et des bifidobactéries. En revanche, très peu d'études ont été effectuées chez *S. thermophilus* et en particulier la souche LMD-9. Des travaux sur la survie au stress digestif de différentes souches de *S. thermophilus*, dont la souche LMD-9, ont déjà été réalisés dans notre laboratoire en utilisant la méthode de suivi de croissance des cellules bactériennes (Junjua et al., 2016). La DO des cultures bactériennes exposées ou pas à un stress acide ou biliaire a été mesurée puis le temps nécessaire pour que les cellules bactériennes (stressées et non stressées) atteignent le milieu de la phase exponentielle de croissance a été déterminé. La différence entre les deux temps (delta temps) a été calculée comme indice de résistance (Junjua et al., 2016). Cette étude a ainsi montré que la souche LMD-9 avait une résistance modérée au stress biliaire (Junjua et al., 2016).

Dans notre étude, nous avons choisi d'évaluer la survie de la souche LMD-9 selon la méthode décrite précédemment par Iyer et al. (2010a). Celle-ci consiste en une numération des colonies bactériennes viables après leur exposition aux sels biliaires (Iyer et al., 2010a). La plupart des études de survie réalisées *in vitro* utilisent la bile bovine ou porcine. Cependant, leur composition exacte en terme de proportion de sels biliaires n'est pas souvent détaillée voire même elle ne contient pas tous les sels biliaires retrouvés chez l'Homme (Beglay et al., 2005).

Dans le cadre de notre étude, nous avons opté pour un mélange équimolaire de sels biliaires contenant deux sels biliaires libres, le cholate (sel biliaire primaire le plus abondant dans la bile humaine ; Islam et al., 2011) et le désoxycholate de sodium (sel biliaire secondaire issu du cholate) ainsi qu'un autre sel biliaire conjugué à la taurine, le taurocholate de sodium. Ces sels biliaires présentent une cytotoxicité différente en fonction du nombre de fonction hydroxyle permettant ainsi de mimer les conditions drastiques rencontrées dans le TGI (Bajor et al., 2010). En effet, le désoxycholate ayant deux fonctions hydroxyles peut plus facilement passer la membrane lipidique que le cholate et le taurocholate qui, eux, possèdent trois fonctions hydroxyles (Cabral et al., 1987). Après 12 h de croissance en milieu LM17, les bactéries ont été exposées pendant 2 h (temps estimé de la digestion d'un lait fermenté) à

37°C à une large gamme de concentration du mélange équimolaire de sels biliaries, puis le nombre d'Unités Formant Colonies (UFC) par mL a été déterminé sur le milieu de culture LM17 gélosé (Figure 15). Dans l'ensemble de l'étude, *Lactobacillus (Lb.) rhamnosus* GG ATCC 53103, connue pour son potentiel probiotique et sa bonne résistance aux sels biliaries, a été utilisée comme témoin positif.

Dans des conditions physiologiques humaines normales, les sels biliaries peuvent atteindre une concentration de 40 mM au niveau de l'intestin grêle (Islam et al., 2011). Au-delà de ce segment intestinal, les sels biliaries sont progressivement dilués et absorbés au cours de leur parcours dans les intestins et peuvent atteindre des concentrations inférieures à 1 mM (Bajor et al., 2010). Concernant notre étude, nous avons testé dans un premier temps des concentrations de 0,25 ; 0,5 ; 2 ; 5 et 10 mM du mélange équimolaire de sels biliaries. Les résultats montrent que les concentrations de 0,25 et de 0,5 mM n'ont pas d'effets significatifs (moins d'un demi-log de différence par rapport au témoin négatif) sur la viabilité des souches *S. thermophilus* LMD-9 et *Lb. rhamnosus* GG (Figure 15a et Figure 15b). En revanche, les concentrations 2 ; 5 et 10 mM ont un effet significatif (plus d'un log de différence par rapport au témoin négatif) sur la viabilité des deux bactéries après 2 h d'incubation à 37°C. En effet, à 2 mM en sels biliaries, la viabilité de LMD-9 diminue significativement, passant de 10^9 à 10^7 UFC.mL⁻¹ (Figure 15a). Au contraire, à 5 et 10 mM, aucune bactérie viable n'a été détectée (Figure 15a). Pour *Lb. rhamnosus* GG, la survie est également diminuée de deux logs à 2 mM. Contrairement à la souche LMD-9, des bactéries viables de *Lb. rhamnosus* GG ont été détectées à 5 mM après 2 h d'exposition mais plus aucune bactérie viable n'a été détectée à 10 mM.

Compte tenu de ces résultats, nous avons affiné les conditions de stress biliaire en testant des concentrations comprises entre 0,25 et 2 mM (Figure 15c). Les résultats corroborent ceux obtenus précédemment (Figure 15a) et montrent également que les effets des sels biliaries sur la viabilité de la souche LMD-9 sont négligeables jusqu'à 1 mM. Nous avons donc testé une autre gamme de concentration en sels biliaries : 0 ; 2 ; 3 et 4 mM. Les résultats montrent que la viabilité des bactéries est significativement réduite à 3 mM (Figure 15d). A une concentration de 4 mM en sels biliaries, aucune UFC n'est détectée (Figure 15d). D'après ces résultats, la gamme de concentration 0, 2 ; 3 et 4 mM en sels biliaries a donc été retenue pour la suite de notre travail.

Ainsi, la survie des trois mutants (*prtS*⁻, *srtA*⁻ et *mucBP*⁻) en présence des sels biliars a été comparée à celle de la souche sauvage LMD-9 afin de mettre en évidence le rôle des protéines de surface (PrtS, MucBP et SrtA) dans la résistance au stress biliaire.

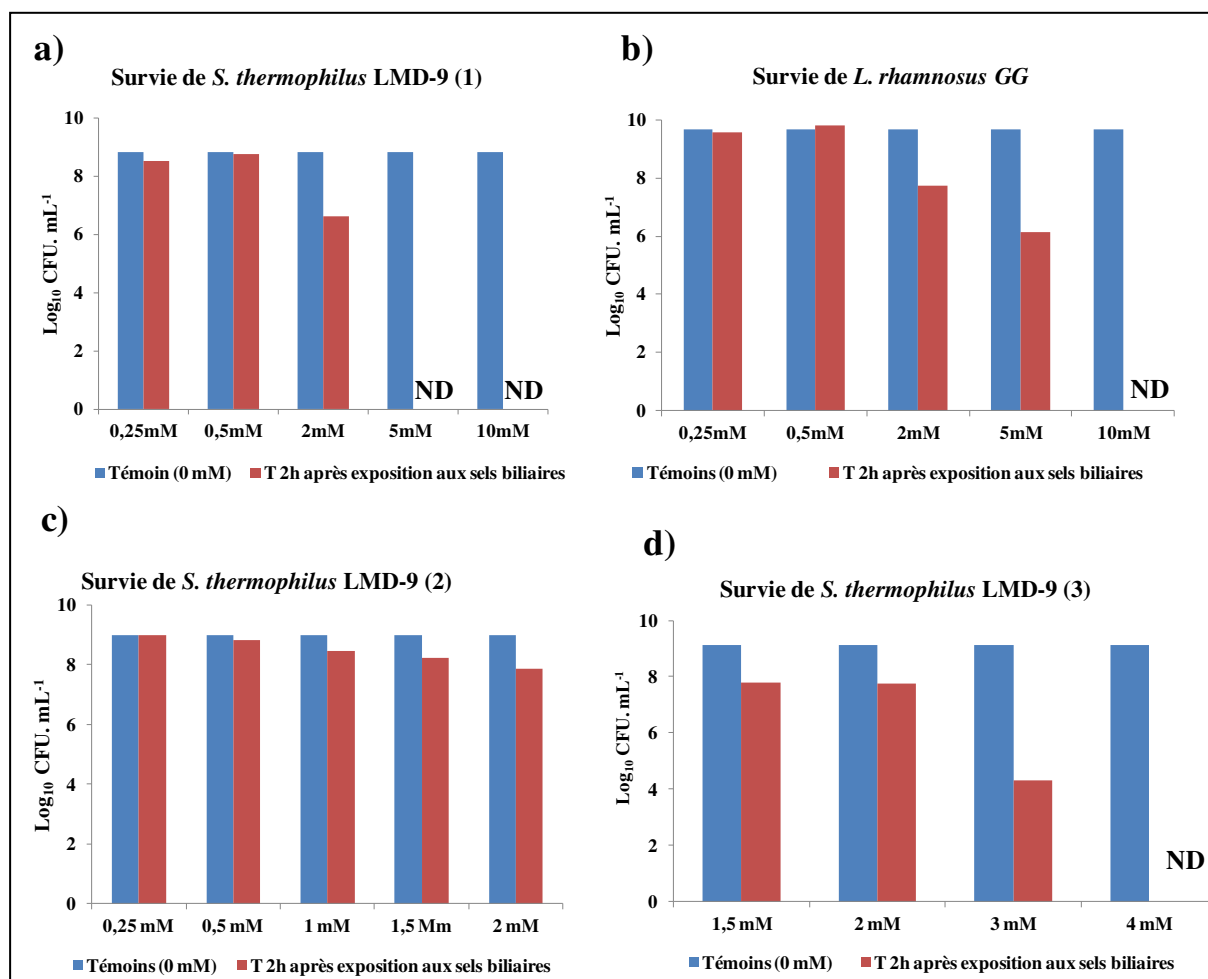


Figure 15 : Etude de la survie de *S. thermophilus* LMD-9 et *Lb. rhamnosus* GG aux différentes concentrations de sels biliars. Les lettres (a, c et d) désignent les résultats de survie de *S. thermophilus* LMD-9 obtenus en présence de différentes concentrations de sels biliars et les numéros (1, 2, et 3) l'ordre des expérimentations réalisées avec cette bactérie. (b) Survie de *Lb. rhamnosus* GG, utilisée comme témoin positif, en présence de différentes concentrations de sels biliars. Le nombre d'UFC.mL⁻¹ obtenu pour le témoin négatif sans sels biliars (0 mM) est placé avant chaque concentration afin d'évaluer plus aisément l'effet des sels biliars sur la viabilité des bactéries. Les résultats sont exprimés en log₁₀ UFC.mL⁻¹. T 2 h : incubation des bactéries pendant 2 h à 37°C en présence des sels biliars. ND : Non détectée.

I. 3. Impact des conditions expérimentales de l'adhésion sur la survie de *Streptococcus thermophilus* LMD-9 et des trois mutants

Dans le protocole utilisé pour l'étude de l'adhésion bactérienne aux cellules eucaryotes, les bactéries sont mises en suspension dans le milieu de culture DMEM

supplémenté avec 10 % ou 20 % de sérum de veau fœtal (SVF) en fonction de la lignée cellulaire utilisée. Les bactéries sont ensuite co-incubées avec les cellules eucaryotes pendant 2 h à 37°C avec 10 % de CO₂ et 90 % d'air. Ensuite, une solution de triton X-100 à 0,1 % est utilisée afin de détacher les bactéries adhérentes du tapis cellulaire. Afin de déterminer l'effet des solutions utilisées dans les tests d'adhésion sur les bactéries, la survie de celles-ci au milieu DMEM et au triton X-100 à 0,1 % a été préalablement établie. Pour ce faire, le même protocole que celui qui sera utilisé dans les expériences d'adhésion, mais sans cellules eucaryotes, a été utilisé. Ainsi, une culture de nuit (12 h) en milieu de culture LM17 a été centrifugée et les bactéries ont été lavées avec du tampon HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). La suspension bactérienne a été ensuite concentrée dans le milieu DMEM ($DO_{650} \approx 12$) puis incubée pendant 2 h à 37°C avec 10 % de CO₂ et 90 % d'air. Des prélèvements ont été effectués à T=0 min (T0 DMEM) et après 2 h d'incubation (T2h DMEM). La suspension bactérienne a alors été centrifugée puis lavée avec du tampon HBSS. Les bactéries ont été ensuite exposées au triton-X 100 à 0,1 % puis incubées pendant 30 min à température ambiante. Des prélèvements ont également été effectués à T=0 min (T0 Triton) et après 30 min d'incubation (T30 min Triton). Des dilutions ont été réalisées pour tous les prélèvements puis étalées sur milieu LM17 gélosé. Le nombre d'UFC a été déterminé après 24 h d'incubation à 42°C en anaérobiose et les résultats sont présentés en log₁₀ UFC.mL⁻¹.

Les résultats montrent que le milieu DMEM SVF 20 % n'affecte pas la survie des souches de *S. thermophilus* (sauvage et mutantes) après 2 h d'incubation. De même, le triton X-100 à 0,1 % semble ne pas avoir d'effet sur la survie des bactéries même après 30 min d'incubation à température ambiante (Figure 16). Ces résultats indiquent que, dans nos conditions, les solutions de DMEM et de triton X-100 à 0,1 % n'affectent pas la survie de la souche sauvage LMD-9 ni celle des trois mutants. Par ailleurs, la croissance de la souche LMD-9 dans le milieu DMEM comparée à celle obtenue dans le milieu LM17 pendant 6 h a été également examinée (résultats non montrés). Les résultats ont montré que la souche ne présentait aucune multiplication dans le milieu DMEM. Ainsi, ces données indiquent que les conditions citées ci-dessus pourront être utilisées pour étudier la capacité d'adhésion de la souche LMD-9 ainsi que celle des trois mutants aux différentes lignées cellulaires.

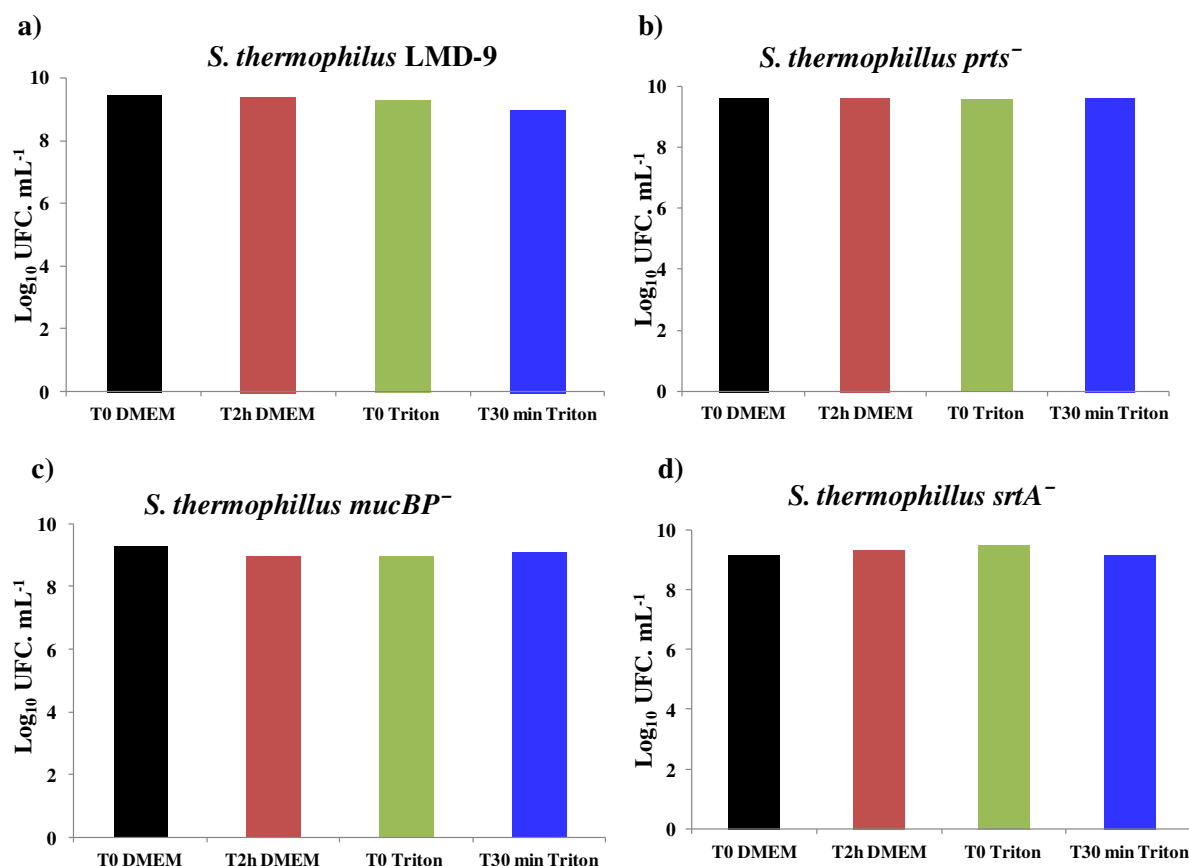


Figure 16 : Impact du milieu de culture DMEM et du triton X-100 à 0,1 % sur la survie de *S. thermophilus* LMD-9 (a) et des mutants *prts⁻* (b), *mucBP⁻* (c) et *srtA⁻* (d). T0 DMEM et T2h DMEM : un prélèvement a été effectué juste après re-suspension des cultures bactériennes dans le milieu DMEM (T0) et après 2 heures d'incubation à 37°C en présence de 10 % de CO₂ (T2h). T0 Triton et T30 min Triton : la culture incubée 2 h dans le milieu DMEM a été exposée au triton X-100 à 0,1 % (v/v) et un prélèvement a été effectué immédiatement à T=0 min (T0) et après 30 min d'incubation à température ambiante (T30 min).

I. 4. Conclusion

Cette étude préliminaire a permis d'établir les conditions expérimentales propices d'une part à l'étude de la survie de la souche sauvage LMD-9 et des mutants dérivés au stress biliaire, et d'autre part à l'étude de leur capacité d'adhésion *in vitro* aux différentes lignées cellulaires. Les résultats préliminaires obtenus ont permis de (i) montrer qu'il n'y a pas de différence de croissance notable entre la souche sauvage LMD-9 et les trois mutants en milieu LM17, (ii) définir les concentrations en sels biliaires auxquelles la souche sauvage LMD-9 était capable de survivre et (iii) montrer que les solutions utilisées dans les tests d'adhésion (Triton X-100 à 0,1 % et milieu DMEM) n'avaient aucun effet sur la viabilité de la souche sauvage LMD-9 et des trois mutants dans nos conditions expérimentales.

EN RÉSUMÉ

- Aucune différence de croissance n'a été observée entre la souche sauvage LMD-9 et les trois mutants en milieu LM17 dans nos conditions expérimentales.
- L'effet du mélange équimolaire de sels biliaires sur la survie de la souche sauvage LMD-9 était négligeable jusqu'à 1 mM. L'effet des sels biliaires sur la survie était significatif jusqu'à 3 mM (5 log de différence par rapport au témoin négatif). Aucune bactérie viable n'a été détectée avec les concentrations 4, 5 et 10 mM. Ainsi, les concentrations 0, 2, 3, 4 mM ont été retenues pour la suite de l'étude.
- La solution de Triton X-100 à 0,1 % et le milieu DMEM n'ont pas d'effet détectable sur la survie de la souche sauvage LMD-9 et des trois mutants dans nos conditions expérimentales.

En se basant sur les résultats de cette étude, le rôle des protéines de surface dans l'adhésion de la souche LMD-9 à des cellules épithéliales et dans la résistance au stress biliaire a été étudié. L'ensemble des résultats obtenus sont détaillés dans la publication décrite ci-dessous « *Implication of sortase-dependent proteins of *Streptococcus thermophilus* in adhesion to human intestinal epithelial cell lines and bile salt tolerance* », parue en 2016 dans « *Applied Microbiology and Biotechnology* ».

II. Implication des protéines de surface dépendantes de la sortase dans l'adhésion de *Streptococcus thermophilus* LMD-9 aux cellules épithéliales intestinales et dans la résistance aux sels biliaires

Introduction à la publication 1

L'adhésion des bactéries probiotiques à la muqueuse intestinale est généralement corrélée avec la production durable de certains effets bénéfiques sur l'hôte. C'est la raison pour laquelle l'adhésion a été retenue dans les critères de sélection des candidats probiotiques établis en 2002 par l'organisation mondiale de la santé (OMS) et le Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (FAO/OMS, 2002). Le processus d'adhésion à la muqueuse intestinale se définit par une interaction entre les cellules bactériennes et les cellules eucaryotes en faisant intervenir des éléments génétiques moléculaires. Ainsi, afin d'examiner les propriétés adhésives des souches bactériennes dans le but de cribler de meilleurs candidats probiotiques, différents modèles cellulaires *in vitro* d'origine humaine ont été développés.

Par ailleurs, la définition des micro-organismes probiotiques inclut la survie aux conditions de stress du tube digestif pour pouvoir atteindre leur cible et exercer des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. Ainsi, les candidats probiotiques sont également sélectionnés *in vitro* pour leur aptitude à résister au stress digestif notamment les stress acide et biliaire.

Parmi les critères de sélection des probiotiques, les deux critères cités-ci-dessus semblent être importants pour l'attribution aux micro-organismes du statut probiotique. Il serait donc intéressant de comprendre les mécanismes moléculaires de la résistance au stress digestif ainsi que l'adhésion à la muqueuse intestinale afin de déterminer les éléments génétiques impliqués dans ces deux processus.

Dans cette étude, nous avons évalué l'aptitude de *S. thermophilus* LMD-9 à adhérer aux différentes lignées cellulaires, les entérocytes Caco-2 et les cellules productrices de mucus HT29-MTX et HT29-CL. 16E. En outre, la survie de la souche LMD-9 à une gamme de concentration de sels biliaires, préalablement déterminée, a été également étudiée. Par ailleurs, pour étudier le rôle de certaines protéines de surface de la souche LMD-9 dans ces

deux processus, la survie au stress biliaire et la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales des trois mutants inactivés dans les gènes *prtS*, *srtA* et *mucBP* ont été analysées.

Cette étude a permis d'une part d'examiner la survie de la souche LMD-9 aux différentes concentrations du mélange équimolaire de sels biliaires et d'autre part d'évaluer l'aptitude de la souche LMD-9 à adhérer aux différentes lignées cellulaires. Ces lignées cellulaires intestinales présentent différentes mucines à la surface cellulaire que la souche LMD-9 peut rencontrer au niveau du tube digestif. Le rôle des protéines PrtS, SrtA et MucBP dans le stress biliaire et dans l'adhésion a été mis en évidence, à notre connaissance, pour la première fois chez la souche LMD-9.

EN RÉSUMÉ

- *S. thermophilus* LMD-9 adhère *in vitro* aux trois lignées cellulaires dans nos conditions expérimentales.
- L'implication des protéines de surface PrtS, SrtA et MucBP dans l'adhésion de la souche LMD-9 dépend des propriétés de surface des lignées cellulaires utilisées.
- Les trois protéines PrtS, SrtA et MucBP joueraient un rôle primordial dans l'adhésion de la souche LMD-9 aux cellules Caco-2 TC7. Avec les cellules HT29-CL. 16E, seule la protéine MucBP semble être impliquée dans le processus d'adhésion.
- La capacité d'adhésion de la souche LMD-9 semble dépendre également d'autres molécules protéiques ou non protéiques de surface.
- Les protéines PrtS et MucBP seraient impliquées dans la résistance de la souche LMD-9 au stress biliaire.

Publication 1: Implication of sortase-dependent proteins of *Streptococcus thermophilus* LMD-9 in adhesion to human intestinal epithelial cell lines and bile salts tolerance

M. Kebouchi, W. Galia, M. Genay[#], C. Soligot, X. Lecomte, A. A. Awussi, C. Perrin, E. Roux, A. Dary-Mourot and Y. Le Roux

Université de Lorraine, Unité de Recherche « Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux » (UR AFPA), Équipe « Protéolyse & Biofonctionnalités des Protéines & des Peptides » (PB2P), Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France

INRA, Unité de Recherche « Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux » (UR AFPA), Unité Sous Contrat 340, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France

[#]Corresponding author ; *Université de Lorraine, Unité de Recherche « Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux » (UR AFPA), Équipe « Protéolyse & Biofonctionnalités des Protéines & des Peptides » (PB2P), Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France Phone: +33 (0) 3 83 68 42 66. E-mail: magali.genay@univ-lorraine.fr*

Implication of sortase-dependent proteins of *Streptococcus thermophilus* in adhesion to human intestinal epithelial cell lines and bile salt tolerance

Mounira Kebouchi^{1,2} · Wessam Galia^{1,2} · Magali Genay^{1,2} · Claire Soligot^{1,2} ·
Xavier Lecomte^{1,2} · Ahoefa Ablavi Awussi^{1,2} · Clarisse Perrin^{1,2} · Emeline Roux^{1,2} ·
Annie Dary-Mouroit^{1,2} · Yves Le Roux^{1,2}

Received: 4 November 2015 / Revised: 10 January 2016 / Accepted: 13 January 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract *Streptococcus thermophilus* (ST) is a lactic acid bacterium widely used in dairy industry and displays several properties which could be beneficial for host. The objective of this study was to investigate, in vitro, the implication of sortase A (SrtA) and sortase-dependent proteins (SDPs) in the adhesion of ST LMD-9 strain to intestinal epithelial cells (IECs) and resistance to bile salt mixture (BSM; taurocholate, deoxycholate, and cholate). The effect of mutations in *prtS* (protease), *mucBP* (MUCin-Binding Protein), and *srtA* genes in ST LMD-9 in these mechanisms were examined. The HT29-MTX, HT29-CL.16E, and Caco-2 TC7 cell lines were used. HT29-MTX and HT29-CL.16E cells express different mucins found in the gastro intestinal tract; whereas, Caco-2 TC7 express cell surface proteins found in the small intestine. All mutants showed different adhesion profiles depending on cell lines. The mutation in genes *srtA* and *mucBP* leads to a significant decrease in LMD-9 adhesion capacity to Caco-2 TC7 cells. A mutation in *mucBP* gene has also shown a significant decrease in LMD-9 adhesion capacity to HT29-CL.16E cells. However, no difference was observed using HT29-MTX cells. Furthermore, ST LMD-9 and *srtA* mutant were resistant to BSM up to 3 mM. Contrariwise, no viable bacteria were detected for *prtS* and *mucBP* mutants at

this concentration. Two conclusions could be drawn. First, SDPs could be involved in the LMD-9 adhesion depending on the cell lines indicating the importance of eukaryotic-cell surface components in adherence. Second, SDPs could contribute to resistance to bile salts probably by maintaining the cell membrane integrity.

Keyword *S. thermophilus* · Sortase-dependent proteins (SDPs) · Adhesion · Intestinal epithelial cells · Bile salt stress

Introduction

Lactic acid bacteria (LAB), a clade of Gram-positive bacteria, are widely used in the manufacture of dairy products. Once consumed, most of them have been shown to promote health benefits on the host and therefore are considered as probiotics (Veiga et al. 2010; Pagnini et al. 2010). The probiotic definition adopted in 2002 (live microorganisms which conferred a health benefit when administrated in adequate amount) implies that to be recognized as a probiotic, a bacterium has to remain alive in the digestive tract, especially able to resist to bile salts in gastro intestinal tract (GIT), and confer a health benefit. As several health effects require that the probiotic adheres, even transiently, to the mucus and/or intestinal epithelial cells (IECs), this property is often sought.

Streptococcus thermophilus (ST) belongs to the LAB group and is recognized as safe since it has obtained the Generally Recognized as Safe (GRAS) status from the American Food and Drug Administration (FDA 2002; FDA 2012) and the Qualified Presumption of Safety (QPS) status from the European Food Safety Authority (EFSA). Due to its high capability of fermenting milk and flavor producing characteristics, this bacterium is massively used as a starter in dairy

✉ Magali Genay
magali.genay@univ-lorraine.fr

¹ Université de Lorraine, Unité de Recherche « Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux » (UR AFPA), Équipe « Protéolyse et Biofonctionnalités des Protéines et des Peptides » (PB2P), Vandœuvre-lès-Nancy 54506, France

² INRA, Unité de Recherche « Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux » (UR AFPA), Unité Sous Contrat 340, Vandœuvre-lès-Nancy 54506, France

industry where it is considered as the second most important species after *Lactococcus lactis* (Hols et al. 2005). In addition to its use in the dairy industry, several beneficial effects of ST in the host have already been reported (Naidu et al. 1999; Pagnini et al. 2010; Savaiano 2014). ST in yogurt cultures has been shown to improve lactose digestion in lactose-intolerant individuals (Rizkalla et al. 2000; Rabot et al. 2010; Savaiano 2014). In addition, yogurt, which is manufactured with the two LAB ST and *Lactobacillus bulgaricus*, was awarded a health claim in 2010 by EFSA for this beneficial effect (EFSA 2010). Furthermore, several studies have highlighted its survival through the GIT, the enhancement of the intestinal barrier function, and limiting pathogen adhesion and invasion (Brigidi et al. 2003; Elli et al. 2006; Mater et al. 2005; Resta-Lenert and Barrett 2003; Qin et al. 2010; Kolling et al. 2012). ST LMD-9 has a 1.8-Mb small genome with a low-GC content whose sequence is already known (Makarova et al. 2006). During its adaptation to dairy environment, this bacterium has lost and acquired several biological functions (Bolotin et al. 2004; Hols et al. 2005; Goh et al. 2011). Approximately, 45 % open-reading frames of ST LMD-9 have no ortholog in other streptococcal species (Goh et al. 2011) indicating the acquisition of new genes by horizontal gene transfer (HGT) to adapt to new ecological niches. The genes encoding cell surface proteins PrtS and MucBP are among those probably acquired by HGT in ST LMD-9 (Delorme et al. 2010; Goh et al. 2011). Furthermore, the effective presence of these proteins at the surface of LMD-9 strain was recently demonstrated by shaving (Lecomte et al. 2014). PrtS is a cell wall serine proteinase of subtilisin family containing a C-terminal anchoring motif (Fernandez-Esplá et al. 2000). It is involved in casein breakdown in ST providing bacterial cells with essential amino acids during growth in milk. MucBP protein has a single MUB domain with an N-terminal YSIRK signal peptide and a C-terminal LPxTG motif (Goh et al. 2011). PrtS and MucBP proteins are recognized by the enzyme SrtA sortase through their LPxTG motif. SrtA cleaves between the threonine and glycine residues and covalently attach the resulted product to the peptidoglycan (Marraffini et al. 2006; Call and Klaenhammer 2013). ST LMD-9 possesses a functional SrtA and it has been shown that the anchoring of PrtS to the cell wall was mediated by this enzyme (Dandoy et al. 2011). Moreover, Dandoy et al. (2011) have reported that the inactivation of *srtA* gene did not affect the PrtS activity in LMD-9 strain suggesting that even if PrtS is not covalently anchored to the cell wall by SrtA, it could remain attached to the bacterial cell surface by electrostatic interactions (Roos and Jonsson 2002). These data indicate that the anchoring of LPxTG-cell wall proteins depends on SrtA but not their activity. In addition, PrtS and MucBP proteins have demonstrated to be involved in adhesion to biotic and/or abiotic surfaces (Habimana et al. 2007; Couvigny et al. 2015).

Adhesion of LAB to IECs is an important criterion for probiotic strain selection. This biological mechanism promotes interaction with host IECs leading to gut protection and colonization. To be able to interact with host cells, the bacteria need to set up protein machinery at the cell surface e.g. SDPs (Juge 2012; Sengupta et al. 2013). Bacterial adhesion in vivo and in vitro studies have been mainly performed with lactobacilli (Roos and Jonsson 2002; Boekhorst et al. 2006; MacKenzie et al. 2010; Von Ossowski et al. 2011), but they are limited in ST. However, the few studies conducted on ST have demonstrated its ability to adhere to Caco-2 and HT-29 cells in vitro (Palencia et al. 2008; Couvigny et al. 2015). Therefore, this bacterium has the ability to interact with IECs but the mechanism of its attachment and factors involved remain unknown. In lactobacilli, in addition to specific adhesins, SDPs and other cell surface components such as exopolysaccharide (EPS) and lipoteichoic acids can also contribute to the adhesion to IECs (Lebeer et al. 2010; Von Ossowski et al. 2011; Sengupta et al. 2013). Regarding cell surface proteins in LMD-9 strain, the proteinase PrtS is 95 % identical to the subtilisin-like serine protease of *Streptococcus suis*. In such pathogenic streptococci, these proteinases are involved in adhesion to mucosal surfaces and virulence (Moschioni et al. 2010; Hu et al. 2010; Bonifait et al. 2010). Furthermore, the proteinase PrtP of *Lc. lactis* (a PrtS homologous) is involved in adhesion to abiotic surfaces however its effect on adhesion to IECs remains to be elucidated (Habimana et al. 2007). Moreover, the other surface protein MucBP has also shown to promote adhesion to mucus and to IECs in several LAB (Roos and Jonsson 2002; Buck et al. 2005; MacKenzie et al. 2010). Recently, it has been shown that the inactivation of *mucBP* gene in ST strain JIM8232, which shares 91 % identity with LMD-9 MucBP protein, decreases significantly the in vitro adhesion ability of JIM8232 strain to HT-29 cells (Couvigny et al. 2015). Besides PrtS and MucBP protein, SrtA is also involved in bacterial adhesion to IECs since it is responsible for the covalent anchoring of surface proteins having a LPxTG motif. It has been shown in pathogenic streptococci and LAB that SrtA can be considered as an adhesion factor but its involvement in ST adhesion remain to be studied (Lalioui et al. 2005; Wang et al. 2009; Muñoz-Provencio et al. 2012; Jensen et al. 2014). Thus, all of these data indicate that sortase and SDPs may play a key role in interactions with IECs and/or mucus components.

The role of the sortase and SDPs in LAB is not only limited to the bacterial adhesion to IECs, but could also contribute to resistance to the environmental stresses through the GIT (e.g., bile salt stress). It has been reported in some lactobacilli that genes encoding SrtA and MucBP proteins are overexpressed after bile exposure (Pfeiler et al. 2007; Weiss and Jespersen 2010; Duany et al. 2012) suggesting their involvement in bile salt stress resistance.

Despite the large number of studies carried out for elucidating the adhesion ability of LAB to IECs and resistance to bile salts, their molecular mechanisms remain largely not understood. The aim of this study is to investigate the involvement of SrtA and SDPs in adhesion ability of LMD-9 to IECs and resistance to bile salts. We evaluated the bacterial adhesion ability to different IECs: Caco-2 TC7, HT29-MTX, and HT29-CL.16E. Caco-2 TC7 are human colorectal cell line which differentiate spontaneously in vitro culture forming a cell monolayer expressing apical and basolateral proteins as enterocytes of the small intestine (Pinto et al. 1983; Lenaerts et al. 2007). Rather than secreted mucins, Caco-2 cells express transmembrane mucins such as MUC3 and brush border-associated functional proteins whose expression have previously demonstrated at mRNA and protein level at various stages of cell differentiation (Van Klinken et al. 1996; see Liévin-Le Moal and Servin (2013) for comprehensive review on differentiated human colon cell lines properties). IECs in the GIT are covered by a double layer of mucus which is composed mainly by glycoproteins named mucins. In order to elucidate the interaction of LMD-9 strain with mucus, we also used HT29-MTX and HT29-CL.16E cells which differentiate into goblet cells in vitro and produce a high amount of mucus. HT29-MTX secretes different mucins including MUC5AC, predominantly produced in the stomach, and the intestinal mucin MUC2 which is secreted in a very low level (Lesuffleur et al. 1990). This is the reason why we have also used HT29-CL.16E cells secreting mainly MUC2 mucin which is predominantly expressed in the large intestine (Augeron and Laboisse 1984; Jarry et al. 1994; Velcich et al. 1995). In order to determine the role of SrtA and SDPs of LMD-9 in the adhesion and the bile salts resistance, three isogenic mutants derived from this strain were studied for their adhesion ability to IECs and resistance to conjugate and deconjugate bile salts mixture. These mutants are inactivated in the protease gene *prtS* (*prtS*[−]), the mucus binding protein gene *mucBP* (*mucBP*[−]) and the sortase A gene *srtA* (*srtA*[−]).

Material and methods

Bacterial strains and culture conditions

ST strain LMD-9 (ATCC® BAA-491™; GenBank accession: CP000419), originally isolated from yogurt, was used in this study (Makarova et al. 2006). Three isogenic mutants, *prtS*[−] (Lecomte et al. 2014), *srtA*[−], and *mucBP*[−] (this study), derived from LMD-9 were also used. *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) (ATCC® 53103™; NCBI Reference Sequence: NC_013198), kindly provided from Valio Ltd. Finland, was included as a positive control (Laparra and Sanz 2009). ST strains were conserved at −20 °C in reconstituted skim milk (10 %, w/v) and routinely grown

at 42 °C without shaking in M17 medium supplemented with 2 % (w/v) of lactose (LM17; Terzaghi and Sandine, 1975). Erythromycin (Sigma) at 5 µg mL^{−1} was added to LM17 medium for mutant selection. LGG strain was routinely cultivated in de Man Rogosa and Sharpe (MRS; Sigma Aldrich®) medium at 37 °C without shaking and conserved in this medium with 20 % (w/v) of glycerol (Sigma) at −20 °C. All cultures were grown for 12 h (stationary phase) before to be used in bile salts survival and adhesion experiments.

Construction of *mucBP* mutant

A mutation in the gene *STER_0576* (new locus tag *STER_RS02840*, NCBI-GI: 500000151) encoding MucBP protein was performed by replacing this gene by an erythromycin resistance gene. The LMD-9 *mucBP*[−] mutant was constructed according to the method described previously by Hafeez et al. (2013) and Lecomte et al. (2014). Briefly, LMD-9 strain was cultured overnight in LM17 medium. Genomic DNA of LMD-9 strain, extracted according to Green and Sambrook (2012), was used as a template to amplify the UP-mucBP and mucBP-Down fragments which are located upstream and downstream the *mucBP* gene, respectively. The primers used are presented in Table 1. All primers were purchased from Eurogentec (Serain, Belgium). The erythromycin resistance gene was amplified from pG+host plasmid DNA (Maguin et al., 1996) using the primer couple UpMucBP-ery_F/ Ery_R (Table 1). Polymerase chain reactions (PCRs) were performed using a Mastercycler pro thermocycler (Eppendorf, Hambourg, Germany). Amplification of each fragment was performed in 20 µL PCR reaction mixture using 0.4 U Phusion high fidelity DNA polymerase (Finnzymes, Thermo Scientific, Finland), 80 ng mL^{−1} of plasmid or 222 ng mL^{−1} of LMD-9 DNA template, 0.2 µM of each dNTPs, 0.5 µM of each primer, and 4 µL of ×5 Phusion HF buffer. Cycling conditions were 1 min at 98 °C, 30 cycles of three steps (20 s at 98 °C, 30 s at 52 °C, and 30 s at 72 °C), and a final extension at 72 °C for 10 min. When required, the PCR-amplified fragments were purified with the High Pure PCR purification Kit (Roche Applied Science, Meylan, France). Overlapping PCR was carried out to bind the different fragments (UP-mucBP fragment, ery gene and mucBP-Down fragment) and was performed as described above. Four microliters of linear DNA fragments obtained by overlapping PCR were then introduced in LMD-9-competent cells by natural transformation as described by Hafeez et al. (2013). Transformants were selected by plating on LM17 agar containing erythromycin (5 µg mL^{−1}). The *mucBP*[−] construction was confirmed by DNA sequencing using the appropriate primers (Table 1, from Muc1_F to Muc10_R).

Table 1 Primers used for the construction of *S. thermophilus* LMD-9 *mucBP*[−] mutant

Primers	Nucleotide sequence	Purpose
UpMucBP_F	5'AAGAAAGATATTCCAGGTTACC 3'	Amplify fragment located upstream of the <i>mucBP</i> gene
UpMucBP_R	5'ATGAGTAATAACCCCTTATAAA 3'	
UpMucBP-ery_F	5'TTTATAAGGGGGTTATTACTCATGGGAGATAAGACGGTTCGTGT 3'	Amplify <i>ery</i> gene
Ery_R	5'GCAAAAGCTTCATCGATGATAG 3'	
DnMucBP_F	5'CTATCATCGATGAAGCTTTTGCTCTTTCTAATTGATACGATTTG 3'	Amplify fragment located downstream of the <i>mucBP</i> gene
DnMucBP_R	5'TTATAGTTATTTACAACCACTAAAG 3'	
Muc1_F	5'GATAAAGATGGTAACGAAATTCC 3'	Sequencing of the construction
Muc2_R	5' TAGCAGCACTTGGACTTTTTG 3'	
Muc3_F	5' CTTCAAAAATGTTGAAATGCCG 3'	
Muc4_R	5'TAGGAATTGAAGTTAAATTAGATG 3'	
Muc5_F	5'AAAGAATGGCGGAAACGTAAAA 3'	
Muc6_R	5' TTAAGTACCGTTACTTATGAGC 3'	
Muc7_F	5'ATACGTACTTTGTTTCAAAATGG 3'	
Muc8_R	5'TGGAAATTAGTATTCTAAGTAGC 3'	
Muc9_F	5'CTGAAAATTGAATTCTTAATTATTA 3'	
Muc10_R	5'CAATGAATTTACGGCAGCCA 5'	

Sequences in italic are homologous

Epithelial cell lines and culture conditions

Three different cell lines were used in this study. The Caco-2 TC7 cells were obtained from Pr. Isabelle Chevalot (UMR 7274, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, Nancy). The HT29-MTX mucus secreting cells were kindly provided by Dr. Thécia Lesuffleur (INSERM UMR S 938, Paris, France) (Lesuffleur et al. 1990). The HT29-CL.16E cells were obtained from Ephyscience, Nantes, France (Augeron and Laboisse 1984). All cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's Minimal Essential Medium with 4.5 g/L glucose (DMEM Glutamax, Fisher Scientific). For HT-29 cell lines, DMEM medium was supplemented with 10 % (v/v) of heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Gibco®) and 1 % (v/v) of penicillin–streptomycin (5,000 U/mL penicillin and 5,000 µg/mL streptomycin, Gibco®); whereas for Caco-2 TC7, in addition of antibiotics, DMEM medium was supplemented with 20 % (v/v) FCS and 1 % (v/v) non-essential amino acid ×100 (Gibco®). All cells were conserved in DMEM medium supplemented with FCS and 10 % glycerol at -80 °C. After thawing, cells were firstly seeded in plastic flasks (75 cm², Dutscher). After 4 days of culture, cells were trypsinized with 0.05 % trypsin-EDTA ×1 (Gibco®) and centrifuged at 470×g for 5 min at 37 °C. According to the cell lines, cells were re-suspended in appropriate DMEM medium and they were seeded in cell culture inserts with polycarbonate membranes (pore size 0.4 µm, effective area 4.2 cm², Millipore) in six-well culture plates (Dominique DUTSCHER) at a density of 6 × 10⁴, 2.4 × 10⁴, or 4 × 10⁴ cells cm^{−2} for Caco-2 TC7, HT29-MTX, and HT29-CL.16E, respectively. The differentiated cell monolayers were obtained between 21 and 25 days

post-seeding. The integrity of the cell monolayer for each cell line was checked under culture conditions by measuring the Trans Epithelial Electrical Resistance (TEER) with a Millicell-ERS Ohm Meter (Millipore). (Tight-cell monolayer and cell polarization are taking into account by TEER measurement ranging between 800 and 1,200 ohm cm² for mucus-secreting cells and between 400 and 500 ohm cm² for Caco-2 TC7 cells). The TEER measurement were performed twice a week during the cell culture, just before adding bacterial cells, and after 2 h of incubation with bacterial cells. Two days before the adhesion experiments, antibiotics were no longer used in the cell cultivation media. All cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 10 % CO₂ and the culture medium was changed every day.

Adhesion assay

Adhesion experiments were performed according to the method described previously by Turpin et al. (2012) with the following modifications. Briefly, bacterial cells from 12 h cultures grown at 42 °C for ST strains and at 37 °C for LGG strain were centrifuged for 15 min at 1,878×g and 37 °C. The pellets were washed once with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Fisher Scientific) and re-suspended in DMEM without antibiotics at a final concentration of 10⁹ or 10¹⁰ CFU mL^{−1} for ST strains (OD_{600nm} of about 12) and LGG strain (OD_{650nm} of about 90), respectively. The initial number of viable bacterial cells in bacterial suspension was determined by plating on LM17 agar for ST strains and MRS agar for LGG strain. Before adhesion assay, the different cell monolayers were washed gently with sterile HBSS and 2 mL

per well of bacterial suspension was added to confluent cell monolayers at a final concentration of 10^9 or 10^{10} CFU mL⁻¹ for ST strains and LGG, respectively, to have bacterial cell to epithelial cell ratio of 1,000:1. The bacterial cells on the cell monolayers were incubated for 2 h at 37 °C in a humidified atmosphere with 10 % CO₂. After incubation, the supernatants from each well were recovered and the cell monolayers were washed four times with HBSS to obtain non-adherent bacterial suspensions. Cell monolayers were scraped with 0.1 % (v/v) Triton® X-100 (Sigma), and passed three times through a 21×g needle and then incubated for 30 min at room temperature. The number of adherent bacterial cells from the cell pellet and non-adherent bacterial cells from the supernatants and washing solutions were determined by plating serial dilutions on LM17 agar or MRS agar plates and colonies were counted by visual counting after 24–48 h of incubation in anaerobic conditions (AnaeroGen, Oxoid, Basingstoke, UK). Negative controls without bacteria and bacteria without cells were used throughout the experiment. At least two independent experiments were performed in triplicate.

Bile salts survival assay

Resistance to bile salts was assessed by investigating the survival ability of strains in the presence of different bile salts concentrations. This experiment was performed according to the method described previously by Iyer et al. (2010) with some modifications. Bacterial cells suspensions from 12 h cultures (stationary phase) grown at 42 °C for ST strains and at 37 °C for LGG strain were centrifuged for 15 min at 1,878×g and 37 °C. The pellets were washed once with HBSS and re-suspended in LM17 for ST or MRS for LGG strain at a final concentration of 10^9 CFU mL⁻¹. An equimolar bile salts mixture (BSM) containing sodium taurocholate, sodium cholate, and sodium deoxycholate (Sigma Aldrich®) was used in this study. BSM was added to the bacterial suspensions at different concentrations (0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, and 10 mM). All bacterial suspensions exposed or not to different BSM concentrations were incubated for 2 h at 37 °C without shaking. The total bacterial cells counts were determined by plating serial dilutions on LM17 agar for ST strains or MRS agar for LGG strain. Plate dishes were then incubated 24 h at 42 °C for ST strains and 48 h at 37 °C for LGG strain in anaerobic conditions. The results were expressed as Log₁₀ CFU mL⁻¹ of viable bacterial cells. At least three independent experiments were carried out for each strain.

Statistical analysis

Experimental data were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's test. For the bacterial adhesion, the comparison was performed between LMD-9 and mutant strains. For the bile salts survival data, we

compared different bile salts concentrations for each strain. R 3.1.2 software was used for the statistical analysis. Results were expressed as means ± SEM. Differences were considered statistically significant when *P* value <0.05.

Results

Bacterial adhesion to IECs in vitro

The adhesion ability of the LMD-9 strain was evaluated using three different IECs in vitro, Caco-2 TC7, HT29-MTX and HT29-CL.16E. Moreover, the effect of mutations in genes encoding PrtS, MucBP and SrtA proteins on the adhesive properties of LMD-9 was also investigated. Bacterial cell growth curves of mutants compared to wild type (WT) strain LMD-9 in LM17 medium were initially investigated and no difference was observed between all strains (data not shown). Before adhesion assay, the survival of all strains in DMEM (10 % or 20 % FCS, v/v) medium in presence or not of 0.1 % (v/v) Triton® X-100 was performed, and no effect was observed for all strains (data not shown). All adhesion results were presented as a relative adherence calculated from the number of adhering bacteria counted per cell compared with that of WT strain which was standardized to 100 %. In all adhesion assays, LGG strain was used as a positive control. At least two independent experiments were performed with each strain in triplicate.

Bacterial adhesion to HT29-MTX cells

HT29-MTX cells exhibit in vitro differentiated goblet cell-like phenotype after adaptation to methotrexate; thereby, they secrete high amounts of mucus mainly composed of MUC5AC mucins (Lesuffleur et al. 1990). We evaluated the adhesion capacity of mutants and the WT strain to this cell line. Figure 1 shows that none of the mutants exhibited significant differences in adhesion ability as compared with WT strain (bacterial adhesion rate ranging from 80 to 100 %, *P*>0.05). These results indicated that the deficiency of PrtS, MucBP, and SrtA proteins in LMD-9 strain has no effect on adherence ability to mucus secreting cells HT29-MTX in vitro.

Bacterial adhesion to HT29-CL.16E cells

HT29-CL.16E cells are derived from the human colonic cancer HT29. After sodium butyrate adaptation, they have acquired the ability to differentiate into polarized goblet cells and secrete massive amounts of mucus mainly composed with MUC2 mucins (Augeron and Labois 1984; Jarry et al. 1994; Velcich et al. 1995). This cell line is widely used for studying the regulation of mucins secretory processes and mucin structures (Freitas and Cayuela 2000). To our knowledge, it is

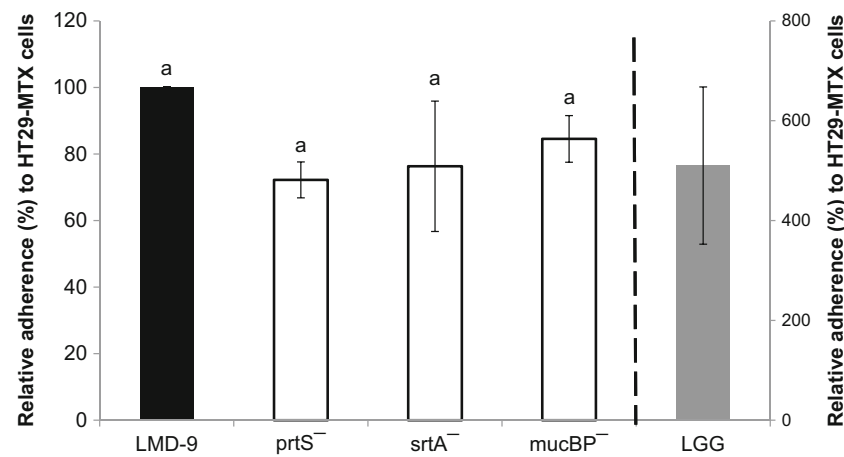


Fig. 1 Adhesion of *S. thermophilus* LMD-9 strain (black bar) and its derivative mutants *prtS*⁻, *mucBP*⁻, and *srtA*⁻ (white bars) to HT29-MTX cell line. *L. rhamnosus* GG (LGG) strain was used as a positive control (deep gray bar). The results were presented as a relative adherence calculated from the number of adhering bacteria counted as colony-forming unit per HT29-MTX cell of mutant strains compared to WT

strain LMD-9 which were standardized to 100 %. Data represent means $\pm$ SEM from at least two independent experiments performed with each strain in triplicate ($n = 2 \times 3$). Statistical analyses were performed with *S. thermophilus* strains without LGG. Means $\pm$ SEM with lower-case letter (a) indicate no significant differences ($P > 0.05$)

rarely used in the bacterial adhesion study. Figure 2 shows the adhesion profile of bacterial strains to HT29-CL.16E cells. Among mutant strains, only *mucBP*⁻ showed a significant decrease in adhesion capacity to HT29-CL.16E cells ($P < 0.05$) compared to WT strain (46 ± 6 % versus 100 %). These results revealed that the deficiency of SrtA and PrtS proteins, but not MucBP protein, has no effect on adhesion capacity of LMD-9 to HT29-CL.16E cells in vitro.

Bacterial adhesion to Caco-2 TC7 cells

Unlike the other two cell lines, Caco-2 TC7 are human colorectal cell line that lack mucus secretion. However, it

expresses transmembrane mucins such as MUC3 and other cell surface proteins found in enterocytes of small intestine (Pinto et al. 1983; Lenaerts et al. 2007). Figure 3 shows a significant decrease in adhesion ability of *srtA*⁻ and *mucBP*⁻ mutants to Caco-2 TC7 cells compared to the WT strain (13 ± 3 and 33 ± 3 %, respectively, versus 100 %, $P < 0.05$). Unexpectedly, a bacterial adhesion rate of *prtS*⁻ mutant to Caco-2 TC7 cells was twofold higher than the WT strain (225 ± 19 versus 100 %). These results indicated that the deficiency of SrtA and MucBP proteins in LMD-9 strain has an impact on its adherence ability to Caco-2 TC7 cells in vitro. In contrast, the deficiency of PrtS favors its adherence capacity to this cell line.

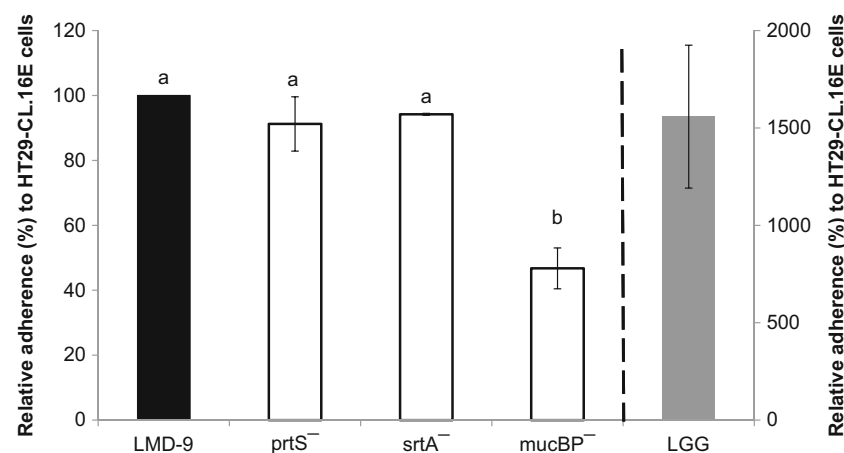


Fig. 2 Adhesion of *S. thermophilus* LMD-9 strain (black bar) and its derivative mutants *prtS*⁻, *mucBP*⁻, and *srtA*⁻ (white bars) to HT29-CL.16E cell line. *L. rhamnosus* GG (LGG) strain was used as a positive control (deep gray bar). The results were presented as a relative adherence calculated from the number of adhering bacteria counted as colony-forming unit per HT29-CL.16E cell of mutant strains compared to

WT strain LMD-9 which were standardized to 100 %. For each strain, data represent means $\pm$ SEM from at least two independent experiments performed with each strain in triplicate ($n = 2 \times 3$). Statistical analyses were performed with *S. thermophilus* strains without LGG. Two means with different lower-case letters (a and b) are significantly different ($P < 0.05$)

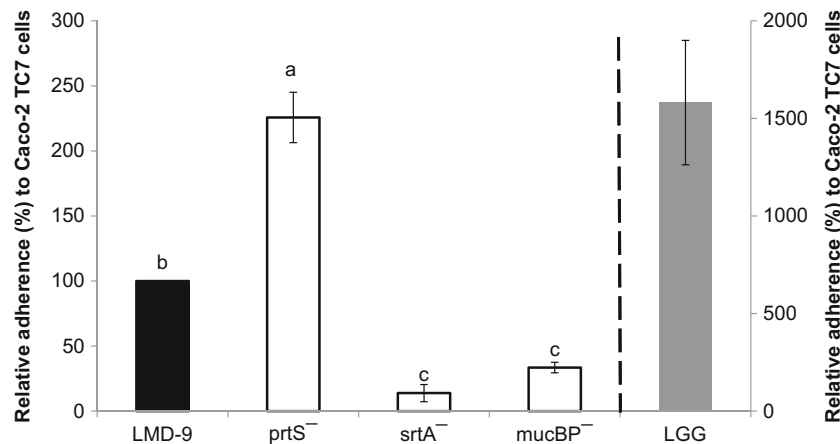


Fig. 3 Adhesion of *S. thermophilus* LMD-9 strain (black bar) and its derivative mutants *prtS*⁻, *mucBP*⁻, and *srtA*⁻ (white bars) to Caco-TC7 cell line. *L. rhamnosus* GG (LGG) strain was used as a positive control (deep gray bar). The results were presented as a relative adherence calculated from the number of adhering bacteria counted as colony-forming unit per Caco-2 cell of mutant strains compared to WT strain

LMD-9 which were standardized to 100 %. For each strain, data represent means $\pm$ SEM from at least two independent experiments performed with each strain in triplicate ($n=2 \times 3$). Statistical analyses were performed with *S. thermophilus* strains without LGG which was used as a positive control for adhesion. Two means with different lower-case letters (a to c) are significantly different ($P < 0.05$)

Effect of bile salts mixture on viability of ST LMD-9 strain

Bile is an aqueous solution mainly composed with bile salts synthesized in the liver from the cholesterol. The physiological concentration of bile salts is variable and depends on different factors including the diet (rich or low-fat diet) and bile salt types (conjugate/free bile salts, degree of hydroxylation). Under normal physiological conditions, the bile salts are concentrated and stored in the gallbladder and when excreted in the intestine, the concentration can range from less than 1 up to 40 mM (see Bajor et al. (2010), Ruiz et al. (2013), and Moghimipour et al. (2015) for comprehensive review on bile salts excretion mechanisms and concentrations in different GIT compartments). In our study, the effect of BSM on viability of LMD-9 strain and the three isogenic mutants was evaluated after 2 h of exposure to different BSM concentrations. On one hand, no difference in survival of mutants and WT strain was observed between the negative control (0 mM) and the various concentrations ranging between 0.25 and 1.5 mM (data not shown). On the other hand, no viable bacterium was detected at higher concentrations than 3 mM after 2 h BSM exposure with the WT LMD-9 strain and its derivative mutants. Figure 4 shows the survival of ST strains and LGG strain as expressed by the number of viable bacterial population after BSM exposure. Depending on strains and BSM concentrations, bacterial population level after bile salts exposure varied considerably between the tested strains.

Overall, in the presence of BSM at different concentrations, our positive control LGG strain showed the highest viability even at 5 mM (data not shown). For LMD-9 strains, in the presence of 2 mM BSM, a significant log reduction compared to negative control (0 mM) was observed for WT and mutant strains ($P < 0.05$; Fig. 4). Furthermore, an exposure to 3 mM

BSM decreased significantly the bacterial population level for WT and mutant strains ($P < 0.05$). At this concentration, WT and *srtA*⁻ mutant strains showed a 5-log decrease in viability ($P < 0.05$; Fig. 4). However, a significant log reduction in viability ($P < 0.05$) was observed with the two other mutants *mucBP*⁻ and *prtS*⁻ with which no viable bacterial cells were detected. These results demonstrated that LMD-9 strain is resistant to bile salts up to 3 mM and cell surface proteins PrtS and MucBP might play a key role in bile salts resistance in this strain.

Discussion

ST is widely used in the manufacture of dairy products for its milk acidification ability and flavor producing characteristics. Among dairy products, yogurt (manufactured by the combination of ST and *Lb. bulgaricus*) has obtained a health claim from EFSA for its capability to improve the lactose digestion in lactose intolerant individuals (EFSA 2010). In addition, several beneficial effects exerted by ST in the host have already been reported (Naidu et al. 1999; Pagnini et al. 2010; Savaiano 2014). This implies that other studies are needed to decipher the mechanisms of interaction of this bacterium with the intestinal mucosa and its survival in the GIT stress conditions.

A previous study has investigated the survival of thirty strains of various food origins to bile salts, as well as their adhesion capacity to HT29-MTX cells, and has reported that LMD-9 strain exhibited moderate resistant to bile salts and adhesion capacity (Junjua M., personal communication). Bile salts toxicity on bacteria cells depends on their type, structure and concentrations. It has been shown that conjugated bile acids are less inhibitory than free bile acids (cholate and deoxycholate) toward intestinal bacteria (Floch et al.

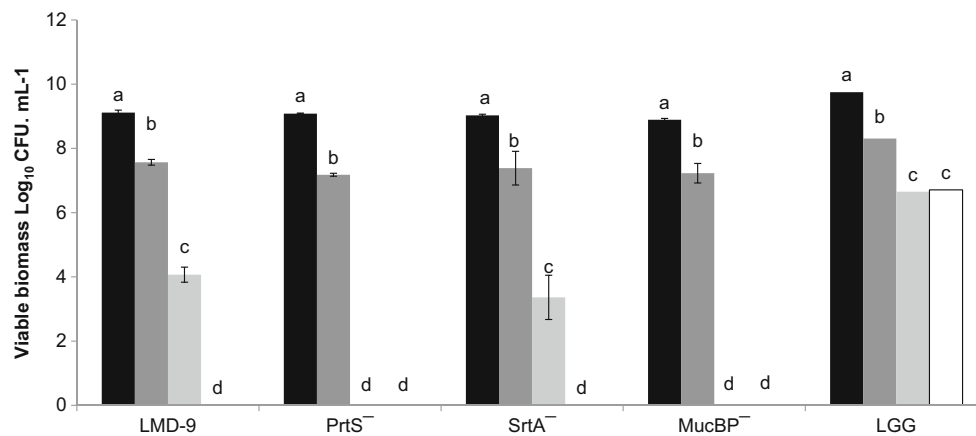


Fig. 4 Effect of different BSM concentrations 0 (black bar), 2 (deep gray bar), 3 (light gray bar), and 4 mM (white bar) on viability of strains *S. thermophilus* LMD-9 and its derivative mutants *prtS*⁻, *srtA*⁻, *mucBP*⁻, and *L. rhamnosus* GG (LGG) which were used as a positive

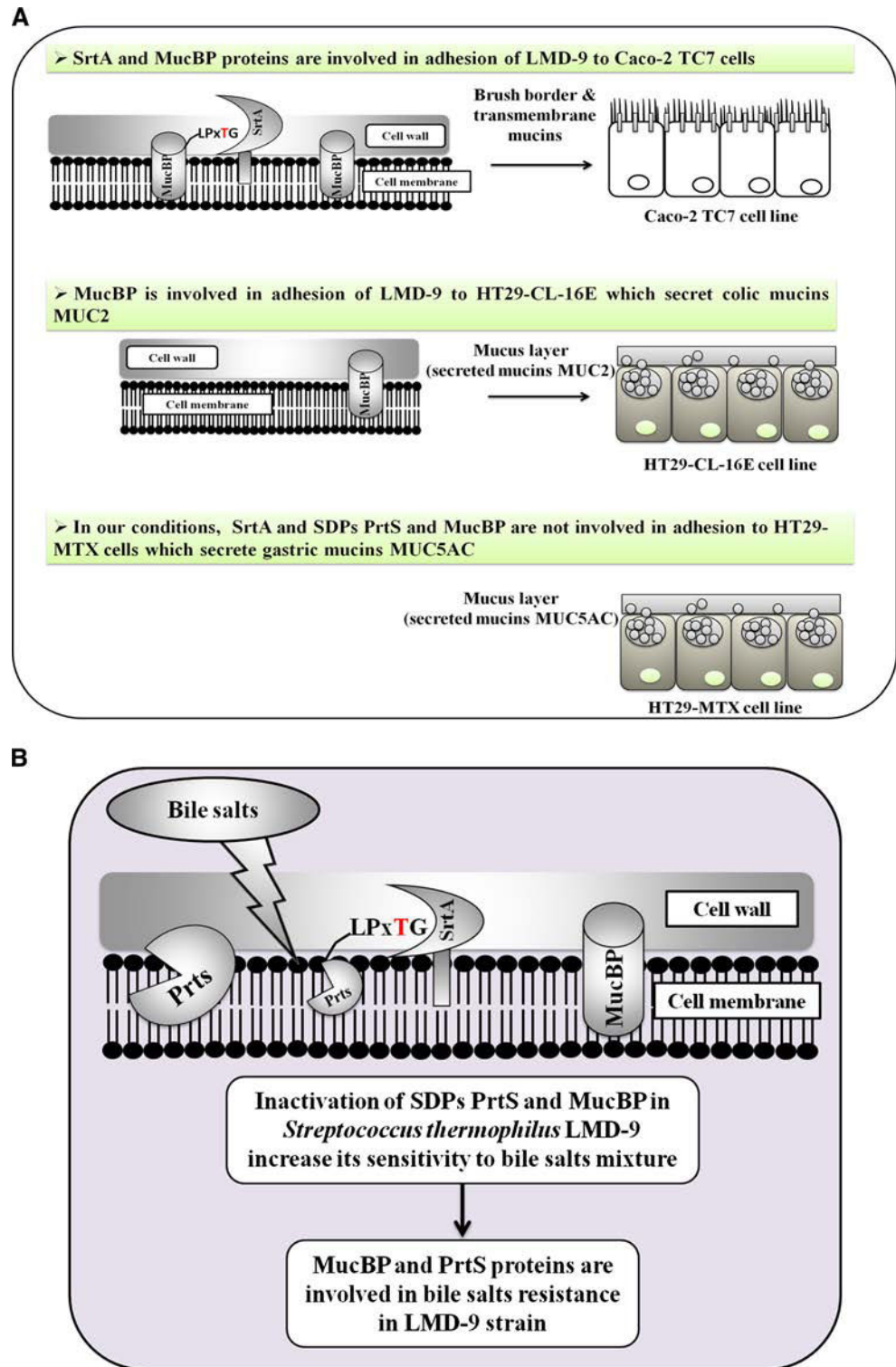
control. Data represent means $\pm$ SEM from at least three independent experiments ($n=3$) expressed by $\log_{10}$ CFU mL^{-1} viable bacterial population level as determined by plate count. Means with different lower-case letters (a to d) are significantly different ($P < 0.05$)

1972; Taranto et al. 2006; Bustos et al. 2011). As the exact composition of bile extract is not well known, we preferred in our study to use a BSM containing three different bile salts including taurine-conjugated bile salts (taurocholate) and unconjugated bile salts (cholate and deoxycholate). Hence, the present study was conducted to evaluate the ST LMD-9 strain and its derivative mutants (*prtS*⁻, *srtA*⁻, *mucBP*⁻) capacity to adhere to IECs and resistance to bile salts in vitro. All the results obtained are schematically summarized in Fig. 5. Our results showed that the WT LMD-9 strain survived up to 3 mM BSM. Based on the other studies, ST appears to be either very sensible or resistant to bile salts depending on strains, experimental conditions and bile salts used (Vinderola and Reinheimer 2003; Iyer et al. 2010; Ziar et al. 2014). Furthermore, the survival of ST LMD-9 strain was improved when cultivated in fermented milk and passed through a dynamic gastro-intestinal model TIM (TNO gastro-intestinal tract model) (Uriot et al. 2015). In addition, this bacterium was found in humans faeces after yogurt consumption (Elli et al. 2006). Similarly, Qin et al. (2010) have demonstrated by metagenomic study the presence of ST DNA in faecal samples of more than 90 % of the European individual tested (Qin et al. 2010). All these data indicate that the food matrix such as milk, with its buffering effect, could protect the bacteria against gastric acid and bile salts stresses. Conversely, we showed that the inactivation of PrtS and MucBP proteins affects the LMD-9 survival at 3 mM BSM. It should be noted that bile salts target the bacterial membrane for its lipophilic character disturbing the bacterial envelopes (Taranto et al. 2006). According to our results, one could, therefore, hypothesize that the absence of SDP at the cell surface could increase cell membrane permeabilization of LMD-9 strain to bile salts. Moreover, transcriptomic studies have reported in lactobacilli that *mucBP* gene and other genes encoding cell surface proteins were significantly upregulated after bile salt exposure

(Pfeiler et al. 2007; Weiss and Jespersen 2010; Duany et al. 2012). In the case of *srtA*⁻ mutant, no difference was observed in survival to bile salts compared to the WT strain (at 3 mM BSM). This is consistent with previous observations in some lactobacilli where sortase deficiency did not alter survival in simulated GIT juices (Remus et al. 2013; Call et al. 2015). To the best of our knowledge, ST LMD-9 encodes, in addition to the two SDPs, PrtS and MucBP proteins, a third SDPs called cyclo-nucleotide phosphodiesterase (CpdB; Goh et al. 2011). Our results could be explained by the fact that even if SrtA is absent, the SDPs PrtS, MucBP, and CpdB could remain attached to the cell wall by electrostatic interactions suggesting that SDPs remain still functional on the cell surface (Dandoy et al. 2011; Muñoz-Provencio et al. 2012). Based on all these data, the cell surface proteins could withstand against deleterious effects of bile salts by maintaining the cell membrane architecture and integrity in LMD-9 strain (see Begley et al. (2005) and Ruiz et al. (2013) for comprehensive review on bile salts resistance mechanisms). Bile salt resistance mechanisms in ST are not fully understood. To our knowledge, there are only few studies that have reported that an EPS thickness protect ST strains against bile salts (Mozzi et al. 2009; Boke et al. 2010). It should be noted that EPS production depends on strain and culture conditions (Boke et al. 2010; Zhang et al. 2014). Furthermore, transcriptomics and proteomic studies in LGG strain have shown a decrease in EPS biosynthesis enzymes after bile salt exposure (Koskeniemi et al., 2011). Hence, the effect of bile salt exposure on the EPS layers composition and properties in ST still remains to be determined.

We further focus on studying the adhesion capacity of LMD-9 strain and its derivative mutants to different IECs. Most of the bacterial adhesion studies are usually performed using in vitro models such as Caco-2, HT-29, or HT29-MTX cells; and to the best of our knowledge, this study is the first to use the HT29-CL.16E cells for studying the bacterial adhesion of LAB. We

Fig. 5 Schematic illustration of the involvement of SDPs in adhesion of LMD-9 strain to different IECs (a) and bile salts stress resistance (b). **a** Schematic illustration summarizing the results of adhesion study to various cell lines. **b** Schematic illustration summarizing the results of bile salts resistance study



have determined the impact of SrtA and SDPs deficiency on the in vitro adhesion ability of LMD-9 strain. The results showed that LMD-9 was able to adhere to different IECs in vitro. Regarding isogenic mutant strains, they showed different adhesion profiles especially between Caco-2 TC7 and mucus-secreting cell lines. In our conditions, the adhesion ability to

Caco-2 TC7 cells was significantly reduced in *srtA*⁻ and *mucBP*⁻ mutants compared to WT strain. This finding is consistent with that obtained in *Lb. salivarius* UCC118, *Lb. casei* BL23, and *Lb. reuteri* strains where the absence of sortase significantly reduced the adherence to Caco-2 cells (van Pijkeren et al. 2006; Muñoz-Provencio et al. 2012; Jensen et al. 2014).

Contrariwise, the *srtA* mutation did not affect the adhesion ability of LMD-9 strain to mucus secreting cells HT29-MTX and HT29-CL.16E. Firstly, these results suggest that the presence of mucus could favor the attachment of bacteria to the cells. Secondly, in the absence of SrtA, SDPs (PrtS, MucBP, and CpdB) remain probably attached to the cell membrane through their C-terminal hydrophobic domain (Dandoy et al. 2011; Muñoz-Provencio et al. 2012). This could explain the high adhesion capacity of *srtA*[−] mutant strain to mucus secreting cells but not with Caco-2 cells which lack mucus layers.

Results obtained with HT29-CL.16E cells showed a significant decrease in adhesion ability only with *mucBP*[−] mutant compared to WT strain. As mentioned above, this decrease was also observed with Caco-2 TC7 cells. This is interesting since MucBP protein contain a MUB domain which may interact with intestinal mucus (Boekhorst et al. 2006; Goh et al. 2011). It has been reported in *Lb. reuteri* that MucBP protein binds to mucus components in vitro (Roos and Jonsson 2002; MacKenzie et al. 2010). Furthermore, Lukić et al. (2012) showed that mucus-binding protein (MbpL) in *Lc. lactis* is involved in adhesion to HT29-MTX cells and pig gastric mucins, and they have been speculated that this protein could have an affinity to MUC5AC mucins which is predominantly produced by HT29-MTX cells. In our conditions, MucBP protein in LMD-9, which shares 29 % identity with MucBP of *Lc. lactis* subsp. *Lactis* BGKPI strain (revealed by BLASTP searches), seems to have more affinity to secreted mucins MUC2 and with transmembrane mucins which is predominantly expressed by HT29-CL.16E and Caco-2 TC7, respectively. This could explain the decrease in adhesion ability of *mucBP*[−] mutant to these cells.

In the present study, we have also investigated the involvement of the proteinase PrtS in LMD-9 adhesion to IECs. Unexpectedly, the deficiency of proteinase PrtS did not impact the adhesion capacity of LMD-9 strain to all IECs tested. According to the study of Delorme et al. (2010), the gene encoding PrtS was probably acquired by HGT. As previously mentioned, the primary role of PrtS is involved in the milk casein hydrolysis. This function is related to its dairy adaptation. It should be noted that in pathogenic streptococci, cell envelope proteinases are involved in adhesion to mucosal surfaces and virulence (Moschioni et al. 2010; Hu et al. 2010; Bonifait et al. 2010). The PrtS protein would have lost its adhesion and virulence properties which corroborate the food-grade and safe status of ST (Goh et al. 2011). Furthermore, the absence of PrtS could be compensating by the presence of the two other SDPs MucBP and CpdB which might explain our results for PrtS deficiency adhesion profile to mucus-secreting cells. Moreover, surprisingly, the PrtS deficiency improves the LMD-9 adhesion ability to Caco-2 TC7 cells. This could be explained by the fact that the PrtS proteolytic activity could be unfavorable to the adhesion to cell surface component such as brush-border proteins of Caco-2 cells.

Overall, the adhesion capacity of LMD-9 strain appears to depend not only on surface proteins but probably on other bacterial surface compounds such as teichoic acids and/or lipoteichoic acids and EPS. In addition, eukaryotic-cell surface components seem to be important in bacteria-host cell interactions.

In conclusion, LMD-9 strain was resistant to bile salts up to 3 mM and it was able to adhere to different IECs tested in vitro. In addition, we identified SDPs which could play a key role in bile salts resistance and adhesion to mucosal surfaces in ST. Thus, this strain could be a good candidate for further investigations to well elucidate its use as a probiotic and a functional ingredient in dairy products.

Acknowledgments We thank Zeeshan Hafeez for the critical reading of the manuscript. Mounira Kebouchi is the recipient of a Ph.D. fellowship from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche.”

Compliance with Ethical Standards This article does not involve experiments on humans or animals.

Conflict of interests The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Augeron C, Laboisse CL (1984) Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res* 44:3961–3969
- Bajor A, Gillberg PG, Abrahamsson H (2010) Bile acids: short and long term effects in the intestine. *Scand J Gastroenterol* 45:645–664
- Begley M, Gahan CGM, Hill C (2005) The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev* 29:625–651
- Boekhorst J, Helmer Q, Kleerebezem M, Siezen RJ (2006) Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiol Read Engl* 152:273–280
- Boke H, Aslim B, Alp G (2010) The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPSS) produced by yogurt starter bacteria. *Arch Biol Sci* 62:323–e328
- Bolotin A, Quinquis B, Renault P, Sorokin A, Ehrlich SD, Kulakauskas S, Lapidus A, Goltsman E, Mazur M, Pusch GD, Fonstein M, Overbeek R, Kyprides N, Purnelle B, Prozzi D, Ngui K, Mausy D, Hancy F, Burteau S, Boutry M, Delcour J, Goffeau A, Hols P et al (2004) Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat Biotechnol* 22: 1554–1558
- Bonifait L, de la Cruz Dominguez-Punaro M, Vaillancourt K, Bart C, Slater J, Frenette M, Gottschalk M, Grenier D (2010) The cell envelope subtilisin-like proteinase is a virulence determinant for *Streptococcus suis*. *BMC Microbiol* 10:42
- Brigidi P, Swennen E, Vitali B, Rossi M, Matteuzzi D (2003) PCR detection of Bifidobacterium strains and *Streptococcus thermophilus* in feces of human subjects after oral bacteriotherapy and yogurt consumption. *Int J Food Microbiol* 81:203–209
- Buck BL, Altermann E, Svingerud T, Klaenhammer TR (2005) Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol* 71:8344–8351

- Bustos AY, Raya R, de Valdez GF, Taranto MP (2011) Efflux of bile acids in *Lactobacillus reuteri* is mediated by ATP. *Biotechnol Lett* 33: 2265–2269
- Call EK, Klaenhammer TR (2013) Relevance and application of sortase and sortase-dependent proteins in lactic acid bacteria. *Front Microbiol* 4:73
- Call EK, Goh YJ, Selle K, Klaenhammer TR, O'Flaherty S (2015) Sortase-deficient lactobacilli: effect on immunomodulation and gut retention. *Microbiol Read Engl* 161:311–321
- Couvigny B, Th  rial C, Gautier C, Renault P, Briand  t R, Guédon E (2015) *Streptococcus thermophilus* biofilm formation: a remnant trait of ancestral commensal life? *PLoS ONE* 10(6):e0128099. doi: 10.1371/journal.pone.0128099
- Dandoy D, Fremaux C, Henry de Frahan M, Horv  th P, Boyaval P, Hols P, Fontaine L (2011) The fast milk acidifying phenotype of *Streptococcus thermophilus* can be acquired by natural transformation of the genomic island encoding the cell-envelope proteinase PrtS. *Microb Cell Factories* 10:S21
- Delorme C, Bartholini C, Bolotine A, Ehrlich SD, Renault P (2010) Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population. *Appl Environ Microbiol* 76:451–460
- Duary RK, Batish VK, Grover S (2012) Relative gene expression of bile salt hydrolase and surface proteins in two putative indigenous *Lactobacillus plantarum* strains under in vitro gut conditions. *Mol Biol Rep* 39:2541–2552
- EFSA 2010 <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/doc/1763.pdf>
- Elli M, Callegari ML, Ferrari S, Bessi E, Cattivelli D, Soldi S, Morelli L, Goupil Feuillerat N, Antoine JM (2006) Survival of yogurt bacteria in the human gut. *Appl Environ Microbiol* 72:5113–5117
- FDA (2002) “GRN No.49 Bifidobacterium lactis strain Bb12 and Streptococcus thermophilus strain Th4 ” GRAS Notice inventory.
- FDA (2012) “GRN No.378 Cultured [dairy sources, sugars, wheat, malt, and fruit- and vegetable based sources] fermented by [*Streptococcus thermophilus*, *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* or mixtures of these strains] ” GRAS Notice Inventory.
- Fernandez-Espla MD, Garault P, Monnet V, Rul F (2000) *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microbiol* 66:4772–4778
- Floch MH, Binder HJ, Filburn B, Gershengoren W (1972) The effect of bile acids on intestinal microflora. *Am J Clin Nutr* 25:1418–1426
- Freitas M, Cayuela C (2000) Microbial modulation of host intestinal glycosylation patterns. *Microb Ecol Health Dis* 12. doi:10.3402/mehd.v12i2.8066
- Goh YJ, Goin C, O'Flaherty S, Altermann E, Hutkins R (2011) Specialized adaptation of a lactic acid bacterium to the milk environment: the comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* LMD-9. *Microb Cell Fact* 10(Suppl 1):S22. doi:10.1186/1475-2859-10-S1-S22
- Green MR, Sambrook J (2012) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y
- Habimana O, Le Goff C, Juillard V, Bellon-Fontaine MN, Buist G, Kulakauskas S, Briand  t R (2007) Positive role of cell wall anchored proteinase PrtP in adhesion of lactococci. *BMC Microbiol* 7:36
- Hafeez Z, Cakir-Kiefer C, Girardet JM, Jardin J, Perrin C, Dary A, Miclo L (2013) Hydrolysis of milk-derived bioactive peptides by cell-associated extracellular peptidases of *Streptococcus thermophilus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:9787–9799
- Hols P, Hancy F, Fontaine L, Grossiord B, Prozzi D, Leblond-Bourget N, Decaris B, Bolotin A, Delorme C, Ehrlich SD, Guédon E, Monnet V RP, Kleerebezem M (2005) New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev* 29:435–463
- Hu Q, Liu P, Yu Z, Zhao G, Li J, Teng L, Zhou M, Bei W, Chen H, Jin M (2010) Identification of a cell wall-associated subtilisin-like serine protease involved in the pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microb Pathog* 48:103–109
- Iyer R, Tomar SK, Kapila S, Mani J, Singh R (2010) Probiotic properties of folate producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Food Res Int* 43:103–110
- Jarry A, Merlin D, Velcich A, Hopfer U, Augenlicht LH, Labois   CL (1994) Interferon-gamma modulates cAMP-induced mucin exocytosis without affecting mucin gene expression in a human colonic goblet cell line. *Eur J Pharmacol* 267:95–103
- Jensen H, Roos S, Jonsson H, Rud I, Grimmer S, van Pijkeren JP, Britton RA, Axelsson L (2014) Role of *Lactobacillus reuteri* cell and mucus-binding protein A (CmbA) in adhesion to intestinal epithelial cells and mucus in vitro. *Microbiol Read Engl* 160:671–681
- Juge N (2012) Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends Microbiol* 2:30–39
- Kolling GL, Wu M, Warren CA, Durmaz E, Klaenhammer TR, Guerrant RL (2012) Lactic acid production by *Streptococcus thermophilus* alters *Clostridium difficile* infection and in vitro Toxin A production. *Gut Microbes* 3:523–529
- Koskenniemi K, Laakso K, Koponen J, Kankainen M, Greco D, Auvinen P, Savijoki K, Nyman TA, Surakka A, Salusj  rvi T, Vos WM, Tynkynen S, Kalkkinen N, Varmanen P (2011) Proteomics and transcriptomics characterization of bile stress response in probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Mol Cell Proteomics MCP* 10: M110.002741
- Lalioui L, Pellegrini E, Dramsi S, Baptista M, Bourgeois N, Doucet-Populaire F, Rusniok C, Zouine M, Glaser P, Kunst F, Poyart C, Trieu-Cuot T (2005) The SrtA Sortase of *Streptococcus agalactiae* is required for cell wall anchoring of proteins containing the LPXTG motif, for adhesion to epithelial cells, and for colonization of the mouse intestine. *Infect Immun* 73:3342–3350
- Laparra JM, Sanz Y (2009) Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett Appl Microbiol* 49:695–701
- Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ (2010) Adaptation factors of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Benef Microbes* 1:335–342
- Lecomte X, Gagnaire V, Briard-Bion V, Jardin J, Lortal S, Dary A, Genay M (2014) The naturally competent strain *Streptococcus thermophilus* LMD-9 as a new tool to anchor heterologous proteins on the cell surface. *Microb Cell Factories* 13:82
- Lenaerts K, Bouwman FG, Lamers WH, Renes J, Mariman EC (2007) Comparative proteomic analysis of cell lines and scrapings of the human intestinal epithelium. *BMC Genomics* 8:91
- Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A (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
- Liévin-Le Moal V, Servin AL (2013) Pathogenesis of human enterovirulent bacteria: lessons from cultured, fully differentiated human colon cancer cell lines. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:380–439
- Luki   J, Strahini   I, Jov  i   B, Filipi   B, Topisirovi   L, Koji   M, Begovi   J (2012) Different roles for lactococcal aggregation factor and mucin binding protein in adhesion to gastrointestinal mucosa. *Appl Environ Microbiol* 78:7993–8000
- Mackenzie DA, Jeffers F, Parker ML, Vibert-Vallet A, Bongaerts RJ, Roos S, Walter J, Juge N (2010) Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol Read Engl* 156:3368–3378
- Maguin E, Prevost H, Ehrlich SD, Gruss A (1996) Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 178:931–935

- Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee JH, Díaz-Muñiz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J, Unlu G, Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B, Mills D (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci* 103:15611–15616
- Marraffini LA, Dedent AC, Schneewind O (2006) Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:192–221
- Mater DDG, Bretigny L, Firmesse O, Flores MJ, Mogenet A, Bresson JL, Corthier G (2005) *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS Microbiol Lett* 250:185–187
- Moghimpour E, Ameri A, Handali S (2015) Absorption-enhancing effects of bile salts. *Mol Basel Switz* 20:14451–14473
- Moschioni M, Pansegrau W, Barocchi MA (2010) Adhesion determinants of the *Streptococcus* species. *Microbial Biotechnol* 3:370–388
- Mozzi F, Gerbino E, Font de Valdez G, Torino MI (2009) Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in an in vitro gastric system. *J Appl Microbiol* 107:56–64
- Muñoz-Provencio D, Rodríguez-Díaz J, Collado MC, Langella P, Bermúdez-Humarán LG, Monedero V (2012) Functional analysis of the *Lactobacillus casei* BL23 sortases. *Appl Environ Microbiol* 78:8684–8693
- Naidu AS, Bidlack WR, Clemens RA (1999) Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit Rev Food Sci Nutr* 39:13–126
- Pagnini C, Saeed R, Bamias G, Arseneau KO, Pizarro TT, Cominelli F (2010) Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:454–459
- Palencia PF, de López P, Corbí AL, Peláez C, Requena T (2008) Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, in vitro adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion. *Eur Food Res Technol* 227:1475–1484
- Pfeiler EA, Azcarate-Peril MA, Klaenhammer TR (2007) Characterization of a novel bile-inducible operon encoding a two-component regulatory system in *Lactobacillus acidophilus*. *J Bacteriol* 189:4624–4634
- Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Keding M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line caco-2 in culture. *Biol Cell* 47:323–330
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guamer F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork P, Ehrlich SD, Wang J (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464:59–65
- Rabot S, Rafter J, Rijkers GT, Watzl B, Antoine JM (2010) Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: impact of probiotics on digestive system metabolism. *J Nutr* 140:677S–689S
- Remus DM, Bongers RS, Meijerink M, Fusetti F, Poolman B, Vos P, de Wells JM, Kleerebezem M, Bron PA (2013) Impact of *Lactobacillus plantarum* sortase on target protein sorting, gastrointestinal persistence, and host immune response modulation. *J Bacteriol* 195:502–509
- Resta-Lenert S, Barrett KE (2003) Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 52:988–997
- Rizkalla SW, Luo J, Kabir M, Chevalier A, Pacher N, Slama G (2000) Chronic consumption of fresh but not heated yogurt improves breath-hydrogen status and short-chain fatty acid profiles: a controlled study in healthy men with or without lactose maldigestion. *Am J Clin Nutr* 72:1474–1479
- Roos S, Jonsson H (2002) A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiol Read Engl* 148:433–442
- Ruiz L, Margolles A, Sánchez B (2013) Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Front Microbiol* 4:396
- Savaiano DA (2014) Lactose digestion from yogurt: mechanism and relevance. *Am J Clin Nutr* 99:1251S–5S
- Sengupta R, Altermann E, Anderson RC, McNabb WC, Moughan PJ, Roy NC (2013) The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators Inflamm* 2013:237921
- Taranto MP, Perez-Martinez G, Font de Valdez G (2006) Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. *Res Microbiol* 157:720–725
- Terzaghi BE, Sandine WE (1975) Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl Microbiol* 29:807–813
- Turpin W, Humblot C, Noordine ML, Thomas M, Guyot JP (2012) Lactobacillaceae and cell adhesion: genomic and functional screening. *PloS One* 7:e38034
- Uriot O, Galia W, Awussi A A, Perrin C, Denis S, Chalancon S, Lorson E, Poiron C, Junjua M, Le Roux Y, Alric M, Dary A, Blanquet-Diot S, Roussel Y (2015) Use of the dynamic gastro-intestinal model TIM to explore the survival of the yogurt bacterium *Streptococcus thermophilus* and the metabolic activities induced in the simulated human gut. *Food Microbiol* <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.05.007>
- Van Klinken BJ, Oussoren E, Weenink JJ, Strous GJ, Büller HA, Dekker J, Einerhand AW (1996) The human intestinal cell lines Caco-2 and LS174T as models to study cell-type specific mucin expression. *Glycoconj J* 13:757–768
- Van Pijkeren JP, Chanchaya C, Ryan KA, Li Y, Claesson MJ, Sheil B, Steidler L, O'Mahony L, Fitzgerald GF, van Sinderen D, O'Toole PW (2006) Comparative and functional analysis of sortase-dependent proteins in the predicted secretome of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl Environ Microbiol* 72:4143–4153
- Veiga P, Gallini CA, Beal C, Michaud M, Delaney ML, DuBois A, Khlebnikov A, Johan ET, Vlieg VH, Punit S, Glickman JN, Onderdonk A, Glimcher LH, Garrett WS (2010) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* fermented milk product reduces inflammation by altering a niche for colitogenic microbes. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:18132–18137
- Velcich A, Palumbo L, Jarry A, Labois C, Racevskis J, Augenlicht L (1995) Patterns of expression of lineage-specific markers during the in vitro-induced differentiation of HT29 colon carcinoma cells. *Cell Growth Differ Mol Biol J Am Assoc Cancer Res* 6:749–757
- Vinderola CG, Reinheimer JA (2003) Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Res Int* 36:895–904
- Von Ossowski I, Satokari R, Reunanen J, Lebeer S, De Keersmaecker SCJ, Vanderleyden J, de Vos WM, Palva A (2011) Functional characterization of a mucus-specific LPXTG surface adhesin from probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol* 77:4465–4472

- Wang C, Li M, Feng Y, Zheng F, Dong Y, Pan X, Cheng G, Dong R, Hu D, Feng X, Ge J, Liu D, Wang J, Cao M, Hu F, Tang J (2009) The involvement of sortase A in high virulence of STSS-causing *Streptococcus suis* serotype 2. Arch Microbiol 191:23–33
- Weiss G, Jespersen L (2010) Transcriptional analysis of genes associated with stress and adhesion in *Lactobacillus acidophilus* NCFM during the passage through an in vitro gastrointestinal tract model. J Mol Microbiol Biotechnol 18:206–214
- Zhang Q, Yang B, Brashears MM, Yu Z, Zhao M, Liu N, Li Y (2014) Influence of casein hydrolysates on exopolysaccharide synthesis by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. J Sci Food Agric 94:1366–1372
- Ziar H, Gérard P, Riazi A (2014) Effect of prebiotic carbohydrates on growth, bile survival and cholesterol uptake abilities of dairy-related bacteria. J Sci Food Agric 94:1184–1190

CHAPITRE II :

IMPACT DE L'ADHÉSION DE *STREPTOCOCCUS* *THERMOPHILUS* LMD-9 SUR L'EXPRESSION DE CERTAINS GÈNES EUCARYOTES ET BACTÉRIENS

I. Impact de l'adhésion de *Streptococcus thermophilus* LMD-9 sur l'expression de certains gènes codant des mucines dans les différentes lignées cellulaires

II. Impact de l'adhésion bactérienne sur l'expression des gènes bactériens chez *Streptococcus thermophilus* LMD-9 : Identification des gènes induits durant l'adhésion aux cellules intestinales humaines *in vitro*

Chapitre II. Impact de l'adhésion bactérienne sur l'expression de certains gènes eucaryotes dans les cellules épithéliales intestinales et bactériens chez *Streptococcus thermophilus* LMD-9

Objectifs

Les premiers travaux de ma thèse ont permis de mettre en évidence la capacité d'adhésion *in vitro*, bien que modérée, de la souche LMD-9 à différentes lignées cellulaires intestinales. Afin d'élucider l'effet de cette capacité d'adhésion sur la production de mucus, nous avons dans un premier temps analysé par qRT-PCR semi-quantitative en temps réel le taux d'expression des gènes codant les mucines sécrétées MUC2 et MUC5AC dans les trois lignées cellulaires après adhésion de la souche LMD-9. Dans un second temps, la réponse moléculaire de la souche LMD-9 après une mise en contact avec les cellules eucaryotes a été également étudiée par l'utilisation de la technologie R-IVET (Recombinase-based *in vivo* expression technology).

I. Impact de l'adhésion de *Streptococcus thermophilus* LMD-9 sur l'expression de certains gènes codant des mucines dans les différentes lignées cellulaires

I. 1. Introduction

La capacité d'adhésion *in vivo* des bactéries à potentiel probiotique, même transitoire, peut contribuer à exercer des effets biologiques sur la muqueuse intestinale (Derrien et al., 2010). Ces effets incluent l'exclusion des pathogènes, la stimulation de la réponse immunitaire ou encore le renforcement de l'effet barrière intestinale. Ce dernier effet peut se produire soit par une stimulation de la prolifération des cellules caliciformes, soit par une augmentation de la synthèse des protéines des jonctions serrées (Lutgendorff et al., 2008) ou encore par une induction de la production de mucus.

Le mucus consiste en une sécrétion visqueuse recouvrant les organes creux et contribue à exercer différentes fonctions dont la lubrification, la protection des organes et le maintien d'une couche hydratée sur l'épithélium. L'élément principal qui est responsable de ses propriétés visqueuses est une famille de glycoprotéines appelé mucines. Ainsi, l'un des éléments majeurs pour contribuer au renforcement de la barrière épithéliale consiste à stimuler la surproduction des mucines soit par une surexpression des gènes codant les mucines ou en facilitant leur excrétion (Mack et al., 1999 ; Caballero-Franco et al., 2007).

Des études réalisées chez des lactobacilles ont rapporté que l'adhésion de ces bactéries aux cellules épithéliales induisait l'expression de certains gènes codant des mucines. En effet, l'adhésion de *Lb. plantarum* 299v aux cellules HT-29 induisait le taux de transcrits du gène *MUC3* ainsi que la sécrétion extracellulaire de cette mucine (Mack et al., 1999). En outre, l'adhésion de cette bactérie inhibait l'adhésion de *Escherichia coli* entérohémorragique sérotype O157:H7 aux cellules intestinales HT-29, mais pas aux cellules non intestinales (cellules épithéliales humaines de type 2 (HEp-2)), suggérant ainsi un rôle protecteur des probiotiques de l'épithélium intestinal par la sécrétion de mucus (Mack et al., 1999). Mattar et ses collaborateurs ont également montré que l'adhésion de *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 aux cellules Caco-2 induisait l'expression du gène ainsi que le taux de la mucine MUC2 (Mattar et al., 2002). Dans la même optique, Mack et ses collaborateurs ont montré que la capacité d'adhésion des souches de lactobacilles était corrélée à une capacité d'induction de l'expression du gène *MUC3*. En effet, les souches les plus adhérentes notamment

Lb. platarum Lp299 et *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 induisaient la transcription des gènes *MUC3* et *MUC2* dans les cellules HT-29 (Mack et al., 2003).

L'induction de l'expression des gènes codant les mucines *MUC2*, *MUC3* et *MUC5AC* a été également observée avec le mélange de probiotique VSL#3 après six heures de mise en contact avec les cellules HT-29 (Otte and Podolsky, 2004). Par ailleurs, Caballero-Franco et ses collaborateurs ont montré que l'administration par voie orale du mélange probiotique VSL#3 à des rats sains augmentait de 60 % le contenu de mucine luminale et induisait l'expression du gène *Muc2* (Caballero-Franco et al., 2007). Ces données indiquent que l'adhésion des bactéries à potentiel probiotique aurait un rôle à la fois protecteur et de renforcement de l'épithélium intestinal.

En ce qui concerne *S. thermophilus*, très peu d'études se sont intéressées à analyser son rôle dans le renforcement de l'effet barrière de l'épithélium intestinal. Toutefois, une étude réalisée en utilisant une co-culture de souches vivantes de *Lb. acidophilus* ATCC4356 et *S. thermophilus* ATCC19258 a montré que ces deux souches augmentaient la résistance transépithéliale de la monocouche cellulaire des lignées Caco-2 et HT29-cl.19A en maintenant l'intégrité structurale des jonctions serrées intercellulaires (Resta-Lenert and Barrett, 2003). Par contre, l'effet de *S. thermophilus* seul sur le renforcement de l'épithélium intestinal et notamment sur l'expression et la sécrétion des mucines, à notre connaissance, n'a jamais été étudié. Ainsi, l'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de l'adhésion de la souche LMD-9 sur l'expression des gènes codant les mucines *MUC2* et *MUC5AC* retrouvées respectivement au niveau intestinal et stomacal.

I. 2. Matériel et méthodes

I. 2. 1. Souches bactériennes et conditions de culture

S. thermophilus LMD-9 et *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103, connue pour sa capacité à induire l'expression des mucines et donc utilisée comme témoin positif, ont été utilisées. La culture de ces deux bactéries a été effectuée selon le protocole décrit précédemment (*Publication 1*).

I. 2. 2. Culture cellulaire et adhésion

Les lignées cellulaires HT29-MTX, HT29-CL. 16E et Caco-2 TC7 ont été utilisées pour évaluer l'expression des gènes *MUC2* et *MUC5AC* après une co-incubation avec les cellules bactériennes. Les conditions de culture cellulaire et d'adhésion bactérienne ont été réalisées selon le protocole décrit précédemment (*Publication 1*). Les cellules bactériennes ont été co-incubées pendant 2 h avec chaque lignée cellulaire. A la vue des résultats obtenus, les bactéries ont été incubées pendant 4 h uniquement avec les cellules Caco-2 TC7. Une extraction d'ARN totaux (ARNt) et des protéines a été effectuée pour les deux conditions expérimentales.

I. 2. 3. Quantification du taux de transcrits des gènes *MUC2* et *MUC5AC* dans les différentes lignées cellulaires après une adhésion bactérienne

I. 2. 3. 1. Extraction des ARN totaux eucaryotes

Après co-incubation des bactéries avec les cellules eucaryotes, les tapis cellulaires ont été délicatement lavés cinq fois avec 1 mL de PBS (phosphate buffered saline). Les tapis cellulaires ont été ensuite traités avec 0,05 % de trypsine-EDTA $\times 1$ (Gibco®) pendant 10 min à 37 °C afin de détacher les cellules. L'action de la trypsine a été neutralisée par addition de 2 mL de milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant le SVF (sérum de veau foetal, riche en protéines qui ont pour rôle d'inhiber l'activité de la trypsine et de protéger les cellules). Le tapis cellulaire a été ensuite gratté en présence de 3 mL de DMEM. La suspension cellulaire a été récupérée de chaque insert puis centrifugée pendant 10 min à 3000 rpm (1410 g). Les culots cellulaires ont été repris dans un tampon de lyse. Les ARNt ont ensuite été extraits en utilisant le kit Nucleospin® RNA/Protein kit (Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Germany) qui permet d'extraire les ARNt et les protéines à partir des mêmes cellules et utilisé précédemment par Plaisancié et al., 2013 (Plaisancié et al., 2013). Les ARNt extraits ont été conservés à -80 °C. La concentration des ARNt a été déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm et leur qualité a été contrôlée par une électrophorèse en gel d'agarose à 2 %. Concernant les protéines extraites, leurs concentrations étaient très faibles et leur détection par immunoblot s'est avérée très difficile.

I. 2. 3. 2. Réaction de polymérisation en chaine semi-quantitative en temps réel après une transcription inverse (qRT-PCR)

a) Transcription inverse (RT)

La conversion des ARNt en ADN complémentaire (ADNc) a été effectuée à partir de 0,5 - 1 µg d'ARNt en utilisant un mélange réactionnel contenant des hexamères aléatoires, une reverse transcriptase et des nucléotides (kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis, Thermo Scientific). Après avoir mis les ARNt, les hexamères aléatoires et l'eau, les échantillons ont été incubés 5 min à 65°C (les ARN eucaryotes sont riches en guanine-cytosine) puis remis immédiatement dans la glace. Ensuite, le tampon de réaction 5X, RiboLock RNase Inhibitor (20U/µL), les dNTPs et la reverse transcriptase ont été ajoutés. Les échantillons ont été ré-incubés pendant 5 min à 25°C puis 60 min à 45°C (MyCycler Thermocycler, Bio-Rad). Les ADNc ont été conservés à -20°C puis utilisés pour la PCR semi-quantitative en temps réel.

b) RT-PCR semi-quantitative en temps réel (qRT-PCR)

La PCR semi-quantitative en temps réel a été réalisée en utilisant comme fluorophore le SYBR Green (Power Sybr® Green PCR Master Mix, Applied Biosystem) et une plaque de 96 puits. La réaction a été effectuée en trois répétitions avec deux duplicats. Chaque mélange réactionnel de 20 µl contient 5 µl d'ADNc dilué préalablement au 1/100^e, 0,5 µM d'amorces et 12,5 µl de SYBR Green 2X. Les plaques de PCR ont été centrifugées pendant 1 min à 2000 g. Les amorces utilisées sont indiquées dans le Tableau 7.

Les réactions d'amplification et de détection de produits ont été effectuées à l'aide d'un appareil de PCR en temps réel (Applied Biosystems StepOnePlus™ Real Time PCR System) selon le protocole suivant : un cycle à 95°C pendant 10 min, suivi de 40 cycles d'amplification (15 secondes à 95°C, 1 min à 60°C, 15 secondes à 72°C), suivie d'une dissociation (de 60°C à 95°C) pour l'établissement de la courbe de dissociation. Les températures d'hybridation ont été optimisées pour les paires d'amorces utilisées.

L'absence de contamination par de l'ADN chromosomique a été vérifiée en comparant l'expression des gènes dans les échantillons non traités par la transcriptase inverse avec celle des échantillons traités. Une réaction d'amplification sur un volume d'eau ainsi qu'un mélange des réactifs de PCR sans ADNc ont été également effectuées afin de vérifier

l'absence de contamination. Pour calibrer les réactions de qRT-PCR, des courbes d'efficacité ont été réalisées à partir des gammes de dilution d'ADNc pour chaque gène testé. La normalisation est effectuée avec le niveau de transcrits du gène de référence codant la GAPDH.

Tableau 6 : Amorces utilisées pour la qRT-PCR semi-quantitative en temps réel

Amorces	Séquences (5'-3')	Taille de l'amplicon	Référence
MUC2	GTCCGTCTCCAACATCACCT	287	(Plaisancié et al., 2013)
	GCTGGCTGGTTTTCTCCTCT		
MUC5AC	CGACCTGTGCTGTGTACCAT	240	(Plaisancié et al., 2013)
	CCACCTCGGTGTAGCTGAA		
GAPDH	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGG	983	(Gaudier et al., 2004)
	CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC		

a) Analyse

Le principe de la RT-PCR semi-quantitative en temps réel consiste à évaluer l'augmentation du signal émis par l'indicateur fluorescent (SYBR Green) après sa fixation à l'ADN double brin nouvellement synthétisé. L'intensité du signal, qui augmente au fur et à mesure, est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction d'amplification. De plus, la détection du signal au cours du temps permet de tracer la courbe d'amplification de l'ADNc. Le premier cycle de démarrage de la phase d'amplification correspond au cycle seuil (threshold cycle) défini par l'appareil par la valeur Ct. Le nombre-seuil en Ct dépend de la quantité initiale de séquences d'ADNc présente dans la réaction de PCR. En effet, plus la valeur Ct est élevée plus le nombre de copie d'ADNc initial est faible. Ainsi, pour valider le Ct de chaque échantillon, chaque réaction de PCR est réalisée en triplicat et la moyenne des trois valeurs de Ct est utilisée. Dans cette étude, la quantification des transcrits a été effectuée par la méthode de quantité relative $\Delta\Delta Ct$ (Pfaffl, 2001). Brièvement, pour chaque gène (cible ou de référence), la valeur Ct obtenue dans les conditions testées est soustraite à celle du contrôle négatif pour obtenir des valeurs ΔCt_{MUC2} et ΔCt_{GAPDH} . La différence entre les deux ΔCt obtenus donne ainsi la valeur $\Delta\Delta Ct$:

$$((\Delta\Delta Ct = (Ct_{MUC2} - Ct_{GAPDH})_{\text{adhésion bactérienne}} - (Ct_{MUC2} - Ct_{GAPDH})_{\text{contrôle négatif}}).$$

La détermination de la quantité relative de l'expression du gène cible est ainsi déterminée par la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Les résultats sont présentés en quantité relative d'ARNm par rapport à celle obtenue pour le gène de référence dans les conditions testées. Pour analyser les résultats, le niveau de transcrits des gènes cibles *MUC2* et *MUC5AC* dans les cellules intestinales utilisées sans bactéries (contrôle négatif) est toujours arbitrairement considéré égal à 1. Ainsi, la quantité de transcrits relative des gènes cibles des cellules intestinales après une adhésion bactérienne est comparée à celle du contrôle négatif.

I. 3. Résultats

I. 3. 1. Evaluation de l'expression des gènes *MUC2* et *MUC5AC* dans les cellules productrices de mucus HT29-MTX et HT29-CL.16E

Le taux de transcrits des gènes *MUC2* et *MUC5AC* a été déterminé par qRT-PCR dans les cellules HT29-MTX et HT29-CL. 16E après 2 h d'incubation avec les souches bactériennes LMD-9 et *Lb. rhamnosus* GG. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux du témoin négatif (cellules intestinales sans bactéries). Les gènes différemment exprimés d'au moins un facteur deux ne seront pas pris en compte. Les résultats montrent que le taux de transcrits de *MUC2* n'est pas augmenté dans les deux lignées cellulaires après 2 h d'incubations avec les deux souches bactériennes (Figure 17a). Pour l'expression de *MUC5AC*, les résultats montrent que le taux de transcrits est augmenté significativement dans les cellules HT29-MTX d'un facteur 2,5 en présence de *Lb. rhamnosus* GG (Figure 17b). Cependant, aucun effet significatif n'a été observé avec la souche LMD-9. Dans le cas des cellules HT29-CL. 16E, aucun effet significatif sur l'expression des deux gènes *MUC2* et *MUC5AC* n'a été observé en présence des deux bactéries. Ces résultats indiquent que les propriétés du modèle cellulaire en présence des bactéries pourraient influencer l'expression des gènes *MUC*.

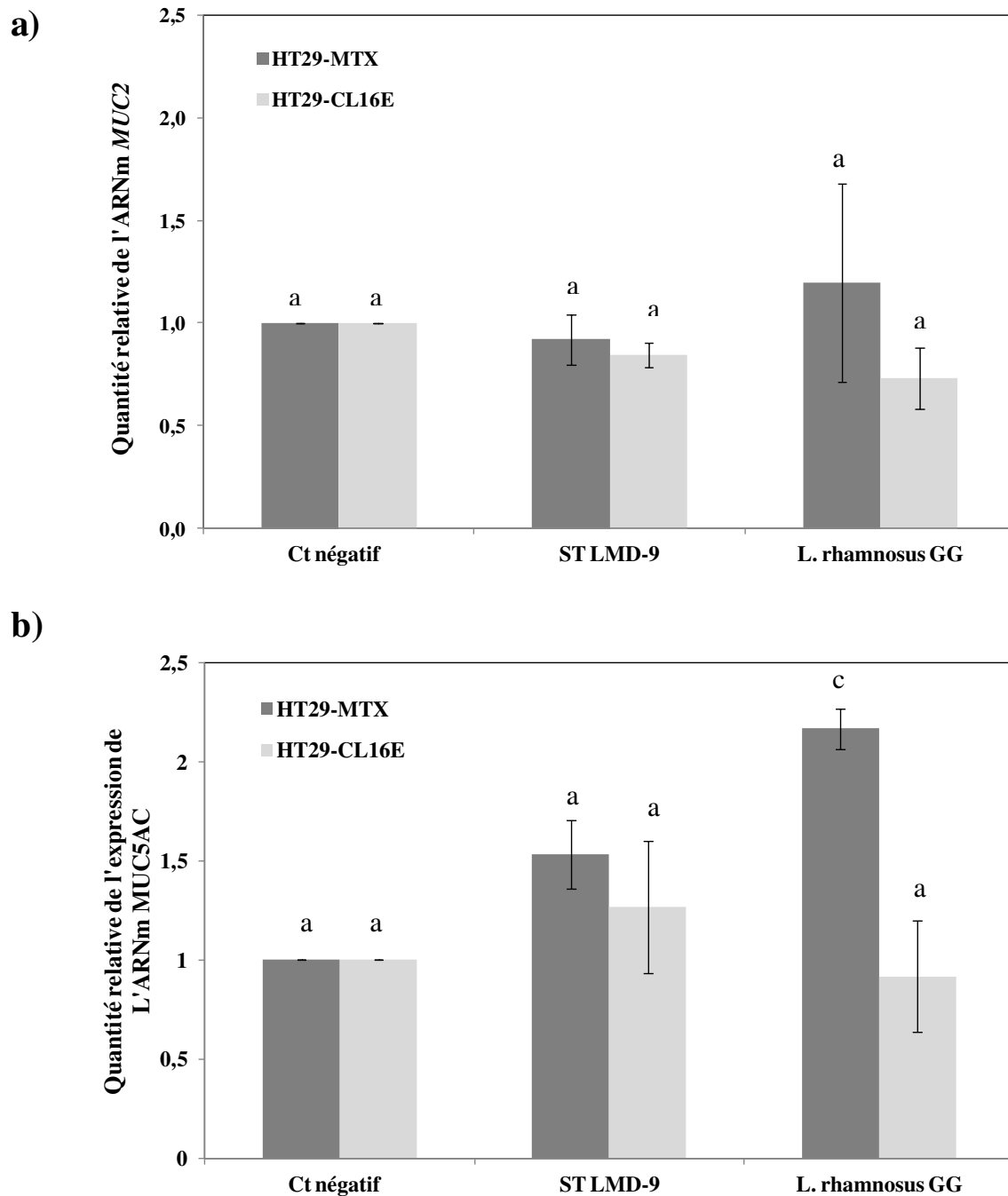


Figure 17 : Détermination du taux de transcrits des gènes *MUC2* et *MUC5AC* par qRT-PCR dans les cellules productrices de mucus HT29-MTX et HT29-CL. 16E après 2 h d'incubation avec les cellules bactériennes *S. thermophilus* LMD-9 (ST LMD-9) et *L. rhamnosus* GG qui est utilisée comme témoin. Les résultats, correspondant à la moyenne $\pm$ la déviation standard de la moyenne de deux répétitions (SEM) ($n=2$), sont exprimés en quantité relative d'ARNm *MUC2* et *MUC5AC* dans les cellules intestinales avec bactéries normalisée à celle du contrôle sans bactérie. Les lettres indiquent la différence significative avec le témoin négatif sans bactérie ($P < 0,02$, test de student unilatéral contre une valeur théorique).

I. 3. 2. Evaluation de l'expression des gènes *MUC2* et *MUC5AC* dans les cellules entérocytaires Caco-2

Dans les cellules muco-sécrétrices, le gène *MUC2* est déjà exprimé de façon abondante, contrairement aux cellules Caco-2 (Hollingsworth et al., 1994 ; Lesuffleur et al., 1993). Compte tenu des résultats obtenus avec les cellules sécrétrices de mucus HT29-MTX et HT29-CL. 16E, nous avons voulu déterminer le taux de transcrits de ce gène dans les cellules Caco-2 (dépourvues de mucus) après 2 h et 4 h d'incubation avec les bactéries. Les résultats montrent qu'après 2 h d'incubation avec les deux souches bactériennes, aucun effet n'est observé sur le taux de transcrits du gène *MUC2*. Après 4 h d'incubation avec les bactéries, le taux de transcrits de *MUC2* semblerait augmenté en présence de *Lb. rhamnosus* GG mais la variabilité observée ne permet pas de mettre en évidence un effet significatif. En revanche, aucun effet n'est observé avec la souche LMD-9 (Figure 18).

Les résultats obtenus pour l'expression de *MUC5AC* n'ont pas été pris en compte car le niveau d'expression était très faible et les résultats n'étaient pas exploitables.

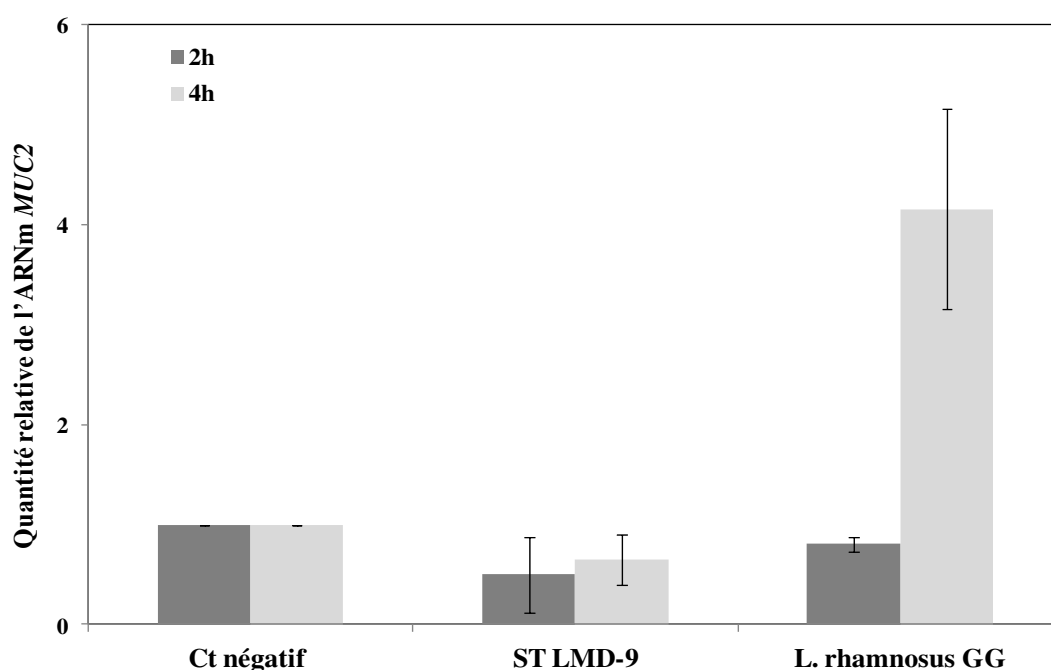


Figure 18 : Détermination du taux de transcrits du gène *MUC2* par qRT-PCR dans les cellules Caco-2 TC7 après 2 h et 4 h d'incubation avec les cellules bactériennes *S. thermophilus* LMD-9 (ST LMD-9) et *L. rhamnosus* GG qui est utilisée comme témoin. Les résultats, correspondant à la moyenne $\pm$ la déviation standard de la moyenne de deux répétitions (SEM), sont exprimés en quantité relative d'ARNm *MUC2* dans les cellules Caco-2 avec bactéries normalisée à celle du contrôle sans bactéries ($n=1 \times 2$). Les lettres indiquent la différence significative avec le contrôle sans bactéries ($P < 0,02$, test de student unilatéral contre une valeur théorique).

I. 4. Discussion et conclusion

La déficience de la barrière intestinale est souvent liée à des pathologies inflammatoires et à des infections par des micro-organismes pathogènes. Bien que les mécanismes d'action ne soient pas clairement élucidés, certaines souches probiotiques peuvent jouer un rôle important dans la protection et le renforcement de la muqueuse intestinale. En effet, des travaux ont pu mettre en évidence l'effet positif de *Lb. rhamnosus* GG et du mélange de probiotique VSL#3 sur le traitement et la prévention des rechutes chez des patients atteints de colites ulcéreuses et de pochite (Mimura et al., 2004 ; Zocco et al., 2006). D'autres études *in vitro* ont également rapporté des effets sur le renforcement de l'épithélium intestinal notamment par une surproduction de mucus (Mattar et al., 2002 ; Hafez, 2012 ; Becker et al., 2013).

Dans cette étude, nous avons voulu analyser l'impact de l'adhésion de *S. thermophilus* LMD-9 sur le renforcement de l'effet barrière de l'épithélium intestinal *in vitro* en quantifiant le niveau d'expression des gènes codant les mucines sécrétées MUC2 et MUC5AC dans les trois lignées cellulaires HT29-MTX, HT29-CL. 16E et Caco-2. Ces lignées présentent des propriétés de surface différentes ainsi qu'un niveau variable d'expression de ces gènes (Tableau 3) (Lesuffleur et al., 1993 ; Augeron and Labois, 1984 ; Bu et al., 2011).

Les résultats préliminaires obtenus montrent que quelle que soit la lignée cellulaire, l'adhésion de la souche LMD-9 après deux heures n'induit pas l'expression des gènes *MUC2* et *MUC5AC* dans nos conditions expérimentales. Cela pourrait être dû soit à la variabilité des propriétés des modèles cellulaires utilisés ou leurs conditions de culture, soit au temps de co-incubation des cellules avec les bactéries ou encore à leur capacité d'adhésion. Etant donné le taux d'expression élevé des gènes *MUC2* et *MUC5AC* avec les cellules sécrétrices de mucus, il serait probablement difficile de démontrer une sur-induction de l'expression de ces gènes dans ces cellules. D'ailleurs, Turpin et ses collaborateurs (2012) ont rapporté la même observation avec les cellules HT29-MTX (Turpin et al., 2012).

Dans nos conditions expérimentales, l'incubation des bactéries avec les cellules eucaryotes était de deux heures. Des études ayant démontré l'effet de l'adhésion sur l'expression du gène *MUC2*, par exemple, co-incubaient pendant 3 h les bactéries avec les cellules Caco-2 (Mack et al., 1999 ; Mattar et al., 2002). Ainsi, nous avons donc voulu déterminer l'impact de l'adhésion de la souche LMD-9 sur l'expression de *MUC2* après 4 h

d'incubation uniquement avec les cellules Caco-2. Les résultats indiquent que même après 4 h, le taux d'expression de *MUC2* reste inchangé avec la souche LMD-9 suggérant que cette souche n'aurait aucun impact sur l'expression des gènes codant les mucines. En outre, la modulation de l'expression des gènes codant les mucines semble dépendre de plusieurs facteurs notamment le modèle cellulaire, le temps de co-incubation des bactéries avec les cellules eucaryotes, la souche bactérienne et sa capacité d'adhésion ainsi que les conditions de culture des bactéries et des cellules eucaryotes. Par ailleurs, il est à noter que la souche LMD-9 adhère modérément aux trois lignées cellulaires utilisées. Cette capacité serait probablement insuffisante pour induire l'expression des gènes *MUC2* et *MUC5AC*. En effet, une étude a montré que chez différentes souches de lactobacilles, la capacité d'adhésion était corrélée à la capacité d'induction du taux de transcrits des gènes *MUC3* et *MUC2*. Il s'est avéré que les souches les plus adhérentes *Lb. rhamnosus* GG et *Lb. plantarum* Lp299v provoquaient une augmentation du taux de transcrits des gènes *MUC3* et *MUC2* (Mattar et al., 2002).

A notre connaissance, très peu d'études sont réalisées pour déterminer l'effet de *S. thermophilus* seul sur le renforcement de l'épithélium. D'ailleurs, il a été montré en utilisant une co-culture de souches vivantes de *Lb. acidophilus* ATCC4356 et *S. thermophilus* ATCC19258 que ces deux souches augmentaient la résistance transépithéliale de la monocouche cellulaire des lignées Caco-2 et HT29-cl.19A en maintenant l'intégrité structurale des jonctions serrées intercellulaires (Resta-Lenert and Barrett, 2003). Ainsi, *S. thermophilus* pourrait donc avoir un effet plutôt sur les protéines des jonctions serrées que sur les mucines sécrétées. C'est pourquoi, des études de quantification des gènes codant les protéines des jonctions serrées comme, par exemple, les protéines zonula occludens et de l'occludine pourraient être intéressantes.

Dans cette partie de la thèse, les données présentées résultent d'expérimentations préliminaires liées à une mise au point préalable et qui nécessitent d'être confirmées. Enfin, pour conclure quant à l'effet de *S. thermophilus* LMD-9 sur l'expression des mucines, une modification des conditions expérimentales utilisées, notamment les conditions de culture bactérienne et cellulaire ou le temps d'incubation des bactéries avec les cellules eucaryotes pourrait conduire à une modification des profils d'expression des gènes *MUC*. De plus, l'effet de l'adhésion de la souche LMD-9 pourrait se traduire sur la synthèse protéique et non au niveau transcriptionnel. En effet, l'adhésion bactérienne pourrait induire l'excrétion des mucines sécrétées conduisant ainsi à une augmentation du niveau de mucus (Davis and

Dickey, 2008). Dans cette étude, compte-tenu des faibles concentrations en protéines obtenues, les expérimentations d'immunoblot ne nous ont pas permis de déterminer le taux des mucines dans les cellules après adhésion.

II. Impact de l'adhésion sur l'expression des gènes bactériens chez *Streptococcus thermophilus* LMD-9 : Identification des gènes induits durant l'adhésion aux cellules intestinales humaines *in vitro*

Introduction à la publication 2

Bien que l'adhésion bactérienne soit très étudiée chez les souches bactériennes à potentiel probiotique comme les bactéries lactiques, les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus restent encore largement méconnus. Dans notre première étude (*Publication 1*), la capacité d'adhésion de *Streptococcus* (*S.*) *thermophilus* LMD-9 aux différentes lignées cellulaires a été étudiée. Nous avons ainsi montré que cette souche adhérerait modérément aux trois modèles cellulaires et cette capacité était plus importante lorsqu'elle était au contact des cellules HT29-CL. 16E (sécrétrices de mucine MUC2). De plus, l'implication des trois gènes *prtS*, *srtA* et *mucBP* dans l'adhésion bactérienne de *S. thermophilus* LMD-9 a été déterminée. Le profil d'adhésion des trois mutants était différent en fonction des lignées cellulaires.

Compte tenu des premiers résultats, l'inactivation des gènes affectait de façon plus marquée la capacité d'adhésion de la souche LMD-9 avec les cellules entérocytaires Caco-2 TC7 en comparaison avec les deux autres lignées. C'est la raison pour laquelle la lignée Caco-2 TC7 a été choisie pour la suite de l'étude. Ainsi, le travail exposé dans l'article 2 (en cours de préparation) consiste en une identification des gènes activés par une approche transcriptomique R-IVET (recombinase-based *in vivo* expression technology) durant l'adhésion de la souche LMD-9 aux cellules Caco-2 TC7. Cette étude a pour objectif d'identifier les déterminants génétiques impliqués dans l'adhésion de cette souche, ce qui permettra de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de ce processus. Ainsi, les gènes spécifiquement induits au contact des cellules Caco-2 ont été déterminés et classés selon leurs fonctions physiologiques.

Publication 2: Highlighting induced-genes in *Streptococcus thermophilus* LMD-9 during adhesion to Caco-2 cells using recombinase-based *in vivo* expression technology

Mounira Kebouchi, Ophélie Uriot, Emilie Lorson, Zeeshan Hafeez, Claire Soligot, Yves Le Roux, Magali Genay, Annie Dary (*En cours de rédaction*).

Abstract

Streptococcus thermophilus is a lactic acid bacterium presenting a major economic interest through its wide use in dairy industry. It can also confer some health-benefits on the host after its consumption. Indeed, it can also adhere to intestinal cells but the molecular mechanisms remain to be understood. In order to elucidate the molecular response of *S. thermophilus* LMD-9 strain during its interaction with enterocyte-like cells, Caco-2, recombinase-based *in vivo* expression technology (R-IVET) was used. This approach was previously successfully applied in LMD-9 strain. Therefore, R-IVET system was tested in adhesion experiment conditions which allowed us the detection of 56 induced-genes in LMD-9 strain during its adhesion to Caco-2 TC7 cells. All identified genes appeared to be randomly distributed over the chromosome and include those involved in stress response, nutrient absorption and metabolism, protein synthesis, regulation, cell surface proteins, competence proteins and others which are related to various cellular pathways. Interestingly, a wide number of these induced-genes, important for infectious process and host colonization, have been previously identified in other bacteria indicating the successful application of the R-IVET approach in our *in vitro* conditions.

II. 1. Introduction

Streptococcus (S.) thermophilus is a lactic acid bacterium (LAB) recognized as safe for consumption since it has obtained the Generally Recognized as Safe (GRAS) status from the American Food and Drug Administration (FDA 2002; FDA 2012) and the Qualified Presumption of Safety (QPS) status from the European Food Safety Authority (EFSA). This bacterium is widely used in dairy products because of its high ability to ferment milk and to produce metabolites giving flavors to the products (Hols et al., 2005 ; Iyer et al., 2010).

Besides its economic interest, this bacterium could confer several beneficial effects on human health alone or in combination with other bacteria and hence considered as a probiotic microorganism but this property remains to be further documented (For review see Delorme, 2008; Iyer et al., 2010, Uriot et al., 2017). For instance, *S. thermophilus* in yogurt culture, in combination with *Lactobacillus (Lb.) delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, has been shown to improve lactose digestion in lactose intolerant individuals (Rizkalla et al. 2000; Rabot et al. 2010; Savaiano 2014). For this effect, yogurt has obtained a health claim from the EFSA (EFSA, 2010). Furthermore, other studies have also reported that the treatment of mucositis affected rats, induced by methotrexate treatment, with a yogurt comprising of *Lb. bulgaricus* and *S. thermophilus* improved the intestinal barrier function of the small bowel epithelium (Southcott et al., 2008). In addition, the partial attenuation of methotrexate induced-mucositis was also observed in female rats after treatment with *S. thermophilus* TH-4 alone (Tooley et al., 2006). Otherwise, Resta et al., (2003) have shown by using a live strain co-culture of *Lb. acidophilus* ATCC4356 and *S. thermophilus* ATCC19258 that these two strains increased the transepithelial resistance of the cell monolayer of the Caco-2 and HT29-cl.19A cell lines by maintaining the structural integrity of tight intercellular junctions (Resta-Lenert and Barrett, 2003). Furthermore, as these two strains adhere *in vitro* to cell lines used, they would limit adhesion and invasion of enteroinvasive *Escherichia (E.) coli* (029:NM) in Caco-2 and HT29-cl.19A epithelial cells (Resta-Lenert and Barrett, 2003). Furthermore, the pathogen inhibition effect was also observed *in vivo* and *in vitro* with LMD-9 strain alone against *Clostridium difficile* by producing lactic acid (Kolling et al., 2012). Otherwise, *in vitro* studies have shown that LMD-9 strain alone has the ability to adhere to HT-29 cells (Couvigny et al., 2015).

LMD-9 strain is among *S. thermophilus* strains whose genome has been completely sequenced and has a size of 1.8 Mb with low guanine-cytosine content (Makarova et al.

2006). The availability of the LMD-9 genome sequence as well as its capacity to be transformed, thanks to its natural competence, allows effective studies of the genes by gene mutant construction and studies of their regulatory mechanisms under different conditions (Junjua et al., 2014, 2016; Uriot et al., 2016).

In our previous study, we demonstrated that *S. thermophilus* LMD-9 strain is capable to adhere *in vitro* to three different intestinal epithelial cell (IEC) lines (Kebouchi et al., 2016). We have also reported that, depending on the cell line, some LPNTG-cell surface proteins are involved in adhesion ability of LMD-9 strain (Kebouchi et al., 2016). Although some studies have reported the adhesion ability of *S. thermophilus*, the molecular mechanisms of this process are still widely unknown (Couvigny et al., 2015; Kebouchi et al., 2016). Hence, this study aims to further investigate the bacterial response of LMD-9 strain after *in vitro* adhesion process to Caco-2 TC7 cells in order to identify genes that are specifically induced upon this interaction. In this insight, we have chosen the promoter-trapping-strategy, termed Recombinase *In vivo* Expression Technology (R-IVET) for highlighting the induced-genes in LMD-9 strain during its adhesion. This technique is among powerful techniques to detect *in vivo* induced-genes. It is based on transcriptional fusion of random genomic DNA fragments to a selectable reporter gene (Angelichio and Camilli, 2002). R-IVET is the only approach among *In vivo* expression technologies that functions as a tool of genetic screening (Bron et al., 2004).

In our R-IVET constructions, the microorganism of interest harbors two antibiotic resistance genes as markers (Figure 19) (Uriot et al., in preparation). One of which (the R-IVET cassette) is chromosomal and flanked by two *loxP* sites which are specifically recognized by the recombinase such as recombinase Cre. The second component consists of a recombinant plasmid carrying bacterial DNA genome fragment randomly cloned upstream a promoterless recombinase such as *Cre* gene and an antibiotic (erythromycin) resistance gene. If the cloned bacterial DNA fragment contains an active promoter, the recombinase gene is expressed and consequently the recombinase enzyme cleaves at *loxP* recombinase-recognition sites located in the chromosome cassette leading to the irreversible excision of the chromosomal resistance gene and changes in the antibiotic resistance phenotype (Angelichio and Camilli, 2002 ; Rediers et al ., 2005).

The R-IVET strategy was initially and widely used in pathogenic bacteria in order to elucidate the infectious mechanisms in various animal models (Lee et al., 1999; for review see

Mahan et al., 2000). Afterwards, it was adapted in non pathogenic bacteria and was originally developed in *Lb. plantarum* WCFS1 (Bron et al. 2004). Currently, it has been successfully applied in other LAB such as *Lactococcus (L.) lactis* MG1363 (Bachmann et al., 2008), *Enterococcus faecalis* V583 (Hanin et al., 2010) and *S. thermophilus* LMD-9 strain (Junjua et al., 2014; Uriot et al., 2016, Uriot et al., in preparation) in order to identify induced-genes in *in vitro* and/or *in vivo* specific conditions. For instance, the use of R-IVET strategy led to the identification of a variety of induced-genes in LMD-9 strain in response to acid and bile salts stresses encountered in the GIT after its passage through a dynamic gastro-intestinal *in vitro* model TIM (TNO gastrointestinal) (Uriot et al., 2016; Uriot et al., in preparation). These findings demonstrate the functionality of this system in LMD-9 strain (Uriot et al., in preparation). The R-IVET approach provides some advantages such as its simplicity in order to identify induced-gene and its ability to identify low and transient gene expression in any complex environments (Angelichio and Camilli, 2002). It should be noted that with R-IVET system, only up-regulated genes are detected allowing the determination of the bacterium behavior in specific niches (Bachmann et al., 2008).

In this study, R-IVET approach led to the identification of 56 activated genes induced in LMD-9 strain during its adhesion to Caco-2 TC7 cells as compared to the negative control and laboratory conditions. These genes are mostly involved in stress response, nutrient absorption and metabolism, protein synthesis, regulation, cell surface proteins, competence proteins and others which are related to various cellular pathways.

II. 2. Materials and methods

II. 2. 1. R-IVET approach

R-IVET library was initially constructed and validated in previous studies (Uriot et al., 2016; Uriot et al., in preparation). The principle of this technique is described in the introduction and summarized in Figure 19.

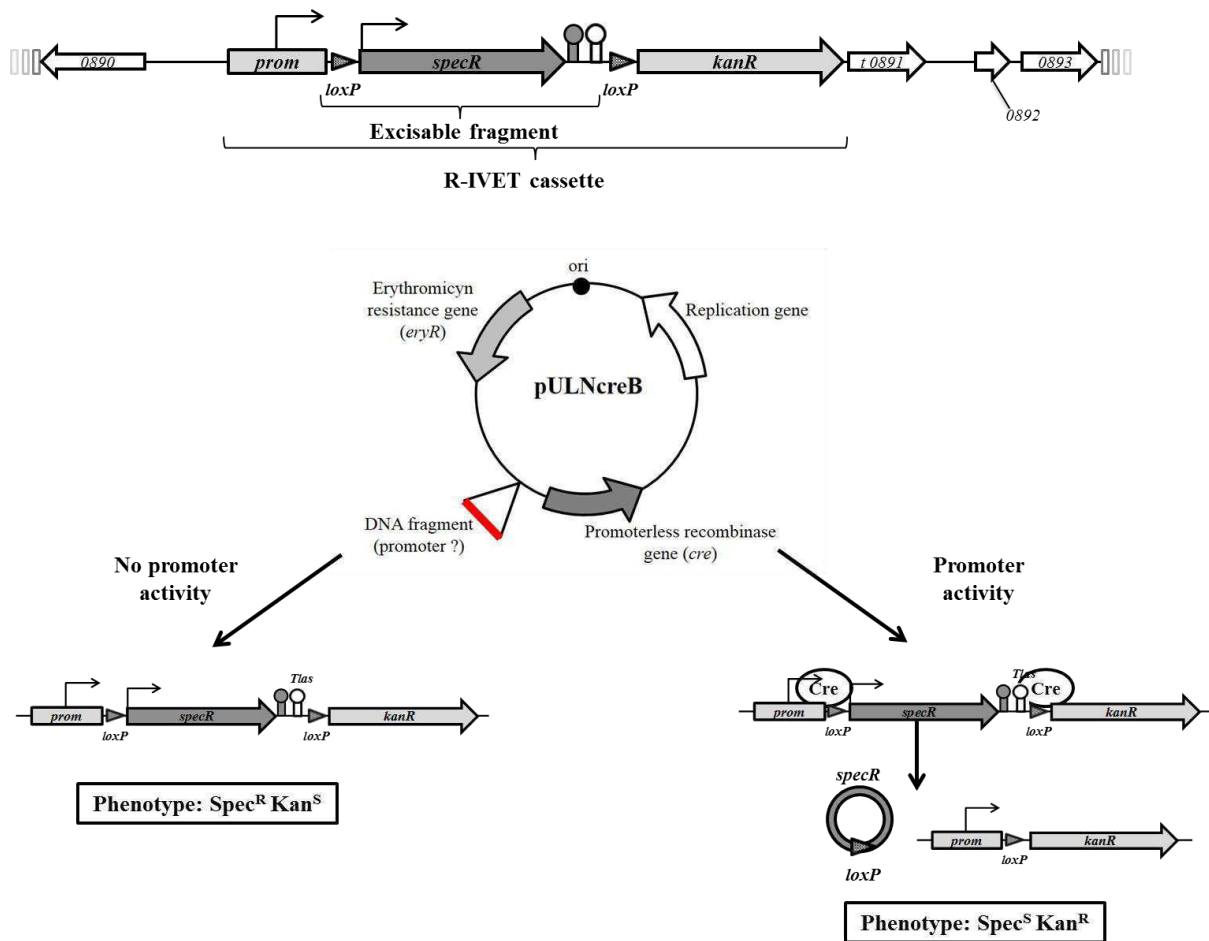


Figure 19: Schematic representation of the R-IVET approach used to identify genes that are induced during adhesion of *S. thermophilus* to Caco-2 TC7 cells. R-IVET library was constructed using LMD-9 strain which harbors in its genome the R-IVET cassette containing two reporter genes (the new strain named STUL5003). These two reporter genes are *specR* which is flanked by two recombinase-recognition sites *lox* and *kanR* gene. R-IVET library harbors also a recombinant plasmid pULNcreB carrying random genomic DNA fragments, a promoterless copy of recombinase *cre* and an antibiotic resistance gene *eryR*. If an active promoter is present in the cloned insert, the recombinase *Cre* is expressed and the enzyme cleaved between two *lox* recombinase-recognition sites leading to the irreversible excision of the chromosomal resistance gene *specR* and expression of antibiotic resistance gene *kanR*. The active clones will have kanamycin resistance phenotype (Uriot et al., in preparation).

II. 2. 2. R-IVET library growth conditions

The R-IVET library strains, were pre-cultured, i.e., inoculated at 1 % from frozen cultures (stored at -80°C in 10 % (w/v) reconstituted skim milk) and incubated overnight at 42°C without shaking in LM17 medium (Terzaghi and Sandine, 1975) supplemented with 5 µg.mL⁻¹ of erythromycin (Sigma) to select clones harboring recombinant plasmid pULNcreB containing erythromycin resistance gene. Afterward, strains were inoculated at 1 % from pre-culture and grown in LM17 medium containing spectinomycin and

streptomycin at 300 and 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively, for 12 h without shaking at 42°C (stationary phase) before utilization in adhesion experiments (Kebouchi et al., 2016).

II. 2. 3. Cell culture conditions

For the adhesion experiments, Caco-2 TC7 cell line was used and the cell culture conditions were performed as previously described by Kebouchi et al. (2016).

II. 2. 4. Identification of *Streptococcus thermophilus* LMD-9 functions induced during adhesion to Caco-2 TC7 cells

In order to determine the induced genes during adhesion of *S. thermophilus* LMD-9 strain to intestinal epithelial cells, the R-IVET library was incubated during four hours with Caco-2 TC7 cells. The adhesion experiments and bacterial culture conditions were performed according to the method described previously by Kebouchi et al. (2016) with the following modifications (Figure 20). Briefly, bacterial cells from 12 h cultures were pelleted, washed and re-suspended at a final concentration 10^9 CFU.mL⁻¹ (OD_{650nm} of about 12) in Dulbecco's modified Eagle's Minimal Essential (DMEM) Medium with 4.5 g.L⁻¹ glucose (DMEM Glutamax, Fisher Scientific) or in LM17 medium, used as control. Subsequently, samples were taken separately from the two bacterial suspensions which corresponded to T0 LM17 and T0 DMEM samples. Afterwards, the bacterial suspension in DMEM was added to confluent cell monolayer at a final concentration of 10^9 CFU.mL⁻¹ to reach a bacterial cell to epithelial cell ratio of 1000:1. The bacterial cells along with the cell monolayer were incubated for 4 h at 37°C in a humidified atmosphere with 10 % CO₂ and processed further according to Kebouchi et al. (2016) to recover cells. All cells (adherent bacteria and eukaryotic cells) recovered from two inserts were pooled and then incubated 30 min at room temperature. Samples were taken separately after recovering from the triton treatment of bacterial suspension (T0 triton) and after 30 min incubation (T30 min triton). Serial dilutions of all samples (T0 LM17, T0 DMEM, T0 triton and T30 min triton) were performed and appropriate dilutions were plated on LM17 agar medium supplemented with a mix of spectinomycin 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and streptomycin 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (adherent bacteria) and onto LM17 agar supplemented with a mix of kanamycin 1 mg.mL⁻¹ and erythromycin 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (activated clones selection). Plates were then incubated at 42°C for 48 h. Three independent R-IVET adhesion experiments were conducted with Caco-2 TC7 cells (n=3). All activated

clones were selected and DNA inserts were then amplified by PCR and resulted sequences were analyzed.

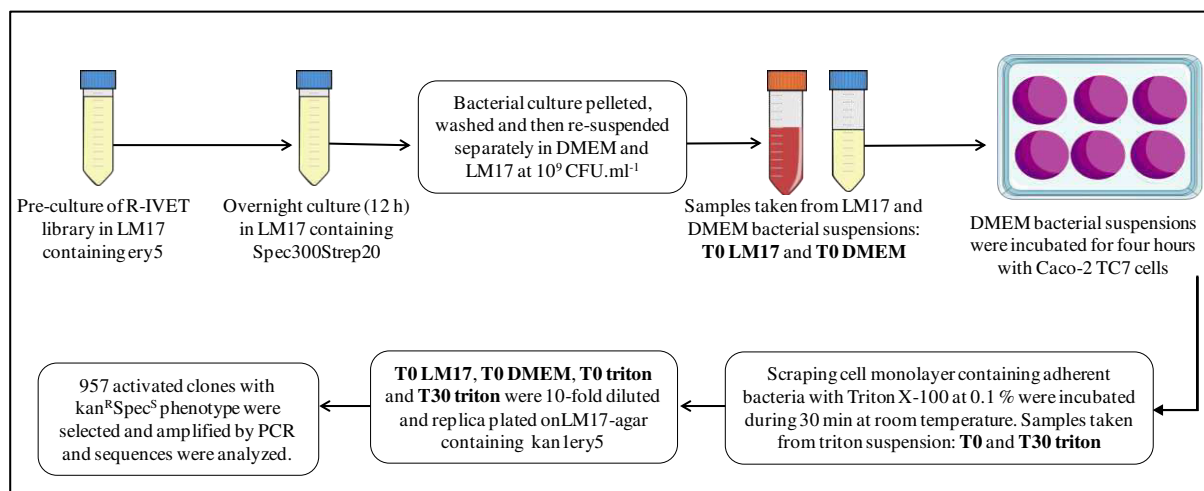


Figure 20: Schematic representation of the experimental approach employed to identify genes specifically induced during the adhesion of *S. thermophilus* LMD-9 to Caco-2 TC7 cells. (ery5: erythromycin at 5 µg.mL⁻¹. Spec300Strep20: spectinomycin at 300 µg.mL⁻¹ and streptomycin at 20 µg.mL⁻¹. Kan1ery5: kanamycin at 1 mg.mL⁻¹ and erythromycin at 5 µg.mL⁻¹).

II. 2. 5. Sequence analysis

Activated clones with Spec^SKan^R (spectinomycin sensible and kanamycin resistant clones with a promoter induced) phenotype from each sample were selected and analyzed by PCR using primers #3 and #4 (Tableau 8). Detection of 630 bp amplicon confirmed that the chromosomal R-IVET cassette had been deleted as a consequence of induction of the promoter located in the recombinant plasmids. The inserts present in the pULNcreB recombinant plasmids of each deleted clone were amplified by PCR using the primers #1 and #2 (Table 8). Amplified fragments were purified and sequenced with the same primers. DNA sequences were analyzed by NCBI BLASTn using the current annotated genome of the wild type *S. thermophilus* LMD-9 strain. A promoter prediction was performed on the sequences of the R-IVET inserts whose nucleotide sequences were located within a gene sequence by using the online promoter prediction tools the Softberry BPROM (Solovyev and Salamov, 2011) and the phiSITE PromoterHunter (Klucar et al., 2010).

Table 7 : Primers used in this study

Number	Name	Sequence
#1	REP-CRE-REV	GCTTCTGGAGGCTCAATTGAAAAG
#2	GENE-CRE-4F	ATTCAACTTGCACCATGCCG
#3	K7S+2F	CCAGGACAATAACCTTATAGC
#4	K7S+6r	GAAAGAGCCTGATGCACTCC

II. 3. Results and discussion

We have previously studied *in vitro* the adhesion ability of LMD-9 strain to three different IEC lines and it appeared to adhere moderately to these cells (Kebouchi et al., 2016). Indeed, the involvement of some surface proteins in the adhesion of this strain seemed to depend on the cell lines properties used in our laboratory conditions (Kebouchi et al., 2016). The results obtained with Caco-2 TC7 cells have shown that the inactivation of *srtA* and *mucBP* genes reduced significantly the adhesion capacity of LMD-9 strain suggesting their involvement in this process (Kebouchi et al., 2016). Contrariwise, the inactivation of *prtS* gene significantly increased the adhesion capacity of LMD-9 strain suggesting that the proteolytic activity of the protease PrtS could be unfavorable for adhesion to cell surface component such as brush-border proteins of Caco-2 cells (Kebouchi et al., 2016). Considering the striking effect of gene-mutations on LMD-9 adhesion capacity to Caco-2 TC7 cells, we have chosen this cell line for the present study in order to identify, in LMD-9 strain, the induced-genes during adhesion. Furthermore, the choice of this cell line also relies on the fact that several studies have already reported that Caco-2 cells exhibit morphological and functional enterocyte phenotype close to those found in human (for review sees Sambuy et al., 2005). To our knowledge, this study presents the first use of the R-IVET approach in order to identify the genetic profile of LMD-9 strain during *in vitro* adhesion to enterocyte-like cells (Caco-2). Before performing adhesion experiments, different preliminary tests on the R-IVET library were carried out.

II. 3. 1. Optimization of counter selection conditions of the R-IVET library

Experimental conditions for counter-selection were developed in order to exclude all or the great majority of recombinant clones carrying an inducible promoter under growth culture conditions i.e., to eliminate Spec^SKan^R clones (spectinomycin sensible and kanamycin

resistant clones with a promoter induced in growth culture conditions) and select Spec^RKan^S clones (spectinomycin resistant and kanamycin sensible with a chromosomal cassette). For this purpose, different concentrations of antibiotics were used. The conditions of the counter selection with different concentrations of antibiotics were already tested in a previous study (Uriot et al., 2016; Uriot et al., In preparation). Shortly, counter-selection was performed by pre-culturing the R-IVET library in LM17 medium supplemented with 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of erythromycin in order to select strains harboring the recombinant plasmid. Subsequently, strains were inoculated from pre-cultures during 12 h without shaking in LM17 medium containing antibiotics (spectinomycin and/or streptomycin) (for chromosomal cassette selection) at following concentrations: 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of spectinomycin, 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of spectinomycin, a mixed of 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of spectinomycin and 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of streptomycin, a mixed of 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of spectinomycin and 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of streptomycin (Junjua et al., 2014; Uriot et al., 2016). The overnight cultures were then 10-fold diluted and appropriate dilutions were plated onto LM17 agar supplemented with erythromycin 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (medium 1), a mix of spectinomycin 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and streptomycin 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (medium 2), and a mix of kanamycin 1 mg.mL^{-1} and erythromycin 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (medium 3).

The results obtained from medium 1 and 2 showed no significant difference in colony number (colony forming unit per mL, CFU.mL⁻¹) (Table 9). Thus, we focused only on the results obtained from medium 1 and 3. Otherwise, the growth of the R-IVET library appeared to be very slow in LM17 medium containing 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of spectinomycin, consequently, this condition was left. Among other conditions, the counter selection with spectinomycin 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and streptomycin 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ appeared to be the most efficient since colony number was the lowest with this condition (9,35E+04 Kan^R induced clones for a total number of 1,17E+09) (Table 9).

Our results are in agreement with those obtained in another study where the medium 3 gives the lowest colony number (Uriot et al., 2016; Uriot et al., In preparation). Based on these data, this condition was chosen to grow the R-IVET library overnight in LM17 medium containing spectinomycin 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ /streptomycin at 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Nevertheless, as it seemed difficult to completely eliminate the Kan^R induced clones, it was also chosen to systematically analyze the Kan^R clones obtained upstream the adhesion assay, i.e., at T0 LM17 and T0 DMEM. Furthermore, in order to eliminate all false positive clones that could

be generated from culture conditions and escaped the counter-selection, a negative control without eukaryotic cells was also undertaken upstream of adhesion experiments.

Table 8 : Results of R-IVET counter-selection as expressed by mean of clone number (CFU.ml⁻¹) of two independent experiments

Antibiotic concentrations (µg.ml ⁻¹) added in LM17 medium	LM17	LM17 Ery5 (medium 1)	LM17 Spec300Strep20 (medium 2)	LM17 Ery5Kana1000 (medium 3)
Spectinomycin 300	1,03E+09	1,10E+09	8,05E+08	2,68E+06
Spectinomycin 500	1,48E+09	7,30E+08	1,12E+09	3,00E+06
Spectinomycin 300 Streptomycin 20	1,17E+09	8,10E+08	1,22E+09	9,35E+04
Spectinomycin 500 Streptomycin 20	9,35E+08	4,20E+08	8,10E+08	9,25E+04

Ery5: erythromycin at 5 µg.mL⁻¹. Spec300Strep20: spectinomycin at 300 µg.mL⁻¹ and streptomycin at 20 µg.mL⁻¹.
Ery5Kana1000: erythromycin at 5 µg.mL⁻¹ and kanamycine at 1000 at 5 µg.mL⁻¹

II. 3. 2. R-IVET library survival in adhesion experiment conditions

The survival ability of the R-IVET library was studied in DMEM medium and in triton X-100 at 0.1 %. The experiment was carried out as previously described in adhesion experiment conditions without Caco-2 TC7 cells in order to determine whether the R-IVET library survive in these conditions. Results presented in Figure 21 showed no significant differences between survival of the wild-type LMD-9 strain and R-IVET library indicating that the DMEM medium has no effect on survival of the R-IVET library even after four hours of incubation. Similarly, treatment with triton X-100 at 0.1 % does not affect the survival ability of this strain. Thus, these results indicated that the adhesion experiment conditions have no effect on R-IVET library survival as compared to the wild type strain.

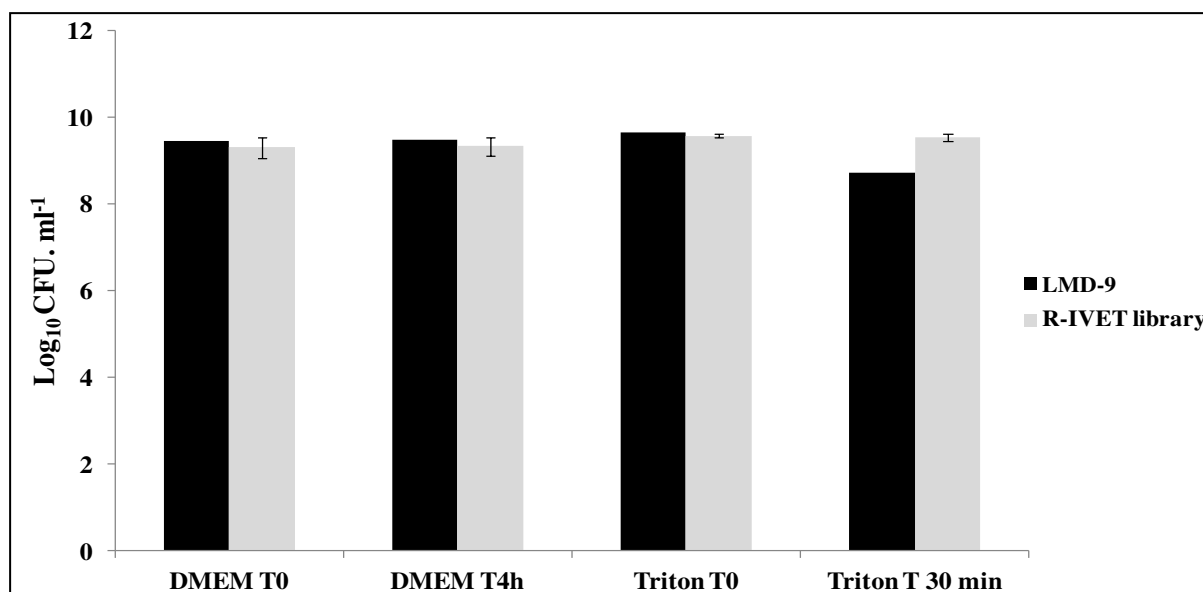


Figure 21: Survival of the R-IVET library in adhesion experiment conditions as compared to the wild type LMD-9 strain. Data represent means $\pm$ SEM from two independent experiments ($n = 2$) expressed by $\log_{10}$ CFU.mL⁻¹ viable bacterial population level determined by plate count.

II. 3. 3. Sequence analysis and identification of genes induced during adhesion to Caco-2 TC7 cells using R-IVET approach

➤ *Genes induced in negative control and in LM17 and DMEM media*

In order to identify genes that are specifically activated in LMD-9 strain during adhesion process, R-IVET library was incubated for four hours to these cells as described in Materials and Methods (Figure 19). Promoter-induced R-IVET strains had Kan^RSpec^S phenotype as the recombinase *Cre* was expressed and *specR* consequently excised from the chromosome cassette. To validate the adhesion experiment and the results obtained, a negative control was performed in order to identify genes that were induced in adhesion experiment conditions without Caco-2 TC7 cells. For this purpose, samples were taken at different experimental stages according to the protocol shown in Figure 20 but without eukaryotic cells. In addition, a sample of bacterial suspension was taken after four hours incubation in DMEM medium (in order to determine the induced-genes by DMEM medium after four hours incubation without intestinal cells). All samples were plated on LM17-agar medium supplemented with a mix of kanamycin 1 mg.mL⁻¹ and erythromycin 5 μ g.mL⁻¹ (activated clones selection). From the negative control (bacteria without eukaryotic cells), the inserts of fifty Kan^RSpec^S clones of each sample (T0 DMEM, T4h DMEM, T0 triton and T30

triton) were amplified by PCR and sequenced. Analysis from overall 200 clones isolated from negative control revealed that about 40 % of them consisted of multiple inserts, which were thus excluded. Eighty promoters from different genes were identified and observed at least two times for all samples. Most of them corresponded to promoters of transposases and pseudogenes. Other promoters of genes involved in basic cellular functions, for example, argininosuccinate synthase, Mg-dependent DNase, ATP-dependent DNA helicase, DNA polymerase I or PepS aminopeptidase were also detected.

➤ *Genes induced during adhesion to Caco-2 TC7 cells*

From the adhesion experiment, a total number of 957 Kan^RSpec^S activated clones were selected and inserts of these clones further analyzed. Before listing the adhesion induced-genes, medium and culture conditions were taken into account. From 957 activated clones, 257 and 226 Kan^RSpec^S clones were collected from T0 LM17 and T0 DMEM media, respectively, and sequences were then analyzed. Fifty three and seventy three promoters from different genes induced by LM17 and DMEM media, respectively, were then identified and observed at least two times for all samples. These genes are also involved in basic cellular functions such as DNA polymerase III, delta subunit, N-acetylglucosamine 6-phosphate deacetylase, tRNA nucleotidyltransferase/poly(A) polymerase.

The 474 Kan^RSpec^S activated clones from T0 triton and T30 triton corresponding to the adhesion process were also analyzed. Among these clones, we revealed about 50 % of them consisted of multiple inserts, which were thus excluded. All induced-genes obtained during adhesion were then compared with those obtained from culture conditions (T0 LM17 and T0 DMEM media) and negative control (without Caco-2 cells; see experimental procedure). Notably, after comparison, we revealed 56 promoter-induced genes. Moreover, antisense sequences located either in a promoter region (13) or inside gene sequences (19) were also identified (Table 10). Promoter prediction software had shown that one or more sequences could serve as promoter in all the identified sequences that are located within a gene. Altogether, these two results led to the conclusion that these sequences could encode small non coding RNA or belong to regions containing downstream a small open reading frame (ORF). The *S. thermophilus* genome is known to contain small ORFs encoding peptides involved in regulation mechanisms such as quorum sensing (Ibrahim et al., 2007a, 2007b).

R-IVET genes activated during adhesion to Caco-2 TC7 cells are listed in Table 10 and were grouped according to their cellular functions. They correspond to genes involved in protein biosynthesis (3 ORFs), cell surface proteins (4 ORFs), defense mechanisms (4 ORFs), nutrients absorption and metabolism (15 ORFs), regulators (2 ORFs), competence proteins (3 ORFs) and other genes involved in different cellular functions (19 ORFs). The remaining genes encode hypothetical proteins of unknown functions (6 ORFs) (Table 10).

Regarding our results, all of the identified genes appeared to be randomly distributed over the chromosome indicating that the detected activated genes were not clustered in the chromosome particular region (Table 10). Analyses of proteome of *S. thermophilus* LMD-9 after its passage through the digestive tract of gnotobiotic rats have revealed that induced-proteins were mainly related to glycolytic metabolism (Rul et al., 2011). Furthermore, this study has also shown that LMD-9 strain was able to colonize the digestive tract but required an adaptation phase (Rul et al., 2011). In our results, induced-genes in LMD-9 strain during adhesion to Caco-2 cells appeared to be not related only to cell surface components but other cellular proteins involved in different functions including nutrient absorption and metabolism, protein biosynthesis and defense mechanisms were also identified. On the basis of this diversity of functions, the first conclusion that can be drawn is that the bacterium needs to adapt its physiology in order to adhere to intestinal cells.

Four genes encoding cell surface proteins were induced during adhesion to Caco-2 cells (2 in T0 triton and 2 in T30min triton). These proteins appeared to be annotated as presented in Table 10 but are not well characterized in *S. thermophilus* LMD-9 strain. For instance, the gene STER_0574 encodes a CshA protein, containing an LPXTG-like motif, which shares 63 % identity with the CshA protein of *S. gordonii* DL1 strain. Its analysis *in silico* showed that the *cshA* gene of *S. thermophilus* LMD-9 is expressed as a precursor polypeptide. It has been shown that the inactivation of *cshA* encoding-gene in the oral bacterium *S. gordonii* DL1 led to the reduction in cell surface hydrophobicity and murine colonization (McNab et al., 1994; McNab et al., 1996). The fact that this gene was found to be induced in the LMD-9 strain during its adhesion to Caco-2 TC7 cells suggests that CshA protein might mediate the adhesion process.

Table 9 : *S. thermophilus* LMD-9 induced genes during *in vitro* adhesion to Caco-2 TC7 cells

Class ^b	ORF ^a (STER-/RS0)	Product or function ^b (new annotation Feb 2015)	Sense/ anti-sense ^c	Genome position	Adhesion to Caco-2 TC7 ^d	
					T0 Triton	T30 Triton
Cell surface proteins						
	STER_0314 (RS01525)	membrane protein	sens	270262-270470		×
	STER_0574 (RS02830)	surface-associated protein cshA	sens	518245-518397	×	
	STER_0758 (RS03720)	membrane protein	sens	690246-690721		×
	STER_1197 (RS05905)	rod shape-determining protein RodA	sens	1106940-1105929	×	
Protein biosynthesis						
	STER_0368 (RS01785)	serine--tRNA ligase	*sens	322147-321141		×
	STER_0423 (2070)	23S rRNA (uracil-5-)-methyltransferase RumA	*sens	368157-369166 368157-369181		×
	STER_0783 (RS0RS03840)	isoleucine--tRNA ligase	*sens	715785-716798 715785-716791	×	
Stress response						
	STER_B1 (RS09830)	acid-shock protein	sens	1282-301		×
	STER_1293 (RS06375)	multidrug ABC transporter ATP-binding protein	anti-sens	1201333-1202350		×
	STER_1313 (RS06480)	MATE family efflux transporter	sens	1218484-1218887	×	
	STER_1348 (RS06655)	Peptide ABC transporter ATPase	*anti-sens	1255962-1255041	×	
Nutrient absorption and metabolism						
	STER_0391 (RS01905)	cysteine desulphydrase	*sens	345914-346179	×	
	STER_0429 (RS02100)	3-oxoacyl-ACP synthase III	anti-sens	374511-374069	×	
	STER_0713 (RS03510)	phosphate ABC transporter substrate-binding protein	*sens	651008-650690		×
	STER_1009 (RS04975)	ABC-type phosphate transport system, permease component	sens	929980-930137		×
	STER_1293 (RS06375)	multidrug ABC transporter ATP-binding protein	anti-sens	1201333-1202350		×
	STER_1371 (RS06750)	galactokinase	sens	1281820-1280820	×	
	STER_1478 (RS07265)	phosphoserine phosphatase SerB	*sens	1384541-1384484	×	
	STER_1494 (RS07350)	spermidine/purescine ABC transporter permease	sens	1399529-1399241		×
	STER_1522 (RS07490)	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	sens	1428563-1427603 1428563-1427571	×	
	STER_1553 (RS07635)	glutamine amidotransferase	sens	1361583-1361200	×	
	STER_1558 (RS07660)	ATPase	*sens	1462899-1462760	×	
	STER_1566 (RS07700)	dihydroxyacid dehydratase	*anti-sens	1468250-1469229 1468250-1469261	×	
	STER_1743 (RS0RS08515)	branched-chain amino acid transporter	sens	1633154-1633062		×
	STER_1792 (RS08765)	argininosuccinate synthase	sens	1677399-677049		×
	STER_1992 (RS09740)	inosine 5'-monophosphate dehydrogenase	sens	1773889-1772923	×	
Regulators						
	STER_0216 (RS01050)	adaptor protein MecA	anti-sens	182455 -181444	×	
	STER_0583 (RS02870)	DNA-binding response regulator	sens	531843-530986	×	

Table 10. *S. thermophilus* LMD-9 induced genes during *in vitro* adhesion to Caco-2 TC7 cells (Continued)

Class ^b	ORF ^a	Product or function ^b (new annotation Feb 2015)	Sens/ anti-sens ^c	Genome position	Adhesion to Caco-2 TC7 ^d	
					T0 Triton	T30 Triton
Competence proteins						
	STER_0406 (RS01985)	competence protein	sens	355852-356858	×	
	STER_1122 (RS05550)	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	*anti-sens	1036085- 1036594		×
	STER_1477 (RS07260)	type II CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9	sens	1384541-1383531	×	
Other functions						
	STER_0044 (RS00225)	Pseudogene	sens	31016-29988		×
	STER_0055 (RS00280)	Transposase	*anti-sens	44609-43805		×
	STER_0102 (RS00510)	Transposase	anti-sens	80702-80891		×
	STER_0237 (RS01165)	Pseudogene	*anti-sens	202301-201856		×
	STER_0352 (RS01710)	ribosomal RNA small subunit methyltransferase G	*sens	308825-308525		×
	STER_0378 (RS01835)	Transporter	*anti-sens	331510-331327	×	
	STER_0571 (RS02815)	Pseudogene	*anti-sens	515583-516195	×	
	STER_0811 (3990)	Transposase	sens	746827-746519	×	
	STER_0849 (4180)	Transposase: ISL3 family transposase	sens	782019-782994		×
	STER_0927 (RS0RS04590)	FADH(2)-oxidizing methylenetetrahydrofolate-- tRNA-(uracil(54)-C(5))-methyltransferase TrmFO	*sens	858330-858443		×
	STER_1074 (RS05335 = RS09875)	voltage-gated chloride channel	sens	<u>998386-997351</u> 998386-997424		×
	STER_1179 (RS05820)	DNA repair protein RecN	*sens	1089736-1089641	×	
	STER_1272 (RS06280)	ribonuclease 3	sens	1183558-1182552	×	
	STER_1355 (RS06685)	transporter	*sens	1259390-1259212		×
	STER_1485 (RS07300)	arsenate reductase family protein	sens	1391653-1391193	×	
	STER_1760 (RS08600)	Transposase	*anti-sens	1645573-1645345	×	
	STER_1859 (RS09090)	alcohol dehydrogenase	sens	<u>1740375-1739341</u> <u>1740375-1739351</u> 1740375-1739384		×
	STER_1952 (RS09545)	5-methyltetrahydrofolate--homocysteine methyltransferase	sens	1810490-1810368	×	
	RS03970	Transposase	sens	741250-740216		×
Hypothetical proteins						
	STER_0004 (RS00020)	hypothetical protein	sens	3416-4150	×	
	STER_0290	annotation change: no similar match	anti-sens	253078-252966		×
	STER_0712 (RS03505)	hypothetical protein	sens	647294-648219		×
	STER_0830	hypothetical protein	sens	755652-756613	×	
	STER_1559 (RS07665)	hypothetical protein	sens	1464744-1463739	×	
	STER_1968 (RS09625)	hypothetical protein	sens	1818680-1819008	×	

(a): Insert identification and comparison to the *S. thermophilus* LMD-9 genome database presenting the old (STER_) and new (RS0) tag-locus.

(^b): Gene annotation was classified into 7 categories according to their predicted function and their conserved domain proteins.

(^c): Proper orientation of insert sequences relative to the gene sequences in their positions in the LMD-9 genome

(*) : DNA sequence of the insert corresponds to an internal sequence of the gene.

(^d): R-IVET library were incubated four hours with Caco-2 TC7 cells and adherent bacteria were detached from cells using triton X-100 at 0.1 % and samples were taken immediately after triton exposition (T0 triton) and after 30min of incubation at room temperature.

Other cell surface proteins were also detected including cell membrane division protein designated as rod shape-determining protein RodA (STER_1197). Research database revealed that this protein contains FtsW domain and appeared to be required in crossing peptidoglycan (PG) precursors outside the cell membrane, for PG biosynthesis and therefore maintaining cell shape and modulating cell wall morphology (Ishino et al., 1986). Furthermore, it has been shown that RodA protein is essential for the viability of *Bacillus subtilis* cells and in maintaining the cell surface shape (Henriques et al., 1998). In our previous study, we have demonstrated that depending on cell line models, some cell surface proteins are involved in LMD-9 adhesion *in vitro* (Kebouchi et al., 2016). Thus, we speculated that other surface non-proteinaceous compounds could be involved in this process in LMD-9 strain (Kebouchi et al., 2016). Therefore, to interact with cell surface compounds of Caco-2 cells, LMD-9 strain might modulate its cell shape by increasing PG biosynthesis in order to increase its adhesion capacity.

Another membrane protein encoding gene is STER_0758 which shows more than 90 % similarity with integral membrane protein of *S. salivarius*. According to research database, this gene product shares also 40 % similarity with ECF (energy-coupling factor)-type riboflavin transporter of *S. pyogenes* which is associated to transport and import of micronutrients (Eitinger et al., 2010). Thus, STER_0758 gene could be an ABC (ATP-binding cassette) transporter in LMD-9 strain. It should be noted that the adhesion of bacteria to IEC are initiated by the interactions established between cell surface components and microvillus membrane glycoconjugates of Caco-2 cells (for review see Sambuy et al., 2005). These interactions might include bacterial transporters which play critical roles in the maintenance of the cell membrane integrity (Eitinger et al., 2010). One therefore could speculate that genes encoding cell membrane transporters including STER_0758 gene could be involved in LMD-9 *in vitro* adhesion process.

In this study, other genes related to metabolism and nutrients acquisition including membrane transporter (STER_0713, STER_1009, STER_1293, STER_1494, STER_1743) were also detected during LMD-9 adhesion to Caco-2 cells. In addition to the nutrients acquisition and the cell growth, these transporters could also be involved in the maintenance in the membrane integrity, cell to cell communication stress resistance and colonization process (Eitinger et al., 2010). Indeed, studies in pathogenic streptococci have reported that ABC transporters are often linked to the virulence (Shelburne et al., 2008; Hava et al., 2002).

Moreover, inactivation of some genes encoding ATP-binding cassette transporters such as oligopeptide-permeases in *S. pneumoniae* resulted in a significant decrease in its nasopharynx colonization ability in mouse model (Kerr et al., 2004). An STM strategy applied in *Helicobacter pylori* has also revealed that two genes encoding multidrug transporters were absolutely essential for gastric colonization (Kavermann et al., 2003). Furthermore, in some LAB, genes encoding ABC transporters are also induced *in vivo* (Bron et al., 2004; Hanin et al., 2010). Although their primary role is the nutrients uptake, these membrane transporters could also be involved in bacterial adhesion. A putative membrane ABC transporter BopA in *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 plays a key role in the adhesion capacity of this strain to Caco-2 cells (Guglielmetti et al., 2008). All These data suggests that ABC transporters might play a role in the bacterial recognition of glycoconjugate receptors present on enterocyte-cell surface leading to the establishment of specific host-interactions with LAB including *S. thermophilus* LMD-9 strain. Furthermore, STER_0391 and STER_1743 gene products appeared to be related to amino acid metabolism and acquisition. Proteomic study performed in *Lb. fermentum* I5007 during its adhesion to Caco-2 cells revealed proteins involved in nutrients acquisition (Yang et al., 2007) suggesting that while bacteria interact with the intestinal mucosa, they need nutrients in order to thrive and colonize the intestine.

Two regulators (STER_0583 and STER_0216) were found to be induced in LMD-9 strain during adhesion to Caco-2 cells. In research database, STER_0583 gene product shares more than 70 % similarity with those of some pathogenic streptococci. This locus was designated as encoding DNA-binding response regulator which belongs to LytR/AlgR family regulators and it contains a LytTR domain. This regulator plays a key role in the rapid adaptation to environmental changes (Ayala et al., 2014). Furthermore, it is required for virulence in some pathogenic bacteria (Nikolskaya et al., 2002; Lizewski et al., 2002). In *S. suis* 05ZYH33, RevSC21 regulator that present 27 % similarity with LMD-9 DNA-binding response regulator, controls the attachment to human laryngeal epithelial cells and the expression of virulence genes (Wu et al., 2009). This suggests that this regulator might play a key role in adaptation of LMD-9 strain during adhesion and could be involved, even indirectly, in adhesion to Caco-2 cells *in vitro*.

Three other genes induced in LMD-9 strain are related to competence. In database analysis, STER_0406 gene product, designated as competence protein, shares 87 % identity with that of *S. salivarius*, 96 % with helicase of *S. vestibularis* and 58 % with competence

protein comFA of *S. equines*. The competence proteins promote the development of the competence state of bacteria for DNA uptake in a specific ecological niches leading therefore to microbial community associations (Jakubovics et al., 2014). In *S. pneumoniae*, competence regulon was induced during pneumococcal nasopharyngeal colonization, pneumonia and bacteremia, accompanied by gene recombination events and induction of competence-specific virulence (Zhu and Lau, 2013). Furthermore, the inactivation of genes encoding competence system in *S. mutans* NG8 leads to the formation of an abnormal biofilm (Li et al., 2002). On the other hand, Gardan and collaborators have reported that oligopeptides transport was essential for induction of natural competence in LMD-9 strain (Gardan et al., 2009). All these findings suggest that the competence state induced during adhesion could be due to either (i) other genes involved in the interaction with the enterocytes whose expression was induced by the competence-state of bacteria, or (ii) the induction of genes involved in the transport of nutrients in bacterial adhesion and which induced the state of competence in LMD-9 strain.

Four genes related to stress response were also induced during adhesion. In *Lb. plantarum* WCFS1, the same genes were also induced in the host after its passage through the mouse GIT (Bron et al., 2004). This study suggested that bacteria might need to eliminate the harmful molecules in order to colonize and persist in the GIT (Bron et al., 2004). Furthermore, in *Lb. reuteri* 100-23, stress-gene induced specifically during the colonization to the mouse GIT has been reported (Walter et al., 2003).

Nineteen other genes classified in the category “other functions” involved in different pathways were also identified in LMD-9 strain during its adhesion to Caco-2 cells. It concerns genes involved in DNA repair, transposition (horizontal gene transfer) and respiratory pathway. Other genes which are designated as pseudogenes were also detected. Finally, six hypothetical proteins were induced during LMD-9 adhesion suggesting their possible involvement in this process.

II. 4. Conclusion

Overall, our study has focused on identifying the induced-genes in *S. thermophilus* LMD-9 strain during its adhesion to Caco-2 TC7 cells using the R-IVET approach. Most induced-genes are linked to promoter activity allowing validation of the target sequences identified and, therefore, the functionality of our R-IVET system. However, some sequence-inserts containing intragenic fragments or in opposite orientation were also detected. As

suggested by Hanin et al. (2010) the fragments that are in opposite orientation might encode small non-coding RNAs or antisense-RNAs. Our findings corroborate those found induced in other bacteria either pathogens or non-pathogens confirming again the performance of our tool (Bron et al., 2004; Walter et al., 2003; Hanin et al., 2010). This first gene screening allows us the determination of the genetic behavior of LMD-9 strain in contact with intestinal cells *in vitro*.

References

- An, R., and Grewal, P.S. (2012). Selective Capture of Transcribed Sequences: A Promising Approach for Investigating Bacterium-Insect Interactions. *Insects* 3, 295–306.
- Angelichio, M.J., and Camilli, A. (2002). In vivo expression technology. *Infect. Immun.* 70, 6518–6523.
- Ayala, E., Downey, J.S., Mashburn-Warren, L., Senadheera, D.B., Cvitkovitch, D.G., and Goodman, S.D. (2014). A biochemical characterization of the DNA binding activity of the response regulator VicR from *Streptococcus mutans*. *PLoS ONE* 9, e108027.
- Bachmann, H., Kleerebezem, M., and van Hylckama Vlieg, J.E.T. (2008). High-throughput identification and validation of in situ-expressed genes of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4727–4736.
- Bron, P.A., Grangette, C., Mercenier, A., de Vos, W.M., and Kleerebezem, M. (2004). Identification of *Lactobacillus plantarum* genes that are induced in the gastrointestinal tract of mice. *J. Bacteriol.* 186, 5721–5729.
- Camilli, A., and Mekalanos, J.J. (1995). Use of recombinase gene fusions to identify *Vibrio cholerae* genes induced during infection. *Mol. Microbiol.* 18, 671–683.
- Castillo, A.R., Woodruff, A.J., Connolly, L.E., Sause, W.E., and Ottemann, K.M. (2008). Recombination-based in vivo expression technology identifies *Helicobacter pylori* genes important for host colonization. *Infect. Immun.* 76, 5632–5644.
- Couvigny, B., Thériault, C., Gautier, C., Renault, P., Briandet, R., and Guédon, E. (2015). *Streptococcus thermophilus* Biofilm Formation: A Remnant Trait of Ancestral Commensal Life? *PLoS ONE* 10.
- Delorme, C. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 274–277.
- Eitinger, T., Rodionov, D.A., Grote, M., and Schneider, E. (2011). Canonical and ECF-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular functions. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 3–67.
- EFSA 2010 <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/doc/1763.pdf>.

FDA (2002) "GRN No.49 Bifidobacterium lactis strain Bb12 and Streptococcus thermophilus strain Th4 " GRAS Notice inventory.

FDA (2012) "GRN No.378 Cultured [dairy sources, sugars, wheat, malt, and fruit- and vegetable based sources] fermented by [Streptococcus thermophilus, Bacillus coagulans, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus paracasei subsp. paracasei, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus sakei, Lactobacillus bulgaricus and Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii or mixtures of these strains] " GRAS Notice Inventory.

Gardan, R., Besset, C., Guillot, A., Gitton, C., and Monnet, V. (2009). The Oligopeptide Transport System Is Essential for the Development of Natural Competence in Streptococcus thermophilus Strain LMD-9. *J. Bacteriol.* 191, 4647–4655.

Guglielmetti, S., Tamagnini, I., Mora, D., Minuzzo, M., Scarafoni, A., Arioli, S., Hellman, J., Karp, M., and Parini, C. (2008). Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of Bifidobacterium bifidum to Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4695–4702.

Hanin, A., Sava, I., Bao, Y., Huebner, J., Hartke, A., Auffray, Y., and Sauvageot, N. (2010). Screening of in vivo activated genes in Enterococcus faecalis during insect and mouse infections and growth in urine. *PLoS ONE* 5, e11879.

Hava, D.L., and Camilli, A. (2002). Large-scale identification of serotype 4 Streptococcus pneumoniae virulence factors. *Mol. Microbiol.* 45, 1389–1406.

Henriques, A.O., Glaser, P., Piggot, P.J., and Moran, C.P. (1998). Control of cell shape and elongation by the rodA gene in Bacillus subtilis. *Mol. Microbiol.* 28, 235–247.

Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Dusko Ehrlich, S., et al. (2005). New insights in the molecular biology and physiology of Streptococcus thermophilus revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 435–463.

Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., and Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 365S–373S.

- Ibrahim, M., Guillot, A., Wessner, F., Algaron, F., Besset, C., Courtin, P., Gardan, R., and Monnet, V. (2007a). Control of the Transcription of a Short Gene Encoding a Cyclic Peptide in *Streptococcus thermophilus*: a New Quorum-Sensing System? *J Bacteriol* 189, 8844–8854.
- Ibrahim, M., Nicolas, P., Bessi res, P., Bolotin, A., Monnet, V., and Gardan, R. (2007b). A genome-wide survey of short coding sequences in streptococci. *Microbiology* 153, 3631–3644.
- Ishino, F., Park, W., Tomioka, S., Tamaki, S., Takase, I., Kunugita, K., Matsuzawa, H., Asoh, S., Ohta, T., and Spratt, B.G. (1986). Peptidoglycan synthetic activities in membranes of *Escherichia coli* caused by overproduction of penicillin-binding protein 2 and rodA protein. *J. Biol. Chem.* 261, 7024–7031.
- Iyer, R., Tomar, S.K., Kapila, S., Mani, J., and Singh, R. (2010). Probiotic properties of folate producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Food Research International* 43, 103–110.
- Jakubovics, N.S., Yassin, S.A., and Rickard, A.H. (2014). Community Interactions of Oral Streptococci. *ResearchGate* 87, 43–110.
- Junjua, M., Kechaou, N., Chain, F., Awussi, A.A., Roussel, Y., Perrin, C., Roux, E., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L.G., Le Roux, Y., et al. (2016). A large scale in vitro screening of *Streptococcus thermophilus* strains revealed strains with a high anti-inflammatory potential. *LWT - Food Sci. Technol.* 70, 78–87.
- Junjua, M., Galia, W., Gaci, N., Uriot, O., Genay, M., Bachmann, H., Kleerebezem, M., Dary, A., and Roussel, Y. (2014). Development of the recombinase-based in vivo expression technology in *Streptococcus thermophilus* and validation using the lactose operon promoter. *J. Appl. Microbiol.* 116, 620–631.
- Kavermann, H., Burns, B. P., Angerm ller, K., Odenbreit, K., Fischer, W., Melchers, K., and Haas, H. (2003). Identification and Characterization of *Helicobacter pylori* Genes Essential for Gastric Colonization. *J Exp Med.* 7,197(7):813-22.
- Kebouchi, M., Galia, W., Genay, M., Soligot, C., Lecomte, X., Awussi, A.A., Perrin, C., Roux, E., Dary-Mourot, A., and Le Roux, Y. (2016). Implication of sortase-dependent proteins of *Streptococcus thermophilus* in adhesion to human intestinal epithelial cell lines and bile salt tolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

- Kerr, A.R., Adrian, P.V., Estevão, S., de Groot, R., Alloing, G., Claverys, J.-P., Mitchell, T.J., and Hermans, P.W.M. (2004). The Ami-AliA/AliB permease of *Streptococcus pneumoniae* is involved in nasopharyngeal colonization but not in invasive disease. *Infect. Immun.* 72, 3902–3906.
- Klucar, L., Stano, M., and Hajduk, M. (2010). phiSITE: database of gene regulation in bacteriophages. *Nucleic Acids Res* 38, D366–D370.
- Lee, S.H., Hava, D.L., Waldor, M.K., and Camilli, A. (1999). Regulation and temporal expression patterns of *Vibrio cholerae* virulence genes during infection. *Cell* 99, 625–634.
- Lebeer, S., Claes, I., Tytgat, H.L.P., Verhoeven, T.L.A., Marien, E., von Ossowski, I., Reunanen, J., Palva, A., Vos, W.M. de, Keersmaecker, S.C.J.D., et al. (2012). Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 185–193.
- Li, Y.-H., Tang, N., Aspiras, M.B., Lau, P.C.Y., Lee, J.H., Ellen, R.P., and Cvitkovitch, D.G. (2002). A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 184, 2699–2708.
- Lizewski, S.E., Lundberg, D.S., and Schurr, M.J. (2002). The transcriptional regulator AlgR is essential for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect. Immun.* 70, 6083–6093.
- Mahan, M.J., Heithoff, D.M., Sinsheimer, R.L., and Low, D.A. (2000). Assessment of bacterial pathogenesis by analysis of gene expression in the host. *Annu. Rev. Genet.* 34, 139–164.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., et al. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *PNAS* 103, 15611–15616.
- McNab, R., Jenkinson, H.F., Loach, D.M., and Tannock, G.W. (1994). Cell-surface-associated polypeptides CshA and CshB of high molecular mass are colonization determinants in the oral bacterium *Streptococcus gordonii*. *Mol. Microbiol.* 14, 743–754.
- McNab, R., Holmes, A.R., Clarke, J.M., Tannock, G.W., and Jenkinson, H.F. (1996). Cell surface polypeptide CshA mediates binding of *Streptococcus gordonii* to other oral bacteria and to immobilized fibronectin. *Infect. Immun.* 64, 4204–4210.

- Nikolskaya, A.N., and Galperin, M.Y. (2002). A novel type of conserved DNA-binding domain in the transcriptional regulators of the AlgR/AgrA/LytR family. *Nucleic Acids Res.* 30, 2453–2459.
- Nishiyama, K., Sugiyama, M., and Mukai, T. (2016b). Adhesion Properties of Lactic Acid Bacteria on Intestinal Mucin. *Microorganisms* 4.
- Rabot, S., Rafter, J., Rijkers, G.T., Watzl, B., and Antoine, J.-M. (2010). Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics: Impact of Probiotics on Digestive System Metabolism. *J. Nutr.* 140, 677S–689S.
- Rediers, H., Rainey, P.B., Vanderleyden, J., and De Mot, R. (2005). Unraveling the secret lives of bacteria: use of in vivo expression technology and differential fluorescence induction promoter traps as tools for exploring niche-specific gene expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 217–261.
- Rizkalla, S.W., Luo, J., Kabir, M., Chevalier, A., Pacher, N., and Slama, G. (2000). Chronic consumption of fresh but not heated yogurt improves breath-hydrogen status and short-chain fatty acid profiles: a controlled study in healthy men with or without lactose maldigestion. *Am J Clin Nutr* 72, 1474–1479.
- Rul, F., Ben-Yahia, L., Chegiani, F., Wrzosek, L., Thomas, S., Noordine, M.-L., Gitton, C., Cherbuy, C., Langella, P., and Thomas, M. (2011). Impact of the metabolic activity of *Streptococcus thermophilus* on the colon epithelium of gnotobiotic rats. *J. Biol. Chem.* 286, 10288–10296.
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stamatii, A., and Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol. Toxicol.* 21, 1–26.
- Savaiano, D.A. (2014). Lactose digestion from yogurt: mechanism and relevance. *Am. J. Clin. Nutr.* 99, 1251S–5S.
- Saviola, B., Woolwine, S.C., and Bishai, W.R. (2003). Isolation of acid-inducible genes of *Mycobacterium tuberculosis* with the use of recombinase-based in vivo expression technology. *Infect. Immun.* 71, 1379–1388.

Shelburne, S.A., Davenport, M.T., Keith, D.B., and Musser, J.M. (2008). The role of complex carbohydrate catabolism in the pathogenesis of invasive streptococci. *Trends Microbiol.* 16, 318–325.

Solovyev, V., Salamov, A., 2011. Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies*. Nova Sci. Publ., Ed. R.W. Li 61–78.

Takamatsu, D., Osaki, M., and Sekizaki, T. (2001). Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. *Plasmid* 46, 140–148.

Terzaghi, B.E., and Sandine, W.E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl Microbiol* 29, 807–813.

Tooley, K.L., Howarth, G.S., Lymn, K.A., Lawrence, A., and Butler, R.N. (2006). Oral ingestion of *Streptococcus thermophilus* diminishes severity of small intestinal mucositis in methotrexate treated rats. *Cancer Biol. Ther.* 5, 593–600.

Uriot, O., Galia, W., Awussi, A.A., Perrin, C., Denis, S., Chalancon, S., Lorson, E., Poirson, C., Junjua, M., Le Roux, Y., et al. Use of the dynamic gastro-intestinal model TIM to explore the survival of the yogurt bacterium *Streptococcus thermophilus* and the metabolic activities induced in the simulated human gut. *Food Microbiology*.

Uriot, O., Galia, W., Roussel, Y., Lorson, E., Denis, S., Chalancon, Alric, M., Blanquet-Diot, S., and Dary-Mourot, A. Use of the Technology R-IVET to identify in *Streptococcus thermophilus* genes specifically expressed under simulated human digestion conditions and in presence of intestinal microbiota (in preparation).

Walter, J., Heng, N.C.K., Hammes, W.P., Loach, D.M., Tannock, G.W., and Hertel, C. (2003). Identification of *Lactobacillus reuteri* genes specifically induced in the mouse gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2044–2051.

Wu, T., Chang, H., Tan, C., Bei, W., and Chen, H. (2009). The orphan response regulator RevSC21 controls the attachment of *Streptococcus suis* serotype-2 to human laryngeal epithelial cells and the expression of virulence genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 292, 170–181.

Yang, F., Wang, J., Li, X., Ying, T., Qiao, S., Li, D., and Wu, G. (2007). 2-DE and MS analysis of interactions between *Lactobacillus fermentum* I5007 and intestinal epithelial cells. *Electrophoresis* 28, 4330–4339.

Zhu, L., and Lau, G.W. (2013). Therapeutic potential of the *Streptococcus pneumoniae* competence regulon. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11, 227–229.

PARTIE III :

DISCUSSION ET CONCLUSION

Synthèse des résultats, discussion et conclusion générale

Les bactéries lactiques (BL), utilisées dans l'industrie agro-alimentaire pour la fabrication des produits laitiers fermentés que nous consommons régulièrement comme le yaourt, pourraient représenter de véritables vecteurs contribuant à l'amélioration ou tout au moins au maintien de la santé humaine (Coudeyras and Forestier, 2010). Par exemple, l'effet de l'amélioration de la digestion du lactose chez les individus hypolactasiques liée aux ferments présents dans le yaourt, a été largement mis en avant et bien documenté (Savaiano, 2014). D'autres effets bénéfiques ont également été rapportés mais doivent encore être confirmés pour qu'ils soient reconnus (Bermudez-Brito et al., 2012). A l'heure actuelle, le nombre d'études scientifiques visant à étudier les BL probiotiques que ce soit *in vitro* ou *in vivo* atteint un nombre considérable, en témoignent d'ailleurs les 1970 articles apparaissant dans la base de données biomédicale Pubmed en tapant le mot clé « probiotic lactic acid bacteria ». Bien que ce nombre ne cesse d'augmenter, la compréhension des mécanismes d'action de ces bactéries probiotiques au niveau de l'hôte est loin d'être élucidée.

Certains effets bénéfiques exercés par les bactéries probiotiques sont liés à leur capacité de résistance aux conditions du tractus gastro-intestinal (TGI) et à leur capacité d'adhésion, au moins transitoire, à la muqueuse intestinale. C'est la raison pour laquelle la sélection *in vitro* des souches selon leur aptitude à résister aux conditions du TGI ainsi que leur capacité à adhérer aux cellules épithéliales intestinales semblent être incontournables en vue de sélectionner de meilleures souches à potentiel probiotique. D'ailleurs, la définition des probiotiques donnée par la FAO/WHO inclut la viabilité des microorganismes (FAO/WHO, 2001). Cependant, des études ont montré que même les bactéries non viables (corps bactériens, ADN, enzymes libérées après lyse des cellules bactériennes...) pouvaient contribuer à exercer des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, notamment sur la modulation du système immunitaire et l'atténuation des diarrhées infectieuses, bien que ces effets aient été moins marqués qu'avec des micro-organismes ingérés vivants (Zhang et al., 2005 ; Kolling et al., 2015 ; Rodríguez-Nogales et al., 2015). Ainsi, le respect des critères de résistance au stress digestif et d'adhésion pour les candidats probiotiques est nécessaire mais non indispensable (AFSSA, 2005). Par ailleurs, pour comprendre le comportement des bactéries vis-à-vis du stress digestif et durant l'adhésion à la muqueuse intestinale, des travaux sont entrepris afin d'identifier les déterminants génétiques impliqués dans ces processus (Lebeer et al., 2008 ; Koskenniemi et al., 2011).

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons choisi d'étudier la capacité d'adhésion de *Streptococcus (S.) thermophilus* mais aussi sa capacité de résistance au stress biliaire. *S. thermophilus* est une BL non seulement très utilisée dans la fabrication des produits laitiers fermentés mais également incorporée dans des produits probiotiques commerciaux. Le choix de cette bactérie réside également sur le fait qu'il a été prouvé qu'elle conférait des effets bénéfiques sur la physiologie de l'hôte (Delorme, 2008 ; Iyer et al., 2010b). En outre, cette bactérie, utilisée en co-culture avec *Lactobacillus (Lb.) bulgaricus* dans la fabrication du yaourt, pourrait être un facteur clé de l'effet santé de ce produit reconnu par l'EFSA en 2010 (EFSA, 2010). En effet, des études ont montré qu'elle produisait une β -galactosidase active lors de son passage dans le tractus digestif de rats axéniques et que sa production augmentait en présence du lactose (Drouault et al., 2002). De plus, Rul et ses collaborateurs ont montré que cette bactérie était capable (i) d'adapter sa physiologie aux conditions du TGI de rats gnotobiotiques par une induction des protéines du métabolisme carboné et (ii) de coloniser le tube digestif de ces animaux à hauteur de 10^8 UFC/g de fèces (Rul et al., 2011). Ces données indiquent ainsi que *S. thermophilus* est métaboliquement active dans le tractus digestif et que l'effet bénéfique du yaourt pourrait être dû, en partie, à cette bactérie.

Malgré les travaux réalisés sur *S. thermophilus*, sa physiologie lors du passage dans le TGI et en particulier sa résistance aux stress biliaire et acide, sa capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale ainsi que son impact sur l'épithélium restent encore largement méconnus. En outre, la réponse moléculaire de *S. thermophilus* vis-à-vis du stress du TGI et au contact des cellules épithéliales intestinales est loin d'être connue. Ainsi, l'objectif majeur de ce travail a été d'étudier, dans un premier temps, la survie de *S. thermophilus* LMD-9 aux sels biliaires et sa capacité d'adhésion *in vitro* aux différentes lignées cellulaires intestinales. Dans un second temps, l'impact de l'adhésion de cette souche a été étudié, d'une part sur l'expression des gènes bactériens durant l'adhésion *in vitro* aux cellules épithéliales et d'autre part, sur le renforcement de la barrière épithéliale par une évaluation du taux de mucines produites. En outre, afin d'étudier le rôle de certaines protéines de surface dans le stress biliaire, la survie des trois mutants *srtA*⁻, *prtS*⁻ et *mucBP*⁻ dérivant de la souche LMD-9 a été étudiée et comparée à celle de la souche sauvage, la présence effective de ces trois protéines sur la paroi bactérienne de la souche LMD-9 ayant été préalablement démontrée (Lecomte et al., 2014).

Des études antérieures, ayant analysé l'aptitude des souches de *S. thermophilus* à survivre au stress biliaire, ont rapporté que la résistance intrinsèque était variable (Vinderola and Reinheimer, 2003 ; Iyer et al., 2010a ; Ziar et al., 2014 ; Junjua et al., 2016 ; Uriot et al., 2016). Par exemple, Vinderola & Reinheimer (2003) ont montré, par mesure de densité optique, que la croissance de différentes souches de *S. thermophilus* étaient totalement inhibée en présence de 0,5 et 1 % de bile (Vinderola and Reinheimer, 2003). Au contraire, dans l'étude de Iyer et al. (2010), les souches RD102 et RD104 de *S. thermophilus* étaient résistantes à 0,5, 1 et 2 % de bile et aucun effet significatif sur la survie n'a été observée même après 180 min d'exposition au stress biliaire (Iyer et al., 2010a). Dans la même optique, Ziar et ses collaborateurs (2014) ont rapporté que la survie de *S. thermophilus* TA040 diminuait de 0,5 à 1 $\log_{10}$ UFC.ml⁻¹ après 12 h d'incubation en présence de 3-4 g.l⁻¹ de bile et que le taux de survie était affectée par la source de carbone présente dans le milieu (survie meilleure en présence de lactose qu'en présence de glucose) (Ziar et al., 2014). Ces données indiquent que la survie de *S. thermophilus* est variable en fonction des souches et des conditions expérimentales, à savoir des conditions de culture et d'exposition au stress (temps d'exposition et type de sels biliaires). De par cette variabilité, il est donc difficile de comparer de façon pertinente les études scientifiques entre elles.

Dans notre étude, nous avons utilisé la technique de numération des colonies bactériennes après une exposition des bactéries pendant 2 h à un mélange équimolaire de trois sels biliaires présentant une cytotoxicité différente dont deux sont libres (le cholate de sodium et le désoxycholate de sodium) et un conjugué (le taurocholate de sodium). Nous avons ainsi montré que la souche LMD-9 survivait jusqu'à une concentration de 3 mM en sels biliaires (la survie diminuait significativement de 5 $\log_{10}$ CFU.ml⁻¹ à 3 mM). Toutefois, aucune bactérie viable n'a été détectée au-delà de cette concentration.

Comme évoqué ci-dessus, plusieurs études ont été menées pour analyser la survie des souches de *S. thermophilus* aux stress rencontrés dans le TGI notamment au stress biliaire. Par contre, les mécanismes de résistance restent encore très peu étudiés. A notre connaissance, une seule étude a pu mettre en évidence le rôle des EPS dans la résistance de certaines souches de *S. thermophilus* au stress biliaire (Mozzi et al., 2009 ; Boke, 2010). Toutefois, la production des EPS dépend des souches et des conditions de culture (Boke, 2010 ; Zhang et al., 2014). Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons voulu étudier l'impact de l'inactivation de certains gènes codant des protéines de surface sur la survie de la souche

LMD-9. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence, pour la première fois à notre connaissance, l'implication des protéines PrtS et MucBP dans la résistance au stress biliaire de la souche LMD-9.

Bien que le rôle des protéines de surface dans l'adhésion bactérienne soit bien documenté chez de nombreuses BL, leur rôle et le mécanisme impliqué dans la résistance au stress biliaire ne sont pas ou peu abordés. En effet, certaines études réalisées chez quelques souches de lactobacilles ont montré que les gènes codant la sortase et la protéine MUB étaient induits après une exposition à la bile suggérant qu'ils pourraient être impliqués dans la résistance au stress biliaire (Pfeiler et al., 2007 ; Weiss and Jespersen, 2010 ; Duany et al., 2012).

Par ailleurs, la résistance aux sels biliaires des bifidobactéries et des lactobacilles est parfois liée à la présence d'une activité BSH (Bile salt hydrolase) (Ahn et al., 2003 ; Ziar et al., 2014). Ainsi, nous nous sommes interrogés sur la capacité de cette souche à hydrolyser les sels biliaires. Il faut noter qu'aucun homologue aux gènes *bsh* présents dans d'autres bactéries, notamment des BL, n'est présent dans le génome de la souche LMD-9. Comme la présence du gène *bsh* n'est pas toujours corrélée à la capacité d'hydrolyse des sels biliaires par les bactéries (Iyer et al., 2010a), des tests ont alors été réalisés afin de déterminer si la souche LMD-9 était capable d'hydrolyser les sels biliaires utilisés dans cette étude. Ces tests ont été effectués selon l'étude de Tae Ahn et al. (2003) avec le taurocholate, le cholate ainsi que le mélange des trois sels biliaires utilisés dans les tests de survie (Ahn et al., 2003). Nos résultats ont montré que la souche LMD-9 n'hydrolysait pas les sels biliaires utilisés dans nos conditions expérimentales suggérant ainsi une absence d'une activité BSH chez cette souche (résultats non montrés dans la thèse).

Les résultats de survie suggèrent ainsi que la souche LMD-9 est modérément résistante aux sels biliaires. Cette résistance pourrait être augmentée avec la matrice alimentaire. En effet, dans nos conditions expérimentales, la souche LMD-9 a été cultivée dans un milieu de culture LM17 en présence des sels biliaires. Ainsi, elle serait plus exposée aux effets drastiques de ces substances. Il a d'ailleurs été montré que la survie de la souche LMD-9 dans un système reproduisant les conditions digestives humaines était plus forte lorsque la souche était administrée en lait fermenté que lorsqu'elle était incorporée avant administration dans du lait liquide (Uriot et al., 2016). Ce phénotype a été également observé chez d'autres BL où la matrice alimentaire jouait un rôle important dans la protection des

bactéries contre les conditions de stress retrouvées dans le TGI (Pitino et al., 2012 ; Bove et al., 2013). Cette augmentation de la survie des BL avec le lait fermenté pourrait être liée à l'effet tampon de l'aliment et la protection des bactéries par les protéines laitières (Huang and Adams, 2004). Par ailleurs, afin d'augmenter la viabilité de certaines BL sensibles au stress du TGI lors de leur incorporation dans l'aliment, des formulations galéniques ou encore la micro-encapsulation ont été également développées et pourraient être utilisées, à long terme, dans l'industrie agro-alimentaire (Kailasapathy, 2002 ; Mandal et al., 2014).

Pour améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance de *S. thermophilus* aux stress rencontrés dans le TGI, une étude transcriptomique utilisant la technique R-IVET (recombinase-based *in vivo* expression technology) a été réalisée dans notre laboratoire sur la souche LMD-9 après son passage à travers un système dynamique multi-compartmenté TIM (TNO gastro-Intestinal Model) simulant les conditions digestives humaines. Cette étude a permis de détecter les gènes induits spécifiquement dans les conditions de stress acide et biliaire (Uriot et al., 2016 ; Uriot et al., en préparation). Il serait d'ailleurs intéressant de déléter ces gènes afin de confirmer leur rôle dans la réponse moléculaire de la résistance au stress digestif.

Par ailleurs, il serait également envisageable de déterminer l'impact des sels biliaires sur les propriétés adhésives de la souche LMD-9. Ceci pourrait se faire en étudiant la capacité d'adhésion de la souche après un pré-traitement aux sels biliaires. En effet, des études ont rapporté que les sels biliaires avait un impact sur l'enveloppe cellulaire des bactéries (Taranto et al., 2003 ; Taranto et al., 2006). De plus, il a également été montré une sous-expression des gènes codant les enzymes de biosynthèse des exopolysaccharides (EPS) au niveau transcriptomique et protéomique chez la souche *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 après son exposition à la bile (Koskenniemi et al., 2011). Ce même phénotype a été également montré chez *Lb. acidophilus* NCFM (Pfeiler et al., 2007). En outre, Lebeer et al. (2009) ont observé une augmentation de la capacité d'adhésion de *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 aux cellules Caco-2 et sa capacité à former des biofilms après l'inactivation du gène *welG* codant l'enzyme de biosynthèse d'EPS (Lebeer et al., 2009). Koskenniemi et al. (2011) ont ainsi suggéré que chez certains lactobacilles, les EPS auraient un effet protecteur dissimulant les adhésines et les protéines de surface, ce qui conduirait à une diminution de leur capacité d'adhésion (Koskenniemi et al., 2011).

Bien que toutes les études réalisées à ce jour, en utilisant des modèles cellulaires *in vitro* ou même *in vivo* dans des modèles animaux, nous permettent d'améliorer notre compréhension quant au comportement des bactéries probiotiques, des études transcriptomiques et protéomiques chez l'Homme, après une consommation quotidienne d'un lait fermenté contenant *S. thermophilus* seul, seraient intéressantes pour identifier les molécules induites au passage du tube digestif humain.

Dans la continuité de cette première partie, les propriétés adhésives de la souche LMD-9 *in vitro* a été également étudiée. Il faut noter qu'il existe plusieurs techniques *in vitro* pour évaluer l'aptitude des bactéries potentiellement probiotiques à adhérer à la muqueuse intestinale (Ouwehand and Salminen, 2003 ; Morelli, 2007).

Dans notre étude, nous avons opté pour une technique qui a été largement utilisée (Coconnier et al., 1992 ; Tuomola and Salminen, 1998 ; Turpin et al., 2012 ; Couvigny et al., 2015) dans la sélection de nouvelles souches probiotiques. Cette technique consiste à mesurer la capacité d'adhésion en utilisant des lignées cellulaires d'origine humaine qui se différencient *in vitro* et forment une monocouche cellulaire polarisée mimant ainsi l'épithélium intestinal. Après une mise en contact des bactéries avec les cellules pendant un temps préalablement défini, la technique est suivie d'une numération des bactéries adhérentes sur milieu gélosé. Cette technique permet une première évaluation des propriétés d'adhésion de la bactérie et un premier criblage pour sélectionner de nouvelles souches potentiellement probiotiques en vue d'essais cliniques (Turpin et al., 2012). Dans des études antérieures, les lignées cellulaires Caco-2 et HT-29, non productrices de mucus, étaient les plus utilisées pour évaluer les propriétés adhésives des souches (Tuomola and Salminen, 1998 ; Jacobsen et al., 1999 ; Ouwehand and Salminen, 2003). Il faut noter que l'épithélium est couvert d'une couche de mucus qui joue un rôle crucial dans l'adhésion des bactéries commensales et probiotiques. Ces dernières décennies, l'utilisation de lignées cellulaires capables de produire une couche de mucus est devenue une approche primordiale permettant de compléter l'étude de l'adhésion aux cellules dépourvues de mucus. C'est la raison pour laquelle dans notre étude nous avons utilisé trois modèles cellulaires ayant des propriétés de surface différentes (Augeron and Laboisse, 1984 ; Lesuffleur et al., 1993 ; Sambuy et al., 2005). Il s'agit des lignées cellulaires productrices de mucus HT29-MTX et HT29-CL. 16E et les cellules entérocytaires Caco-2 TC7. L'utilisation de ces trois lignées a donc permis d'étudier *in vitro*

les propriétés adhésives de la souche LMD-9 avec les différentes mucines qu'elle peut rencontrer dans le TGI.

Dans la suite de ce travail, nous nous sommes interrogés sur les éléments mécanistiques de la souche LMD-9 mis en œuvre dans le processus d'adhésion. C'est pourquoi nous avons inclus dans cette étude les trois mutants *srtA*⁻, *prtS*⁻ et *mucBP*⁻ afin de déterminer l'implication de ces protéines dans l'adhésion. En effet, leur rôle dans ce processus a déjà été mis en évidence chez d'autres BL notamment les lactobacilles (Buck et al., 2005 ; Habimana et al., 2007 ; Mackenzie et al., 2010 ; Muñoz-Provencio et al., 2012 ; Le et al., 2013). Cependant, à nos connaissances, à ce jour, aucune étude n'a été réalisée chez *S. thermophilus* LMD-9 pour élucider les mécanismes moléculaires de l'adhésion. Les résultats de cette première partie a fait l'objet d'une première publication parue en 2016 dans *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Les travaux réalisés dans cette étude ont montré que la souche LMD-9 adhéraient *in vitro* aux différentes lignées cellulaires ce qui est en accord avec les études précédentes (Couvigny et al., 2015 ; Junjua et al., 2016). Cette capacité d'adhésion pourrait contribuer à la colonisation des intestins. Une étude réalisée *in vivo* a d'ailleurs rapporté que la souche LMD-9 était capable de coloniser le tube digestif de rats gnotobiotiques après 4 semaines d'inoculation (gavage oral de la souche cultivée dans du lait) (Rul et al., 2011). L'adhésion bactérienne de *S. thermophilus* est une propriété très intéressante étant donné qu'elle pourrait contribuer à certaines activités probiotiques. Par exemple, l'effet de l'adhésion de *S. thermophilus* ATCC19258 en association avec *Lb. acidophilus* ATCC4356 limiterait l'adhésion et l'invasion d'*Escherichia coli* entéroinvasive 029:NM sur des cellules épithéliales Caco-2 et HT29/cl.19A (Resta-Lenert and Barrett, 2003). En outre, d'autres effets pouvant être liés, de manière directe ou indirecte aux propriétés d'adhésion de *S. thermophilus* LMD-9, ont déjà été rapportés. Ainsi, des travaux ont montré qu'un traitement de rats atteints d'une mucite, induite suite à un traitement au méthotrexate, avec un yaourt composé de *Lb. bulgaricus* et *S. thermophilus* améliorait la fonction barrière de l'épithélium de l'intestin grêle (Southcott et al., 2008). En outre, Tooley et ses collaborateurs ont également observé qu'un traitement avec *S. thermophilus* TH-4 à une dose de 10⁹ UFC.ml⁻¹ atténuait partiellement les lésions de l'intestin grêle chez les rats atteints d'une mucite induite par le méthotrexate (Tooley et al., 2006). Par ailleurs, une étude a montré un effet inhibiteur *via* une production de lactate *in vitro* de l'infection expérimentale liée à

Clostridium (C.) difficile TL24 (Kolling et al., 2012). Un effet similaire de la souche LMD-9 notamment sur le soulagement des symptômes liés à *C. difficile* TL24 a été également observé *in vivo* chez des souris (Kolling et al., 2012). Ces données suggèrent que *S. thermophilus* serait un véritable facteur protecteur au niveau intestinal et sa capacité d'adhésion, même transitoire, serait une propriété dynamisant ces effets. Il serait donc intéressant d'envisager des études chez l'Homme afin de montrer l'effet antagoniste de cette bactérie.

Par ailleurs, il faut noter que des molécules bactériennes comme les thermophilines ou les exopolysaccharides (EPS) pourraient être produites par *S. thermophilus* lorsqu'elle est au contact de la muqueuse du tube digestif. Ces molécules peuvent prévenir des maladies comme les gastrites chroniques et peuvent contribuer ainsi à la protection de la muqueuse (Rodríguez et al., 2009 ; Marcial et al., 2017). En effet, la souche CRL1190 produit des EPS qui permettraient de prévenir les gastrites chroniques chez les souris et de protéger la muqueuse (Rodríguez et al., 2009). De plus, il a été montré récemment que cette souche était également capable d'adhérer aux tissus de l'estomac d'origine humaine et d'inhiber l'infection de la bactérie pathogène *Helicobacter pylori* (Marcial et al., 2017). Toutes ces données indiquent l'importance du processus d'adhésion dans la protection et la prévention des maladies de la muqueuse intestinale.

L'étude de l'adhésion a permis de montrer, qu'en fonction du type cellulaire, les protéines de surface joueraient un rôle important dans l'adhésion de la souche LMD-9. Avec les cellules Caco-2 TC7, l'adhésion des mutants était significativement affectée contrairement aux cellules HT29-MTX. Avec les cellules HT29-CL. 16E, seule l'inactivation du gène *mucBP* réduisait de façon significative la capacité d'adhésion de la souche LMD-9. Ces données suggèrent d'une part que d'autres molécules seraient impliquées dans l'adhésion de cette souche et d'autre part, que la composition de la surface des cellules eucaryotes aurait une forte influence sur les interactions cellules/bactéries. D'ailleurs, des études ont montré que certaines protéines de surface de *Lb. rhamnosus* GG adhéraient aux mucines et s'attachaient spécifiquement à des groupements glycosylés de ces mucines (von Ossowski et al., 2011 ; Nishiyama et al., 2016a). Ces données indiquent ainsi qu'il existe une affinité spécifique entre les protéines de surface et les récepteurs glycanes liés aux mucines ce qui pourrait expliquer le profil variable d'adhésion des mutants dans nos conditions. Ces groupements glycosylés pourraient être utilisés par les bactéries à la fois comme des sites d'attachement et comme source d'énergie (Etzold and Juge, 2014 ; Nishiyama et al., 2016b).

Des études réalisées en utilisant la microscopie à force atomique (AFM pour atomic force microscope) ont rapporté que les protéines MUB auraient une spécificité de fixation aux glycanes des mucines sialylées (Etzold et al., 2014 ; Gunning et al., 2016). Ainsi, une purification des protéines PrtS et MucBP, ou utiliser des mutants comme par exemple le mutant *srtA⁻* qui permet la libération de la protéase PrtS dans le milieu extracellulaire (Awussi et al., en préparation), pourrait permettre d'étudier leurs interactions avec les mucines des cellules épithéliales *in vitro* en utilisant l'AFM. Ces travaux permettraient ainsi d'identifier les groupements glycosylés auxquels les protéines de surface vont spécifiquement interagir durant le processus d'adhésion.

Dans notre étude, nous avons utilisé trois modèles cellulaires différents afin de se rapprocher le plus possible des conditions *in vivo*. Bien que ces modèles ne reflètent pas complètement les propriétés physiologiques de la muqueuse intestinale, ils nous permettent d'évaluer *in vitro* la capacité d'adhésion des bactéries et d'étudier le mécanisme par lequel elles interagissent avec les composants de surface cellulaire de ces modèles. En effet, chaque modèle cellulaire présente des propriétés spécifiques de surface. Au vu de nos résultats, le choix du modèle cellulaire reste un élément crucial à prendre en compte avant toute étude ou criblage préliminaire de nouvelles souches d'intérêt probiotique. Il serait donc intéressant d'effectuer ces criblages sur différentes lignées cellulaires afin de pouvoir mettre en évidence leur capacité d'adhésion.

Compte-tenu des résultats obtenus avec les mutants, d'autres molécules de surface seraient probablement impliquées dans l'adhésion de la souche LMD-9. D'ailleurs, plusieurs études *in vitro* ont pu mettre en évidence le rôle de molécules de surface non protéiques de la paroi cellulaire ou d'autres protéines (de surface ou cytoplasmiques) dans l'adhésion chez les lactobacilles. Par exemple, il a été montré que les acides lipotéichoïques jouaient un rôle primordial dans l'adhésion de *Lb. johnsonii* La1 aux cellules Caco-2 et dans la colonisation intestinale de *Lb. reuteri* 100-23 (Granato et al., 1999 ; Walter et al., 2007). Chez *B. breve* UCC2003, les EPS seraient des facteurs importants dans la colonisation et la persistance dans le TGI de la souris (Fanning et al., 2012). D'autres protéines cytoplasmiques pouvant être associées à la surface cellulaire des bactéries peuvent être impliquées dans l'adhésion. Cela a déjà été montré chez certains lactobacilles par exemple pour le facteur d'élongation TU (EFTU) (Dhanani and Bagchi, 2013) ou la protéine chaperonne GroEL (Bergonzelli et al., 2006). En outre, Rul et ses collaborateurs ont montré par une approche protéomique que ces

deux protéines (EFTU et GroEL) étaient induites chez la souche LMD-9 après son passage dans le TGI de souris gnotobiotiques, suggérant ainsi leur implication dans l'adhésion et dans la colonisation de l'épithélium intestinal (Rul et al., 2011).

Dans l'hypothèse qui sous-tend que d'autres molécules seraient potentiellement impliquées dans l'adhésion de la souche LMD-9, nous avons réalisé une étude transcriptomique afin de compléter les résultats obtenus ci-dessus. Pour cela, nous avons utilisé l'approche R-IVET à sélection positive (deux gènes rapporteurs). Cette technique vise à identifier des promoteurs spécifiquement activés dans certaines conditions, en l'occurrence l'adhésion de la souche LMD-9 à des cellules eucaryotes. Compte-tenu des résultats obtenus avec le profil des mutants en fonction du modèle cellulaire, nous avons choisi les cellules Caco-2 TC7 avec lesquelles l'effet des mutations des gènes sur la capacité d'adhésion de LMD-9 était le plus marqué (Kebouchi et al., 2016).

Ainsi, la banque R-IVET (souches dérivées de LMD-9 génétiquement modifiées abritant une construction chimérique au niveau du chromosome et un plasmide recombinant) a été mise en contact pendant 4 h avec les cellules Caco-2 TC7. Comme le génome de la souche LMD-9 est entièrement séquencé et disponible dans les bases de données en ligne, cela nous a permis l'identification des séquences des promoteurs induits durant l'adhésion de cette souche et par conséquent les gènes correspondants et leurs fonctions putatives. C'est ainsi que nous avons pu identifier, à notre connaissance pour la première fois, 56 gènes spécifiquement induits durant l'adhésion de la souche LMD-9 aux cellules Caco-2 TC7. Ces gènes sont liés à différentes fonctions physiologiques comme le métabolisme, le transport et l'acquisition de nutriments, la synthèse des protéines, la réponse au stress, des gènes régulateurs, des protéines de compétence, des protéines de surface et d'autres gènes impliqués dans diverses fonctions.

De rares études se sont penchées sur la détermination de la réponse moléculaire des BL spécifiquement durant leur adhésion à l'épithélium intestinal *in vitro* (Yang et al., 2007 ; Mangiapane et al., 2013). Toutefois, certaines études transcriptomiques et protéomiques ont pu déterminer les éléments génétiques liés au passage des BL à potentiel probiotique dans le tube digestif de modèles animaux (Bron et al., 2004 ; Walter et al., 2003 ; Denou et al., 2007 ; Hanin et al., 2010). Ces études apportent des informations globales sur le comportement des bactéries lors du passage du tube digestif mais elles ne déterminent pas les entités génétiques spécifiquement liés à l'adhésion. Par exemple, Rul et ses collaborateurs (2011) ont déterminé,

par une approche protéomique *in vivo* lors du passage du tube digestif de la souche LMD-9, que les protéines induites étaient principalement liées au métabolisme carboné (Rul et al., 2011). En outre, une autre étude a pu identifier chez *Lb. plantarum* WCFS1 par l'approche R-IVET une panoplie de gènes liés à différentes fonctions après son passage du tube digestif de la souris (Bron et al., 2004). En plus des protéines de surface qui ont été largement mises en avant dans les processus d'adhésion notamment par inactivation de gènes (Buck et al., 2005 ; Jensen et al., 2014 ; Call et al., 2015), il semblerait que d'autres gènes soient également impliqués dans l'adaptation des bactéries lorsqu'elles sont au contact des cellules épithéliales. D'ailleurs, des travaux entrepris sur la souche LMD-9 ont rapporté qu'une phase d'adaptation était requise pour la colonisation du tube digestif de souris gnotobiotiques (Rul et al., 2011).

La suite de ce travail requiert de confirmer les gènes identifiés durant l'adhésion aux cellules épithéliales par un second passage des clones abritant ces gènes après avoir réintroduit le plasmide pULNcreB dans une souche qui possède la cassette R-IVET chromosomique. Suite à ce deuxième passage, les gènes confirmés devront être validés expérimentalement. Cela impliquera d'inactiver ces gènes et de déterminer la capacité d'adhésion des mutants générés aux cellules Caco2. Bien que le R-IVET soit une technique présentant certains avantages comme la détection des gènes faiblement ou transitoirement exprimés, elle a tout de même des inconvénients. En effet, cette technique ne permet pas d'évaluer le niveau d'expression des gènes induits. Ainsi, elle pourrait éventuellement être complétée par une RT-PCR semi-quantitative afin de quantifier le taux d'expression des gènes induits dans nos conditions.

L'adhésion bactérienne des BL probiotiques à la muqueuse intestinale pourrait conduire au renforcement de l'effet barrière de l'épithélium. D'après la littérature, cet effet serait lié d'une part à la surproduction de mucus et des protéines des jonctions serrées et d'autres part à la stimulation du développement des cellules caliciformes (Caballero-Franco et al., 2007 ; Anderson et al., 2010). Ainsi, plusieurs études *in vitro* utilisant des modèles cellulaires ont rapporté que certains lactobacilles induisaient l'expression des gènes ainsi que la quantité de mucines sécrétées (Mack et al., 1999; Mack et al., 2003). A notre connaissance, l'impact de l'adhésion *in vitro* de la souche LMD-9 sur la couche de mucus n'a jamais été abordé auparavant.

Ainsi, trois lignées cellulaires ont été étudiées pour quantifier l'expression des gènes codant les mucines après leur mise en contact avec la souche LMD-9. Dans nos conditions

expérimentales, la souche LMD-9 ne modulait pas l'expression des gènes codant les mucines sécrétées MUC2 et MUC5AC. Bien que ces données résultent d'une étude préliminaire qui nécessite d'être confirmée, on pourrait tout de même suggérer que la souche LMD-9 pourrait n'avoir aucun effet sur l'expression des mucines ou que les conditions expérimentales employées (conditions de culture cellulaire/bactérienne, temps d'incubation des bactéries avec les cellules...) ne permettent pas d'observer une induction de l'expression des gènes eucaryotes par les bactéries. Il est néanmoins à souligner que les conditions expérimentales que nous avons employées ont permis de mesurer un effet significatif de *Lb. rhamnosus* GG sur l'expression du gène *MUC5AC*.

L'effet des bactéries adhérees pourrait s'appliquer de façon post-transcriptionnelle, notamment sur l'excrétion des mucines et donc sur leur quantité (Caballero-Franco et al., 2007). Dans notre étude, nous n'avons malheureusement pas réussi à quantifier la quantité de mucines dans nos conditions, en raison de la faible concentration des protéines obtenues après extraction et la difficulté de leur détection par immunoblot. Une phase de mise au point est donc absolument nécessaire et il pourrait être judicieux d'utiliser d'autres techniques notamment la méthode immuno-enzymatique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) pour une meilleure quantification de la sécrétion des mucines après adhésion des bactéries (Wan et al., 2014). Alternativement, comme cela a été décrit par Wang et ses collaborateurs (2014) sur les cellules épithéliales LS174T, la méthode de coloration PAS (Periodic Acid Schiff) pourrait également être utilisée pour déterminer l'impact de l'adhésion bactérienne sur le niveau de mucines produites (Wang et al., 2014).

Par ailleurs, une étude réalisée en utilisant une co-culture de souches vivantes de *Lb. acidophilus* et *S. thermophilus* a montré que ces deux bactéries augmentaient la résistance transépithéliale de la monocouche cellulaire des lignées Caco-2 et HT29-cl.19A en maintenant l'intégrité structurale des jonctions serrées intercellulaires (Resta-Lenert and Barrett, 2003). *S. thermophilus* pourrait donc avoir un effet plutôt sur les protéines des jonctions serrées que sur les mucines sécrétées. Ainsi, des études de quantification de l'expression des gènes codant les protéines des jonctions serrées comme, par exemple, les protéines zonula occludens (ZO-1) et de l'occludine pourraient être envisagées. En outre, un effet de *S. thermophilus* sur la différenciation et la production des cellules caliciformes a été également observé dans le TGI de rats gnotobiotiques. Ces travaux ont montré que cette bactérie augmentait le nombre des cellules caliciformes au niveau de l'épithélium intestinal et

que cet effet serait probablement lié à la production de l'acide lactique (Wrzosek et al., 2012). Toutes ces données indiquent que le rôle de *S. thermophilus* n'est pas juste limité à la digestion du lactose et que d'autres effets seraient également exercés par cette bactérie dans le TGI.

Pour conclure, les travaux menés lors de cette thèse ont permis de mettre en évidence les propriétés adhésives de *S. thermophilus* LMD-9 *in vitro* aux différentes lignées cellulaires ainsi que sa capacité de résistance aux sels biliaries. Nous avons également déterminé l'importance de certaines protéines de surface dans ces deux processus suggérant l'existence d'un lien entre la résistance de la bactérie au stress rencontré dans le tube digestif et sa capacité à coloniser la muqueuse intestinale. De plus, ces travaux de thèse ont permis d'apporter des premiers éléments significatifs quant aux stratégies employées par la bactérie pour adhérer. Ces stratégies seraient *a priori* liées à plusieurs entités moléculaires définissant des voies métaboliques différentes notamment celles qui permettent l'adaptation à de nouvelles niches écologiques (gènes de stress, de métabolisme carboné, d'acquisition de nutriments, de compétence...). Ainsi, il semblerait que la réponse moléculaire des bactéries au contact des cellules épithéliales soit spécifique à chaque souche, suggérant ainsi que plusieurs réponses mécanistiques coexistent au sein d'une même espèce. L'étude de l'adhésion de la souche LMD-9 dans nos conditions a permis non seulement de confirmer l'importance des protéines de surface dans ce processus, mais a aussi révélé la complexité du phénomène d'adhésion qui fait intervenir plusieurs familles de molécules et pas seulement celles liées à la surface bactérienne. A l'heure actuelle, les études génomiques et protéomiques visent à caractériser le potentiel probiotique des souches en déterminant des biomarqueurs liés à l'adhésion et à la résistance au stress acide et biliaire. L'identification de ces biomarqueurs conduirait ainsi à la compréhension du comportement bactérien vis-à-vis des conditions de stress rencontrés dans le tube digestif, leur capacité de persistance et de colonisation au niveau de la muqueuse intestinale et leur pouvoir à exercer des effets santé.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

AFSSA <https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT-Ra-PreprobiotiqEN.pdf>

Ahn, Y.T., Kim, G.B., Lim, K.S., Baek, Y.J., and Kim, H.U. (2003). Deconjugation of bile salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates. *Int. Dairy J.* 13, 303–311.

Aiba, Y., Nakano, Y., Koga, Y., Takahashi, K., and Komatsu, Y. (2015). A highly acid-resistant novel strain of *Lactobacillus johnsonii* No. 1088 has antibacterial activity, including that against *Helicobacter pylori*, and inhibits gastrin-mediated acid production in mice. *MicrobiologyOpen* 4, 465–474.

Alander, M., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T., Mattila-Sandholm, T., and von Wright, A. (1997). Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 361–364.

Alcimed (2009) Les probiotiques, un marché qui s'essouffle. Communiqué de Presse.

Alcántara, C., and Zúñiga, M. (2012). Proteomic and transcriptomic analysis of the response to bile stress of *Lactobacillus casei* BL23. *Microbiol. Read. Engl.* 158, 1206–1218.

Al-Ghazzewi, F.H., and Tester, R.F. (2016). Biotherapeutic agents and vaginal health. *J. Appl. Microbiol.*

Almeida, C.C., Lorena, S.L.S., Pavan, C.R., Akasaka, H.M.I., and Mesquita, M.A. (2012). Beneficial effects of long-term consumption of a probiotic combination of *Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium breve* Yakult may persist after suspension of therapy in lactose-intolerant patients. *Nutr. Clin. Pract. Off. Publ. Am. Soc. Parenter. Enter. Nutr.* 27, 247–251.

Aloisio, I., Santini, C., Biavati, B., Dinelli, G., Cencič, A., Chingwaru, W., Mogna, L., and Di Gioia, D. (2012). Characterization of *Bifidobacterium* spp. strains for the treatment of enteric disorders in newborns. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 1561–1576.

Alp, G., and Aslim, B. (2010). 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* 16, 101–105.

Alp, G., Aslim, B., Suludere, Z., and Akca, G. (2010). The role of hemagglutination and effect of exopolysaccharide production on bifidobacteria adhesion to Caco-2 cells in vitro. *Microbiol. Immunol.* 54, 658–665.

Anderson, J.W., and Gilliland, S.E. (1999). Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *J. Am. Coll. Nutr.* 18, 43–50.

Anderson, R.C., Cookson, A.L., McNabb, W.C., Park, Z., McCann, M.J., Kelly, W.J., and Roy, N.C. (2010). *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiol.* 10, 316.

Ashraf, R., and Shah, N.P. (2014). Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54, 938–956.

Ataie-Jafari, A., Larijani, B., Alavi Majd, H., and Tahbaz, F. (2009). Cholesterol-lowering effect of probiotic yogurt in comparison with ordinary yogurt in mildly to moderately hypercholesterolemic subjects. *Ann. Nutr. Metab.* 54, 22–27.

Augeron, C., and Laboisse, C.L. (1984). Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res.* 44, 3961–3969.

Avall-Jääskeläinen, S., and Palva, A. (2005). *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 511–529.

-B-

Bajor, A., Gillberg, P.-G., and Abrahamsson, H. (2010). Bile acids: short and long term effects in the intestine. *Scand. J. Gastroenterol.* 45, 645–664.

Basu, S., Paul, D.K., Ganguly, S., Chatterjee, M., and Chandra, P.K. (2009). Efficacy of high-dose *Lactobacillus rhamnosus* GG in controlling acute watery diarrhea in Indian children: a randomized controlled trial. *J. Clin. Gastroenterol.* 43, 208–213.

Beausoleil, M., Fortier, N., Guénette, S., L'ecuyer, A., Savoie, M., Franco, M., Lachaine, J., and Weiss, K. (2007). Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus*

CL1285 and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Can. J. Gastroenterol. J. Can. Gastroenterol.* 21, 732–736.

Becker, S., Oelschlaeger, T.A., Wullaert, A., Vlantis, K., Pasparakis, M., Wehkamp, J., Stange, E.F., and Gersemann, M. (2013). Bacteria regulate intestinal epithelial cell differentiation factors both in vitro and in vivo. *PloS One* 8, e55620.

Beecher, C., Daly, M., Berry, D.P., Klostermann, K., Flynn, J., Meaney, W., Hill, C., McCarthy, T.V., Ross, R.P., and Giblin, L. (2009). Administration of a live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 into the bovine mammary gland stimulates the local host immune response, particularly IL-1beta and IL-8 gene expression. *J. Dairy Res.* 76, 340–348.

Begley, M., Gahan, C.G.M., and Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 625–651.

Begley, M., Hill, C., and Gahan, C.G.M. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1729–1738.

Bercik, P., Park, A.J., Sinclair, D., Khoshdel, A., Lu, J., Huang, X., Deng, Y., Blennerhassett, P.A., Fahnestock, M., Moine, D., et al. (2011). The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 23, 1132–1139.

Bergonzelli, G.E., Granato, D., Pridmore, R.D., Marvin-Guy, L.F., Donnicola, D., and Corthésy-Theulaz, I.E. (2006a). 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.

Bergonzelli, G.E., Granato, D., Pridmore, R.D., Marvin-Guy, L.F., Donnicola, D., and Corthésy-Theulaz, I.E. (2006b). 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.

Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., and Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Ann. Nutr. Metab.* 61, 160–174.

- Bernbom, N., Licht, T.R., Brogren, C.-H., Jelle, B., Johansen, A.H., Badiola, I., Vogensen, F.K., and Nørrung, B. (2006). Effects of *Lactococcus lactis* on composition of intestinal microbiota: role of nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 239–244.
- Bigliardi, B., and Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends Food Sci. Technol.*
- Bolken, T.C., Franke, C.A., Jones, K.F., Zeller, G.O., Jones, C.H., Dutton, E.K., and Hruby, D.E. (2001). Inactivation of the *srtA* gene in *Streptococcus gordonii* inhibits cell wall anchoring of surface proteins and decreases in vitro and in vivo adhesion. *Infect. Immun.* 69, 75–80.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., Ehrlich, S.D., Kulakauskas, S., Lapidus, A., Goltsman, E., Mazur, M., Pusch, G.D., et al. (2004). Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat. Biotechnol.* 22, 1554–1558.
- Borchers, A.T., Selmi, C., Meyers, F.J., Keen, C.L., and Gershwin, M.E. (2009). Probiotics and immunity. *J. Gastroenterol.* 44, 26–46.
- Bosch, M., Fuentes, M.C., Audivert, S., Bonachera, M.A., Peiró, S., and Cuñé, J. (2014). *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529: probiotic candidates to reduce cholesterol levels. *J. Sci. Food Agric.* 94, 803–809.
- Bourlioux, P., Braesco, V., and Mater, D.D.G. (2011). Yaourts et autres laits fermentés. *Cah. Nutr. Diététique* 46, 305–314.
- Bove, P., Russo, P., Capozzi, V., Gallone, A., Spano, G., and Fiocco, D. (2013). *Lactobacillus plantarum* passage through an oro-gastro-intestinal tract simulator: carrier matrix effect and transcriptional analysis of genes associated to stress and probiosis. *Microbiol. Res.* 168, 351–359.
- Boyer, J.L. (2013). Bile Formation and Secretion. *Compr. Physiol.* 3, 1035–1078.
- Brigidi, P., Swennen, E., Vitali, B., Rossi, M., and Matteuzzi, D. (2003). PCR detection of Bifidobacterium strains and *Streptococcus thermophilus* in feces of human subjects after oral bacteriotherapy and yogurt consumption. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 203–209.

- Broadbent, J.R., McMahon, D.J., Welker, D.L., Oberg, C.J., and Moineau, S. (2003). Biochemistry, Genetics, and Applications of Exopolysaccharide Production in *Streptococcus thermophilus*: A Review¹. J. Dairy Sci. 86, 407–423.
- Bron, P.A., Marco, M., Hoffer, S.M., Van Mullekom, E., de Vos, W.M., and Kleerebezem, M. (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.
- Bron, P.A., Molenaar, D., de Vos, W.M., and Kleerebezem, M. (2006). DNA micro-array-based identification of bile-responsive genes in *Lactobacillus plantarum*. J. Appl. Microbiol. 100, 728–738.
- Bruno-Bárcena, J.M., Andrus, J.M., Libby, S.L., Klaenhammer, T.R., and Hassan, H.M. (2004). Expression of a Heterologous Manganese Superoxide Dismutase Gene in Intestinal Lactobacilli Provides Protection against Hydrogen Peroxide Toxicity. Appl. Environ. Microbiol. 70, 4702–4710.
- Bu, X.-D., Li, N., Tian, X.-Q., and Huang, P.-L. (2011). Caco-2 and LS174T cell lines provide different models for studying mucin expression in colon cancer. Tissue Cell 43, 201–206.
- Buck, B.L., Altermann, E., Svingerud, T., and Klaenhammer, T.R. (2005a). Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Appl. Environ. Microbiol. 71, 8344–8351.
- Buck, B.L., Altermann, E., Svingerud, T., and Klaenhammer, T.R. (2005b). Functional Analysis of Putative Adhesion Factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Appl. Environ. Microbiol. 71, 8344–8351.
- Bustos, A.Y., Raya, R., de Valdez, G.F., and Taranto, M.P. (2011). Efflux of bile acids in *Lactobacillus reuteri* is mediated by ATP. Biotechnol. Lett. 33, 2265–2269.
- Busscher, H.J., Bellon-Fontaine, M.-N., Mozes, N., der-Mei, H.C. van, Sjollem, J., Cerf, O., and Rouxhet, P.G. (1990). Deposition of *Leuconostoc mesenteroides* and *streptococcus thermophilus* to solid substrata in a parallel plate flow cell. Biofouling 2, 55–63.
- Butel, M.-J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. Médecine Mal. Infect. 44, 1–8.

-C-

- Butel, M.-J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine Mal. Infect.* 44, 1–8.
- Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., and Chadee, K. (2007). The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292, G315-322.
- Cabral, D.J., Small, D.M., Lilly, H.S., and Hamilton, J.A. (1987). Transbilayer movement of bile acids in model membranes. *Biochemistry (Mosc.)* 26, 1801–1804.
- Call, E.K., and Klaenhammer, T.R. (2013). Relevance and application of sortase and sortase-dependent proteins in lactic acid bacteria. *Front. Microbiol.* 4, 73.
- Call, E.K., Goh, Y.J., Selle, K., Klaenhammer, T.R., and O’Flaherty, S. (2015). Sortase-deficient lactobacilli: effect on immunomodulation and gut retention. *Microbiol. Read. Engl.* 161, 311–321.
- Carr, F.J., Chill, D., and Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28, 281–370.
- Castaldo, C., Vastano, V., Siciliano, R.A., Candela, M., Vici, M., Muscariello, L., Marasco, R., and Sacco, M. (2009). Surface displaced alfa-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein. *Microb. Cell Factories* 8, 14.
- Chang, B., Sang, L., Wang, Y., Tong, J., Zhang, D., and Wang, B. (2013). The protective effect of VSL#3 on intestinal permeability in a rat model of alcoholic intestinal injury. *BMC Gastroenterol.* 13, 151.
- Chopra, D.P., Dombkowski, A.A., Stemmer, P.M., and Parker, G.C. (2010). Intestinal epithelial cells in vitro. *Stem Cells Dev.* 19, 131–142.
- Chow, J., Lee, S.M., Shen, Y., Khosravi, A., and Mazmanian, S.K. (2010). Host-bacterial symbiosis in health and disease. *Adv. Immunol.* 107, 243–274.
- Coconnier, M.H., Klaenhammer, T.R., Kernéis, S., Bernet, M.F., and Servin, A.L. (1992). Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2034–2039.
- Coleman, R. (1987). Biochemistry of bile secretion. *Biochem. J.* 244, 249–261.

Collins, J.K., Thornton, G., and Sullivan, G.O. (1998). Selection of Probiotic Strains for Human Applications. *Int. Dairy J.* 8, 487–490.

Conway, P.L., Gorbach, S.L., and Goldin, B.R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* 70, 1–12.

Cosenza, L., Nocerino, R., Di Scala, C., di Costanzo, M., Amoroso, A., Leone, L., Paparo, L., Pezzella, C., Aitoro, R., and Berni Canani, R. (2015). Bugs for atopy: the *Lactobacillus rhamnosus* GG strategy for food allergy prevention and treatment in children. *Benef. Microbes* 6, 225–232.

Cotter, P.D., and Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 67, 429–453, table of contents.

Coudeyras, S., and Forestier, C. (2010). Microbiote et probiotiques : impact en santé humaine. *Can. J. Microbiol.* 56, 611–650.

Couvigny, B., Thériat, C., Gautier, C., Renault, P., Briandet, R., and Guédon, E. (2015). *Streptococcus thermophilus* Biofilm Formation: A Remnant Trait of Ancestral Commensal Life? *PLoS ONE* 10.

-D-

Dandoy, D., Fremaux, C., de Frahan, M.H., Horvath, P., Boyaval, P., Hols, P., and Fontaine, L. (2011). The fast milk acidifying phenotype of *Streptococcus thermophilus* can be acquired by natural transformation of the genomic island encoding the cell-envelope proteinase PrtS. *Microb. Cell Factories* 10 Suppl 1, S21.

Davis, C.W., and Dickey, B.F. (2008). Regulated airway goblet cell mucin secretion. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 487–512.

De Vuyst, L., and Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13, 194–199.

Deepika, G., Green, R.J., Frazier, R.A., and Charalampopoulos, D. (2009). Effect of growth time on the surface and adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1230–1240.

- Deepika, G., Karunakaran, E., Hurley, C.R., Biggs, C.A., and Charalampopoulos, D. (2012). Influence of fermentation conditions on the surface properties and adhesion of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Microb. Cell Factories* 11, 116.
- Delorme, C. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 274–277.
- Delorme, C., Bartholini, C., Bolotine, A., Ehrlich, S.D., and Renault, P. (2010). Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 451–460.
- Denou, E., Berger, B., Barretto, C., Panoff, J.-M., Arigoni, F., and Brüssow, H. (2007). Gene Expression of Commensal *Lactobacillus johnsonii* Strain NCC533 during In Vitro Growth and in the Murine Gut. *J. Bacteriol.* 189, 8109–8119.
- Derrien, M., van Passel, M.W., van de Bovenkamp, J.H., Schipper, R.G., de Vos, W.M., and Dekker, J. (2010). Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes* 1, 254–268.
- Dhanani, A.S., and Bagchi, T. (2013). The expression of adhesin EF-Tu in response to mucin and its role in *Lactobacillus adhesion* and competitive inhibition of enteropathogens to mucin. *J. Appl. Microbiol.* 115, 546–554.
- Di Marzio, L., Centi, C., Cinque, B., Masci, S., Giuliani, M., Arcieri, A., Zicari, L., De Simone, C., and Cifone, M.G. (2003). Effect of the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* on stratum corneum ceramide levels and signs and symptoms of atopic dermatitis patients. *Exp. Dermatol.* 12, 615–620.
- Dinleyici, E.C., Kara, A., Ozen, M., and Vandenplas, Y. (2014). *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 in different clinical conditions. *Expert Opin. Biol. Ther.* 14, 1593–1609.
- Donnet-Hughes, A., Rochat, F., Serrant, P., Aeschlimann, J.M., and Schiffrin, E.J. (1999). Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. *J. Dairy Sci.* 82, 863–869.
- Dowling, R.H. (1973). The enterohepatic circulation of bile acids as they relate to lipid disorders. *J. Clin. Pathol. Suppl. (Assoc. Clin. Pathol.)* 5, 59–67.

Dramsi, S., Trieu-Cuot, P., and Bierne, H. (2005). Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. *Res. Microbiol.* 156, 289–297.

Drouault, S., and Corthier, G. (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Vet. Res.* 32, 101–117.

Drouault, S., Anba, J., and Corthier, G. (2002). *Streptococcus thermophilus* Is Able To Produce a β -Galactosidase Active during Its Transit in the Digestive Tract of Germ-Free Mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 938–941.

Duary, R.K., Batish, V.K., and Grover, S. (2012). Relative gene expression of bile salt hydrolase and surface proteins in two putative indigenous *Lactobacillus plantarum* strains under in vitro gut conditions. *Mol. Biol. Rep.* 39, 2541–2552.

Dubey, A.P., Rajeshwari, K., Chakravarty, A., and Famularo, G. (2008). Use of VSL[sharp]3 in the treatment of rotavirus diarrhea in children: preliminary results. *J. Clin. Gastroenterol.* 42 Suppl 3 Pt 1, S126-129.

-E-

EFSA 2010 <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/doc/1763.pdf>.

Elli, M., Callegari, M.L., Ferrari, S., Bessi, E., Cattivelli, D., Soldi, S., Morelli, L., Goupil Feuillerat, N., and Antoine, J.-M. (2006). Survival of yogurt bacteria in the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5113–5117.

Eskesen, D., Jespersen, L., Michelsen, B., Whorwell, P.J., Müller-Lissner, S., and Morberg, C.M. (2015). Effect of the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, on defecation frequency in healthy subjects with low defecation frequency and abdominal discomfort: a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial. *Br. J. Nutr.* 114, 1638–1646.

Esteller, A. (2008). Physiology of bile secretion. *World J. Gastroenterol.* 14, 5641–5649.

Etzold, S., and Juge, N. (2014). Structural insights into bacterial recognition of intestinal mucins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 28, 23–31.

Etzold, S., Kober, O.I., Mackenzie, D.A., Tailford, L.E., Gunning, A.P., Walshaw, J., Hemmings, A.M., and Juge, N. (2014). Structural basis for adaptation of lactobacilli to gastrointestinal mucus. *Environ. Microbiol.* 16, 888–903.

Euzéby, J.P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 590–592.

-F-

Facklam, R. (2002). What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 613–630.

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

Fanning, S., Hall, L.J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D., Motherway, M.O., Shanahan, F., Nally, K., Dougan, G., et al. (2012). Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2108–2113.

FAO/WHO working group. 2002. Guidelines for the Evaluation of probiotics in Food.

FAO/WHO (2001) Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. In Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization expert consultation report. FAO, Rome, Italy.

Farrow, J.A., and Collins, M.D. (1984). DNA base composition, DNA-DNA homology and long-chain fatty acid studies on streptococcus thermophilus and *Streptococcus salivarius*. *J. Gen. Microbiol.* 130, 357–362.

FDA (2002) BGRN No.49 *Bifidobacterium lactis* strain Bb12 and *Streptococcus thermophilus* strain Th4 GRAS Notice inventory.

FDA (2012) BGRN No.378 Cultured [dairy sources, sugars, wheat,malt, and fruit- and vegetable based sources] fermented by [*Streptococcus thermophilus*, *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus*

plantarum, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* or mixtures of these strains] ^ GRAS Notice Inventory.

Fernandez-Espla, M.D., Garault, P., Monnet, V., and Rul, F. (2000). *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4772–4778.

Ferreira Dos Santos, T., Alves Melo, T., Almeida, M.E., Passos Rezende, R., and Romano, C.C. (2016). Immunomodulatory Effects of *Lactobacillus plantarum* Lp62 on Intestinal Epithelial and Mononuclear Cells. BioMed Res. Int. 2016, 8404156.

Flint, S., Brooks, J., Bremer, P., Walker, K., and Hausman, E. (2002). The resistance to heat of thermo-resistant streptococci attached to stainless steel in the presence of milk. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 28, 134–136.

Flint, S.H., Brooks, J.D., and Bremer, P.J. (1997). The influence of cell surface properties of thermophilic streptococci on attachment to stainless steel. J. Appl. Microbiol. 83, 508–517.

Food research.com/market

Floch, M.H., Binder, H.J., Filburn, B., and Gershengoren, W. (1972). The effect of bile acids on intestinal microflora. Am. J. Clin. Nutr. 25, 1418–1426.

Fogh, J., Fogh, J.M., and Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. J. Natl. Cancer Inst. 59, 221–226.

Foucaud, C., and Poolman, B. (1992). Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. Functional reconstitution of the protein and characterization of the kinetic mechanism of transport. J. Biol. Chem. 267, 22087–22094.

Francavilla, R., Miniello, V., Magistà, A.M., De Canio, A., Bucci, N., Gagliardi, F., Lionetti, E., Castellaneta, S., Polimeno, L., Peccarisi, L., et al. (2010). A randomized controlled trial of *Lactobacillus* GG in children with functional abdominal pain. Pediatrics 126, e1445-1452.

Frece, J., Kos, B., Svetec, I.K., Zgaga, Z., Mrsa, V., and Susković, J. (2005). Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. J. Appl. Microbiol. 98, 285–292.

Fuchs, E.L., Brutinel, E.D., Klem, E.R., Fehr, A.R., Yahr, T.L., and Wolfgang, M.C. (2010). In vitro and in vivo characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* cyclic AMP (cAMP) phosphodiesterase CpdA, required for cAMP homeostasis and virulence factor regulation. J. Bacteriol. 192, 2779–2790.

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66, 365–378.

-G-

Gagnière, J., Raisch, J., Veziant, J., Barnich, N., Bonnet, R., Buc, E., Bringer, M.-A., Pezet, D., and Bonnet, M. (2016). Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. World J. Gastroenterol. 22, 501–518.

Galia, W., Perrin, C., Genay, M., and Dary, A. (2009). Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. Int. Dairy J. 19, 89–95.

Gao, X.W., Mubasher, M., Fang, C.Y., Reifer, C., and Miller, L.E. (2010). Dose-response efficacy of a proprietary probiotic formula of *Lactobacillus acidophilus* CL1285 and *Lactobacillus casei* LBC80R for antibiotic-associated diarrhea and Clostridium difficile-associated diarrhea prophylaxis in adult patients. Am. J. Gastroenterol. 105, 1636–1641.

García-Hernández, J., Moreno, Y., Chuan, C., and Hernández, M. (2012). In vivo study of the survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus CECT 4005T and *Streptococcus thermophilus* CECT 801 by DVC-FISH after consumption of fermented milk. J. Food Sci. 77, M593-597.

Gaudier, E., Jarry, A., Blottière, H.M., de Coppet, P., Buisine, M.P., Aubert, J.P., Labois, C., Cherbut, C., and Hoebler, C. (2004). Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 287, G1168-1174.

Gérard, P. (2011). Le microbiote intestinal: composition et fonctions. Phytothérapie 9, 72–75.

Giraffa, G., Paris, A., Valcavi, L., Gatti, M., and Neviani, E. (2001). Genotypic and phenotypic heterogeneity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. J. Appl. Microbiol. 91, 937–943.

- Goh, Y.J., Goin, C., O’Flaherty, S., Altermann, E., and Hutkins, R. (2011). Specialized adaptation of a lactic acid bacterium to the milk environment: the comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* LMD-9. *Microb. Cell Factories* 10 Suppl 1, S22.
- Gómez Zavaglia, A., Kociubinski, G., Pérez, P., Disalvo, E., and De Antoni, G. (2002). Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 93, 794–799.
- Gourbeyre, P., Denery, S., and Bodinier, M. (2011). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *J. Leukoc. Biol.* 89, 685–695.
- Granato, D., Perotti, F., Masserey, I., Rouvet, M., Golliard, M., Servin, A., and Brassart, D. (1999). Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1071–1077.
- Granato, D., Bergonzelli, G.E., Pridmore, R.D., Marvin, L., Rouvet, M., and Corthésy-Theulaz, I.E. (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.
- Grootaert, C., Boon, N., Zeka, F., Vanhoecke, B., Bracke, M., Verstraete, W., and Van de Wiele, T. (2011). Adherence and viability of intestinal bacteria to differentiated Caco-2 cells quantified by flow cytometry. *J. Microbiol. Methods* 86, 33–41.
- Guarino, A., Lo Vecchio, A., and Canani, R.B. (2009). Probiotics as prevention and treatment for diarrhea. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 25, 18–23.
- Guarino, A., Guandalini, S., and Lo Vecchio, A. (2015). Probiotics for Prevention and Treatment of Diarrhea. *J. Clin. Gastroenterol.* 49 Suppl 1, S37-45.
- Guidance to compliance with Regulation (EC) 1924/2006 on nutrition and health claims made on foods, version 2, 2011)
- Gunning, A.P., Kavanaugh, D., Thursby, E., Etzold, S., MacKenzie, D.A., and Juge, N. (2016). Use of Atomic Force Microscopy to Study the Multi-Modular Interaction of Bacterial Adhesins to Mucins. *Int. J. Mol. Sci.* 17.

-H-

Habimana, O., Le Goff, C., Juillard, V., Bellon-Fontaine, M.-N., Buist, G., Kulakauskas, S., and Briandet, R. (2007). Positive role of cell wall anchored proteinase PrtP in adhesion of lactococci. *BMC Microbiol.* 7, 36.

Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Girardet, J.-M., Jardin, J., Perrin, C., Dary, A., and Miclo, L. (2013). Hydrolysis of milk-derived bioactive peptides by cell-associated extracellular peptidases of *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9787–9799.

Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L., and Dary-Mourot, A. (2014). Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Res. Int.* 63, Part A, 71–80.

Hafez, M.M. (2012). Upregulation of Intestinal Mucin Expression by the Probiotic Bacterium *E. coli* Nissle 1917. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 4, 67–77.

Hanin, A., Sava, I., Bao, Y., Huebner, J., Hartke, A., Auffray, Y., and Sauvageot, N. (2010). Screening of in vivo activated genes in *Enterococcus faecalis* during insect and mouse infections and growth in urine. *PloS One* 5, e11879.

Hatice Boke, B.A. (2010). The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPSS) produced by yogurt starter bacteria. *Arch. Biol. Sci.* 62.

Higashikawa, F., Noda, M., Awaya, T., Nomura, K., Oku, H., and Sugiyama, M. (2010). Improvement of constipation and liver function by plant-derived lactic acid bacteria: a double-blind, randomized trial. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 26, 367–374.

Hollingsworth, M.A., Strawhecker, J.M., Caffrey, T.C., and Mack, D.R. (1994). Expression of MUC1, MUC2, MUC3 and MUC4 mucin mRNAs in human pancreatic and intestinal tumor cell lines. *Int. J. Cancer* 57, 198–203.

Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Dusko Ehrlich, S., et al. (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 435–463.

Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., and Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 365S–373S.

Huang, Y., and Adams, M.C. (2004). In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 91, 253–260.

Hugenholtz, J., Sybesma, W., Groot, M.N., Wisselink, W., Ladero, V., Burgess, K., van Sinderen, D., Piard, J.-C., Eggink, G., Smid, E.J., et al. (2002). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 217–235.

Hung, M.-C., and Christodoulides, M. (2013). The biology of *Neisseria adhesins*. *Biology* 2, 1054–1109.

Hutkins, R., Morris, H.A., and McKay, L.L. (1985). Galactokinase activity in *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 777–780.

-I-

Ishizeki, S., Sugita, M., Takata, M., and Yaeshima, T. (2013). Effect of administration of bifidobacteria on intestinal microbiota in low-birth-weight infants and transition of administered bifidobacteria: A comparison between one-species and three-species administration. *Anaerobe* 23, 38–44.

Islam, K.B.M.S., Fukiya, S., Hagio, M., Fujii, N., Ishizuka, S., Ooka, T., Ogura, Y., Hayashi, T., and Yokota, A. (2011). Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology* 141, 1773–1781.

İşlek, A., Sayar, E., Yılmaz, A., Baysan, B.Ö., Mutlu, D., and Artan, R. (2014). The role of *Bifidobacterium lactis* B94 plus inulin in the treatment of acute infectious diarrhea in children. *Turk. J. Gastroenterol. Off. J. Turk. Soc. Gastroenterol.* 25, 628–633.

Iyer, R., Tomar, S.K., Kapila, S., Mani, J., and Singh, R. (2010a). Probiotic properties of folate producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Food Res. Int.* 43, 103–110.

Iyer, R., Tomar, S.K., Uma Maheswari, T., and Singh, R. (2010b). *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 20, 133–141.

-J-

Jacobsen, C.N., Rosenfeldt Nielsen, V., Hayford, A.E., Møller, P.L., Michaelsen, K.F., Paerregaard, A., Sandström, B., Tvede, M., and Jakobsen, M. (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.

Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., and Axelsson, L. (2012). In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 216–222.

Jensen, H., Roos, S., Jonsson, H., Rud, I., Grimmer, S., van Pijkeren, J.-P., Britton, R.A., and Axelsson, L. (2014). Role of *Lactobacillus reuteri* cell and mucus-binding protein A (CmbA) in adhesion to intestinal epithelial cells and mucus in vitro. *Microbiol. Read. Engl.* 160, 671–681.

Junjua, M., Kechaou, N., Chain, F., Awussi, A.A., Roussel, Y., Perrin, C., Roux, E., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L.G., Le Roux, Y., et al. (2016). A large scale in vitro screening of *Streptococcus thermophilus* strains revealed strains with a high anti-inflammatory potential. *LWT - Food Sci. Technol.* 70, 78–87.

-K-

Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 3, 39–48.

Kainulainen, V., Loimaranta, V., Pekkala, A., Edelman, S., Antikainen, J., Kylväjä, R., Laaksonen, M., Laakkonen, L., Finne, J., and Korhonen, T.K. (2012). Glutamine synthetase and glucose-6-phosphate isomerase are adhesive moonlighting proteins of *Lactobacillus crispatus* released by epithelial cathelicidin LL-37. *J. Bacteriol.* 194, 2509–2519.

Kajander, K., Hatakka, K., Poussa, T., Färkkilä, M., and Korpela, R. (2005). A probiotic mixture alleviates symptoms in irritable bowel syndrome patients: a controlled 6-month intervention. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 22, 387–394.

Kakiyama, G., Pandak, W.M., Gillevet, P.M., Hylemon, P.B., Heuman, D.M., Daita, K., Takei, H., Muto, A., Nittono, H., Ridlon, J.M., et al. (2013). Modulation of the fecal bile acid profile by gut microbiota in cirrhosis. *J. Hepatol.* 58, 949–955.

Karczewski, J., Troost, F.J., Konings, I., Dekker, J., Kleerebezem, M., Brummer, R.-J.M., and Wells, J.M. (2010). Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298, G851-859.

Karimi, O., and Pena, A.S. (2003). Probiotics: Isolated bacteria strain or mixtures of different strains? Two different approaches in the use of probiotics as therapeutics. *Drugs Today Barc. Spain* 1998 39, 565–597.

Kawamura, Y., Hou, X.G., Sultana, F., Miura, H., and Ezaki, T. (1995). Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 406–408.

Kebouchi, M., Galia, W., Genay, M., Soligot, C., Lecomte, X., Awussi, A.A., Perrin, C., Roux, E., Dary-Mouro, A., and Le Roux, Y. (2016b). Implication of sortase-dependent proteins of *Streptococcus thermophilus* in adhesion to human intestinal epithelial cell lines and bile salt tolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

Kelesidis, T., and Pothoulakis, C. (2012). Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 5, 111–125.

Khaleghi, M., Kermanshahi, R.K., Yaghoobi, M.M., Zarkesh-Esfahani, S.H., and Baghizadeh, A. (2010). Assessment of bile salt effects on s-layer production, slp gene expression and some physicochemical properties of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 749–756.

Ki Cha, B., Mun Jung, S., Hwan Choi, C., Song, I.-D., Woong Lee, H., Joon Kim, H., Hyuk, J., Kyung Chang, S., Kim, K., Chung, W.-S., et al. (2012). The effect of a multispecies probiotic mixture on the symptoms and fecal microbiota in diarrhea-dominant irritable bowel syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Clin. Gastroenterol.* 46, 220–227.

Kinoshita, H., Uchida, H., Kawai, Y., Kawasaki, T., Wakahara, N., Matsuo, H., Watanabe, M., Kitazawa, H., Ohnuma, S., Miura, K., et al. (2008). Cell surface *Lactobacillus plantarum* LA 318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1667–1674.

- Kline, K.A., Fälker, S., Dahlberg, S., Normark, S., and Henriques-Normark, B. (2009). Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe* 5, 580–592.
- Kociubinski, G., Zavaglia, A.G., Pérez, P.F., Disalvo, E.A., and De Antoni, G.L. (2002). Effect of bile components on the surface properties of bifidobacteria. *J. Dairy Res.* 69, 293–302.
- Koebnick, C., Wagner, I., Leitzmann, P., Stern, U., and Zunft, H.J.F. (2003). Probiotic beverage containing *Lactobacillus casei* Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation. *Can. J. Gastroenterol. J. Can. Gastroenterol.* 17, 655–659.
- Kolars, J.C., Levitt, M.D., Aouji, M., and Savaiano, D.A. (1984). Yogurt--an autodigesting source of lactose. *N. Engl. J. Med.* 310, 1–3.
- Kolling, G.L., Wu, M., Warren, C.A., Durmaz, E., Klaenhammer, T.R., and Guerrant, R.L. (2012). Lactic acid production by *Streptococcus thermophilus* alters *Clostridium difficile* infection and in vitro Toxin A production. *Gut Microbes* 3, 523–529.
- Kolling, Y., Salva, S., Villena, J., Marranzino, G., and Alvarez, S. (2015). Non-viable immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 and its peptidoglycan improve systemic and respiratory innate immune response during recovery of immunocompromised-malnourished mice. *Int. Immunopharmacol.* 25, 474–484.
- Korpela, K., Salonen, A., Virta, L.J., Kumpu, M., Kekkonen, R.A., and de Vos, W.M. (2016). *Lactobacillus rhamnosus* GG Intake Modifies Preschool Children's Intestinal Microbiota, Alleviates Penicillin-Associated Changes, and Reduces Antibiotic Use. *PloS One* 11, e0154012.
- Koskenniemi, K., Laakso, K., Koponen, J., Kankainen, M., Greco, D., Auvinen, P., Savijoki, K., Nyman, T.A., Surakka, A., Salusjärvi, T., et al. (2011). Proteomics and transcriptomics characterization of bile stress response in probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 10, M110.002741.
- Kristiansen, T.Z., Maitra, A., and Pandey, A. (2007). Proteomics of Human Bile. In *Proteomics of Human Body Fluids*, V.T.M. FRCPT, ed. (Humana Press), pp. 399–414.

Kuisma, J., Mentula, S., Jarvinen, H., Kahri, A., Saxelin, M., and Farkkila, M. (2003). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on ileal pouch inflammation and microbial flora. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 17, 509–515.

Kumar, R., Grover, S., and Batish, V.K. (2012). Bile Salt Hydrolase (Bsh) Activity Screening of Lactobacilli: In Vitro Selection of Indigenous Lactobacillus Strains with Potential Bile Salt Hydrolysing and Cholesterol-Lowering Ability. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 4, 162–172.

-L-

Lalioui, L., Pellegrini, E., Dramsi, S., Baptista, M., Bourgeois, N., Doucet-Populaire, F., Rusniok, C., Zouine, M., Glaser, P., Kunst, F., et al. (2005). The SrtA Sortase of *Streptococcus agalactiae* is required for cell wall anchoring of proteins containing the LPXTG motif, for adhesion to epithelial cells, and for colonization of the mouse intestine. *Infect. Immun.* 73, 3342–3350.

Lam, E.K.Y., Tai, E.K.K., Koo, M.W.L., Wong, H.P.S., Wu, W.K.K., Yu, L., So, W.H.L., Woo, P.C.Y., and Cho, C.H. (2007). Enhancement of gastric mucosal integrity by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Life Sci.* 80, 2128–2136.

Lambert, J.M., Bongers, R.S., de Vos, W.M., and Kleerebezem, M. (2008). Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin acylase family members in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4719–4726.

Laparra, J.M., and Sanz, Y. (2009). Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 695–701.

Laser Reuterswärd, A. (2007). The new EC Regulation on nutrition and health claims on foods. *Scand. J. Food Nutr.* 51, 100–106.

Le, D.T.L., Tran, T.-L., Duviau, M.-P., Meyrand, M., Guérardel, Y., Castelain, M., Loubière, P., Chapot-Chartier, M.-P., Dague, E., and Mercier-Bonin, M. (2013). Unraveling the role of surface mucus-binding protein and pili in muco-adhesion of *Lactococcus lactis*. *PloS One* 8, e79850.

Lebeer, S., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S.C.J. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 72, 728–764, Table of Contents.

- Lebeer, S., Verhoeven, T.L.A., Francius, G., Schoofs, G., Lambrichts, I., Dufrêne, Y., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S.C.J. (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.
- Lebeer, S., Claes, I., Tytgat, H.L.P., Verhoeven, T.L.A., Marien, E., von Ossowski, I., Reunanen, J., Palva, A., Vos, W.M. de, Keersmaecker, S.C.J.D., et al. (2012). Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 185–193.
- Lecomte, X., Gagnaire, V., Briard-Bion, V., Jardin, J., Lortal, S., Dary, A., and Genay, M. (2014). The naturally competent strain *Streptococcus thermophilus* LMD-9 as a new tool to anchor heterologous proteins on the cell surface. *Microb. Cell Factories* 13, 82.
- Lecomte, X., Gagnaire, V., Lortal, S., Dary, A., and Genay, M. (2016). *Streptococcus thermophilus*, an emerging and promising tool for heterologous expression: Advantages and future trends. *Food Microbiol.* 53, Part A, 2–9.
- Lee, K.-K., and Yii, K.-C. (1996). A comparison of three methods for assaying hydrophobicity of pathogenic vibrios. *Lett. Appl. Microbiol.* 23, 343–346.
- Lefébure, T., and Stanhope, M.J. (2007). Evolution of the core and pan-genome of *Streptococcus*: positive selection, recombination, and genome composition. *Genome Biol.* 8, R71.
- Lesuffleur, T., Kornowski, A., Augeron, C., Dussaulx, E., Barbat, A., Labois, C., and Zweibaum, A. (1991). Increased growth adaptability to 5-fluorouracil and methotrexate of HT-29 sub-populations selected for their commitment to differentiation. *Int. J. Cancer* 49, 731–737.
- Lesuffleur, T., Porchet, N., Aubert, J.P., Swallow, D., Gum, J.R., Kim, Y.S., Real, F.X., and Zweibaum, A. (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.

- Lesuffleur, T., Roche, F., Hill, A.S., Lacasa, M., Fox, M., Swallow, D.M., Zweibaum, A., and Real, F.X. (1995). Characterization of a mucin cDNA clone isolated from HT-29 mucus-secreting cells. The 3' end of MUC5AC? J. Biol. Chem. 270, 13665–13673.
- Li, G. (2012). Intestinal Probiotics: Interactions with Bile Salts and Reduction of Cholesterol. *Procedia Environ. Sci.* 12, Part B, 1180–1186.
- Li, W., Liu, L., Chen, H., and Zhou, R. (2009). Identification of *Streptococcus suis* genes preferentially expressed under iron starvation by selective capture of transcribed sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 292, 123–133.
- Lick, S., Drescher, K., and Heller, K.J. (2001). Survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the Terminal Ileum of Fistulated Göttingen Minipigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4137–4143.
- Liévin-Le Moal, V., and Servin, A.L. (2013). Pathogenesis of Human Enterovirulent Bacteria: Lessons from Cultured, Fully Differentiated Human Colon Cancer Cell Lines. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 77, 380–439.
- Liu, W., Pang, H., Zhang, H., and Cai, Y. (2014). Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. In *Lactic Acid Bacteria*, H. Zhang, and Y. Cai, eds. (Springer Netherlands), pp. 103–203.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408.
- Ljungh, A., and Wadström, T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 7, 73–89.
- Lundeen, S.G., and Savage, D.C. (1990). Characterization and purification of bile salt hydrolase from *Lactobacillus* sp. strain 100-100. *J. Bacteriol.* 172, 4171–4177.
- Lutgendorff, F., Akkermans, L.M.A., and Söderholm, J.D. (2008). The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastro-intestinal damage. *Curr. Mol. Med.* 8, 282–298.

-M-

- Mack, D.R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., and Hollingsworth, M.A. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol.* 276, G941-950.
- Mack, D.R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., and Hollingsworth, M.A. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* 52, 827–833.
- Mackenzie, D.A., Jeffers, F., Parker, M.L., Vibert-Vallet, A., Bongaerts, R.J., Roos, S., Walter, J., and Juge, N. (2010). Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol. Read. Engl.* 156, 3368–3378.
- Mackie, R.I., Sghir, A., and Gaskins, H.R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 1035s–1045s.
- Mainville, I., Arcand, Y., and Farnworth, E.R. (2005). A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 287–296.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., et al. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 15611–15616.
- Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P., Macierzanka, A., and Mackie, A. (2011). The role of bile salts in digestion. *Adv. Colloid Interface Sci.* 165, 36–46.
- Mandal, S., Hati, S., Puniya, A.K., Khamrui, K., and Singh, K. (2014). Enhancement of survival of alginate-encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC 298. *J. Sci. Food Agric.* 94, 1994–2001.
- Maneerat, S., Lehtinen, M.J., Childs, C.E., Forssten, S.D., Alhoniemi, E., Tiphaine, M., Yaqoob, P., Ouwehand, A.C., and Rastall, R.A. (2013). Consumption of *Bifidobacterium lactis* Bi-07 by healthy elderly adults enhances phagocytic activity of monocytes and granulocytes. *J. Nutr. Sci.* 2, e44.

- Mangiapane, E., Lamberti, C., Pessione, A., Ceruti, P., Novelli, F., Galano, E., Virkola, R., Korhonen, T., and Pessione, E. (2013). An integrated proteomic and physiological approach to understand the adhesion mechanism of the probiotic *Lactobacillus reuteri* Lb2 BM DSM 16143. *J. Integr. OMICS* 3, 145–156.
- Mans Minekus, P.M. (1995). A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *ATLA Altern Lab Anim. Altern. Lab. Anim.* ATLA 23, 197–209.
- Maoret, J.J., Font, J., Augeron, C., Codogno, P., Bauvy, C., Aubery, M., and Laboisse, C.L. (1989). A mucus-secreting human colonic cancer cell line. Purification and partial characterization of the secreted mucins. *Biochem. J.* 258, 793–799.
- MarketsandMarkets (2015) Probiotic Ingredients Market by Function (Regular, Preventative, Therapy), Application (Food & Beverage, Dietary Supplements, & Animal Feed), End Use (Human & Animal Probiotics), Ingredient (Bacteria & Yeast), and by Region - Global Trends & Forecast to 2020
- Marco, M.L., de Vries, M.C., Wels, M., Molenaar, D., Mangell, P., Ahrne, S., de Vos, W.M., Vaughan, E.E., and Kleerebezem, M. (2010). Convergence in probiotic *Lactobacillus* gut-adaptive responses in humans and mice. *ISME J.* 4, 1481–1484.
- Marri, P.R., Hao, W., and Golding, G.B. (2006). Gene gain and gene loss in streptococcus: is it driven by habitat? *Mol. Biol. Evol.* 23, 2379–2391.
- Marteau, P., Flourie, B., Pochart, P., Chastang, C., Desjeux, J.F., and Rambaud, J.C. (1990). Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans. *Br. J. Nutr.* 64, 71–79.
- Mater, D.D.G., Bretigny, L., Firmesse, O., Flores, M.-J., Mogenet, A., Bresson, J.-L., and Corthier, G. (2005). *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS Microbiol. Lett.* 250, 185–187.
- Mattar, A.F., Teitelbaum, D.H., Drongowski, R.A., Yongyi, F., Harmon, C.M., and Coran, A.G. (2002). Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatr. Surg. Int.* 18, 586–590.

McGroarty, J.A. (1994). Cell surface appendages of lactobacilli. FEMS Microbiol. Lett. 124, 405–409.

Metchnikoff E: The Prolongation of Life: Optimistic Studies (translated from the French by P. Chalmers Mitchell). London, William Heineman, 1907.

Merenstein, D.J., Tan, T.P., Molokin, A., Smith, K.H., Roberts, R.F., Shara, N.M., Mete, M., Sanders, M.E., and Solano-Aguilar, G. (2015). Safety of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis (*B. lactis*) strain BB-12-supplemented yogurt in healthy adults on antibiotics: a phase I safety study. Gut Microbes 6, 66–77.

Meurman, J.H., and Stamatova, I. (2007). Probiotics: contributions to oral health. Oral Dis. 13, 443–451.

Miclo, L., Roux, E., Genay, M., Brusseaux, E., Poirson, C., Jameh, N., Perrin, C., and Dary, A. (2012). Variability of hydrolysis of β -, α s1-, and α s2-caseins by 10 strains of *Streptococcus thermophilus* and resulting bioactive peptides. J. Agric. Food Chem. 60, 554–565.

Mimura, T., Rizzello, F., Helwig, U., Poggioli, G., Schreiber, S., Talbot, I.C., Nicholls, R.J., Gionchetti, P., Campieri, M., and Kamm, M.A. (2004). Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. Gut 53, 108–114.

Ministère chargé de l’agriculture et de l’agroalimentaire. Ce que nous devons savoir sur... le yaourt [en ligne]. Disponible sur: <http://alimentation.gouv.fr> [consulté en juin 2014].

Moghimipour, E., Ameri, A., and Handali, S. (2015). Absorption-Enhancing Effects of Bile Salts. Mol. Basel Switz. 20, 14451–14473.

Mohammadi, A.A., Jazayeri, S., Khosravi-Darani, K., Solati, Z., Mohammadpour, N., Asemi, Z., Adab, Z., Djalali, M., Tehrani-Doost, M., Hosseini, M., et al. (2016). The effects of probiotics on mental health and hypothalamic-pituitary-adrenal axis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial in petrochemical workers. Nutr. Neurosci. 19, 387–395.

Monteagudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García-Armesto, M.R., and Ferrero, M.Á. (2012). In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. J. Funct. Foods 4, 531–541.

Morelli, L. (2007). In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. *Int. Dairy J.* 17, 1278–1283.

Moschioni, M., Pansegrau, W., and Barocchi, M.A. (2010). Adhesion determinants of the *Streptococcus* species. *Microb. Biotechnol.* 3, 370–388.

Mozzi, F., Gerbino, E., Font de Valdez, G., and Torino, M. i. (2009). Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in an in vitro gastric system. *J. Appl. Microbiol.* 107, 56–64.

Muñoz-Provencio, D., Llopis, M., Antolín, M., de Torres, I., Guarner, F., Pérez-Martínez, G., and Monedero, V. (2009). Adhesion properties of *Lactobacillus casei* strains to resected intestinal fragments and components of the extracellular matrix. *Arch. Microbiol.* 191, 153–161.

Muñoz-Provencio, D., Rodríguez-Díaz, J., Collado, M.C., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L.G., and Monedero, V. (2012). Functional analysis of the *Lactobacillus casei* BL23 sortases. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8684–8693.

-N-

Nagao, F., Nakayama, M., Muto, T., and Okumura, K. (2000). Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the immune system in healthy human subjects. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 2706–2708.

Namba, K., Hatano, M., Yaeshima, T., Takase, M., and Suzuki, K. (2010). Effects of *Bifidobacterium longum* BB536 administration on influenza infection, influenza vaccine antibody titer, and cell-mediated immunity in the elderly. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 939–945.

Nishiyama, K., Ueno, S., Sugiyama, M., Yamamoto, Y., and Mukai, T. (2016a). *Lactobacillus rhamnosus* GG SpaC pilin subunit binds to the carbohydrate moieties of intestinal glycoconjugates. *Anim. Sci. J. Nihon Chikusan Gakkaiho* 87, 809–815.

Nishiyama, K., Sugiyama, M., and Mukai, T. (2016b). Adhesion Properties of Lactic Acid Bacteria on Intestinal Mucin. *Microorganisms* 4.

Nobbs, A.H., Lamont, R.J., and Jenkinson, H.F. (2009). Streptococcus adherence and colonization. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR 73, 407–450, Table of Contents.

Norin, K.E., Gustafsson, B.E., Lindblad, B.S., and Midtvedt, T. (1985). The establishment of some microflora associated biochemical characteristics in feces from children during the first years of life. Acta Paediatr. Scand. 74, 207–212.

Nuding, S., Antoni, L., and Stange, E.F. (2013). The host and the flora. Dig. Dis. Basel Switz. 31, 286–292.

-O-

Odamaki, T., Sugahara, H., Yonezawa, S., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., Tanabe, S., Tominaga, T., Togashi, H., Benno, Y., and Xiao, J. (2012). Effect of the oral intake of yogurt containing *Bifidobacterium longum* BB536 on the cell numbers of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in microbiota. Anaerobe 18, 14–18.

Ogata, T., Nakamura, T., Anjitsu, K., Yaeshima, T., Takahashi, S., Fukuwatari, Y., Ishibashi, N., Hayasawa, H., Fujisawa, T., and Iino, H. (1997). Effect of *Bifidobacterium longum* BB536 Administration on the Intestinal Environment, Defecation Frequency and Fecal Characteristics of Human Volunteers. Biosci. Microflora 16, 53–58.

Ogata, T., Kingaku, M., Yaeshima, T., Teraguchi, S., Fukuwatari, Y., Ishibashi, N., Hayasawa, H., Fujisawa, T., and Iino, H. (1999). Effect of *Bifidobacterium longum* BB536 yogurt administration on the intestinal environment of healthy adults. Microb. Ecol. Health Dis. 11.

Öner, Ö., Aslim, B., and Aydaş, S.B. (2014). Mechanisms of cholesterol-lowering effects of lactobacilli and bifidobacteria strains as potential probiotics with their bsh gene analysis. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 24, 12–18.

Ooi, L.-G., and Liong, M.-T. (2010). Cholesterol-Lowering Effects of Probiotics and Prebiotics: A Review of in Vivo and in Vitro Findings. Int. J. Mol. Sci. 11, 2499–2522.

Osaki, M., Takamatsu, D., Shimoji, Y., and Sekizaki, T. (2002). Characterization of *Streptococcus suis* genes encoding proteins homologous to sortase of gram-positive bacteria. J. Bacteriol. 184, 971–982.

von Ossowski, I., Satokari, R., Reunanen, J., Lebeer, S., De Keersmaecker, S.C.J., Vanderleyden, J., de Vos, W.M., and Palva, A. (2011). Functional characterization of a mucus-specific LPXTG surface adhesin from probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4465–4472.

Otte, J.-M., and Podolsky, D.K. (2004). Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286, G613-626.

Ouwehand, A.C., and Salminen, S. (2003). In vitro Adhesion Assays for Probiotics and their in vivo Relevance: A Review. *Microb. Ecol. Health Dis.* 15.

Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Grönlund, M.-M., Isolauri, E., and Salminen, S.J. (1999). Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *Int. Dairy J.* 9, 623–630.

Ouwehand, A.C., Salminen, S., and Isolauri, E. (2002a). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 279–289.

Ouwehand, A.C., Salminen, S., Tölkö, S., Roberts, P., Ovaska, J., and Salminen, E. (2002b). Resected Human Colonic Tissue: New Model for Characterizing Adhesion of Lactic Acid Bacteria. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 184–186.

Ouwehand, A.C., Lagström, H., Suomalainen, T., and Salminen, S. (2002c). Effect of probiotics on constipation, fecal azoreductase activity and fecal mucin content in the elderly. *Ann. Nutr. Metab.* 46, 159–162.

Ouwerkerk, J.P., de Vos, W.M., and Belzer, C. (2013). Glycobiome: bacteria and mucus at the epithelial interface. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 27, 25–38.

-P-

Pagnini, C., Saeed, R., Bamias, G., Arseneau, K.O., Pizarro, T.T., and Cominelli, F. (2010). Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 454–459.

Palencia, P.F. de, López, P., Corbí, A.L., Peláez, C., and Requena, T. (2008). Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, in vitro adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion. *Eur. Food Res. Technol.* 227, 1475–1484.

- Pavlović, N., Stankov, K., and Mikov, M. (2012). Probiotics--interactions with bile acids and impact on cholesterol metabolism. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168, 1880–1895.
- Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 86.
- Pessione, E., and Cirrincione, S. (2016). Bioactive Molecules Released in Food by Lactic Acid Bacteria: Encrypted Peptides and Biogenic Amines. *Front. Microbiol.* 7, 876.
- Pfeiler, E.A., and Klaenhammer, T.R. (2009). Role of transporter proteins in bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6013–6016.
- Pfeiler, E.A., Azcarate-Peril, M.A., and Klaenhammer, T.R. (2007). Characterization of a Novel Bile-Inducible Operon Encoding a Two-Component Regulatory System in *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bacteriol.* 189, 4624–4634.
- van Pijkeren, J.-P., Canchaya, C., Ryan, K.A., Li, Y., Claesson, M.J., Sheil, B., Steidler, L., O'Mahony, L., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D., et al. (2006). Comparative and functional analysis of sortase-dependent proteins in the predicted secretome of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4143–4153.
- Pitino, I., Randazzo, C.L., Cross, K.L., Parker, M.L., Bisignano, C., Wickham, M.S.J., Mandalari, G., and Caggia, C. (2012). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains inoculated in cheese matrix during simulated human digestion. *ResearchGate* 31, 57–63.
- Plaisancié, P., Claustre, J., Estienne, M., Henry, G., Boutrou, R., Paquet, A., and Léonil, J. (2013). A novel bioactive peptide from yoghurts modulates expression of the gel-forming MUC2 mucin as well as population of goblet cells and Paneth cells along the small intestine. *J. Nutr. Biochem.* 24, 213–221.
- Poyart, C., Quesne, G., Coulon, S., Berche, P., and Trieu-Cuot, P. (1998). Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J. Clin. Microbiol.* 36, 41–47.
- Pretzer, G., Snel, J., Molenaar, D., Wiersma, A., Bron, P.A., Lambert, J., de Vos, W.M., van der Meer, R., Smits, M.A., and Kleerebezem, M. (2005). Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 187, 6128–6136.

-Q-

Qin, H., Zhang, Z., Hang, X., and Jiang, Y. (2009). *L. plantarum* prevents enteroinvasive *Escherichia coli*-induced tight junction proteins changes in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol.* 9, 63.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65.

-R-

Rabot, S., Rafter, J., Rijkers, G.T., Watzl, B., and Antoine, J.-M. (2010). Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics: Impact of Probiotics on Digestive System Metabolism. *J. Nutr.* 140, 677S–689S.

Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., Takabayashi, K., et al. (2004). Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 126, 520–528.

Resta-Lenert, S., and Barrett, K.E. (2003). Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 52, 988–997.

Reunanen, J., von Ossowski, I., Hendrickx, A.P.A., Palva, A., and de Vos, W.M. (2012). Characterization of the SpaCBA pilus fibers in the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2337–2344.

Ridlon, J.M., Kang, D.J., Hylemon, P.B., and Bajaj, J.S. (2014). Bile acids and the gut microbiome. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 30, 332–338.

Ridlon, J.M., Harris, S.C., Bhowmik, S., Kang, D.-J., and Hylemon, P.B. (2016). Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes* 7, 22–39.

Ringel-Kulka, T., Palsson, O.S., Maier, D., Carroll, I., Galanko, J.A., Leyer, G., and Ringel, Y. (2011). Probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium lactis* Bi-07 versus placebo for the symptoms of bloating in patients with functional bowel disorders: a double-blind study. *J. Clin. Gastroenterol.* 45, 518–525.

- Rizkalla, S.W., Luo, J., Kabir, M., Chevalier, A., Pacher, N., and Slama, G. (2000). Chronic consumption of fresh but not heated yogurt improves breath-hydrogen status and short-chain fatty acid profiles: a controlled study in healthy men with or without lactose maldigestion. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 1474–1479.
- Rodríguez, C., Medici, M., Rodríguez, A.V., Mozzi, F., and Font de Valdez, G. (2009). Prevention of chronic gastritis by fermented milks made with exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains. *J. Dairy Sci.* 92, 2423–2434.
- Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F., Vezza, T., Garrido-Mesa, N., Olivares, M., Comalada, M., Riccardi, C., Utrilla, M.P., Rodríguez-Cabezas, M.E., and Galvez, J. (2015). The viability of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 is not essential to exert intestinal anti-inflammatory properties. *Food Funct.* 6, 1176–1184.
- Roos, S., and Jonsson, H. (2002). A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiol. Read. Engl.* 148, 433–442.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., and Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 29–33.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., and Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 12, 163–171.
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C.G., and Salminen, S. (2006). Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J. Food Prot.* 69, 2011–2015.
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Arigoni, F., de los Reyes-Gavilán, C.G., and Margolles, A. (2009). Bile affects the synthesis of exopolysaccharides by *Bifidobacterium animalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1204–1207.
- Ruiz, L., Sánchez, B., Ruas-Madiedo, P., de Los Reyes-Gavilán, C.G., and Margolles, A. (2007). Cell envelope changes in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* as a response to bile. *FEMS Microbiol. Lett.* 274, 316–322.

Ruiz, L., Margolles, A., and Sánchez, B. (2013). Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Front. Microbiol.* 4, 396.

Rul, F., Ben-Yahia, L., Chegdani, F., Wrzosek, L., Thomas, S., Noordine, M.-L., Gitton, C., Cherbuy, C., Langella, P., and Thomas, M. (2011). Impact of the metabolic activity of *Streptococcus thermophilus* on the colon epithelium of gnotobiotic rats. *J. Biol. Chem.* 286, 10288–10296.

-S-

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., and Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84, 197–215.

Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stammati, A., and Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol. Toxicol.* 21, 1–26.

Sánchez, B., González-Rodríguez, I., Arbolea, S., López, P., Suárez, A., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., and Gueimonde, M. (2015). The effects of *Bifidobacterium breve* on immune mediators and proteome of HT29 cells monolayers. *BioMed Res. Int.* 2015, 479140.

Sanders, M.E., and Klaenhammer, T.R. (2001). Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J. Dairy Sci.* 84, 319–331.

Santos, C.M.A., Pires, M.C.V., Leão, T.L., Hernández, Z.P., Rodriguez, M.L., Martins, A.K.S., Miranda, L.S., Martins, F.S., and Nicoli, J.R. (2016). Selection of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for vaginitis treatment. *Microbiol. Read. Engl.*

Savaiano, D.A. (2014). Lactose digestion from yogurt: mechanism and relevance. *Am. J. Clin. Nutr.* 99, 1251S–5S.

Schillinger, U., Guigas, C., and Heinrich Holzapfel, W. (2005). In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *Int. Dairy J.* 15, 1289–1297.

Schneewind, O., Fowler, A., and Faull, K.F. (1995). Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*. *Science* 268, 103–106.

Schneider, S.M. (2008). Probiotiques. *Médecine Mal. Métaboliques* 2, 363–367.

- Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R.C., McNabb, W.C., Moughan, P.J., and Roy, N.C. (2013). The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators Inflamm.* 2013, 237921.
- Servin, A.L., and Coconnier, M.-H. (2003). Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17, 741–754.
- Shahbal, S., Hemme, D., and Renault, P. (1993). Characterization of a Cell Envelope-Associated Proteinase Activity from *Streptococcus thermophilus* H-Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 177–182.
- Sharif, M.R., Kashani, H.H., Ardakani, A.T., Kheirkhah, D., Tabatabaei, F., and Sharif, A. (2016). The Effect of a Yeast Probiotic on Acute Diarrhea in Children. *Probiotics Antimicrob. Proteins.*
- Siciliano, R.A., and Mazzeo, M.F. (2012). Molecular mechanisms of probiotic action: a proteomic perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 390–396.
- Sindhu, K.N.C., Sowmyanarayanan, T.V., Paul, A., Babji, S., Ajjampur, S.S.R., Priyadarshini, S., Sarkar, R., Balasubramanian, K.A., Wanke, C.A., Ward, H.D., et al. (2014). Immune response and intestinal permeability in children with acute gastroenteritis treated with *Lactobacillus rhamnosus* GG: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 58, 1107–1115.
- Solano-Aguilar, G., Molokin, A., Botelho, C., Fiorino, A.-M., Vinyard, B., Li, R., Chen, C., Urban, J., Dawson, H., Andreyeva, I., et al. (2016). Transcriptomic Profile of Whole Blood Cells from Elderly Subjects Fed Probiotic Bacteria *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 (LGG) in a Phase I Open Label Study. *PloS One* 11, e0147426.
- Solís, G., de Los Reyes-Gavilan, C.G., Fernández, N., Margolles, A., and Gueimonde, M. (2010). Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe* 16, 307–310.
- Southcott, E., Tooley, K.L., Howarth, G.S., Davidson, G.P., and Butler, R.N. (2008). Yoghurts containing probiotics reduce disruption of the small intestinal barrier in methotrexate-treated rats. *Dig. Dis. Sci.* 53, 1837–1841.

Stiles, M.E., and Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1–29.

Sun, Z., Chen, X., Wang, J., Zhao, W., Shao, Y., Wu, L., Zhou, Z., Sun, T., Wang, L., Meng, H., et al. (2011). Complete genome sequence of *Streptococcus thermophilus* strain ND03. *J. Bacteriol.* 193, 793–794.

-T-

Tabbers, M.M., de Milliano, I., Roseboom, M.G., and Benninga, M.A. (2011). Is *Bifidobacterium breve* effective in the treatment of childhood constipation? Results from a pilot study. *Nutr. J.* 10, 19.

Tailliez, P. (2001). Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Le Lait* 81, 1–11.

Tanaka, Y., Takami, K., Nishijima, T., Aoki, R., Mawatari, T., and Ikeda, T. (2015). Short- and long-term dynamics in the intestinal microbiota following ingestion of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* GCL2505. *Biosci. Microbiota Food Health* 34, 77–85.

Taranto, M.P., Fernandez Murga, M.L., Lorca, G., and de Valdez, G.F. (2003). Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. *J. Appl. Microbiol.* 95, 86–91.

Taranto, M.P., Perez-Martinez, G., and Font de Valdez, G. (2006). Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. *Res. Microbiol.* 157, 720–725.

Tettelin, H., Masignani, V., Cieslewicz, M.J., Eisen, J.A., Peterson, S., Wessels, M.R., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Margarit, I., Read, T.D., et al. (2002). Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12391–12396.

Thakur, K., Tomar, S.K., and De, S. (2015). Lactic acid bacteria as a cell factory for riboflavin production. *Microb. Biotechnol.*

The european food information concil. www.eufic.org. 2006

Thibault, H., Aubert-Jacquín, C., and Goulet, O. (2004). Effects of long-term consumption of a fermented infant formula (with *Bifidobacterium breve* c50 and *Streptococcus thermophilus* 065) on acute diarrhea in healthy infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 39, 147–152.

Thomas, M., Wrzosek, L., Ben-Yahia, L., Noordine, M.-L., Gitton, C., Chevret, D., Langella, P., Mayeur, C., Cherbuy, C., and Rul, F. (2011). Carbohydrate metabolism is essential for the colonization of *Streptococcus thermophilus* in the digestive tract of gnotobiotic rats. *PloS One* 6, e28789.

Ton-That, H., Faull, K.F., and Schneewind, O. (1997). Anchor structure of staphylococcal surface proteins. A branched peptide that links the carboxyl terminus of proteins to the cell wall. *J. Biol. Chem.* 272, 22285–22292.

Ton-That, H., Liu, G., Mazmanian, S.K., Faull, K.F., and Schneewind, O. (1999). Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 12424–12429.

Ton-That, H., Mazmanian, S.K., Faull, K.F., and Schneewind, O. (2000). Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Sortase catalyzed in vitro transpeptidation reaction using LPXTG peptide and NH(2)-Gly(3) substrates. *J. Biol. Chem.* 275, 9876–9881.

Tooley, K.L., Howarth, G.S., Lymn, K.A., Lawrence, A., and Butler, R.N. (2006). Oral ingestion of *Streptococcus thermophilus* diminishes severity of small intestinal mucositis in methotrexate treated rats. *Cancer Biol. Ther.* 5, 593–600.

Tuomola, E.M., and Salminen, S.J. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy Lactobacillus strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 45–51.

Turpin, W., Humblot, C., Noordine, M.-L., Thomas, M., and Guyot, J.-P. (2012). Lactobacillaceae and cell adhesion: genomic and functional screening. *PloS One* 7, e38034.

-U-

Upadrasta, A., and Madempudi, R.S. (2016). Probiotics and blood pressure: current insights. *Integr. Blood Press. Control* 9, 33–42.

Uriot, O., Galia, W., Awussi, A.A., Perrin, C., Denis, S., Chalancon, S., Lorson, E., Poirson, C., Junjua, M., Le Roux, Y., et al. (2016). Use of the dynamic gastro-intestinal model TIM to explore the survival of the yogurt bacterium *Streptococcus thermophilus* and the metabolic activities induced in the simulated human gut. Food Microbiol. 53, Part A, 18–29.

Uriot, O., Galia, W., Roussel, Y., Lorson, E., Denis, S., Chalancon, Alric, M., Blanquet-Diot, S., and Dary-Mourot, A. Use of the Technology R-IVET to identify in *Streptococcus thermophilus* genes specifically expressed under simulated human digestion conditions and in presence of intestinal microbiota (in preparation).

-V-

Van Oss, C.J., Chaudhury, M.K., and Good, R.J. (1988). Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. Chem. Rev. 88, 927–941.

Vanier, G., Sekizaki, T., Domínguez-Punaro, M.C., Esgleas, M., Osaki, M., Takamatsu, D., Segura, M., and Gottschalk, M. (2008). Disruption of *srtA* gene in *Streptococcus suis* results in decreased interactions with endothelial cells and extracellular matrix proteins. Vet. Microbiol. 127, 417–424.

Veiga, P., Pons, N., Agrawal, A., Oozeer, R., Guyonnet, D., Brazeilles, R., Faurie, J.-M., Vlieg, J.E.T. van H., Houghton, L.A., Whorwell, P.J., et al. (2014). Changes of the human gut microbiome induced by a fermented milk product. Sci. Rep. 4, 6328.

Vélez, M.P., De Keersmaecker, S.C.J., and Vanderleyden, J. (2007). Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. FEMS Microbiol. Lett. 276, 140–148.

Vesterlund, S., Paltta, J., Karp, M., and Ouwehand, A.C. (2005). Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. Res. Microbiol. 156, 238–244.

Vidlock, E.J., and Cremonini, F. (2012). Meta-analysis: probiotics in antibiotic-associated diarrhoea. Aliment. Pharmacol. Ther. 35, 1355–1369.

Vinderola, C.G., and Reinheimer, J.A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Res. Int.* 36, 895–904.

de Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., and Schrezenmeir, J. (2001). Probiotics--compensation for lactase insufficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 421S–429S.

-W-

Walsham, A.D.S., MacKenzie, D.A., Cook, V., Wemyss-Holden, S., Hews, C.L., Juge, N., and Schüller, S. (2016). *Lactobacillus reuteri* Inhibition of Enteropathogenic *Escherichia coli* Adherence to Human Intestinal Epithelium. *Front. Microbiol.* 7, 244.

Walter, J., Heng, N.C.K., Hammes, W.P., Loach, D.M., Tannock, G.W., and Hertel, C. (2003). Identification of *Lactobacillus reuteri* genes specifically induced in the mouse gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2044–2051.

Walter, J., Loach, D.M., Alqumber, M., Rockel, C., Hermann, C., Pfitzenmaier, M., and Tannock, G.W. (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.

Wan, L.-Y.M., Allen, K.J., Turner, P.C., and El-Nezami, H. (2014). Modulation of mucin mRNA (MUC5AC and MUC5B) expression and protein production and secretion in Caco-2/HT29-MTX co-cultures following exposure to individual and combined *Fusarium mycotoxins*. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 139, 83–98.

Wang, H., Brook, C.L., Whittaker, A.L., Lawrence, A., Yazbeck, R., and Howarth, G.S. (2013). Effects of *Streptococcus thermophilus* TH-4 in a rat model of doxorubicin-induced mucositis. *Scand. J. Gastroenterol.* 48, 959–968.

Wang, H., Lee, I.-S., Braun, C., and Enck, P. (2016). Effect of probiotics on central nervous system functions in animals and humans - a systematic review. *J. Neurogastroenterol. Motil.*

- Wang, L., Cao, H., Liu, L., Wang, B., Walker, W.A., Acra, S.A., and Yan, F. (2014). Activation of Epidermal Growth Factor Receptor Mediates Mucin Production Stimulated by p40, a *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived Protein. *J. Biol. Chem.* 289, 20234–20244.
- Weiss, G., and Jespersen, L. (2010). Transcriptional analysis of genes associated with stress and adhesion in *Lactobacillus acidophilus* NCFM during the passage through an in vitro gastrointestinal tract model. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 18, 206–214.
- Weiss, G., Rasmussen, S., Zeuthen, L.H., Nielsen, B.N., Jarmer, H., Jespersen, L., and Frøkiaer, H. (2010). *Lactobacillus acidophilus* induces virus immune defence genes in murine dendritic cells by a Toll-like receptor-2-dependent mechanism. *Immunology* 131, 268–281.
- Whitford, E.J., Cummins, A.G., Butler, R.N., Prisciandaro, L.D., Fauser, J.K., Yazbeck, R., Lawrence, A., Cheah, K.Y., Wright, T.H., Lymn, K.A., et al. (2009). Effects of *Streptococcus thermophilus* TH-4 on intestinal mucositis induced by the chemotherapeutic agent, 5-Fluorouracil (5-FU). *Cancer Biol. Ther.* 8, 505–511.
- Wong, S., Jamous, A., O'Driscoll, J., Sekhar, R., Weldon, M., Yau, C.Y., Hirani, S.P., Grimble, G., and Forbes, A. (2014). A *Lactobacillus casei* Shirota probiotic drink reduces antibiotic-associated diarrhoea in patients with spinal cord injuries: a randomised controlled trial. *Br. J. Nutr.* 111, 672–678.
- Wrzosek, L., Rul, F., Noordine, M.L., Bouet, S., Robert, V., Langella, P., Thomas, M. (2012). Sa2059 Lactate Plays a Key Role in the Crosstalk Between *Streptococcus thermophilus* and Colonic Epithelium in Gnotobiotic Rats. *Gastroenterology*. 142 issue 5 on page S-392
- Wu, Y., Zhu, C., Chen, Z., Chen, Z., Zhang, W., Ma, X., Wang, L., Yang, X., and Jiang, Z. (2016). Protective effects of *Lactobacillus plantarum* on epithelial barrier disruption caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in intestinal porcine epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 172, 55–63.
- Wyszyńska, A., Kobierecka, P., Bardowski, J., and Jagusztyn-Krynicka, E.K. (2015). Erratum to: Lactic acid bacteria—20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 4531.

-X-

Xiao, J., Kondo, S., Yanagisawa, N., Miyaji, K., Enomoto, K., Sakoda, T., Iwatsuki, K., and Enomoto, T. (2007). Clinical Efficacy of Probiotic *Bifidobacterium longum* for the Treatment of Symptoms of Japanese Cedar Pollen Allergy in Subjects Evaluated in an Environmental Exposure Unit. *Allergol. Int.* 56, 67–75.

Xie, Q., Pan, M., Huang, R., Tian, X., Tao, X., Shah, N.P., Wei, H., and Wan, C. (2016). Short communication: Modulation of the small intestinal microbial community composition over short-term or long-term administration with *Lactobacillus plantarum* ZDY2013. *J. Dairy Sci.* 99, 6913–6921.

-Y-

Yamaguchi, M., Terao, Y., Ogawa, T., Takahashi, T., Hamada, S., and Kawabata, S. (2006). Role of *Streptococcus sanguinis* sortase A in bacterial colonization. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 8, 2791–2796.

Yamano, T., Iino, H., Takada, M., Blum, S., Rochat, F., and Fukushima, Y. (2006). Improvement of the human intestinal flora by ingestion of the probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* La1. *Br. J. Nutr.* 95, 303–312.

Yang, F., Wang, J., Li, X., Ying, T., Qiao, S., Li, D., and Wu, G. (2007). 2-DE and MS analysis of interactions between *Lactobacillus fermentum* I5007 and intestinal epithelial cells. *Electrophoresis* 28, 4330–4339.

Yoon, J.S., Sohn, W., Lee, O.Y., Lee, S.P., Lee, K.N., Jun, D.W., Lee, H.L., Yoon, B.C., Choi, H.S., Chung, W.-S., et al. (2014). Effect of multispecies probiotics on irritable bowel syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 29, 52–59.

-Z-

Zannini, E., Waters, D.M., Coffey, A., and Arendt, E.K. (2016). Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 1121–1135.

- Zhang, L., Li, N., Caicedo, R., and Neu, J. (2005). Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J. Nutr.* 135, 1752–1756.
- Zhang, Q., Yang, B., Brashears, M.M., Yu, Z., Zhao, M., Liu, N., and Li, Y. (2014). Influence of casein hydrolysates on exopolysaccharide synthesis by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *J. Sci. Food Agric.* 94, 1366–1372.
- Zhang, W., Wang, H., Liu, J., Zhao, Y., Gao, K., and Zhang, J. (2013). Adhesive ability means inhibition activities for lactobacillus against pathogens and S-layer protein plays an important role in adhesion. *Anaerobe* 22, 97–103.
- Zhang, W.-M., Wang, H.-F., Gao, K., Wang, C., Liu, L., and Liu, J.-X. (2015). *Lactobacillus reuteri* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase functions in adhesion to intestinal epithelial cells. *Can. J. Microbiol.* 61, 373–380.
- Zhang, Z.-G., Ye, Z.-Q., Yu, L., and Shi, P. (2011). Phylogenomic reconstruction of lactic acid bacteria: an update. *BMC Evol. Biol.* 11, 1.
- Zhong, L., Zhang, X., and Covasa, M. (2014). Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 20, 7878–7886.
- Zhu, Y., Xiao, L., Shen, D., and Hao, Y. (2010). Competition between yogurt probiotics and periodontal pathogens in vitro. *Acta Odontol. Scand.* 68, 261–268.
- Ziar, H., Gérard, P., and Riazi, A. (2014). Effect of prebiotic carbohydrates on growth, bile survival and cholesterol uptake abilities of dairy-related bacteria. *J. Sci. Food Agric.* 94, 1184–1190.
- Zocco, M.A., dal Verme, L.Z., Cremonini, F., Piscaglia, A.C., Nista, E.C., Candelli, M., Novi, M., Rigante, D., Cazzato, I.A., Ojetti, V., et al. (2006). Efficacy of *Lactobacillus* GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 23, 1567–1574.
- Zoghbi, S., Trompette, A., Claustre, J., El Homsy, M., Garzón, J., Jourdan, G., Scoazec, J.-Y., and Plaisancié, P. (2006). β -Casomorphin-7 regulates the secretion and expression of gastrointestinal mucins through a μ -opioid pathway. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290, G1105–1113.

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Arbre phylogénétique, basé sur l'analyse comparative de séquences du gène codant l'ARNr 16S, présentant les grands groupes des bactéries lactiques et les groupes non reliés <i>Propionibacterium</i> et <i>Bifidobacterium</i>	16
Figure 2 : Les principaux effets bénéfiques des probiotiques sur la muqueuse intestinale.	20
Figure 3 : Illustration schématique des mécanismes d'adaptation et d'action des souches probiotiques.....	22
Figure 4 : Lignes directrices et critères stricts pour l'évaluation et la sélection de potentiels micro-organismes probiotiques (FAO/OMS, 2002).....	26
Figure 5 : Composition de la bile et voie de synthèse des sels biliaires	30
Figure 6 : Les mécanismes moléculaires majeurs de la résistance au stress biliaire caractérisés chez les lactobacilles	33
Figure 7 : Représentation schématique des constituants de la muqueuse intestinale humaine..	48
Figure 8: Schematic representation of mucin peptide domains organization	62
Figure 9: Schematic illustration of mucin biosynthesis	63
Figure 10: Schematic distribution of mucus and mucins along the gastrointestinal tract.....	67
Figure 11: Schematic illustration of the intestinal mucosa and its interaction with the microbiota.....	75
Figure 12 : Arbre phylogénétique des streptocoques établi en se basant sur la comparaison des gènes codant les ARNs ribosomiques 16S.....	106
Figure 13 : Mécanisme d'ancrage des protéines à domaine LPxTG par la sortase A chez les bactéries à coloration Gram positive.....	118
Figure 14 : Etude du profil de croissance de la souche sauvage <i>S. thermophilus</i> LMD-9 ainsi que des mutants <i>srtA</i> , <i>prtS</i> et <i>mucBP</i> pendant 12 h à 42°C en milieu LM17.....	128
Figure 15 : Etude de la survie de <i>S. thermophilus</i> LMD-9 et <i>Lb. rhamnosus</i> GG aux différentes concentrations de sels biliaires.....	131
Figure 16 : Impact du milieu de culture DMEM et du triton X-100 à 0,1 % sur la survie de <i>S. thermophilus</i> LMD-9 (a) et des mutants <i>prtS</i> ⁻ (b), <i>mucBP</i> ⁻ (c) et <i>srtA</i> ⁻ (d).....	133
Figure 17 : Détermination du taux de transcrits des gènes <i>MUC2</i> et <i>MUC5AC</i> par qRT-PCR dans les cellules productrices de mucus HT29-MTX et HT29-CL. 16E.	163

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 18 : Détermination du taux de transcrits du gène <i>MUC2</i> par qRT-PCR dans les cellules Caco-2 TC7.	164
Figure 19: Schematic representation of the R-IVET approach used to identify genes that are induced during adhesion of <i>S. thermophilus</i> to Caco-2 TC7 cells	176
Figure 20: Schematic representation of the experimental approach employed to identify genes specifically induced during the adhesion of <i>S. thermophilus</i> LMD-9 to Caco-2 TC7 cells..	178
Figure 21: Survival of the R-IVET library in adhesion experiment conditions as compared to the wild type LMD-9 strain.....	182

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Exemples de bactéries lactiques utilisées dans les aliments fermentés traditionnels	14
Tableau 2 : Exemples de micro-organismes à activité probiotique (effets démontrés <i>in vitro</i> et/ou <i>in vivo</i>) utilisés dans la fabrication d'aliments et compléments alimentaires	23
Tableau 3 : Caractérisation des lignées cellulaires utilisées pour étudier l'adhésion bactérienne	39
Table 4: Mucins in the digestive system, their localization, cell expression and physiological functions	61
Tableau 5 : Exemples d'effets bénéfiques démontrés <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> en utilisant <i>S. thermophilus</i> seule ou en combinaison avec d'autres souches probiotiques.	110
Tableau 6 : Amorces utilisées pour la qRT-PCR semi-quantitative en temps réel	161
Table 7 : Primers used in this study	179
Table 8 : Results of R-IVET counter-selection as expressed by mean of clone number (CFU.ml ⁻¹) of two independent experiments.....	181
Table 9 : <i>S. thermophilus</i> LMD-9 induced genes during <i>in vitro</i> adhesion to Caco-2 TC7 cells	185

VALORISATION DES TRAVAUX DE THÈSE

VALORISATION DES TRAVAUX DE THÈSE

Ce travail de thèse m'a permis à la fois de gérer un projet de recherche et de pratiquer une activité d'enseignement. Durant ma thèse, j'ai travaillé sur des cellules eucaryotes et procaryotes et utilisé des techniques différentes. J'ai dû mettre au point certaines approches et j'ai pu être confrontée à des tests infructueux. En plus des premiers résultats publiés, des essais réalisés ont pu contribuer à d'autres résultats qui font l'objet d'un autre article dont je suis première auteure. Durant ma thèse, des collaborations ont été également effectuées et ont contribué à l'obtention de résultats dont une partie est déjà publiée. En plus de mes travaux de recherche, j'ai pu rédiger une revue qui a été soumise au Journal of functional food. Un autre atout de cette thèse est mon implication dans l'encadrement d'un stagiaire avec lequel j'ai obtenu des résultats qui ont d'ailleurs été publiés dans mon premier article. Les résultats de ma thèse m'ont également permis de présenter un poster dans un congrès international à l'Institut Pasteur de Paris et une communication orale (à venir dans le congrès des bactéries lactiques à Lille en juin 2017).

ARTICLES SCIENTIFIQUES

Implication of sortase-dependent proteins of *Streptococcus thermophilus* in adhesion to human intestinal epithelial cell lines and bile salts tolerance

Mounira Kebouchi, Wessam Galia, Magali Genay, Claire Soligot, Xavier Lecomte, Ahoefa Ablavi Awussi, Clarisse Perrin, Emeline Roux, Annie Dary-Mouro, Yves Le Roux. Article paru en 2016 dans le journal *Applied Microbiology and Biotechnology*

Functional in vitro screening of *Lactobacillus* strains isolated from Tunisian camel raw milk toward their selection as probiotic

Imen Mahmoudi, Olfa Ben Moussa, Tedj El Moulouk Khaldi, Mounira Kebouchi, Claire Soligot-Hognon, Yves Le Roux, Mnasser Hassouna. Article paru en 2016 dans le journal *Small Ruminant Research*

Mucins: the major component of the gastrointestinal mucus and an important element in interactions between intestinal mucosa, probiotic bacteria and dietary particles

Mounira Kebouchi, Yves Le Roux, Claire Soligot, Annie Dary-Mouro, Magali Genay. Revue soumise pour publication dans *Journal of Functional Foods*

VALORISATION DES TRAVAUX DE THÈSE

Highlighting induced-genes in *Streptococcus thermophilus* LMD-9 during adhesion to Caco-2 cells using recombinase-based *in vivo* expression technology.

Mounira Kebouchi, Ophélie Uriot, Emilie Lorson, Zeeshan Hafeez, Claire Soligot, Yves Le Roux, Magali Genay, Annie Dary (*En cours de redaction*).

Surface proteins involved in the adhesion of *Streptococcus salivarius* to human intestinal epithelial cells

Fanny Chaffanel, Florence Charron-Bourgoin, Claire Soligot, **Mounira Kebouchi**, Stéphane Berti, Sophie Payot, Yves Le Roux, Nathalie Leblond-Bourget (Article soumis au journal *Applied Microbiology and Biotechnology*)

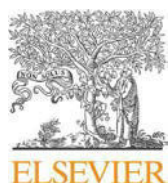
Phenotypic and probiotic characterization of new strains of non-pathogenic streptococci isolated from traditional Algerian fermented milks.

Tedj El Moulouk Khaldi, **Mounira Kebouchi**, Claire Soligot, Karima Kharroub, Yves Le Roux, Emeline Roux (*En cours de redaction*).

COMMUNICATION PAR AFFICHE

Factors involved in adherence of the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* to human intestinal cells

Mounira Kebouchi, Wessam Galia, Magali Genay, Xavier Lecomte, Ahoefa Ablavi Awussi, Claire Soligot, Clarisse Perrin, Emeline Roux , Annie Dary-Mourot and Yves Le Roux. Poster présenté au colloque « Young Researchers in Life Sciences ». 26-28 Mai 2014, Paris.



Functional in vitro screening of *Lactobacillus* strains isolated from Tunisian camel raw milk toward their selection as probiotic

Imen Mahmoudi^{a,*}, Olfa Ben Moussa^a, Tedj El Moulouk Khaldi^{b,c}, Mounira Kebouchi^{b,c}, Claire Soligot^{b,c}, Yves Le Roux^{b,c}, Mnasser Hassouna^a

^a Unité de Recherche Sciences et Technologies des Aliments, École Supérieure des Industries Alimentaires de Tunis (ESIAT), 58 Avenue Alain Savary, 1003 El Khadhra, Tunis, Tunisia

^b Université de Lorraine, Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (URAFPA), Équipe Protéolyse & Biofonctionnalités des Protéines & des Peptides (PB2P), Vandœuvre-lès-Nancy F-54506, France, France

^c INRA, Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (UR AFPA), Unité Sous Contrat 340, Vandœuvre-lès-Nancy F-54506, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2016

Received in revised form 15 March 2016

Accepted 16 March 2016

Available online 17 March 2016

Keywords:

Lactic acid bacteria

Camel raw milk

Probiotic

ABSTRACT

Twenty probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains from Tunisian camel raw milk were identified among a collection of 177 isolates. The selected strains were able to tolerate pH 2, pepsin, pancreatin and bile salts, as restrictive criteria for probiotic potential. LAB strains were identified using 16S rRNA gene sequencing. Fourteen isolates belonged to the species *Lactobacillus fermentum* and six to *Lactobacillus plantarum*. None of this LAB showed mucin degradation or hemolytic activity, while proving resistant to a series of clinically antibiotics. All strains have antibacterial activity against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. However, only 18 strains inhibited *Salmonella thyphimurium*. The *L. fermentum* strains showed an important level of adhesion to human Caco-2 and HT29-MTX epithelial cells. Our work suggests that camel raw milk is valuable source of probiotic bacteria with functional characters of intestinal lactobacilli. These bacteria may be further used in probiotic applications.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Increasingly the disease risk, such as cancer, intolerance to lactose, diabetes and cardiovascular diseases, the growing health awareness in the consumption of probiotic bacteria has encouraged consumers worldwide. The lactic acid bacteria are classified as the majority of probiotic bacteria and that are drawing increasing interest in the field of probiotics (Tannock, 2004; Haghshenas et al., 2015).

Among lactic acid bacteria, lactobacilli have a long history of safe use (Maragkoudakis et al., 2006). They are expanded in nature and present one of the major bacterial group involved in milk and dairy products where they have important roles during the manufacture and maturation (Pisano et al., 2014). In recent years, increased training exists for the isolation of new strains of *Lactobacillus* which have a beneficial effect on health when consumed by humans and can be isolated from different sources

and environments. It is well recognized that lactobacilli confers a beneficial health effects to humans and animals. Taking this *Lactobacillus* such as *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* stimulates the growth of beneficial microorganisms and reduces the amount of pathogens, thus amending the intestinal microbial balance of the host and reducing the risk of gastrointestinal diseases (Chiang and Pan, 2012). Moreover, lactobacilli have other health benefits, such as reduction of lactose intolerance by *Lactobacillus acidophilus* (Gilliland and Kim, 1984), reduction of cholesterol by *Bifidobacterium longum* (Miremadi et al., 2014) and enhanced immune response (Chiang and Pan, 2012).

In order to exert its beneficial effects on the host, probiotic bacteria have to be able to survive the gastrointestinal conditions and resist bile salts. Other functional property considered to characterise probiotics is the antagonistic effect against pathogens (Saarela et al., 2000; Xanthopoulos et al., 2012).

The ability of *Lactobacillus* bacteria to adhere to the mucosal surfaces of the intestine has been one of the parameters for the characterization of probiotic microorganisms. It is reported that the adherent probiotic lactobacilli have beneficial health effects, specially related to the inhibition of pathogens adhesion to intestinal cell lines (Lievin-Le Moal et al., 2002).

* Corresponding author at: Unité de Recherche Sciences et Technologies des Aliments, École Supérieure des Industries Alimentaires de Tunis (ESIAT), 58 Avenue Alain Savary, 1003 El Khadhra, Tunis, Tunisia.

E-mail address: imenmahmoudi15@yahoo.fr (I. Mahmoudi).

As regards the security of probiotic strains, the antibiotic resistance character is one of the aspects that need to be examined because of the important interests about the increasing level of resistance to antibiotics in regular utilization in medicine (Monteagudo-Mera et al., 2012).

Many raw materials with probiotic importance will be certainly a key of development for functional foods (Coman et al., 2012; De Almeida et al., 2015).

Camel milk is the important source of human nutrition in hot and arid climate, producing mainly milk. In these regions, camels can produce high volumes of good quality milk which may contain essential nutrients for human health (Jrad et al., 2013). Lactic acid bacteria found in this milk have antimicrobial activity and high conservation behaviour and inhibit some pathogenic microorganisms (Barbour et al., 1984). From an economic point of view and due to the increasing consumer interest in functional foods, camel milk has great potential effects because it has specific biological properties such as high nutritional value and important medicinal values (Shabo et al., 2005). Consequently that it is exotic food, camel milk could form a potential source of probiotic lactic acid bacteria (Yateem et al., 2008).

This present study was therefore aimed to identifying candidate bacteria from camel raw milk with probiotic properties and evaluating their effects. In addition, only the strains that did show tolerance to low pH, pepsin, pancreatin and bile salts and not have any pathogenic character were further tested for their ability to inhibit pathogens and resist to antibiotics. For adhesion properties, may be relevant.

2. Materials and methods

2.1. Isolation of bacteria from camel's milk

Eighty samples of camel's milk were collected under aseptic conditions from different regions of Tunisia (North, Middle, East and South). A number of bacteria strains were isolated using the dilution plate method on de Man Rogosa Sharpe (MRS) agar medium (Biokar Diagnostics). Plates were incubated at 37 °C for 48 h under anaerobic conditions.

2.2. Tolerance of strains at pH 2, pepsin and pancreatin

The methods used and described below were performed according to Pennacchia et al. (2004) with minor modifications. Briefly, one hundred seventy seven overnight bacterial cells cultivated in MRS broth (Biokar Diagnostics) were harvested by centrifugation (10000 rpm, 5 min, 4 °C) and washed twice with PBS adjusted to pH 7, before being resuspended either in phosphate buffer (PBS) solution at pH 2, containing pepsin (3 g/L, Fluka, Germany), after that, in PBS solution at pH 8, containing pancreatin (3 g/L, Fluka, Germany) (strains resistant to pepsin). Resistance was assessed in terms of viable colony counts and enumerated after incubation at 37 °C for 3 h with pepsin and for 4 h with pancreatin, reflecting the time spent by food in the stomach and small intestine, respectively.

Survival rates were calculated according to the following equation:

$$\text{Survival rate (\%)} = (N1/N2) \times 100$$

Where N1 represents the total viable count of strains at time 3 h "or" 4 h and N0 represents the total viable count of strains at time 0 h.

2.3. Bile tolerance

The tolerance of the LAB strains to the bile salts was tested as previously described by Anandharaj and Sivasankari (2014). Overnight cultures were inoculated in MRS broth supplemented

with bile salts (oxgall, Sigma) at different concentrations (0, 0.1, 0.3, 0.5 and 1%, w/v). The mixture was incubated at 37 °C for 3 and 5 h and was removed periodically for determination of total viable count following the plate method and t = 0 h was the control.

2.4. Identification of strains

The phenotypic results of the bacterial strains Gram-positive, catalase-negative and resistant to gastric stress were treated with 16S rRNA sequencing. Strains were identified by 16S rRNA sequence analysis in URAFFA (Animal Research Unit and Animal Products Features – University of Lorraine – INRA – Nancy- France). 16S rRNA genes were amplified by PCR using the universal primer SSU for: TGCCAGCAGCCGCGTA and SSU rev: GACGGGCGGTGTGTACAA. Amplification was done using a thermocycler as follows: denaturation at 95 °C for 3 min, 35 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 55 °C, and 1 min at 72 °C, and 10 min at 72 °C. Amplified fragments were purified from agarose gels using a PCR purification kit (Roche). The analysis of alignment and homology of the partial nucleotide sequence of *Lactobacillus* spp. was carried out by the basic local alignment search tool (Bioedit and BLAST NCBI).

2.5. Safety assessment

2.5.1. Mucin degradation

The mucin degradation test was carried out according to Zhou et al. (2001) with minor modifications. Mucin (type III, Sigma, France) was supplemented to agarose medium at a concentration of 0.5% (w/v) and with or without 3% (w/v) of glucose. 20 µL of viable bacterial cultures were inoculated on the surface of the medium by spotting method. The plates were incubated at 37 °C for 72 h and then stained with 0.1% (w/v) of amido black in 3.5 M acetic acid for 30 min. After that, they were washed once with 1.2 M acetic acid. The discolored zone around the colony of *Escherichia coli* strain (DH5 alpha, Institute Pasteur of Tunisia), was used as positive control, appeared. The mucin degradation activity was expressed as the size of the area of lysis of mucin.

2.5.2. Haemolytic activity

The haemolytic test was determined by spotting on blood agar plates. This activity was found by observation of a clear halo around the spot (β-haemolysis), a greenish halo (α-haemolysis) or absence of halo (γ-haemolysis) (Meira et al., 2012).

2.6. Coexistence test

Coexistence among the twenty selected LAB was tested by a cross-streak method according to Daeschel (1992). The strains were streaked perpendicularly to each other on MRS agar. After incubation at 37 °C for 48 h, the coexistence was observed at the streaks crossing points.

2.7. Antibiotic susceptibility

The antibiotic susceptibility against clinically important antibiotics, such as penicillin G (6 µg), ampicillin (10 µg), cefuroxime (30 µg), ceftriaxone (30 µg), streptomycin (10 UI), chloramphenicol (30 µg), amikacin (30 µg), tetracycline (30 UI), erythromycin (15 UI), colistin (50 µg), nalidixic acid (30 µg) and ciprofloxacin (5 µg), was determined by the disc diffusion method which previously described by Charteris et al. (1998) with minor modifications. The LAB strains were grown in MRS broth and incubated at 37 °C for 24 h. 1 mL of each cell suspension was seeded in Mueller-Hinton agar (Biokar Diagnostics) and stored at 4 °C for 1 h to solidify the media. Then, antibiotic discs (BioMérieux, France) were deposited

on the agar. After drying at 4 °C for 2 h, the petri dishes were incubated at 37 °C for 24 h. The diameter was measured in accordance with the critical diameters proposed by the committee of the susceptibility of the [French Society of Microbiology \(2014\)](#).

2.8. Antimicrobial activity

The inhibitory effect of different strains over pathogens *Salmonella thyphimurium* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Listeria monocytogenes* (ATCC 070 101 121) and *E. coli* (DH5 alpha, Institute Pasteur of Tunisia) was tested using the agar disc diffusion method previously described by [Villani et al. \(1997\)](#) and [Ben Moussa et al. \(2008\)](#).

2.9. Cells cultures

Caco-2 TC7 is human colorectal cell line which differentiates spontaneously *in vitro* culture forming a polarized cell monolayer. The human colonic cell line Caco-2 (UMR 7274, Laboratory of Reactions and Process Engineering, Nancy, France) was frequently cultured in essential medium Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM (Invitrogen), supplemented with 20% (w/v) fetal calf serum (FCS) (Gibco®), 1% (w/v) nonessential aminoacid solution (Invitrogen), and 1% (w/v) antibiotic solution (penicillin/streptomycin) (Invitrogen). Cells were maintained in plastic flasks (75 cm², Dustcher) for four days at 37 °C in a 10% CO₂ atmosphere.

HT29-MTX are human colorectal cells, derived from HT-29 cells. After a long treatment with methotrexate, this cell line acquired the ability to differentiate into goblet cells *in vitro* and produce a high amount of mucus ([Lesuffleur et al., 1990](#)). The HT29-MTX cells were provided by Thécia Lesuffleur (INSERM UMR S 938, Paris, France). This cell lines were cultured in DMEM (Invitrogen), supplemented with 10% (w/v) FCS (Invitrogen), 1% (w/v) nonessential aminoacid solution (Invitrogen), and 1% (w/v) antibiotic solution (penicillin/streptomycin) (Invitrogen). Cells were maintained at 37 °C in a 10% CO₂ atmosphere.

2.10. Adhesion assay

Quantitative analysis of bacterial adherence to differentiated cells was tested as previously described by [Turpin et al. \(2012\)](#) and [Kebouchi et al. \(2016\)](#). The cells were seeded at a concentration of 5 × 10⁶ cells/well in six well culture plates for 21–25 days prior to use in adhesion assay. The cells culture medium was daily changed and replaced by DMEM supplemented with 20% (w/v) FCS for Caco-2 and 10% (w/v) FCS for HT29-MTX and without antibiotic 48 h before the adhesion assay. The bacterial cultures (14 h, 20 mL) were harvested (4000 rpm, 15 min, 4 °C) and washed with 5 mL of Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Fisher Scientific) (Invitrogen). Cells were re-suspended in appropriate DMEM without antibiotics to achieve a concentration of 10⁹ CFU/mL. The growth medium in the six-well culture plates monolayers was aspirated and the cells washed once with HBSS. A 2 mL aliquot of LAB suspension (10⁹ CFU/mL in DMEM) was added to each well of the tissue culture plate (to have bacterial cell to epithelial cell ratio of 1000:1) and incubated at 37 °C in 10% CO₂ atmosphere for 2 h. Afterwards, the supernatants from each well were recovered and the cell monolayers were washed four times with HBSS to obtain non-adherent bacterial suspensions.

Cell monolayer was scraped with 0.1% (v/v) Triton® X-100 (Sigma, France), and passed three times through a 21 × g needle and then incubated for 30 min at room temperature. The number of non adherent bacteria from the supernatant and the washing solution and the adherent bacteria from the cell monolayer were determined by plating appropriate dilutions on MRS agar medium. The colonies were counted after 48 h incubation at 37 °C. The results were expressed as a relative adherence calculated from the number of adhering bacteria counted as colony-forming unit per cell

Table 1

Effect of pepsin at pH 2 and pancreatin on the viability of twenty LAB strains.

LAB strains	viable counts (log CFU/mL)			
	Pepsin at pH 2		Pancreatin	
	0	3 h	0	4 h
B2	8.46 ± 0.01	8.45 ± 0.2	8.43 ± 0.01	8.40 ± 0.1
B19	8.41 ± 0.02	8.38 ± 0.3	8.47 ± 0.02	8.47 ± 0.5
B23	8.08 ± 0.1	8.06 ± 0.1	8.32 ± 0.01	8.30 ± 0.3
B28	8.47 ± 0.03	8.44 ± 0.5	8.07 ± 0.03	8.00 ± 0.02
B79	8.16 ± 0.1	8.15 ± 0.02	8.04 ± 0.02	8.00 ± 0.1
B90	8.48 ± 0.01	8.47 ± 0.01	8.05 ± 0.01	8.04 ± 0.1
B93	8.11 ± 0.05	8.01 ± 0.05	8.35 ± 0.04	8.34 ± 0.1
B97	8.44 ± 0.02	8.42 ± 0.03	8.48 ± 0.1	8.47 ± 0.2
B103	8.47 ± 0.1	8.46 ± 0.2	8.25 ± 0.2	8.25 ± 0.5
B104	8.44 ± 0.05	8.43 ± 0.1	8.09 ± 0.06	8.08 ± 0.4
B107	8.48 ± 0.01	8.47 ± 0.02	8.08 ± 0.3	8.08 ± 0.02
B116	8.39 ± 0.03	8.37 ± 0.3	8.21 ± 0.1	8.20 ± 0.01
B142	8.45 ± 0.02	8.45 ± 0.2	8.26 ± 0.2	8.26 ± 0.2
B156	8.48 ± 0.1	8.46 ± 0.01	8.28 ± 0.04	8.27 ± 0.3
B128	8.47 ± 0.01	8.41 ± 0.1	8.22 ± 0.1	8.22 ± 0.07
B134	8.48 ± 0.02	8.46 ± 0.4	8.19 ± 0.2	8.18 ± 0.12
B143	8.41 ± 0.01	8.40 ± 0.01	8.15 ± 0.02	8.15 ± 0.23
B149	8.21 ± 0.1	8.18 ± 0.1	8.29 ± 0.03	8.29 ± 0.1
B166	8.45 ± 0.1	8.43 ± 0.1	8.19 ± 0.02	8.19 ± 0.1
B174	8.42 ± 0.03	8.40 ± 0.6	8.21 ± 0.1	8.21 ± 0.3

which standardized to 100%. Experiments were carried out with two independent replicate for each strain in duplicate.

2.10. Statistical analysis

All experiences were designed based on a completely arbitrary design and statistical differences were analysed by one-way ANOVA followed by multiple mean comparisons Student's test. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant. Results were presented as the mean ± standard deviation of three values.

3. Results

3.1. LAB screening for pH, pepsin and pancreatin resistance

Only the LAB strains have a survival rate ≥ 80% were retained for the rest resistance tests under the conditions of the digestive tract strains. Only the results of twenty strains out of the 177 tested for tolerance to pepsin at pH 2 are noted in [Table 1](#). LAB isolates, achieved a survival rates higher than 90% what is considered a good acid and pepsin resistance. In response to pancreatic fluid ([Table 1](#)), the survival rate was > 98% for 20 isolates tested. No significant differences were observed in the loss of viability of the strains after 3 h and 4 h of incubation (*P* > 0.05).

3.2. Bile salts tolerance

[Table 2](#) shows the effect of bile salts on the growth of the strains. All LAB strains exhibited an excellent bile tolerance, no significant differences (*p* > 0.05) were noted in the loss of viability after 5 h, until the concentration assayed 0.5%; all tested strains practically retained the same level until 100% of viability. Moreover, significant reductions of viability (*p* < 0.05) were observed at 1% of bile salts after 5 h of incubation for all tested isolated. Nevertheless, despite this decrease in viability, viable bacteria were observed at all tested concentrations of bile salts after 5 h of incubation, and the viable counts, in these cases, were always below 7.4 log of CFU/mL.

Table 2
Effect of bile salts concentrations on the viability of twenty LAB strains.

LAB Strains	Viable counts (logCFU/mL)											
	0 h				3 h				5 h			
	%Bile salts (w/v)											
	Control*	0.3	0.5	1	Control	0.3	0.5	1	Control	0.3	0.5	1
B2	9.03 ± 0.03	8.91 ± 0.1	8.87 ± 0.3	8.76 ± 0.11	10.04 ± 0.02	8.44 ± 0.01	8.43 ± 0.2	8.11 ± 0.05	11.35 ± 0.05	8.012 ± 0.01	7.61 ± 0.4	4.02 ± 0.02
B19	8.78 ± 0.1	8.58 ± 0.02	8.11 ± 0.1	8.24 ± 0.1	10.12 ± 0.05	8.21 ± 0.01	8.00 ± 0.01	7.85 ± 0.03	11.22 ± 0.2	7.84 ± 0.07	7.5 ± 0.02	5.19 ± 0.02
B23	8.90 ± 0.1	8.78 ± 0.01	8.14 ± 0.1	8.02 ± 0.1	10.54 ± 0.02	8.62 ± 0.02	8.00 ± 0.28	8.00 ± 0.1	11.06 ± 0.1	8.36 ± 0.02	7.83 ± 0.01	4.00 ± 0.08
B28	8.91 ± 0.1	8.84 ± 0.1	8.77 ± 0.10	8.72 ± 0.11	10.05 ± 0.5	8.67 ± 0.1	8.11 ± 0.2	8.04 ± 0.1	11.12 ± 0.02	7.50 ± 0.02	7.43 ± 0.01	4.02 ± 0.02
B79	8.88 ± 0.1	8.80 ± 0.1	8.70 ± 0.10	8.70 ± 0.11	10.00 ± 0.5	8.60 ± 0.1	8.10 ± 0.2	8.00 ± 0.1	11.92 ± 0.02	7.40 ± 0.02	7.33 ± 0.01	5.02 ± 0.02
B90	8.950 ± 0.04	8.81 ± 0.1	8.70 ± 0.1	8.69 ± 0.21	10.00 ± 0.1	8.72 ± 0.11	8.61 ± 0.3	8.00 ± 0.1	10.88 ± 0.1	8.02 ± 0.1	7.12 ± 0.1	4.07 ± 0.1
B93	8.68 ± 0.1	8.56 ± 0.12	8.44 ± 0.17	8.21 ± 0.04	10.44 ± 0.1	8.32 ± 0.05	8.13 ± 0.03	8.01 ± 0.02	10.78 ± 0.07	8.00 ± 0.41	7.12 ± 0.11	4.04 ± 0.11
B97	8.52 ± 0.05	8.40 ± 0.53	8.32 ± 0.2	8.16 ± 0.28	10.33 ± 0.07	8.31 ± 0.1	8.2 ± 0.27	8.00 ± 0.13	11.6 ± 0.1	8.02 ± 0.2	7.3 ± 0.19	3.27 ± 0.02
B103	8.91 ± 0.22	8.76 ± 0.29	8.70 ± 0.11	8.45 ± 0.09	9.85 ± 0.1	8.50 ± 0.1	8.42 ± 0.33	8.00 ± 0.04	11.82 ± 0.01	7.86 ± 0.03	7.05 ± 0.1	3.81 ± 0.1
B104	8.53 ± 0.02	8.50 ± 0.1	8.45 ± 0.1	8.41 ± 0.1	9.2 ± 0.04	8.31 ± 0.01	8.28 ± 0.02	8.05 ± 0.24	11.82 ± 0.01	7.04 ± 0.01	6.06 ± 0.3	4.63 ± 0.01
B107	8.54 ± 0.03	8.50 ± 0.1	8.430 ± 0.03	8.16 ± 0.01	9.74 ± 0.02	8.47 ± 0.01	8.15 ± 0.2	8.11 ± 0.5	11.85 ± 0.05	7.012 ± 0.01	7.01 ± 0.4	4.82 ± 0.02
B116	9.05 ± 0.29	9.00 ± 0.1	8.76 ± 0.02	8.07 ± 0.02	10.03 ± 0.01	8.83 ± 0.07	8.61 ± 0.1	8.05 ± 0.2	11.30 ± 0.01	8.7 ± 0.01	7.19 ± 0.1	5.22 ± 0.4
B142	8.9 ± 0.22	8.78 ± 0.2	8.71 ± 0.1	8.67 ± 0.1	10.12 ± 0.01	8.64 ± 0.11	8.50 ± 0.01	8.22 ± 0.03	11.02 ± 0.2	8.14 ± 0.02	7.5 ± 0.02	5.01 ± 0.02
B156	8.94 ± 0.14	8.89 ± 0.1	8.87 ± 0.1	8.72 ± 0.1	10.25 ± 0.1	8.47 ± 0.1	8.19 ± 0.02	8.04 ± 0.1	11.92 ± 0.01	8.01 ± 0.07	7.00 ± 0.01	5.01 ± 0.01
B128	8.68 ± 0.1	8.6 ± 0.12	8.46 ± 0.11	8.21 ± 0.1	9.84 ± 0.1	8.46 ± 0.1	8.33 ± 0.37	8.00 ± 0.01	10.48 ± 0.11	7.30 ± 0.1	7.12 ± 0.11	4.14 ± 0.1
B134	8.72 ± 0.1	8.66 ± 0.1	8.52 ± 0.12	8.36 ± 0.1	10.14 ± 0.1	8.51 ± 0.1	8.23 ± 0.2	8.02 ± 0.1	10.63 ± 0.12	8.02 ± 0.12	7.35 ± 0.1	3.22 ± 0.02
B143	8.73 ± 0.24	8.71 ± 0.1	8.70 ± 0.1	8.59 ± 0.01	10.00 ± 0.1	8.64 ± 0.11	8.33 ± 0.3	8.00 ± 0.1	10.88 ± 0.1	8.024 ± 0.1	7.55 ± 0.1	3.99 ± 0.1
B149	8.68 ± 0.1	8.61 ± 0.1	8.56 ± 0.1	8.21 ± 0.14	9.84 ± 0.1	8.26 ± 0.15	8.33 ± 0.3	8.06 ± 0.02	10.48 ± 0.11	8.00 ± 0.1	7.12 ± 0.11	4.4 ± 0.1
B166	8.92 ± 0.05	8.86 ± 0.1	8.72 ± 0.12	8.66 ± 0.18	10.14 ± 0.11	8.81 ± 0.14	8.23 ± 0.2	8.12 ± 0.13	11.63 ± 0.12	8.02 ± 0.12	7.35 ± 0.1	5.012 ± 0.02
B174	8.85 ± 0.2	8.82 ± 0.02	8.76 ± 0.1	8.65 ± 0.19	10.45 ± 0.1	8.58 ± 0.1	8.42 ± 0.1	8.00 ± 0.1	10.82 ± 0.04	8.5 ± 0.03	7.14 ± 0.1	5.01 ± 0.1

^aControl: cells under no stress.

3.3. Identification of LAB strains

The twenty LAB isolates that grew at gastrointestinal conditions were divided into two groups. Fourteen isolates were identified as *Lactobacillus fermentum* and six isolates were identified *Lactobacillus plantarum*. Analysis of the sequences showed that the two groups *L. fermentum* and *L. plantarum* were identified based on the sequence results after using the Basic Local Alignment Search Tool in the NCBI site. The isolated strains were identified with 100% homology.

3.4. Mucin degradation and hemolysin production

No detection of mucinolysis activity for all cultures on medium with or without glucose. However, fecal flora culture revealed a mucinolytic activity. In contrast to fecal culture, none of the strains was able to produce a clear lysis zone around the colonies of the LAB tested. In addition, none of this LAB strains were haemolytic. They were γ - haemolytic.

3.5. Coexistence assay

The cross-streak method demonstrated that the selected bacteria were compatible in vitro. They haven't shown antagonism against each other.

3.6. Antibiotic resistance

The antibiotic susceptibility of isolated LAB against antibiotics was evaluated based on measure of the inhibition zone diameter in accordance with the French Society of Microbiology (2014). The data obtained are shown in Table 3. The selected lactobacilli strains showed a similar antibiotic resistance. They were resistant to all the used antibiotics.

3.7. Antagonistic activity

Results of inhibition ability of the LAB strains against the indicator organisms are presented in Table 4. All the isolates exhibited

an inhibitory effect against *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *E. coli* (20 strains) and prevented their growth. In contrast, *S. typhimurium* was inhibited by only 18 strains with moderate anti-bacterial activity. The strain *L. fermentum* B116 displayed superior antagonistic activity against *S. aureus* ($d = 11 \pm 0.68$ mm) and the both *L. fermentum* B116 and B19 showed the highest inhibition abilities against *E. coli* ($d = 10 \pm 0.47$ mm and 9 ± 0.39 mm respectively).

3.8. Adhesion ability

Both strains *L. fermentum* B19 and B116 showed remarkable probiotic properties such as resistance to bile salts at the highest concentration (1%) and important antagonistic activities thus they were selected for continuing adhesion characteristics.

The results of the adhesion assay to Caco-2 TC7 for the two selected strains are depicted in Fig. 1(A). Adhesion percentages were $30.09 \pm 5.89\%$ and $29.43 \pm 5.91\%$ for B19 and B116 respectively. The adhesion levels of the both strain were significantly higher than LMD-9 strain ($0.41 \pm 0.2\%$). The adhesion ability to HT29-MTX cellular model was evaluated similarly for the 2 selected LAB and the results are presented in Fig. 1(B). All 2 isolates showed a low percentage of adhesion ability to this cell line. However, the isolate *L. fermentum* B116 showed the higher percentage ($27 \pm 6.68\%$) of adhesion compared to B19 ($14.93 \pm 0.75\%$) and LMD-9 ($0.9 \pm 0.1\%$).

4. Discussion

Besides their technological properties, the demand for probiotic bacteria is currently increasing (Ayeeni et al., 2011; Argyri et al., 2013). The complex microbiota of Tunisian camel raw milk could constitute an interesting source to obtain new probiotic strains for dairy foods.

In the present study, LAB were isolated from different Tunisian camel raw milk samples, characterized in vitro such as acidity, pepsin, pancreatin resistance and bile tolerance and identified by biochemical and molecular methods. Probiotic candidates should be resistant to gastrointestinal conditions, in order to survive into the stomach and execute their health effects as viable active cells

Table 3
Antibiotic susceptibility of LAB strains against antibiotics.

LAB strains	Antibiotics											
	P	AM	CXM	CRO	S	C	AN	TE	E	Co	NA	CIP
	Critical diameter					D-d (mm)						
	22–16	31–25	34–28	38–32	15–13	23–19	17–15	19–17	32–26	15–15	34–28	25–22
<i>Lactobacillus fermentum</i>												
B2	14	4	mh	mh	mh	15	mh	5	15	4	15	mh
B19	11	7	mh	mh	mh	10	mh	mh	11	mh	15	mh
B23	15	9	mh	mh	mh	15	mh	5	14	4	15	mh
B28	15	9	mh	mh	mh	13	mh	8	13	5	14	mh
B79	15	8	mh	mh	mh	13	mh	6	25	5	14	mh
B90	14	7	mh	mh	mh	13	mh	6	23	8	15	mh
B93	14	7	mh	mh	mh	13	mh	5	21	5	13	mh
B97	13	7	mh	mh	mh	14	mh	5	20	8	15	mh
B103	14	7	mh	mh	mh	12	mh	6	12	6	15	mh
B104	12	7	mh	mh	mh	12	mh	8	14	8	15	mh
B107	12	7	mh	mh	mh	12	mh	6	15	9	16	mh
B116	13	mh	mh	mh	mh	14	mh	mh	15	mh	mh	mh
B142	12	6	mh	mh	mh	12	mh	6	20	5	17	mh
B156	14	6	mh	mh	mh	12	mh	5	26	mh	15	mh
<i>Lactobacillus plantarum</i>												
B128	12	8	mh	5	5	13	mh	5	17	mh	15	mh
B134	12	9	mh	mh	5	11	mh	5	20	5	18	mh
B143	13	7	mh	5	5	11	mh	6	23	5	15	mh
B149	12	8	mh	5	mh	12	mh	6	22	5	16	mh
B166	11	8	mh	6	mh	12	mh	5	14	mh	19	mh
B174	12	8	mh	7	mh	12	mh	5	18	mh	19	mh

P: penicillin G, AM: ampicillin, CXM: cefuroxime, CRO: ceftriaxone, S: streptomycin, C: chloramphenicol, AN: amikacin, TE: tetracycline, E: erythromycin, CO: colistin, NA: nalidixic acid, CIP: ciprofloxacin.
mh: missing halo.

when they arrive in the colon (Federici et al., 2014). This study revealed that twenty strains among one hundred seventy seven isolates tested were able to survive in pepsin at pH 2 and in pancreatin with survival rates higher than 90%. In fact, many researchs have shown that *Lactobacillus* strains were resistant to pH varying between 2.5 and 4 (Du Toi et al., 1998; Dunne et al., 2001). The work of Maragkoudakis et al. (2006) showed that the viability of *Lactobacillus* strains of dairy origin was not affected by pH 3. However, in work of Prasad et al. (1999), only four LAB among 200 strains isolated from dairy origin were resistant to pH 3 ($\geq 80\%$).

Concerning the resistance to pepsin, the action of this enzyme on the cell membrane is not lethal to the majority of selected lactic bacteria. Our results were in agreement with Maragkoudakis et al. (2006) who showed that *L. rhamnosus* and *L. paracasei* ssp. *paracasei* present better survival rates in the presence of pepsin at pH 2 for 3 h. Also, the twenty LAB were able to tolerate the high bile concentrations: 0.3 (essential property for being a probiotic), 0.5 and 1% after 3 and 5 h of incubation. The specific strain properties and culture conditions may be factors influencing their resistance to bile salts. Resistance to bile salts is an important criterion for probi-

Table 4
Antimicrobial activity data of twenty identified LAB against four pathogen indicator strains.

LAB strains	Pathogen strains				
	<i>Listeriamonocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonellathyphimurium</i>	<i>Escherchiacoli</i>	Addition
<i>Lactobacillus fermentum</i>					
B2	++	++	+	++	7 +
B19	++	++	+	+++	8 +
B23	++	++	+	++	7 +
B28	++	++	+	++	7 +
B79	++	++	+	++	7 +
B90	++	++	+	++	7 +
B93	++	++	+	++	7 +
B97	++	++	+	++	7 +
B103	++	++	+	++	7 +
B104	++	++	+	++	7 +
B107	++	++	+	++	7 +
B116	++	+++	++	+++	10 +
B142	++	++	+	++	7 +
B156	++	++	+	++	7 +
<i>Lactobacillus plantarum</i>					
B128	++	++		++	7 +
B134	+	++		++	5 +
B143	+	+		++	5 +
B149	+	+		++	5 +
B166	+	+		++	5 +
B174	+	+		++	5 +

+: presence of a clear zone of growth inhibition around spots ≤ 2 mm, ++: presence of a clearly defined inhibition zone between 2 and 8 mm, +++: presence of a clearly defined inhibition zone between 8 and 12 mm and -: no inhibition.

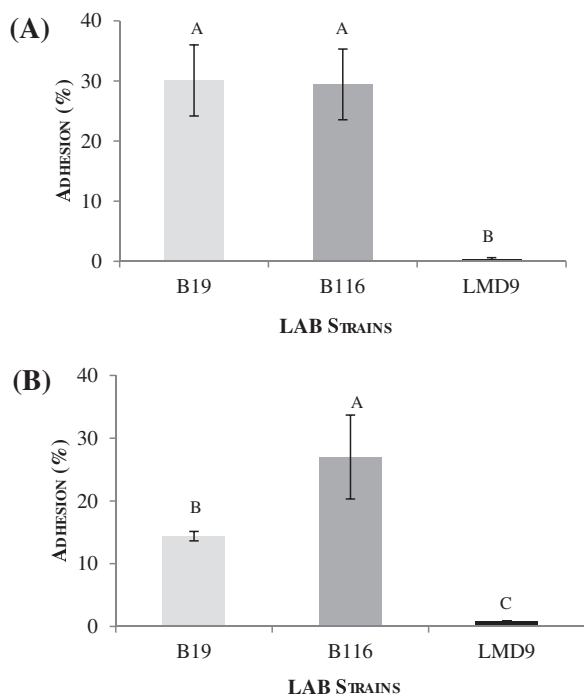


Fig. 1. Percentage of adhesion measured as the percentage of colony-forming units per milliliter adherent bacteria with respect to colony-forming units per milliliter of added bacteria of the both *Lactobacillus fermentum* strains to the intestinal epithelial cell line Caco-2 (A) and HT29-MTX (B) cell lines. Columns that do not share the same letter are statistically different according to the least significant differences (LSD) mean comparison test ($P < 0.05$).

otic selection (Anandharaj and Sivasankari, 2014). Kim et al. (2001) reported that *L. acidophilus* LA1-1 was resistant to a high concentration of bile salts. Similar results were found by other authors who have isolated LAB from different products (Pennacchia et al., 2004; Anandharaj and Sivasankari, 2014 Vinderola et al., 2008; Zago et al., 2011; Ramos et al., 2013; Leite et al., 2015).

The identification of probiotic bacteria via 16S rRNA sequencing is a suitable and accessible technique (FAO/WHO, 2002). Two species were identified in the present study: *L. fermentum* (14 isolates) and *L. plantarum* (6 isolates). Our results are in agreement with Abbas and Mahasneh (2014) showing that *L. fermentum* and *L. plantarum* species were present in camel milk. These two species are recognized among the probiotics strains (Meira et al., 2012; Ramos et al., 2013).

The character GRAS (Generally Recognized As Safe) (FAO/WHO, 2002) was verified in this research. So, no hemolytic and mucinolytic activities were detected for all LAB strains. These observations were in agreement with Meira et al. (2012) and Monteagudo-Mera et al. (2012). The phenomenon of mucin degradation could promote the alteration of the barrier of the intestinal mucosa (Zhou et al., 2001). It is noted that *E. coli* culture exhibited a very extensive mucinolytic activity in medium where mucin was the only energy source (without glucose). An organism able to degrade mucin not only has the potential to attack the host, but can also promotes the penetration of other pathogenic and toxic agents (Ruseler-van Embden et al., 1995).

Antibiotic overuse results in the spread of antibiotic resistance genes across a region and such resistance genes are transferred to other microorganism. Thus, the sensitivity of probiotics to conventional antibiotics is a fundamental health promoting characteristic (Temmerman et al., 2003). Therefore, in this research, different strains were resistant to antibiotics belonging to different classes, which are related to different modes of action. Several authors found that *L. plantarum* strains were resistant to various antibi-

otics (Zago et al., 2011; Kantachote et al., 2010; Yu et al., 2013). We have noted that *L. fermentum* strains were resistant to ten tested antibiotics in accordance with the French Society of Microbiology (2014). Our results were in disagreement with Zeng et al. (2010) who demonstrated that *L. fermentum* is sensitive to some common antibiotics such as penicillin, ampicillin, erythromycin, amikacin and chloramphenicol.

Lactobacilli have required important antimicrobial properties against different pathogenic bacteria (Yilmaz et al., 2006). In addition, they may prevent the colonization of pathogenic microorganisms by protection of intestinal cells. We observed that most of the identified strains exhibited antimicrobial activity against used indicator strains. *L. fermentum* B116 showed immense antibacterial effect against pathogens. Our observation was in agreement with Savadogo et al. (2004) who reported that the antimicrobial activity of *L. fermentum* has produced the maximum zone of inhibition (12 mm) against *Enterococcus faecalis*. Similar results were obtained for *L. plantarum* strains isolated from fermented products (Kantachote et al., 2010; Yu et al., 2013; Belicova et al., 2013). However, Zago et al. (2011) reported that *L. plantarum* which isolated from cheeses were not able to inhibit pathogens. Besides the organic acids, many authors indicated the production of bacteriocins by LAB strains (Atrih et al., 1993; Todorov et al., 2008; Mills et al., 2011). The production of antimicrobial metabolites by probiotic bacteria can be beneficial for preservation of food (Dunne et al., 2001 Bernet-Camard et al., 1997). Beyond their antimicrobial effects, our bacteria were expected to benefit hosts without interference *in vivo*.

The capacity to adhere to the intestinal mucosa is a criterion for probiotic strain selection because they should adhere to the host (FAO/WHO, 2006). Caco-2 and HT29-MTX represent the two major cell types found in the human intestinal epithelium (Mahler et al., 2009). The both strains *L. fermentum* showed high level adhesion to Caco-2 TC7 cell lines. It was noted that some species of dairy origin have a high capacity for adhesion to cellular lines (Kimoto-Nira et al., 2007). Comparing with *Lactobacillus rhamnosus* GG a probiotic bacteria used as a positive control for adhesion (Tuomola and Salminen, 1998), our bacteria were better adhesive than this probiotic reference in data reported by other authors (Leite et al., 2015).

As concerns the adhesion to HT29-MTX, the strain *L. fermentum* B116 showed a significant higher adherence than B19 and LMD9. On the other hand, the different percentages of adhesion obtained between the two *L. fermentum* indicate that the adhesion ability of bacteria of the same species may depend on the strain (Lim and Im, 2008). Lee et al. (2011) reported that *Lactobacillus sakei* isolated from Kimchi has an important ability of adherence was. In another study, Guo et al. (2012) noted that the adhesion levels to HT29-MTX ranged from 66 to 182%. HT29-MTX cell lines have some advantages to study the adhesion of bacteria to the intestinal epithelium. They constitute a mucin secreting cell culture and express similar protein profile as the human intestinal epithelium (Lenaerts et al., 2007). However, the glycoproteins represented in HT29-MTX cell lines are not the only determinants for attachment of bacteria but may be other proteins of the plasma membrane of mature cells enterocyte (Laparra and Sanz 2009).

Many lactobacilli have been reported that they adhere to fibronectin to other proteins or to mucus (Xu et al., 2009). Adhesion of bacteria can interfere with the adhesion of pathogens by exerting a barrier against their colonization or by competitive mechanisms by steric interactions (Xu et al., 2009) or specific blockage on cell receptors (Otero et al., 2004).

5. Conclusion

The data presents in this research reveals that the LAB isolated from camel raw milk could be considered potential probiotic bacteria, due to resistance to gastrointestinal tract simulated conditions, absence of undesirable properties, antibiotic resistance, antimicrobial activity and adhesion capability to human cell-lines Caco-2 and HT29-MTX. Therefore, they could be used as additives cultures for contributing to the quality of functional dairy products. However, other studies are intended to confirm *in vivo* these results as well as to evaluate the strains stability to formulation processes.

Conflicts of interest

The analyses were supported by laboratory “Food Science and Technology” (UR04AGRO2, ESIAT) and Lorraine University (UR AFPA). The authors declare that they have no conflict of interest. The authors are responsible for the content and writing of the manuscript.

References

- Abbas, M.M., Mahasneh, A.M., 2014. Isolation of *Lactobacillus* strains with probiotic potential from camel's milk. *Afr. J. Microbiol. Res.* 8, 1645–1655.
- Anandharaj, M., Sivasankari, B., 2014. Isolation of potential probiotic *Lactobacillus oris* HMI68 from mother's milk with cholesterol-reducing property. *J. Biosci. Bioeng.* 2, 153–159.
- Argyri, A.A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.A.G., Tsakalidou, E., Nychas, G.J.E., Panagou, E.Z., Tassou, C.C., 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiol.* 33, 282–291.
- Atrih, A., Rekhif, N., Michel, M., Lefebvre, G., 1993. Detection of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from different foods. *Microbes* 75, 117–123.
- Ayeni, F.A.B., Sanchez, B.A., Adeniyi, C.G., De Los Reyes-Gavilan, A., Margolles Ruas-Madiedo, P., 2011. Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine. *Inter. J. Food Microbiol.* 147, 97–104.
- Barbour, E.K., Nabbut, N.H., Frerisch, W.M., Al-Nakhli, H.M., 1984. Inhibition of pathogenic bacteria by camel's milk: relation to whey lysozyme and stage of lactation. *J. Food Prot.* 11, 838–884.
- Belicova, A., Mikulasova, M., Dusinky, R., 2013. Probiotic potential and safety properties of *Lactobacillus plantarum* from Slovak Bryndza cheese. *Biomed Res. Inter.* 760298.
- Ben Moussa, O., Mankai, M., Setti, K., Boulares, M., Maher, M., Hassouna, M., 2008. Characterisation and technological properties of psychotropic lactic acid bacteria strains isolated from Tunisian raw milk. *Ann. Microbiol.* 58, 461–469.
- Bernet-Camard, M.F., Lievin, V., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L., Hudault, S., 1997. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a non-bacteriocin antibacterial substance(s) active *in vitro* and *in vivo*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2747–2753.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K., 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food Prot.* 61, 1636–1643.
- Chiang, S.S., Pan, T.M., 2012. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 903–916.
- Coman, M.M., Cecchini, C., Verdenelli, M.C., Silvi, S., Orpianesi, C., Cresci, A., 2012. Functional foods as carriers for SYNBO®, a probiotic bacteria combination. *Inter. J. Food Microbiol.* 157, 346–352.
- Daeschel, M.A., 1992. Procedures to detect antimicrobial activities of microorganisms. In: Ray, B., Daeschel, M. (Eds.), *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. CRC Press Inc., Boca Raton Florida, pp. 57–80.
- De Almeida Júnior, W.L.G., Ferrari, I.S., De Souza, J.V., Da Silva, C.D.A., Da Costa, M.M., Dias, F.S., 2015. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. *Food Contr.* 53, 96–103.
- Du Toi, M., Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.T., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., Ahrens, F., Holzapfel, W.H., 1998. Characterisation and selection of probiotic *Lactobacilli* for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *Inter. J. Food Microbiol.* 40, 93–104.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K., 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Amer. J. Clin. Nutr.* 73, 386–392.
- FAO/WHO (2002). Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food.
- FAO/WHO (2006). Probiotic in foods. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation, 85. FAO Food and Nutrition Paper, Rome, Italy.
- Federici, S., Ciarrocchi, F., Campana, R., Ciandrini, E., Blasi, G., Baffone, W., 2014. Identification and functional traits of lactic acid bacteria isolated from Ciauscolo salami produced in Central Italy. *Meat Sci.* 98, 575–584.
- CA-SFM/EUCAST. (2014). Committee of Antibiogram of French Society of Microbiology. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. European Society of Clinical Microbiology and Infectious diseases. CA-SFM, 2, 7.
- Gilliland, S.E., Kim, H.S., 1984. Effect of viable starter culture bacteria in yogurt on lactose utilization in humans. *J. Dairy Sci.* 67, 1–6.
- Guo, C.F., Zhang, L.W., Han, X., Yi, H.X., Li, J.Y., Tuo, Y.F., Zhang, Y.C., Du, M., Shan, Y.J., Yang, L., 2012. Screening for cholesterol-lowering probiotic based on deoxycholic acid removal pathway and studying its functional mechanisms *in vitro*. *Anaerobe* 18, 516–522.
- Haghshenas, B., Nami, Y., Abdullah, N., Radiah, D., Rosli, R., Khosroushahi, A.Y., 2015. Anticancer impacts of potentially probiotic acetic acid bacteria isolated from traditional dairy microbiota. *LWT Food Sci. Technol.* 60, 690–697.
- Jrad, Z., El hatmi, H., Fguiri, I., Arroum, S., Assadi, M., Khorchani, T., 2013. Antibacterial activity of Lactic acid bacteria isolated from Tunisian camel milk. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7, 1002–1008.
- Kantachote, D., Prachyakij, P., Charernjiratrakul, W., Ongsakul, M., Duangjitcharoen, Y., Chaiyasut, C., Nitoda, T., Kanzaki, H., 2010. Characterization of the antiyeast compound and probiotic properties of a starter *Lactobacillus plantarum* DW3 for possible use in fermented plant beverages. *Electr. J. Biotechnol.* 13, 1–15.
- Kebouchi, M., Galia, W., Genay, M., Soligot, C., Lecomte, X., Awussi, A.A., Perrin, C., Roux, E., Dary-Mourot, A., Le Roux, Y., 2016. Implication of sortase-dependent proteins of *Streptococcus thermophilus* in adhesion to human intestinal epithelial cell lines and bile salt tolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Kim, S.W., Perl, L., Park, J.H., Tandianus, J.E., Dunn, N.W., 2001. Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Current Microbiol.* 43, 346–350.
- Kimoto-Nira, H., Mizumachi, K., Nomura, M., Kobayashi, M., Suzuki, I., Tsuji, N.M., Kurisaki, J.I., Ohmomo, S., 2007. *Lactococcus* spp. as potential probiotic lactic acid bacteria. *Jap. Agricult. Res. Quart.* 41, 181–189.
- Laparra, J.M., Sanz, Y., 2009. Comparison of *in vitro* models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Let. Appl. Microbiol.* 49, 695–701.
- Lee, H., Yoon, H., Ji, Y., Kim, H., Park, H., Lee, J., Shin, J., Shin, H., Holzapfel, W., 2011. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi. *Inter. J. Food Microbiol.* 145, 155–161.
- Leite, A.M.O., Miguel, M.A.L., Peixoto, R.S., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V.M.F., Delgado, S., 2015. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *J. Dairy Sci.* 98, 3622–3632.
- Lenaerts, K., Bouwman Lenaerts, K., Bouwman, F.G., Lamers, W.H., Renes, J., Mariman, E.C., 2007. Comparative proteomic analysis of cell lines and scrapings of the human intestinal epithelium. *BMC Gen.* 8, 1–14.
- Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaux, E., Zweibaum, A., 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 (19), 6334–6343.
- Lievin-Le Moal, V., Amsellem, R., Servin, A.L., Coconnier, M.H., 2002. *Lactobacillus acidophilus* (strain LB) from resident human adult gastrointestinal microflora exerts activity against brush border damage promoted by a diarrhoeagenic *Escherichia coli* in human enterocyte-like cells. *Gut* 50, 803–811.
- Lim, S.M., Im, D.S., 2008. Screening and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from Korean fermented foods. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 178–186.
- Mahler, G.J., Shuler, M.L., Glahn, R.P., 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.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E., 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Inter. Dairy J.* 16, 189–199.
- Meira, S.M.M., Helfer, V.E., Velho, R.V., Lopes, F.C., Brandelli, A., 2012. Probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from Brazilian regional ovine cheese. *J. Dairy Res.* 79, 119–127.
- Mills, S., Serrano, M., Griffin, C., O'Connor, P.M., Schaad, G., Bruining, C., Hill, C., Ross, R.P., Meijer, W.C., 2011. Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* LMG P-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese. *Micro. Cell Fact.* 10, S7.
- Miremadi, F., Ayyash, M., Sherkat, F., Stojanovska, L., 2014. Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of cellular membranes of probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *J. Funct. Foods* 9, 295–305.
- Monteagudo-Mera, A., Rodriguez-Aparicio, L., Rua, J., Martinez-Blanco, H., Navasa Nicolas Garcia-Armestob, M.R., Ferrero, M.A., 2012. *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *J. Funct. Foods* 4, 531–541.
- Otero, M.C., Ocana, V.S., Macias, E.N.M., 2004. Bacterial surface characteristics applied to selection of probiotic microorganisms. *Meth. Molec. Biol.* 268, 435–440.
- Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiatta, G., Pepe, O., Mauriello, G., Villani, F., 2004. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Sci.* 7, 309–317.
- Pisano, M.B., Silvia, V., Conti, S., Fadda, M.E., Deplano, M., Melis, M.P., Deiana, M., Cosentino, S., 2014. Preliminary Evaluation of Probiotic Properties of *Lactobacillus* strains isolated from Sardinian dairy products. *Biomed Res. Inter.* 9.

- Prasad, J., Gill, H., Smart, J., Gopal, P.K., 1999. Selection and characterisation of *Lactobacillus* and bifidobacterium strains for use as probiotics. *Inter. Dairy J.* 8, 993–1002.
- Ramos, C.L., Thorsen, L., Schwan, R.F., Jespersen, L., 2013. Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiol.* 36, 22–29.
- Ruseler-van Embden, J.G.H., Lieschut-van, L.M.C., Gosselink, M.J., Marteau, P., 1995. Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *L. acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins. *Scandin. J. Gastroenterol.* 30, 675–680.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., Mattila-Sandholm, T., 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 83, 197–215.
- Savado, A., Ouattara, C.A.T., Savado, P.W., Ouattara, A.S., Barro, N., Traore, A.S., 2004. Microorganisms involved in Fulani traditional fermented milk in Burkina Faso. *Pak. J. Nutr.* 3, 134–139.
- Shabo, Y., Barzel, R., Margoulis, M., Yagil, R., 2005. Camel milk for food allergies in children. *Isr. Med. Assoc. J.* 7, 796–798.
- Tannock, G.W., 2004. A special fondness for *Lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3189–3194.
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J., 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Inter. J. Food Microbiol.* 81, 1–10.
- Todorov, S.D., Botes, M., Guigas, C., Schillinger, U., Wiid, I., Wachsman, M.B., Holzappel, W.H., Dicks, L.M., 2008. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 104, 465–477.
- Tuomola, E.M., Salminen, S.J., 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Inter. J. Food Microbiol.* 41, 45–51.
- Turpin, W., Humblot, C., Noordine, M.L., Thomas, M., Guyot, J.P., 2012. Lactobacillaceae and cell adhesion: genomic and functional screening. *PLoS One* 7, 38034.
- Villani, F., Sannino, L., Moschetti, G., Mauriello, G., Pepe, O., Amodio-Cocchieri, R., Coppla, S., 1997. Partial characterization of an antagonistic substance produced by *Staphylococcus xylosus* 1E and determination of the effectiveness of the producer strain to inhibit *Listeria monocytogenes* in Italian sausage. *J. Food Microbiol.* 16, 63–73.
- Vinderola, G., Capellini, B., Villarreal, F., Suarez, V., Quiberoni, A., Reinheimer, J., 2008. Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *Lebensm. Wiss. Technol.* 41, 678–688.
- Xanthopoulos, V., Ipsilantis, C.G., Tzanetakisa, N., 2012. Use of a selected multi-strain potential probiotic culture for the manufacture of set-type yogurt from caprine milk. *Small Rum. Res.* 106, 145–153.
- Xu, J., Bae, E., Zhang, Q., Annis, D.S., Erickson, H.P., Mosher, D.F., 2009. Display of cell surface sites for fibronectin assembly is modulated by cell adherence to (1) F3 and C-terminal modules of fibronectin. *PLoS One* 4, 4113.
- Yateem, M.T., Balba, T., Al-Surrayai, B., Al-Mutairi Al-Daher, R., 2008. Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *Inter. J. Dairy Sci.* 3, 194–199.
- Yilmaz, M., Soran, H., Beyatli, Y., 2006. Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. *Microbiolog. Res.* 161, 127–131.
- Yu, Z., Zhang, X., Li, S., Li, C., Li, D., Yang, Z., 2013. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese sauerkraut. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 489–498.
- Zago, M., Fornasari, M.E., Carminati, D., Burns, P., Suarez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J., Giraffa, G., 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol.* 28, 1033–1040.
- Zeng, X.Q., Pan, D.D., Zhou, P.D., 2010. Functional characteristics of *Lactobacillus fermentum* F1. *Cur. Microbiol.* 62, 27–31.
- Zhou, J.S., Gopal, P.K., Hill, H.S., 2001. Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin in vitro. *Inter. J. Food Microbiol.* 63, 81–90.

Factors involved in adherence of the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* to human intestinal cells

Mounira Kebouchi, Wessam Galia, Magali Genay, Xavier Lecomte, Ahoefa Ablavi Awussi, Claire Soligot, Clarisse Perrin, Emeline Roux, Annie Dary-Mouroet and Yves Le Roux.

Université de Lorraine, UR AFPA (Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux), Equipe PB2P (Protéolyse & Biofonctionnalités des Protéines et des Peptides), Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France
INRA, UR AFPA Unité Sous Contrat 340, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54506, France

Background

Adhesion of probiotic bacteria such as certain lactic acid bacteria (LAB) is an important characteristic as it :

- Promotes gut persistence time and colonization
- Provides protection to the intestinal barrier

This is a complex process involving many different factors.

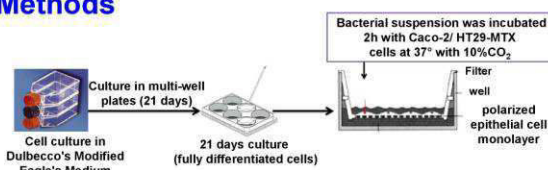
Among LAB, *Streptococcus thermophilus*, is of major importance for the food industry since it is massively used for the manufacture of dairy products.



Objectives

S. thermophilus strain LMD-9 was evaluated for its capacity to adhere to cultured human enterocyte *Caco-2* cells and mucus secreting cells HT29-MTX. Several factors involved in adherence of *S. thermophilus* were identified.

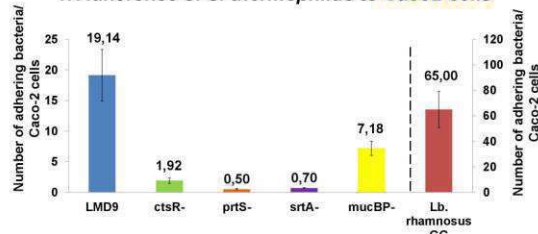
Methods



We used *Lactobacillus rhamnosus* GG as positive control for adhesion to intestinal cells. To characterize proteins that may promote attachment of *S. thermophilus* to human intestinal cells, genes encoding the mucin-binding protein (MucBP), the cell envelope proteinase (PrtS), the sortase A (SrtA) and class three stress gene repressor (CtsR), were inactivated individually.

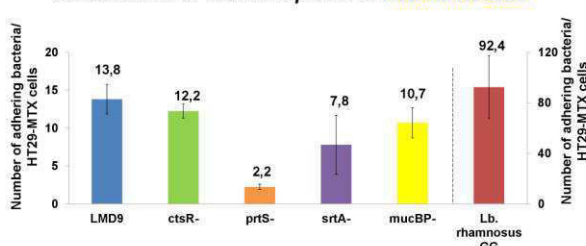
Results

1. Adherence of *S. thermophilus* to *Caco2*-cells



Each mutant showed reduction in adhesion ability to *Caco-2* cells. In this study, proteins MucBP, PrtS, SrtA, CtsR, each contributed, individually, to the ability of LMD-9 to adhere to *Caco-2* cells *in vitro*.

2. Adherence of *S. thermophilus* to HT29-MTX cells



S. thermophilus WT strain LMD-9 adheres to mucus-secreting cells HT29-MTX. The adhesion ability of mutants was only reduced with the *prtS*- mutant. This result suggests that PrtS may play a key role in adhesion to mucus-secreting cells *in vitro*.

Conclusion

The resulting adhesion profiles for *S. thermophilus* WT strain LMD-9 were quite similar for the two cell lines used. In addition, our data suggest that one or more proteins could be involved in the adhesion to *Caco-2* and HT29-MTX cells in *S. thermophilus* strain LMD-9. These proteins could adhere either directly to the epithelium (formed by *Caco-2* cells *in vitro* but do not produce mucins), mucus (produced by HT29-MTX cells *in vitro*) or to specific component of the epithelial environment.

Further directions

HT29-MTX cells exhibit differentiated goblet cell-like phenotype secreting high amounts of MUC5AC mucins predominantly expressed in the stomach. Therefore, the adhesion ability of *S. thermophilus* strain LMD-9 will be determined using an other type of mucus secreting cells producing high amounts of MUC2 mucins which expressed in the small and large intestine (HT29 Cl.16).

References

- Rul, F. et al., 2011. Impact of the Metabolic Activity of *Streptococcus thermophilus* on the Colon Epithelium of Gnotobiotic Rats. J Biol Chem 286: 10288–10296.
- McGuckin, M.A. et al., 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. Nat. Rev. Microbiol. 9, 265–278.

Contact : yves.leroux@univ-lorraine.fr

RÉSUMÉ-ABSTRACT

Résumé

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt économique de par leur large utilisation dans l'industrie agro-alimentaire. Parmi elles, *Streptococcus thermophilus* (ST) est d'une importance majeure puisqu'elle est la plus utilisée après *Lactococcus lactis*, pour la fabrication de produits laitiers fermentés et de fromages. De plus, cette bactérie est le seul streptocoque à bénéficier du statut GRAS (Generally Recognized As Safe). Outre son intérêt en industrie laitière, ST présente des effets bénéfiques sur la santé intestinale de l'Homme. Bien que ces effets soient largement documentés, le statut probiotique de ST reste encore à conforter. C'est pourquoi des études sont actuellement menées afin de sélectionner des souches de ST à fort potentiel probiotique. Parmi les critères importants figurent leur capacité à survivre aux conditions drastiques du tube digestif (TD) et leur capacité à adhérer aux cellules intestinales. Dans cette optique, les objectifs de cette thèse étaient d'étudier, dans un premier temps, la capacité d'adhésion *in vitro* de la souche ST LMD-9 à différentes lignées cellulaires intestinales d'origine humaine et d'évaluer la survie de cette souche au stress biliaire. Afin de mettre en évidence un rôle potentiel de certaines protéines de surface dans ces deux processus, trois mutants issus de cette souche et inactivés dans les gènes *prtS* (protéase pariétale), *srtA* (sortase A) et *mucBP* (protéine de liaison aux mucines), ont été inclus dans cette étude. Dans un second temps, l'impact de l'adhésion de LMD-9 a été analysé, d'une part sur l'expression de gènes codant certaines mucines dans les cellules eucaryotes, et d'autre part sur l'expression de gènes qui seraient spécifiquement induits durant le processus d'adhésion, ceci en utilisant la technologie R-IVET (Recombinase-based *In Vivo* Expression Technology). Les résultats obtenus ont permis de montrer que la souche LMD-9 était capable de survivre jusqu'à une concentration de 3 mM en sels biliaires et que les protéines de surface PrtS, SrtA et MucBP seraient impliquées dans la résistance à ce stress. Nos résultats ont également montré que LMD-9 adhérerait aux trois différentes lignées cellulaires, suggérant ainsi que la souche pourrait interagir avec les différentes mucines qu'elle peut rencontrer dans le TD. De plus, l'implication de certaines protéines de surface dans l'adhésion de LMD-9 s'est avérée dépendante des caractéristiques de ces lignées, qu'il s'agisse de cellules entérocytaires (Caco-2) ou productrices de mucus (HT29-MTX et HT29-CL.16E). Concernant l'impact de l'adhésion de la souche LMD-9 sur l'expression des gènes *MUC2* et *MUC5AC*, aucun effet sur le taux de transcrits n'a été observé dans nos conditions expérimentales. Par ailleurs, nos résultats ont permis, pour la première fois, d'identifier les gènes spécifiquement induits dans la souche LMD-9 durant l'adhésion aux cellules épithéliales. Nous avons ainsi montré que l'adhésion de la souche LMD-9 ne dépend pas uniquement des protéines de surface, mais d'autres fonctions et voies métaboliques seraient également impliquées. Ce travail de thèse contribue ainsi à apporter de nouvelles connaissances liées (i) au choix du modèle cellulaire dans les études d'adhésion bactérienne *in vitro*, (ii) à l'aptitude de la souche LMD-9 à survivre au stress biliaire en faisant intervenir certaines protéines de surface et (iii) à la compréhension des mécanismes moléculaires de l'adhésion de LMD-9 aux cellules épithéliales intestinales.

Abstract

Lactic acid bacteria are of great economic interest because of their use in the food industry. Among them, *Streptococcus thermophilus* (ST) is of major interest since it is the most used after *Lactococcus lactis*, for the manufacture of fermented dairy products and cheese. In addition, this bacterium is the only streptococcus to benefit from GRAS status (Generally Recognized As Safe). Beside its interest in the dairy industry, ST has beneficial effects on human intestinal health. Although these effects are widely documented, the probiotic status of ST remains to be consolidated. Therefore, studies are currently being conducted in order to select strains of ST with a high probiotic potential. Among criteria that are important to select ST strains include their ability to survive stress the drastic conditions of the digestive tract (DT) and their ability to adhere to intestinal cells. In this context, the aim of this thesis was to investigate firstly the *in vitro* adhesion capacity of the ST LMD-9 strain to different human intestinal cell lines and to evaluate the survival of this strain to bile salt stress. In order to highlight the potential role of some surface proteins in these two processes, three mutants derived from this strain and inactivated in the genes *prtS* (parietal protease), *srtA* (sortase A) and *mucBP* (Mucin Binding-protein) were also included in this study. Secondly, the impact of LMD-9 adhesion was analyzed, on one hand on the expression of some mucin-encoding genes in eukaryotic cells, and on the other hand on the expression of genes that would be specifically induced during adhesion process, and this using the R-IVET (Recombinase-based *In Vivo* Expression Technology) approach. The results obtained demonstrated the ability of LMD-9 to survive up to the concentration of 3 mM of bile salts and that the PrtS, SrtA and MucBP surface proteins would be involved in the resistance to this stress. Our results also showed that the LMD-9 strain was capable of adhering to three cell lines used suggesting that this strain could interact with different mucins that may encounter in the DT. Moreover, the involvement of some surface proteins in the adhesion of LMD-9 has been found to be dependent on the surface characteristics of these cell lines, whether they are enterocytic (Caco-2) or mucus-secreting cells (HT29-MTX and HT29-CL.16E). Regarding the impact of LMD-9 adhesion on *MUC2* and *MUC5AC* gene expression, no effect has been observed on the transcript level under our experimental conditions. Furthermore, for the first time, our results allowed us to identify genes specifically induced in the LMD-9 strain during adhesion process to epithelial cells. We have thus shown that the LMD-9 adhesion does not depend solely on surface proteins, but other functions and metabolic pathways are also involved. This thesis work contributes thus to new knowledge related to (i) the choice of the cellular model in *in vitro* bacterial adhesion studies, (ii) the ability of LMD-9 to survive bile salt stress by involving some surface proteins and (iii) understanding the molecular mechanisms of LMD-9 adhesion to epithelial cells.