

**UNIVERSITE DE LIMOGES**

Ecole doctorale Biologie - Santé

Faculté des Sciences et Techniques

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

Thèse N° [7/2010]

**THÈSE**

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES****Discipline : Biologie-Santé**

Présentée et soutenue publiquement par

**Naima SAAD***Le 03 Février 2010*

*Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées  
dans la relation de la bactérie probiotique *Lactobacillus  
plantarum 299v* avec l'hôte : approche in vitro*

*Thèse dirigée par : M. Philippe Bressollier, Professeur**M. Jean Marie Schmitter, Professeur***Jury :**

<u>Rapporteurs</u>	<b>M. J.M Chobert</b>	Directeur de recherche, INRA Nantes
	<b>M. D. Drider</b>	Maître de conférences, HDR, ONIRIS de Nantes
Examineurs	<b>M. P. Bressollier</b>	Professeur, Université de Limoges
	<b>M. P. Krausz</b>	Professeur, Université de Limoges
	<b>M. J.M. Schmitter</b>	Professeur, Université de Bordeaux I
	<b>M<sup>me</sup>. M. Urdaci</b>	Professeur, ENITA de Bordeaux
Invité	<b>M. J.P. Picot</b>	PDG Société ID-BIO, Limoges



# UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole doctorale Biologie - Santé

Faculté des Sciences et Techniques

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

Thèse N° [7/2010]

## THÈSE

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES**

**Discipline : Biologie-Santé**

Présentée et soutenue publiquement par

**Naima SAAD**

*Le 03 Février 2010*

*Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées  
dans la relation de la bactérie probiotique Lactobacillus  
plantarum 299v avec l'hôte : approche in vitro*

*Thèse dirigée par : M. Philippe Bressollier, Professeur*

*M. Jean Marie Schmitter, Professeur*

**Jury :**

<u>Rapporteurs</u>	<b>M. J.M Chobert</b>	Directeur de recherche, INRA Nantes
	<b>M. D. Drider</b>	Maître de conférences, HDR, ONIRIS de Nantes
Examineurs	<b>M. P. Bressollier</b>	Professeur, Université de Limoges
	<b>M. P. Krausz</b>	Professeur, Université de Limoges
	<b>M. J.M. Schmitter</b>	Professeur, Université de Bordeaux I
	<b>M<sup>me</sup>. M. Urdaci</b>	Professeur, ENITA de Bordeaux
Invité	<b>M. J.P. Picot</b>	PDG Société ID-BIO, Limoges



## **Remerciements**

*J'adresse mes profonds remerciements :*

*Au **Conseil Régional du Limousin** et à la société **ID-BIO**, qui ont financé ce travail.*

*Au **Professeur Pierre Krausz**, directeur du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.*

*J'exprime toute ma profonde gratitude au **Pr. Philippe Bressollier**, sans lequel ce travail n'aurait pu aboutir. Je tiens à le remercier vivement pour sa confiance durant les trois années de thèse, pour son soutien lors des moments difficiles pour faire évoluer ce projet. Je le remercie encore pour son encadrement, sa disponibilité et les nombreuses discussions scientifiques que nous avons eues. Je le remercie également pour sa patience lors de la rédaction de thèse, je l'ai mis à rude épreuve, surtout lors de la phase finale.*

*Je souhaite témoigner mes remerciements tout aussi sincères au **Pr. Jean Marie Schmitter** du laboratoire de Génomique Fonctionnelle-CBMN-Bordeaux 2, co-directeur de cette thèse. Je tiens à le remercier pour m'avoir accueillie dans son laboratoire lors de mes séjours bordelais, pour sa disponibilité, et l'attention qu'il m'a accordée lors de mon initiation au monde de la « spectrométrie de masse ».*

*J'adresse également toute ma reconnaissance à **Madame le Pr. Maria Urdaci**, directrice du Laboratoire de Microbiologie et de Biochimie Appliquée-CBMN, 'ENITA de Bordeaux, pour sa rigueur et sa disponibilité. Je vous remercie vivement pour vos précieux conseils et les discussions scientifiques enrichissantes que nous avons eues ensemble. Enfin, je vous suis reconnaissante d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je remercie **Monsieur Jean Pierre Picot**, PDG de la société ID-BIO pour avoir cofinancé cette thèse et pour l'intérêt qu'il a porté à ce sujet.*

*J'adresse également tous mes remerciements à **Monsieur Jean Marc Chobert**, Directeur de l'équipe Fonctions et Interactions des Protéines Laitières de l'INRA-BIA de Nantes et à **Monsieur Djamel Drider**, MCF-HDR à l'Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique (ONIRIS), Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle, qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail. Les remarques constructives qu'ils ont formulées ont contribué à l'amélioration de mon manuscrit.*

*Je remercie tout mes collègues du Département Génie Biologique de l'IUT du Limousin, **Raymonde Faure** et la "Petite" **Karine Grenier** pour toute l'aide qu'elles m'ont apportée, pour leur patience devant ma farouche détermination « à épuiser tous les stocks du département ». Je tiens à remercier l'ensemble des membres de Génie-Bio, BIOLO, la "Grande" **Carinne Belzanne**, **Catherine Decourt**, **Dominique Soulé**, **François Letourneau**,*



*Ethienne Bertrand, Christophe Genin, Sophie Raherison, Jocelyne Verdier, Anne-Sophie Lia-Beldini, Patrick Courgnaud, Serge Chambon, et François Louvet pour la bonne ambiance et les moments forts agréables passés au près de vous. Mes remerciements vont aussi à Gaëlle Bégaud-grimaud et à Tan-Sothea Ouk pour leur aide si généreuse lors de la rédaction, la préparation de l'oral de thèse et pour les longues discussions scientifiques. Je remercie également le Pr. Bernard Verneuil pour ses discussions scientifiques toutes aussi formatrices notamment en spectrométrie de masse.*

*Je voudrais aussi remercier tous les membres et doctorants (présents ou anciens) du LCSN: Cyril Ringot, Karine Teste, Nicolas Drogat, Romain Lucas, Marc Bakleh, Carmen Klein, Jean Pierre, Aline Barbat, Julien Vergnaud, Benjamin, Cédric Astier, Loïc Jauberty, Raphaël Decou, Chris Moussavou, et tous ceux que j'ai pu oublier pour tous les bons moments passés avec eux et pour leur contribution à la bonne ambiance qui règne dans ce labo. Je remercie aussi les différents stagiaires qui ont de près ou de loin contribué à ce travail, notamment, Cédric Chevallier, Paul Mallemanche et Marc Simon.*

*Mes remerciements vont également à tous mes collègues bordelais, Muriel Denayrolles, Anne Marie, Borja Sanchez, Sylvia, Françoise et Roland Coubet, Stéphane Chaignepain, Katell Bathany, et Corinne Buré pour leur accueil, leur gentillesse, leur disponibilité, leurs conseils techniques et les bons moments de complicité passés parmi eux.*

*Je tiens à remercier Chantal Vignoles et Catherine Claude-Martin Ouk pour leur aide si précieuse pour la partie Cytométrie en Flux de ce travail.*

*Je remercie Karine Vuillier et Emilie Pinault pour leur contribution aux analyses protéomiques.*

*Je tiens à remercier très chaleureusement mes amies, Imen ben Abdelmalek, Mounia Mikram, Habiba Bejbouji, pour les bons moments d'humour et de gaieté passés à Bordeaux entre ces trois communautés: Algéro-Tunisiano-Marocaine. Mes remerciements vont également à mes amies, Katia Arib, Pascal Gning, Redouan elBoutechfaiti, et Ghania Chernai.*

*Je ne pourrais oublier mon ami intime Cédric Delattre, que je remercie tout particulièrement pour la rigueur scientifique qu'il a su me transmettre, son humour burlesque, sa générosité, et pour m'avoir initié à la course pieds.*

*Enfin je remercie mes proches. Mes chers parents et ma très grande fratrie sans lesquels tout cela n'aurait été possible. Merci de m'avoir permis d'aller aussi loin dans mes études et de m'avoir soutenue et supportée tout au long de ces années. Je n'oublie pas, mes neveux et nièces dont je suis très fière, mes oncles et tantes, merci pour votre affection.*

*Mes très chers parents, je vous dédie ce travail.*



## **Résumé :**

Les microorganismes probiotiques mis en œuvre dans les aliments fonctionnalisés, sont capables de produire des effets bénéfiques sur la santé du consommateur. Ces effets dépendent entre autres de la capacité d'adhésion des probiotiques aux constituants de l'épithélium intestinal. L'adhésion, est un phénomène complexe dépendant des propriétés physico-chimiques de la surface bactérienne ainsi que de la présence d'entités protéiques et/ou non protéiques possédant une affinité pour les constituants de la muqueuse intestinale de l'hôte. Au travers de l'étude de l'hydrophobie/hydrophilie et de la charge électrique de la surface de la souche probiotique *Lactobacillus plantarum* 299v ainsi que de celles d'autres souches adhérentes de *L. plantarum*, une absence de corrélation entre de telles propriétés et la capacité d'adhésion des souches sur les cibles mucine et cellules épithéliales intestinales Caco-2 a été établie. La caractérisation systématique des protéines associées à la paroi de *L. plantarum* 299v suivie de l'estimation de leur affinité pour des cibles de la surface intestinale, ont conduit à l'identification de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) en tant qu'adhésine potentielle. L'analyse, par cytométrie en flux, des cellules de *L. plantarum* 299 v marquées par des anticorps anti-GAPDH et par l'iodure de propidium a permis d'établir un lien entre la perte d'intégrité de la membrane plasmique et la présence de cette « anchorless protein » associée à la paroi bactérienne. Cette observation conduit à la proposition d'un mécanisme original concernant l'exportation de l'enzyme cytoplasmique à la surface de la bactérie. D'autres polymères non protéiques de type acides lipoteichoïques associés à la paroi, ont été caractérisés et leur implication dans l'interaction de *L. plantarum* 299v avec la mucine et les cellules épithéliales intestinales Caco-2 a été démontrée.

**Mots clés :** *L. plantarum* 299v, propriétés physico-chimiques de surface, protéines de la paroi, GAPDH, acides lipoteichoïques.

## **Abstract**

The probiotic microorganisms implemented in functionalized foods can produce beneficial effects on consumer health. These effects depend on the adhesion ability of probiotics to the constituents of the intestinal tract. The phenomenon of bacterial adhesion is a complex process which is mediated by the physico-chemical properties of the bacterial surface and by a set of proteinaceous and non-proteinaceous molecular entities with specific binding abilities to constituents of the host intestinal mucosa. Through the study of the hydrophobic/hydrophilic character and electric charge of the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* 299v and those of other adherent strains of *L. plantarum*, no correlation between such properties and their adhesion ability to mucin and Caco-2 epithelial cells was established. The systematic characterization of the cell wall associated proteins of *L. plantarum* 299v followed by the estimation of their affinities for targets of the intestinal surface, led to the identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a potential adhesin. Flow cytometry analysis of *L. plantarum* 299v cells labelled with anti-GAPDH and propidium iodide unambiguously confirmed a relationship between the loss of the plasma membrane integrity and location on cell wall of GAPDH and probably of other "anchorless protein". This observation led to us the proposal of an original mechanism on the export of this cytoplasmic enzyme to the bacterial cell wall surface. Other non-proteinaceous polymers like lipoteichoic acids have been characterized and their involvement in the interaction of *L. plantarum* 299v to mucin and Caco-2 monolayer cells was demonstrated.

**Keywords:** *L. plantarum* 299v, surface physico-chemical properties, cell wall proteins, GAPDH, lipoteichoic acids.



# ***TABLE DES MATIERES***



SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

ABRÉVIATIONS

INTRODUCTION..... 1

**CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

<b>1 Les bactéries lactiques .....</b>	<b>5</b>
1.1 Description, classification et caractéristiques physiologiques .....	6
1.1.1 Le genre <i>Lactobacillus</i> .....	6
1.1.2 Les bactéries lactiques dans la microflore intestinale .....	10
1.2 Probiotiques et bactéries lactiques .....	13
1.2.1 Définitions.....	13
1.2.2 Critères de sélection d'une bactérie d'intérêt probiotique .....	14
1.2.3 Les principales bactéries lactiques utilisées comme probiotiques.....	16
1.2.4 Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé de l'hôte.....	21
1.2.4.1 <i>Les effets immuno-modulateurs</i> .....	21
1.2.4.2 <i>Effets vis-à-vis de différentes pathologies du tractus intestinal</i> .....	25
1.2.4.2.1 Effets sur les maladies intestinales inflammatoires .....	25
1.2.4.2.2 Effets sur le syndrome de l'intestin (côlon) irrité (SII).....	27
1.2.4.2.3 Effets sur les diarrhées infectieuses .....	28
<b>2 Les mécanismes d'adhésion des probiotiques.....</b>	<b>29</b>
2.1 Généralités .....	29
2.2 Les facteurs de l'adhésion .....	31
2.2.1 Propriétés physico-chimiques de surface et interaction probiotique/hôte .....	31
2.2.1.1 <i>Interactions de lifshitz-van der Waals (LW)</i> .....	31
2.2.1.2 <i>Les interactions électrostatiques (EL)</i> .....	32
2.2.1.3 <i>Les interactions acide-base de Lewis (AB)</i> .....	33
2.2.1.4 <i>L'hydrophobie de surface : mesure et rôle dans l'adhésion</i> .....	34
2.2.1.5 <i>Charge nette de surface : mesure et rôle dans l'adhésion</i> .....	36
2.2.2 Entités moléculaires de surface et interactions probiotiques/hôte.....	37
2.2.2.1 <i>Rappels sur la structure de la paroi des lactobacilles</i> .....	39
2.2.2.2 <i>Les constituants protéiques de la paroi</i> .....	40
2.2.2.2.1 Protéines fortement associées à la paroi bactérienne.....	40
2.2.2.2.2 Protéines de la couche S.....	42
2.2.2.2.3 Les protéines sécrétées.....	43
2.2.2.2.4 Les "anchorless proteins" .....	43
2.2.2.2.5 Cas particulier des protéines associées à la paroi de <i>L. plantarum</i> . 46	
2.2.2.3 <i>Les protéines de paroi impliquées dans l'adhésion des lactobacilles aux constituants de la muqueuse intestinale</i> .....	46
2.2.2.3.1 Adhésion des lactobacilles aux cellules épithéliales .....	47
2.2.2.3.2 Adhésion des lactobacilles à la mucine.....	51
2.2.2.3.3 Adhésion des lactobacilles aux constituants de la matrice extracellulaire .....	52
2.2.2.3.4 Cas particulier des protéines impliquées dans l'adhésion de <i>L. plantarum</i> .....	55
2.2.2.4 <i>Constituants non-protéiques de la paroi, impliqués dans l'interaction bactérie/hôte</i> .....	59

2.2.2.4.1	Les facteurs polysaccharidiques .....	59
2.2.2.4.2	Les acides teichoïques et lipoteichoïques .....	60
2.2.2.4.2.1	Composition structurale .....	60
2.2.2.4.2.2	Méthodes d'extraction des LTA .....	62
2.2.2.4.3	Implication des TA et LTA dans l'interaction bactérie/hôte .....	63
3	Méthodes d'investigation des constituants protéiques impliqués dans l'adhésion des probiotiques .....	65
3.1	Les différents tests d'adhésion .....	65
3.2	Analyse des constituants protéiques .....	68
3.2.1	Analyse des protéines de surface par électrophorèse sur gel .....	68
3.2.2	Technique de chromatographie bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse .....	70

**CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES**

1	Souches bactériennes .....	72
2	Milieu de culture MRS .....	72
3	Conditions de culture .....	72
4	Etude des propriétés physico-chimiques de surface de <i>L. plantarum</i> .....	72
4.1	Etude de l'hydrophobie/hydrophilie et du caractère acide-base de Lewis .....	72
4.2	Etude de la charge électrique de surface .....	75
4.3	Tests d'adhésion de <i>L. plantarum</i> .....	75
4.3.1	Adhésion sur mucine gastrique .....	75
4.3.1.1	Préparation des puits: .....	75
4.3.1.2	Préparation des cultures de <i>L. plantarum</i> .....	76
4.3.2	Adhésion sur cellules épithéliales Caco-2 .....	76
4.3.2.1	Conditions de culture et préparation des cellules pour le test d'adhésion .....	76
4.3.2.2	Préparation de la culture de <i>L. plantarum</i> pour le test d'adhésion sur les cellules Caco-2 .....	77
5	Extraction des entités protéiques de surface de <i>L. plantarum</i> 299v .....	77
5.1	Extraction de la fraction protéique faiblement adsorbée à la paroi .....	77
5.2	Marquage spécifique puis extraction d'une fraction protéique fortement associée à la paroi de <i>L. plantarum</i> 299v .....	79
5.3	Caractérisation biochimique des différentes fractions protéiques .....	79
5.3.1	Dosage des protéines par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) .....	79
5.3.2	Analyse des protéines par électrophorèse monodimensionnelle .....	80
•	<i>Gel de séparation</i> : .....	80
•	<i>Gel de concentration</i> : .....	80
5.3.3	Analyse des fractions protéiques par électrophorèse bidimensionnelle .....	80
5.3.4	Coloration des gels au bleu colloïdal (G-250) .....	81
5.3.5	Coloration des protéines au nitrate d'argent .....	82
5.3.6	Analyse des spots protéiques par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF .....	82
5.3.6.1	Etape de lavage des échantillons .....	82
5.3.6.2	Réduction et alkylation des protéines .....	83
5.3.6.3	Extraction des peptides .....	83
5.3.6.4	Analyse par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF .....	83
5.4	Evaluation <i>in vitro</i> de l'affinité, des protéines extraites de la paroi de <i>L. plantarum</i> 299v, pour différentes cibles du tractus intestinal .....	84
5.4.1	Test d'affinité sur microplaque .....	84

5.4.2	Chromatographie d'affinité sur mucine et collagène de type I.....	84
5.4.2.1	<i>Procédure de greffage du collagène type I et de la mucine</i> .....	84
5.4.2.2	<i>Conditions chromatographiques</i> .....	85
5.5	La GAPDH associée à la paroi de <i>L. plantarum</i> 299v : contribution à l'étude de son exportation et de son rôle à la surface de la bactérie .....	86
5.5.1	Extraction des formes pariétale et intracellulaire de GAPDH.....	86
5.5.2	Purification des deux formes de GAPDH.....	87
5.5.3	Test d'activité GAPDH .....	87
5.5.3.1	<i>Mesure de l'activité GAPDH cytosolique</i> .....	88
5.5.3.2	<i>Mesure de l'activité GAPDH liée à la paroi</i> .....	88
5.5.4	Comparaison des structures primaires des formes de GAPDH cytosolique et associée à la paroi .....	88
5.5.5	Estimation de la masse moléculaire des formes natives de GAPDH pariétale et intracellulaire.....	89
5.5.6	Production d'anticorps polyclonaux spécifiques de la forme de GAPDH associée à la paroi de <i>L. plantarum</i> 299v .....	89
5.5.7	Effet du pH sur l'association de la GAPDH à la paroi .....	89
5.5.8	Etude de "l'exportation" de la GAPDH à la surface de la bactérie .....	90
5.5.8.1	<i>Contrôles de paramètres culturels et de l'évolution de l'activité GAPDH associée à la paroi au cours de la croissance</i> .....	90
5.5.8.2	<i>Etude de la perméabilité membranaire par cytométrie en flux</i> .....	91
5.5.8.3	<i>Double marquage des cellules bactériennes par IP et anticorps anti-GAPDH</i> .....	92
5.5.8.4	<i>Effets d'un stress nutritionnel sur la concentration de la GAPDH pariétale et la perméabilité membranaire</i> .....	93
5.5.8.5	<i>Lyse cellulaire provoquée et suivi de la localisation de la GAPDH</i> .....	93
5.5.9	Rôle de la GAPDH associée à la paroi de <i>L. plantarum</i> 299v dans l'interaction, bactérie/hôte.....	94
5.5.9.1	<i>Test ELISA pour l'étude de l'interaction de la GAPDH pariétale purifiée avec les protéines de la matrice extracellulaire</i> .....	94
5.5.9.2	<i>Rôle de la GAPDH in situ à la surface bactérienne, dans l'interaction de L. plantarum 299v avec la fibronectine</i> .....	94
6	Extraction des acides lipotéichoïques associés à la paroi de <i>L. plantarum</i> 299v.....	95
6.1	Extraction par des solvants organiques.....	95
6.1.1	Méthode d'extraction au phénol à chaud.....	95
6.1.2	Extraction au n-butanol.....	96
6.2	Extraction des LTA de <i>L. plantarum</i> 299v par traitement mécanique aux ultrasons .....	96
6.3	Purification des LTA extraits .....	97
6.3.1	Purification par chromatographie de filtration moléculaire sur gel .....	97
6.3.2	Purification par chromatographie d'interactions hydrophobes .....	97
6.3.3	Purification par chromatographie d'échange d'ions .....	97
6.4	Détection des LTA dans les différents extraits par la technique de Dot-blotting .....	98
6.5	Caractérisation biochimique des LTA purifiés.....	98
6.5.1	Dosage du phosphate .....	98
6.5.2	Analyse par CPG/SM des hexoses, glycérol et acides gras .....	99
6.5.2.1	<i>Préparation de l'échantillon pour l'analyse des oses et du glycérol</i> .....	99
6.5.2.2	<i>Analyse chromatographique</i> .....	100
6.5.3	Analyse des acides gras .....	102
6.5.3.1	<i>Préparation de l'échantillon pour l'analyse des acides gras</i> .....	102

6.5.3.2	<i>Analyse chromatographique des acides gras</i> .....	102
6.5.4	<i>Analyse des acides aminés</i> .....	103
6.5.4.1	<i>Préparation des échantillons pour l'analyse chromatographique</i> .....	103
6.5.4.2	<i>Analyse des échantillons par HPLC en phase inversée</i> .....	104
6.6	<i>Implication des LTA dans l'interaction de L. plantarum 299v avec la mucine et les cellules épithéliales intestinales Caco-2</i> .....	105
6.6.1	<i>Test d'inhibition d'adhésion sur mucine</i> .....	105
6.6.2	<i>Test d'inhibition d'adhésion sur cellules Caco-2</i> .....	106

**CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS**

1	<i>Etude de propriétés physico-chimiques de surface chez L. plantarum 299v et rôle potentiel dans l'adhésion in vitro de la bactérie</i> .....	109
1.1	<i>Les caractères hydrophobe / hydrophile et acide-base de Lewis</i> .....	109
1.2	<i>Charge électrique de surface</i> .....	115
1.3	<i>Propriétés physico-chimiques de surface de L. plantarum et capacité d'adhésion in vitro sur mucine et cellules épithéliales intestinales Caco-2</i> .....	117
2	<i>Entités moléculaires protéiques associées à la paroi de L. plantarum 299v et implication dans l'adhésion in vitro</i> .....	122
2.1	<i>Isolement et caractérisation de protéines associées à la paroi de L. plantarum 299v</i> .....	122
2.1.1	<i>Extraction et caractérisation des entités protéiques faiblement liées à la paroi</i> .....	124
2.1.1.1	<i>Séparation des protéines de la fraction FI par électrophorèse bidimensionnelle</i> .....	124
2.1.1.2	<i>Identification des protéines de la fraction FI par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF</i> .....	126
2.1.2	<i>Extraction et identification des entités protéiques fortement associées à la paroi de L. plantarum 299v</i> .....	130
2.1.2.1	<i>Extraction après marquage spécifique</i> .....	130
2.1.2.2	<i>Identification des protéines par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF</i> .....	134
2.2	<i>Evaluation in vitro de l'affinité des protéines de la paroi de L. plantarum 299v pour différentes cibles du tractus intestinal</i> .....	139
2.2.1	<i>Affinité pour les protéines de la matrice extracellulaire</i> .....	141
2.2.1.1	<i>Test d'affinité sur microplaques</i> .....	141
2.2.1.2	<i>Chromatographie d'affinité sur collagène type I</i> .....	143
2.2.2	<i>Affinité pour la mucine</i> .....	143
2.2.2.1	<i>Test d'affinité sur microplaque</i> .....	143
2.2.2.2	<i>Chromatographie d'affinité sur mucine</i> .....	145
2.3	<i>Identification structurale des protéines possédant une affinité pour les cibles mucine et constituants de la matrice extracellulaire</i> .....	145
2.3.1	<i>Séquençage N-terminal de la protéine de masse moléculaire 39 kDa</i> .....	145
2.3.2	<i>Etablissement, par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF, de la carte tryptique de la protéine de masse moléculaire 39 kDa</i> .....	146
2.4	<i>La GAPDH associée à la paroi de L. plantarum 299v : contribution à l'étude de son exportation et de son rôle à la surface de la bactérie</i> .....	148
2.4.1	<i>Extraction et purification des formes pariétale et cytoplasmique de la GAPDH</i> .....	149

2.4.2	Caractérisation structurale des deux formes de GAPDH identifiées chez <i>L. plantarum</i> 299v.....	151
2.4.2.1	Comparaison des structures primaires des deux formes de GAPDH.....	151
2.4.2.1.1	Détermination de la masse moléculaire par LC/ESI/SM .....	151
2.4.2.1.2	Analyse comparée des cartes tryptique par LC/ESI/SM .....	153
2.4.2.2	Comparaison des états oligomériques des deux formes de GAPDH.....	153
2.4.3	Effet du pH sur l'association de la GAPDH à la paroi de <i>L. plantarum</i> 299v....	155
2.4.4	Rôle de la GAPDH pariétale dans l'interaction <i>in vitro</i> de <i>L. plantarum</i> 299v avec des cibles du tractus intestinal.....	157
2.4.4.1	Mesure de l'affinité de la GAPDH pour les protéines de la matrice extracellulaire.....	157
2.4.4.2	Implication de la GAPDH, <i>in situ</i> à la surface de <i>L. plantarum</i> 299v, dans l'adhésion de la souche à la fibronectine.....	159
2.4.5	Etude de l'exportation de la GAPDH du milieu intracellulaire vers la paroi de <i>L. plantarum</i> 299v .....	161
2.4.5.1	Evolution de la concentration de la GAPDH associée à la paroi, en fonction de la phase de croissance.....	161
2.4.5.2	Evolution de la perméabilité membranaire et de la concentration en GAPDH pariétale au cours de la croissance.....	165
2.4.5.3	Etablissement de la relation entre la perte d'intégrité de la membrane plasmique de <i>L. plantarum</i> 299v et la présence de la GAPDH associée à la paroi	169
2.4.5.4	Disponibilité de la source carbonée et localisation de la GAPDH au niveau de la paroi.....	170
3	Entités moléculaires non-protéiques de la paroi de <i>L. plantarum</i> 299v et adhésion <i>in vitro</i> .....	171
3.1	Extraction, purification et caractérisation des acides lipotéichoïques associés à la paroi de <i>L. plantarum</i> 299v .....	171
3.1.1	Extraction et purification des LTA.....	173
3.1.2	Caractérisation de la composition des LTA associés à la paroi de <i>L. plantarum</i> 299v.....	175
3.1.3	Détermination de la masse moléculaire des LTA associés à la paroi de <i>L. plantarum</i> 299v.....	179
3.2	Inhibition de l'adhésion de <i>L. plantarum</i> 299v par les LTA .....	179
3.2.1	Test d'inhibition d'adhésion sur mucine.....	179
3.2.2	Test d'inhibition d'adhésion aux cellules Caco-2 .....	181
3.3	Modification non-létale de l'état de la paroi de <i>L. plantarum</i> 299v : effets sur la capacité d'adhésion <i>in vitro</i> de la souche probiotique et sur les LTA associés à sa surface .....	181
3.3.1	Effet d'un traitement par sonication à faible puissance sur la capacité d'adhésion de <i>L. plantarum</i> .....	183
3.3.2	Préparation de l'extrait de constituants de la paroi par traitement aux ultrasons.....	183
3.3.2.1	Aptitude de l'extrait EBS à inhiber l'adhésion de <i>L. plantarum</i> 299v....	183
3.3.2.2	Mise en évidence des LTA dans l'EBS par ELISA et Dot-blotting.....	185
3.3.2.3	Purification et caractérisation des LTA présents dans l'extrait EBS .....	185
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	188
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	194
	ANNEXES.....	216



**-Chapitre I-**

- Figure I.1 :** Arbre phylogénétique, basé sur l'analyse comparative des séquences d'ARNr 16S, montrant les principaux groupes phylogénétiques des bactéries lactiques et les genres non reliés *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* (d'après Holzapfel *et al.*, 2001).
- Figure I.2 :** Composition de la microflore intestinale humaine (Holzapfel *et al.*, 1998).
- Figure I.3:** Les mécanismes par lesquels les probiotiques induisent leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte.
- Figure I.4 :** Exemples de produits probiotiques non-alimentaires mis sur le marché et contenant la souche *L. plantarum*.
- Figure I.5 :** Représentation schématique de la paroi des bactéries Gram positif (d'après Delcour *et al.*, 1999).
- Figure I.6:** Les différentes sous familles de protéines exportées chez les bactéries probiotiques du genre *Lactobacillus* (d'après Sanchez *et al.*, 2008).
- Figure I.7:** Les principales protéines du secretome de *L. plantarum*, prévisibles sur la base de l'analyse du génome (d'après Boekhorst *et al.*, 2006a).
- Figure I.8 :** Représentation schématique de différents domaines structuraux des 12 protéines dont l'analyse du gène codant permet de prévoir une implication dans l'adhésion de *L. plantarum* sur des cibles moléculaires extracellulaires de l'hôte (d'après Boekhorst *et al.*, 2006a).
- Figure I.9 :** Organisation génétique du locus *msa* dans le génome de *L. plantarum* WCFS1 (a). Structure moléculaire de la protéine MSA codée par le gène *msa* montrant des domaines propres à une adhésine bactérienne (b) (d'après Pretzer *et al.*, 2005).
- Figure I.10 :** Exemples de structures d'acides téichoïques (a) chaîne de poly (glycérol-phosphate) d'acides teichoïques chez *Bacillus subtilis*, (b): poly (ribitol-phosphate) des acides teichoïques de *Lactobacillus plantarum*; (c): des acides téichuroniques de *Bacillus subtilis*; (d): acides lipotéichoïques de *Bacillus subtilis* (Adapté de Delcour *et al.*, 1999).

**-Chapitre II-**

**Figure II.1 :** Présentation schématique des traitements appliqués aux souches de *L. plantarum*, préalablement à l'étude des propriétés physico-chimiques de surface et de la capacité résiduelle d'adhésion.

**Figure II. 2 :** Schéma général du procédé d'extraction des protéines associées à la paroi de *L. plantarum* 299v

**Figure II.3 :** (a) Structure chimique de l'iodure de propidium, (b) Structure de la fluoresceine diacétate.

**Figure II.4 :** Programme de température pour l'analyse des dérivés TMS par CPG/SM.

**Figure II.5 :** Réaction de dérivation des acides aminés par le phénylisothiocyanate (PITC).

**-Chapitre III-**

**Figure III.1 :** Courbe de croissance de *L. plantarum* 299v cultivé en milieu MRS à 37°C.

**Figure III.2 :** Evolution de l'hydrophobie et du caractère acide-base de Lewis des cellules de *L. plantarum* 299v en fonction de la phase de croissance et de divers traitements physique ou biochimique affectant leur surface.

**Figure III.3 :** Evaluation des propriétés physico-chimiques de surface, par la méthode MATS, des différentes souches de *L. plantarum* prélevées en début de phase stationnaire (a) et en fin de phase stationnaire (b).

**Figure III.4 :** Evolution de la mobilité électrophorétique de *L. plantarum* 299v en fonction du pH de la solution bactérienne.

**Figure III.5 :** Etude de l'effet des traitements par ultrasons ou par la trypsine sur la viabilité des souches de *L. plantarum*.

**Figure III.6 :** Effet de traitements physique ou biochimique de la bactérie *L. plantarum* 299v, à divers stades de la croissance, sur sa capacité d'adhésion à la mucine (a) et aux cellules épithéliales intestinales Caco-2 (b).

**Figure III.7 :** Etude comparée des effets de traitements par les ultrasons ou par la trypsine, sur la capacité d'adhésion à la mucine (a) ou aux cellules épithéliales intestinales Caco-2 (b) de 4 souches de *L. plantarum* prélevées en début de phase stationnaire.

**Figure III. 8 :** Schéma général du procédé d'extraction des protéines associées à la paroi de *L. plantarum* 299v.

**Figure III.9:** Analyse par électrophorèse bidimensionnelle, de la fraction protéique faiblement associée à la paroi de *L. plantarum* 299v et désorbée à l'issue du lavage de la suspension bactérienne par un tampon Tris 0,1M, pH 8 (**Fraction FI**).

**Figure III.10 :** Réaction de couplage entre les groupes N-hydroxysuccinimide-(NHS-) de la cyanine activée et les groupes NH<sub>2</sub> des protéines associées à la paroi de la bactérie intègre.

**Figure III.11 :** SDS-PAGE des protéines associées à la paroi de *L. plantarum* 299v. (a) la bactérie entière et intègre est marquée par la cyanine Cy3, puis les fractions protéiques FII et FII sont extraites après lyse bactérienne. La révélation est réalisée à  $\lambda_{\text{excitation}} = 554 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{émission}} = 568 \text{ nm}$ . (b) identique au gel (a) mais la révélation est réalisée au bleu colloïdal. (c) La bactérie est lysée puis les protéines totales sont marquées par la cyanine Cy3, avant d'être fractionnées en FII et FIII.

**Figure III.12 :** Separation par électrophorèse bidimensionnelle des protéines associées à la paroi (FII) de *L. plantarum* 299v, après marquage par la cyanine 3. L'électrophorégramme est visualisé à une longueur d'onde d'excitation de 554 nm et à une longueur d'onde d'émission de 568 nm.

**Figure III.13 :** Capacité d'adhésion de *L. plantarum* 299v sur cible fibronectine en fonction du pH de lavage des cellules bactériennes avant la mise en œuvre dans le test.

**Figure III.14 :** Sélection, par test sur microplaque, des protéines de l'extrait FI possédant une affinité pour divers constituants de la matrice extracellulaire.

**Figure III.15 :** (a) Separation des protéines de l'extrait FI par chromatographie d'affinité sur Sepharose greffé par le collagène type I. (b) Analyse SDS-PAGE des fractions d'éluat collectées après séparation des protéines de l'extrait FI (EB) par chromatographie d'affinité sur Sepharose greffé par le collagène type I.

**Figure III.16 :** Caractérisation par test sur microplaques, de l'affinité des protéines désorbées de la paroi de *L. plantarum* 299v (FI) pour la cible mucine gastrique de porc.

**Figure III.17 :** Séparation des protéines de l'extrait FI par chromatographie d'affinité sur Sepharose greffé par la mucine (a). Analyse SDS-PAGE des fractions d'éluat collectées après séparation des protéines de l'extrait FI par chromatographie d'affinité sur Sepharose greffé par la mucine (b).

- Figure III.18 :** Alignement de la séquence N-terminale de la protéine de 39kDa avec celle de la GAPDH Q88YH6\_LCPL codée par le gène de la souche sauvage *L. plantarum* WCFS1.
- Figure III.19 :** Carte tryptique, établie par spectrométrie en mode MALDI-TOF, de la bande de masse moléculaire 39 kDa de *L. plantarum* 299v.
- Figure III.20 :** Purification par chromatographie de pseudo-affinité sur colonne « blue Sepharose CL6B » des formes associée à la paroi et intracellulaire de la GAPDH (a). Analyse par SDS-PAGE des fractions collectées après la chromatographie de pseudo-affinité sur colonne blue Sepharose CL 6B (b).
- Figure III.21:** Profils chromatographiques des formes de GAPDH (Cytosolique et associée à la paroi) après séparation sur colonne C4 (150 x 2,1 mm) couplée à une source nanospray d'un spectromètre de masse en mode LC ESI-MS/MS.
- Figure III.22 :** Séparation des peptides issus de la digestion tryptique de chacune des deux formes de GAPDH (Cytosolique et associée à la paroi), par HPLC en phase inversée sur colonne C18 (150 x 2,1 mm) couplée à un détecteur spectromètre de masse en mode LC-ESI SM/SM.
- Figure III.23 :** Analyse par filtration moléculaire sur gel Superdex 200 des formes natives de GAPDH extraites de *L. plantarum* 299v. GAPDH associée à la paroi (-◆-);GAPDH cytoplasmique (-▲-).
- Figure III.24 :** Localisation de la GAPDH à la surface des cellules de *L. plantarum* 299v, par marquage spécifique à l'aide d'anticorps fluorescents et par mesure de l'activité enzymatique *in situ*.
- Figure III.25 :** Evaluation de l'affinité de la GAPDH pour les protéines de la matrice extracellulaire. Les cibles sont immobilisées sur microplaque 96 puits et la GAPDH spécifiquement adsorbée sur chaque cible est quantifiée par la méthode ELISA.
- Figure III.26 :** Effet du pH, lors de l'étape de lavage des cellules bactériennes qui précède le test d'adhésion, sur la concentration en GAPDH associée à la paroi et la capacité résiduelle de *L. plantarum* 299v à s'adsorber sur la cible fibronectine.
- Figure III.27 :** Analyse par SDS-PAGE : **(a)** des protéines désorbées à pH 8, de la paroi de *L. plantarum* 299v et **(b)** des surnageants de culture prélevés au cours de la croissance de la bactérie probiotique.

**Figure III.28** : Evolution de l'activité de l'enzyme associée à la paroi et en solution dans le milieu de culture, après addition de GAPDH cytoplasmique à une culture de *L. plantarum* 299v début de phase stationnaire.

**Figure III.29** : Evolution de l'activité GAPDH associée à la paroi de *L. plantarum* 299v, exprimé en U/Cellule, de la perméabilité membranaire (% de la fluorescence rouge, IP) et de l'activité métabolique (fluorescence moyenne verte, FDA) aux différentes étapes de la phase de croissance **(a)**. Cytogrammes montrant la bi-analyse paramétrique de l'activité métabolique et de l'intégrité membranaire pendant la croissance de *L. plantarum* 299v après le marquage à l'IP (FL3) et à la FDA (FL1) **(b)**.

**Figure III.30** : Relation entre l'intégrité de la membrane plasmique et la concentration en GAPDH associée à la paroi de *L. plantarum* 299v. **(a)** Le cytogramme de la fluorescence verte (FL1, Alexa-488) en fonction de la fluorescence rouge (FL3, IP), **(b)** Diagramme qui établit la corrélation entre la concentration de la GAPDH associée à la paroi et le taux d'altération de la membrane plasmique.

**Figure III.31** : Effet de la disponibilité en source carbonée sur la concentration en GAPDH associée à la paroi et sur la perméabilité de la membrane plasmique des cellules de *L. plantarum* 299v.

**Figure III.32** : Profil chromatographique de la purification par exclusion moléculaire sur colonne Superose HR 6 (300 x10 mm) des LTA extraits de la paroi de *L. plantarum* 299v par la méthode au phénol.

**Figure III.33** : Profil chromatographique de la purification sur colonne d'interactions hydrophobes Octyl-Sépharose (100 x 16 mm) des LTA extraits de la paroi de *L. plantarum* 299v par la méthode au n-butanol.

**Figure III.34** : Profil chromatographique de la purification par chromatographie d'échange d'ions sur colonne DEAE (100 x 10 mm) du pool de fractions 18 à 24 obtenues après la purification sur colonne Octyl-Sépharose des LTA extraits de la paroi de *L. plantarum* 299v par la méthode au n-butanol.

**Figure III.35** : Analyse de la composition en acides aminés des LTA purifiés, par HPLC en phase inversée sur colonne Pico-Tag. C18 (3,9 x 150 mm, Waters). Etalon interne : acide  $\alpha$ -aminobutyrique.

**Figure III.36** : Spectre de masse des LTA extraits de la paroi de *L. plantarum* 299v. Le spectre est établi par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF. Les LTA

## *Liste des figures*

---

sont extraits et purifiés selon la procédure décrite dans la section 6.3.2, page 97.

**Figure III.37 :** Effet d'un prétraitement de la cible mucine par les LTA, sur la capacité d'adhésion de *L. plantarum* 299v.

**Figure III.38 :** Effet d'un prétraitement de la cible cellules épithéliales intestinales Caco-2 par les LTA, sur la capacité d'adhésion de *L. plantarum* 299v.

**Figure III.398 :** Inhibition de l'adhésion de *L. plantarum* 299v par l'extrait EBS. (a) sur cible mucine et (b) sur cible cellules épithéliales Caco-2.

**Figure III.40 :** Détection, par la technique de Dot-blotting, des LTA dans l'extrait brut obtenu après le traitement non létal des cellules de *L. plantarum* 299v aux ultrasons.

**Figure III.41 :** Profil chromatographique de la purification, par chromatographie d'interactions hydrophobes sur colonne Octyl-Sépharose (160 x 10 mm), des LTA extraits de la paroi de *L. plantarum* 299v après traitement aux ultrasons.

**-Chapitre I-**

**Tableau I.1 :** Les principaux groupes formés au sein du genre *Lactobacillus*, sur la base des caractéristiques phénotypiques (adapté de Stiles and Holzapfel, 1997).

**Tableau I.2 :** Souches probiotiques utilisées comme nutraceutiques et/ ou dans les produits laitiers fermentés.

**Tableau I.3:** Quelques exemples des principaux effets bénéfiques sur la santé de l'hôte induits par des souches de probiotiques.

**Tableau I.4 :** Les principales adhésines protéiques isolées chez quelques espèces de *Lactobacillus*.

**-Chapitre II-**

**Tableau II.1 :** Gradient d'élution utilisé pour la chromatographie d'affinité sur mucine.

**Tableau II.2 :** Gradient d'élution utilisé lors de la chromatographie d'affinité sur collagène type I.

**Tableau II.3 :** Gradient d'élution utilisé pour l'analyse des acides aminés par HPLC en phase inversée.

**-Chapitre III-**

**Tableau III.1:** Effet de la phase de croissance et de divers prétraitements physique ou biochimique sur la mobilité électrophorétique (ME en  $10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) des cellules de *L. plantarum* 299v.

**Tableau III.2 :** Effet de traitements physique ou biochimique sur la mobilité électrophorétique de 4 souches de *L. plantarum*, en début de phase stationnaire.

**Tableau III.3 :** Identification par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF des protéines faiblement associées à la paroi de *L. plantarum* 299v.

**Tableau III.4 :** Identification par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF des protéines associées à la paroi de *L. plantarum* 299v (FII) préalablement marquées par la cyanine 3 (Cy3).

**Tableau III.5 :** Comparaison des masses moléculaires des peptides tryptiques issus de la bande de masse moléculaire 39kDa avec celles des peptides tryptiques

### *Liste des tableaux*

---

théoriques déduits de la séquence de la GAPDH de la souche sauvage *L. plantarum* WCFS1.

**Tableau III.6:** Evolution de l'activité GAPDH et de certains paramètres culturels durant la croissance de *L. plantarum* 299v.

**Tableau III.7:** Analyse comparée de la composition de LTA extraits de la paroi de différentes espèces de lactobacilles.

**ABRÉVIATIONS**

<b><math>\lambda</math></b>	Longueur d'onde
<b>BSTFA</b>	Bis(trimethylsilyl)trifluoroacétamide
<b>CPG</b>	Chromatographie en phase gazeuse
<b>Cy3</b>	Cyanine 3
<b>DEAE</b>	DiethylAminoEthyl
<b>DMEM</b>	Dulbecco Modified Eagle's Minimal Essential Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxyde
<b>DMF</b>	Dimethylformamide
<b>EDTA</b>	EthylenDiamineTetraAcetic acid
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>ESI</b>	Electrospray ionisation
<b>FAO/WHO</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization
<b>FDA</b>	Fluoresceine DiAcétate
<b>GAPDH</b>	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
<b>IP</b>	Iodure de propidium
<b>KVhs</b>	Kilos Volts heures
<b>LTA</b>	Lipoteichoïc acids
<b>MALDI-TOF</b>	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight
<b>MATS</b>	Microbial Adhesion to Solvent
<b>ME</b>	Mobilité Electrophorétique
<b>Min</b>	Minute
<b>MM</b>	Marqueurs moléculaires
<b>MRS</b>	de Man Rogosa Sharpe
<b>PBS</b>	Phosphate Saline Buffer
<b>PITC</b>	Phénylthiocyanate
<b>PMSF</b>	PhenylMethylSulphonyl Fluoride
<b>Rpm</b>	Rotation par minute
<b>TA</b>	Teichoïc acids
<b>TFA</b>	Trifluoroacetic acid
<b>T<sub>R</sub></b>	Temps de rétention
<b>UFC</b>	Unité formant colonie
<b>W</b>	Watts



# ***INTRODUCTION GENERALE***



L'homme moderne est un consommateur effréné en quête perpétuelle de bien être, qui ne cesse de vouloir préserver son capital santé. Dans ce contexte, l'idée de pouvoir se soigner ou de se prémunir contre différentes affections en mangeant devient très séduisante et largement exploitée par les professionnels du secteur agro-alimentaire. Ceux-ci ont mis sur le marché, au cours de ces dernières années, l'aliment fonctionnalisé, encore appelé aliment santé.

Le concept d'aliment fonctionnalisé, capable de produire des effets bénéfiques sur la santé du consommateur (humain ou animal) est étroitement associé à la notion de microorganisme probiotique .

Un probiotique est un microorganisme vivant, utilisé seul, ou associé avec des oligosaccharides prébiotiques, des oligoéléments, et/ou des vitamines ou bien encore inclu dans une préparation alimentaire le plus souvent lactée et qui lorsqu'il est ingéré en quantité suffisante, affecte de façon bénéfique la santé de l'hôte en optimisant l'équilibre de sa flore intestinale. Plusieurs critères sont associés à cette définition :

- Un probiotique doit pouvoir être produit à l'état viable et à grande échelle en vue d'applications industrielles ;
- Il doit être capable de survivre dans les conditions du tractus et de l'écosystème intestinal, ce qui implique qu'il résiste à l'acidité gastrique, aux enzymes pancréatiques ainsi qu'aux sels biliaires ;
- L'hôte doit tirer un bénéfice santé de la consommation du probiotique.

Parmi les microorganismes identifiés pour répondre à ces critères, on trouve principalement des bactéries lactiques appartenant aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, mais également des bactéries non lactiques principalement des genres *Bacillus* et *Streptococcus*.

Les effets bénéfiques, recensés et établis sur la base d'études cliniques, concernent principalement l'amélioration de l'état de patients atteints de diverses affections du tractus gastro-intestinal. De tels effets sont étroitement liés, entre autres, à la capacité des bactéries probiotiques à :

- Présenter un effet antagoniste vis-à-vis de microorganismes pathogènes grâce à la compétition pour les aliments et les sites d'adhésion sur la muqueuse intestinale ainsi qu'à la production de substances antimicrobiennes ;
- Moduler la réponse immunitaire de l'hôte.

Dans ces conditions, on conçoit aisément que l'un des problèmes majeurs auquel est confrontée la bactérie probiotique, réside dans la nécessité de s'installer et de séjourner dans

l'intestin et par conséquent d'adhérer à l'épithélium intestinal afin de prolonger ainsi son temps de passage et de pouvoir exprimer ses effets positifs sur la santé de l'hôte. Toutefois, les conditions de stress environnemental dans lesquelles le probiotique se retrouve, compromettent souvent ses chances de survie. Il doit notamment entrer en compétition avec l'ensemble de la microflore commensale et/ou les microorganismes pathogènes susceptibles d'être présents dans le tractus.

La capacité d'interaction avec la muqueuse intestinale de l'hôte, pour une bactérie lactique probiotique, dépend principalement de ses propriétés de surface et par conséquent de la composition de la paroi du microorganisme qui représente l'élément structural exposé aux constituants de l'épithélium intestinal.

Chez les bactéries lactiques et pour le genre *Lactobacillus* en particulier, la paroi complexe est constituée :

- D'un réseau de peptidoglycane assurant à la fois la résistance mécanique de la cellule et l'ancrage de nombreuses entités moléculaires ;
- De protéines associées au peptidoglycane et/ou à la membrane plasmique par divers motifs d'ancrage covalent ou non-covalent ;
- De polysaccharides ou exopolysaccharides ;
- D'acides téichoïques ou lipotéichoïques, poly-anioniques à base de glycérophosphate substitués par des hexoses et un acide aminé particulier, la D-alanine.

La présence de ces différentes entités moléculaires, émergeant à la surface du peptidoglycane du lactobacille, conditionne ses propriétés physico-chimiques de surface telles que l'hydrophobie/hydrophilie, son caractère acide/base, la charge nette, ...De telles propriétés peuvent être impliquées dans l'interaction de la bactérie avec ses cibles au niveau intestinal, participant à l'expression de son caractère probiotique.

De plus, les différentes structures polymériques liées à la surface des lactobacilles sont susceptibles de présenter une spécificité de reconnaissance vis-à-vis d'éléments de la paroi intestinale. Des protéines associées à la paroi de lactobacilles ont été identifiées comme des adhésines spécifiques du mucus, des protéines de la matrice extracellulaire et des cellules épithéliales intestinales. Les acides lipotéichoïques sont également impliqués, chez plusieurs lactobacilles, dans l'adhésion aux cellules épithéliales. Le processus d'adhésion est par conséquent un phénomène complexe qui résulte de l'intervention de propriétés globales de la surface bactérienne et/ou de l'existence d'entités moléculaires protéiques et/ou non-protéiques possédant une affinité spécifique pour des éléments de la muqueuse intestinale de l'hôte.

L'identification des déterminants moléculaires de l'adhésion d'une bactérie probiotique aux constituants du tractus intestinal, nécessite la mise en œuvre d'approches scientifiques complémentaires.

Dans le cas de la bactérie probiotique, *L. plantarum* 299v, commercialisée par la société Probi AB, et qui fait l'objet du travail qui va être présenté, le séquençage complet de son génome a été à l'origine d'une première approche génétique pour la prévision des structures moléculaires exportées à la surface du lactobacille. Les données publiées ont permis d'établir la composition partielle du « Sécrotome » de la bactérie, soit 228 protéines exportables du cytoplasme vers la paroi. Toutefois, si ces données sont essentielles dans le cadre d'une étude visant à établir de manière systématique la composition de la surface bactérienne, dans le but de mieux comprendre l'interaction du microorganisme avec son hôte, elles sont cependant insuffisantes si elles ne sont pas étayées ou validées par une seconde approche biochimique. Cette deuxième approche fait appel aux techniques d'extraction, de purification et de caractérisation structurale des différents polymères associés à la paroi de la bactérie probiotique. Seule la combinaison des informations issues des approches génétique et biochimique sont susceptibles de donner accès à une connaissance assez exhaustive de la composition de la paroi du lactobacille probiotique, préalable indispensable et essentiel pour une compréhension de l'interaction bactérie/ hôte.

L'objectif du travail présenté dans ce manuscrit est par conséquent d'apporter une contribution à l'identification d'entités moléculaires protéiques et non protéiques, présentes à la surface de la bactérie probiotique *L. plantarum* 299v puis de caractériser, au cours d'une approche *in vitro*, leur affinité pour différentes cibles de la paroi intestinale de l'hôte.

Le travail exposé est structuré en 3 parties :

- La première d'entre elles est consacrée à une étude bibliographique résumant les connaissances acquises dans les domaines des propriétés physico-chimiques globales de la surface de bactéries lactiques probiotiques et du genre *Lactobacillus* en particulier. Une analyse exhaustive des travaux concernant l'identification de constituants de la paroi des lactobacilles probiotiques, impliqués dans l'interaction avec des éléments de la surface du tractus intestinal est ensuite présentée;
- Les résultats expérimentaux sont abordés dans une seconde partie subdivisée en 4 chapitres :
  - Nous abordons tout d'abord la caractérisation des propriétés physico-chimiques de la surface de la bactérie probiotique *L. plantarum* 299v ainsi que celles d'autres sous espèces isolées au laboratoire, ceci afin

d'expertiser l'éventuelle corrélation entre de telles propriétés et la capacité d'adhésion de la bactérie sur les cibles de la muqueuse intestinale mises en œuvre ;

- Le 2<sup>ème</sup> chapitre concerne l'identification systématique, grâce à une approche protéomique, des protéines présentes au niveau de la paroi de *L. plantarum* 299v et la mise en évidence *in vitro*, de leur affinité pour différents constituants de la muqueuse intestinale ;
  - Nous consacrons le 3<sup>ème</sup> chapitre à l'étude de "l'exportation" d'une "anchorless ou moonlighting proteins" impliquée dans l'adhésion de *L. plantarum* 299v. Cette partie du travail a fait l'objet d'une publication jointe en annexe ;
  - Le dernier chapitre de la partie résultats porte sur l'indentification et la caractérisation de structures polyanioniques non protéiques, de type acides teichoïques, jouant également un rôle dans l'adhésion de *L. plantarum* 299v. Cette étude fera objet d'un projet de publication présentée ultérieurement.
- L'ensemble des matériels et méthodes mis en œuvre au cours de l'étude sont présentés dans la 3<sup>ème</sup> partie de ce manuscrit.

Enfin, la conclusion du travail exposé, permet d'établir le bilan de l'étude et d'annoncer les perspectives qui peuvent en découler.

***CHAPITRE I***  
**SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**



## **1 Les bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques forment un groupe bactérien phylogénétiquement très hétérogène et bénéficient du statut GRAS (Generally Recognised As Safe). Ce groupe bactérien est largement répandu dans la nature. Les bactéries qui le constituent sont fréquemment isolées d'environnements riches en matières organiques telles que les végétaux en décomposition mais on retrouve également des représentants de ce groupe dans les tractus gastro-intestinaux et urogénitaux des mammifères. Les bactéries appartenant à ce groupe font aussi l'objet de nombreuses applications en industries agro-alimentaires, notamment dans le secteur du lait, des viandes et des végétaux nécessitant une étape de fermentation au cours de l'élaboration des produits finis. En tant que microorganismes d'intérêt industriel, les bactéries lactiques viennent immédiatement après la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'intérêt de la consommation des bactéries lactiques est apparu vers le début du 20<sup>ème</sup> siècle, lorsque Metchnikoff a suggéré que l'absorption de ces microorganismes vivants, présents dans le yogourt, accroissait la longévité du consommateur. L'auteur attribue les effets positifs observés sur la santé de l'hôte à une réduction de la population des bactéries putréfiantes et/ou productrices de toxines dans le tube digestif (Metchnikoff, 1907). Le concept de bactéries probiotiques n'en était alors qu'à ses premiers balbutiements. Depuis, l'élaboration puis la consommation de produits alimentaires ou compléments alimentaires contenant des microorganismes probiotiques a connu un essor considérable. Au cours de ces dernières décennies, les grands groupes leaders en alimentation humaine tels que Nestlé, Danone ... etc, ont très largement exploité le concept et ont mis sur le marché une foule de nouveaux produits à base de bactéries probiotiques, qui entrent dans la gamme des aliments fonctionnalisés ou aliments santé ou encore alicaments. Bon nombre d'applications commerciales d'aliments contenant des bactéries probiotiques ont précédé les travaux de recherche visant à établir, sur la base d'une approche scientifique rigoureuse, d'une part les mécanismes d'action et d'autre part les effets sur la santé de l'hôte de ces bactéries lactiques vivantes présentes dans les aliments ou les compléments alimentaires. Toutefois, depuis une dizaine d'années, le sujet suscite de plus en plus d'intérêt auprès d'équipes de microbiologistes, biochimistes, physiologistes et de médecins et le nombre de publications scientifiques s'accroît, chacune apportant sa contribution à une meilleure compréhension des mécanismes complexes d'interaction de ces bactéries avec l'hôte humain ou animal.

### 1.1 Description, classification et caractéristiques physiologiques

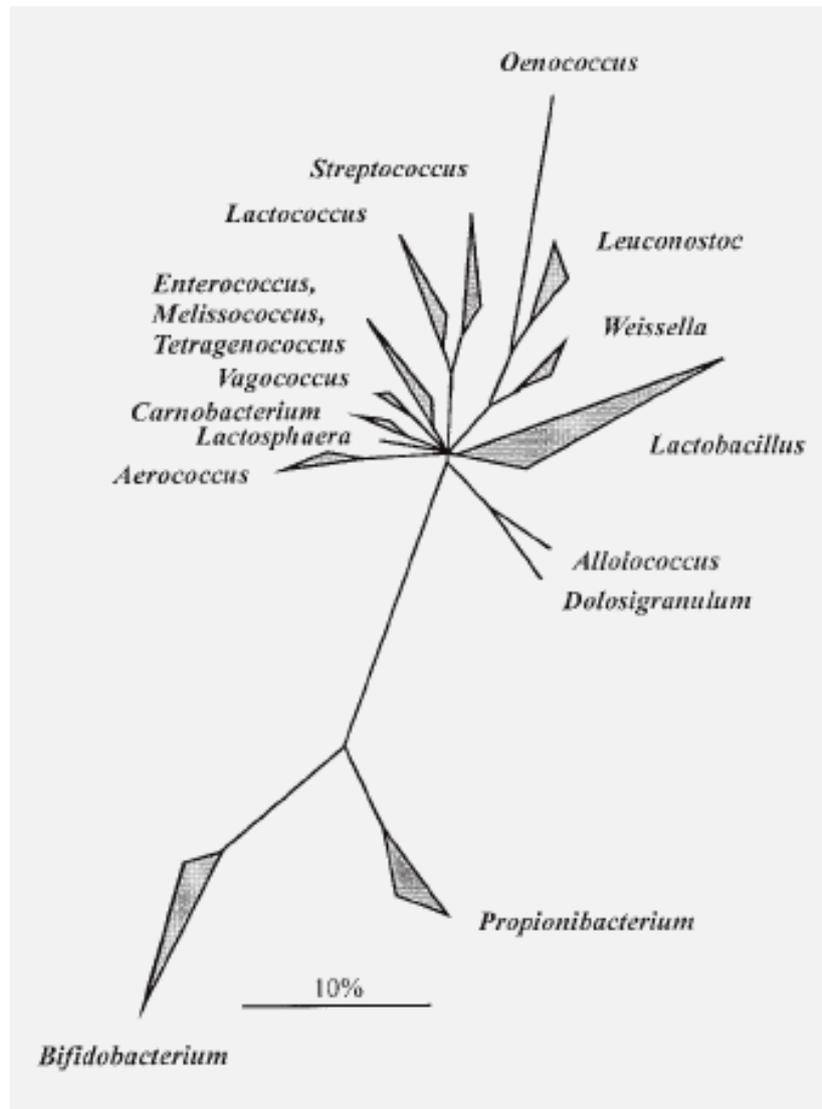
Les bactéries lactiques sont définies comme étant des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes, c'est-à dire qui requièrent des molécules organiques complexes comme source d'énergie (De Roissart, 1986). Ce sont des bactéries Gram positif, asporulées, généralement non mobiles, anaérobies mais aéro-tolérantes, pouvant se présenter en coques ou en bacilles. Elles sont dépourvues de cytochrome-oxydase, de nitrate-oxydase et ne possèdent pas de catalase. Leur métabolisme énergétique est principalement de type fermentaire. Elles peuvent être homofermentaires, l'acide lactique représentant alors 70% du produit métabolique ou bien hétérofermentaires, produisant 50 % d'acide lactique mais également d'autres composés tels que l'acide acétique, le CO<sub>2</sub> ou l'éthanol.

L'introduction des techniques de biologie moléculaire, en particulier la comparaison des séquences d'ARN ribosomal, a donné lieu à des révisions majeures en matière de taxonomie des bactéries lactiques et a conduit à l'introduction de plusieurs nouveaux genres dans ce groupe.

Selon Stiles and Holzapfel, (1997) et Axelsson, (1998) les bactéries lactiques regroupent les genres suivants : *Aerococcus*, *Alliococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. Néanmoins, ce sont surtout les genres *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* et *Weissella* qui font objet d'applications en industries agroalimentaires pour le développement d'aliments fonctionnalisés (Vandamme *et al.*, 1996). La relation phylogénétique entre les différents genres de bactéries lactiques, représentée **Figure I.1**, est basée sur la comparaison des séquences d'ARN ribosomal 16S. *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Lactosphaera* sont étroitement apparentés les uns aux autres. Les genres *Lactococcus* et *Streptococcus* apparaissent relativement apparentés alors que le genre *Lactobacillus* est phylogénétiquement distinct.

#### 1.1.1 Le genre *Lactobacillus*

Les lactobacilles appartiennent à la flore normale de la cavité buccale, urogénitale et du tractus gastro-intestinal de l'homme et de l'animal. Ils représentent le groupe le plus important des bactéries lactiques, contenant plus de 120 espèces et 20 sous espèces



**Figure I.1 :** Arbre phylogénétique, basé sur l'analyse comparative des séquences d'ARNr 16S, montrant les principaux groupes phylogénétiques des bactéries lactiques et les genres non reliés *Bifidobactérium* et *Propionibacterium* (Holzapfel *et al.*, 2001).

(<http://www.dsmz.de/microorganisms>). Ce nombre évolue régulièrement, 13 nouvelles espèces ont été proposées en 2005, 9 en 2006 et 7 autres en 2007 (Lee and Salminen, 2009).

Les lactobacilles se présentent sous forme de bacilles Gram positif, isolés ou en chaînettes, non sporulés et immobiles avec un pourcentage G+C inférieur à 50%. Les lactobacilles appartiennent au groupe des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Lactobacillaceae*. Ces bactéries peuvent se développer à des températures basses ou extrêmes comprises entre 2 et 50°C, avec un optimum compris entre 30 et 40°C. Ils ont un métabolisme strictement fermentaire (homo ou hétérofermentaire), aérotolérant ou anaérobies et acidophiles, avec un optimum de pH entre 5,5 et 6,2 (Kandler and Weiss, 1986). De plus ces microorganismes sont auxotrophes avec de fortes exigences en facteurs de croissance tels que des glucides, des acides aminés, des dérivés d'acides nucléiques, des sels et des vitamines (Morishita *et al.*, 1981). Les lactobacilles sont isolés de diverses niches écologiques telles que les plantes, le sol, l'eau, les produits laitiers, carnés ou végétaux fermentés ou en décomposition. Bien qu'ils y soient moins représentés que les bifidobactéries, les lactobacilles sont des habitants naturels des tractus gastro-intestinaux et urogénitaux de l'homme et de l'animal.

Stiles and Holzapfel, (1997), rapportent que les lactobacilles peuvent être classés en trois groupes selon leur métabolisme fermentaire (**Tableau I.1**):

- Groupe 1, homofermentaires obligatoires, produisant exclusivement de l'acide lactique à partir de la fermentation du glucose. Les bactéries associées à ce groupe ne fermentent pas les pentoses et parmi les espèces les plus fréquemment isolées de produits alimentaires, on trouve *L. acidophilus* et *L. delbrueckii*.
- Groupe 2, représente les hétérofermentaires facultatifs, qui produisent en plus de l'acide lactique, de l'éthanol, du CO<sub>2</sub>, de l'acide acétique ou d'autres acides organiques à courte chaîne à partir de la fermentation d'hexoses. Ces microorganismes peuvent fermenter les pentoses grâce à l'enzyme transketolase, qui catalyse la transformation du xylose-5-phosphate en glycéraldéhyde-3-phosphate (3<sup>ème</sup> maillon de la glycolyse). Les espèces les plus représentées sont *L. casei* et *L. plantarum*.
- Enfin le groupe 3, inclut les hétérofermentaires obligatoires, qui fermentent les hexoses et les pentoses en acide lactique, acide acétique et/ou éthanol et CO<sub>2</sub>. La production de gaz à partir de la fermentation du glucose est un trait caractéristique de ces bactéries. Les principales espèces de ce groupe sont *L. fermentum* et *L. brevis* (pour une revue détaillée, Stiles and Holzapfel, 1997).

**Tableau I.1** : Les principaux groupes formés au sein du genre *Lactobacillus*, sur la base des caractéristiques phénotypiques (adapté de Stiles and Holzapfel, 1997).

<b>Groupe 1</b>	<b>Groupe 2</b>	<b>Groupe 3</b>
<b>homofermentaires strictes</b>	<b>hétérofermentaires facultatifs</b>	<b>hétérofermentaires strictes</b>
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acetotolerans</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. amylophilus</i>	<i>L. agilis</i>	<i>L. buchneri</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>L. alimentarius</i>	<i>L. collinoides</i>
<i>L. aviarius subsp. araffinosus</i>	<i>L. bifementans</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. aviarius subsp. Aviarius</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. fructivorans</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>L. coryniformis</i>	<i>L. fructosus</i>
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>subsp. torquens</i>	<i>L. hilgardii</i>
<i>L. delbrueckii subsp.</i>	<i>L. coryniformis</i>	<i>L. kefir</i>
<i>delbrueckii</i>	<i>subsp. coryniformis</i>	<i>L. malefermentans</i>
<i>L. delbrueckii subsp. lactis</i>	<i>L. cuvatus</i>	<i>L. oris</i>
<i>L. farciminis</i>	<i>L. graminis</i>	<i>L. panis</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>L. hamsteti</i>	<i>L. parabuchneri</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>L. homohiochii</i>	<i>L. parakefir</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. intestinalis</i>	<i>L. pontis</i>
<i>L. jensenii</i>	<i>L. murinus</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>L. paracasei subsp. paracasei</i>	<i>L. sanfrancisco</i>
<i>L. kefiranofaciens</i>	<i>L. tolerans</i>	<i>L. suebicus</i>
<i>L. kefirgranum</i>	<i>L. paraplantarum</i>	<i>L. vaccinofermentans</i>
<i>L. mali</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. vaginalis</i>
<i>L. ruminis</i>	<i>L. pentosus</i>	
<i>L. salivarius subsp. salicinus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	
<i>L. salivarius subsp. salivarius</i>	<i>L. sake</i>	
<i>L. sharpeae</i>		

L'espèce *Lactobacillus plantarum* est une bactérie Gram positif, mésophile, oxygène tolérante, et hétérofermentaire. Elle peut croître en forte densité ce qui pourrait être intéressant pour des applications industrielles. Plusieurs souches de *L. plantarum* résistent à un passage dans l'estomac sous une forme viable et sont ainsi capables de survivre pendant plus de 6 jours dans le tractus gastro-intestinal de l'homme et de l'animal (Bron *et al.*, 2004 ; Vesa *et al.*, 2000 ). De telles propriétés de survie et de persistance dans le tractus de l'hôte, homme et animal, contribuent à conforter l'intérêt de cette souche en tant que probiotique potentiel (Goossens *et al.*, 2005 ; McNaught *et al.*, 2005), mais également comme vecteur pour l'acheminement de composés thérapeutiques vers des cibles intestinales (Pouwels *et al.*, 1998; Pavan *et al.*, 2000). De ce fait, certaines souches de *L. plantarum* sont présentées comme des probiotiques qui induisent des effets bénéfiques sur la santé du consommateur. Sur le marché, ces microorganismes sont disponibles sous formes de compléments alimentaires, tels que *L. plantarum* 299v et Lp 01 commercialisés par la société Probi AB (Suède). Il est revendiqué pour la souche *L. plantarum* 299v une aptitude à soulager les patients des symptômes du syndrome du côlon irritable, un rôle dans la protection contre des infections intestinales et la prévention contre certaines diarrhées (De Veries *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que des souches de *L. plantarum* sont capables de moduler l'immunité adaptative de l'homme (Grangette *et al.*, 2005 ; Pathmakantan *et al.*, 2004 ; Schultz *et al.*, 2002). La capacité d'adhésion de *L. plantarum* 299v aux cellules gastro-intestinales (Cebeci *et al.*, 2003) est certainement liée à l'ensemble des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte cités ci-dessus.

En 2003, le génome de la souche sauvage isolée de la salive humaine, *L. plantarum* WCFS1 ou *L. plantarum* NCIMB 8826, (National Collection of Industrial and Marine Bacteria, Aberdeen, U.K.), a été complètement séquencé (Kleerebezem *et al.*, 2003). Sur la base de ce travail, 3052 protéines potentielles sont décrites, dont 2890 protéines cytoplasmiques (protéines du métabolisme, protéines de la transcription et de la traduction des ARNm, protéines impliquées dans le processus de croissance et de mort cellulaires) et environ 228 protéines membranaires, sécrétées et associées à la paroi (protéines de transport et de surface).

### 1.1.2 Les bactéries lactiques dans la microflore intestinale

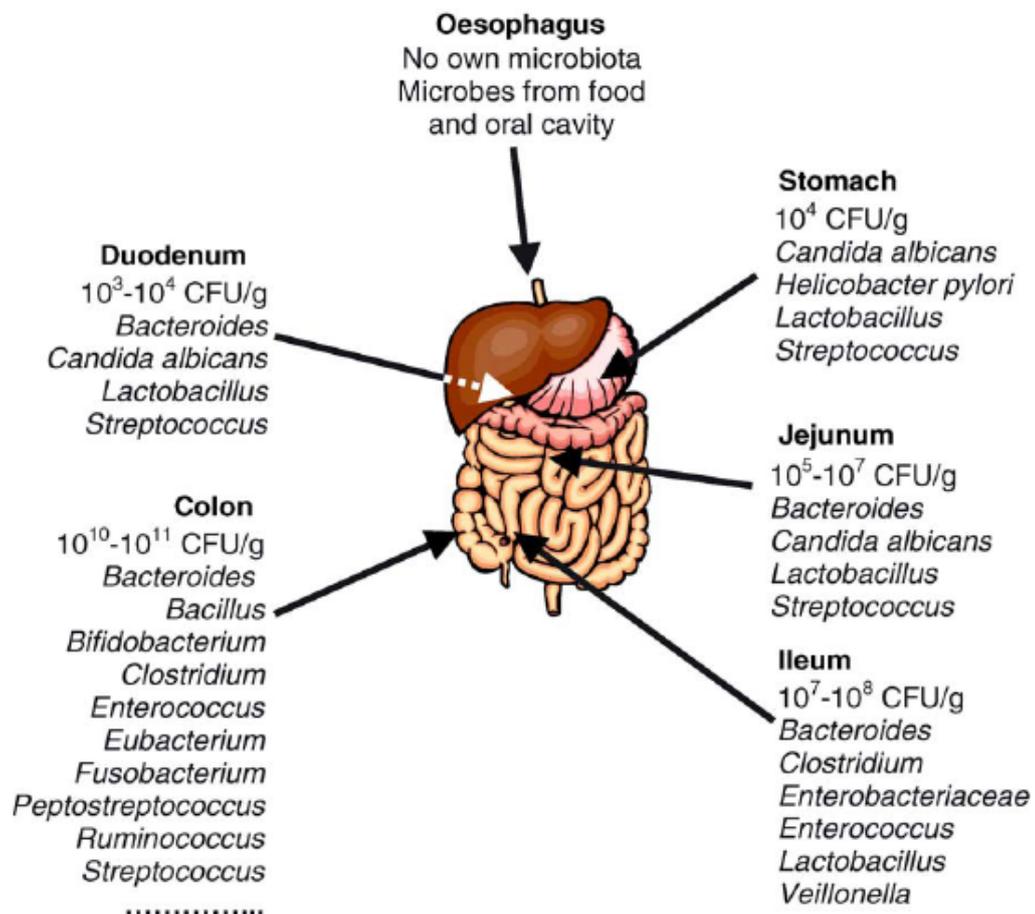
Les tractus gastro-intestinaux et urogénitaux de l'homme et des animaux sont les principaux habitats naturels des bactéries lactiques, du fait qu'ils fournissent un environnement stable et un approvisionnement continu en éléments nutritifs, sous forme

d'aliments ingérés ou sécrétés par l'hôte. On y retrouve plus communément les genres *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Bifidobacterium*. Généralement les espèces de *Lactobacillus* isolées du tube digestif de l'homme comprennent *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis* et *L. reuteri* (Mikelsaar *et al.*, 1987).

Dans le tractus gastro-intestinal humain, on compte une population microbienne de près de  $10^{13}$  à  $10^{14}$  organismes (Gorbach *et al.*, 1967). Celle-ci est constituée de plus de 1000 espèces, et le génome total de ces commensaux ou « microbiome » est estimé à au moins 100 fois plus de gènes que le génome humain complet (Hooper and Gordon, 2001 ; Gill *et al.*, 2006). Chez l'homme, le nombre de bactéries lactiques est très variable dans les différentes sections du tube digestif, il augmente progressivement lorsqu'on passe de l'intestin grêle vers le côlon (**Figure I.2**). Dans l'iléon distal, le contenu dans la lumière, est moins acide et les mouvements péristaltiques plus lents, favorisant ainsi une densité bactérienne plus élevée qui atteint  $10^5$ - $10^8$  cellules par gramme de contenu luminal (Gorbach *et al.*, 1967 ; Holzapfel *et al.*, 1998). Le côlon, quant à lui, est le plus grand réservoir de bactéries, les mouvements péristaltiques des enterocytes sont lents et les aliments y ont un temps de séjour de 18 à 68 h (Mitsuoka, 1992), ceci permet aux bactéries de croître dans le contenu luminal. La microflore colique est l'une des plus diversifiées parmi celles identifiées dans les autres écosystèmes, elle compte plus de 400 espèces décrites à ce jour. Le nombre de bactéries varie entre  $10^{10}$  et  $10^{12}$  par gramme de contenu et constitue environ 30 à 50 % de la masse fécale.

Les lactobacilles comptent parmi la flore dominante du microbiota intestinal et sont présents tout au long du tractus gastro-intestinal en des quantités variables. Ils représentent environ 1% des micro-organismes, soit approximativement  $10^3$  à  $10^7$  bactéries/g de contenu intestinal (Dal Bello *et al.*, 2003; Tannock, 2005). Toutefois, en raison de leur métabolisme, les lactobacilles colonisent l'intestin grêle proximal, c'est-à-dire le duodénum et le jéjunum, où ils accèdent aux réserves de glucides provenant de l'alimentation de l'hôte, qu'ils utilisent comme des sources d'éléments nutritifs (Bongaerts and Severijnen, 2001). Ce trait phénotypique est reflété par un nombre important de gènes codant pour des enzymes du métabolisme des glucides ainsi que pour des transporteurs putatifs de glucides. Nombreux d'entre eux ont été décrits pour certains lactobacilles et qui se rapportent directement à la place qu'ils occupent au sein du tractus gastro-intestinal (Claesson *et al.*, 2007).

Toutefois, la croissance de ces bactéries dans le tractus gastro-intestinal (GI) dépend d'un certain nombre d'autres facteurs tels que l'acidité, les sécrétions biliaires, la présence d'immunoglobulines, d'enzymes, l'exfoliation des cellules épithéliales, la sécrétion du mucus ainsi que des mouvements péristaltiques (Holzapfel *et al.*, 1998 ; Tannock, 1999).



**Figure I.2** : Composition de la microflore intestinale humaine (Isolauri *et al.*, 2004).

Pour résister à l'entraînement par le flux de matière entrant dans la lumière intestinale, l'adhésion des bactéries aux différents constituants de la paroi intestinale est probablement un facteur important, conditionnant le succès de la colonisation de la partie supérieure de l'intestin (Savage, 1977; Fuller, 1989 ; Tannock *et al.*, 1992). L'interaction physique des lactobacilles avec des composés de la surface intestinale de l'hôte est une fonction indispensable à la compréhension de l'écologie du *Lactobacillus* dans le tractus gastro-intestinal humain. En comparaison avec les travaux effectués sur les mécanismes d'adhésion des pathogènes de l'homme, très peu d'informations ont été rapportées dans la littérature sur les molécules de surface impliquées dans l'adhésion de lactobacilles à la muqueuse intestinale.

## 1.2 Probiotiques et bactéries lactiques

### 1.2.1 Définitions

Depuis très longtemps, les bactéries lactiques sont consommées dans des produits dérivés du lait, de la viande, de poisson et de divers végétaux. Ces bactéries sont devenues de ce fait des candidats naturels pouvant être utilisés dans la préparation de spécialités probiotiques. Le statut GRAS dont bénéficient certaines des bactéries lactiques est un atout supplémentaire pour leur mise en œuvre dans ce cadre.

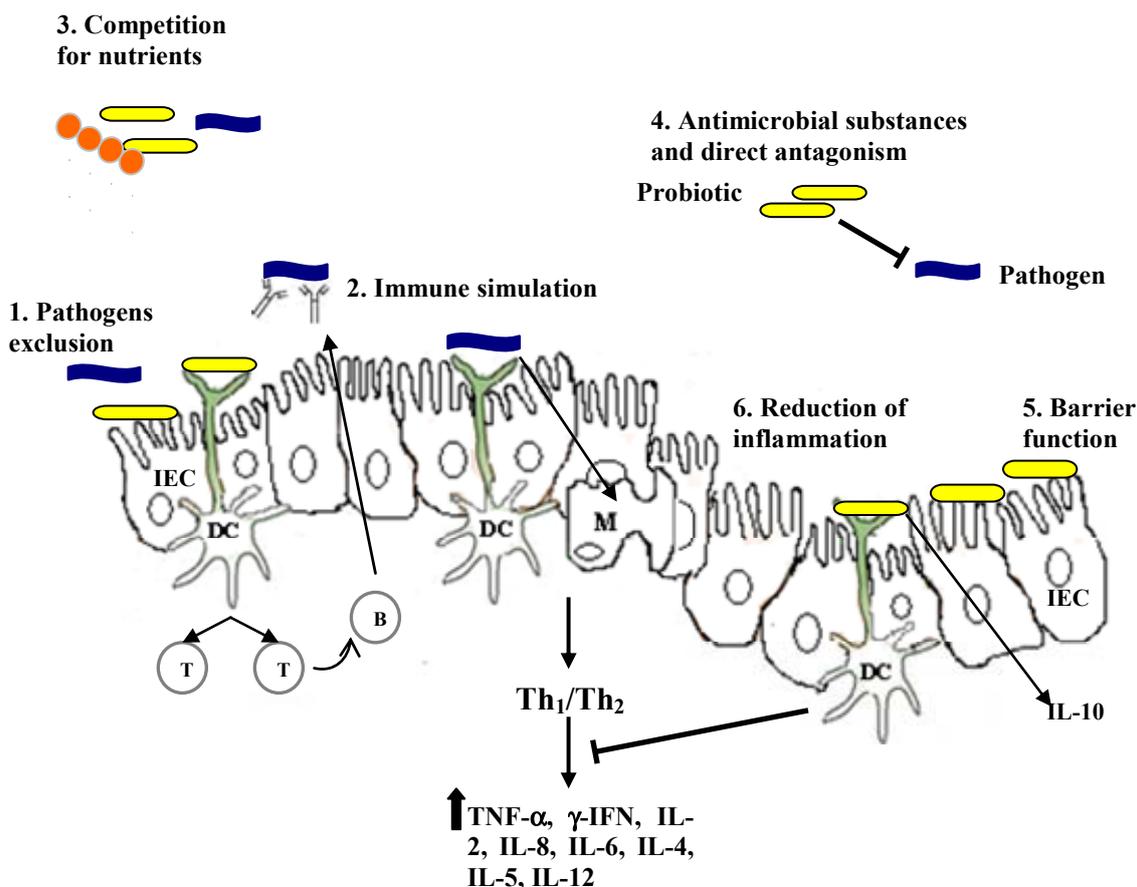
La définition du terme probiotique a évolué au cours du temps, en fonction des avancées scientifiques et technologiques sur le sujet. Il est couramment admis que la notion de « probiotique » dérive des observations pionnières de Metchnikoff, (1907), lequel suggérait que l'ingestion de bactéries lactiques vivantes accroissait la longévité du consommateur en réduisant la population de bactéries putréfiantes et/ou produisant des toxines dans le tube digestif. L'une des premières définitions des probiotiques en tant que « acteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes » a été proposée par Lilly and Stillwell en 1965. Ensuite, Parker en 1974 élargit la définition à des « organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la flore ». Cette définition inclut potentiellement des produits métaboliques microbiens, y compris les antibiotiques. En 1989, Fuller propose une définition très proche du sens actuel du terme : « le probiotique est un supplément alimentaire microbien vivant, qui affecte de façon bénéfique l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale » (Fuller, 1989). Plus récemment Guarner and Schaafsma, (1998) ont proposé une autre définition, qui a été retenue par la FAO/WHO en 2001 à savoir : « les

probiotiques sont des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte ».

### **1.2.2 Critères de sélection d'une bactérie d'intérêt probiotique**

Les microorganismes probiotiques sont sélectionnés selon des critères particuliers pour garantir qu'ils parviennent dans le tractus intestinal sous une forme viable, qu'ils puissent y développer leur activité métabolique et, si possible, qu'ils possèdent également une certaine capacité d'adhésion. Ainsi Ouwehand *et al.*, (2001) ont proposé certaines propriétés essentielles pour la sélection de nouvelles souches probiotiques : (i) ces bactéries doivent être sans danger pour l'hôte, c.-à-d. qu'ils ne sont ni pathogènes, ni toxiques, (ii) être résistantes au passage des voies gastriques, aux enzymes pancréatiques, aux sels biliaires et à l'acidité, (iii) avoir de bonnes propriétés technologiques, de sorte qu'elles puissent être cultivées à grande échelle, avoir une durée de conservation prolongée et en cas d'utilisation dans les produits fermentés, contribuer à l'amélioration du goût. Enfin, (iv) être capable d'adhérer aux muqueuses intestinales afin d'exercer leur effet immunomodulateur, participer à l'exclusion de pathogènes ou encore, améliorer la guérison de la muqueuse.

Cette capacité des bactéries probiotiques à adhérer aux divers constituants des muqueuses puis à coloniser le tractus gastro-intestinal et/ou urogénital, même de manière transitoire, est probablement une propriété essentielle, déterminant la survie de la flore bactérienne mais également sa contribution aux effets positifs qu'elle peut engendrer sur la santé de l'hôte. Toutefois, d'autres propriétés sont prises en considération pour la sélection des meilleurs candidats au rôle de probiotique. Parmi celles-ci on compte (i) l'aptitude de la bactérie lactique à modifier les conditions de son microenvironnement dans le tractus (ex : acidification grâce à la production d'acides gras à courtes chaînes... etc), (ii) sa capacité à entrer en compétition avec les bactéries pathogènes vis-à-vis des éléments nutritifs et des sites d'adhésion et par conséquent à survivre et à se multiplier pendant son transit dans le tractus, (iii) la production de métabolites antimicrobiens qui va favoriser l'antagonisme vis-à-vis des pathogènes et enfin, (iv) l'aptitude à engendrer une modulation de la réponse immunitaire de l'hôte. Toutes ces propriétés prises en considération pour sélectionner les bactéries lactiques en tant que probiotiques sont intimement liées aux mécanismes d'action de ces dernières et sont résumées sur la **Figure I.3**.



**Figure 1.3:** Les mécanismes par lesquels les probiotiques induisent leur effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. 1) Exclusion et compétition avec les pathogènes pour les sites d'adhésion aux cellules épithéliales ; 2) Stimulation de l'immunité ; 3) Compétition pour les nutriments, 4) Production de substances antimicrobiennes contre les pathogènes ; 5) Protection de l'intégrité de la barrière intestinale ; 6) Régulation de la production des cytokines anti-inflammatoires (IL-10) et inhibition de la production des cytokines proinflammatoires (ex : TNF- $\alpha$ ).

IEC: cellules de l'épithélium intestinal ; DC : cellules dendritiques ; IL: interleukine ; M : cellules M intestinales.

Les composantes bioactives des probiotiques comprennent des éléments de paroi, des protéines de surface, des acides nucléiques, des acides organiques et des acides gras à courte chaîne, des peptides antimicrobiens et d'autres facteurs solubles moins bien identifiés.

L'efficacité des probiotiques est soutenue par plusieurs études cliniques, principalement celles concernant le traitement de la diarrhée aiguë chez l'enfant et la prévention des troubles associés aux antibiotiques. Actuellement, les probiotiques et leurs composés bioactifs constituent des médicaments de substitution qui peuvent aider à réduire l'utilisation des antibiotiques, améliorant ainsi les thérapies pharmacologiques classiques.

### 1.2.3 Les principales bactéries lactiques utilisées comme probiotiques

Parmi les microorganismes utilisés en tant que probiotiques (**Tableau I.2**), les plus communément mis en œuvre appartiennent au groupe hétérogène des bactéries lactiques et notamment aux genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus* (FAO/WHO, 2001 ; Holzapfel, 2001). Toutefois, des bactéries non lactiques, tels que *Escherichia*, *Bacillus* mais également des levures telles que *Saccharomyces* ont fait l'objet d'applications sur le marché du probiotique (Rolfe, 2002 ; Holzapfel, 2001). Toutefois, des interrogations subsistent en ce qui concerne l'utilisation sans danger de ces microorganismes non lactiques (Ishibashi and Yamazaki, 2001 ; Eaton and Gasson, 2001).

Une attention particulière est accordée à la souche *Lactobacillus plantarum* qui fait l'objet de ce travail. *L. plantarum* est un habitant naturel du tractus gastro-intestinal de l'homme et de l'animal (Ahrné *et al.*, 1998), c'est un microorganisme largement répandu qui occupe diverses niches écologiques (l'eau et le sol). En outre, il est fréquemment isolé à partir de produits laitiers, carnés et d'une grande variété de végétaux comme les choux, les olives et divers légumes (Axelsson, 2004 ; Yon *et al.*, 2006 ; Lavermicocca *et al.*, 2005). Grâce à sa haute tolérance pour les milieux acides, *L. plantarum* est utilisé dans des processus de fermentations industrielles de divers végétaux (Sefa-Dedeh *et al.*, 2004). Les souches de *L. plantarum* sont capables de s'adapter à une grande variété de conditions environnementales. Ainsi, il a été montré que *L. plantarum* a développé des adaptations métaboliques importantes en réponse à des facteurs de stress tels que le choc thermique (De Angelis *et al.*, 2004), le stress à l'acide lactique et à l'éthanol (Pieterse *et al.*, 2005), aux sels biliaires (Bron *et al.*, 2006), ainsi qu'aux pH acides (G-Alegria *et al.*, 2003).

**Tableau I.2** : Souches probiotiques utilisées comme nutraceutiques et/ ou dans les produits laitiers fermentés.

<b><i>Lactobacillus</i></b>	<b><i>Bifidobacterium</i></b>	<b>Autres bactéries lactiques</b>	<b>Bactéries non-lactiques</b>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus spp,</i>
<i>L. amylovirus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>L. brevis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. cellobius</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. curvatus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. farciminis</i>		<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. fermentum</i>			
<i>L. gallinarum</i>			
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Les produits laitiers fermentés sont les meilleurs véhicules alimentaires pour la consommation de probiotiques. Les espèces de bactérie lactiques les plus fréquemment employées dans la production de produits laitiers probiotiques sont d'origine humaine car il est généralement admis que celles-ci sont mieux adaptées aux besoins physiologiques de l'hôte et peuvent coloniser plus facilement son tractus intestinal comparativement aux souches sauvages ou aux souches qui existent dans le côlon d'autres animaux. Le marché mondial des probiotiques est en forte croissance depuis le début des années 2000. Cette dynamique est notamment soutenue par le lien entre alimentation et santé, apporté par la définition des probiotiques. Ce concept de probiotique a pris son essor dans l'industrie alimentaire et en particulier dans le secteur laitier qui a fait preuve de ténacité afin de développer de nouvelles gammes de produits. Le Japon est le leader mondial pour la diversité des produits laitiers probiotiques, avec plus d'une cinquantaine de variétés mises sur le marché (Gomes and Malcata, 1999). Outre les produits dérivés de la fermentation du lait, d'autres spécialités telles que les gommes à mâcher et les jus de fruits complémentés en probiotiques, ont fait leur apparition sur le marché. Des tendances similaires sont également observées dans les pays européens comme en France, en Allemagne et en Suède. En 2008, les produits dérivés du lait complémentés en probiotiques ont représenté près de 80% des nouveaux produits laitiers mis sur le marché (GNPA, global new product data base, <http://www.gnpd.com>). En effet, au cours de ces trente dernières années, on a vu apparaître plusieurs produits à base de probiotiques mis sur le marché par les grands groupes leaders, comme Activia® (*Bifidobacterium animalis*), ou encore LC1 de Nestlé (*Lactobacillus johnsonii*) et Actimel® (*Lactobacillus casei defensis*) de Danone. La gamme des produits s'est élargie à d'autres produits comme les crèmes glacées (Lucerne Food, USA) et les fromages dont le Millán Vicente au Portugal et Spar Vital en Hongrie. Cependant, des produits probiotiques sortant totalement de l'univers des produits laitiers et dérivés font leur apparition notamment dans les produits céréaliers telles les céréales du petit déjeuner Very Berry Granola® de l'américain Total Granola, les barres céréalières Alpen chocolat de Weetabix en Grande-Bretagne, dans les boissons énergisantes de Emmi en Suisse et au Portugal et même dans les pâtes à tartiner comme le miel « Probiotic Honey » du britannique Daflorn.

Outre les produits alimentaires probiotiques, il existe divers produits de santé ainsi que des préparations pharmaceutiques contenant des probiotiques, disponibles sur le marché. En général, il s'agit de préparations bactériennes lyophilisées, commercialisées sous forme de comprimés et/ou de gélules, qui sont utilisées dans le traitement des troubles gastro-

intestinaux telles que les diarrhées (y compris les effets secondaires de la thérapie antibiotique), la constipation et certaines maladies hépatiques.

Les préparations contenant la souche *L. plantarum* sont nombreuses mais les informations concernant les propriétés des souches utilisées sont rares tant par soucis de confidentialité que par manque de données scientifiques publiées. Parmi ces produits (**Figure I.4**) récemment mis sur le marché, on peut citer le produit VSL # 3<sup>®</sup> (VSL Pharmaceuticals 3, Fort Lauderdale, FL, USA), contenant *L. plantarum* associé à sept autres souches : *L. acidophilus*, *L. delbruckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve* et *Streptococcus thermophilus*. Ce produit a été testé contre des colites ulcéraives, des pouchites et autres désordres intestinaux inflammatoires. On trouve également les produits de la gamme Probio Forte (Smart City SA, UK) incluant la souche *L. plantarum* 2203 ainsi que de 4 autres souches de lactobacilles et bifidobactéries (*L. acidophilus* BL 2027, *L. casei* BL 2401, *L. lactis* 2618 et *Bifidobacterium lactis* BL 2211) en association à d'autres ingrédients tels que : l'amidon de maïs, l'inuline de la chicorée et du stéarate de magnésium. Selon le fabricant, ce produit contribue à renforcer la santé intestinale et les défenses naturelles du consommateur. Dans les préparations de la gamme Complexe-flore intestinale (Fleurance, Auch, France) constituées de 5 souches différentes rigoureusement sélectionnées pour leurs actions stimulantes et complémentaires sur les défenses naturelles de l'organisme, on retrouve les souches de *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. salivarius* en association avec une souche de *Bifidobacterium lactis*.

Des produits à base de la souche probiotique *L. plantarum* 299v sont commercialisés par la société Probi AB, Suède. Cette souche a été originellement isolée de la muqueuse intestinale humaine saine. Les premiers produits mis sur le marché contenant la souche probiotique de Probi AB ont été lancés en 1994 sous forme de boissons fruitées, commercialisées en Europe par la société Proviva, Suède. Les boissons sont à base de farine d'avoine fermentée par la souche Lp 299v. Probi a signé des accords avec Danone pour la production d'aliments fonctionnalisés à base de *L. plantarum* 299v. Danone a développé plusieurs produits à base de cette souche mais aucun n'est encore mis sur le marché. Au Japon, la souche est également disponible sous forme de comprimés. Il a été rapporté que *L. plantarum* 299v est capable de survivre au passage dans le tractus gastro-intestinal et s'y établir même temporairement (Johansson *et al.*, 1998) et plusieurs études cliniques ont établi les effets bénéfiques sur la santé liés à cette souche pour le traitement de troubles intestinaux inflammatoires (Niedzielin *et al.*, 2001 ; Mangell *et al.*, 2006).



**Figure I.4 :** Exemples de produits probiotiques non-alimentaires mis sur le marché et contenant la souche *L. plantarum*.

#### 1.2.4 Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé de l'hôte

Les effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, attribués aux probiotiques, sont nombreux, mais les preuves confirmant ces allégations sont encore assez rares. Les principaux effets avérés ont été établis à la suite d'études cliniques alors que d'autres sont seulement supposés, car ils reposent sur la base d'essais *in vitro* qui nécessitent encore des transpositions au niveau *in vivo* pour être validés. Les premiers intérêts cliniques rapportés dans la littérature pour l'utilisation des probiotiques, l'ont été dans le cadre : de traitements de maladies infectieuses dont des diarrhées d'origines virales ou bactériennes ou consécutives aux antibiothérapies, de maladies inflammatoires chroniques telles que la colite ulcéreuse et la pouchite. D'autres bénéfices-santés attribués aux probiotiques sont étayés par de nombreux travaux scientifiques détaillés ci-après et dont la synthèse est présentée dans le **Tableau I.3**. Ils concernent notamment, l'immuno-modulation, la diminution du taux de cholestérol sanguin, la diminution du risque de cancer du côlon, l'amélioration de la digestion du lactose, la réduction des allergies, et la modification de l'écologie intestinale.

##### *1.2.4.1 Les effets immuno-modulateurs*

Les cellules épithéliales de l'intestin sont en contact direct avec les micro-organismes présents dans la lumière intestinale. Les bactéries du tractus peuvent se lier aux récepteurs exprimés à la surface des cellules épithéliales et déclencher ainsi une cascade de mécanismes de défense immunitaire. Les microorganismes probiotiques qui interagissent ainsi avec les cellules épithéliales intestinales modulent leur fonction, directement, ou bien peuvent être transportés par les cellules immunitaires localisées dans l'épithélium recouvrant la plaque de Peyer. Les probiotiques ainsi pris en charge sont ensuite présentés aux cellules du système immunitaire, dans la région sub-épithéliale, telles que les cellules dendritiques.

A ce niveau, les bactéries probiotiques ont la possibilité d'activer les lymphocytes T helper (Th) et les macrophages, en stimulant la production de cytokines, qui sont des molécules participant à la communication entre les lymphocytes, les macrophages et les autres cellules intervenant pendant les réactions inflammatoires et les réponses immunitaires. La réponse des cytokines, induite par un tel mécanisme, est très dépendante du genre et de l'espèce bactérienne impliqués (Shida and Masanobu, 2008).

## Chapitre I: Synthèse bibliographique

**Tableau I.3:** Quelques exemples des principaux effets bénéfiques sur la santé de l'hôte induits par des souches de probiotiques.

Souche de probiotique	Effets sur la santé	Référence
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	Soulagement des inflammations du syndrome de l'intestin irrité	Niedzielin <i>et al.</i> , 2001
	Réduction du cholestérol- LDL	Bukowska <i>et al.</i> , 1998
	Réduction de la récurrence des diarrhées à <i>Clostridium difficile</i>	Wullt <i>et al.</i> , 2003
<i>L. casei</i> Shirota	Sous-régulation des IL-6 et INF- $\gamma$	Matsumoto <i>et al.</i> , 2005
<i>L. casei</i> DN114001	Modulation de l'immunité	Tien <i>et al.</i> , 2006
<i>L. rhamnosus</i> GG	Traitement des diarrhées aiguës à rotavirus ou associées aux antibiotiques	Basu <i>et al.</i> , 2008
	Modulation de l'immunité	Zhang <i>et al.</i> , 2005
	Réduction des inflammations intestinales	Gosselink <i>et al.</i> , 2004
	Traitement et prévention des allergies	Kalliomaki <i>et al.</i> , 2001
<i>L. acidophilus</i> La5	Prévention après intervention contre des pouchites	Kuisma <i>et al.</i> , 2003
	Réduction des diarrhées à rotavirus ou associées aux antibiotiques	Sugita and Togawa, 1994
	Activation du système immunitaire chez des patients présentant le syndrome de l'intestin irrité	Ohman <i>et al.</i> , 2009
<i>L. acidophilus</i> M92	Diminution du cholestérol sérique	Kos, 2001
<i>L. salivarius</i> UCC118	Soulagement des symptômes des maladies inflammatoires intestinales et modulation de microflore intestinale	Mattila-Sandholm <i>et al.</i> , 1999 ; Dunne <i>et al.</i> , 2001
	Réduction des diarrhées à rotavirus et modulation de l'immunité	Shornikova <i>et al.</i> , 1997 ; Rosenfeldt <i>et al.</i> , 2002; Lin <i>et al.</i> , 2008

**Tableau I.3 : (suite)**

Souche de probiotique	Effets sur la santé	Référence
<i>Bifidobacterium breve</i>	Modulation et stimulation de l'immunité	Hoarau <i>et al.</i> , 2006; Latvala <i>et al.</i> , 2008 ; Okada <i>et al.</i> , 2009
	Réduction des symptômes du syndrome l'intestin irrité	Brigidi <i>et al.</i> , 2001 ; Matsumoto <i>et al.</i> , 2001
<i>B. animalis</i>	Augmentation de la secretion des IgAs	Bakker-Zierikzee <i>et al.</i> , 2006
<i>B. longum</i> BB536	Traitement des allergies	Takahashi <i>et al.</i> , 2006 ; Isolauri and Salminen, 2008
<i>B. lactis</i> Bb12	Réduction de la fréquence des diarrhées à rotavirus et les turista	Saavedra <i>et al.</i> , 1994;
	Effets inhibiteurs contre <i>Helicobacter pylori</i>	Wang <i>et al.</i> , 2005
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Diminution des rechutes pour les maladies inflammatoires intestinales	Malchow, 1997
	modulation et stimulation de l'immunité	Sturn <i>et al.</i> , 2005
	Apaisement des colites ulcératives	Kruis <i>et al.</i> , 2004 ; Sartor, 2005
	Exclusion d' <i>E. coli</i> entérotoxigène	Boudeau <i>et al.</i> , 2003
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Diminution des rechutes pour les maladies inflammatoires intestinales	Guslandi <i>et al.</i> , 2000
	Diminution des diarrhées associées aux antibiotiques	Kotowska <i>et al.</i> , 2005
	Réduction de la récurrence des diarrhées à <i>Clostridium difficile</i>	McFarland <i>et al.</i> , 1994
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Diminution de l'intolérance au lactose	De Vrese <i>et al.</i> , 2001
	Prévention des diarrhées à rotavirus	Saavedra <i>et al.</i> , 1994

A titre d'exemple, l'infection de la lignée de cellules épithéliales humaines Caco-2 par des souches pathogènes de *Shigella flexneri*, déclenche une réponse pro-inflammatoire tandis que la pré-incubation des cellules Caco-2 avec le probiotique *L. casei* DN-114 001 diminue la réponse induite par *S. flexneri* grâce au blocage de l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Tien *et al.*, 2006). D'autre part, il a été rapporté que la bactérie probiotique *L. rhamnosus* GG (LGG) supprime l'apoptose des cellules épithéliales du côlon de souris induite par le TNF- $\alpha$  (Yan and Polk, 2002). LGG réduit également l'inflammation, par inhibition de la production des cytokines proinflammatoires, IL-8, via la voie de signalisation NF- $\kappa$ B par les cellules épithéliales intestinales Caco-2 préalablement stimulées par la bactérie probiotique (Zhang *et al.*, 2005). Toujours afin d'illustrer les effets immunomodulateurs liés aux probiotiques, la préparation probiotique commerciale VSL # 3<sup>®</sup> peut stimuler la sécrétion de mucine par des cellules épithéliales de la lignée LS 174 de côlon humain, ce qui induirait probablement un effet de remodelage de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal (Caballero-Franco *et al.*, 2007). Ces résultats montrent que certaines souches probiotiques peuvent agir directement sur l'épithélium intestinal afin de maintenir l'intégrité de la barrière épithéliale. Par ailleurs, la préparation probiotique VSL # 3<sup>®</sup> induit la maturation et l'expression *in vitro* des cytokines par les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, ou DCs), promouvant ainsi le développement des réponses immunitaires par les cellules T helper 1 (Th1), Th 2 et Th 3 (Hart *et al.*, 2004). De plus, VSL # 3<sup>®</sup> est utilisée en particulier dans le traitement de maladies inflammatoires de l'intestin, car les souches qu'elle contient stimulent la production de l'interleukine anti-inflammatoire IL-10 et la suppression des cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL-12.

Certaines bactéries probiotiques peuvent également stimuler les fonctions du système immunitaire inné, y compris les fonctions phagocytaires des neutrophiles et l'activité cytotoxique des cellules NK (Naturel killer). L'activation des neutrophiles et des cellules NK pourrait être étroitement liée à la capacité anti-infectieuse ou anti-tumorale des probiotiques. Un récent rapport de Gill *et al.*, (2006) suggère que des aliments supplémentés par la souche *L. rhamnosus* HN001 peuvent engendrer une augmentation du nombre de cellules NK chez l'homme. De plus, la consommation de lait fermenté par la souche probiotique *L. casei* Shirota améliore l'activité cytotoxique des cellules NK (Takeda *et al.*, 2006). En outre, des formules enrichies en *Bifidobacterium animalis* augmentent le niveau de sécrétion d'IgA fécaux chez les nourrissons (Bakker-Zierikzee *et al.*, 2006). Enfin, des souris alimentées avec LGG non viables présentent des taux d'IgA fécaux élevés, et les cellules de la rate de ces

souris présentent une sécrétion accrue de l'interleukine IL-6. Ces résultats suggèrent que les cellules de LGG non viables peuvent augmenter la réponse immune systémique et muqueuse, favorisant ainsi la sécrétion d'IgA à la surface des muqueuses (He *et al.*, 2005).

### *1.2.4.2 Effets vis-à-vis de différentes pathologies du tractus intestinal*

#### *1.2.4.2.1 Effets sur les maladies intestinales inflammatoires*

Récemment des données convaincantes ont été rapportées dans la littérature quant à l'implication de certaines bactéries probiotiques dans le traitement de maladies inflammatoires intestinales. Les probiotiques agiraient principalement sur la dégradation des antigènes entériques, la normalisation de la microflore, le maintien de l'effet de barrière de l'intestin et la réduction de la sécrétion des médiateurs de la réponse immunitaire inflammatoire (Isolauri *et al.*, 2004).

L'utilisation de la souche probiotique non lactique *E. coli* Nissle 1917 (ECN), à faible dose (1,5 g/jour) présente une efficacité presque équivalente à celle de la mésalazine (anti-inflammatoire intestinal) dans le maintien de l'état de guérison de la colite ulcéreuse sur une période de plus d'un an (Kruis *et al.*, 2004 ; Sartor, 2004). Cui *et al.*, (2003) rapportent que l'administration d'une combinaison de trois espèces de *Bifidobacterium*, pendant 2 mois à des patients atteints de colite, engendre un effet bien supérieur à celui d'un placebo (rechute de 20% contre 93% avec le placebo,  $p < 0,01$ ) dans le maintien de la rémission induite par la sulfasalazine. Par ailleurs, les niveaux tissulaires de NF-kB, IL-1 et du facteur de nécrose tumorale (TNF) étaient plus bas après la thérapie probiotique, et le taux d'IL-10 était augmenté par rapport aux valeurs observées dans le lot placebo.

La remarquable capacité du produit VSL #3<sup>®</sup> à prévenir la récurrence de pouchite chronique a contribué à crédibiliser l'utilisation des probiotiques dans le traitement de maladies inflammatoires intestinales. Dix-sept patients sur 20 soit 85%, recevant VSL #3<sup>®</sup> (6 g/jour pendant un an) en combinaison avec une antibiothérapie (métronidazole + ciprofloxacine) présentent le maintien de la rémission de pouchite récurrente ou réfractaire comparativement à seulement 1 patient sur 16 (6%) dans le groupe traité par un placebo ( $p < 0,001$ ) (Mimura *et al.*, 2004). De plus, de récentes études cliniques ont montré que l'administration de VSL # 3<sup>®</sup> à des patients atteints de pouchite augmente de manière significative le nombre de cellules T régulatrices au niveau des muqueuses, ce qui indique un potentiel bénéfique immuno-régulateur des souches de probiotiques dans le cas de cette maladie (Pronio *et al.*, 2008). De plus, Gosselink *et al.*, (2004), obtiennent une réduction de

l'épisode de risque de pouchite de 29 à 7% après 3 ans de traitement de patients avec *L. rhamnosus* GG (LGG).

Chez les patients atteints de la maladie de Crohn, la réponse immunitaire à des signaux de la bactérie commensale *E. coli* ATCC 35345 et du probiotique *L. casei* DN-114 001, a été étudiée. La souche *L. casei* peut contrecarrer les effets pro-inflammatoires de la bactérie *E. coli*, par diminution du taux de médiateurs proinflammatoires clés (Llopis *et al.*, 2009). En outre, les capacités immuno-régulatrices de probiotiques tel que LGG ont été étudiées dans le contexte de la maladie de Crohn pédiatrique (Bousvaros *et al.*, 2005). Par ailleurs, le traitement d'enfants atteints de maladie de Crohn, par la souche de *L. reuteri* ATCC PTA 6475, a supprimé la transcription de cytokines proinflammatoires tel que le TNF, en inhibant l'activation du facteur de transcription AP-1 (Lin *et al.*, 2008). Auparavant, Campieri *et al.*, (2000) ont rapporté que la combinaison du produit probiotique VSL #3<sup>®</sup> (à 6 g/jour) avec l'antiflamatoire mesalazine (4 g/jour), lors d'un traitement d'un lot de 40 patients, a abaissé à 10% la récurrence postopératoire de la maladie de Crohn. A titre comparatif, la récurrence est abaissée à 40% chez les patients traités seulement avec les antibiotiques. Toutefois les effets bénéfiques sur la santé ne sont pas toujours observés, par exemple un traitement par *L. rhamnosus* GG ne réduit pas de manière significative, par rapport au placebo, la prévention de la rechute post-opératoire étudiée sur un lot de 45 adultes atteints de la maladie de Crohn (Prantera *et al.*, 2002). Les mêmes observations sont faites lors d'études sur le maintien de la rémission durant six mois pour des patients atteints de maladie de Crohn active ou modérée (Schultz *et al.*, 2004). Plus récemment, Marteau *et al.*, (2006) ont signalé que l'utilisation de la souche *L. johnsonii* LA1 lors d'un essai contrôlé randomisé chez 98 patients ayant subi une opération chirurgicale de la maladie de Crohn, engendre une légère diminution de la récurrence dans le groupe traité avec LA1 mais les résultats sont toutefois statistiquement non significatifs (49% contre 64% chez le placebo). Ainsi, les effets thérapeutiques de probiotiques vis-à-vis de la maladie de Crohn ne sont pas cliniquement étayés. Des essais cliniques randomisés sont encore nécessaires pour définir plus précisément le rôle des probiotiques en tant qu'agents préventifs et thérapeutiques dans le cas de cette pathologie. L'échec du traitement de la maladie de Crohn par des probiotiques peut être lié à un manque de compréhension du mécanisme d'action de ces probiotiques, mais également au peu d'informations disponibles sur la pathogenèse de cette maladie.

1.2.4.2.2 Effets sur le syndrome de l'intestin (côlon) irrité (SII)

Le syndrome de l'intestin irritable appelé, également le syndrome du côlon irritable, est défini comme un trouble fonctionnel de l'intestin, caractérisé par des symptômes de douleurs abdominales ou d'inconfort associés à une défécation perturbée (Drossman *et al.*, 2002). Le SII représente le désordre intestinal le plus communément diagnostiqué par les gastro-entérologues, son taux moyen de prévalence est d'environ 10% dans les pays industrialisés (Campieri *et al.*, 2000). Plusieurs causes semblent être à l'origine du SII. Il s'agit notamment de facteurs psychosociaux, d'une motilité intestinale altérée, et éventuellement d'un déséquilibre dans les neurotransmetteurs. Il existe également des preuves scientifiques suggérant que le microbiote intestinal des patients atteints du SII se distingue de celui des sujets sains. On observe notamment la fermentation anormale des résidus alimentaires, ce qui peut jouer un rôle potentiel dans l'étiologie du SII (Madden and Hunter, 2002). Par ailleurs, en s'appuyant sur les résultats d'expériences conduites sur des modèles animaux ainsi que sur des biopsies intestinales humaines, le rôle thérapeutique potentiel de probiotiques est évoqué pour le traitement de patients présentant ce syndrome. Halpern *et al.*, (1996) ont effectué une étude sur 18 patients atteints de SII. Les patients ont reçu des cellules de *L. acidophilus* non-viables pendant une période de deux fois 6 semaines, séparée par une période d'une semaine d'arrêt de traitement. Les auteurs ont observé une amélioration significative chez 50% des patients traités par la préparation probiotique. Niedzielin *et al.*, (2001) ont, quant à eux, mené une étude sur 40 patients atteints de SII. Les patients ont été traités avec des boissons fruitées contenant la souche probiotique *L. plantarum* 299v, pendant une période de 4 semaines. Les résultats ont montré une disparition des douleurs abdominales chez tous les patients traités et une amélioration de l'ensemble des symptômes de SII chez 95% des patients recevant la préparation de probiotiques contre seulement 15% chez les patients du lot placebo. Au cours d'une étude antérieure, cette même souche avait été administrée pendant 6 mois à des patients souffrant de SII (Nobaek *et al.*, 2000). Les 52 patients traités enregistraient leurs symptômes gastro-intestinaux pendant toute la période de l'étude et de nouveau 12 mois après la fin de l'étude. Les flatulences et les douleurs abdominales ont été réduites dans le lot des patients traités et l'amélioration de la fonction gastro-intestinale a persisté 12 mois plus tard après l'étude.

Hamilton-Miller, (2001) indique qu'il y a nécessité d'effectuer des études complémentaires afin de valider les effets des probiotiques sur le syndrome de l'intestin

irritable et surtout qu'il serait d'une grande importance, que de telles études incluent dans leur plan de mise en oeuvre, une période de suivi à plus long terme des patients traités.

### 1.2.4.2.3 Effets sur les diarrhées infectieuses

Plusieurs essais cliniques ont été réalisés afin d'évaluer l'efficacité des probiotiques dans la prévention et le traitement de maladies gastro-intestinales telles que les diarrhées et les allergies alimentaires. Dans la diarrhée associée aux antibiothérapies, d'importants travaux établissent l'efficacité de l'administration, par voie orale, de probiotiques pour la réduction de la durée et de la fréquence de la maladie.

Les probiotiques ont été testés pour le traitement de diarrhées provoquées par la souche pathogène *Clostridium difficile*. En effet, 10 à 20% des diarrhées associées aux antibiothérapies sont causées par cet agent pathogène. Dans une étude menée en double aveugle, Hickson *et al.*, (2007) signalent que la consommation d'une boisson contenant les souches probiotiques *L. casei*, *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* peut réduire l'incidence de la diarrhée associée aux antibiotiques et de la diarrhée associée à *C. difficile*. En outre, chez des patients âgés recevant une antibiothérapie, des probiotiques ont été utilisés pour prévenir la diarrhée associée à *C. difficile* (Plummer *et al.*, 2004). L'étude est conduite en double aveugle sur des patients recevant tous, pendant 20 jours, un traitement antibiotique associé soit à une prise complémentaire d'une préparation contenant les deux souches probiotiques *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium bifidum* soit à la prise d'un placebo. Sur la base du développement de la diarrhée, 2,9% des patients recevant les probiotiques présentent des toxines associées à *C. difficile* dans les matières fécales, contre 7,9% dans le groupe placebo de contrôle. Toujours dans le cadre des diarrhées à *C. difficile* associées au métronidazole, Wullt *et al.*, (2003) rapportent que le probiotique *L. plantarum* 299v limite la réapparition de la diarrhée. En effet, 4 patients sur un lot de 11 témoignent d'une reprise de la diarrhée contre 6 sur un lot de 9 patients ayant reçu le placebo en remplacement du probiotique. Cependant, la faible taille de l'échantillon ne permet pas de conclure formellement sur l'efficacité de *L. plantarum* dans le traitement de la récurrence de la diarrhée associée à *C. difficile*. Néanmoins, ces résultats ne font que confirmer l'intérêt de l'utilisation de probiotiques dans le traitement des désordres intestinaux.

Dans une étude récente menée sur un groupe d'enfants indiens présentant une diarrhée aiguë due à l'eau, Basu *et al.*, (2008) démontrent l'intérêt de l'utilisation du probiotique *Lactobacillus rhamnosus* GG pour traiter une telle maladie. Les patients sont randomisés

dans trois groupes, le groupe 1 contrôle, le groupe 2 recevant la solution de réhydratation et 10 unités formant colonie de LGG une fois par jour et le groupe 3 recevant la solution de réhydratation et 10 unités formant colonie de LGG deux fois par jour. La fréquence et la durée de la diarrhée ainsi que du séjour à l'hôpital ont été significativement plus faibles dans les groupes traités par rapport au groupe contrôle.

En outre, plusieurs méta-analyses ont été réalisées avec *Saccharomyces boulardii* pour évaluer leur efficacité dans la prévention de la diarrhée associée aux antibiotiques chez les adultes et les enfants. Kotowska *et al.*, (2005) ont effectué une étude sur un large échantillon d'enfants présentant une otite moyenne et/ou des infections des voies respiratoires. Les patients ont reçu un traitement antibiotique plus 250 mg de *S. boulardii* par voie orale deux fois par jour au cours de l'antibiothérapie. Les résultats ont montré une réduction de la prévalence de la diarrhée dans le groupe traité par rapport au placebo (8% contre 23%). Toutefois une étude menée par Szymański *et al.*, (2008), en double aveugle chez des enfants recevant des traitements antibiotiques standards associés à un complément alimentaire contenant 10<sup>8</sup> UFC de *Bifidobacterium longum* PL03, *L. rhamnosus* KL535A et *L. plantarum* PL02 deux fois par jour pendant la durée du traitement antibiotique, fait état de taux de diarrhées similaires dans le lot de patients recevant les probiotiques et dans ceux recevant le placebo. Néanmoins, les 3 combinaisons de probiotiques ont réduit la fréquence des selles.

Les effets bénéfiques exercés par tout ces probiotiques sur la santé de l'hôte dépendent entre autres de la capacité de tels microorganismes à interagir avec les constituants de la paroi intestinale. L'adhésion à la muqueuse intestinale permet d'augmenter leur temps de séjour et et donc de faciliter la colonisation de l'écosystème intestinal pour y exercer ainsi l'ensemble de leurs effets bénéfiques de manière durable. En conséquence, nous consacrerons dans la partie suivante de l'exposé bibliographique, une large part à l'interaction bactérie probiotique/hôte et notamment à l'adhésion sur les constituants de la paroi intestinale.

## 2 Les mécanismes d'adhésion des probiotiques

### 2.1 Généralités

L'adhésion est une action qui se caractérise par l'ensemble des phénomènes physico-chimiques et biologiques permettant à une bactérie de s'unir à une surface de façon durable (Quirynen and Bollen, 1995). Elle dépend de :

- L'environnement (température, pH,...) ;

- L'aspect et la rugosité de la surface ;
- L'énergie libre de surface du système bactérie/substratum ;
- Le caractère hydrophile ou hydrophobe des bactéries et du substratum ;
- Les charges de surface ;
- La force ionique du milieu ;
- La présence de structures spécifiques à la surface des bactéries et du substratum.

L'adhésion des bactéries probiotiques aux constituants du tractus gastro-intestinal (le mucus, les cellules épithéliales et les protéines de la matrice extracellulaire) est l'un des critères majeurs et essentiels pour leur sélection (Savage, 1992 ; Reid, 1999). Au niveau de la muqueuse intestinale, l'adhésion des probiotiques est dépendante entre autres, du flux de matière dans la lumière intestinale, de la compétition pour les éléments nutritifs, de la disponibilité des sites d'adhésion et des propriétés physico-chimiques de surface de la paroi des probiotiques (Wadström *et al.*, 1987; Freter, 1992 ; Schillinger *et al.*, 2005).

Dans l'intestin, la capacité d'adhésion peut contribuer à la création d'un effet de barrière transitoire. Les mécanismes par lesquels les bactéries probiotiques, notamment les lactobacilles, colonisent le tractus intestinal sont actuellement peu connus et leur mode d'adhésion à l'épithélium intestinal reste controversé (Berzkorovainy *et al.*, 2001). Cette propriété d'adhésion est importante pour la bactérie probiotique, car elle freine son entraînement par les mouvements péristaltiques au niveau de l'intestin, contribuant ainsi à un accroissement de son temps de séjour, ce qui représente un avantage écologique. Ces dernières années, de nombreux tests *in vitro* et *in vivo* ont apporté des preuves pertinentes montrant que la capacité d'adhésion aux constituants de l'épithélium intestinal est biologiquement importante pour la mise en place des bactéries dans l'écosystème intestinal (Alander *et al.*, 1997 ; Johansson *et al.*, 1993).

L'adhésion bactérienne à la muqueuse intestinale est un processus complexe qui est tributaire des propriétés physico-chimiques et biologiques d'une part du probiotique et d'autre part de sa cible (Freter, 1992 ; Schillinger *et al.*, 2005). Elle dépend en partie initialement d'interactions aspécifiques réversibles puis dans une phase ultérieure d'interactions plus spécifiques et irréversibles (Busscher and Weerkamp, 1987; Mozes *et al.*, 1991). La phase initiale du processus d'adhésion résulte d'interactions faibles non spécifiques dans lesquelles sont impliquées les propriétés physico-chimiques de surface de la bactérie et de sa cible, telles que l'hydrophobie/hydrophilie, la charge électrique et le caractère acide-base de Lewis (Van Loosdrecht *et al.*, 1987b, Van Oss *et al.*, 1996 ; Poortinga *et al.*, 2002). Cette étape initiale permet un rapprochement des bactéries de leur cible, qui sera suivi d'une interaction plus

spécifique entre des facteurs associés à la paroi bactérienne appelés adhésines et des récepteurs complémentaires présents sur les cibles. Ces adhésines peuvent être des protéines de la surface bactérienne parmi lesquelles on trouve les lectines qui présentent des domaines de reconnaissance de motifs mono- ou oligosaccharidiques (Adlerberth *et al.*, 1996), des protéines de la couche S ou "S-layer proteins", des protéines d'adhésion spécifique au mucus ou aux constituants de la matrice extracellulaire et des hémagglutinines (Frece *et al.*, 2005 ; Satoh *et al.*, 1999; Roos and Jonsson, 2002 ; Bernet *et al.*, 1994; Greene et Klaenhammer 1994 ; Andreu *et al.*, 1995). Il existe également des adhésines non protéiques tels que les acides teichoïques, ou lipoteichoïques et les polysaccharides (Granato *et al.*, 1999; Vidal *et al.*, 2002).

### 2.2 Les facteurs de l'adhésion

La connaissance des facteurs de l'adhésion, au sein desquels nous regroupons les propriétés physico-chimiques de la surface bactérienne ainsi que les constituants moléculaires de la paroi impliqués dans le processus d'adhésion est indispensable pour comprendre ce dernier.

#### 2.2.1 Propriétés physico-chimiques de surface et interaction probiotique/hôte

Les interactions non spécifiques mises en jeu lors de l'étape initiale d'adhésion dépendent des propriétés physico-chimiques de surface de la bactérie et de la surface cible. Ces interactions non covalentes comprennent les interactions électrostatiques (EL), de van der Waals (LW) et les interactions acide-base de Lewis (AB) (donneur électron/accepteur électron). Elles dépendent principalement de la nature des structures présentes sur les surfaces qui vont entrer en contact, de la conformation des macromolécules sur ces surfaces mais également de facteurs micro-environnementaux tels que le pH, la température, la force ionique du milieu...etc.

##### 2.2.1.1 Interactions de lifshitz-van der Waals (LW)

Ce sont des forces retenant ensemble les molécules et les atomes de deux corps et qui dépendent des attractions reliant les atomes et les molécules lorsqu'ils se rapprochent. Les forces de van der Waals sont en général de faible intensité, elles diminuent rapidement avec la distance. Ces forces résultent de l'interaction entre les électrons d'une molécule et les charges d'une autre. Lorsque la bactérie est à une distance comprise entre 50 et 20 nm du substratum,

elle est uniquement soumise aux interactions attractives de Van der Waals. Pour éviter l'interpénétration des nuages électroniques des deux molécules, des forces de répulsion électrostatiques entrent en jeu.

L'énergie d'interaction liée aux forces de van der Waals issues des corps microbiens (1), du support (2) et du liquide (3) entrant en contact lors du phénomène d'adhésion (Jacobs *et al.*, 2007) est calculée par l'équation de Dupé :

$$\Delta G_{1,2,3}^{LW} = -2 \left[ \left( \sqrt{\gamma_3^{LW}} - \sqrt{\gamma_2^{LW}} \right) \left( \sqrt{\gamma_3^{LW}} - \sqrt{\gamma_1^{LW}} \right) \right]$$

$\gamma_1^{LW}$ ,  $\gamma_2^{LW}$ ,  $\gamma_3^{LW}$  : tensions interfaciales des cellules microbiennes, du support et du liquide respectivement.

Les interactions de van der Waals vont être répulsives dans le cas d'une énergie libre  $\Delta G_{1,2,3}^{LW}$  positive, pour  $\gamma_1^{LW} < \gamma_3^{LW} < \gamma_2^{LW}$ , et attractives lorsque  $\Delta G_{1,2,3}^{LW}$  est négative.

### 2.2.1.2 Les interactions électrostatiques (EL)

Les interactions électrostatiques intervenant entre la surface du microorganisme et la surface réceptrice sont dues au recouvrement de la double couche ionique associée aux groupements chargés présents à la surface des deux corps (Rutter and Vincent, 1984). Ces interactions interviennent en général lorsque la bactérie est à une distance inférieure à 20 nm du substratum. Lorsque la surface de la bactérie, chargée négativement arrive en contact avec la surface du substratum, chargée également négativement, il se produit des interactions électrostatiques répulsives dues au chevauchement des deux couches superficielles chargées.

L'énergie libre due aux interactions électrostatiques ( $\Delta G^{EL}$ ) entre une sphère de rayon R et une surface plane, peut être obtenue par la relation suivante (Visser, 1976) :

$$\Delta G^{EL} = R\Psi_0^2 \epsilon \ln (1 + \exp (-\kappa \perp))$$

Où  $\perp$  est la distance mesurée à partir du bord extérieur de la sphère ;  $\Psi_0$ , le potentiel de surface ;  $\epsilon$ , la constante diélectrique du milieu liquide et  $1/\kappa$ , la longueur de Debye.

Le potentiel  $\Psi_0$  (ou potentiel de surface de la particule) n'est pas directement mesurable, mais on peut le déterminer via la mesure du potentiel zêta ( $\zeta$ ) (potentiel électrocinétique) par les méthodes de micro-électrophorèse.

Par la relation  $\Psi_0 = \zeta(1 + z/a)\exp(\kappa z)$

où  $1/\kappa$  : la longueur de Debye (épaisseur de la couche ionique diffuse) ;  
 $z$  : distance entre la surface de la particule et la surface de friction ;  
 $\varepsilon$  : la constante diélectrique du milieu liquide ;  
 $a$  : le rayon de la particule

$\Delta G^{EL}$  étant fonction de la grandeur  $1/\kappa$ , cette énergie d'interaction diminue progressivement avec une augmentation de la force ionique du liquide de suspension. De plus, en considérant la première relation, il est à noter que  $\Delta G^{EL}$  diminue exponentiellement avec la distance de séparation entre les deux corps.

En dessous de 20 nm, lorsque la bactérie franchit la barrière énergétique répulsive due aux forces électrostatiques, elle se trouve à une distance de l'ordre du nanomètre, où apparaissent les interactions de courtes distances telles que les interactions acide-base de Lewis ou les interactions hydrophobes.

### 2.2.1.3 Les interactions acide-base de Lewis (AB)

Les interactions acide-base de Lewis (accepteur / donneur d'électrons) permettent la formation de liaisons hydrogène (interactions de Lewis). Ce sont des interactions électrostatiques fortes, de courte distance, et possibles lorsqu'un atome d'hydrogène est en contact avec un atome électronégatif.

L'énergie d'interaction liée aux forces acido-basiques de Lewis  $\Delta G_{1,2,3}^{AB}$  des corps microbiens (1), du support (2) et du liquide (3) entrant en contact est mesurée par l'équation (Jacobs *et al.*, 2007):

$$\Delta G_{1,2,3}^{AB} = 2 \left( \sqrt{\gamma_1^+ \gamma_3^-} + \sqrt{\gamma_2^+ \gamma_3^-} + \sqrt{\gamma_1^- \gamma_3^+} + \sqrt{\gamma_2^- \gamma_3^+} - \sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+} - 2\sqrt{\gamma_3^+ \gamma_3^-} \right)$$

Où  $\gamma^+$  représente la tension de surface du paramètre accepteur d'électron et  $\gamma^-$ , la tension de surface de l'élément donneur d'électron.

Il est important de souligner qu'en fonction des valeurs  $\gamma^+$  et  $\gamma^-$  des trois corps en présence,  $\Delta G_{1,2,3}^{AB}$  peut prendre des valeurs négatives (attraction) ou positives (répulsion).

Plusieurs techniques ont été mises en œuvre afin d'évaluer les différentes propriétés de surface, telles que la microélectrophorèse pour la mesure de la charge nette (Cupersus *et al.*,

1993, 1995 ; Geertsema *et al.*, 1994), la mesure de l'angle de contact (Cupersus *et al.*, 1993 ; Reid *et al.*, 1992, 1994) ou la méthode d'adhésion microbienne au solvant ou MATS (Cupersus *et al.*, 1995 ; Reid *et al.*, 1992 ; Harty *et al.*, 1993), la spectroscopie infrarouge, et la spectroscopie à photoélectron (X-ray) (Latrache *et al.*, 1994 ; Mozes and Lortal, 1995). Les méthodes les plus communément utilisées et rapportées dans la littérature pour analyser les propriétés physico-chimiques de surface, sont la technique MATS pour l'hydrophilie/hydrophobie et la zétamétrie pour la charge nette. Ces analyses sont menées afin de corrélérer les propriétés de la surface des probiotiques et des lactobacilles en particulier avec leur capacité potentielle d'adhésion ou d'interaction avec des cibles du tractus gastro-intestinal. En dépit de plusieurs études sur l'hydrophobie et la charge de la surface bactérienne, ces aspects physico-chimiques de l'adhésion du probiotique demeurent mal compris.

### 2.2.1.4 L'hydrophobie de surface : mesure et rôle dans l'adhésion

L'hydrophobie d'une bactérie est due en grande partie à la nature des composés présents à sa surface et utiles pour l'adhésion (Rosenberg and Doyle, 1990). Pour évaluer l'hydrophobie d'une surface, deux techniques ont été développées : la mesure d'angle de contact et la mesure d'adhésion aux solvants.

La mesure de l'angle de contact entre une goutte d'eau et la surface à étudier permet une évaluation directe des propriétés hydrophobes/hydrophiles de la surface (Rosenberg and Doyle, 1990). La surface est dite hydrophobe lorsque l'angle de contact est supérieur à 50° et hydrophile quand l'angle est inférieur à 50°.

La technique MATS dérive d'une première méthode mise au point par Rosenberg *et al.*, (1980) qui utilisaient uniquement l'adhésion à l'hexadécane. Bellon-Fontaine *et al.*, (1996) et Lee and Yii, (1996) ont alors développé cette technique en utilisant trois solvants l'hexadécane (solvant apolaire), le chloroforme (solvant polaire acide, accepteur d'électrons) et l'acétate d'éthyle (solvant basique, donneur d'électrons). L'hydrophobie/hydrophilie des cellules bactériennes est estimée sur la base de leur partition entre une phase aqueuse dans laquelle elles sont initialement mises en suspension et une phase apolaire d'hexadécane. L'acidité/basicité ou capacité à développer des interactions acide-base de Lewis est évaluée après séparation des bactéries entre une phase aqueuse et une phase organique à caractère acide tel que le chloroforme ou bien basique tel que l'acétate d'éthyle. La méthode MATS consiste à mettre en contact avec le solvant organique, une suspension bactérienne en milieu

aqueux de densité optique ( $DO_{600nm}$ ) initiale connue. Après une agitation vigoureuse, des microgouttelettes de solvants se forment, sur lesquelles les bactéries s'adsorbent, plus au moins selon leurs propriétés de surface. Après repos et séparation des différentes phases, la mesure de la DO de la phase aqueuse est effectuée. La capacité d'adhésion de la bactérie au solvant est exprimée en pourcentage (%) d'après la relation suivante :

$$\frac{DO_{600} \text{ (phase aqueuse de départ)} - DO_{600} \text{ (phase aqueuse après mélange)}}{DO_{600} \text{ (phase aqueuse de départ)}} \times 100$$

D'après les études de Lee and Yui, (1996), il est admis qu'une bactérie est hydrophobe lorsque le pourcentage d'adhésion à l'hexadécane est supérieur à 50%, hydrophile quand ce pourcentage est inférieur à 20% et moyennement hydrophobe si le pourcentage est compris entre ces deux valeurs.

Les propriétés de surface des bactéries du genre *Lactobacillus* sont dépendantes de l'espèce. La souche *L. casei* présente un caractère hydrophile, les travaux de Pelletier *et al.*, (1997) effectués sur 8 espèces et sous espèces de la bactérie mettent en évidence une plus forte adhésion de *L. casei* au solvant chloroforme comparativement à celle mesurée sur l'hexadécane. Cette observation témoigne du caractère basique, donneur d'électrons de la surface de *L. casei* et par conséquent de l'aptitude de la bactérie à contracter principalement des interactions de type acide/base de Lewis avec les surfaces cibles. Très récemment, Muñoz-Provencio *et al.*, (2009) dans une étude réalisée sur des souches de *L. casei* issues de fromages et de probiotiques commercialisés, confirment seulement partiellement les observations du groupe de Pelletier. En effet, les sous-espèces de *L. casei* mises en œuvre dans l'étude présentent une variabilité importante de leurs propriétés de surface : 4 sous espèces sur 12 sont fortement hydrophobes avec des pourcentages d'adhésion à l'hexadécane de plus de 60% (BL23, BL90, BL193, BL212), et 3 autres sous espèces sont quant à elles hydrophiles (BL83, BL208, BL229) avec des pourcentages d'adhésion à l'hexadécane inférieurs à 10%. Ces résultats rendent compte de la variabilité de ces propriétés de surface au sein d'une même espèce.

Plusieurs études visant à établir une corrélation entre certaines propriétés de surface de lactobacilles telles que l'hydrophobie et la capacité de ce genre bactérien à adhérer à différents substratum ont été mises en œuvre (Ehrmann *et al.*, 2002). Wadström *et al.*, (1987) constatent que des souches de *Lactobacillus* possèdent une importante hydrophobie de surface, adhèrent fortement à des enterocytes d'intestin de porc. Toutefois des observations

contradictoires sont rapportées par Vinderola *et al.*, (2004) sur un modèle de fragments d'intestin grêle et de côlon de rat. Muñoz-Provencio *et al.*, (2009) constatent que la capacité d'adhésion de *L. casei*, à des fragments de côlon humain ainsi qu'aux protéines de la matrice extracellulaire, des différentes sous espèces testées, peut être importante aussi bien pour les bactéries à caractère hydrophobe que pour d'autres présentant une surface hydrophile. D'autres travaux consacrés à l'étude de l'adhésion, sur des cellules intestinales de la lignée Caco-2, de lactobacilles ainsi que d'une souche non lactique d'*Enterococcus mundtii* ST4SA indiquent qu'il est impossible d'établir une corrélation entre l'hydrophobie de surface et l'aptitude de la bactérie à se lier aux cellules épithéliales intestinales (Botes *et al.*, 2008). Les souches *E. mundtii* ST4SA faiblement hydrophobes et la souche de *L. plantarum* 423 possédant une l'hydrophobie de plus de 50%, adhèrent toutes de manière significative aux cellules Caco-2. Tous ces constats récents sont corroborés par les études antérieures de Savage, (1992), et Schillinger *et al.*, (2005). L'ensemble de ces auteurs conclut sur l'impossibilité d'établir une relation directe entre une propriété donnée de la surface bactérienne et la capacité du microorganisme à s'adsorber sur des cibles du tractus gastrointestinal tels que le mucus ou une lignée de cellules épithéliales.

Il est toutefois important de noter que les divergences rapportées entre les différentes études peuvent être la conséquence d'un manque d'homogénéité des techniques mises en œuvre pour mesurer les propriétés de surface des bactéries étudiées. En guise de conclusion, il semble que dans la relation entre l'hydrophobie/hydrophilie de la surface du probiotique et l'aptitude de ce dernier à interagir avec sa cible, il est difficile d'établir une règle générale. Dans ce domaine, la prudence sera de mise et nécessitera une étude particulière pour chaque bactérie probiotique testée.

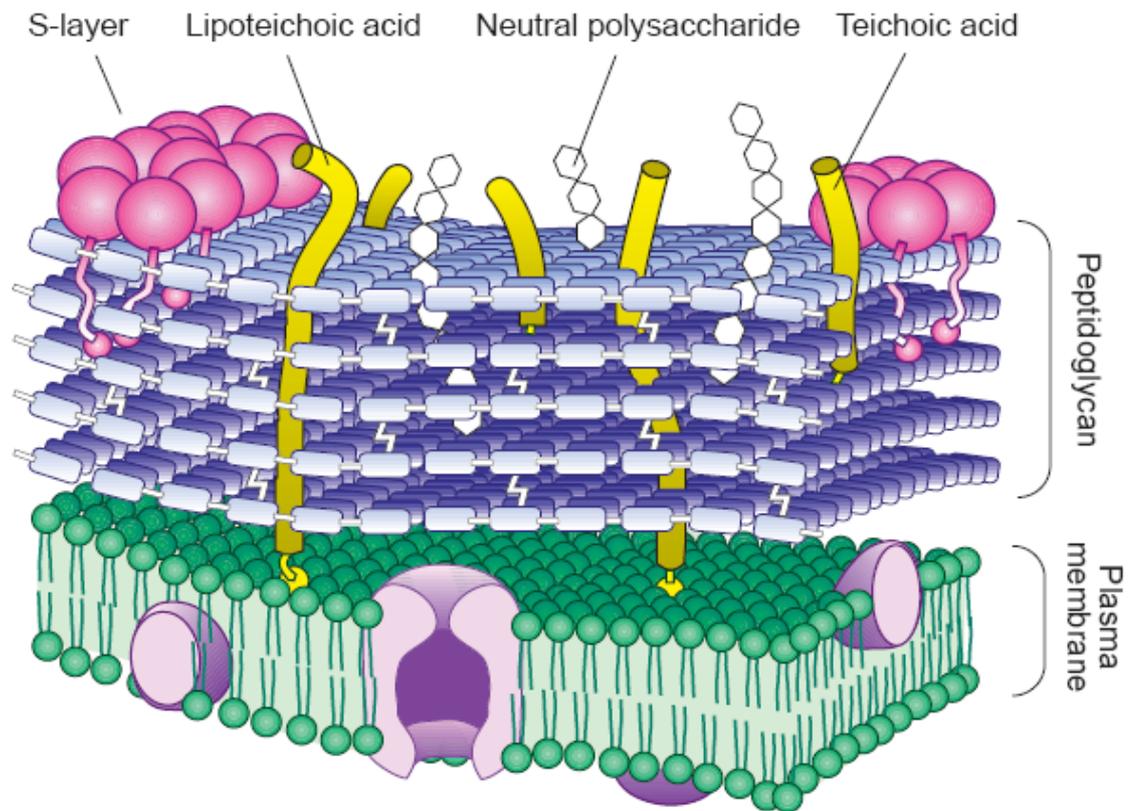
### 2.2.1.5 Charge nette de surface : mesure et rôle dans l'adhésion

L'évaluation de la charge nette de surface des cellules bactériennes a suscité l'intérêt des bactériologistes dès le début du 20<sup>ème</sup> siècle. Il en découle une variété de méthodes pour quantifier cette propriété. Parmi ces méthodes, la microélectrophorèse est la plus utilisée, elle implique la mise en place d'une suspension bactérienne dans une cellule d'électrophorèse, l'application d'une tension électrique constante aux bornes de la cellule, puis une observation directe en microscopie optique du mouvement des bactéries sous l'effet du champ électrique appliqué et enfin le calcul de leur mobilité électrophorétique (Moyer, 1936; Brinton and Lauffer, 1959). La mobilité électrophorétique (ME) peut être par la suite convertie en

potentiel zêta à l'aide de l'équation de Smoluchowski (Hiemenz, 1977),  $(\zeta) = \mu \times [\eta/\epsilon]$  où  $\zeta$ , représente le potentiel zêta,  $\mu$  : la mobilité électrophorétique,  $\eta$  : la viscosité de la solution et  $\epsilon$  la constante diélectrique du milieu. Le potentiel zêta est défini comme la différence de potentiel entre la surface de la bactérie et le milieu environnant. Il est déterminé par la nature et le nombre de groupements protonables tels que les groupes phosphate, carboxyle et aminé des composés présents à la surface des bactéries (Hancock, 1991). Il dépend également du pH et de la force ionique de la suspension cellulaire. La ME et par conséquent le potentiel zêta sont dépendants du genre et de l'espèce bactérienne dans des conditions expérimentales données et contrôlées. Le sens et la vitesse de déplacement des cellules sont fortement tributaires de paramètres expérimentaux tels que la force ionique, la température et le pH du milieu, ainsi que de la force et de l'intensité du champ électrique appliqué. La paroi bactérienne des lactobacilles présente une charge électrique globale relativement négative à pH physiologique, et plus on tend vers les pH acides plus on se rapproche du point isoélectrique de la bactérie, valeur de pH à laquelle sa mobilité électrophorétique est nulle. Une charge nette faiblement négative semble favoriser l'adhésion sur plusieurs surfaces cibles (Giaouris *et al.*, 2009). Cependant, très peu de travaux ont été rapportés dans la littérature, concernant la relation entre la charge électrique globale de surface et la capacité d'adhésion des lactobacilles.

### 2.2.2 Entités moléculaires de surface et interactions probiotiques/hôte

La capacité d'interaction des cellules bactériennes avec les divers constituants de la muqueuse intestinale est un critère de sélection des microorganismes probiotiques ainsi que nous l'avons évoqué précédemment. Généralement, l'adhésion du probiotique à sa cible est considérée comme un mécanisme complexe mais nécessaire à la colonisation du tractus par la bactérie. L'adhésion des bactéries lactiques probiotiques aux cellules intestinales peut contribuer à l'exclusion de pathogènes entraînant de ce fait un effet bénéfique pour la santé de l'hôte. Après le processus d'adhésion aspécifique mettant en jeu des forces attractives de Van der Waals, des interactions électrostatiques et hydrophobes, certains lactobacilles probiotiques mettent en place un mode d'attachement plus stable et plus spécifique, dû à la présence au niveau de leur paroi, d'entités moléculaires présentant une affinité pour certains des constituants de la cible. Parmi les structures moléculaires de la surface de la paroi, impliquées dans l'adhésion, on trouve des protéines, des acides lipotéichoïques, des lipides (Nousiainen



**Figure 1.5 :** Représentation schématique de la paroi des bactéries Gram positif. La bicouche lipidique de la membrane plasmique est couverte par une multicouche de peptidoglycane, traversée par des polysaccharides neutres, des acides lipoteichoïques et acides teichoïques, puis entourée par une enveloppe extérieure de protéines de la couche S (d'après Delcour *et al.*, 1999).

and Setälä, 1998) ou des appendices externes (lectines) et (ou) des polymères extracellulaires tels que les polysaccharides (Busscher and Weerkamp, 1987).

### 2.2.2.1 Rappels sur la structure de la paroi des lactobacilles

L'enveloppe des cellules bactériennes Gram positif tels que les lactobacilles, est constituée d'une membrane cytoplasmique recouverte d'une couche épaisse de peptidoglycane (PG) de 30 nm d'épaisseur environ, bien que cette dernière puisse varier en fonction des conditions de croissance (Rogers, 1984). Accessoirement, le peptidoglycane est entouré d'une couche secondaire de polymères tels que des polysaccharides (**Figure I.5**). Le peptidoglycane forme un exosquelette qui contribue au maintien de la forme des cellules et lui confère sa résistance mécanique et notamment sa capacité à résister aux variations de pression osmotique du milieu externe. Le réseau de PG est constitué de chaînes d'unités répétitives de disaccharides d'acides N-acétylglucosamine-( $\beta$ 1-4)-N-acétylmuramique (GlcNAc-MurNAc). Ces chaînes polysaccharidiques sont réticulées par de courts ponts pentapeptidiques (L-alanine-D-glutamate-L-lysine-D-alanine-D-alanine). Toutefois, la composition de cette partie peptidique peut varier entre les espèces bactériennes. Notamment chez certaines souches de *Lactobacillus* tels *L. plantarum* et *L. casei*, le résidu D-alanine terminal peut être substitué par un résidu D-lactate (Ferain *et al.*, 1996 ; Handwerger *et al.*, 1994). Le PG forme un immense réseau macromoléculaire entourant complètement la cellule bactérienne (Navarre and Schneewind, 1999 ; Ton-that *et al.*, 2004). Ce réseau de peptidoglycane est recouvert ou traversé à certains endroits par trois types de structures : des acides teichoïques et lipoteichoïques, des polysaccharides (Schäffer and Messner, 2005) et des protéines.

Les acides téichoïques sont généralement constitués de résidus de glycérophosphate, ribitol-phosphate ou glucosyl-phosphate polymérisés et assemblés par des liaisons phosphodiester (**Figure I.10**, section 2.2.2.4.2.1). Les acides teichoïques sont liés covalamment au PG (acides téichoïques proprement dits), alors que les acides lipotéichoïques sont ancrés à la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire de motifs lipidiques (Schär-Zammaretti and Ubbink, 2003) et sont le plus souvent composés de polymères de glycérol-phosphate substitués par des groupements D-Ala et des hexoses tels que le glucose ou le galactose. De par leur structure, les acides téichoïques ou lipotéichoïques peuvent constituer une réserve de phosphate pour la bactérie (Grant, 1979). En tant que polymères anioniques, ils peuvent piéger des cations nécessaires à la croissance de la bactérie tels que le  $Mg^{2+}$  (Hughes *et al.*, 1970 ; Lambert *et al.*, 1975). Certaines de ces structures non-protéiques peuvent

intervenir dans la relation lactobacilles/hôte (Granato *et al.*, 1999). Outre ces polymères constitutifs de l'enveloppe bactérienne, des protéines sont associées à la paroi du microorganisme. Celles-ci peuvent être subdivisées en sous familles sur la base de leur mode d'ancrage aux divers constituants de l'enveloppe bactérienne.

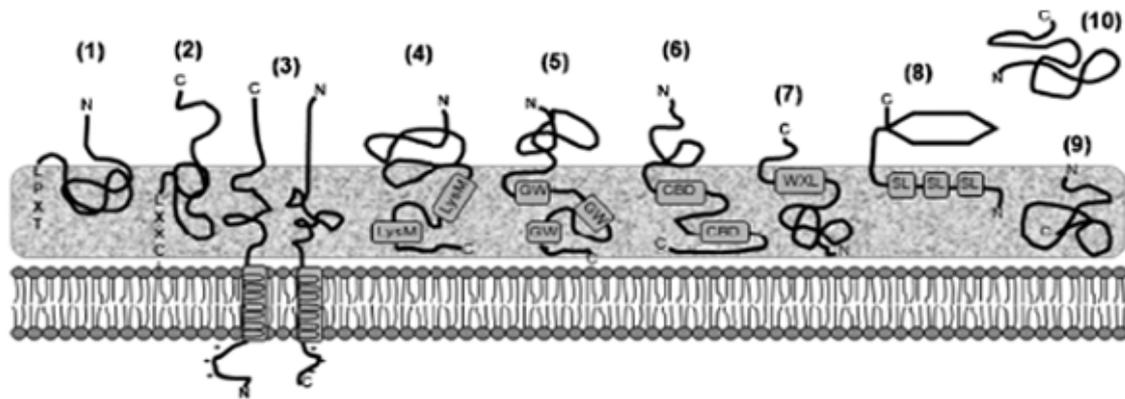
Avant de faire un état des lieux bibliographique des protéines de surface impliquées dans l'adhésion des lactobacilles aux constituants de la paroi intestinale, nous allons nous attacher à décrire chaque sous famille protéique exportée à la surface des *Lactobacillus* (Sanchez *et al.*, 2008).

### 2.2.2.2 Les constituants protéiques de la paroi

En règle générale, les protéines exportées à la surface bactérienne possèdent un peptide signal qui les orientent vers les voies d'exportation et permet ainsi leur migration vers la surface. Certaines de ces protéines contiennent dans leur structure un ou plusieurs domaines, qui sont nécessaires à leur ancrage à la paroi cellulaire ou à la membrane cytoplasmique. Dans le cas d'absence de motif d'ancrage, ces protéines seront sécrétées dans le milieu extérieur. Par conséquent, les protéines exportées à la surface bactérienne peuvent être associées soit à la membrane cytoplasmique soit à la paroi cellulaire ou enfin sécrétées dans le milieu environnant. Récemment, une autre sous famille de protéines liées à la paroi bactérienne a été identifiée. Ces dernières ne possèdent ni peptide signal ni motif d'ancrage à la paroi qui permettrait de justifier leur présence à la surface bactérienne. Elles sont nommées "anchorless proteins" ou encore "moonlighting proteins", et sont majoritairement des protéines intracellulaires impliquées dans les voies métaboliques des glucides ou des protéines. Leur rôle dans l'interaction bactérie/hôte a été largement rapporté. **La Figure I.6** présente de manière schématique les différentes sous familles de protéines exportées à la surface d'une bactérie Gram positif tel que *Lactobacillus*.

#### 2.2.2.2.1 *Protéines fortement associées à la paroi bactérienne*

Les protéines de surface fortement associées à la paroi bactérienne peuvent être scindées en deux catégories : les protéines liées de manière covalente (ex. protéines LPXTG et lipoprotéines) et les protéines associées de façon non-covalente. Les mieux identifiées des protéines de surface sont celles qui possèdent un motif LPXTG dans la partie C-terminale de leur séquence en acides aminés. Ce motif est reconnu par des enzymes de type sortases, ou des peptidases de surface qui catalysent la réaction de clivage entre la thréonine et la glycine



**Figure 1.6:** Les différentes sous familles de protéines exportées chez les bactéries probiotiques du genre *Lactobacillus*. **1:** Protéines ancrées à la paroi avec un motif LPXTG, **2:** Lipoprotéines ; **3:** Protéines avec un domaine N-terminal ou C-terminal en hélice transmembranaire ; **4:** LysM protéines, liées au résidu Lys du peptidoglycane ; **5:** GW protéines ; **6:** Protéines présentant un domaine choline-binding ; **7:** WXL protéines ; **8:** Protéines de la couche S ; **9:** "Anchorless proteins" ou protéines sans peptide signal ni motif d'ancrage à la paroi et **10:** Protéines sécrétées (Sanchez *et al.*, 2008).

(T-G) du motif LPXTG, créant ainsi une liaison covalente entre la protéine et le peptidoglycane (Navarre and Schneewind, 1999). Une autre famille de protéines liées de manière covalente à la paroi est constituée par les lipoprotéines. Celles-ci sont associées à la fois à la paroi et à la membrane plasmique par un motif "lipobox" ou LXXC au niveau N-terminal de leur séquence en acides aminés. Ce motif permet leur ancrage covalent à la bicouche lipidique de la membrane cytoplasmique (Sutcliffe and Harrington, 2002). Les lipoprotéines sont généralement des protéines de transport des éléments nutritifs.

Outres les protéines LPXTG et les lipoprotéines, il existe des protéines associées à la paroi bactérienne de manière non-covalente. Parmi celles-ci, on trouve des protéines avec des domaines N- ou C- terminaux transmembranaires, constitués d'acides aminés hydrophobes, favorisant l'interaction avec la membrane cytoplasmique (Bath *et al.*, 2005), ainsi que des protéines avec un domaine LysM. Ce dernier est constitué d'environ 40 résidus d'acides aminés et se trouve dans une variété d'enzymes impliquées dans la dégradation de la paroi bactérienne et possède généralement un domaine de fixation au peptidoglycane. A titre d'exemple ce motif a été proposé comme un moyen d'ancrage de l'autolysine AcmA de *Lactococcus lactis* à la paroi de ce dernier (Steen *et al.*, 2003). D'autres protéines présentant des motifs de liaison à la paroi de type glycine-tryptophane (GW) sont identifiées chez de nombreuses bactéries des genres *Listeria* et *Streptococcus* (Yother and White, 1994; Cabanes *et al.*, 2002) mais peu rapportées chez *Lactobacillus*.

#### **2.2.2.2 Protéines de la couche S**

Les protéines de la couche S ou "S-layer proteins" (SLp) forment une catégorie spéciale de protéines associées à la paroi de manière non-covalente. Elles sont constituées d'une sous unité protéique unique d'une masse moléculaire allant de 40 à 200 kDa, qui s'associent entre elles pour former des feuillets en structure bidimensionnelle et paracrystalline (Sleytr *et al.*, 1993). Les "S-layers proteins" s'organisent à la surface des cellules bactériennes de façon à former une couche qui peut avoir une fonction de protection pour le microorganisme. Les protéines de la couche S se lient de manière non covalente à la paroi bactérienne et peuvent être ainsi dissociées par des agents altérant les liaisons hydrogène ainsi que par des agents chaotropiques comme le chlorure de lithium et le chlorure de guanidine (Pum and Sleytr, 1999 ; Sleytr and Beveridge, 1999). Chez certaines bactéries probiotiques, les protéines de la couche S présentent un ou plusieurs domaines N-terminaux (appelés "S layer domains" ou SL), responsables de l'adhésion à d'autres constituants de la

paroi tels que les acides teichoïques/lipotéichoïques, ou les polysaccharides (Mesnage *et al.*, 2000). Il arrive qu'aucun domaine SL ne soit détecté au niveau de la protéine de la couche S, dans ce cas, des régions N- ou C- terminales de la séquence joueraient le rôle de domaine de fixation à la paroi (Ävall-Jääskeläinen and Palva, 2005).

Les protéines de la couche S sont fréquemment rencontrées chez les lactobacilles du groupe *L. acidophilus* (*L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus* et *L. gallinarum*), mais elles sont absentes chez *L. gasseri* et *L. johnsonii* (Masuda and Kawata, 1983). Les séquences de gènes codant pour ces protéines chez les souches de *L. brevis* (Vidgrén *et al.*, 1992), *L. acidophilus* (Boot *et al.*, 1993, 1995), *L. crispatus* (Ventura *et al.*, 2000) et *L. helveticus* (Callegari *et al.*, 1998 ; Ventura *et al.*, 2000) sont connues et sont déposées dans les bases de données GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA).

#### **2.2.2.2.3 Les protéines sécrétées**

Ces protéines sont exportées à la surface bactérienne car elles possèdent un peptide signal. Toutefois, du fait de l'absence de motif d'ancrage à la paroi dans leur structure, elles sont complètement excrétées dans le milieu environnant. Chez des bactéries lactiques probiotiques, deux types de système de sécrétion ont été identifiés : (i) un système de sécrétion ATP-dépendant (ou ATP-dependent General Secretary Pathway, GSP) et (ii) un système spécifique d'exportation des protéines. Dans le système GSP, les protéines sont exportées sous forme de pré-protéines possédant des séquences signales à leur partie N-terminale. Ces pré-protéines sont transloquées au travers de canaux membranaires hydrophiles, sous un état dénaturé et par la suite le peptide signal est protéolysé et la protéine acquiert sa structure 3D native grâce à l'intervention de protéines chaperonnes (Tjalsma *et al.*, 2008; van Wely *et al.*, 2001).

Dans la deuxième voie de sécrétion, la plupart des protéines sont exportées à la surface avec un peptide signal et sous leur état natif ou même dans certains cas sous une forme oligomérique.

#### **2.2.2.2.4 Les "anchorless proteins"**

Ces protéines constituent une classe à part parmi les protéines présentes au niveau de la paroi ou excrétées dans le milieu extracellulaire. Ces dernières ne possèdent ni peptide signal ni motif d'ancrage à la paroi, de types LPXTG, lipobox ou domaine LysM, d'où leur

appellation anglo-saxon « anchorless ou moonlighting proteins ». Ce sont majoritairement des protéines cytoplasmiques qui jouent un rôle essentiel dans la croissance et le métabolisme des microorganismes. Quand elles sont exportées à la surface de la paroi de certains pathogènes appartenant aux genres *Streptococcus*, *Staphylococcus* ou *Listeria monocytogenes*, ces protéines une fois présentes à la surface vont être, pour certaines d'entre elles, impliquées dans des phénomènes d'invasion, de virulence et d'interaction avec les constituants de la matrice extracellulaire de l'hôte (Chhatwal, 2002 ; Pancholi and Chhatwal, 2003 ; Modun and Williams, 1999 ; Schaumburg *et al.*, 2004). Chez plusieurs bactéries lactiques présentant un caractère probiotique, des "anchorless proteins" ont été récemment décrites dans la littérature. Nombre de ces protéines impliquées dans diverses voies métaboliques au niveau cytoplasmique ont été également mises en évidence à la surface de la paroi de nombreux lactobacilles tels que *L. crispatus*, *L. plantarum* et *L. johnsonii* (Hurmala *et al.*, 2007 ; Kinoshita *et al.*, 2008 ; Granato *et al.*, 2004). Elles semblent assurer une fonction dans l'interaction bactérie/hôte. Parmi les "anchorless proteins" les plus fréquemment observées, on trouve la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), l'énolase, le facteur d'élongation EF-Tu et la GroEL, protéine de la famille des chaperonnes Hsp 60.

La GAPDH et l'énolase sont des enzymes clés de la glycolyse, elles catalysent respectivement la transformation du glycérol-3-phosphate en 1, 3 bisphosphoglycérate et du 2-phosphoglycérate en phosphoénol-pyruvate. Ces enzymes ont été identifiées à la surface de la bactérie probiotique *L. crispatus* S1 ainsi que chez d'autres souches de lactobacilles, *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* et *L. lactis* (Hurmala *et al.*, 2007). Elles sont associées à la paroi sous forme de tétra et d'octamères, dont les masses moléculaires sont estimées à 148 et 340 kDa respectivement. Ces masses sont peu différentes des masses des formes cytoplasmiques ce qui confirme «l'exportation» de ces enzymes à la surface sous leur forme native et oligomérique (Antikainen *et al.*, 2007a). De plus, l'association de ces enzymes à la paroi bactérienne est décrite comme étant réversible et pH-dépendante (Antikainen *et al.*, 2007b). La GAPDH et l'énolase restent adsorbées à la surface des cellules bactériennes à pH acide (entre 4,5 et 7) puis sont relarguées dans le milieu extracellulaire à pH faiblement alcalin (>7). Les auteurs ont montré qu'à pH acide, en dessous du point isoélectrique de ces enzymes, ces dernières sont chargées positivement et pourraient ainsi interagir avec des éléments de la paroi, chargés négativement comme les acides lipotéichoïques et téichoïques, ce qui serait à l'origine de leur association à la paroi.

Dans une tentative d'identification de protéines de surface liées à la paroi du probiotique *L. johnsonii* NCC 533 (La1) et impliquées dans l'interaction de la souche avec les cellules épithéliales intestinales et avec la mucine gastrique, Granato *et al.*, (2004), démontrent la présence du facteur d'élongation EF-Tu à la surface du microorganisme. La présence d'EF-Tu, associé à la paroi de la bactérie La1, n'est pas un fait exceptionnel. Nakamura *et al.*, (1997) décrivent la protéine comme un antigène commun à de nombreux lactobacilles. Grâce à la mise en œuvre de la microscopie électronique, du western-blotting, de l'ELISA et de l'analyse par spectrométrie de masse en tandem, Granato *et al.*, (2004) ont prouvé que l'EF-Tu était exprimé à la surface de la bactérie sous une forme native. En outre, la protéine EF-Tu recombinante (rEF-Tu) est capable de se lier aux cellules épithéliales intestinales des lignées Caco-2 et HT29 ainsi qu'à la mucine intestinale humaine. Cette adhésion est plus efficace à pH 5 qu'à pH 7,2. Un constat identique avait été fait auparavant par Green and Klaenhammer, (1994) ; Granato *et al.*, (1999); Blum *et al.*, (1999) et Roos and Jonsson, (2002). Ces auteurs rapportent que l'adhésion de *L. johnsonii* La1 à la mucine est plus forte à pH 5 et que l'anchorless protéine EF-Tu peut également induire une réponse immunitaire pro-inflammatoire (Granato *et al.*, 2004).

Comme indiqué ci-dessus pour la protéine EF-Tu associée à la surface de *L. johnsonii* La1, une protéine chaperonne de type GroEL a été observée à la surface de cette même bactérie (Bergonzelli *et al.*, 2006). Bien que GroEL ne possède pas de peptide signal qui permettrait sa translocation au travers de la membrane plasmique, la présence de cette protéine à la surface de la paroi n'est pas un résultat inattendu. Cette dernière a été détectée à la surface de nombreuses autres bactéries pathogènes (Dunn *et al.*, 1997 ; Garduno *et al.*, 1998 ; Vanet and Labigne, 1998 ; Hennequin *et al.*, 2001). Cette chaperonne est un élément essentiel pour le repliement structural des protéines intracellulaires après leur synthèse. Elle est également fortement exprimée lors de stress thermiques. La protéine recombinante (rGroEL) a été exprimée chez *E. coli* et sa capacité d'adhésion aux cellules épithéliales de la lignée HT29 ainsi qu'au mucus, suggère que GroEL pourrait contribuer à l'interaction de *L. johnsonii* La1 avec les constituants de la paroi intestinale (Bergonzelli *et al.*, 2006). De même que pour le facteur EF-Tu, l'interaction est plus importante à pH acide. En outre, la protéine recombinante (rGroEL) stimule la sécrétion de l'interleukine 8 (IL-8) par les macrophages et semble aussi impliquée dans l'agrégation des cellules de la bactérie pathogène *Helicobacter pylori* (Bergonzelli *et al.*, 2006).

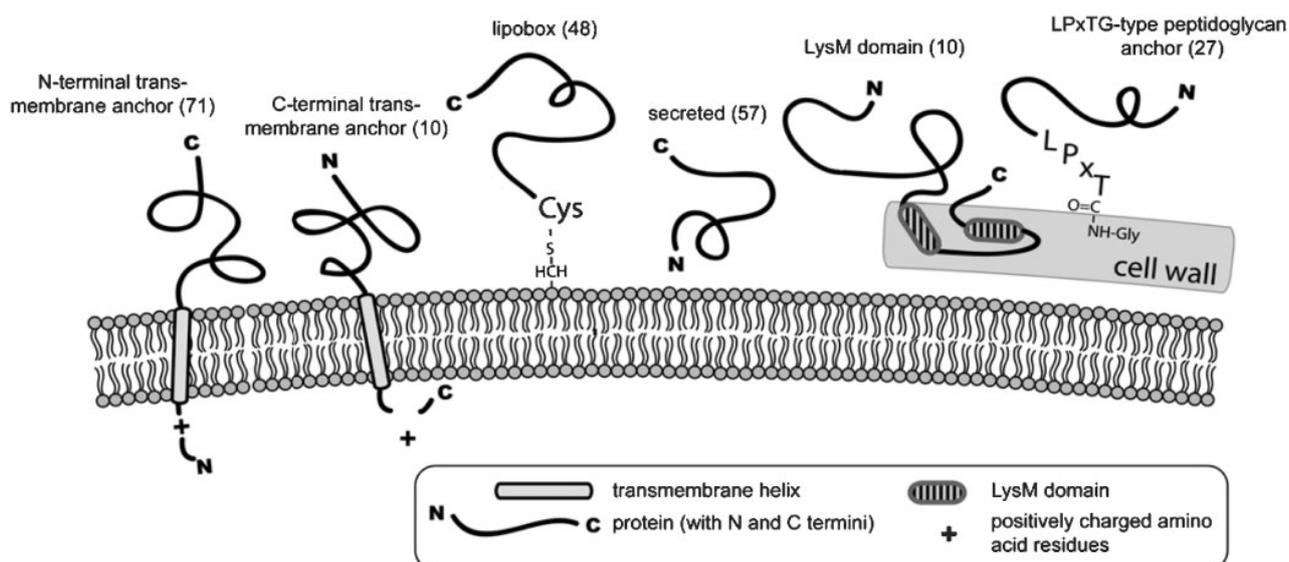
### 2.2.2.2.5 Cas particulier des protéines associées à la paroi de *L. plantarum*

En 2003, Le génome de la souche sauvage *L. plantarum* WCFS1 a été complètement séquencé par l'équipe de Kleerebezem *et al.*, (2003). En se basant sur l'analyse de ce génome, Boekhorst *et al.*, (2006a), ont effectué un travail remarquable visant à identifier toutes les protéines présentes dans le « Sécrotome » de cette espèce. Une base de données fournissant des informations sur ces protéines et leurs domaines d'ancrage à la surface bactérienne peut être consultée sur le site : <http://www.cmbi.ru.nl/secretome>.

Cette étude a révélé que le génome de *L. plantarum* coderait pour plus de 228 protéines extracellulaires, dont la majeure partie posséderait un motif ou domaine d'ancrage au niveau de la paroi ou de la membrane cytoplasmique. Parmi ces protéines, 48 portent un motif Lipobox et seraient exportées à la surface par un mécanisme de sécrétion commun. Ce motif permet leur fixation à la membrane plasmique par une liaison covalente entre le résidu Cystéine de leur séquence N-terminale d'acides aminés et un motif lipidique de la membrane plasmique (**Figure I.7**). Chez *L. plantarum* ce type d'ancrage se situe au niveau des protéines de transport membranaire ou "ABC transporters" (Boekhorst *et al.*, 2006a). En outre, d'après la séquence du génome, plusieurs protéines peuvent se fixer au peptidoglycane, parmi elles, 27 porteraient un motif LPXTG et 10 seraient associées à la paroi grâce à un domaine LysM. De plus des protéines possédant un domaine C-terminal constitué de plus de 120 résidus, désigné "WxL domain" car il contient ce motif à deux reprises, est identifié chez 19 protéines de *L. plantarum*, mais également dans certaines protéines de *Lactococcus lactis* et *Listeria*. L'ensemble des protéines du sécrétome de *L. plantarum* est représenté de manière schématique **Figure I.7**. Les protéines, dont le gène codant a permis de prévoir leur exportation à la paroi de *L. plantarum*, ont été par la suite reclassées sur la base de la fonction biologique qui leur serait associée. On distingue alors des enzymes, des transporteurs et des protéines possédant des domaines structuraux leur permettant de se lier de manière spécifique à des cibles intestinales telles que la mucine et les protéines de la matrice extracellulaire.

### 2.2.2.3 Les protéines de paroi impliquées dans l'adhésion des lactobacilles aux constituants de la muqueuse intestinale

Les facteurs d'adhésion sont généralement considérés comme des pré-requis essentiels à l'interaction de la bactérie avec son hôte. Chez les pathogènes, il a été démontré que ces facteurs d'adhésion jouent un rôle important dans le processus d'invasion et de virulence lors de l'épisode infectieux. De même pour les probiotiques, l'adhésion est d'une importance



**Figure I.7:** Les principales protéines du sécrétome de *L. plantarum*, prévisibles sur la base de l'analyse du génome (Boekhorst *et al.*, 2006a). Le nombre entre parenthèses correspond au nombre de protéines potentielles pour chaque sous famille.

capitale pour le microorganisme. Elle leur permet de séjourner plus longtemps dans le tractus intestinal et ainsi d'exercer leur effets bénéfiques pour la santé de l'hôte (Bron, 2004; Marco *et al.*, 2005).

### 2.2.2.3.1 Adhésion des lactobacilles aux cellules épithéliales

Les cellules épithéliales intestinales forment une barrière et assurent un rôle fondamental dans la communication entre l'hôte et le contenu luminal (Nagler-Anderson, 2001). Bien que de nombreuses études *in vitro* rendent compte de l'adhésion de souches de *Lactobacillus* aux cellules épithéliales intestinales, seuls quelques tests *in vivo* et *ex vivo* (c'est-à-dire sur des échantillons de biopsies) ont confirmé ces observations (Valeur *et al.*, 2004). Les principales adhésines protéiques identifiées sur la base de test, *in vitro* chez le genre *Lactobacillus* sont présentées dans le **Tableau I.4**.

Des cellules épithéliales intestinales de la lignée Caco-2, isolées à partir d'un adénocarcinome du côlon humain (Fogh *et al.*, 1977), sont communément utilisées pour des études *in vitro* d'adhésion de bactéries probiotiques. Cette lignée de cellules confluentes se différencie en une monocouche de cellules polarisées avec des membranes apicales et basolatérales séparées par des jonctions serrées (Pinto *et al.*, 1982, 1983; Simon and Fuller, 1985).

## Chapitre I: Synthèse bibliographique

**Tableau I.4** : Les principales adhésines protéiques isolées chez quelques espèces de *Lactobacillus*.

Souche de <i>Lactobacillus</i>	Adhésine	Surface ou cellule Cible	Références
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Protéine d'adhésion au mucus (Mub)	Cellules épithéliales intestinales humaines/ Mucine	Buck <i>et al.</i> , 2005
	Protéine de la couche-S A (SlpA)	Cellules épithéliales intestinales humaines	
	Protéine d'adhésion à la fibronectine (Fbp)	Cellules épithéliales intestinales humaines/ Fibronectine	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> M92		Cellules épithéliales intestinales du rat	Frece <i>et al.</i> , 2005
<i>Lactobacillus acidophilus</i> spp.	Protéine de la couche-S A (SlpA)	Cellules épithéliales intestinales du poulet	Schneitz <i>et al.</i> , 1993
	Protéine de la couche-S		
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC8287	Protéine de la couche-S A (SlpA)	Cellules épithéliales intestinales humaines/ Fibronectine	Hynönen <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus reuteri</i> 10023	Protéine de surface (Lsp)	Cellules épithéliales intestinales chez le	Walter <i>et al.</i> , 2007
<i>Lactobacillus reuteri</i> 104R	(MapA)	rat	Rojas <i>et al.</i> , 2002 ; Miyoshi <i>et al.</i> , 2006
		Cellules épithéliales intestinales humaines/ mucus gastrique du porc	
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1060	Protéine d'adhésion au mucus		Roos and Jonsson, 2002
<i>Lactobacillus reuteri</i> NCIB 11951	Protéine d'adhésion au collagène type I (Cbn)	Mucus/ mucine collagène type I	Roos <i>et al.</i> , 1996

**Tableau I.4** : (suite).

<b>Souche de <i>Lactobacillus</i></b>	<b>Adhésine</b>	<b>Surface ou cellule Cible</b>	<b>Références</b>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Protéine de la couche-S A (SlpA)	Cellules épithéliales intestinales humaines	Johnson-Henry <i>et al.</i> , 2007
<i>Lactobacillus crispatus</i> JCM 5810	Protéine de la couche-S (CbsA)	Protéine d'adhésion au collagène type I, IV, laminine	Toba <i>et al.</i> , 1995; Sillanpää <i>et al.</i> , 2000; Antikainen <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC533	Facteur d'élongation EF-Tu Protéine GroEL	Cellules épithéliales intestinales humaines/ mucine	Granato <i>et al.</i> , 2004 Bergonzelli <i>et al.</i> , 2006
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	Protéine de surface A (LspA)	Cellules épithéliales intestinales humaines	van Pijkeren <i>et al.</i> , 2006
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	Protéine de fixation au mannose (Msp)	Reconnaissance de groupements mannosides	Pretzer <i>et al.</i> , 2005
<i>Lactobacillus plantarum</i> LA 318	GAPDH	Mucine	Kinoshita <i>et al.</i> , 2008
<i>Lactobacillus plantarum</i> 423	EF-Tu, GAPDH, Triosephosphate isomerase (TPI)	Cellules épithéliales intestinales humaines	Ramiah <i>et al.</i> , 2008

La monocouche des cellules Caco-2 ressemble structurellement aux entérocytes différenciés de l'épithélium intestinal (Pinto *et al.*, 1983). Une autre lignée cellulaire est également utilisée pour ces tests d'adhésion *in vitro*, il s'agit de la lignée HT-29. Celle-ci est également isolée à partir d'adénocarcinome humain et ressemble à la lignée Caco-2 en étant toutefois moins différenciée. Enfin, une troisième lignée identifiée Int-407, isolée à partir d'intestin grêle d'embryon humain (Henle and Deinhardt, 1957) a fait l'objet d'une utilisation plus épisodique par rapport aux deux lignées précédentes.

Les travaux faisant état de l'implication d'adhésines protéiques dans l'interaction *in vitro* de bactéries probiotiques du genre *Lactobacillus* avec des lignées de cellules intestinales sont nombreux. Granato *et al.*, (2004) ont identifié une forme associée à la paroi du facteur d'élongation EF-Tu chez la souche *Lactobacillus johnsonii* NCC53 (La1). Les auteurs montrent que cette anchorless protéine participe à l'interaction de la bactérie probiotique avec des cellules épithéliales de lignée Caco-2 et HT-29. L'adhésion de *L. johnsonii* La1 aux cellules Caco-2 est pH dépendante avec un maximum à pH acide de 5.

Green and Klaenhammer, (1994) ont testé la capacité de trois *Lactobacillus* d'origine humaine à adhérer aux cellules Caco-2. Une première caractérisation biochimique des propriétés d'adhésion des isolats humains contenant *L. acidophilus* BG2FO4 et NCFM/N2 et aussi *L. gasseri* ADH, a révélé la présence de plusieurs éléments à la surface des cellules bactériennes, qui sont impliqués dans le phénomène d'adhésion aux cellules intestinales. Chez *L. acidophilus* BG2FO4 et NCFM/N2 des molécules sensibles aux protéases ont été identifiées comme facteur d'adhésion alors que la souche *L. gasseri* ADH présente des éléments de surface sensibles au métaperiodate de sodium. Ces observations permettent aux auteurs de conclure sur la présence d'adhésines de nature protéique pour les souches *L. acidophilus* BG2FO4 et NCFM/N2 et de type glucidique pour la souche *L. gasseri* ADH. Les travaux de Kapczynski *et al.*, (2000), montrent que *L. gilis* et *L. acidophilus* se lient à la marge des cellules épithéliales intestinales humaines de la lignée Int-407, au niveau de la zone de la matrice extracellulaire qui entoure ces cellules. La microscopie à fluorescence a permis de mettre en évidence que ces souches bactériennes adhèrent dans les zones de localisation de la fibronectine. De plus, l'affinité des cellules de *L. gilis* et *L. acidophilus* pour la fibronectine a été démontrée par la technique ELISA et aussi grâce à des tests d'affinité avec de la fibronectine radio-marquée. Les auteurs suggèrent ainsi que la fibronectine peut être l'un des récepteurs eucaryotes impliqués dans l'attachement de *Lactobacillus* à la surface de la muqueuse intestinale. Hynönen *et al.*, (2002) dans un travail consacré à *L. brevis* ATCC 8287 établissent que la bactérie adhère aux cellules épithéliales des lignées Caco-2 et Int-407 par le

biais d'une protéine de la couche S ou SLpA. Ultérieurement, l'implication d'une autre protéine de la couche S de *L. acidophilus* NCFM, dans l'adhésion aux cellules Caco-2, est identifiée par Buck *et al.*, (2005). Enfin, la souche de *L. reuteri*, isolée de différents animaux, présente à sa surface une adhésine de fixation au mucus appelée "Mucus adhesion promoting protein" ou MapA. Ce facteur est une protéine de masse moléculaire 26 kDa, qui en plus de son rôle dans l'adhésion au mucus, serait impliquée dans l'attachement des cellules de *L. reuteri* aux cellules intestinales Caco-2 (Miyoshi *et al.*, 2006).

### 2.2.2.3.2 Adhésion des lactobacilles à la mucine

Les cellules épithéliales intestinales sont recouvertes d'une couche protectrice de mucus, mélange de glycolipides et de protéines de hauts poids moléculaires et fortement glycosylées, appelées mucines. L'expression et la sécrétion du mucus par les cellules de l'intestin est dynamique et dépend de nombreux facteurs physiologiques. Le mucus présent à la surface des cellules épithéliales est entraîné par les mouvements péristaltiques au niveau de l'intestin et de ce fait, il est éliminé en continu dans les fèces. Un tel processus permet le renouvellement permanent de cette couche de protection de l'épithélium. On peut donc considérer que cette "barrière protectrice" est dynamique. Par conséquent, la capacité d'une bactérie probiotique à adhérer au mucus peut apparaître comme présentant un intérêt limité. En effet, on peut admettre dans ces conditions que plus une bactérie possède d'affinité pour le mucus, plus elle sera éliminée rapidement avec ce dernier. Toutefois, le mucus est un habitat privilégié pour les bactéries commensales de l'intestin telles que les lactobacilles (Ouwehand *et al.*, 2001 ; Servin, 2004) et lorsque ces dernières s'adsorbent sur ce substratum, elles peuvent s'y développer rapidement en y trouvant des nutriments nécessaires à leur croissance, puis diffuser au sein de cette couche jusqu'aux cellules épithéliales. En conclusion, une bactérie qui possède une bonne affinité ou une capacité d'adhésion à la mucine, colonisera plus facilement le tractus de l'hôte comparativement à un microorganisme qui témoignerait d'une faible affinité pour cette même cible.

Plusieurs protéines d'adhésion à la mucine ont été identifiées chez les lactobacilles. Tuomola *et al.*, (2000), ont mis en évidence l'implication de facteurs protéiques dans l'adhésion à la mucine, après traitement des cellules de *L. acidophilus* La1 et *L. rhamnosus* GG, par des protéases telles que la trypsine ou la pepsine. Dans des études plus approfondies, d'adhésines possédant une affinité pour la mucine, certaines d'entre elles ont été identifiées et fonctionnellement caractérisées chez de nombreux lactobacilles. Il s'agit de la protéine

extracellulaire d'adhésion au mucus (mucus-binding protein, MUB) isolée chez *Lactobacillus reuteri* 1063 (Roos and Jonsson, 2002) et de la MUB de *L. acidophilus* NCFM (Buck *et al.*, 2005). La souche *L. salivarius* UCC118 quant à elle, présente une capacité d'adhésion au mucus qui lui est conférée par une protéine de surface identifiée LspA (van Pijkeren *et al.*, 2006).

Ces trois protéines d'adhésion au mucus possèdent l'organisation typique des protéines de la surface de bactéries Gram positif. Elles présentent un peptide signal N-terminal pour un ciblage de la protéine à l'exportation au travers de la membrane plasmique ainsi qu'un domaine C-terminal permettant l'ancrage à la paroi, motif LPXTG, qui est reconnu par des enzymes de type sortase qui catalysent la fixation covalente de ces protéines exportées, au réseau de peptidoglycane de la paroi bactérienne (Navarre and Schneewind, 1994, 1999, Ton-That *et al.*, 2004). Rojas *et al.*, (2002) ont isolé et purifié une protéine (The adhesion-promoting protein) impliquée dans l'adhésion de *L. fermentum* 104R aux mucines intestinale et gastrique de porc. La protéine qui possède une masse moléculaire de 29 kDa, a été purifiée à partir d'un extrait de protéines de la paroi de *L. fermentum* 104R par chromatographie d'affinité, puis détectée et visualisée dans les fractions chromatographiques par western-blotting, en utilisant du mucus couplé à une peroxydase (Horse Radish Peroxydase, HRP).

En plus de ces adhésines vraies présentant un motif d'ancrage à la paroi bactérienne, une nouvelle classe de protéines associées de façon non covalente à la surface et agissant comme un promoteur d'adhésion des lactobacilles à la mucine, a fait l'objet de plusieurs publications au cours de ces dernières années. Toutes appartiennent à la catégorie des "anchorless proteins". Parmi ces dernières, on peut citer le facteur d'élongation EF-Tu et la protéine chaperonne GroEL ou Hsp 60 qui ont été caractérisées sur la paroi de *L. johnsonii* La1 (Granato *et al.*, 2004 ; Bergonzelli *et al.*, 2006).

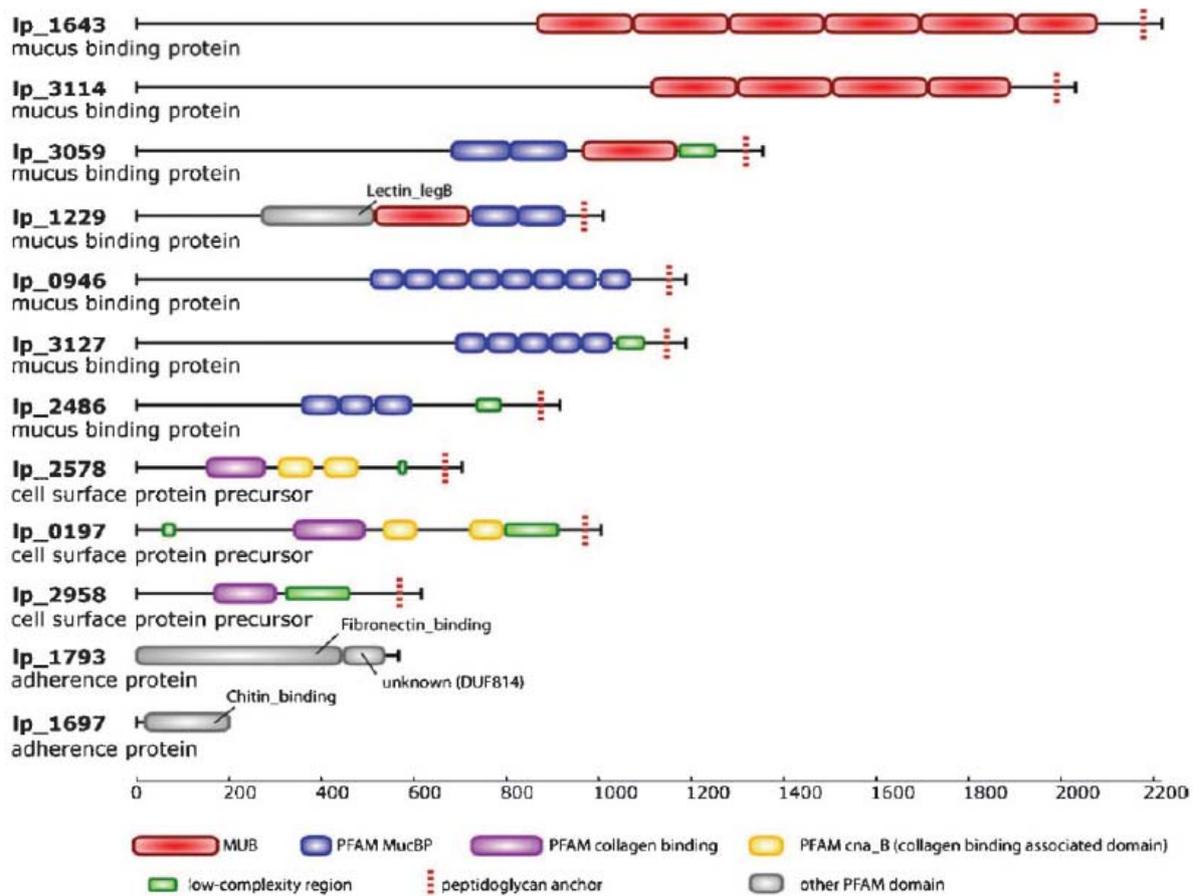
### ***2.2.2.3.3 Adhésion des lactobacilles aux constituants de la matrice extracellulaire***

La mucine et les cellules épithéliales intestinales ne sont pas les deux seules cibles avec lesquelles les lactobacilles sont susceptibles d'interagir lors de leur séjour dans le tractus de l'hôte. Ils peuvent également interagir avec des constituants de la matrice extracellulaire. Cette dernière est assimilable à un tissu conjonctif qui entoure et relie entre elles les cellules épithéliales. Ses principaux constituants appartiennent à 4 classes de molécules : le collagène,

le protéoglycane, l'élastine et les protéines structurales telles que la fibronectine, la laminine, la vitronectine et l'entracine. En cas d'altération de la muqueuse consécutive à une irritation ou à une pathologie, la matrice extracellulaire et plus particulièrement ses constituants protéiques deviennent plus accessibles aux microorganismes pathogènes présents dans le tractus intestinal (Styriak *et al.*, 2003). Toutefois, la capacité de certains lactobacilles à adhérer aux protéines de cette matrice leur confère une aptitude à exclure les pathogènes par le biais d'une compétition pour les mêmes sites potentiels d'adhésion au niveau de la matrice extracellulaire (Styriak *et al.*, 1999, 2003; Neeser *et al.*, 2000 ; Lorca *et al.*, 2002).

De nombreuses protéines de la surface des lactobacilles ont été décrites comme des adhésines potentielles aux composés de la matrice extracellulaire. Parmi celles-ci on trouve la protéine d'adhésion au collagène (CnBP, collagen binding protein) identifiée chez *L. reuteri* NCIB 11951 (Aleljung *et al.*, 1994). Cette protéine possède une affinité pour le collagène de type I. Ultérieurement Roos *et al.*, (1996) ont établi que CnBP chez *L. reuteri* NCIB 11951 est une composante du système de transport ABC. Ces conclusions ont été établies sur la base de l'analyse de la séquence en acides aminés et des recherches dans les bases de données. Les auteurs ont ainsi révélé la présence de fortes similitudes entre la séquence de la CnBP de *L. reuteri* NCIB 11951 et le domaine de fixation des solutés au niveau du système de transport bactérien ABC. D'autres protéines associées à la surface bactérienne, impliquées dans l'interaction avec des constituants de la matrice extracellulaire, ont été rapportées chez diverses souches de *Lactobacillus*. Toba *et al.*, (1995) ont isolé une protéine de la couche S dénommée Cbs chez *L. crispatus* JCM 5810 conférant à la bactérie sa capacité à adhérer aux collagènes de type I et IV, à la laminine et dans une moindre mesure à la fibronectine. Ultérieurement Sillanpää *et al.*, (2000) et Antikainen *et al.*, (2002) ont confirmé le caractère «collagen binding» de cette protéine et le gène codant pour la Cbs a été complètement séquencé et la protéine exprimée chez *E. coli*.

Une autre protéine de la couche S a été identifiée chez la souche *L. brevis* ATCC 8287, il s'agit de la protéine SLp A associée à la paroi de cette bactérie. Cette protéine est impliquée dans l'adhésion de la souche au collagène ainsi qu'à la fibronectine (Hynonen *et al.*, 2002). Récemment, de Leeuw *et al.*, (2006) ont utilisé la résonance plasmonique de surface (RPS) afin de mettre en évidence la capacité d'adhésion de la SLpA de *L. brevis* ATCC 8287 à la fibronectine, à la laminine, au collagène et au fibrinogène. Une adhésine spécifique de la

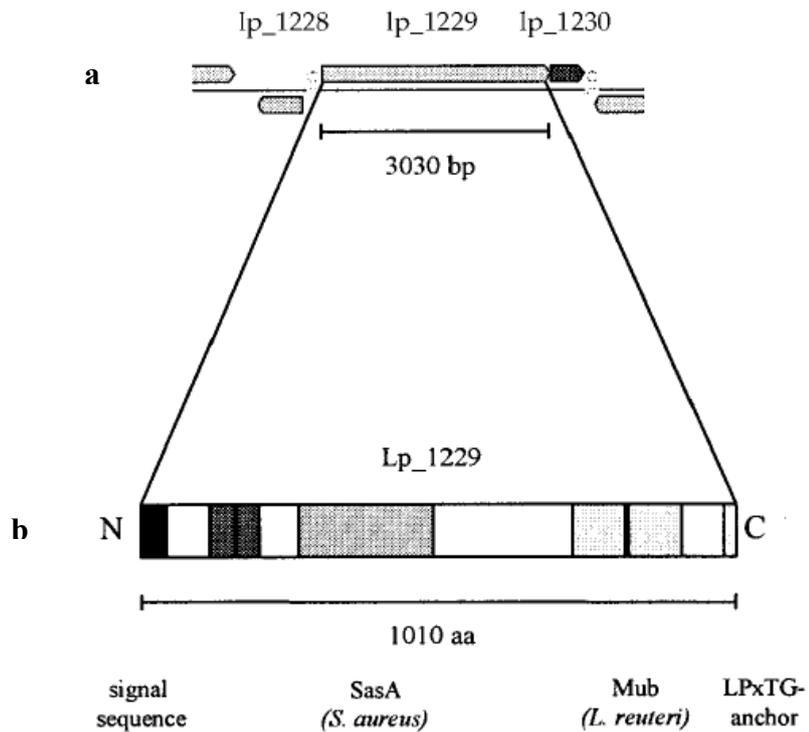


**Figure 1.8** : Représentation schématique de différents domaines structuraux des 12 protéines dont l'analyse du gène codant permet de prévoir une implication dans l'adhésion de *L. plantarum* sur des cibles moléculaires extracellulaires de l'hôte (Boekhorst *et al.*, 2006a).

fibronectine, appelée FbpA ou fibronectin binding protein A, a été isolée de la paroi de *L. acidophilus* NCFM (Buck *et al.*, 2005). Enfin, Jakava-Viljanen and Palva, (2007), ont établi que la désorption d'une protéine de la couche S (S layer protein), isolée de souches de *Lactobacillus* de l'intestin et de fèces de porc, par un traitement au chlorure de guanidine, affecte la capacité d'adhésion de ces souches à des cibles de la matrice extracellulaire telles que le collagène, la laminine et la fibronectine.

### 2.2.2.3.4 Cas particulier des protéines impliquées dans l'adhésion de *L. plantarum*

Des protéines dont la structure déduite du gène, prévoit une implication dans l'interaction de *L. plantarum* avec des cibles moléculaires et extracellulaires de l'hôte ont été identifiées. Leurs structures ont été par la suite analysées pour déterminer les domaines structuraux et fonctionnels susceptibles d'interagir avec des cibles telles que la matrice extracellulaire. Une représentation schématique de ces domaines structuraux est illustrée sur la **Figure I.8**. L'étude bioinformatique des alignements des séquences de ces protéines selon le modèle de Hidden Markov (HMM) (Durbin *et al.*, 1998) a permis d'identifier la présence de 3 protéines portant des domaines d'adhésion au collagène (Boekhorst *et al.*, 2006a). Ces domaines sont conservés chez les bactéries Gram positif et les alignements de séquences ont révélé des homologies avec le domaine d'adhésion au collagène mis en évidence précédemment chez *Staphylococcus aureus* par l'équipe de Symersky *et al.*, (1997). De la même façon, une protéine possédant un domaine de fixation à la chitine a été identifiée après alignement de sa séquence avec celle de la protéine du virus *Choristoneura biennis entomopoxvirus* (Yuen *et al.*, 1990). Une protéine d'adhésion à la fibronectine présentant un domaine spécifique de cette fonction et préalablement caractérisé chez *Streptococcus gordonii* (Christie *et al.*, 2002) serait associée à la surface de *L. plantarum*. Enfin, 7 protéines portant des copies de domaines présumés adhérer au mucus (Mucus binding protein) entreraient dans la composition du sécrétome de *L. plantarum* (**Figure I.8**). De telles protéines possèdent soit des domaines d'interaction au mucus, qui ne sont pas spécifiques des bactéries lactiques car ceux-ci ont été mis en évidence auparavant chez certaines espèces de *Listeria* (MucBP ou mucus binding protein), soit des domaines d'interaction avec le mucus qui sont propres aux bactéries lactiques et identifiés MUB (mucus binding domain) (Boekhorst *et al.*, 2006b). Parmi les 12 protéines d'adhésion potentiellement présentes chez la souche de *L. plantarum* WCSF1, 10 d'entre elles possèdent des motifs d'ancrage au peptidoglycane, de type LPXTG.



**Figure 1.9 :** (a) Organisation génétique du locus *msa* dans le génome de *L. plantarum* WCFS1. (b) Structure moléculaire de la protéine MSA codée par le gène *msa* montrant des domaines propres à une adhésine bactérienne (Pretzer *et al.*, 2005).

Pour les deux autres protéines rien n'est établi quant à leur mode d'association à la paroi. Sur le plan expérimental, rien n'a encore été établi afin de confirmer, sur la base de test *in vitro*, le rôle fonctionnel de ces adhésines potentielles dans l'interaction de *L. plantarum* avec les constituants du tractus intestinal de l'hôte.

Toutefois, une étude combinée de l'analyse du génome complet de la souche sauvage *L. plantarum* WCFS1 et de la capacité de 14 souches de *L. plantarum* à agglutiner *S. cerevisiae* d'une manière mannose-dépendante, a permis d'identifier 4 gènes candidats codant pour des adhésines spécifiques au mannose chez *L. plantarum* (Pretzer *et al.*, 2005). Il s'agit du gène lp\_0373, annoté comme codant pour une protéine de la surface bactérienne contenant un motif LPXTG, du gène lp\_0402 de fonction inconnue, de lp\_0403 qui serait à l'origine d'une protéine impliquée dans la biosynthèse de la plantaricine et enfin du gène lp\_1229 codant pour un précurseur d'une protéine de surface avec un motif d'ancrage LPXTG. Des essais de délétion et de surexpression de ces gènes ont permis d'identifier un gène candidat dont la suppression a entraîné une perte complète de la capacité d'agglutination des levures alors que sa surexpression, a quantitativement amélioré ce phénotype. Il s'agit du gène *msa* (mannose-specific adhesin) qui code pour une "lectine-like" protein, qui reconnaît spécifiquement des unités mannose (*Msa*, lp\_1229) (Pretzer *et al.*, 2005). L'analyse des 1010 résidus d'acides aminés de la séquence de la protéine MSA indique une structure multidomaine typique d'adhésine de *L. plantarum* (**Figure I.9**). La séquence présente des éléments typiques des protéines de surface, dont l'exportation dépend des sortases, d'un peptide signal N-terminal et d'un domaine C-terminal hydrophobe codant pour le motif d'ancrage LPXTG. L'alignement de la séquence de la MSA avec d'autres protéines de surface de bactérie Gram positif, grâce aux outils bioinformatiques de recherche d'homologies tels que BLAST et FASTA, a révélé la présence au niveau de l'extrémité C-terminale (entre les résidus 720 et 916) de deux copies de 97 résidus d'acides aminés codant pour un domaine d'adhésion au mucus (MUB). Ce dernier a été ultérieurement identifié chez *L. reuteri* (Roos *et al.*, 2002). Certains pathogènes tels que les *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) expriment ce type de protéine à forte affinité pour les groupements mannosides, à leur surface au niveau des fimbriae. Cette protéine leur permet de reconnaître spécifiquement les cellules épithéliales intestinales de l'hôte (Krogfelt *et al.*, 1990 ; Wold *et al.*, 1988). De plus, ces facteurs de reconnaissance de glycoconjugués, à la surface des cellules hôtes, ont été également mis en évidence chez d'autres souches d'entéro-pathogènes telles que, *Salmonella enterica* sérotype *Enteritidis*, *Vibrio cholerae*, et *Pseudomonas aeruginosa*, où ils jouent un rôle dans l'adhésion de ces pathogènes (Imberty *et al.*, 2004 ; Aslanzadeh and Paulissen, 1992 ; Bhattacharjee and Srivastava, 1978). Par

analogie à ces pathogènes, certaines souches de probiotiques exprimant ces mêmes protéines d'adhésion à leur surface, pourraient inhiber l'interaction de pathogènes, en entrant en compétition avec ces derniers pour les mêmes sites d'adhésion à la surface des cellules épithéliales de l'hôte (Neesser *et al.*, 2000 ; Reid and Burton, 2002).

Lors de travaux antérieurs, Adlerberth *et al.*, (1996) ont démontré l'existence, chez *L. plantarum*, d'un mécanisme d'adhésion spécifique à des récepteurs riches en groupements mannoses, exprimés par la lignée de cellules épithéliales intestinales HT-29. Cette caractéristique peut potentiellement conférer au lactobacille une capacité à coloniser l'intestin de l'homme et par conséquent à participer à l'exclusion compétitive des agents pathogènes. Récemment, des travaux effectués au sein de notre laboratoire ont montré qu'un traitement des cellules de *L. plantarum* par un agent chaotropique tel que le LiCl et/ou protéolytique comme la trypsine, annulait complètement la capacité d'adhésion des souches de *L. plantarum* à des cellules épithéliales des lignées Caco-2 et HT-29, témoignant ainsi de la nature protéique d'adhésines présentes à la surface des souches de *L. plantarum* testées (Tallon *et al.*, 2007).

La mise en évidence de l'implication d'anchorless protéines, associées à la paroi de *L. plantarum*, dans l'interaction de la bactérie avec l'hôte est récente. Kinoshita *et al.*, (2008), dans le cadre d'une étude réalisée sur la souche *L. plantarum* LA 318, caractérisent l'association non covalente d'une protéine de 39 kDa à la paroi du lactobacille. Cette protéine est identifiée comme étant la GAPDH. Les auteurs utilisent la résonance plasmonique de surface afin d'établir une corrélation entre la présence de la GAPDH à la surface de *L. plantarum* LA 318 et la capacité de la souche à adhérer, *in vitro* à la mucine intestinale humaine. Sur la base d'une telle observation, Kinoshita *et al.*, (2008) suggèrent que la souche *L. plantarum* LA 318 pourrait utiliser la GAPDH comme adhésine afin de coloniser la muqueuse intestinale humaine.

En plus de la GAPDH, d'autres "anchorless proteins" telles que le facteur d'élongation EF-Tu et la triosephosphate isomérase (TPI) sont identifiées et caractérisées à la surface de la souche *L. plantarum* 423 (Ramiah *et al.*, 2008). Un simple traitement de la bactérie par un agent chaotropique comme le chlorure de guanidine 4M, engendre un abaissement de plus de 40% de la capacité d'adhésion *in vitro* de la bactérie aux cellules épithéliales intestinales de la lignée Caco-2. Ce même traitement s'accompagne de la désorption des 3 "anchorless proteins" de la paroi bactérienne. Ces observations conduisent les auteurs à formuler l'hypothèse selon laquelle les 3 enzymes, une fois exportées à la surface, joueraient un rôle dans l'adhésion aux constituants du tractus intestinal de l'hôte.

### 2.2.2.4 Constituants non-protéiques de la paroi, impliqués dans l'interaction bactérie/hôte

Par facteurs non-protéiques d'adhésion, on désigne les autres polymères qui "décorent" le peptidoglycane des bactéries Gram positif. Ils sont représentés par les polysaccharides, les acides téichoïques, téichuroniques et lipotéichoïques. L'implication des acides téichoïques (TA), des acides lipotéichoïques (LTA) ainsi que de structures polysaccharides, dans le processus d'adhésion des lactobacilles aux constituants du tractus gastro-intestinal, est cependant moins fréquemment rapportée dans la littérature que celle mettant en jeu des composés protéiques de la paroi bactérienne.

#### **2.2.2.4.1 Les facteurs polysaccharidiques**

L'implication des polysaccharides dans le processus d'adhésion des lactobacilles sur des cibles du tractus intestinal n'est pas aussi marquée que celle attribuée aux facteurs protéiques associés à la paroi bactérienne. Cependant, peu d'exemples sont disponibles dans la littérature, étayant le rôle de structures polysaccharidiques dans l'interaction bactérie/hôte. Les polysaccharides peuvent être soit sécrétés par la bactérie dans le milieu de culture soit rester associés à la paroi de cette dernière (Ruas-Madiedo and Reyes-Gavilan, 2005). La mise en évidence de leur intervention dans le processus d'adhésion met souvent en jeu une oxydation préalable des composés glucidiques de la surface bactérienne par le métaperiodate de sodium. Toutefois ce traitement chimique reste peu spécifique et est susceptible d'affecter des constituants glucidiques d'autres molécules présentes au niveau de la paroi du microorganisme, telles que les glycoprotéines.

Green et Klaenhammer, (1994) ont montré que le traitement de *L. gasseri* ADH par le métaperiodate de sodium, réduit de manière significative la capacité de la souche probiotique à adhérer aux cellules intestinales de la lignée Caco-2. Un traitement de ces mêmes cellules de *L. gasseri* ADH par des protéases de type trypsine et pepsine n'a par contre aucun effet négatif sur la capacité d'adhésion de la bactérie. Le traitement de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* Ly par le métaperiodate de sodium affecte fortement la capacité d'adhésion de la souche aux cellules épithéliales de lignée Int-407, alors que ce même traitement est sans effet sur l'adhésion de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* Ly sur les cellules de lignée Caco-2 (Sarem *et al.*, 1994). Ces observations laissent penser que les deux cibles cellulaires ne font probablement pas intervenir les mêmes récepteurs à leur surface lors de leur interaction avec les différents microorganismes présents dans la lumière intestinale. Toutefois, le rôle des

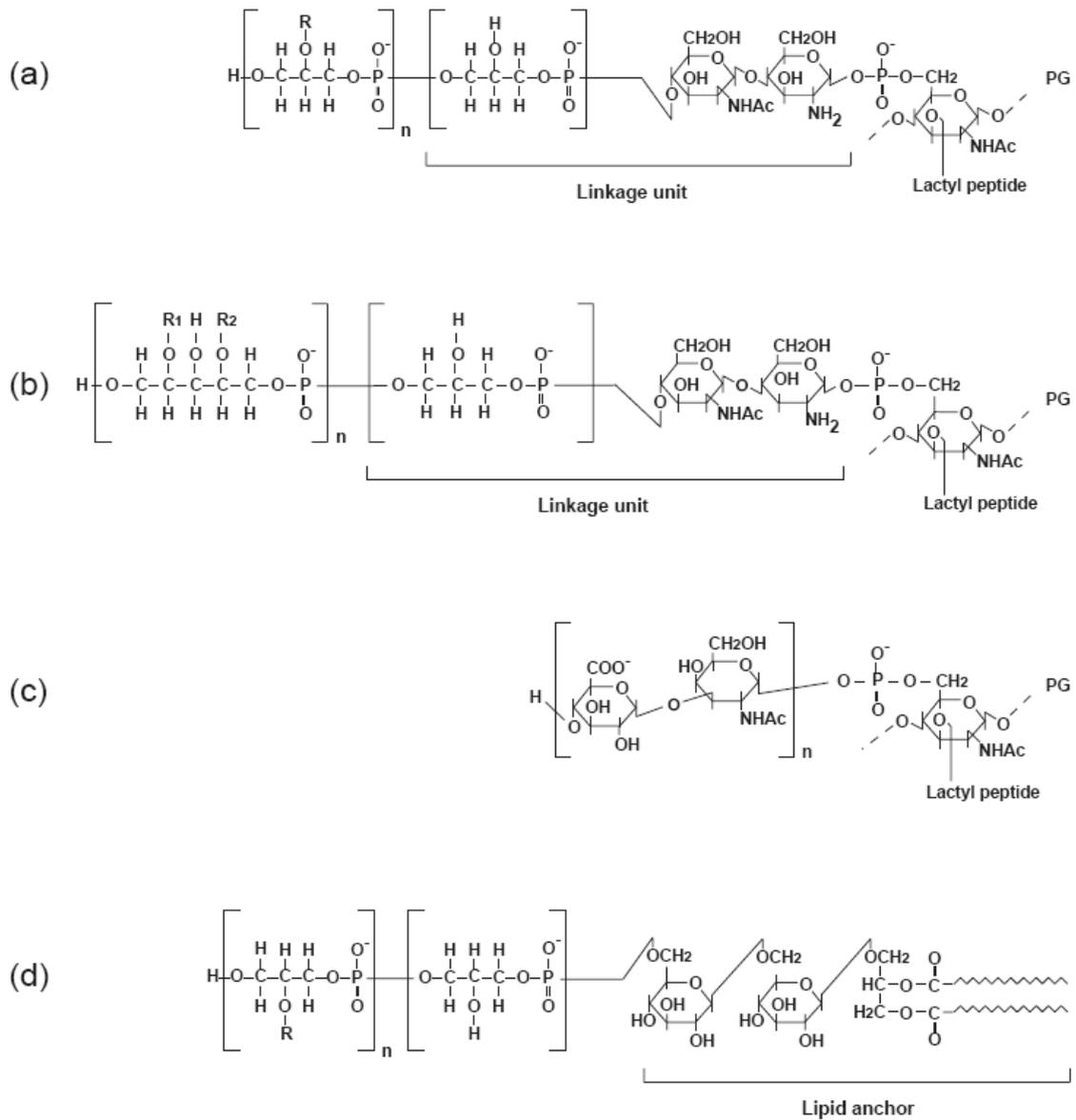
polysaccharides dans l'interaction de lactobacilles avec l'hôte peut être contradictoire. Par exemple, chez *L. acidophilus* CRL639, l'adhésion aux constituants de la matrice extracellulaire tels que le collagène de type I et la fibronectine est attribuée à la présence d'une protéine de la couche S (SLp) de masse moléculaire 43 kDa, et la production en phase stationnaire d'expolysaccharides capsulaires par cette même souche inhibe sa capacité d'adhésion à ces mêmes constituants (Lorca *et al.*, 2002)

### 2.2.2.4.2 Les acides teichoïques et lipoteichoïques

#### 2.2.2.4.2.1 Composition structurale

Le terme acide téichoïque (TA) désignait initialement toute structure bactérienne incluant, paroi, membrane et polymères capsulaires contenant du glycéro-phosphate, du ribitol-phosphate ou des résidus phospho-glycanes (Baddiley, 1972). Dans le courant des années 70, Wicken and Knox, (1970) ont mis en évidence que les acides téichoïques étaient liés de manière covalente au peptidoglycane alors que les acides lipotéichoïques (LTA) plus largement répandus chez les lactobacilles étaient liés de manière covalente à la membrane cytoplasmique, par le biais d'un motif glycolipidique. Les TA représentent plus de la moitié du poids de la paroi bactérienne, ils possèdent une structure très variable et leur abondance dépend de l'espèce ou de la souche bactérienne, du stade ou du taux de croissance, du pH, de la source en carbone et de la disponibilité en phosphate. Une représentation schématique de la structure de certains acides teichoïques et lipotéichoïques identifiés chez certaines espèces de bactéries lactiques est donnée par Delcour *et al.*, (1999) (**Figure I.10**). Les LTA sont largement distribués chez les bactéries lactiques, on les trouve chez les entérocoques, les lactobacilles, les lactocoques, les leuconostokes et les streptocoques (Fischer, 1994). Ils sont constitués d'une chaîne principale de polyglycérol-phosphate. Les LTA ont été identifiés pour la première fois chez la bactérie lactique *L. fermentum* par Wicken and Knox, (1975). Leur structure est moins variable que celle des acides teichoïques et leur production est indépendante des conditions de croissance (Fischer, 1988).

Chez *L. plantarum*, on trouve les deux types de TA : les acides téichoïques et les acides lipotéichoïques (LTA). Les LTA, chez *Lactobacillus plantarum* sont des polymères de glycérol-phosphate fortement substitués par des résidus D-alanine avec un rapport molaire D-Ala/phosphate de 0,89 et dans une moindre mesure avec du glucose dans un rapport molaire de Glc/phosphate de 0,11 (Archibald and Baddiley, 1966). Les TA de



**Figure 1.10** : Exemples de structures d'acides téichoïques (a) chaîne de polyglycerol-phosphate d'acides teichoïques chez *Bacillus subtilis*, (b): polyribitol-phosphate des acides teichoïques de *Lactobacillus plantarum*; (c): des acides téichuroniques de *Bacillus subtilis*; (d): acides lipotéichoïques de *Bacillus subtilis*;

PG: chaîne de peptidoglycane, R, R1, R2 = substituants (glucose, D-alanine, GlcNAc ...)  
(Delcour *et al.*, 1999).

*L. plantarum* sont constitués quant à eux de polyribitol-phosphate substitués également par des résidus D-alanine et glucose, avec des rapports molaires au phosphate variables et souche-dépendantes (Palumbo *et al.*, 2004). Comme cela est illustré sur la **Figure I.10b**, le motif d'ancrage des TA au peptidoglycane de *L. plantarum* est constitué d'un disaccharide de N-acétylmannosaminyl  $\beta(1\rightarrow4)$  glucosamine suivi de phosphoglycérol (Delcour *et al.*, 1999).

Pour les LTA (**Figure I.10d**), la chaîne principale de polyglycérol-phosphate est très similaire à celle des acides téichoïques. La partie terminale réductrice de la chaîne principale est associée par une liaison phosphodiester à l'oxygène du carbone 6 (O-6) de la partie non réductrice de l'hexose du motif d'ancrage glycéro-glycolipidique. La structure précise de ce dernier peut varier en fonction du genre ou de l'espèce, mais obéit au même schéma général, c'est-à-dire, un diacylglycérol lié à un di-ou tri-saccharide (Delcour *et al.*, 1999). L'ancrage à la membrane plasmique est assuré par la chaîne aliphatique des acides gras (**Figure I.10d**). La micro-hétérogénéité des LTA résulte de la différence dans le nombre d'acides gras, dans la longueur de la chaîne hydrophile polyglycérophosphate et dans la variabilité des substituants (Fischer, 1994). Bien que les acides lipotéichoïques restent attachés à la membrane plasmique après leur biosynthèse, une fraction de la chaîne polyglycérophosphate peut être relarguée dans le milieu par désacylation. Ces formes sécrétées de LTA peuvent former des micelles par agrégation dans le milieu extracellulaire (Wicken and Knox, 1980).

### 2.2.2.4.2.2 Méthodes d'extraction des LTA

Nous avons vu dans la partie précédente que les LTA sont caractérisés par une grande variabilité structurale et par un degré de substitution en résidus D-alanine qui dépend fortement des souches ou des espèces bactériennes. Le contenu en alanine de ces polymères ou leurs rapports molaires D-alanine/phosphore contribuent fortement au rôle des LTA dans l'interaction probiotique/hôte. L'étude *in vitro* du rôle des LTA dans l'interaction du probiotique avec sa cible cellulaire ou moléculaire ou encore de leur capacité à stimuler l'immunité de l'hôte, nécessite la préparation de fractions ultra pures de ces polymères, à partir des parois cellulaires de la souche d'intérêt. Les procédures d'extraction des LTA sont souvent drastiques et létales pour la bactérie du fait de l'ancrage covalent de ces structures au niveau des parois bactériennes. Dans la littérature, plusieurs méthodes ont été largement décrites et la plus communément utilisée est celle impliquant l'utilisation de phénol concentré (80%, p/v) et à chaud (65°C) (Wicken and Knox, 1973). Cette méthode a été initialement utilisée pour l'extraction des lipopolysaccharides de bactéries Gram négatif exempts de contaminants protéiques, puis la procédure a été étendue pour l'extraction des LTA chez les

bactéries Gram positifs. En présence de phénol concentré à chaud, les complexes protéine-lipide-polysaccharides sont dissociés en lipoprotéines et en lipopolysaccharides qui se retrouvent dans la phase phénolique et les polymères d'acides lipotéichoïques vont se répartir quant à eux dans la phase aqueuse supérieure.

Cependant, la méthode d'extraction au phénol à chaud pour la purification des LTA a été par la suite contestée, car elle présente plusieurs inconvénients. Le premier concerne le manque de pureté des préparations obtenues. Les contaminants protéiques peuvent être à l'origine d'effet bioactif apparent conduisant à des conclusions erronées sur le rôle réel des LTA (Gao *et al.*, 2001). Le deuxième inconvénient est lié au fait que la méthode au phénol concentré à chaud est destructive vis-à-vis des substituants bioactifs de D-alanine conduisant à l'hydrolyse de certaines liaisons esters (Hashimoto *et al.*, 1997). Morath *et al.*, (2001) ont ainsi mis au point une nouvelle méthode d'extraction de LTA utilisant le n-butanol à température ambiante. Celle-ci permet d'obtenir une fraction de LTA purs, exempts de contaminants et dont le degré de substitution par les résidus D-alanine n'est pas affecté à la suite du procédé d'extraction.

### 2.2.2.4.3 Implication des TA et LTA dans l'interaction bactérie/hôte

Du fait de leur caractère polyanionique ainsi que de leur l'hydrophobie, les TA et les LTA peuvent indirectement influencer les propriétés d'adhésion des bactéries, en modifiant les propriétés physico-chimiques de la paroi bactérienne. Miörner *et al.*, (1983), dans une étude consacrée aux acides lipotéichoïques de la paroi de bactéries pathogènes du genre *Streptococcus* du groupe A, associent la capacité d'adhésion du microorganisme à l'hydrophobie de sa surface qui résulterait de la présence des acides lipotéichoïques. L'hypothèse de l'intervention des LTA dans l'adhésion de lactobacilles aux constituants de la paroi est avancée pour la première fois à l'issue des travaux du groupe de Sherman and savage, (1986). L'équipe fait état du rôle des LTA dans l'adhésion de souches de *Lactobacillus* aux cellules épithéliales intestinales. Par la suite Granato *et al.*, (1999) dans un travail consacré à *L. johnsonii* la1, démontrent que des acides lipotéichoïques extraits de la paroi de cette bactérie, inhibent de manière dose-dépendante son adhésion aux cellules épithéliales humaines de la lignée Caco-2. Plus récemment, Walter *et al.*, (2007) ont pu induire une mutation au niveau de l'opéron codant pour la protéine d'insertion des résidus D-alanine sur la chaîne polyglycérphosphate de LTA de *L. reuteri* 100-2 et observer les conséquences de cette modification sur l'activité biologique des LTA. Les auteurs

établistent une corrélation étroite entre la diminution du degré de substitution de la chaîne polyglycérophosphate par les résidus D-alanine et la capacité résiduelle de la souche *L. reuteri* 100-2 à coloniser le tractus intestinal du rat.

Chez *L. plantarum*, Kim *et al.*, (2007) et De vos, (2005) ont mis en évidence des activités immuno-modulatrices attribuées aux acides teichoïques et lipotéichoïques associés à la paroi bactérienne. Il est bien connu que *L. plantarum* est l'un des résidents permanents du tractus intestinal de l'homme, qui entretient des relations bénéfiques avec son hôte par la production de certains métabolites ou la stimulation de la production de cytokines spécifiques. En 2005, Grangette *et al.*, (2005) décrivent pour la première fois, chez *L. plantarum* l'incidence de la composition des LTA sur la production de cytokines qui joueraient un rôle de protection de l'hôte contre des désordres intestinaux inflammatoires.

Malgré les propriétés importantes associées aux acides teichoïques et lipotéichoïques, la compréhension de leurs rôles physiologiques reste incomplète. Ils sont considérés comme des analogues des lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram négatif, et ils partagent avec ceux-ci, nombre de propriétés biochimiques et physiologiques (Ginsburg, 2002). Morath *et al.*, (2001) ont signalé que les propriétés pro-inflammatoires des LTA sont tributaires de leur contenu en D-alanine. Ces résidus D-alanine sont formés par conversion de la L-alanine grâce à l'action d'une alanine racémase puis ils sont couplés à la chaîne de LTA par l'activité des produits d'expression de l'opéron *dlt*. Des propriétés anti-inflammatoires ont été analysées chez des mutants *dlt*<sup>-</sup> de la souche sauvage *L. plantarum* NCIMB 8826, lors de tests *in vitro* sur des cellules mononuclées et *in vivo* sur des modèles murins présentant une colite inflammatoire (Grangette *et al.*, 2005). Le mutant *dlt*<sup>-</sup> incorpore moins de résidus D-Ala lors du processus de biosynthèse des chaînes d'acides lipotéichoïques et cette mutation a une incidence importante sur l'effet immunomodulateur du probiotique. Les auteurs ont observé une réduction significative de la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les cellules mononuclées et les monocytes du sang lorsqu'ils sont stimulés par le mutant *dlt*<sup>-</sup>, alors qu'une forte augmentation de la sécrétion de l'interleukine anti-inflammatoire Il-10 a été enregistrée avec la souche sauvage. En accord avec les résultats de ces tests *in vitro*, le mutant *dlt*<sup>-</sup> a été nettement plus protecteur vis à vis de la colite du modèle murin que la souche sauvage. Les résultats montrent bien que la composition des LTA de la souche de *L. plantarum* possède une influence dans la modulation les réponses immunitaires pro- ou anti-inflammatoires de l'hôte.

De plus, l'influence de LTA modifiés de *L. plantarum*, sur la perception de la douleur chez des souris présentant une distension colrectale a été examinée. Ces dernières ont été alimentées par un régime contenant le mutant *dlt*<sup>-</sup> de *L. plantarum* et les sécrétions de

cytokines pro et anti-inflammatoires ont été mesurées (Duncker *et al.*, 2008). L'analyse indique une diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires de type IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  par les lymphocytes mésentériques. Parallèlement, on observe une augmentation de la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 par les ganglions abdominaux. Les auteurs concluent que la composition des LTA de *L. plantarum* et notamment son contenu en D-alanine peut être déterminant pour la régulation des désordres intestinaux inflammatoires.

Ces résultats montrent bien que l'administration de souches mutantes de *L. plantarum* est beaucoup plus protectrice que celle de cellules sauvages et suggèrent que la composition des LTA peut orienter la réponse inflammatoire vers un équilibre anti-inflammatoire. Ces observations ouvrent la voie pour le développement rationnel de thérapies utilisant des bactéries lactiques modifiées pour le traitement de désordres intestinaux inflammatoires.

### 3 Méthodes d'investigation des constituants protéiques impliqués dans l'adhésion des probiotiques

#### 3.1 Les différents tests d'adhésion

La difficulté à évaluer la capacité d'adhésion *in vivo* des souches probiotiques a conduit au développement de nombreux tests *in vitro* d'adhésion. Ces derniers sont censés refléter la capacité d'une souche probiotique à persister de façon même transitoire dans l'intestin de l'homme. Toutefois, peu de rapports existent sur l'adhésion des bactéries lactiques probiotiques sur des modèles du tractus intestinal plus proches des conditions *in situ* mettant en œuvre, par exemple des segments d'intestin humain (Sarem *et al.*, 1994).

Récemment, plusieurs éléments structuraux du tractus intestinal ont été sélectionnés en tant que modèles pour des essais d'évaluation *in vitro* de l'adhésion. Ces modèles utilisent essentiellement les cellules épithéliales intestinales humaines de lignées Caco-2 et HT-29, du mucus intestinal ou des composés de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagène, laminine, ...) comme cibles.

Les cellules HT-29 et Caco-2 sont des cellules épithéliales d'intestin humain indifférenciées ou différenciées respectivement. Elles dérivent de carcinomes de côlon humain (Fogh *et al.*, 1977) et se différencient en une monocouche de cellules polarisées mimant les entérocytes de l'épithélium intestinal (pour détails voir la section, 2.2.2.3.1).

Le mucus est également utilisé comme autre support pour les tests *in vitro*. Le mucus est une substance visqueuse sécrétée par les cellules caliciformes et les glandes de la muqueuse

intestinale, il recouvre la totalité de cette dernière. Le mucus est composé de molécules de haut poids moléculaire ( $> 2 \times 10^6$  Da) appelées mucines qui sont des polymères de protéines hautement glycosylées, assemblées entre elles par des liaisons disulfure (Mantle *et al.*, 1984; Bell *et al.*, 1985). Outre la mucine, le mucus contient également d'autres protéines, des lipides, de l'ADN et des fragments de membranes de cellules épithéliales (Mantle et Husar, 1994). Le mucus fournit une protection physique contre les pathogènes qui doivent pénétrer cette couche pour atteindre l'épithélium intestinal. Il agit aussi comme un lubrifiant, qui facilite le transit des éléments nutritifs ingérés (Tannock, 1999). Cependant, en tant que première couche du lumen intestinal, le mucus constitue la surface qui entre initialement en contact avec les bactéries lactiques de l'intestin, jouant ainsi un rôle important dans l'adhésion et la colonisation du tractus intestinal par ces dernières.

Enfin, les constituants de la matrice extracellulaire sont également utilisés comme cibles moléculaires lors de tests d'adhésion *in vitro*. La matrice extracellulaire est une structure relativement stable qui entoure et relie les cellules épithéliales entre elles. Elle est impliquée dans le développement cellulaire, la croissance, la différenciation, la cohésion ainsi que dans la migration cellulaire. Les principaux composants de cette matrice appartiennent à quatre grandes classes de molécules: le collagène, le protéoglycane, l'élastine et les glycoprotéines de structure telles que la laminine, la fibronectine, la vitronectine, et l'entactine. La lame basale forme aussi une structure spécialisée de la matrice extracellulaire, avec une structure en feuillets amorphes, qui sépare la couche de cellules épithéliales du tissu conjonctif sous-jacent (Sillanpää, 2000). Cette lame basale est constituée principalement de collagène de type IV et de laminine qui interagissent entre eux pour former un réseau dense et serré. L'adhésion des bactéries lactiques aux protéines de la matrice extracellulaire peut être une propriété recherchée pour un probiotique. En effet, une telle capacité d'adhésion peut protéger l'hôte contre l'invasion de l'épithélium endommagé présentant des zones où la matrice extracellulaire serait alors exposée aux bactéries pathogènes.

Après adhésion sur la cible choisie, les méthodes de désorption des bactéries adhérentes utilisent la sonication ou des détergents tels que le Triton X-100, le Tween 80 (Yuehuei and Friedman, 1997). Le dénombrement des cellules bactériennes ainsi récupérées, est effectué soit par comptage direct en microscopie optique, ou bien après ensemencement sur des boîtes gélosées ou encore par comptage de la radioactivité si les bactéries ont été préalablement marquées avant leur incubation avec la cible (Yuehuei and Friedman, 1997 ; Vesterlund *et al.*, 2005).

La numération directe par observation en microscopie nécessite un marquage des bactéries avec des colorants tel que le cristal violet. C'est une méthode laborieuse qui nécessite le comptage de plusieurs champs microscopiques et par conséquent susceptibles d'induire des erreurs.

La méthode de dénombrement sur boîte est la plus classique ; il s'agit d'un comptage du nombre de UFC (Unité Formant Colonie) après un étalement des bactéries désorbées, sur des boîtes de milieu gélosé spécifique de la souche ou de l'espèce d'intérêt. Des séries de dilutions au 10<sup>ème</sup> de la suspension bactérienne sont préparées et 100 µl de chaque dilution sont ensuite étalés de manière homogène sur les boîtes gélosées. Après 24 à 48h d'incubation à la température optimale de croissance de la bactérie, les colonies sont comptées (le nombre idéal de colonies doit être compris entre 30 et 300). Cette méthode présente certains désavantages, elle est fastidieuse, consommatrice en temps et surtout ne permet pas de détecter les bactéries viables non cultivables (VBNC). Néanmoins, cette méthode est la plus couramment utilisée du fait qu'elle comporte moins de risque pour le manipulateur.

La radioactivité est aussi utilisée comme moyen de comptage des bactéries. Cette méthode nécessite un prémarquage des cellules bactériennes avec des traceurs radioactifs tels que la leucine [<sup>14</sup>C], le glucose [<sup>14</sup>C], la thymidine [<sup>3</sup>H] ou l'acide palmitique [<sup>3</sup>H] avant leur mise en œuvre dans le test d'adhésion. Cette méthode a l'avantage d'être très sensible et très précise, ce qui permet le traitement rapide d'un grand nombre d'échantillons. De plus, la viabilité des bactéries à l'issue du traitement de désorption de la cible n'est pas un prérequis. L'inconvénient majeur du marquage radioactif est le recours à des techniques spécifiques coûteuses.

Si les méthodes de mesure d'adhésion bactérienne sont diversifiées, sur le plan expérimental une standardisation des conditions utilisées semble indispensable pour permettre une comparaison des résultats. Parmi les paramètres dont il faut assurer le contrôle, on observe : le pH du tampon utilisé, la phase de croissance du microorganisme mis en œuvre, la température, ...etc. Blum *et al.*, (1999) ont effectué une analyse comparative sur des résultats obtenus par différentes équipes scientifiques lors de l'évaluation de la capacité d'adhésion de plusieurs souches de lactobacilles sur des cellules épithéliales Caco-2/HT-29 ainsi que sur du mucus intestinal. Les auteurs ont relevé une absence de standardisation des conditions expérimentales utilisées lors des essais d'adhésion *in vitro*. En conséquence, les résultats obtenus par les différentes équipes, qui utilisaient des souches de lactobacilles identiques mais dans des conditions de test différentes, montrent une grande variabilité dans les capacités d'adhésion de ces souches. Cette absence de normalisation complique ainsi l'interprétation des

données et des divergences apparaissent sur l'évaluation d'une adhésion efficace. Une validation critique du test d'adhésion *in vitro* est donc essentielle pour l'utilisateur, qui met en œuvre ce test en tant qu'outils de criblage et de dépistage de nouvelles souches probiotiques.

### **3.2 Analyse des constituants protéiques**

Les protéines de surface sont des médiateurs de communication entre la cellule bactérienne et son environnement. Le séquençage du génome de nombreuses bactéries a fourni une mine d'informations génétiques dont les fonctionnalités restent encore mal définies. Nombre de ces gènes codent potentiellement pour des protéines associées à la paroi bactérienne. Par conséquent il est devenu impératif après cette ère de la génomique, de définir une nouvelle technologie qui permettrait de fournir des informations sur l'expression, la structure et la fonction des protéines de surface dont la présence potentielle est déduite du séquençage du génome. La « protéomique » répond à ces attentes. Cependant, les bactéries Gram positif sont entourées par une couche épaisse de peptidoglycane qui rend difficile l'analyse protéomique des constituants associés à leur surface. L'analyse protéomique des constituants de la surface est donc entravée par ces limitations techniques qui causent une sous-estimation de la classe de protéines peu représentées et plus ancrées dans la paroi.

#### **3.2.1 Analyse des protéines de surface par électrophorèse sur gel**

La méthode de choix pour la séparation hautement résolutive des protéines est sans aucun doute l'électrophorèse bidimensionnelle ou 2D. Cette méthode couple une première séparation des protéines sur le critère de leur point isoélectrique suivie d'une deuxième dimension sur gel SDS-PAGE qui sépare les protéines sur la base de leur masse moléculaire (Görg *et al.*, 2004). Au cours de ces dernières années, cette technique a été appliquée avec succès pour l'étude de la fraction du protéome associé à la surface de bactéries Gram positif et négatif. Toutefois, si la technique est aisément applicable aux protéines hydrophiles, elle est mal adaptée à l'analyse de protéines faiblement solubles en milieu aqueux, telle que les protéines transmembranaires très hydrophobes, ce qui constitue une limitation de la méthode 2D.

Le séquençage des génomes bactériens a permis de construire des bases de données pour l'investigation bioinformatique des protéines dont le gène codant prévoit la présence à la surface du microorganisme. Des programmes ont été créés afin de mesurer l'hydrophobie

ou l'hydrophilie moyenne des protéines de paroi en utilisant le serveur GRAVY (Grand average of hydrophobicity) dont le site web est donné ci-dessous : (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>). Les protéines avec une valeur GRAVY négative peuvent être analysées en 2D, dans le cas contraire l'expertise sera impossible. D'autres programmes sont disponibles pour prévoir, à partir de la séquence de protéine déduite du gène, le nombre de domaines transmembranaire (TMRs), le mode d'exportation (avec ou sans peptide signal) ou le mode d'ancrage à la paroi ou la sécrétion dans le milieu. Il s'agit des serveurs Psort, TMPred...etc. En général, il est admis qu'une protéine avec plus de trois domaines TMR et une valeur GRAVY positive est difficilement analysable par 2D. L'électrophorèse 2D est bien adaptée pour séparer une large gamme de protéines à l'exception des protéines membranaires. Cette méthode d'analyse est souvent associée à une analyse en spectrométrie de masse des spots protéiques séparés, dans le but d'en identifier les constituants. A cet effet, après la séparation électrophorétique des protéines, chaque spot obtenu est digéré par une protéase spécifique telle que la trypsine, et les cartes tryptiques obtenues sont établies par analyse en spectrométrie de masse des peptides en mode ESI ou MALDI-TOF. La carte peptidique, véritable empreinte de la protéine permettant l'identification va être comparée à la carte peptidique théorique déduite du gène ou de la protéine préalablement séquencée et stockée dans les bases de données telles que SwissProt ou Genbank.

Récemment une analyse 2D a permis de comparer la fraction du protéome associée à la surface de trois souches du probiotique *L. plantarum* : *L. plantarum* CECT 4185 faiblement adhérente, souche de *L. plantarum* 299v moyennement adhérente et *L. plantarum* WHE fortement adhérente (Izquierdo *et al.*, 2009). L'analyse comparée des différentes protéines de la surface des trois souches, suivie de leur identification par spectrométrie de masse en mode ESI a permis de caractériser plusieurs facteurs d'adhésion qui étaient surexprimés chez la souche hautement adhérente WHE. Les protéines identifiées appartiennent toutes au groupe des anchorless protéines. Il s'agit de la GAPDH, du facteur d'élongation EF-Tu, et des protéines chaperones GroEL et DnaK. Cette étude est la première expertise comparative du surfaceome de la souche probiotique *L. plantarum*. En effet, jusqu'à présent l'analyse 2D des protéines de la surface était principalement réalisée chez des organismes microbiens pathogènes dans l'optique de développer de nouveaux vaccins candidats à partir des antigènes de surface identifiés (McMillan and Chhatwal, 2005 ; Grandi, 2001).

### 3.2.2 Technique de chromatographie bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse

Cette approche est basée sur l'analyse des protéines sans avoir recours à une électrophorèse sur gel. Elle a été développée pour l'analyse des protéines membranaires ou de paroi, difficilement séparables sur gel. Une méthode de chromatographie liquide bidimensionnelle ou 2D-LC est utilisée pour l'analyse d'un mélange complexe constitué de l'ensemble des peptides tryptiques obtenus lors de la digestion *in situ* des protéines accessibles à l'enzyme à la surface de la bactérie étudiée. La chromatographie d'échange de cations peut être utilisée pour réaliser la séparation dans la première dimension, suivie d'une chromatographie en phase inversée dans la seconde dimension. Cette dernière étape de chromatographie est directement couplée à une analyse des peptides par spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) soit en mode électrospray (ESI) ou en mode matrice assistée par désorption laser, MALDI.

Les masses des peptides ainsi que les éléments de leurs séquences obtenus, sont ensuite utilisés pour l'identification des protéines d'origine. La méthode est facilement automatisable, et donc de vastes volumes de données peuvent être générés dans un délai de temps relativement court. La 2D-LC-MS/MS possède plusieurs avantages car elle permet de s'affranchir des problèmes inhérents à la technique basée sur une étape initiale de séparation par électrophorèse sur gel 2D, telles que la sous-représentation des protéines de haute masse moléculaire et de pHi extrêmes, des protéines hydrophobes et faiblement représentées. Des estimations indiquent qu'une seule analyse 2D-LC-MS/MS pourrait identifier jusqu'à 10 fois plus de protéines que celles accessibles à partir d'un seul gel 2D (Cordwell, 2006). La stratégie 2D-LC-MS/MS est particulièrement utile pour cartographier la surface bactérienne. Toutefois, cette technique n'est pas adaptée pour une analyse quantitative et/ ou comparative des surfacéomes.

Récemment, des auteurs ont extrait les protéines de surface de certains microorganismes par la technique de rasage enzymatique, du terme anglo-saxon « shaving » qui consiste à digérer la surface des bactéries intègres par des protéases comme la trypsine ou la protéinase K, puis à séparer et à identifier le mélange complexe de peptides obtenus par la 2D-LC couplée à la spectrométrie de masse. Cette technique de rasage enzymatique suivi de la 2D-LC-MS/MS a été utilisée avec succès pour cartographier et caractériser les protéines de surface de plusieurs bactéries pathogènes telles que *Streptococcus pyogenes* et *Streptococcus* du groupe A (Severin *et al.*, 2007 ; Rodriguez-Ortega *et al.*, 2006), *Streptococcus suis*

(Rodriguez-Ortega *et al.*, 2008), *Bacillus anthracis* (Francisca *et al.*, 2005) et de bactéries non pathogènes comme *Bacillus subtilis* (Tjalsma *et al.*, 2008). Cette technique n'a pas encore fait l'objet à ce jour de travaux publiés chez les lactobacilles.



***CHAPITRE II***  
**MATERIELS ET METHODES**



## 1 Souches bactériennes

Les souches probiotiques de *Lactobacillus plantarum* utilisées dans cette étude sont : *L. plantarum* 299v commercialisée par la société Probi AB (Suède) et les souches : CBE, BMCM12 et MR22 qui ont été isolées au Laboratoire de Microbiologie et Biochimie appliquée, LMBA UMR 5248 CNRS-U Bordeaux 1-ENITAB au cours de travaux antérieurs menés en collaboration avec le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN, EA 1069, Limoges). Les souches sont conservées à -80°C sur des microbilles en présence de glycérol à 18% (v/v).

## 2 Milieu de culture MRS

Les souches de *L. plantarum* sont cultivées sur milieu MRS (de Man, Rogosa et Sharpe, de Man *et al.*, 1960). Il est composé de 10 g/L de peptone, 8 g/L d'extraits de viande, 4 g/L d'extraits de levures, 20 g/L de glucose, 2 g/L de phosphate dipotassique, 5 g/L d'acétate de sodium, 2 g/L de citrate d'ammonium, 0,2 g/L de sulfate de magnésium (heptahydraté), 0,04 g/L de sulfate de manganèse (monohydraté) et de tween 80 à 0,1% (v/v). Le pH final est fixé à 6,4. Avant utilisation, le milieu est autoclavé pendant 15 min à 120°C. Les milieux de culture sont utilisés sous formes de bouillons ou de milieux gélosés par addition d'agar à 15 g/L.

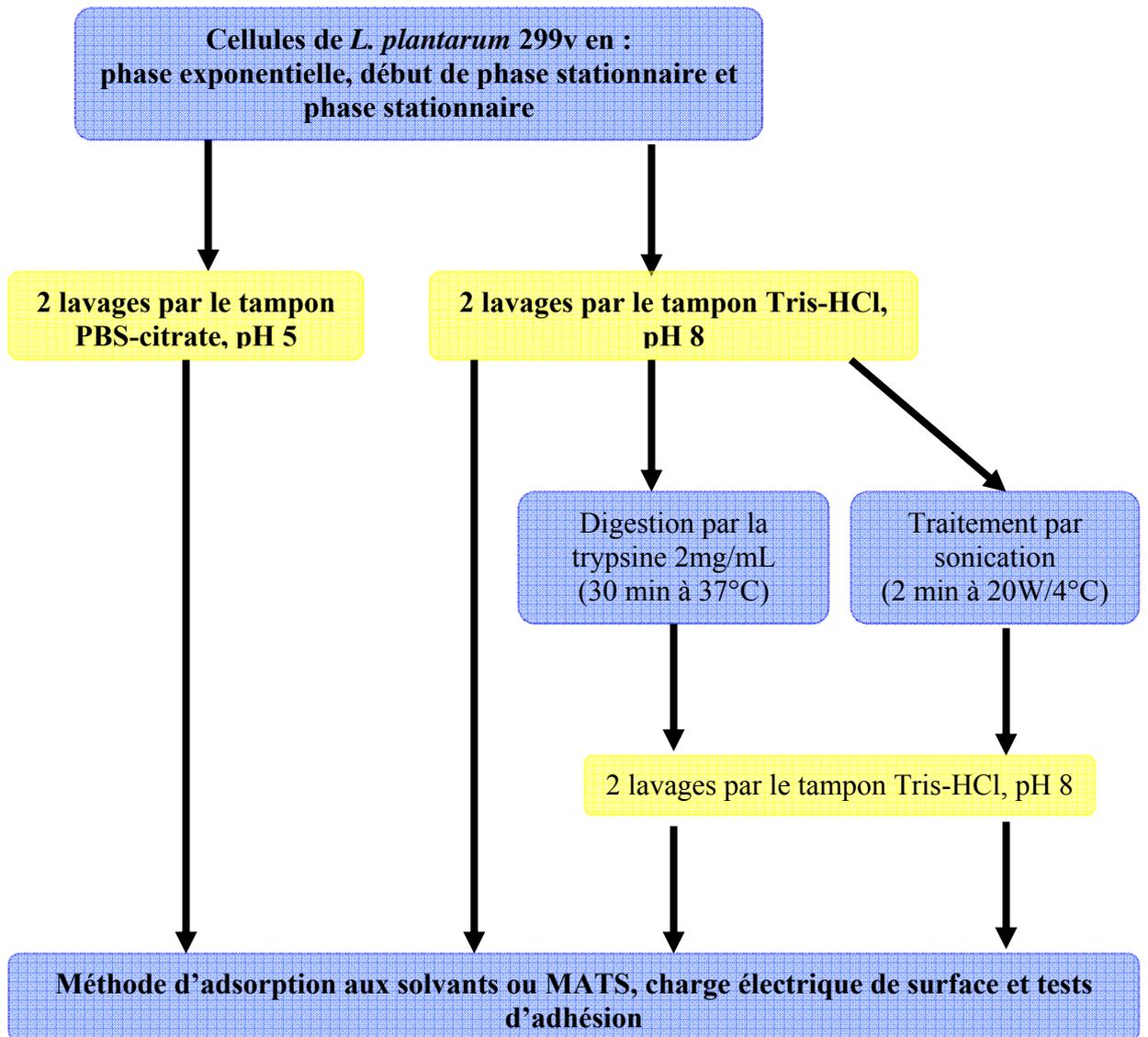
## 3 Conditions de culture

Les cultures liquides de *L. plantarum* sont inoculées à raison de 1% (v/v) avec des précultures d'une nuit puis incubées à 37°C sans agitation.

## 4 Etude des propriétés physico-chimiques de surface de *L. plantarum*

### 4.1 Etude de l'hydrophobie/hydrophilie et du caractère acide-base de Lewis

La méthode d'adhésion aux solvants (MATS) a été utilisée pour évaluer le caractère hydrophobe/hydrophile de la surface des cellules de *L. plantarum* ainsi que leur caractère acide-base de Lewis. L'hydrophobie/hydrophilie des cellules bactériennes est mesurée après



**Figure II.1** : Présentation schématique des traitements appliqués aux souches de *L. plantarum*, préalablement à l'étude des propriétés physico-chimiques de surface et de la capacité résiduelle d'adhésion.

partition des cellules entre une phase aqueuse et une phase apolaire d'hexadécane. La basicité/acidité est évaluée après séparation des cellules de *L. plantarum* entre une phase aqueuse et un solvant polaire acide accepteur d'électrons tel que le chloroforme ou un solvant polaire basique donneur d'électrons comme l'acétate d'éthyle.

Nous avons étudié l'effet de traitements mécaniques, aux ultrasons et biochimiques par la trypsine, sur l'expression des propriétés de surface des cellules de *L. plantarum* prélevées à trois stades différents de la croissance : en phase exponentielle (9h), en début de phase stationnaire (12h) et en phase stationnaire (24h). Avant la mise en œuvre du test MATS, les cellules bactériennes ont été traitées comme suit (**Figure II. 1**) :

- 1 mL de culture de *L. plantarum* prélevé à chaque stade de la croissance est centrifugé à 3500 x g pendant 5 min à 4°C. Le culot est ensuite lavé deux fois par 1 mL soit de tampon Tris-HCl 0,1 M, **pH 7,5**, soit de tampon PBS-citrate, **pH 5** puis centrifugé ;
- 5 mL de culture de *L. plantarum* prélevés à chaque phase de la croissance sont centrifugés comme décrit ci-dessus. Le culot est lavé deux fois par 5 mL de tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5 et centrifugé à nouveau. Le culot résultant est soit : (i) soniqué dans 5 mL d'une solution de NaCl 1M à une puissance de 20W pendant 3 min par impulsions de 5 sec suivies d'une phase de repos de 20 sec, à 4°C ou (ii) incubés 1h à 37°C avec 5 mL d'une solution de trypsine (Sigma) à 2 mg/mL dans un tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5. Après ces traitements, les cellules sont centrifugées à 3500 x g pendant 5 min à 4°C puis lavées deux fois avec le tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5 et centrifugées à nouveau.

Les cellules de *L. plantarum* lavées par le tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5 sans aucun autre traitement, sont considérées comme cellules contrôles. Le caractère non létal des traitements mécaniques aux ultrasons et biochimiques par la trypsine a été évalué avant la mise au point du test MATS par numération des unités formant colonies (UFC) après culture sur milieu solide MRS agar.

Les différents culots cellulaires obtenus après traitements mécanique ou biochimique sont resuspendus dans environ 2,4 mL de tampon KNO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 6,2 de manière à obtenir une densité optique de  $0,6 \pm 0,02$  à 600 nm. La suspension bactérienne est alors additionnée de 0,4 mL de solvant organique (hexadécane, chloroforme ou acétate d'éthyle). Les mélanges sont agités au vortex pendant 1 min puis laissés à reposer à température ambiante pendant 15 min. Après séparation des différentes phases, l'absorbance de la phase aqueuse est lue à 600 nm ainsi que celle de la suspension bactérienne avant l'ajout du solvant. L'affinité des cellules bactériennes pour les solvants est exprimée en pourcentage d'après la relation suivante :

$$\frac{\text{DO}_{600} \text{ (phase aqueuse de départ)} - \text{DO}_{600} \text{ (phase aqueuse après incubation avec le solvant)}}{\text{DO} \text{ (phase aqueuse de départ)}} \times 100$$

## 4.2 Etude de la charge électrique de surface

La charge nette de la surface de la bactérie est déterminée par la mesure de sa mobilité électrophorétique (ME). La ME correspond à la vitesse des particules bactériennes sous l'influence d'un champ électrique (Pelletier *et al.*, 1997). Brièvement, les cellules de *L. plantarum* récoltées en phases exponentielle (9h), en début de phase stationnaire (12h) et en phase stationnaire (24h), sont soumises aux prétraitements décrits dans la section précédente (Cf. **section 4.1**), puis sont resuspendues à une concentration de  $10^8$  UFC/mL dans un tampon de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10 mM dont le pH est ajusté à des valeurs comprises entre 1,5 et 8 par ajout de  $\text{HNO}_3$  ou KOH. La ME des bactéries traitées par la trypsine ou aux ultrasons, a été mesurée à pH 7,5.

La mobilité électrophorétique des cellules bactériennes est mesurée à température ambiante avec un zétamètre automatique (ZETAPHOREMETER IV Model Z4000, CAD Instrumentations, France) sous un champ électrique de 40 V. Avant l'injection de la suspension bactérienne dans la chambre de mesure, celle-ci est préalablement nettoyée avec de l'eau dé-ionisée. La mobilité électrophorétique moyenne des bactéries est exprimée en  $10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$  et est calculée automatiquement par l'appareil à partir de l'équation de Smoluchowsky :

La mobilité électrophorétique (ME) =  $\zeta \times [\eta / \epsilon]$  où  $\zeta$  représente le potentiel ZETA,  $\eta$  la viscosité de la solution et  $\epsilon$  la constante diélectrique.

## 4.3 Tests d'adhésion de *L. plantarum*

### 4.3.1 Adhésion sur mucine gastrique

#### 4.3.1.1 Préparation des puits:

Le protocole utilisé est adapté de la méthode de Vishwanath and Ramphal, (1984) mise au point sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Le test est réalisé sur microplaques en polystyrène 96 puits (Maxisorp Nunc, Danmark). Chaque puits servant pour le test est recouvert par 100  $\mu\text{L}$  d'une solution de mucine gastrique de porc de type III (Sigma) à 10 mg/mL. La plaque est incubée une nuit à 4°C. Les puits sont

ensuite lavés deux fois par 200  $\mu\text{L}$  de tampon PBS (8 g/L NaCl ; 0,2 g/L KCl ; 0,2 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; 1,5 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4) pour éliminer l'excès de mucine puis recouverts par 200  $\mu\text{L}$  d'une solution d'albumine sérique bovine (BSA) à 2% (p/v) dans le tampon PBS. Les microplaques sont incubées pendant 2h à 37°C. Cette étape a pour but d'enduire complètement le fond des puits de manière à éviter une adhésion non spécifique des cellules bactériennes sur le plastique. Les puits sont ensuite à nouveau lavés deux fois par 200 $\mu\text{L}$  de PBS, avant d'ajouter les cellules bactériennes.

### 4.3.1.2 Préparation des cultures de *L. plantarum*

Les cellules de *L. plantarum* 299v sont prélevées à trois stades différents de la croissance : en phase exponentielle (9h), en début de phase stationnaire (12h) et en phase stationnaire (24h), puis traitées selon la procédure décrite dans la **section 4.1**. Les cellules sont resuspendues dans du tampon PBS et diluées de manière à atteindre une  $\text{DO}_{600\text{ nm}}$  de  $0,1 \pm 0,02$  (ce qui correspond à environ  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). 100  $\mu\text{L}$  de chaque suspension bactérienne sont ajoutés par puits et la microplaque est incubée 1h à 37°C. Après incubation, la suspension contenant les bactéries qui n'ont pas adhéré, est éliminée par pipetage. Chaque puits est ensuite lavé 5 fois avec 200  $\mu\text{L}$  de tampon PBS pour éliminer totalement les cellules bactériennes qui n'ont pas adhéré à la mucine. La désorption des cellules adhérentes est réalisée par addition de 200 $\mu\text{L}$  d'une solution de triton X-100 à 0,5% (v/v) suivie d'une incubation pendant 20 min à température ambiante, sous agitation orbitale à 150 x g. Les bactéries contenues dans les 200  $\mu\text{L}$  sont dénombrées après étalement sur boîtes de MRS-agar. Chaque essai d'adhésion est réalisé trois fois et le nombre de bactéries adhérentes est exprimé par la moyenne du nombre d'UFC/puits.

### **4.3.2 Adhésion sur cellules épithéliales Caco-2**

#### 4.3.2.1 Conditions de culture et préparation des cellules pour le test d'adhésion

Ce protocole est adapté de Forestier *et al.*, (2001). L'adhésion est réalisée sur des cellules épithéliales intestinales de la lignée Caco-2 isolées à partir d'un adénocarcinome de côlon humain.

Les cellules sont cultivées dans le milieu DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Minimal Essential Medium, Gibco) supplémenté à 10% (v/v) en sérum de veau fœtal décomplémenté (Gibco), 100 U/mL de pénicilline et streptomycine (Gibco) et à 1mM de pyruvate de sodium (Gibco). Les cellules sontensemencées dans des microplaques à 12 puits (Nunclon<sup>TM</sup> Surface,

Nunc) à raison de  $5 \times 10^4$  cellules/puits, puis incubées à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture est changé tous les 2 jours et les cellules sont utilisées au bout de 15 jours, lorsqu'elles sont à confluence totale. Avant utilisation, la monocouche est lavée deux fois avec une solution de PBS, puis 0,5 mL de DMEM contenant de la BSA à 2% (p/v) sont ajoutés dans chaque puits et les plaques sont incubées 2h à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>. Après incubation, la solution de BSA dans le DMEM est éliminée et les puits sont lavés deux fois avec 0,5 mL de tampon PBS.

### 4.3.2.2 Préparation de la culture de *L. plantarum* pour le test d'adhésion sur les cellules Caco-2

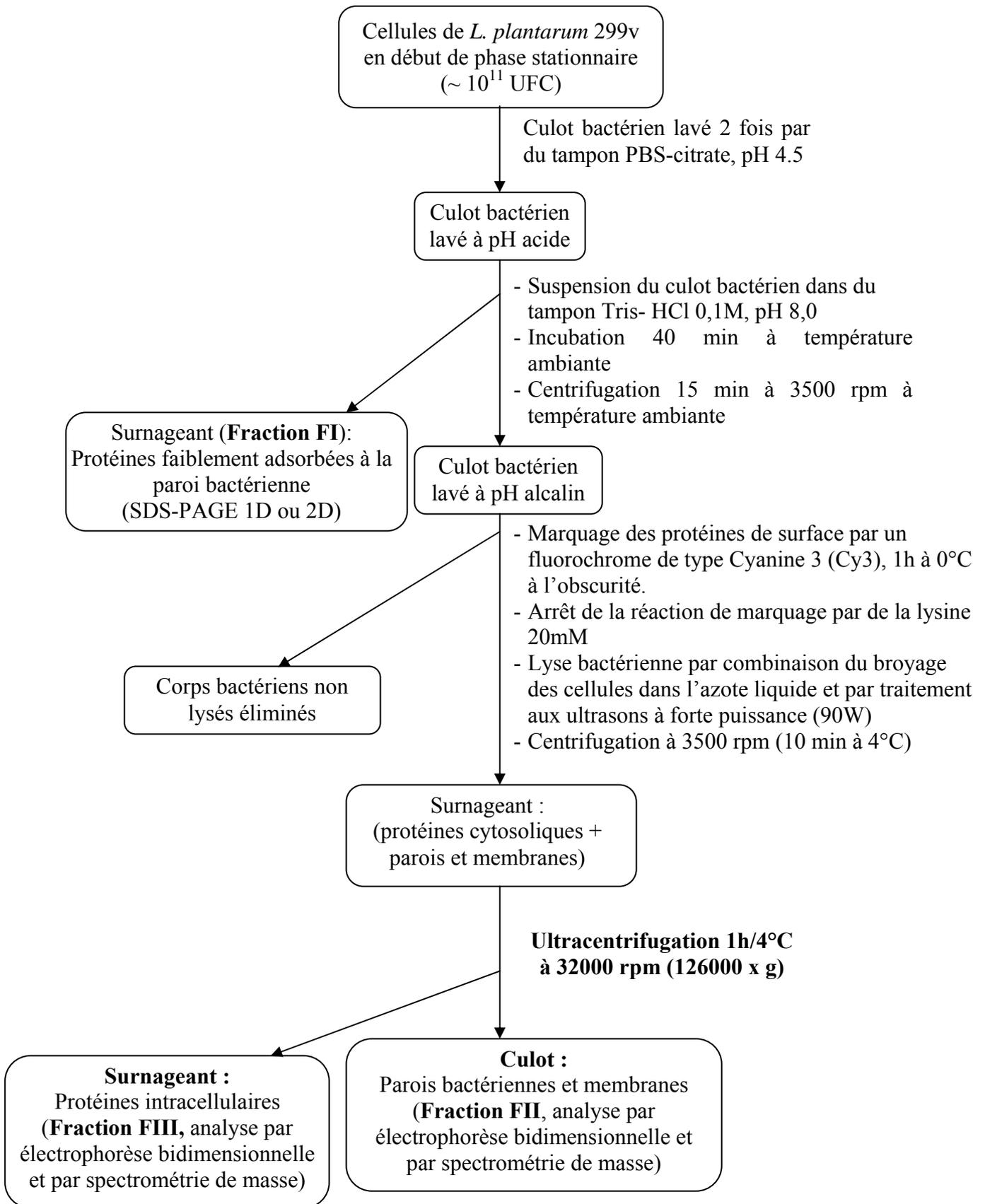
Les cellules de *L. plantarum* ayant subi les différents traitements décrits dans la section 4.1 sont resuspendues dans 1 mL de milieu DMEM et diluées 20 fois dans le même milieu. 150 µL de la suspension sont ajoutés à chaque puits et la plaque est incubée 1h à 37°C sous une atmosphère de 5% en CO<sub>2</sub>. Les puits sont ensuite lavés trois fois avec du PBS et les cellules Caco-2 sont lysées avec 0,5 mL d'une solution de Triton X-100 à 0,05% (v/v). Le nombre de cellules bactériennes viables ayant adhéré, est déterminé par dénombrement sur boîte de Petri contenant du milieu MRS gélosé. Chaque essai d'adhésion est réalisé trois fois et le nombre de bactéries adhérentes est exprimé par la moyenne du nombre d'UFC/puits.

## **5 Extraction des entités protéiques de surface de *L. plantarum* 299v**

### **5.1 Extraction de la fraction protéique faiblement adsorbée à la paroi**

Nous avons isolé deux fractions protéiques de la surface de *L. plantarum* 299v, une fraction faiblement adsorbée à la paroi et une fraction d'entités protéiques plus fortement ancrées au niveau du peptidoglycane (**Figure II.2**).

La fraction protéique faiblement associée à la paroi de *L. plantarum* 299v est isolée à partir de 400 mL d'une culture en début de phase stationnaire. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 3500 x g pendant 10 min puis lavées deux fois avec du tampon phosphate-citrate, pH 5,0. Les culots ainsi lavés sont ensuite resuspendus dans 200 mL de tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 et incubés sous agitation orbitale à 100 x g pendant 30 min à température ambiante. Les bactéries sont éliminées par centrifugation à 3500 x g pendant 15 min et le surnageant est filtré sur membrane 0,22 µm (Millipore), dialysé 48h contre 200 volume d'eau distillée et enfin concentré et séché par lyophilisation. La fraction protéique ainsi récupérée est identifiée fraction **FI**.



**Figure II.2** : Schéma général du procédé d'extraction des protéines associées à la paroi de *L. plantarum* 299v.

## 5.2 Marquage spécifique puis extraction d'une fraction protéique fortement associée à la paroi de *L. plantarum* 299v

Les cellules de *L. plantarum* 299v ( $10^{12}$  UFC) issues de 200 mL d'une culture en début de phase stationnaire sont lavées trois fois avec du tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. Les cellules lavées sont resuspendues dans 1,5 mL de tampon PBS, pH 8,5. 4 pmoles de Cyanine 3 (CyDye DIGE fluors minimal labelling, GE Healthcare), solubilisées dans du DMF à une concentration initiale de 1 nmole/ $\mu$ L, sont additionnées. La suspension bactérienne en présence du marqueur Cy3 est incubée pendant 1h à 4°C et à l'obscurité. La réaction de marquage est ensuite stoppée par addition de 20  $\mu$ L d'une solution de lysine 10mM et les cellules bactériennes sont récupérées par centrifugation à 3500 x g pendant 10 min à 4°C. Le culot bactérien est lavé deux fois avec du tampon Tris 50mM-EDTA 5mM puis broyé dans de l'azote liquide. Le broyat est resuspendu dans 37 mL de tampon Tris-HCl 50mM, pH 8,0 contenant des inhibiteurs de protéases : 5 mM EDTA (Sigma), 1mM PMSF (Sigma) et 23 $\mu$ M de leupeptine (Sigma). La suspension est ensuite soniquée pendant 3 min à 4°C à 90W avec un sonificateur Vibracell VC 750 Ultrasonic Processor équipé d'une sonde de 3 mm (Fisher Scientific Bioblock, Illkirch, France). Les débris cellulaires non lysés sont éliminés par centrifugation à 3500 x g pendant 10 min. Le surnageant contenant les protéines cytosoliques et les fragments de parois et de membranes, est ultracentrifugé à 126000 x g pendant 1h à 4°C. Les culots constitués des morceaux de parois et de membranes bactériennes (**Fraction FII**) et le surnageant d'ultracentrifugation contenant les protéines intracellulaires (**Fraction FIII**) sont ensuite stockés à -20°C et à l'obscurité.

## 5.3 Caractérisation biochimique des différentes fractions protéiques

### 5.3.1 Dosage des protéines par la méthode de Bradford (Bradford, 1976)

La concentration en protéines est mesurée par spectrophotométrie à 595 nm, en présence de bleu de Coomassie (réactif de Bradford). Les échantillons sont dilués dans 0,8 mL d'eau, auxquels sont ajoutés 200  $\mu$ L de réactif de Bradford (Bio-rad). Ils sont ensuite incubés 30 min à température ambiante, et l'absorbance est lue à 595 nm contre un témoin approprié. Une gamme de BSA est utilisée comme standard.

### 5.3.2 Analyse des protéines par électrophorèse monodimensionnelle

Les protéines d'intérêt sont solubilisées dans un tampon Tris-HCl, pH 6,8 à 0,25 M, glycérol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), bleu de Bromophénol 0,01 % (p/v) et 2-β mercaptoéthanol 0,05 % (v/v), puis traitées à 100°C pendant 3 min à 100 °C. Les protéines dénaturées sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) à 10% dans un tampon Tris-glycine (Tris 25mM, glycine 192mM, SDS 0,1% pds/vol, pH 8,3) selon Laemmli, (1970). L'épaisseur du gel de polyacrylamide est fixée à 1 mm. La séparation est réalisée sous une tension constante fixée à 125V à l'aide d'un système « Novex Mini-Cell» (Invitrogen).

- **Gel de séparation :**

Acrylamide/Bis-acrylamide (29 : 1) (Sigma) 10% (p/v), SDS 0.1% (p/v), Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8.

La réaction de polymérisation est catalysée par 625 µL d'une solution de persulfate d'ammonium à 50 mg/mL et 6 µL de TEMED (tetraméthyl éthylène diamine, Sigma).

- **Gel de concentration :**

Acrylamide/Bis-acrylamide (29 :1) 4% (p/v), SDS 0,1% (p/v), Tris-HCl 0,166 M, pH 6,8. La polymérisation est catalysée par 1 mL de d'une solution de persulfate d'ammonium à 50 mg/mL et 5 µL de TEMED.

### 5.3.3 Analyse des fractions protéiques par électrophorèse bidimensionnelle

Les deux fractions protéiques isolées de la surface de *L. plantarum* 299v et identifiées **FI** et **FII**, sont analysées par électrophorèse bidimensionnelle ou 2D.

Les échantillons lyophilisés sont solubilisés dans un tampon Tris 30mM contenant de l'urée 8M, de la thiourée 2M, du CHAPS 4% (p/v), de l'EDTA 0,5mM, du DTT 1mM ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostic). Les protéines solubilisées sont déssalées par l'utilisation du kit "2D clean up" selon la procédure décrite par le fournisseur (GE Healthcare). Les culots protéiques résultants sont à nouveau solubilisés dans le tampon 8M urée, thiourée 2M et CHAPS 4% (p/v) et les protéines sont quantifiées à l'aide du kit "2D Quant" (GE Healthcare).

L'étape de focalisation isoélectrique des protéines est réalisée sur une bande "Immobilized pH gradient, IPG strips" de 18 cm de long avec un gradient linéaire de pH de 3

à 10 (GE Healthcare). Les bandes IPG sont préalablement hydratées pendant 12h à température ambiante dans un tampon contenant de l'urée 8M, de la thiourée 2M, du CHAPS 4% (p/v), du DTT 65mM ainsi qu'un tampon IPG, pH 3 à 10 (GE Healthcare). Pendant l'étape de réhydratation, les bandes IPG sont recouvertes d'huile minérale (GE Healthcare). Après l'étape de réhydratation, environ 450 µg de protéines solubilisées dans le tampon, 8M urée, thiourée 2M et 4% CHAPS (p/v), sont déposés sur la bande IPG, du côté anode dans des cupules de dépôt (Cap loading, GE Healthcare). La focalisation isoélectrique des protéines est réalisée dans une cellule IPGphor II (GE Healthcare) et avec une intensité limitée à 75 µA/bande IPG. La migration est effectuée pendant 18h30 à température de 20°C jusqu'à atteindre un total de 80 kVhs. Les bandes IPG sont soumises à un traitement de réduction puis d'alkylation à température ambiante en deux étapes de 15 min chacune. Ces traitements sont réalisés dans un tampon Tris 50mM, contenant de l'urée 6M, du glycérol 30% (v/v), des traces de bleu de bromophénol et du DTT (agent réducteur) 50mM ou de l'iodoacétamide (agent alkylant) 55mM respectivement.

Pour l'étape de la deuxième dimension, les bandes IPG sont déposées sur un gel SDS-PAGE 10% (24 x 26 cm) puis elles sont recouvertes d'un gel d'agarose 1% (p/v) de 4 cm d'épaisseur environ. La migration est réalisée à un voltage constant de 125 V selon Laemmli, (1970) pendant 4,5 h dans une cellule d'électrophorèse "Ettan DALT 6 Vertical electrophoresis systems (GE Healthcare) équipée d'un générateur de type Mini VE-SE260 (GE Healthcare).

### 5.3.4 Coloration des gels au bleu colloïdal (G-250)

Après migration, le gel est fixé pendant une nuit à température ambiante dans une solution d'éthanol à 30% (v/v) contenant de l'acide ortho-phosphorique à 2% (v/v). Une deuxième étape de fixation avec deux bains successifs de 30 minutes dans une solution d'acide ortho-phosphorique à 2% (v/v) est réalisée.

La révélation des spots protéiques s'effectue dans une solution d'éthanol à 18% (v/v) contenant de l'acide ortho-phosphorique à 2% (v/v), du sulfate d'ammonium à 15% (p/v) et du bleu colloïdal G-250 à 0,02% (p/v). La dernière étape consiste en une incubation de 48h à température ambiante et sous agitation orbitale.

### **5.3.5 Coloration des protéines au nitrate d'argent**

Après migration les gels sont fixés 2h ou une nuit dans une solution d'éthanol à 50% (v/v), contenant de l'acide acétique à 12% (v/v) et du formaldéhyde 0,1% (v/v). Les gels sont ensuite réhydratés avec deux bains successifs de 20 min dans une solution d'éthanol/H<sub>2</sub>O 50/50 (v/v) puis par un bain de 20 min dans une solution d'éthanol/H<sub>2</sub>O 30/70 (v/v). Ces derniers sont ensuite imprégnés pendant 1 min par une solution de thiosulfate de sodium à 0,02% (p/v) (Sigma). Après trois rinçages à l'eau distillée, les gels sont colorés pendant 30 min à température ambiante dans une solution de nitrate d'argent à 0,2% (p/v) et de formaldéhyde à 0,075% (v/v). Les gels sont lavés deux fois supplémentaires avec de l'eau distillée et mis à développer pendant 10 min à température ambiante dans une solution de carbonate de sodium à 6% (p/v), contenant du formaldéhyde à 0,05% (v/v) et 2 ml d'une solution de thiosulfate de sodium à 0,2 g/L. La réaction de développement est stoppée avec une solution de méthanol à 50% (v/v) contenant de l'acide acétique à 12% (v/v).

Les électrophorégrammes mono et bidimensionnels des protéines de surface marquées par la cyanine Cy3 sont révélés à l'aide d'un scanner réglé aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de la cyanine 3 soit 554/568 nm respectivement.

### **5.3.6 Analyse des spots protéiques par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF**

Pour l'étude protéomique des protéines séparées sur gels mono et bidimensionnels, nous avons mis au point un protocole de réduction-alkylation-digestion "in-gel" de chaque bande ou spot protéique séparé sur gel.

#### *5.3.6.1 Etape de lavage des échantillons*

Une fois séparées sur le gel d'électrophorèse, les protéines d'intérêt sont excisées du gel et placées dans des tubes eppendorfs ou plaques de 96 puits exempts de kératine. Les spots sont décolorés par trois lavages successifs dans 100 µL d'un mélange acétonitrile (ACN)/NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25mM 60/40 (v/v) pendant 10 min. Les spots sont ensuite déshydratés par 50 µL d'ACN pendant 5 min puis séchés pendant 10 min sous vide à l'évaporateur centrifuge (Speed VAC).

### 5.3.6.2 Réduction et alkylation des protéines

Les morceaux de gels déshydratés sont réduits pendant 1h à 56°C dans 50 µL d'une solution de dithiothreitol (DTT, Sigma) à 10 mM dans du tampon NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM. 50 µL d'une solution alkylante d'iodoacétamide 55 mM dans un tampon NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25mM, sont ajoutés. Après 30 min de réaction d'alkylation, l'excédent est éliminé, puis les morceaux de gels sont lavés pour éliminer les traces de DTT et d'iodoacétamide. Les morceaux de gels sont ensuite déshydratés avant addition de la trypsine. Les protéines sont digérées "in-gel" pendant une nuit à 37°C dans 30 à 35 µL d'une solution de trypsine TPCK (Sigma) à 5 µg/mL dans du tampon NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25mM.

### 5.3.6.3 Extraction des peptides

L'étape d'extraction doit permettre la diffusion passive des peptides du gel vers la solution d'extraction. Cette étape est primordiale pour avoir un signal le plus intense possible lors de l'analyse par spectrométrie de masse. Les peptides sont extraits pendant 15 min à température ambiante avec 100 µL d'une solution ACN/H<sub>2</sub>O/acide acétique 60/40/0,1 (v/v/v). L'opération est répétée trois fois. Les peptides ainsi extraits sont ensuite concentrés sous vide à environ 10 µL. Avant l'analyse par spectrométrie de masse, les mélanges peptidiques sont dessalés sur des systèmes Zip C18 (Millipore) selon les instructions du fabricant.

### 5.3.6.4 Analyse par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF

Les échantillons protéiques dessalés sont mélangés volume à volume avec une solution de matrice d'acide  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-cinnamique à 4 mg/ml dans une solution ACN/ TFA 50/0,1 (v/v). Une fraction de ce mélange (environ 2 µL) est déposée au centre de la cible MALDI. Après séchage de la cible, l'analyse des masses est réalisée en mode MALDI-TOF sur un système SM/MALDI-Q-TOF Premier instrument (Waters, Manchester, UK). La désorption/ionisation est réalisée par irradiation laser, avec un laser à azote à 337 nm. Les spectres obtenus sont soumis à une recherche dans la banque de données Swissprot ou NCBI en utilisant le logiciel MASCOT mass mapping.

## 5.4 Evaluation *in vitro* de l'affinité, des protéines extraites de la paroi de *L. plantarum* 299v, pour différentes cibles du tractus intestinal

### 5.4.1 Test d'affinité sur microplaque

Le test est réalisé sur microplaques de polystyrène 96 puits (Maxisorp Nunc). Chaque puits servant pour le test est recouvert par 100  $\mu$ L de solution de collagène de type I de veau (0,5 mg/ml) (Sigma), de fibronectine humaine (0,5 mg/ml) (Becton Dickinson), laminine de souris (0,5 mg/ml) (Becton Dickinson) ou de mucine gastrique de porc (30 mg/ml) (Sigma). La plaque est incubée une nuit à 4°C. Les puits sont ensuite lavés deux fois avec 200  $\mu$ L de tampon PBS, puis recouverts par 200  $\mu$ L d'une solution de BSA à 2% (p/v) dans le tampon PBS, pendant 2h à 37°C. Les puits sont à nouveau lavés deux fois par 200 $\mu$ L de PBS et 100  $\mu$ L d'une solution de l'extrait FI (voir section 5.1) à 1 mg/mL sont ajoutés à chaque puits. Après 2h d'incubation à 37°C, les puits sont lavés 5 fois avec du tampon  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50mM afin d'éliminer les protéines non adsorbées. Les protéines ayant de l'affinité pour les cibles sont désorbées par 100 $\mu$ L d'une solution de SDS à 2% (p/v) pendant 1h30 à 37°C, sous agitation orbitale. Les fractions collectées sont analysées par SDS-PAGE selon les conditions décrites dans la section 5.3.2.

### 5.4.2 Chromatographie d'affinité sur mucine et collagène de type I

L'estérification des fonctions carboxyliques du Sepharose avec du N-hydroxysuccinimide (NHS) conduit à la formation d'esters activés qui réagissent rapidement et efficacement avec des ligands contenant des groupes amino telles que les protéines, conduisant à la formation de liaisons amides stables.

#### 5.4.2.1 Procédure de greffage du collagène type I et de la mucine

3 mL de Sepharose 4B pré-activé (Amersham Biosciences) sont lavés 15 fois avec 3 mL d'une solution d'HCl 10mM. Après lavage, le gel est mélangé avec 2 mL d'une solution de collagène type I à une concentration finale de 1,8 mg/mL dans du tampon  $\text{NaHCO}_3$  0,1M, NaCl 0,5M, pH 8, puis incubé pendant 2h30, à température ambiante sous une agitation orbitale à 200 rpm. La phase stationnaire de Sepharose ainsi couplée, est lavée deux fois avec du tampon  $\text{NaHCO}_3$  0,1M, NaCl 0,5M, pH 8, puis à nouveau lavée en alternance par 50 mL de tampon Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,5M, pH 8 puis par 30 mL de tampon acétate de sodium 0,1M-NaCl 0,5M, pH 4.

Pour le greffage de la mucine, le même mode opératoire est utilisé en multipliant par 4 les quantités respectives en gel et en protéines à greffer.

Après ces lavages répétés, les gels greffés sont suspendus dans du tampon PBS ajusté à 10% (v/v) en éthanol puis conditionnés soit dans une colonne Tricorn (Amersham Biosciences) 5/50 (5 x 50 mm) pour le Sepharose greffé collagène type I ou dans une colonne API waters (10 x 120 mm) pour le Sepharose greffé mucine.

#### 5.4.2.2 Conditions chromatographiques

Pour la chromatographie d'affinité sur mucine, 1 mL d'une solution de l'extrait brut FI de *L. plantarum* 299v, à 0,17 mg/mL dans le tampon  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25mM, pH 8, est injecté (Injecteur Réodyne 7125) sur la colonne de Sepharose greffé mucine. L'élution est réalisée à 0,3 mL/min en mode gradient de phase mobile à l'aide d'une pompe Kontron 320. Les conditions d'élution sont indiquées dans le **Tableau II.1**.

L'absorbance de l'éluat est mesurée en continu à 280 nm à l'aide d'un détecteur UV Kontron modèle 322. L'éluat est collecté par fraction de 3 mL à l'aide d'un collecteur Bio-rad modèle 2110.

**Tableau II.1** : Gradient d'élution utilisé pour la chromatographie d'affinité sur mucine.

Temps (min)	%A ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 25mM, pH 8)	%B ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0,1M-NaCl 2M, pH 4)	%C ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 25mM, pH 8-urée 6M)
0	100	0	0
120	100	0	0
135	0	100	0
195	0	100	0
210	100	0	0
250	100	0	0
265	0	0	100
365	0	0	100
380	100	0	0

Le même protocole expérimental est mis en œuvre pour la chromatographie d'affinité sur collagène type I. 0,1 mL d'une solution à 1,17 mg/mL de l'extrait FI de *L. plantarum* 299v est injecté sur la colonne de Sepharose greffé collagène type I. Le débit d'élution est fixé

à 0,05 mL/min. L'absorbance est mesurée en continu à 280 nm. L'éluat est collecté par fractions de 0,5 mL et les conditions d'éluion sont indiquées dans le **Tableau II.2** ci dessous :

**Tableau II.2** : Gradient d'éluion utilisé lors de la chromatographie d'affinité sur collagène type I.

Temps (min)	%A (NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 25mM, pH 8)	%B (CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> 0,1M-NaCl 2M, pH 4)
0	100	0
150	100	0
210	0	100
290	0	100
350	100	0
400	100	0

## 5.5 La GAPDH associée à la paroi de *L. plantarum* 299v : contribution à l'étude de son exportation et de son rôle à la surface de la bactérie

### 5.5.1 Extraction des formes pariétale et intracellulaire de GAPDH

Une culture de 200 mL de *L. plantarum* 299v en début de phase stationnaire est lavée par du tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 afin d'extraire les protéines de la fraction FI comme décrit dans la section 5.1. L'extrait est ensuite concentré dix fois par ultrafiltration à l'aide d'une cellule Amicon (Millipore, Bedford, USA) équipée d'une membrane en cellulose régénérée de seuil de coupure de 10 kDa (Millipore), sous une pression de 1,5 bar. L'extrait concentré est diafiltré par une série de dilutions/concentrations réalisée à 4°C avec du tampon NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM pH 7,5 contenant de l'EDTA 5 mM, du PMSF 1 mM et du DTT 5 mM (Tampon A). L'extrait concentré et diafiltré est ensuite additionné de sulfate d'ammonium à 85% de saturation. La suspension est placée à 4°C pendant 18h. Après centrifugation à 16000 x g, le précipité est solubilisé dans 4 mL de tampon A, puis dialysé une nuit à 4 °C contre ce même tampon.

La forme intracellulaire de la GAPDH a été extraite à partir des culots bactériens lysés dans le tampon A, à l'aide d'un broyeur à microbilles (Mini-Beadbeater<sup>TM</sup>, Biospec Products). Les corps bactériens non lysés sont éliminés par centrifugation à 3500 x g pendant

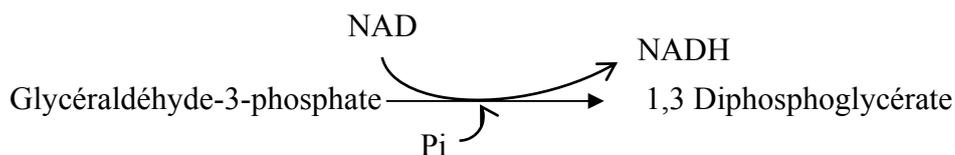
15 min à 4°C, et le surnageant contenant les protéines cytosoliques présentes dans le surnageant sont précipitées au sulfate d'ammonium puis traitées comme cité ci-dessus.

### 5.5.2 Purification des deux formes de GAPDH

Les formes de GAPDH intracellulaire et associée à la paroi de *L. plantarum* 299v sont purifiées à température ambiante en une seule étape de chromatographie de pseudo-affinité. La phase stationnaire est greffée avec le ligand bleu cibacron F3G-A possédant une structure 3D mimétique de celle du NAD, ce qui lui confère la capacité d'être reconnu spécifiquement par des enzymes utilisant le NAD comme coenzyme. Les extraits dialysés de protéines intracellulaires et de paroi sont déposés sur une colonne « Fast Flow blue Sepharose CL 6B » (GE Healthcare). La séparation chromatographique est réalisée à l'aide d'un système Waters 600 E équipé d'une station d'acquisition et de traitement de données Millennium<sup>32</sup>. Le volume de la colonne est de 5 mL et le débit d'élution est fixé à 2 mL/min. L'absorbance de l'éluat est mesurée en continu à 280 nm (Détection UV Waters 486). Les protéines présentant de l'affinité pour la phase stationnaire sont ensuite éluées avec un gradient linéaire de 0 à 10mM de NAD dans le tampon A (Cf. 5.5.1). Des fractions d'éluat de 2 mL sont collectées à l'aide d'un collecteur modèle 2110 (Bio-rad, USA). Chaque fraction est analysée sur la base de son contenu en protéines et en activité GAPDH. Les fractions présentant de l'activité GAPDH sont rassemblées. La pureté est contrôlée par SDS-PAGE.

### 5.5.3 Test d'activité GAPDH

La mesure d'activité des deux formes de GAPDH (associée à la paroi et cytoplasmique) est adaptée de Ferdinand (1964). La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase est une enzyme clé de la glycolyse. Elle catalyse la phosphorylation du glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3 diphosphoglycérate en présence de NAD ( $\beta$ -nicotinamide adenine dinucléotides) et de phosphate inorganique.



### 5.5.3.1 Mesure de l'activité GAPDH cytosolique

Une fraction aliquote de l'extrait intracellulaire contenant de la GAPDH est incubée avec 7 µL de Glycéraldéhyde-3-Phosphate à 49 mg/mL (Sigma), additionnés de 100 µL d'une solution de NAD 10 mM (Sigma) dans un volume final de 1 mL de tampon triéthanolamine 40 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, EDTA 5 mM, et dithiothreitol 0,1 mM, pH 8,6. L'activité est mesurée à température ambiante par suivi de l'absorbance à 340 nm. Une unité d'activité enzymatique (U) correspond à 1 µmole de NADH, H<sup>+</sup> libérée par min dans les conditions du test.

### 5.5.3.2 Mesure de l'activité GAPDH liée à la paroi

Un culot issu de la centrifugation de 1mL de culture de *L. plantarum* 299v, est lavé deux fois avec du tampon phosphate-citrate, pH 5,0 puis re-suspendu dans un volume final de 1 mL de tampon triethanolamine 40 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, EDTA 5 mM, dithiothreitol 0,1 mM, pH 8,6, en présence de 7 µL de glycéraldéhyde-3-Phosphate (49 mg/mL) additionnés de 100 µL d'une solution de NAD à 10 mM. Le mélange réactionnel est incubé pendant 4 min à température ambiante. Les corps bactériens sont éliminés par centrifugation à 8000 x g pendant 1 min et l'activité GAPDH est mesurée sur le surnageant par suivi de l'absorbance à 340 nm. L'activité enzymatique est calculée comme décrit précédemment.

## 5.5.4 Comparaison des structures primaires des formes de GAPDH cytosolique et associée à la paroi

Les masses moléculaires des formes purifiées de GAPDH, cytosolique et associée à la paroi, sont estimées par spectrométrie de masse en mode LC ESI-SM/SM (Thermo Fischer). Les deux formes de GAPDH sont séparées par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur colonne C4 (150 x 2,1 mm, Vydac) constituée de particules de 5 µm et de 30 nm de porosité. Avant injection sur la colonne C4, les préparations de GAPDH purifiées sont dialysées contre un tampon NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM, pH 8,8. La sortie de la colonne est connectée directement à la source nanospray d'un spectromètre de masse LCQ Advantage ion trap.

La structure primaire des deux formes purifiées de GAPDH est déterminée par spectrométrie de masse en mode LC ESI-MS/MS. Les deux formes de GAPDH sont soumises à une protéolyse trypsique comme décrit dans la section 5.3.6. Les peptides trypsiques

correspondant à chaque forme de GAPDH sont séparés par HPLC en phase inversée sur une colonne capillaire C 18 (150 x 2,1 mm, Vydac) à un débit de 0,2 mL/min. Les peptides élués sont introduits directement dans la source nanospray du spectromètre de masse LCQ Advantage ion trap.

#### **5.5.5 Estimation de la masse moléculaire des formes natives de GAPDH pariétale et intracellulaire**

La masse moléculaire de chacune des deux formes de GAPDH, est estimée par filtration moléculaire sur gel. Environ 125 µg de chaque forme de GAPDH purifiée sont solubilisés dans 0,5 mL de tampon NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM, pH 7,5 contenant du DTT 5 mM, de l'EDTA 5mM, du PMSF 1mM et du NAD 10mM, puis déposés sur une colonne Superdex 200 (10/300 mm, Tricorn, GE Healthcare). La phase stationnaire est éluée à un débit de 0,5 mL/min avec le même tampon dépourvu de NAD. L'éluat est collecté par fraction de 0,5 mL. La détection est réalisée à 280 nm. Chaque fraction est caractérisée sur la base de son contenu en GAPDH par la mesure de son activité enzymatique. La masse moléculaire des deux formes de GAPDH est estimée grâce à une courbe d'étalonnage établie à l'aide du mélange de marqueurs : thyroglobuline (669 kDa), apoferritine (440 kDa), β-amylase (200 kDa), sérum albumine bovine (67 kDa), anhydrase carbonique (29 kDa), aprotinine (6500 Da) et le cytochrome C (12400 Da).

#### **5.5.6 Production d'anticorps polyclonaux spécifiques de la forme de GAPDH associée à la paroi de *L. plantarum* 299v**

Des anticorps polyclonaux anti-GAPDH associée à la paroi de *L. plantarum* 299v ont été produits chez le lapin par la société Proteogenix (Valparc, France). Un lapin mâle (race New Zelande) est immunisé avec 2 mg de la forme purifiée de GAPDH associée à la paroi de *L. plantarum* 299v. Après 90 jours d'immunisation, le lapin est sacrifié et son sérum est récupéré. Les anticorps anti-GAPDH sont ensuite purifiés par chromatographie d'affinité sur protéine A et leur réactivité est testée par la méthode ELISA à une dilution de 1:65000.

#### **5.5.7 Effet du pH sur l'association de la GAPDH à la paroi**

La localisation de la GAPDH au niveau de la paroi de *L. plantarum* 299v est établie par immunofluorescence selon un protocole adapté d'Antikainen *et al.*, (2007). Des cellules de *L. plantarum* 299v collectées en phase stationnaire (10<sup>9</sup> UFC/mL) sont lavées soit avec un

tampon PBS à pH 7,5 soit avec un tampon phosphate-citrate à pH 5,0. 20 µL de la suspension sont déposés sur des lames en verre, fixés à la flamme puis avec une solution de paraformaldéhyde à 3,5% (p/v) pendant 15 min à température ambiante. Les lames sont ensuite lavées deux fois par un tampon PBS et incubées 30 min à 37°C avec les anticorps anti-GAPDH préalablement dilués au 1:50 dans du tampon PBS. Après incubation, les lames sont lavées trois fois 10 min avec du tampon PBS, et incubées de nouveau 30 min à 37°C avec des anticorps anti-IgG de lapin, couplés au fluorochrome Alexa-488. Les anticorps secondaires sont dilués au 1 :100 dans du tampon PBS (Molecular probes, Invitrogen). Les lames sont ensuite lavées trois fois 10 min avec du tampon PBS puis observées à l'aide d'un microscope confocale (Zeiss).

### **5.5.8 Etude de "l'exportation" de la GAPDH à la surface de la bactérie**

#### **5.5.8.1 Contrôles de paramètres cultureux et de l'évolution de l'activité GAPDH associée à la paroi au cours de la croissance**

L'évolution de paramètres cultureux tels que le pH, la concentration résiduelle en source carbonée, le nombre de cellules bactériennes ainsi que l'activité GAPDH associée à la paroi ont été contrôlés au cours de la croissance de la souche probiotique.

Le pH de la culture est mesuré à l'aide d'un pH mètre (micro pH 2000, CRISON) toutes les 3 heures au cours de la culture.

L'activité GAPDH associée à la paroi est estimée aux mêmes intervalles de temps par la méthode décrite dans la section (5.5.3.2).

Le nombre de cellules viables de *L. plantarum* 299v est déterminé par numération du nombre d'UFC sur milieu MRS gélosé.

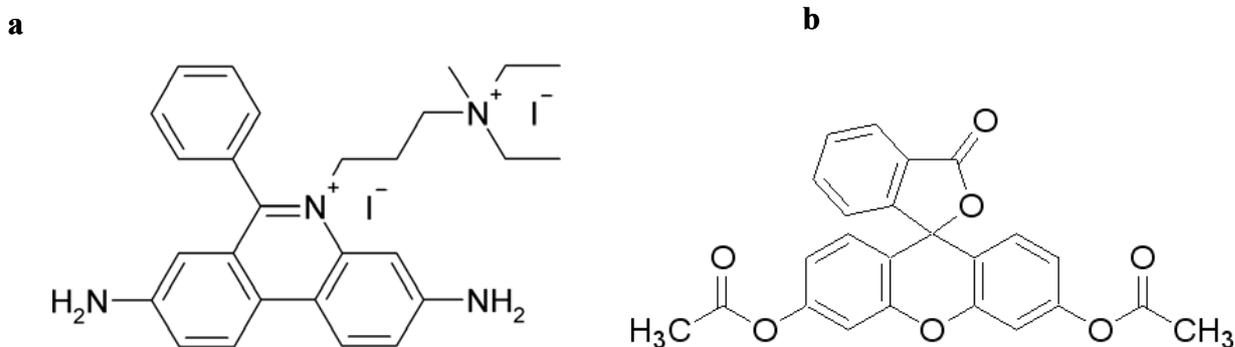
La disponibilité en source de carbone dans le milieu de culture au cours de la croissance est évaluée par chromatographie liquide haute performance (HPLC). La méthode est adaptée de Morales *et al.*, (1998). Le surnageant de culture est dilué par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de telle sorte que la concentration finale en acide soit de 5mM. Le facteur de dilution est adapté en fonction de l'échantillon à analyser. Après centrifugation, durant 2 min à 10 000 x g, 20µL de surnageant sont injectés sur une colonne Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm, BioRad, USA) équipée d'une pré-colonne Micro-Guard (BioRad, USA). L'élution est réalisée en mode isocratique par du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM à un débit de 0,6 mL/min, à 35°C. L'éluat est analysé par deux détecteurs en série: un détecteur UV modèle 486 (WATERS) réglé à 215 nm puis un réfractomètre différentiel modèle RI detector 475 (Kontron Instruments, Suisse), placé en

série à la sortie du précédent. L'acquisition des données est réalisée par une station Millennium<sup>32</sup> (WATERS). Les analyses qualitative et quantitative de glucose sont réalisées par comparaison avec un chromatogramme étalon réalisé dans les mêmes conditions expérimentales.

#### 5.5.8.2 Etude de la perméabilité membranaire par cytométrie en flux

La cytométrie en flux est mise en œuvre pour suivre les évolutions de la perméabilité membranaire et de l'activité métabolique des cellules bactériennes à différents intervalles de croissance. Deux fluorochromes ont été sélectionnés : l'Iodure de Propidium ou IP pour mettre en évidence l'altération de la perméabilité membranaire et la Fluoresceïne DiAcétate ou FDA pour la mesure de l'activité métabolique.

L'IP (Molecular Probes, Oregon, USA) est un agent intercalant des acides nucléiques (l'ADN ou l'ARN) qui fluoresce ( $\lambda_{\text{excitation maximum}} = 535 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{\text{émission maximum}} = 617 \text{ nm}$ ). La masse moléculaire de l'IP est de 668,4 Da. L'IP est couramment utilisé afin de marquer le noyau de cellules ayant perdu leur intégrité membranaire. Il est employé en microscopie à épifluorescence, en microscopie confocale ou en cytométrie en flux. Sa structure chimique est donnée sur la **Figure II.3a**.



**Figure II.3 :** (a) Structure chimique de l'iodure de propidium (MM : 668,4 g/mol), (b) Structure de la fluoresceïne diacétate (MM : 416,38 g/mol).

L'iodure de propidium se fixe au niveau des brins d'ADN sans affinité particulière, avec une stéréochimie d'une molécule d'IP pour 4 à 5 paires de base. Une fois fixé, l'intensité de fluorescence de l'IP est augmentée de 20 à 30 fois. Ce fluorochrome est utilisé comme un indicateur de viabilité cellulaire, car les membranes plasmiques intactes, caractéristiques des

cellules vivantes, sont imperméables à ce composé. L'IP ne peut marquer que les cellules mortes ou endommagées, c'est à dire celles dont la perméabilité membranaire est altérée.

La Fluorescéine DiAcétate (FDA) (**Figure II.3b**) est un composé non fluorescent qui a la propriété de pénétrer passivement par diffusion moléculaire dans la plupart des cellules. Une fois à l'intérieur des cellules, la molécule subit une hydrolyse enzymatique par des estérases intracellulaires non spécifiques et il s'en suit la libération d'un produit ionisé fluorescent, la fluorescéine ( $\lambda_{\text{excitation maximum}} = 488 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{\text{émission maximum}} = 508 \text{ nm}$ ). Ce produit fluorescent est séquestré uniquement dans le cytoplasme des cellules qui possèdent une membrane plasmique intègre. Les cellules endommagées ou dont la membrane est altérée, ne retiennent ni le FDA, ni son produit d'hydrolyse fluorescent, ces derniers diffusent alors dans le milieu extracellulaire. La solution mère (10 mg/mL) de FDA est préparée dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma, USA) et conservée à 4°C à l'abri de la lumière.

Pour l'analyse par cytométrie en flux, les cellules de *L. plantarum* 299v prélevées à différents stades de la croissance : 9h, 12h, 16h, 20h, 24h et 48h, sont lavées deux fois par du tampon phosphate-citrate, pH 5,0 puis resuspendues dans ce même tampon à une concentration finale de  $10^6$  UFC/mL. La FDA est ajoutée à une concentration finale de 10 µg/mL puis la suspension est incubée pendant 15 min à 30°C. L'IP est quant à lui additionné à une concentration finale de 25 µg/mL, avant l'analyse en cytométrie en flux (Shapiro, 2008).

Les mesures sont réalisées sur un cytomètre en flux FACS Vantage Diva SE (Becton Dickinson, USA) à une longueur d'onde d'excitation de 488 nm, en utilisant un laser Argon de 25 mW. Les cellules sont aspirées à un débit de 5000 cellules/sec dans un capillaire de 70 µm de diamètre. Pour chaque essai au moins  $10^5$  cellules sont analysées. La fluorescence verte (fluorescéine, FL1) est mesurée à une longueur d'onde de  $530 \pm 15 \text{ nm}$  et la fluorescence rouge (iodure de propidium, FL3) est enregistrée à 610 nm. L'utilisation d'échantillons marqués indépendamment par chaque marqueur permet de compenser électroniquement les chevauchements de fluorescence entre chaque signal. Les résultats sont traités à l'aide du logiciel Cell Quest Pro (Becton Dickinson, USA).

### 5.5.8.3 Double marquage des cellules bactériennes par IP et anticorps anti-GAPDH

Des culots cellulaires issus de 1 mL de culture de *L. plantarum* 299v en phase stationnaire de croissance (T 24h) sont lavés deux fois par un tampon phosphate-citrate, pH 5,0 puis incubés pendant 30 min à température ambiante avec des anticorps anti-GAPDH

dilués au 1 :50 dans ce même tampon. Les cellules sont ensuite lavées deux fois puis incubées pendant 30 min à température ambiante avec des anticorps anti-IgG de lapin, couplés à l'Alexa-488. Après deux lavages des cellules par un tampon phosphate-citrate, pH 5,0, les cellules sont marquées à l'IP avant l'analyse en cytométrie en flux dans les conditions décrites dans la section précédente. La fluorescence verte est mesurée à  $530 \pm 15$  nm (Alexa-488, FL1) et la fluorescence rouge à 610 nm (Iodure de Propidium, FL3).

### 5.5.8.4 Effets d'un stress nutritionnel sur la concentration de la GAPDH pariétale et la perméabilité membranaire

Des cultures de *L. plantarum* 299v, en phase exponentielle de croissance (9h) dans un milieu MRS à 37°C, sont supplémentées en glucose afin d'atteindre une concentration finale en glucose de 20 g/L. La supplémentation en source carbonée est réalisée soit en une fois à T9h, soit en deux fois à T9h et T12h de culture. Après addition, l'incubation est prolongée jusqu'en phase stationnaire de croissance (T24h), puis les UFC sont déterminées par dénombrement sur gélose MRS, et l'activité GAPDH pariétale est évaluée selon le protocole décrit dans la section 5.5.3.2. L'intégrité des membranes cytoplasmiques est quant à elle mesurée par cytométrie en flux après un marquage des cellules à l'iodure de propidium.

### 5.5.8.5 Lyse cellulaire provoquée et suivi de la localisation de la GAPDH

5 mL d'une culture de *L. plantarum* 299v en début de phase stationnaire (12h) sont incubés 15, 30 et 60 min à 37 °C avec 0,4 U/mL de GAPDH intracellulaire obtenue par lyse mécanique d'une fraction de la même culture. Après atteinte de la durée d'incubation, 1 mL de la culture est centrifugé 5 min à 3500 x g et les cellules collectées sont lavées deux fois par un tampon phosphate-citrate, pH 5,0. L'activité GAPDH résiduelle, dans le surnageant de culture et à la surface des cellules bactériennes, est mesurée comme décrit dans la section 5.5.3.2. Les activités de la GAPDH associée à la paroi bactérienne et celle présente à l'état libre dans le milieu de culture, sont également contrôlées avant la simulation de la lyse bactérienne décrite précédemment.

### 5.5.9 Rôle de la GAPDH associée à la paroi de *L. plantarum* 299v dans l'interaction, bactérie/hôte

#### 5.5.9.1 Test ELISA pour l'étude de l'interaction de la GAPDH pariétale purifiée avec les protéines de la matrice extracellulaire

Les puits d'une microplaque 96 puits sont recouverts avec des solutions de collagène de type I (Sigma), de fibronectine humaine (BD, Biosciences), de laminine de souris (BD, Biosciences) et de BSA à raison de 2µg/puits. Après incubation une nuit à 4°C, les puits sont lavés deux fois avec du tampon PBS-Tween 20 à 0,1% (v/v) (tampon PBS-T). Les puits sont ensuite recouverts avec une solution de lait écrémé à 1% (p/v) dans un tampon PBS, et incubés 2h à 37°C. Un deuxième lavage par le tampon PBS-T est effectué et les puits sont ensuite incubés pendant 2h à 37°C, avec 100 µL d'une solution de concentrations croissantes de GAPDH pariétale purifiée (20 à 150 µg/mL). Après trois lavages avec 200 µL de PBS-T, 100 µL d'une solution d'anticorps anti-GAPDH dilués au 1 :1000 dans un tampon PBS sont additionnés dans chaque puits. Au bout d'une heure d'incubation à 37°C, les puits sont lavés à nouveau 3 fois par un tampon PBS-T puis placés 1h à 37°C en présence de la solution d'anticorps secondaire, anti-IgG de lapin couplés à une HRP-peroxydase (Horseradish Peroxydase conjugate) (Biosource, USA). La solution d'anticorps secondaires est diluée au 1 :10000. Trois lavages par du tampon PBS-T sont effectués puis le marquage est révélé 10 min à température ambiante par addition de 100µL/puits d'une solution de TMB (3,3', 5,5' Tétraméthylbenzidine, Sigma). Avant la lecture de l'absorbance à 450 nm, la réaction est stoppée avec 100µL/puits d'une solution de HCl 1N.

#### 5.5.9.2 Rôle de la GAPDH in situ à la surface bactérienne, dans l'interaction de *L. plantarum* 299v avec la fibronectine

La fibronectine d'origine humaine est une protéine fibreuse de haut poids moléculaire (PM : 450-500 kDa). C'est un constituant majeur de la matrice extracellulaire chez les eucaryotes. La protéine est immobilisée sur une microplaque de polystyrène à 96 puits (Maxisorp Nunc). 100 µL d'une solution de fibronectine à 1 mg/mL sont déposés par puits et la plaque est incubée une nuit à 4°C. Les puits sont ensuite lavés deux fois avec 200 µL de tampon PBS et recouverts par 200 µL d'une solution de BSA à 2% (p/v) dans du PBS et placés 2h à 37°C. Les puits sont lavés de nouveau deux fois par du tampon PBS avant l'incubation avec les cellules de *L. plantarum* 299v.

Des culots équivalents à 1 mL de culture de *L. plantarum* 299v en début de phase stationnaire (12h) sont lavés deux fois avec du tampon phosphate-citrate dans une gamme de pH comprise entre 4,5 à 7,5 par incrément de 0,5 unité pH. Les suspensions sont ensuite centrifugées 5 min à 3500 x g et les culots sont dilués dans du tampon phosphate-citrate, pH 5,0 de manière à obtenir une DO de  $0,1 \pm 0,02$  à 600 nm. 100  $\mu$ L de chaque suspension sont ajoutés dans les puits traités par la fibronectine et la microplaque est incubée 1h à 37°C. Chaque puits est ensuite lavé 5 fois avec 200  $\mu$ L de tampon phosphate-citrate, pH 5,0 pour éliminer les cellules qui n'ont pas adhéré à la fibronectine. Les bactéries ayant adhéré à la fibronectine sont désorbées avec 200  $\mu$ L d'une solution de Triton X-100 à 0,5% (v/v) pendant 20 min à température ambiante, sous agitation orbitale de 150 rpm. Le dénombrement des cellules bactériennes est effectué sur des géloses MRS après dilution du prélèvement dans le tampon PBS. Chaque essai est triplé.

## 6 Extraction des acides lipotéichoïques associés à la paroi de *L. plantarum* 299v

### 6.1 Extraction par des solvants organiques

#### 6.1.1 Méthode d'extraction au phénol à chaud

Les acides lipotéichoïques (LTA) ont été isolés pour la première fois chez *Lactobacillus fermenti* par Fisher *et al.*, (1973). Les auteurs ont mis au point la méthode d'extraction au phénol à chaud (65°C) afin d'obtenir une fraction de LTA faiblement contaminée en protéines associées, acides nucléiques, polysaccharides, peptidoglycane et acides téichoïques.

Des cellules de *L. plantarum* 299v issues de 3 litres de culture en début de phase stationnaire sont centrifugées 10 min à 3500 x g à 4°C puis lavées trois fois avec du tampon Tris-HCl 0,1M, pH8. Les cellules lavées sont délipidées une nuit à température ambiante après mise en suspension à environ 800 mg/mL dans 60 mL d'un mélange de tampon acétate de sodium 0,1M, pH 4,7, de méthanol et de chloroforme, 1 :2 :1 (v/v/v). La suspension est centrifugée à 3500 x g à 4°C pendant 15 min et le culot cellulaire obtenu est lavé à nouveau une fois avec 120 mL de méthanol. Les cellules sont ensuite suspendues dans 60 mL de tampon acétate de sodium 0,1M, pH 4,7 puis mélangées volume/volume avec une solution de phénol à 80% (p/v). La suspension est incubée 45 min au bain marie à 65°C sous agitation douce. Après refroidissement à 4°C, l'émulsion formée est séparée par centrifugation à 3500 x g pendant 30 min à 4°C. La phase phénolique supérieure est éliminée et la phase aqueuse

inférieure, qui contient les LTA, est récupérée puis dialysée contre 100 volumes d'un tampon acétate de sodium 0,1M, pH4,7 pendant 48h. Le dialysat est ensuite lyophilisé.

L'extrait lyophilisé est solubilisé dans 5 mL de tampon acétate de sodium 0,1M, pH 4,7 et les acides nucléiques contenus dans l'extrait sont hydrolysés pendant 24h à température ambiante sous agitation orbitale en présence de RNase A (50 µg/mL) (Sigma) et de DNase I (10 µg/mL) (Sigma). L'extrait ainsi traité est soumis aux étapes de purification par chromatographie.

### **6.1.2 Extraction au n-butanol**

Les cellules de 4 litres de culture de *L. plantarum* 299v collectées en début de phase stationnaire sont lavées trois fois par un tampon Tris-HCl 0,1M, pH 8, resuspendues dans 80 mL de tampon acétate d'ammonium 0,1M, pH 4,7 puis soniquées pendant 2 min à 4°C à une puissance de 90W. Le lysat bactérien est ensuite mélangé volume à volume avec du n-butanol, puis incubé 30 min à température ambiante sous agitation douce. Après centrifugation à 12000 x g pendant 30 min à 4°C, la phase supérieure de n-butanol est éliminée et la phase aqueuse est récupérée puis dialysée pendant 48h contre 100 volumes d'un tampon acétate d'ammonium 0,1M, pH 4,7. Le dialysat est lyophilisé et conservé à 4°C.

### **6.2 Extraction des LTA de *L. plantarum* 299v par traitement mécanique aux ultrasons**

Une méthode physique douce et non-létale a été mise en œuvre pour l'extraction de LTA associés à la paroi de *L. plantarum* 299v. 3 L de culture de *L. plantarum* 299v, en début de phase stationnaire, sont centrifugés à 3500 x g pendant 15 min puis lavés trois fois par un tampon Tris-HCl 0,1M, pH 8,0. Les cellules lavées sont re-suspendues dans 200 mL de tampon acétate d'ammonium 0,1M, pH 4,7 contenant du NaCl 1M puis soniquées pendant 2 min par impulsions de 5 sec suivies d'une phase de repos de 20 sec, à 4°C, à l'aide d'un sonificateur de type Vibracell VC 750 Ultrasonic Processor équipé d'une microsonde de 3 mm (Fisher Scientific Bioblock, Illkirch, France). La suspension est ensuite centrifugée à 3500 x g pendant 15 min à 4°C et le surnageant récupéré est filtré sur membrane de 0,22 µm (Millipore). Le filtrat est concentré par lyophilisation puis dialysé pendant 48h contre 200 volumes d'un tampon acétate d'ammonium 0,1M, pH 4,7.

### **6.3 Purification des LTA extraits**

#### **6.3.1 Purification par chromatographie de filtration moléculaire sur gel**

Les LTA extraits au phénol sont purifiés par chromatographie de filtration moléculaire sur gel à l'aide d'un système FPLC (Pharmacia). L'extrait est appliqué sur une colonne Superose HR6 (10/300 mm) avec un domaine de fractionnement linéaire de 30000 à  $4 \times 10^6$  Da (Amersham Biosciences). La phase stationnaire est pré-équilibrée avec un tampon acétate de sodium 0,1M, pH 4,7 à un débit de 0,3 mL/min. La détection est effectuée simultanément à 280 nm et 260 nm grâce à un détecteur UV-visible Kontron 325 system (Kontron Instruments, Suisse). L'éluat est collecté par fractions de 3 mL (collecteur modèle 2110, BioRad, USA). Le phosphate est dosé dans chaque fraction d'éluat afin de détecter la présence des LTA.

#### **6.3.2 Purification par chromatographie d'interactions hydrophobes**

Un autre mode de purification par chromatographie d'interactions hydrophobes sur colonne Octyl Sepharose a été mis au point pour la purification des LTA extraits au n-butanol ou aux ultrasons. Les extraits, dialysés contre du tampon acétate d'ammonium 0,1M pH 4,7, sont ajustés à 15% (v/v) en 1-propanol puis appliqués sur une colonne Octyl Sepharose HiPrep™ (100 x 16 mm, GE Healthcare). Le débit est fixé à 2 mL/min. La phase stationnaire est éluée par 48 mL de tampon acétate d'ammonium 0,1M, pH 4,7 ajusté à 15% (v/v) en 1-propanol. L'élution sélective des LTA est réalisée par 68 mL de tampon acétate d'ammonium 0,1M, pH 4,7 ajusté à 35% (v/v) en 1-propanol, au même débit. La détection est effectuée à 280 nm, des fractions de 4 mL sont collectées puis analysées sur la base de leur contenu en phosphate.

#### **6.3.3 Purification par chromatographie d'échange d'ions**

Les fractions Octyl Sepharose éluées par le 1-propanol à 35% et possédant une forte concentration en phosphate, sont rassemblées puis dialysées contre un tampon acétate d'ammonium 20mM, pH 4,7 (tampon A) pendant 24h. Le dialysat est ajusté à 30% (v/v) en 1-propanol puis déposé sur une colonne échangeur d'anions DiEthyl Amino Ethyl (DEAE-Sepharose, fast flow, GE Healthcare) AP-1 (100 x 10 mm, Waters). Le débit est fixé à 2 mL/min et la phase stationnaire est équilibrée avec le tampon A. Les LTA sont élués par un gradient linéaire de 0 à 1M en NaCl dans le tampon A. Des fractions de 4 mL sont collectées puis analysées sur la base de leur contenu en phosphate.

#### 6.4 Détection des LTA dans les différents extraits par la technique de Dot-blotting

Le Dot-blotting est utilisé pour la détection de la présence des LTA dans l'extrait brut de sonication ainsi que dans les différents pools de fractions issues des séparations par chromatographie d'interactions hydrophobes. La détection est effectuée grâce à l'utilisation d'anticorps polyclonaux de type IgG de lapin anti- LTA de *Staphylococcus aureus* (ABC Serotec).

Les échantillons à analyser sont déposés sur une membrane de nitrocellulose (Invitrogen). La membrane est séchée puis saturée pendant 2h, à température ambiante à l'aide d'une solution de BSA à 3% (p/v) dans un tampon TBS-Tween 20 (TBS-T) constitué de : Tris 50mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 et Tween 20 à 0,1% (v/v). Après deux lavages par le tampon TBS-T, la membrane est incubée 1h à température ambiante dans la solution d'anticorps primaires, IgG de lapin anti-LTA de *Staphylococcus aureus*, préalablement dilués au 1 :100. Six rinçages de 10 min dans le tampon TBS-T sont effectués avant l'incubation de la membrane 1h à température ambiante, en présence de la solution d'anticorps secondaires d'anti-IgG de lapin, couplés à une peroxydase HRP (Horse radish peroxydase). La solution d'anticorps secondaires est diluée au 1 :5000 dans le tampon TBS-T. La membrane est ensuite lavée pendant 2h avec des bains successifs de 10 min dans le tampon TBS-T. La révélation des LTA est réalisée à l'aide d'un kit ECL-normal (Amersham Biosciences) avant l'autoradiographie sur les films (X-Omate R Film, Kodak).

#### 6.5 Caractérisation biochimique des LTA purifiés

Les différents extraits de LTA (phénol, ultrasons-NaCl 1M et n-butanol) sont analysés pour établir leur composition en phosphate, glycérol, alanine, hexoses et acides gras.

##### 6.5.1 Dosage du phosphate

- **Étalonnage de la méthode**

Le dosage est adapté de Chen *et al.*, (1956). Les solutions suivantes sont préparées :

- Acide Ascorbique 10% (p/v) dans H<sub>2</sub>O
- Solution de molybdate d'ammonium, 4 H<sub>2</sub>O à 0,42% (p/v) dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N

Un mélange (a) contenant 1 volume de solution d'acide ascorbique pour 6 volumes de solution de molybdate d'ammonium est préparé extemporanément. 0,70 mL du mélange (a) sont ajoutés à 0,30 mL de solution de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> contenant 0,9 à 3,6 µg d'équivalent

phosphate. Le mélange réactionnel est incubé 1 h à 37 °C et l'absorbance est lue à 820 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible Utrospec 2000 (Pharmacia Biotech), contre un témoin approprié afin d'établir une droite d'étalonnage.

- **Dosage du phosphate organique dans les fractions de LTA purifiés**

Les solutions suivantes sont préparées :

- $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  à 10% (p/v) dans de l'éthanol absolu.
- HCl à 0,5 N.

Les fractions chromatographiques contenant les LTA sont concentrées par évaporation sous vide, 0,10 mL de chaque fraction est additionné de 0,03 mL de solution de nitrate de magnésium. L'ensemble est minéralisé par chauffage à la flamme d'un bec Bunsen. Après refroidissement, 0,30 mL d'une solution d'HCl 0,5N sont ajoutés et les tubes sont bouchés puis incubés au bain marie à 100°C pendant 15 minutes. Après refroidissement, 0,7 mL du mélange (a) sont ajoutés, et les tubes sont incubés 1 h à 37°C. L'absorbance est lue à 820 nm, contre un témoin approprié. La conversion de la DO 820 nm en concentration en équivalent phosphate est réalisée en se référant à la droite d'étalonnage.

### **6.5.2 Analyse par CPG/SM des hexoses, glycérol et acides gras**

Les fractions chromatographiques dont le contenu en phosphate témoigne de la présence possible de LTA sont rassemblées puis la présence d'hexoses, de glycérol et d'acides gras est caractérisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).

#### *6.5.2.1 Préparation de l'échantillon pour l'analyse des oses et du glycérol*

- **Hydrolyse à l'acide trifluoroacétique (TFA)**

Une quantité d'échantillon correspondant approximativement à 100 µg équivalents glucose (estimation utilisée sur la base d'un dosage par la méthode de Dubois *et al.*, (1956) au phénol-acide sulfurique), est placée dans un tube à dérivation en verre, 32 x11,6 mm à fond conique (ICS, France). 10 µL de myoinositol à 10 mg/mL, étalon interne, sont ajoutés à l'échantillon. Après séchage sous vide (Speed Vac, Fisher Scientific), 200 µL d'une solution de TFA 4M sont ajoutés et chaque tube contenant le mélange réactionnel est purgé sous courant d'azote avant d'être fermé hermétiquement et placé à l'étuve pendant 1h à 125°C. Après l'hydrolyse, le milieu réactionnel est refroidi à 4°C puis séché sous courant d'azote.

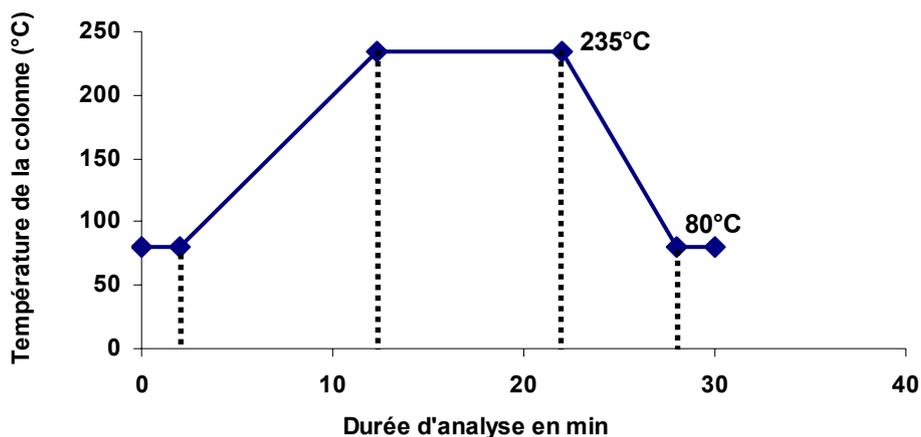
- **Dérivation au BSTFA**

Les résidus secs sont repris dans le mélange de dérivation constitué de 100  $\mu\text{L}$  de pyridine anhydre et de 100  $\mu\text{L}$  de N, O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA, Sigma). Les tubes sont brièvement purgés sous azote, bouchés hermétiquement puis homogénéisés au vortex. Après 2h d'incubation à 27°C et à l'obscurité, le milieu réactionnel est dilué au 1 :10 dans l'hexane. 1  $\mu\text{L}$  de cette solution préalablement centrifugée, pendant 3min à 10000 x g, est injecté dans le système chromatographique en phase gazeuse.

### 6.5.2.2 *Analyse chromatographique*

L'analyse est effectuée avec un système CPG modèle GC 8060 couplé à un détecteur de type spectromètre de masse modèle MD 800 (Fison Instruments, Italie), fonctionnant en mode impact électronique (IE). L'hélium est utilisé comme gaz vecteur. L'acquisition et le traitement des données sont assurés par le logiciel Masslab (Fison Instruments, Italie). L'échantillon (1 $\mu\text{L}$ ) est injecté sur une colonne de type PTE (diméthylsilicone greffé à 5% avec des groupemes phényl, Supelco, USA). La longueur de la colonne est de 30 m, son diamètre intérieur de 0,32 mm et l'épaisseur du film de phase stationnaire est de 0,25  $\mu\text{m}$ . L'injection est réalisée en mode splitless, la température de l'injecteur est fixée à 250°C et le débit du gaz vecteur est réglé à 2 mL/ min.

L'élution des composés est effectuée en mode gradient de température suivant le programme indiqué **Figure II.4** ci-dessous :



**Figure II.4** : Programme de température pour l'analyse des dérivés TMS par CPG/SM.

- **L'analyse qualitative**

Chaque composé analysé est identifié sur la base de deux critères :

- Son temps de rétention relatif par rapport à celui de l'étalon interne, qui est comparé à ceux des composés étalons traités dans les mêmes conditions d'hydrolyse, de dérivation et d'analyse par CPG "gaz/liquide" couplée à la SM. ;
- Son spectre de masse comparé avec ceux archivés dans la base de spectres de références du logiciel Masslab (LIBTX et NIST, 65000 références).

Le  $T_r$  est déterminé grâce à la relation suivante :

$$T_r = \frac{T_{R-inc}}{T_{R-ét-int}}$$

Où  $T_{R-inc}$  est le temps de rétention du composé inconnu ;  
 $T_{R-ét-int}$  est celui de l'étalon interne ;

- **L'analyse quantitative**

La concentration de chaque composé identifié est déterminée par la méthode de l'étalonnage interne. Pour les calculs, seul le pic chromatographique majoritaire, parmi l'ensemble de ceux correspondant à l'élution de l'ose identifié, est pris en considération :

$$C_{inc} = \frac{C_{et} \times A_{inc}}{A_{et}} \times \frac{A_{et-int} \times C'_{et-inc}}{C_{et-int} \times A'_{et-int}} \times d$$

Où  $C_{et}$  = concentration de l'ose étalon dans le mélange témoin ;  
 $A_{et}$  = aire du pic majoritaire de l'ose étalon dans le mélange témoin ;  
 $A_{inc}$  = aire du pic majoritaire de l'ose, identifié dans l'échantillon inconnu ;  
 $C_{et-int}$  = concentration de l'étalon interne dans le mélange témoin ;  
 $A_{et-int}$  = aire de l'étalon interne dans le mélange témoin ;  
 $C'_{et-int}$  = concentration de l'étalon interne dans l'échantillon inconnu ;  
 $A'_{et-int}$  = aire de l'étalon interne dans l'échantillon inconnu,  
 $d$  = facteur de dilution, de l'échantillon après dérivation.

Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{moles/mL}$ .

### 6.5.3 Analyse des acides gras

#### 6.5.3.1 Préparation de l'échantillon pour l'analyse des acides gras

- **Hydrolyse acide**

Les échantillons contenant les LTA ainsi que le mélange étalon d'acides gras contenant du C16, C18, C18 : 1, C18 : 2, C18 : 3 (20 µg de chaque acide gras) sont placés dans des tubes à dérivation à fond conique (ICS, France). Chaque tube est additionné de 20 µL d'une solution d'étalon interne, C17 à 1 mg/mL. Les mélanges réactionnels sont séchés sous vide. Les résidus secs sont hydrolysés en présence de 200 µL d'HCl 2M, pendant 2,5h à 100°C. Après l'hydrolyse, les échantillons sont refroidis puis séchés sous courant d'azote.

- **Préparation des esters méthyliques d'acides gras**

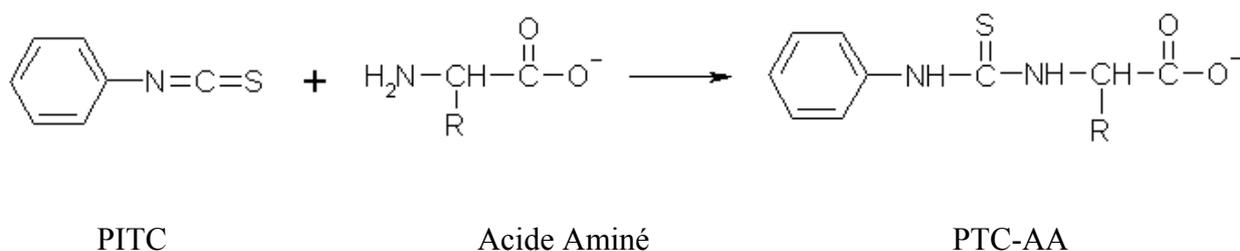
La méthode mise en œuvre est adaptée de Lepage and Roy, (1986). Les résidus secs hydrolysés par HCl, sont estérifiés après reprise par 1 mL d'un mélange de méthanol-benzène-chlorure d'acétyle, 4 : 1 : 0,5 (v/v/v). Les tubes sont fermés hermétiquement puis placés à 100°C pendant 1h. Après refroidissement, 2,5 mL d'une solution de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 6% (p/v) sont ajoutés à chaque tube et le mélange réactionnel est centrifugé pendant 15 min à 3500 x g. 1 µL de la phase supérieure (benzène) est analysé par CPG/SM.

#### 6.5.3.2 Analyse chromatographique des acides gras

Les esters méthyliques d'acides gras sont analysés à l'aide du système de chromatographie en phase gazeuse décrit dans la section **6.5.2.2**. L'analyse chromatographique est réalisée sur une colonne capillaire INNOWAX (J & W Scientific, USA). La longueur de la colonne est de 30 m, la phase stationnaire est constituée d'un film de polyéthylène glycol (polaire) de 0,25 µm d'épaisseur. Le diamètre intérieur de la colonne est de 0,25 mm. L'injection est effectuée en mode split avec un rapport de division de 20, et la température de l'injecteur est fixée à 250 °C. L'analyse est réalisée en mode isotherme à 180 °C. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur, à un débit de 2 mL/min. Les analyses qualitative et quantitative des acides gras sont effectuées comme indiqué précédemment dans la section **6.5.2.2**.

### 6.5.4 Analyse des acides aminés

L'acide aminé majoritaire constitutif des LTA est l'alanine (D-alanine). La technique choisie pour réaliser l'analyse de ce résidu est la méthode PicoTag (Waters) adaptée de Bidlingmeyer *et al.*, (1984). Les échantillons sont dérivés par du phénylthiocyanate (PITC) afin d'obtenir des acides aminé-phénylthiocarbamyl, PTC-AA détectables par spectrophotométrie UV à 254 nm. La réaction de dérivation est indiquée **Figure II.5**:



**Figure II.5** : Réaction de dérivation des acides aminés par le phénylthiocyanate (PITC).

Les dérivés PTC-AA sont ensuite analysés sur un système de chromatographie liquide haute performance (HPLC) (Kontron Instruments, Suisse) équipé d'une pompe à gradient ternaire modèle 325, d'un système de dégazage à l'hélium et d'un injecteur à boucle modèle 7125 (Rhéodyne, USA).

#### 6.5.4.1 Préparation des échantillons pour l'analyse chromatographique

Les fractions purifiées, contenant les LTA à analyser, sont placées dans des tubes capillaires (Jiffylite, Sealed air) préalablement pyrolysés 5h à 400°C. Les tubes "échantillons" et "mélange étalons" sont additionnés de 25 nmoles d'acide  $\alpha$ -aminobutyrique comme étalon interne, puis séchés sous vide. Les résidus secs sont ensuite soumis à une hydrolyse acide par HCl 5,6M en phase vapeur pendant 24h à 110°C, sous vide en présence de cristaux de phénol. Les hydrolysats acides sont séchés sous vide, neutralisés par addition de 10  $\mu$ L d'un mélange éthanol/eau/triéthylamine 2 : 2 : 1 (v/v/v), puis séchés à nouveau sous vide. Les résidus secs sont solubilisés dans 20 $\mu$ L d'un réactif de dérivation composé d'un mélange éthanol/eau/triéthylamine/PITC dans les proportions 7: 1: 1: 1 (v/v/v/v) respectivement. La dérivation est effectuée pendant 15 min à température ambiante.

6.5.4.2 Analyse des échantillons par HPLC en phase inversée

Après élimination du réactif de dérivation par évaporation sous vide, les résidus secs sont dissous dans 200 ou 400 µL de tampon échantillon constitué d'un mélange de 95 mL de tampon Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,071% (p/v), pH 7,4 et de 5 mL d'acétonitrile. Après centrifugation des échantillons à 10000 x g pendant 3 min, 20µL de chaque échantillon sont injectés sur une colonne HPLC Waters Pico-Tag ® C18 "end-capped" (150 x 3,9 mm), de 4 µm de granulométrie. L'élution est réalisée à un débit de 1 mL/min, à 44°C. La détection des PTC-AA est effectuée à 254 nm. Les tampons d'élution sont préparés selon le protocole suivant :

• **Solvant A** :

- 19 g de trihydrate d'acétate de sodium dans 1L d'H<sub>2</sub>O
- 0,5 mL de triéthylamine
- 200 µL d'une solution d'EDTA à 1 mg/mL.

• **Solvant B** :

- 300 mL d'acétonitrile + 200 mL d'H<sub>2</sub>O ultrapure
- 200 µL de la solution d'EDTA à 1 mg/ mL.

Ces deux solvants sont filtrés avant utilisation pour l'analyse chromatographique. Le gradient d'élution est résumé dans le **Tableau II.3** ci-dessous :

**Tableau II.3** : Gradient d'élution utilisé pour l'analyse des acides aminés par HPLC en phase inversée.

Temps (min)	%A	%B
0	100	0
10	54	46
10,2	0	100
11,7	0	100
12	0	100
12,2	0	100
12,5	100	0
27	100	0
27,5	100	0

Les analyses qualitative et quantitative des acides aminés sont effectuées comme indiqué précédemment dans la section 6.5.2.2 en se référant au chromatogramme du mélange étalon obtenu dans les mêmes conditions expérimentales (Annexe 3).

## 6.6 Implication des LTA dans l'interaction de *L. plantarum* 299v avec la mucine et les cellules épithéliales intestinales Caco-2

L'implication potentielle des LTA présents dans l'extrait brut de sonication et dans les fractions purifiées après chromatographie dans l'adhésion de *L. plantarum* 299v sur des cibles de l'épithélium intestinal telles que la mucine et les cellules intestinales de la lignée Caco-2 a été évaluée par des tests *in vitro* sur microplaques.

### 6.6.1 Test d'inhibition d'adhésion sur mucine

La mucine gastrique de porc est immobilisée sur une microplaque 96 puits selon le protocole décrit dans la section 4.3.1.1. Les puits sont ensuite incubés pendant 2h à 37°C, avec des concentrations croissantes d'extrait brut de sonication à raison de 0,08, 0,16 et 0,32 µmoles équivalent phosphate /puits dans du PBS ou de LTA purifiés à raison de 0,08, 0,145 et 0,29 µmoles équivalent phosphate/puits. Le matériel non adsorbé est éliminé par pipetage et les puits sont lavés trois fois par du tampon PBS.

#### - Préparation des cellules de *L. plantarum* 299v:

Les cellules de *L. plantarum* 299v collectées en début de phase stationnaire sont sédimentées par centrifugation, pendant 5 min à 3500 x g, puis lavées deux fois avec du tampon Tris-HCl 0,1M, pH 8,0. Les culots sont dilués dans du tampon PBS de manière à obtenir une DO de  $0,1 \pm 0,02$  à 600 nm. 100 µL de cette suspension bactérienne sont incubés 1h à 37°C dans les puits de mucine prétraités par l'extrait brut de sonication ou par les LTA purifiés. Après incubation, les bactéries non-adhérentes sont éliminées et les puits sont lavés 5 fois avec 200 µL de tampon PBS. Les cellules de *L. plantarum* 299v ayant adhéré sur la cible mucine sont désorbées par 200 µL de solution de Triton X-100 à 0,5% (v/v). La fraction désorbée de chaque puits est diluée dans du tampon PBS puis utilisée pour le dénombrement des cellules bactériennes sur gélose MRS. Chaque essai d'adhésion est réalisé trois fois et le nombre de bactéries adhérentes est exprimé par moyenne de nombre d'UFC/puits.

### 6.6.2 Test d'inhibition d'adhésion sur cellules Caco-2

Les cellules épithéliales intestinales Caco-2 sont immobilisées sur des microplaques 12 puits comme décrit précédemment dans la section 4.3.2.1. Les puits sont incubés avec des quantités croissantes d'extrait brut de sonication (0,6 et 1,2  $\mu$ moles équivalent phosphate /puits) ou de LTA purifiés (0,3 et 0,8  $\mu$ moles équivalent phosphate/puits) pendant 2h à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>. Après incubation, les puits sont lavés deux fois par du tampon PBS.

Les cellules de *L. plantarum* 299v prélevées en début de phase stationnaire (12h), sont lavées deux fois par du tampon PBS. Les cellules sont ensuite diluées dans du milieu DMEM à 10<sup>8</sup> UFC/mL et 0,5 mL de cette suspension sont ajoutés à chaque puits. La plaque est incubée 1h à 37°C sous une atmosphère à 5% CO<sub>2</sub>. Les puits sont lavés de nouveau 3 fois avec 0,5 mL de tampon PBS. Les cellules Caco-2 sont lysées avec 0,5mL de solution de Triton X-100 à 0,05% (v/v) et 100  $\mu$ L du contenu de chaque puits sont dilués dans du tampon PBS et les cellules bactériennes adhérentes sont dénombrées sur gélose MRS. Chaque essai est triplé et le nombre de bactéries adhérentes est exprimé par moyenne de nombre d'UFC/puits.



***CHAPITRE III***  
***RESULTATS ET DISCUSSIONS***



## - PREAMBULE -

Le projet intitulé « Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées dans la relation de la bactérie probiotique *Lactobacillus plantarum* 299v avec l'hôte : approche *in vitro* » a été supporté par le Conseil Régional du Limousin et la société ID-BIO dans le cadre d'une allocation ARIV (Allocation Recherche Innovation et Valorisation). Sa mise en œuvre a fait l'objet d'une collaboration entre le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, LCSN EA 1069 de Limoges et le Laboratoire de Microbiologie et de Biochimie Appliquée, LMBA UMR 5248 CNRS-U. Bordeaux 1-ENITAB et l'unité Chimie, Biologie des Molécules et Nanoobjets, CBMN-UMR 5248 de Génomique Fonctionnelle, Bordeaux.

Au travers de ce travail, nous avons souhaité apporter une contribution à la connaissance des propriétés de la paroi bactérienne potentiellement mises en jeu lors de l'étape d'adhésion d'un microorganisme probiotique aux constituants de l'épithélium intestinal de l'hôte. En effet, lorsqu'une bactérie probiotique, intégrée dans un aliment fonctionnalisé ou présente dans un complément alimentaire, est ingérée vivante par l'hôte, cette dernière est susceptible de produire des effets bénéfiques sur la santé du consommateur. La manifestation de tels effets est tributaire entre autres de la capacité de cette bactérie à interagir avec la paroi du tractus intestinal de l'hôte. L'aptitude du probiotique à s'adsorber sur différents éléments de l'épithélium intestinal est dépendante de propriétés physico-chimiques de surface et de la présence d'entités moléculaires qui peuvent assurer le rôle d'adhésines.

L'approche expérimentale a été réalisée sur la base de test *in vitro* et nous avons choisi la souche probiotique *Lactobacillus plantarum* 299v, commercialisée par la société Pro Bi SA (Suède), comme modèle d'étude.

Le travail présenté aborde trois aspects de l'adhésion *in vitro* de la bactérie :

- La caractérisation de certaines propriétés physico-chimiques de surface de *L. plantarum* 299v tels que son hydrophobie/hydrophilie, son caractère acide-base et sa charge nette puis la recherche d'une éventuelle corrélation entre ces propriétés et la capacité d'adhésion de la bactérie sur des cibles telles que la mucine gastrique et les cellules épithéliales intestinales de l'hôte;

- L'identification d'adhésines protéiques associées à la paroi bactérienne et la mise en évidence de leur implication dans l'interaction de *L. plantarum* 299v avec les différents constituants de la paroi intestinale et l'étude du mécanisme d'exportation vers la paroi de *L. plantarum* 299v d'une "anchorless protein" identifiée comme jouant le rôle d'adhésine chez cette bactérie probiotique ;
- L'identification et la caractérisation d'acides lipotéichoïques de la paroi de *L. plantarum* 299v puis l'étude de leur intervention dans l'adhésion du probiotique.

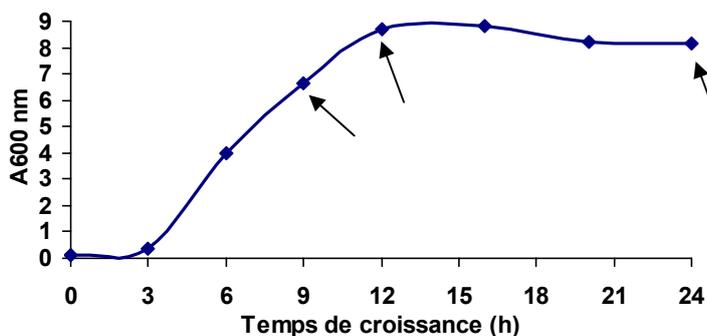
## 1 Etude de propriétés physico-chimiques de surface chez *L. plantarum* 299v et rôle potentiel dans l'adhésion *in vitro* de la bactérie

La capacité d'adhésion à l'épithélium intestinal est une propriété importante pour les nombreuses souches bactériennes utilisées comme probiotiques. L'adhésion repose dans sa phase initiale sur l'établissement d'interactions non-spécifiques dépendantes des propriétés physico-chimiques de la surface bactérienne et de celle de sa cible, permettant un rapprochement de ces dernières. Au cours d'une deuxième étape, des interactions plus spécifiques s'établissent entre les adhésines de paroi bactérienne et des récepteurs complémentaires présents à la surface des cibles cellulaires ou moléculaires de l'hôte. Parmi les propriétés physico-chimiques de la paroi bactérienne, nous considérerons son caractère hydrophobe/hydrophile, son caractère acide-base de Lewis ainsi que sa charge nette.

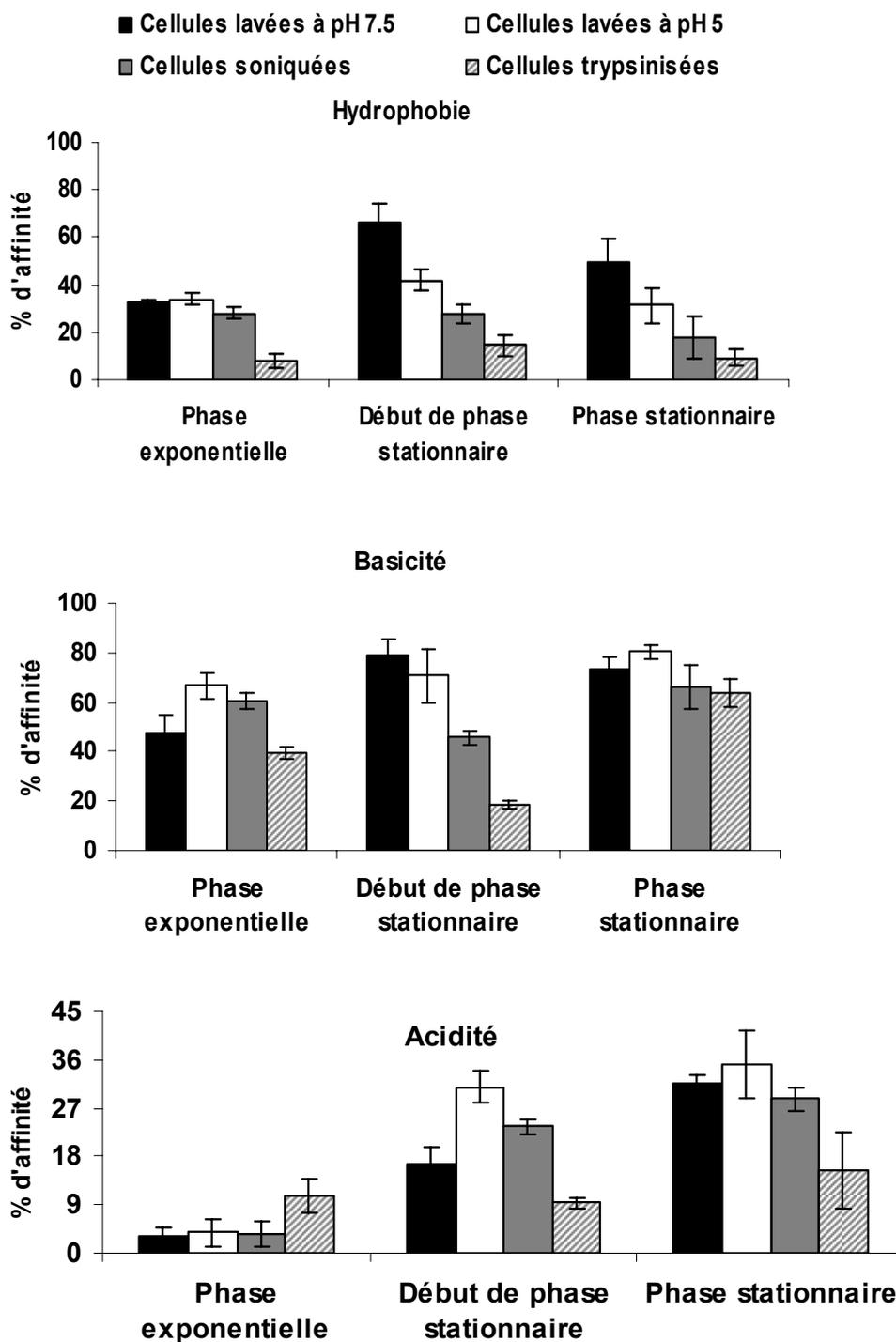
### 1.1 Les caractères hydrophobe / hydrophile et acide-base de Lewis

La méthode d'adsorption aux solvants ou MATS a été appliquée pour évaluer l'hydrophobie/hydrophilie de surface de la souche de *L. plantarum* 299v ainsi que son caractère acide/base de Lewis. L'hydrophobie/hydrophilie des cellules bactériennes est mesurée à l'issue de leur partition entre une phase aqueuse et une phase organique apolaire telle que l'hexadécane. L'acidité-basicité ou caractère acide-base de Lewis de surface est quantifié par la capacité de la bactérie à s'adsorber sur un solvant accepteur d'électrons (acide) tel que le chloroforme ou donneur d'électrons (basique) comme l'acétate d'éthyle.

De telles propriétés physico-chimiques de la surface de la bactérie probiotique *L. plantarum* 299v sont évaluées à trois stades de la croissance selon la courbe présentée sur la **Figure III.1** ci dessous: En phase exponentielle à T 9h, en début de phase stationnaire à T 12h et en fin de phase stationnaire à T24h.



**Figure III.1** : Courbe de croissance de *L. plantarum* 299v cultivé en milieu MRS à 37°C.



**Figure III.2 :** Evolution de l'hydrophobie et du caractère acide-base de Lewis des cellules de *L. plantarum* 299v en fonction de la phase de croissance et de divers traitements physique ou biochimique affectant leur surface : lavage à pH 7,5 (contrôle), à pH 5,0, sonication et trypsinisation. Chaque barre d'erreur est le résultat de trois expériences indépendantes et représente la déviation standard ( $\pm$  SD).

Les cellules prélevées aux différents stades de la croissance, sont lavées deux fois, soit à pH 7,5 soit à pH 5,0, avant d'être soumises au test MATS. Par ailleurs, les effets de traitements mécaniques aux ultrasons ou enzymatique par la trypsine sur les propriétés de surface des bactéries préalablement lavées à pH 7,5 sont mesurés. L'ensemble des résultats est présenté **Figure III.2.**

Les cellules de *L. plantarum* 299v dans le lot contrôle (pH 7,5) présentent un caractère hydrophobe en début et en fin de phase stationnaire. En effet, elles possèdent des coefficients de partition entre l'hexadécane et l'eau supérieurs à 50%. En phase exponentielle, les cellules de *L. plantarum* 299v ont une hydrophobie moyenne avec un pourcentage d'affinité pour l'hexadécane de 38%.

Lors du prélèvement des cellules bactériennes à chaque phase de la croissance, le pH originel du milieu est acide ( $3,8 < \text{pH} < 5$ ) et les cellules lavées à pH acide (pH 5,0) possèdent une hydrophobie significativement inférieure à celle mesurée pour les cellules dites contrôles, lavées à pH 7,5. Cette observation est vérifiée tout au long de la phase stationnaire. Nous pouvons émettre l'hypothèse d'une modification des propriétés de surface de la bactérie à l'issue d'un simple lavage à pH faiblement alcalin. Cette observation est en accord avec une élimination de certains constituants faiblement adsorbés à la paroi des cellules bactériennes, consécutivement à la modification du pH du milieu environnant, comme cela a été rapporté pour les cellules de *L. crispatus* ST1 (Hurmalainen *et al.*, 2007). On peut postuler que la désorption de certains constituants de la surface de la paroi, à pH 7,5, s'accompagnerait d'un démasquage de composés apolaires, justifiant l'augmentation de l'hydrophobie de surface. De plus, l'absence de modification observable en phase exponentielle peut témoigner du caractère évolutif de la composition de la paroi bactérienne pendant la croissance.

Dans la suite de notre approche sur la caractérisation de propriétés de la surface de *L. plantarum* 299v, nous avons mis en œuvre divers traitements physique ou biochimique des cellules bactériennes avant l'évaluation de ces propriétés par la méthode MATS. Les traitements ont pour but d'altérer plus au moins spécifiquement la présence de familles de constituants à la surface de la paroi, d'observer les effets induits sur l'hydrophobie et/ou le caractère acide-base de Lewis et d'établir une possible corrélation entre ces propriétés et la composition de la paroi du microorganisme.

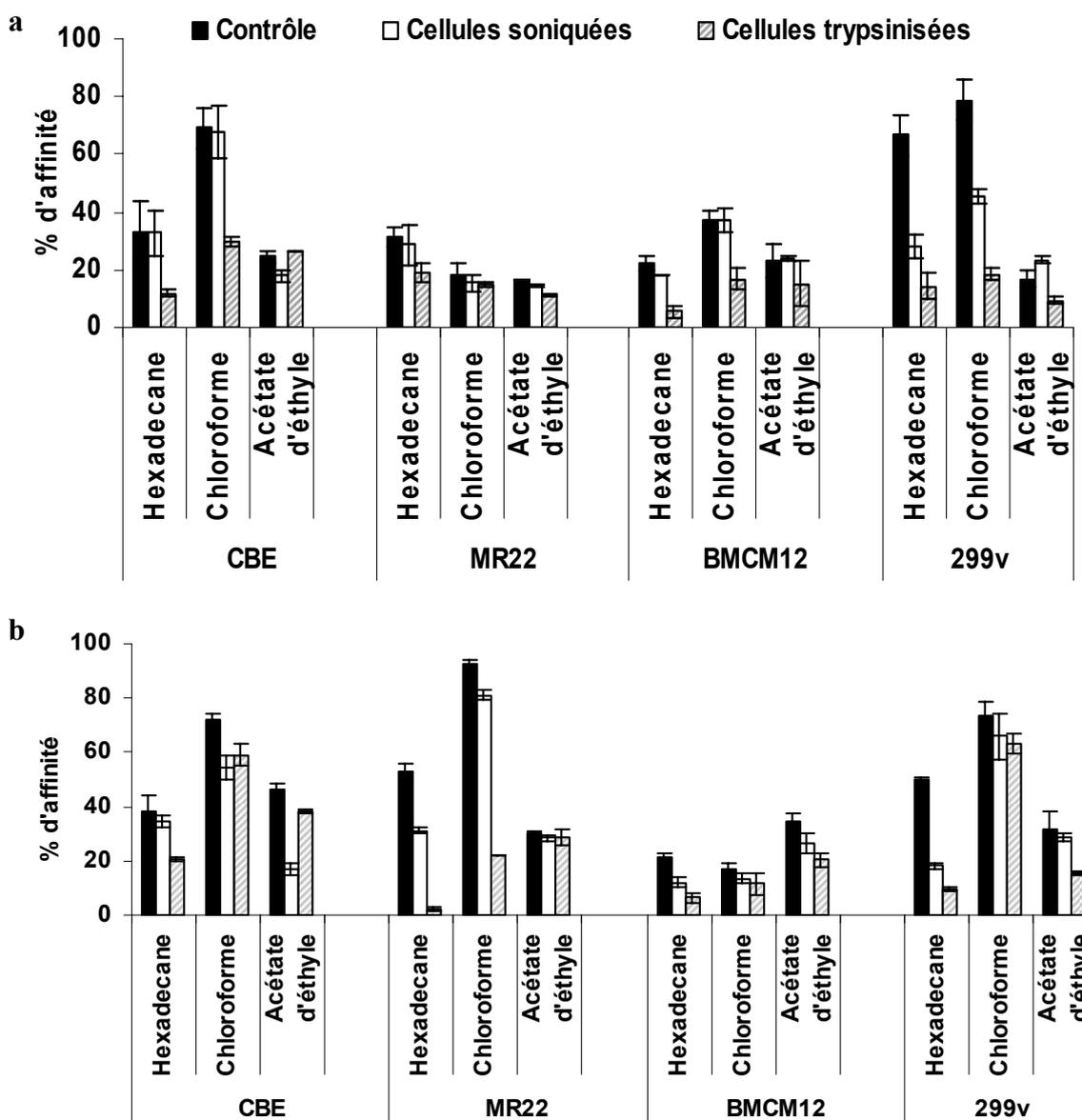
Afin de ne pas induire un biais expérimental, préjudiciable à l'interprétation des résultats, les cellules bactériennes prélevées aux différentes phases de la culture, ont été systématiquement lavées à pH 7,5 avant de subir soit un traitement aux ultrasons soit un traitement par la trypsine suivi de l'évaluation de certaines de leurs propriétés de surface par

la méthode MATS. Nous considérerons les bactéries lavées à pH 7,5 comme témoin ou contrôle au cours de cette approche expérimentale. Cette précaution doit permettre d'attribuer l'éventuel effet du traitement enzymatique sur les propriétés de surface, non pas à une simple désorption d'entités moléculaires faiblement associées à la paroi, consécutive au pH du milieu réactionnel lors de la protéolyse (pH 8,0) mais bien à l'hydrolyse de composés protéiques émergeant de la paroi de *L. plantarum* 299v et fortement liés à cette dernière.

Les traitements, par sonication à faible puissance (20 W pendant 3 min par impulsions de 5 sec, suivi d'une phase de repos de 20 sec, à 4°C) ou par digestion trypsique durant 30 min à 37°C, engendrent tous les deux un abaissement important de l'hydrophobie de la surface des cellules de *L. plantarum* 299v en phase stationnaire de croissance (**Figure III.2**). Par contre le caractère hydrophobe des bactéries en phase exponentielle n'est affecté qu'à l'issue du traitement enzymatique. Quelle que soit la phase de croissance, *L. plantarum* 299v présente un caractère base de Lewis prononcé du fait de son adhésion marquée au solvant acide chloroforme, avec un taux d'adhésion compris entre 50 et 85%. Une telle propriété de surface a été décrite auparavant pour les souches *L. casei*, *L. paracasei* (Pelletier *et al.*, 1997). Cette observation permet de conclure sur la présence d'entités moléculaires donneuses d'électrons à la surface de la paroi de *L. plantarum* 299v et en conséquence sur leur capacité potentielle à générer des interactions électrostatiques de type acide-base de Lewis avec des cibles de l'hôte. Les propriétés acide-base de Lewis sont peu affectées par les traitements mécanique ou enzymatique réalisés en phase stationnaire (T 24h) (**Figure III.2**).

Au vu de ces résultats, on peut attribuer la chute de l'hydrophobie de la surface bactérienne, après traitement par la trypsine, à l'élimination spécifique de protéines présentant des domaines structuraux apolaires, exposés initialement au milieu environnant. L'effet du traitement par ultrasons est plus complexe à interpréter. On peut émettre l'hypothèse selon laquelle, le phénomène de cavitation, généré par le traitement mécanique de sonication, engendre des bouleversements de l'organisation de la surface de la paroi, incluant par exemple la désorption de constituants faiblement ancrés et/ou la modification de l'exposition de domaines structuraux d'entités moléculaires à la surface du microorganisme. Toutefois, si la sonication et l'hydrolyse trypsique produisent des effets similaires sur certaines propriétés globales de la surface de *L. plantarum* 299v, les causes à l'origine des effets observés peuvent être différentes compte tenu de la complexité de la paroi bactérienne.

On remarque, une fois de plus que l'incidence des traitements physique et/ou biochimique est dépendante de la phase de croissance, ce qui atteste d'une évolution des



**Figure III.3 :** Evaluation des propriétés physico-chimiques de surface, par la méthode MATS, des différentes souches de *L. plantarum* prélevées en début de phase stationnaire (a) et en fin de phase stationnaire (b). Chaque barre d'erreur est le résultat de trois expériences indépendantes et représente la déviation standard ( $\pm$  SD).

propriétés de la surface de la paroi bactérienne entre la phase exponentielle et la phase stationnaire.

Dans le but de vérifier expérimentalement s'il existe une corrélation possible entre une propriété donnée de surface de *L. plantarum* 299v et sa capacité d'interaction avec une cible du tractus intestinal, cette étude a été étendue à 3 autres sous espèces de *L. plantarum*. Celles-ci sont identifiées : CBE, BMCM12 et MR22, elles ont été isolées au Laboratoire de Microbiologie et Biochimie appliquée de Bordeaux (ENITA-Bordeaux) au cours de travaux antérieurs menés en collaboration avec le LCSN. Ces souches ont été sélectionnées sur le critère de leur capacité d'adhésion sur les cibles mucine et cellules Caco-2. Les souches CBE et BMCM12 adhèrent fortement et la souche MR22 constitue quant à elle le témoin négatif d'adhésion (Tallon *et al.*, 2007)

Les 3 sous espèces de *L. plantarum* ont subi des traitements mécaniques ou biochimiques identiques à ceux appliqués à *L. plantarum* 299v puis leurs propriétés physicochimiques de surface ont été évaluées par la méthode MATS (**Figure III.3**). Ainsi que nous l'avons observé précédemment pour la souche *L. plantarum* 299v, les souches CBE, BMCM12 et MR22 possèdent un caractère moyennement hydrophobe. Quelle que soit la phase de croissance considérée, leur pourcentage d'adhésion à l'hexadécane est compris entre 23 et 53% (**Figure III.3**). Toutefois, cette propriété de surface est moins marquée que chez *L. plantarum* 299v (% d'adhésion à l'hexadécane > 65%).

Parmi les trois sous espèces de *L. plantarum* testées, seules les souches BMCM12 et MR22 voient leur hydrophobie significativement affectée à l'issue du traitement par les ultrasons (**Figure III.3b**). La trypsine quant à elle altère significativement, mais à des degrés divers, les propriétés physico-chimiques de la paroi des 3 sous espèces de *L. plantarum*, avec toutefois un effet moindre sur l'abaissement de l'hydrophobie de la souche CBE. La chute de l'hydrophobie de surface induite par un traitement protéasique a été déjà rapportée par Mjörner *et al.*, (1983) dans le cadre d'une étude consacrée à des streptocoques du groupe A. A ce niveau de notre investigation des propriétés de surface de *L. plantarum*, nous possédons des préparations bactériennes présentant une grande diversité d'hydrophobie de paroi. L'étape qui suivra consistera en une comparaison des capacités d'adhésion, *in vitro* sur des cibles du tractus intestinal, des différentes souches ayant subi ou non un prétraitement affectant leur hydrophobie de surface. Auparavant, pour compléter cette étude des

propriétés physico-chimiques de la surface de *L. plantarum*, nous allons aborder la mesure de la charge nette de sa paroi.

## 1.2 Charge électrique de surface

L'interaction bactérie/hôte et en particulier l'adhésion est souvent décrite comme étant fortement dépendante de l'hydrophobie ou de l'énergie libre de surface (Van Loosdrecht *et al.*, 1987a ; Busscher *et al.*, 1987 ; Absolom *et al.*, 1983). Toutefois, plusieurs auteurs ont rapporté une influence des charges électriques nettes de la bactérie et de la surface cible, sur l'adhésion (Hermansson *et al.*, 1982 ; Larsson and Glantz, 1981). La plupart des surfaces cibles naturelles ainsi que celles des bactéries sont chargées négativement. L'ensemble des interactions de longue distance qui vont s'établir entre la bactérie et la surface cible de mêmes charges nettes résulte alors d'une part de la force de répulsion électrostatique et d'autre part de forces d'attraction de Van der Waals. Les deux forces peuvent se compenser, cela dépendra de la concentration et de la valence des contre-ions présents dans le milieu ou bien à l'interface bactérie/cible (van Loosdrecht *et al.*, 1987).

Pour obtenir des informations sur ces interactions électrostatiques et leur implication potentielle dans l'adhésion, il est nécessaire de mesurer le potentiel électrique des différentes surfaces mises en contact, ce qui est très complexe. On a alors recours à l'estimation du potentiel électrocinétique ou potentiel Zéta, plus facilement accessible et représentatif du potentiel électrique (van Loosdrecht *et al.*, 1987b). Après un certain nombre d'hypothèses, le potentiel zéta peut être calculé à partir de la mobilité électrophorétique (ME) de la bactérie. Toutefois, ce calcul nécessite la connaissance de la conductivité de la bactérie et ce paramètre est difficilement accessible. Einolf and Carstensen, (1979), estiment que la conductivité des bactéries est comparable à celle d'une solution 0,01M de NaCl. Cependant, compte tenu de la difficulté à accéder à une valeur précise de ce paramètre pour *L. plantarum*, nous avons pris le parti d'utiliser directement la mobilité électrophorétique, déterminée expérimentalement, comme mesure représentative de l'état de charge électrique de la bactérie. Par conséquent, aucune conversion de la mobilité électrophorétique en potentiel zéta n'a été effectuée. Cette démarche se justifie du fait que nous considérons, au cours de cette étude, des bactéries appartenant à la même espèce bactérienne et qui doivent donc avoir des conductivités comparables.

Toutes les mesures de ME sont effectuées après mise en suspension des bactéries dans une solution de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM. Cette faible force ionique est choisie afin de minimiser les

**Tableau III.1:** Effet de la phase de croissance et de divers prétraitements physique ou biochimique sur la mobilité électrophorétique (ME en  $10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) des cellules de *L. plantarum* 299v.

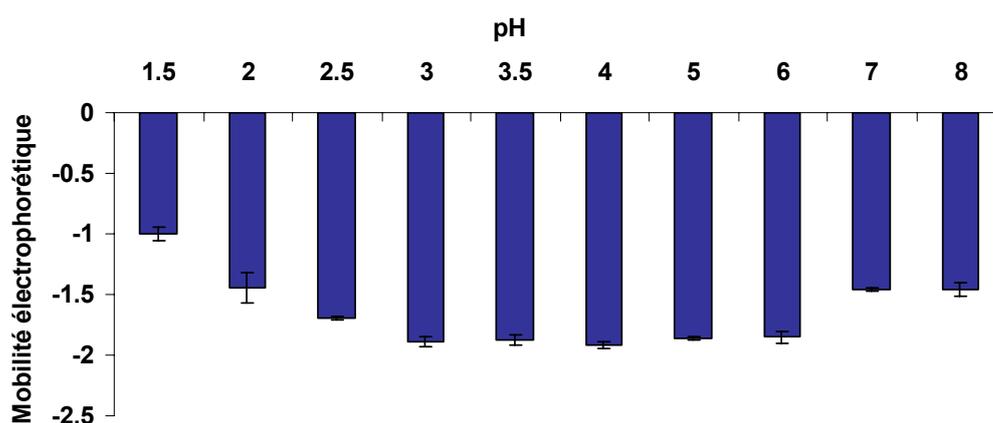
	Contrôle	Cellules soniquées	Cellules trypsinisées
<b>Phase de culture</b>			
<b>Phase exponentielle</b>	$(-1,63 \pm 0,2)$	$(-1,47 \pm 0,16)$	$(-1,49 \pm 0,17)$
<b>Début de phase stationnaire</b>	$(-1,44 \pm 0,22)$	$(-1,42 \pm 0,17)$	$(-1,58 \pm 0,19)$
<b>phase stationnaire</b>	$(-1,43 \pm 0,42)$	$(-1,42 \pm 0,28)$	$(-1,35 \pm 0,18)$

Chaque mesure ( $\pm$  déviation standard) est le résultat de 4 expériences indépendantes.

**Tableau III.2:** Effet de traitements physique ou biochimique sur la mobilité électrophorétique de 4 souches de *L. plantarum*, en début de phase stationnaire.

Souche de <i>L. plantarum</i>	Contrôle	Cellules soniquées	Cellules trypsinisées
<b>CBE</b>	$(-2,08 \pm 0,01)$	$(-2,20 \pm 0,05)$	$(-2,01 \pm 0,021)$
<b>BMCM12</b>	$(-1,65 \pm 0,026)$	$(-1,57 \pm 0,054)$	$(-1,57 \pm 0,02)$
<b>MR22</b>	$(-1,47 \pm 0,032)$	$(-1,32 \pm 0,01)$	$(-1,36 \pm 0,01)$
<b>299v</b>	$(-1,44 \pm 0,22)$	$(-1,42 \pm 0,17)$	$(-1,58 \pm 0,19)$

Chaque mesure ( $\pm$  déviation standard) est le résultat de 4 expériences indépendantes.



**Figure III.4 :** Evolution de la mobilité électrophorétique de *L. plantarum* 299v en fonction du pH de la suspension bactérienne. Chaque barre d'erreur est le résultat de 4 expériences indépendantes et représentent la déviation standard ( $\pm$  SD).

interactions ions/bactéries susceptibles de modifier le comportement électrophorétique de ces dernières (Pelletier *et al.*, 1997).

Les ME des cellules de *L. plantarum* 299v ayant subi les différents traitements mécanique ou biochimique sont comparables à celles des cellules contrôles seulement lavées à pH 7,5. Les résultats sont rapportés dans le **Tableau III.1**. Les cellules de *L. plantarum*, quelle que soit la souche considérée, possèdent une charge électrique nette négative à pH neutre. En comparaison avec la souche de *L. plantarum* 299v, les trois sous espèces bactériennes : MR22, CBE et BMCM12 présentent une ME également peu variable avec une valeur proche de celle de *L. plantarum* 299v (**Tableau III.2**). L'ensemble de ces souches possèdent une charge électrique nette négative.

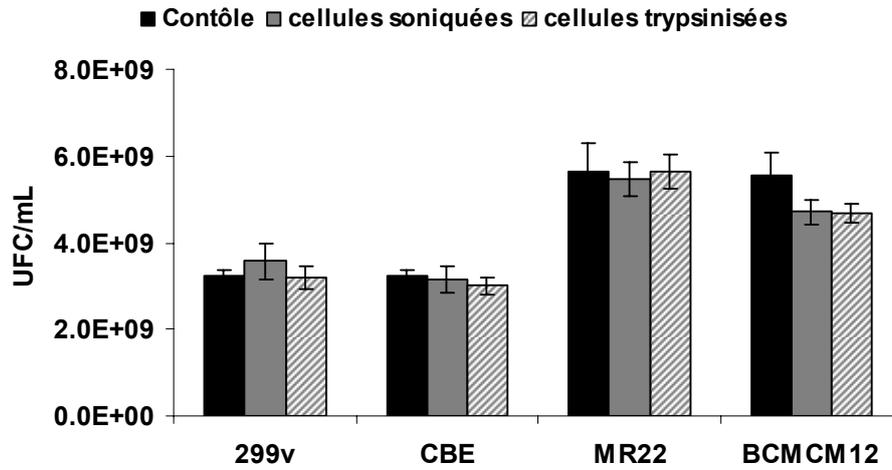
La ME décroît progressivement lorsque le pH de la suspension bactérienne est abaissé lors de la mesure (**Figure III.4**) et que celui-ci se rapproche du pHi de la bactérie. Cependant, dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas observé une M.E nulle permettant d'estimer la valeur du pHi de *L. plantarum* 299v.

Aucun des prétraitements, par sonication ou par la protéase, n'a affecté de manière significative la ME des cellules de *L. plantarum* et par conséquent, l'état de la charge électrostatique nette de la bactérie (**Tableaux II.1 et II.2**).

Nous allons consacrer la suite du travail à l'étude de la capacité d'adhésion des différentes souches de *L. plantarum* ayant ou non subi un prétraitement mécanique ou enzymatique, puis nous combinerons l'ensemble des données relatives à la capacité d'adhésion et aux propriétés de surface afin de vérifier s'il est possible d'établir une corrélation entre ces deux paramètres.

#### **1.3 Propriétés physico-chimiques de surface de *L. plantarum* et capacité d'adhésion *in vitro* sur mucine et cellules épithéliales intestinales Caco-2**

Après l'étude des effets de traitements physique ou enzymatique sur l'expression des propriétés de surface des cellules de *L. plantarum*, nous avons évalué l'incidence de ces mêmes traitements sur la capacité résiduelle des différentes souches à adhérer à la mucine et aux cellules épithéliales intestinales de la lignée Caco-2. Le caractère non-létal de ces deux traitements, mécanique ou enzymatique, appliqués aux cellules bactériennes, a été évalué avant la mise en œuvre de ces dernières dans les tests d'adhésion. En effet, la méthode



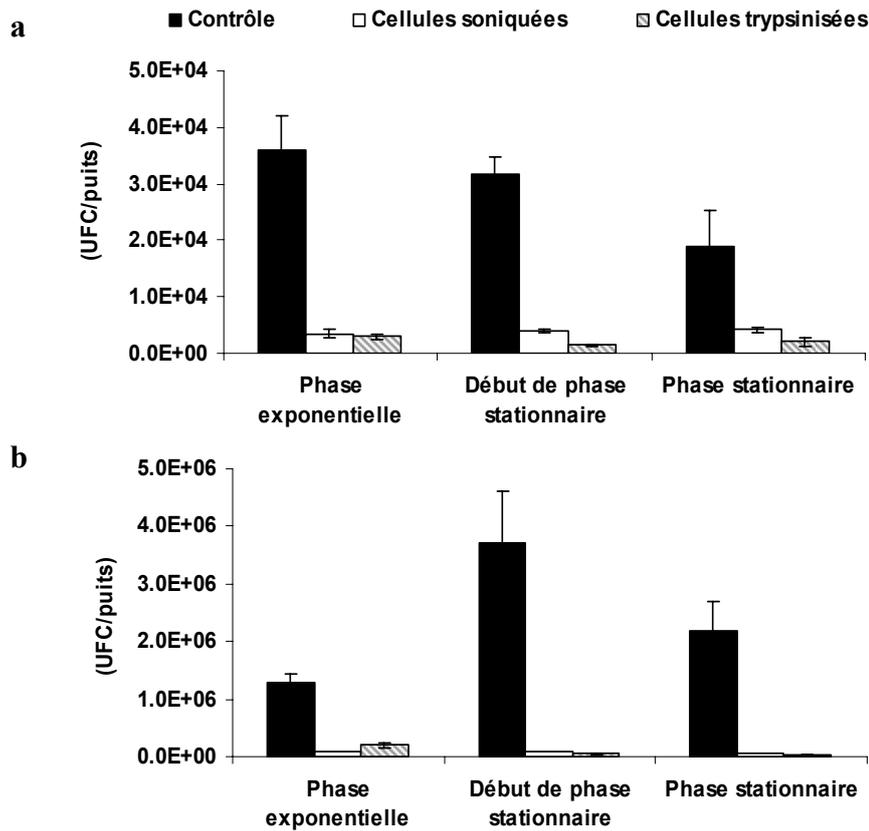
**Figure III.5 :** Etude de l'effet des traitements par ultrasons ou par la trypsine sur la viabilité des souches de *L. plantarum*. Chaque barre d'erreur est le résultat de trois expériences et représente la déviation standard ( $\pm$  SD).

d'estimation du nombre de cellules bactériennes adhérant à chacune des deux cibles moléculaire ou cellulaire choisies, repose sur une numération des unités formant colonies (UFC) après culture sur milieu solide MRS agar des bactéries désorbées des cibles. Il était donc essentiel de s'assurer au préalable que la diminution éventuelle du nombre de cellules bactériennes adhérant aux différentes cibles soit bien la conséquence d'un abaissement de leur capacité d'adhésion et non pas d'une mortalité induite par les différents prétraitements appliqués aux cellules de *L. plantarum* avant les tests en puits. Les résultats des tests de viabilité présentés sur la **Figure III.5** suggèrent que les traitements aux ultrasons à faible puissance et enzymatique par la trypsine ne sont pas létaux vis-à-vis des différentes souches de *L. plantarum*.

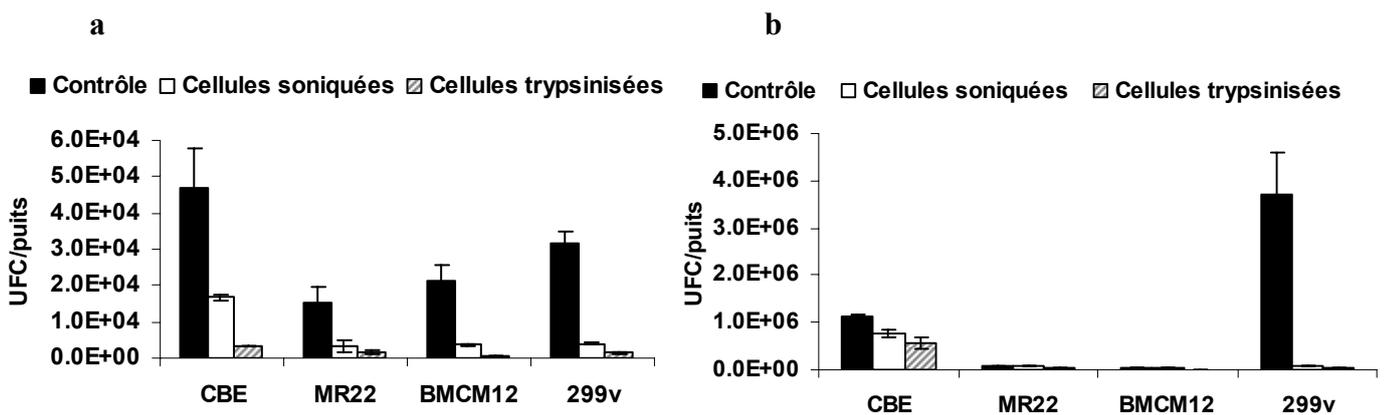
Le traitement mécanique aux ultrasons à faible puissance été utilisé afin de désorber des composés (protéines, polysaccharides,...) faiblement liés à la surface de la paroi bactérienne et qui pourraient être impliqués dans l'expression des propriétés physico-chimiques de surface et/ou intervenir directement en tant qu'adhésines dans l'interaction de la bactérie avec sa cible. La trypsine, quant à elle, hydrolyse des protéines de la paroi qui lui sont accessibles. Le traitement par cette protéase a été choisi comme référence, son effet sur des composés protéiques de surface impliqués dans l'adhésion de souches de *L. plantarum* à la mucine gastrique et aux cellules épithéliales intestinales de la lignée Caco-2 a été précédemment mis en évidence au laboratoire (Tallon *et al.*, 2007) ainsi que par de nombreux auteurs sur d'autres souches de lactobacilles (Green and Klaenhammer, 1994 ; Kos *et al.*, 2003).

Le traitement des cellules de *L. plantarum* 299v par ultrasons, quelle que soit la phase de croissance, engendre une chute de la capacité d'adhésion sur les cibles mucine et cellules Caco-2. L'abaissement est comparable à celui induit par le traitement enzymatique de référence **Figure III.6**.

Les ultrasons à faible puissance réduisent de 80 et 90% l'aptitude de *L. plantarum* 299v à adhérer respectivement à la mucine et aux cellules Caco-2. Nous avons également quantifié l'incidence de ce traitement sur la capacité d'adhésion des trois sous espèce de *L. plantarum*. Les résultats sont représentés sur la **Figure III.7**. Les souches CBE, MR22 et BMCM12 présentent une aptitude à adhérer aux cellules épithéliales intestinales nettement inférieure à celle du probiotique commercial *L. plantarum* 299v. On observe un abaissement remarquable de la capacité d'adhésion de MR22 et BMCM12 à la mucine à l'issue de la sonication, comparable à l'effet induit par le traitement à la trypsine. La souche CBE manifeste un comportement différent. Sa capacité d'interaction avec les deux cibles est beaucoup moins



**Figure III.6 :** Effet de traitements physique ou biochimique de la bactérie *L. plantarum* 299v, à divers stades de la croissance, sur sa capacité d'adhésion à la mucine (a) et aux cellules épithéliales intestinales Caco-2 (b). Le contrôle est une suspension bactérienne ayant seulement subi un lavage à pH 7,5 dans un tampon Tris 0,1M, avant la mise en œuvre dans le test d'adhésion. Chaque barre d'erreur est le résultat de trois expériences.



**Figure III.7 :** Etude comparée des effets de traitements par les ultrasons ou par la trypsin, sur la capacité d'adhésion à la mucine (a) ou aux cellules épithéliales intestinales Caco-2 (b) de 4 souches de *L. plantarum* prélevées en début de phase stationnaire. Chaque barre d'erreur est le résultat de trois expériences.

affectée à l'issue du traitement physique par ultrasons comparativement à celle de *L. plantarum* 299v sur les mêmes surfaces cibles. Si, il semble raisonnable d'attribuer l'effet négatif du prétraitement protéasique sur la capacité d'adhésion de *L. plantarum*, principalement à la dégradation d'entités moléculaires protéiques de la paroi, possédant initialement une fonction "d'adhésine", la justification de l'effet des ultrasons est nettement moins évidente.

A l'issue du traitement de sonication, les modifications induites au niveau de la paroi peuvent être multiples et l'abaissement observé de l'aptitude de la bactérie à interagir avec les cibles choisies est la résultante de l'ensemble de ces modifications. Parmi celles-ci on peut avancer : (i) la désorption de constituants protéiques, polysaccharidiques, acide téichoïques ou lipotéichoïques... faiblement ancrés à la paroi, (ii) une modification structurale de la surface de la paroi consécutive au phénomène de cavitation induit par la propagation des ultrasons. Ces deux effets ne sont pas forcément exclusifs l'un de l'autre. On comprend alors qu'il sera nécessaire, dans la suite du travail, d'expertiser la composition de l'extrait moléculaire complexe, désorbé de la paroi de *L. plantarum* 299v après traitement aux ultrasons, pour apporter des éléments de réponse.

A l'issue de cette première partie du travail, nous ne pouvons pas conclure sur l'implication directe des propriétés physico-chimiques de surface dans le processus d'adhésion des souches de *L. plantarum*. Bien qu'on observe une relation apparente entre l'hydrophobie de surface élevée de *L. plantarum* 299v et son importante capacité d'adhésion sur les cibles mucine et cellules Caco-2, on ne peut faire le même constat sur les autres souches de *L. plantarum* à savoir CBE, MR22 et BMCM12. En effet, la souche CBE, qui possède une hydrophobie globale faible, manifeste une capacité d'adhésion importante sur les deux constituants de la paroi intestinale étudiés. Elle est même l'une des souches de *L. plantarum* la plus adhérente sur la cible mucine. Alors que la souche MR22 qui présente une hydrophobie moyenne, possède quant à elle une faible capacité d'adhésion. Dans la littérature, d'autres auteurs (Savage, 1992 ; Schillinger *et al.*, 2005) ont fait les mêmes constats sur certaines souches de lactobacilles. Ils n'ont trouvé aucune corrélation entre l'hydrophobie de surface et la capacité d'adhésion de certains lactobacilles au mucus et aux cellules épithéliales intestinales. Schillinger *et al.*, (2005), ont conduit une étude sur un ensemble de souches de lactobacilles appartenant aux groupes *acidophilus* et *casei*. Les auteurs ont rapporté que les souches, possédant une forte hydrophobie de surface, présentent en général une importante capacité d'adhésion aux cellules épithéliales HT-29 MX. Toutefois, d'autres souches appartenant à ces mêmes groupes, caractérisées par une hydrophobie très faible, de l'ordre de

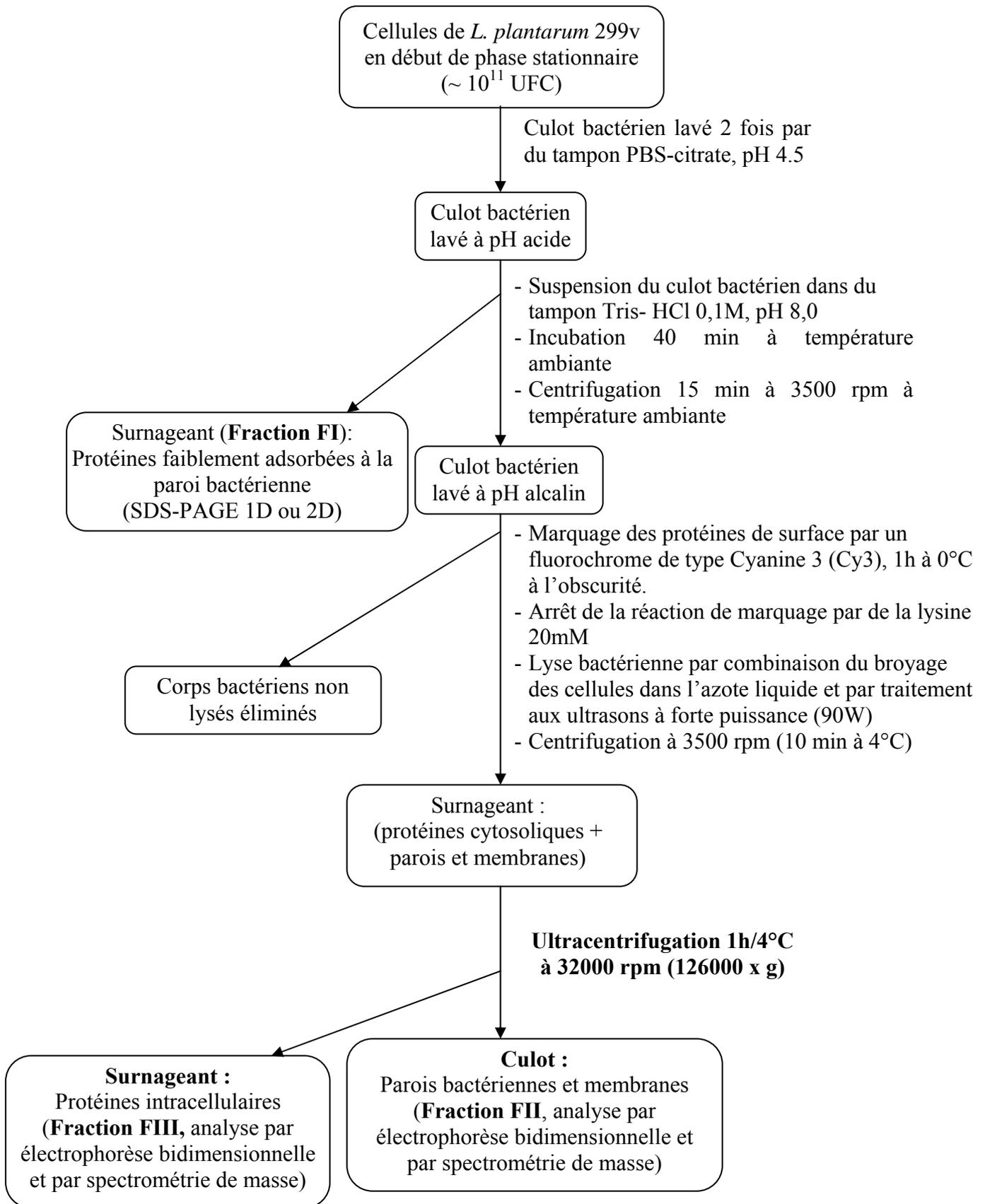
2%, sont capables d'adhérer aux cellules HT-29 MX (capacité d'adhésion de 40%). Les auteurs concluent sur le fait que l'hydrophobie de surface peut être utile à l'adhésion, mais ce n'est manifestement pas le seul prérequis et/ou facteur nécessaire qui intervient dans le processus d'adhésion bactérienne. En effet, l'hydrophobie de surface est l'une des propriétés physico-chimiques qui facilitent le premier contact entre le micro-organisme et les cellules hôtes. Elle est impliquée dans la phase initiale d'adhésion non-spécifique qui permet le rapprochement des bactéries de leurs cibles, qui laisse place à la 2<sup>ème</sup> étape d'adhésion spécifique, faisant intervenir des entités moléculaires protéiques et/ou non protéiques ancrées au niveau de la paroi bactérienne (Granato *et al.*, 1999; Rojas *et al.*, 2002 ; Roos and Jonsson, 2002). D'autres études antérieures étayent également l'absence de corrélation directe entre l'hydrophobie et la capacité d'adhésion (Wadström *et al.*, 1987 ; Vinderola *et al.*, 2004).

## **2 Entités moléculaires protéiques associées à la paroi de *L. plantarum* 299v et implication dans l'adhésion *in vitro***

### **2.1 Isolement et caractérisation de protéines associées à la paroi de *L. plantarum* 299v**

La fraction protéique associée à la paroi des bactéries Gram positif et en particulier des lactobacilles peut être complexe. Elle comprend :

- Des protéines simplement adsorbées à divers constituants de la paroi et facilement dissociables par simple lavage à pH faiblement alcalin compris entre 7 et 8 (Schaumburg *et al.*, 2004 ; Hurmalainen *et al.*, 2007). L'origine de ces protéines suscite encore beaucoup d'interrogations puisque, les séquences de leurs gènes codants ne comportent ni peptide signal qui permet de justifier une exportation du cytoplasme vers la paroi, ni motif d'ancrage qui permettrait leur fixation à l'enveloppe bactérienne. Elles sont communément appelées « anchorless proteins » du terme anglosaxon : sans motif d'ancrage (Pancholi and Fischetti, 1992 ; Delgado *et al.*, 2001 ; Hurmalainen *et al.*, 2007).
- Des protéines liées de façon covalente au peptidoglycane ou à la membrane plasmique par le biais de motifs d'ancrage spécifiques. Le séquençage récent du génome de *L. plantarum* (Kleerebezem *et al.*, 2003) prévoit environ 228 protéines potentiellement associées à la paroi de la bactérie.



**Figure III. 8 :** Schéma général du procédé d'extraction des protéines associées à la paroi de *L. plantarum* 299v.

Aussi, afin de simplifier notre approche visant à identifier les protéines de la paroi de *L. plantarum* 299v impliquées dans l'adhésion *in vitro* à des cibles du tractus intestinal, nous avons mis au point une procédure permettant d'isoler de manière sélective les protéines sur le critère de leur mode d'association à la paroi. Le schéma général de la démarche est illustré **Figure III.8**.

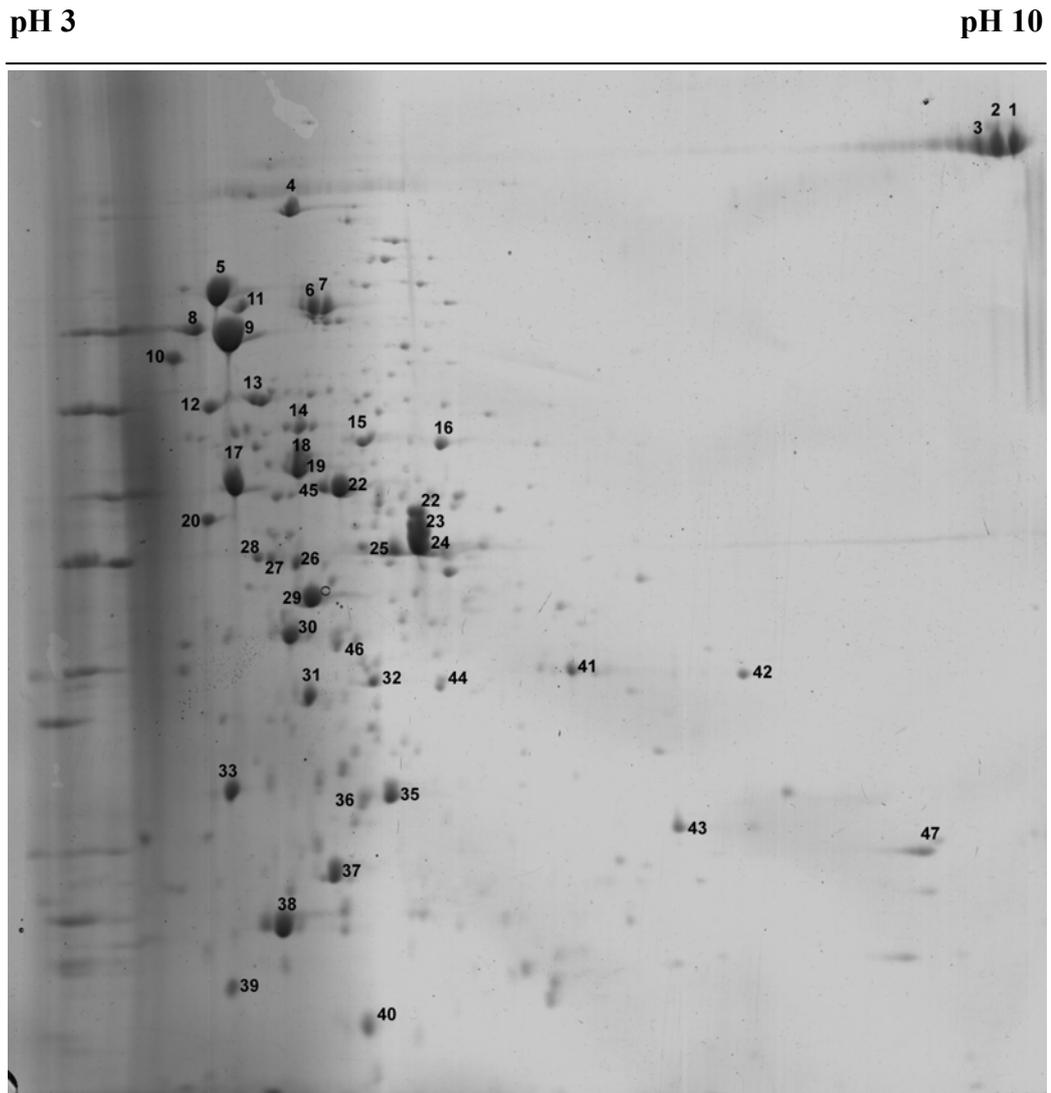
### **2.1.1 Extraction et caractérisation des entités protéiques faiblement liées à la paroi**

Les cellules de *L. plantarum* 299v sont prélevées en début de phase stationnaire car elles présentent un maximum de capacité d'adhésion à ce stade de leur croissance (Cf., **Figure III.6**). Après centrifugation, le culot bactérien est lavé avec un tampon phosphate-citrate, pH 5 afin d'éliminer les contaminants apportés par le milieu de culture. Les cellules ainsi lavées sont sédimentées puis le culot est incubé dans un tampon Tris 0,1M, pH 8 pendant 40 min à température ambiante. Le surnageant obtenu est dialysé, concentré par lyophilisation puis la fraction protéique qu'il contient est séparée par électrophorèse bidimensionnelle. L'ensemble des protéines présentes dans cet extrait constitue la fraction identifiée **FI**.

#### 2.1.1.1 Séparation des protéines de la fraction FI par électrophorèse bidimensionnelle

Les protéines constitutives de la fraction **FI** sont séparées par électrophorèse bidimensionnelle dans des conditions opératoires indiquées dans le chapitre matériels et méthodes. L'électrophorégramme, révélé au bleu colloïdal, est présenté **Figure III.9**. On observe un nombre important de spots (47 spots) traduisant la complexité de cette fraction protéique. Les spots les plus intenses sont repérés par une numérotation allant de 1 à 47. Ceux-ci ont été excisés du gel, puis protéolysés par la trypsine. Les peptides résultant de la protéolyse seront analysés par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF.

La très grande majorité des protéines constitutives de la fraction FI, possèdent des pHi acides compris entre 4 et 6. Sur la base de l'observation de l'électrophorégramme, **Figure III.9**, il est possible de formuler une première hypothèse permettant d'expliquer la présence très majoritaire de protéines de pHi acides dans la fraction FI. Lors du prélèvement des cellules bactériennes, en début de phase stationnaire, le pH du milieu est acide et voisin de 4 (pH 3,88 à 4, Cf. **Tableau III.6**). A ce pH, les protéines présentant des pHi compris entre 4 et 6 (**Figure III.9**), possèdent donc une charge nette positive et sont de ce fait susceptibles de



**Figure III.9 :** Analyse par électrophorèse bidimensionnelle, de la fraction protéique faiblement associée à la paroi de *L. plantarum* 299v et désorbée à l'issue du lavage de la suspension bactérienne par un tampon Tris 0,1M, pH 8 (Fraction FI). Le gel d'électrophorèse est révélé au bleu colloïdal.

s'adsorber à des constituants pariétaux polyanioniques tels que les acides téichoïques ou lipo téichoïques, polysaccharides... lors de leur "exportation" vers la paroi.

L'augmentation du pH de la suspension bactérienne à une valeur voisine de 8, lors de l'étape de lavage par le tampon Tris 0,1M, engendre une modification de la charge nette des composés amphotères associés à la paroi, telles que les protéines. Il s'en suit l'apparition de forces de répulsion électrostatiques entre les protéines alors chargées négativement et les autres constituants pariétaux tels que les acides téichoïques riches en groupes phosphates anioniques. Si les protéines étaient initialement adsorbées majoritairement par liaisons ioniques sur ces composés de la paroi, alors on comprend leur désorption dans de telles conditions. Antikainen *et al.*, (2007), dans un travail consacré à l'étude des protéines associées à la paroi de *L. crispatus*, émettent des hypothèses semblables pour justifier la désorption d'anchorless proteins telles que la GAPDH et l'énolase, consécutivement à un accroissement du pH. La désorption d'une forme pariétale de GAPDH à l'issue d'un lavage des cellules de *L. plantarum* La 318 par du tampon à pH faiblement alcalin (pH 7,4) a été également décrite très récemment par Kinoshita *et al.*, (2008).

#### 2.1.1.2 Identification des protéines de la fraction FI par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF

Les protéines présentes sous chacun des spots numérotés de 1 à 47 sur l'électrophorégramme **Figure III.9**, sont identifiées sur la base de leur carte tryptique établie par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF. L'excision des spots, l'hydrolyse tryptique ainsi que les conditions d'analyse par spectrométrie de masse sont décrites dans le chapitre matériels et méthodes. Les résultats sont présentés dans le **Tableau III.3**. Les protéines identifiées sont principalement d'origine cytoplasmique, impliquées majoritairement dans les métabolismes énergétique ou protéique ou dans le processus de stress. Rien, dans la fonction ni dans la structure des protéines identifiées, ne permet de prévoir leur exportation ou leur présence au niveau de la paroi de la bactérie. Elles appartiennent majoritairement à la famille des « anchorless proteins ». Une enzyme particulière à activité N-acétylmuramide hydrolase, a été identifiée, il s'agit de la muramidase (Ip\_2645). Cette protéine fait partie de la famille des protéines sécrétées.

Dans notre approche de la caractérisation des protéines faiblement associées à la paroi de *L. plantarum* 299v, nous avons utilisé une procédure non drastique pour laver les cellules bactériennes prélevées en début de phase stationnaire, afin de ne pas engendrer une lyse

**Tableau III.3** : Identification par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF des protéines faiblement associées à la paroi de *L. plantarum* 299v.

N° de spot	Protéines identifiées	N° de Locus	Masse moléculaire (Da)	pHi	Recouvrement* (%)
1, 2, 3	Muramidase	lp_2645	82140	8,99	36
4	Elongation factor G	lp_1027	76965	4,81	38
5	Molecular chaperone DnaK	lp_2027	66689	4,68	21
6,7	Pyruvate kinase	lp_1897	62827	4,99	19
8	Trigger factor	lp_2118	49406	4,5	14
9	Chaperonin GroEL	lp_0728	57402	4,69	17
10	Cell division protein Ftsz	lp_2193	44986	4,44	41
11	PEP-protein phosphatase	lp_1274	63071	4,69	46
12	F1F0 ATPsynthase Subunit beta	lp_2364	50800	4,58	40
13	30S ribosomal protein S1	lp_1882	47131	4,79	37
14	F1F0 ATPsynthase Subunit alpha	lp_2366	54545	4,95	32
15	Glutathione Reductase	lp_3267	48343	5,18	22
16	NADH peroxidase	lp_2544	48283	5,36	23
17	Phosphopyruvate Hydratase	lp_0792	48057	4,61	30
18,19	Glucose6phosphatase isomerase	lp_2502	49816	4,96	20
20	Putative Mn-dependent inorganic Pyrophosphate	lp_1837	33713	4,5	36
21	Phosphoglycerate Kinase	lp_0790	42770	5,04	17
22, 23,24 et 25	Glyceraldehyde3-Phosphate-dehydrogenase	lp_0789	36644	5,3	24
26	Non identifiée				
27, 28	DNA-directed RNAPol ymerase subunit alpha	lp_1062	34935	4,8	18
29	D-lactate dehydrogenase	lp_2057	37158	4,89	21
30	Lactate dehydrogenase	lp_0537	34111	4,86	50
31	Elongation factor Ts	lp_2054	31653	4,91	51
32	6 phosphofructo Kinase	lp_1898	34244	5,13	33

**Tableau III.3** : (suite)

<b>N° de spot</b>	<b>Protéines identifiées</b>	<b>N° de Locus</b>	<b>Masse moléculaire (Da)</b>	<b>pHi</b>	<b>Recouvrement (%)</b>
<b>33</b>	Triose phosphate Isomerase Non identifiée	lp_0791	27126	4,62	33
<b>35</b>	Fructose-bisphosphate aldolase	lp_0330	31016	5,07	32
<b>36</b>	Tetrahydropyridine- 2carboxylate-succinyl transférase	lp_2264	24537	5,02	31
<b>37</b>	Phosphoglyceromutase	lp_3170	26071	4,94	37
<b>38</b>	Non identifiée				
<b>39</b>	Transcription elongation factor G reA	lp_1563	17903	4,61	36
<b>40</b>	Ribosomal protein L10	lp_0621	17916	5,08	56
<b>41</b>	Mannose PTS EIIAB	lp_0575	35261	5,75	11
<b>42</b>	Oxidoreductase	lp_0206	29458	7,07	32
<b>43</b>	Enoyl-acyl carrier protein	lp_1681	26978	6,9	24
<b>44</b>	Oxidoreductase	lp_3403	31667	5,16	48
<b>45</b>	Elongation factor Tu	lp_2119	43350	4,95	34
<b>46</b>	Phosphotransacetylase	lp_0807	34515	5,04	45
<b>47</b>	50S ribosomal protein L1	lp_0620	24755	7,79	58

bactérienne et par conséquent une contamination artéfactuelle de la fraction **FI**. De plus nous avons également contrôlé l'absence de lyse bactérienne au moment de l'extraction de la fraction **FI** en dosant l'activité enzymatique d'un marqueur du milieu intracellulaire telle que la lactate déshydrogénase (LDH). Dans tous les cas, aucune trace d'activité de cette enzyme n'a été mise en évidence dans l'extrait **FI**. Afin de valider notre méthode de contrôle de l'intégrité des cellules pendant la phase d'extraction de la fraction **FI**, nous avons vérifié que la provocation d'une lyse par sonication à forte puissance (90W/3min), après le lavage des bactéries à pH 8, s'accompagne effectivement de l'apparition d'une activité LDH quantifiable dans le milieu réactionnel.

La présence de LDH identifiée sous les spots 29 et 30, **Figure III.9**, n'est pas la conséquence du protocole d'extraction de la fraction **FI**. La protéine devait être préalablement associée à la paroi de *L. plantarum* 299v et l'absence d'activité de l'enzyme pourrait être justifiée par la perte de sa structure native lors de son exportation vers la paroi bactérienne au cours de la croissance. La présence de protéines cytoplasmiques à la surface de bactéries Gram positif pathogènes et non pathogènes a été largement rapportée dans la littérature.

Tjalsmal *et al.*, (2008) ont identifié 41 protéines cytoplasmiques à la surface de *Bacillus subtilis* 168. Severin *et al.*, (2007) dans un travail consacré à l'étude des protéines associées à la paroi de *Streptococcus pyogenes*, ont caractérisé 79 protéines dont 21 protéines, soit 25%, sont cytoplasmiques. Enfin, Planchon *et al.*, (2007) font un constat similaire lors de la caractérisation du « surfacéome » de *Staphylococcus xylosus* C2a. Tous ces auteurs ont vérifié que la présence de telles protéines, inattendues à la surface des bactéries, n'était pas la conséquence d'une lyse bactérienne induite par le procédé d'extraction de ces dernières de la surface bactérienne. L'hypothèse d'une libération de protéines cytoplasmiques consécutive à une autolyse d'une fraction de cellules bactériennes au cours de la croissance, suivie de leur ré-adsorption sur la paroi est avancée mais aucun mécanisme précis permettant de justifier cette hypothèse n'est alors identifié.

Au vu de ces résultats et afin d'apporter des éléments objectifs d'information pouvant contribuer à justifier la présence de nombreuses protéines cytoplasmiques à la surface de *L. plantarum* 299v, nous exposerons ultérieurement une partie du travail consacrée à l'étude de la localisation de l'une de ces protéines, la GAPDH, qui nous semblait constituer un modèle approprié pour une telle approche.

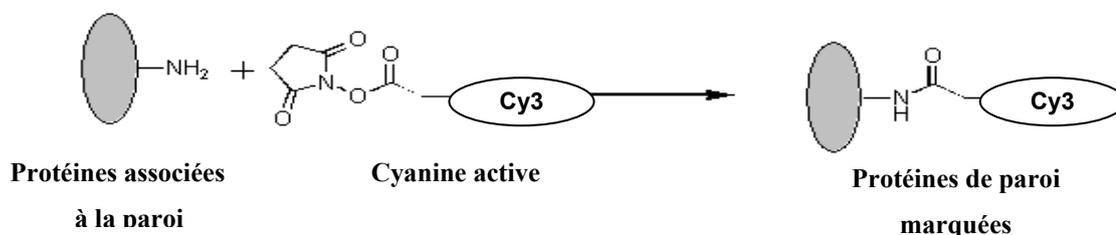
Auparavant, nous allons aborder la caractérisation de la fraction protéique **FII**, issue du protocole d'extraction précédemment illustré **Figure III.8**.

## 2.1.2 Extraction et identification des entités protéiques fortement associées à la paroi de *L. plantarum* 299v

### 2.1.2.1 Extraction après marquage spécifique

En 2003, le génome complet de la souche sauvage de *L. plantarum* WCFS1 a été totalement séquencé grâce aux travaux de l'équipe de Kleerebezem *et al.*, (2003). Sur cette base, les auteurs proposent l'existence de plus de 228 protéines exportables vers la paroi de *L. plantarum*. Les séquences de l'ensemble du « sécrétome » sont déposées dans les banques de données SwissProt ou Genbank. Un site web a même été créé par les auteurs de ces travaux : <http://www.cmbi.ru.nl/secretome> (Boekhorst *et al.*, 2006a). Ce site présente une classification générale de l'ensemble des protéines potentielles du « sécrétome » de la bactérie *L. plantarum*, soit sur le critère de la structure du domaine prévisible pour l'ancrage de chaque protéine à l'enveloppe bactérienne soit sur le critère de la fonction biologique attribuable à chacune d'entre elles.

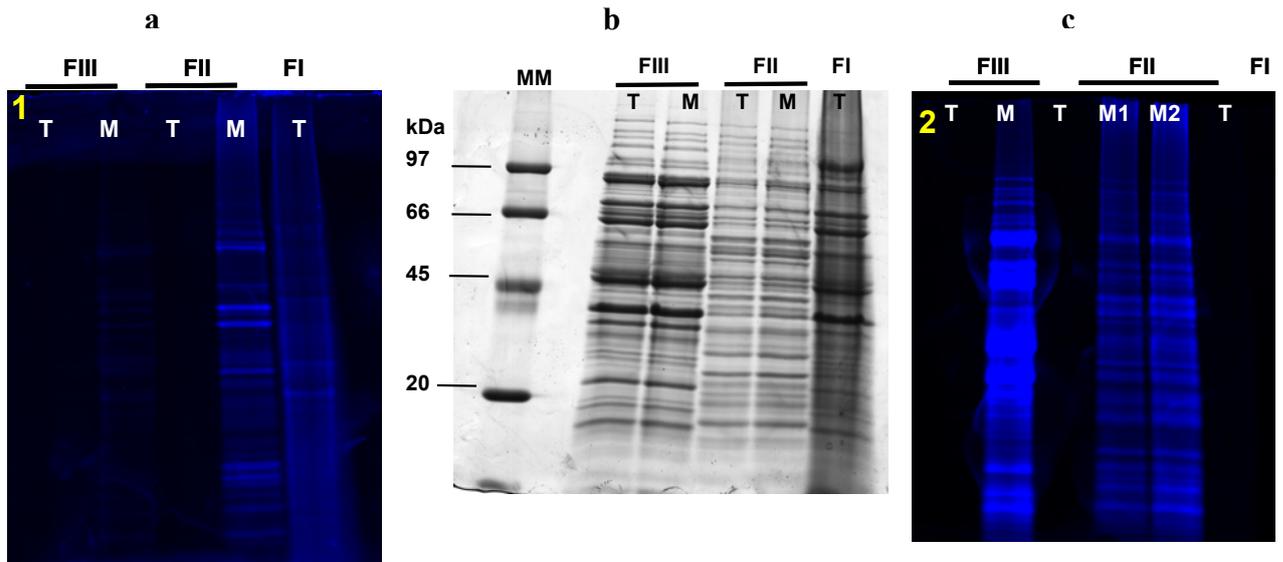
En nous appuyant sur l'ensemble de ces informations, nous avons opté, dans la suite du travail, pour une approche « protéomique » afin d'identifier les protéines associées à la paroi de *L. plantarum* 299v. Cependant, en raison de la faible abondance des protéines liées à l'enveloppe bactérienne (1 à 2% des protéines cellulaires), ces dernières sont difficiles à détecter sur un gel 2-D, sans avoir recours à une procédure spécifique d'enrichissement préalable de l'extrait en cette famille de protéines. Afin de nous affranchir d'une telle contrainte, nous avons réalisé un marquage spécifique par des fluorochromes de type cyanine (Cy3) des protéines accessibles à la surface de *L. plantarum* 299v. Ce marqueur fluorescent est couplé à des groupes N-hydroxysuccinimide (NHS-), qui vont former une liaison amide covalente avec les groupes  $\epsilon\text{NH}_2$  des résidus lysine des protéines présentes à la surface de la bactérie intègre (**Figure III.10**).



**Figure III.10** : Réaction de couplage entre les groupes N-hydroxysuccinimide-(NHS-) de la cyanine activée et les groupes  $\epsilon\text{NH}_2$  des protéines associées à la paroi de la bactérie intègre.

Cette étape de marquage délicate est réalisée au froid dans la glace afin d'éviter une internalisation de la cyanine au niveau cytoplasmique et par conséquent le marquage des protéines intracellulaires qu'il est impératif d'éviter. La méthode mise en œuvre est adaptée des travaux récents d'Anaya *et al.*, (2007) concernant la bactérie Gram négatif *Porphyromonas gingivalis*. Après le marquage par la cyanine Cy3, les protéines de l'enveloppe bactérienne sont isolées selon la procédure décrite **Figure III.8**, puis sont séparées par électrophorèse mono ou bidimensionnelle. L'identification des protéines est réalisée par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF sur la base de leur carte tryptique.

La **Figure III.11** présente les électrophorégrammes monodimensionnels (SDS-PAGE) des différentes sous fractions protéiques extraites, de *L. plantarum* 299v, selon le protocole décrit **Figure III.8**. Le gel **(a)** représente la séparation électrophorétique des protéines extraites des cellules entières et intègres de *L. plantarum* 299v ayant subi un marquage spécifique par la cyanine 3 avant la lyse et la séparation des différentes sous-fractions protéiques (**FII** et **FIII**). L'électrophorégramme révèle une faible intensité de fluorescence de la fraction **FII**, protéines fortement associées à la paroi de la bactérie, ce qui témoigne de la faible abondance de ces protéines au niveau de la paroi et/ou du faible taux de marquage de ces dernières. La comparaison de l'intensité de fluorescence de la sous fraction protéique (**FII**) du gel **(a)** à celle de cette même sous fraction marquée à la cyanine 3 après la lyse des cellules de *L. plantarum* 299v (gel **c**) confirme le faible taux de marquage des protéines associées à la paroi des bactéries entières. De plus, on observe une très faible fluorescence au niveau des protéines intracellulaires (**FIII**, gel **a**), consécutive à une légère diffusion probable du fluorochrome dans le milieu cytosolique de la bactérie. Cette contamination, seulement à un faible niveau, de la fraction des protéines extraites de la paroi, FII, par des protéines intracellulaires (FIII) est confirmée par l'électrophorégramme **(b)**, révélé au bleu colloïdal. En effet, on observe d'importantes différences qualitatives et quantitatives entre les profils électrophorétiques des fractions FII et FIII. Les protéines extraites de la paroi des cellules de *L. plantarum* 299v, préalablement marquées par la cyanine 3, sont séparées par électrophorèse bidimensionnelle dans les conditions expérimentales décrites dans le chapitre matériels et méthodes. L'électrophorégramme de la fraction FII, est visualisé aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de la cyanine 3 soit 554 et 568 nm respectivement (**Figure III.12**). Parallèlement,

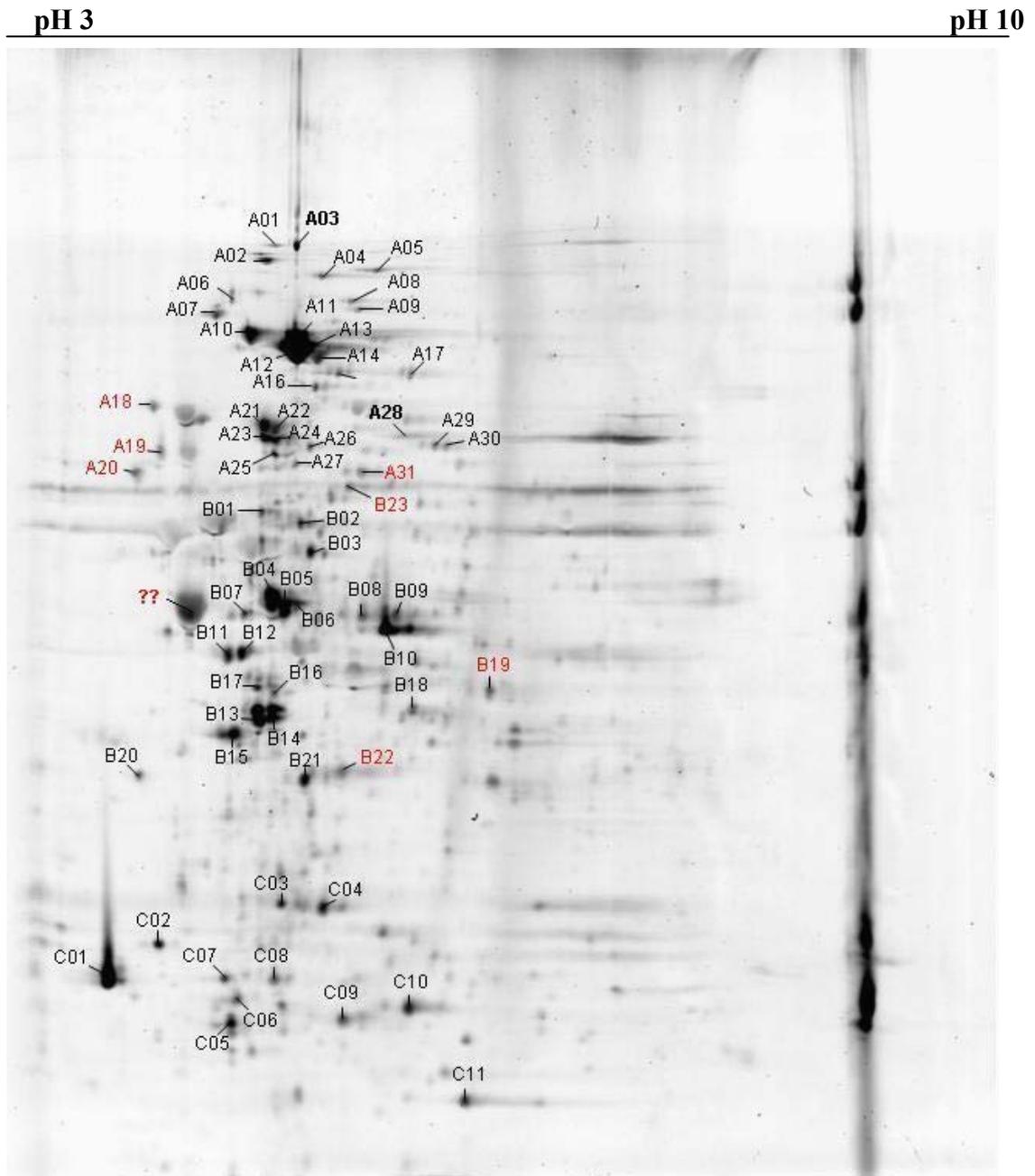


FI : Fraction de protéines faiblement associées à la paroi de *L. plantarum* 299v désorbées à pH 8

FII : Fraction de protéines plus fortement ancrées au niveau de l'enveloppe bactérienne de *L. plantarum* 299v

FIII : fraction de protéines cytosoliques de *L. plantarum* 299v

**Figure III.11** : SDS-PAGE des protéines associées à la paroi de *L. plantarum* 299v. **(a)** la bactérie entière et intègre est marquée par la cyanine Cy3, puis les fractions protéiques FII et FIII sont extraites après lyse bactérienne. La révélation est réalisée à  $\lambda_{\text{excitation}} = 554 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{émission}} = 568 \text{ nm}$ . **(b)** identique au gel **(a)** mais la révélation est réalisée au bleu colloïdal. **(c)** La bactérie est lysée puis les protéines totales sont marquées par la cyanine Cy3, avant d'être fractionnées en FII et FIII. La révélation est identique à celle du gel **(a)**. M : échantillon marqué, T : témoin non marqué.



**Figure III.12** : Séparation par électrophorèse bidimensionnelle des protéines associées à la paroi (FII) de *L. plantarum* 299v, après marquage par la cyanine 3. L'électrophorégramme est visualisé à une longueur d'onde d'excitation de 554 nm et à une longueur d'onde d'émission de 568 nm. Tous les spots identifiés A01 à C11, émettent une fluorescence consécutive au marquage par la cyanine 3.

nous avons réalisé une extraction des protéines associées à la paroi de *L. plantarum* 299v en suivant le protocole **Figure III.8** mais sans marquage préalable des cellules bactériennes par la cyanine 3. Aucune des protéines constitutives de FII ne présente une auto-fluorescence lorsque le gel 2D est révélé à la  $\lambda_{\text{excitation}} = 554 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{émission}} = 568 \text{ nm}$ .

#### 2.1.2.2 Identification des protéines par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF

Les protéines présentes sous chacun des 65 spots visualisés sur l'électrophorégramme **Figure III.12**, sont identifiées sur la base de leur carte tryptique, par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF. Chaque spot protéique est excisé du gel 2D, hydrolysé à la trypsine puis analysé par spectrométrie de masse selon les conditions opératoires décrites dans le chapitre matériels et méthodes. Les résultats sont présentés dans le **Tableau III.4**. Le serveur bioinformatique "Psortb v.0.2" qui prévoit la localisation finale des protéines bactériennes, a été utilisé afin de définir la localisation des protéines présentes sous les 65 spots révélés par fluorescence. L'analyse sur "Psortb v.0.2" de ces protéines prévoit une association à la paroi ou à la membrane plasmique de *L. plantarum* 299v pour 6 d'entre elles. On identifie donc sous le spot A6, la protéine (lp\_1633) dont la localisation prévoit une association à la paroi. L'analyse de la séquence de gène codant pour cette protéine attribue une fonction de récepteur de reconnaissance des séquences peptidiques signales. D'autres fonctions ont été également attribuées à cette protéine, telles que la fixation au GTP, une activité nucléoside triphosphatase et enfin une activité d'interaction, de manière non covalente, à n'importe quelle protéine ou complexe protéique. Les protéines sous les spots B10 (lp\_1264), B18 (lp\_2352), C9 (lp\_0803) et C10 (lp\_0878) sont identifiées comme des transporteurs membranaires d'oligopeptides ou d'acides aminés. Ces protéines appartiennent à la famille des "ABC transporters", présentant des domaines transmembranaires (Cf. **Tableau III.4**). Des protéines appartenant à cette famille de transporteurs membranaires ont été répertoriées dans le « Sécrétome » de *L. plantarum* WCSF1 (Boekhorst *et al.*, 2006a), ces dernières présentent des motifs d'ancrage à la membrane plasmique de type Lipobox (LXXC). Enfin, une protéine hypothétique sous le spot A28 (lp\_0139) de fonction inconnue, est quant à elle répertoriée dans le « sécrétome » de *L. plantarum* 299v. Ces résultats sont néanmoins originaux puisque aucun travail antérieur sur les protéines de *L. plantarum* n'a décrit la présence de ces protéines au niveau de la paroi de la bactérie. En plus de telles protéines dites de la paroi ou de membrane, 13 protéines cytoplasmiques "anchorless proteins" précédemment identifiées à

**Tableau III.4** : Identification par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF des protéines associées à la paroi de *L. plantarum* 299v (FII) et préalablement marquées par la cyanine 3 (Cy3).

N° de spot	Protéines de surface identifiées	Masse moléculaire (Da)	N° locus	pI
<b><u>Protéines de paroi</u></b>				
A6	Signal recognition particle receptor FtsY	53926	lp_1633	4.84
A28	Hypothetical protein	64710	lp_0139	5.37
<b><u>Protéines membranaires</u></b>				
B10	Oligopeptide ABC transporteur	39760	lp_1264	5.60
B18	Amino acid ABC transporteur ATP binding protein	37676	lp_2352	5.73
C9	Glutamine ABC transporter, ATP-binding protein	26827	lp_0803	5.17
C10	Glutamine ABC transporter, ATP-binding protein	27226	lp_0878	5.47
<b><u>Protéines hypothétiques</u></b>				
A18	Hypothetical protein lp_1626	60746	lp_1626_	4.47
C1	Hypothetical protein lp_2260	18034	lp_2260	4.28
C11	Hypothetical protein lp_2340	17597	lp_2340	5.91
<b><u>Protéines de localisation inconnue</u></b>				
A20	Cell division protein FtsZ	44986	lp_2193	4.44
B20	Cell division initiation protein DivIVA	26158	lp_2189	4.49

**Tableau III.4** : (suite)

N° de spot	Protéines de surface identifiées	Masse moléculaire (Da)	N° de locus	pI
<b><u>Anchorless proteins précédemment identifiées à la surface d'autres espèces Gram positif</u></b>				
A10	Elongation factor G	76965	1p_1027	4.81
A7	Membrane alanine aminopeptidase	93890	1p_0937	4.77
A22	Pyruvate kinase	62827	1p_1897	4.99
B4, 5, 6	Elongation factor TU	43350	1p_2119	4.95
B22	30S ribosomal protein S2	30207	1p_2055	5.23
C4	Fructose biphosphate aldolase	30902	1p_0330	5.07
A25, A26	Pyruvate oxydase	63600	1p_0852	4.94
A27	Pyruvate oxydase	63515	1p_0894	5.21
A1	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	134759	1p_1021	4.97
A2	carbamoyl-phosphate synthase	115685	1p_2700	4.95
A9	Leucyl-tRNA synthetase	92570	1p_1316	5.33
A17	Glycyl-tRNA synthetase beta subunit	78483	1p_1964	5.44
A21	Aspartyl t-RNA synthetase	67618	1p_1980	4.94
<b><u>Protéines cytoplasmiques</u></b>				
A3	Non identifiée			
A4	Alanine-tRNA ligase	97205	1p_2227	5.14
A5	Pyruvate carboxylase	127218	1p_2136	5.44

**Tableau III.4** : (suite)

N° de spot	Protéines de surface identifiées	Masse moléculaire (Da)	N° de locus	pI
A11, A12	Maltose Phosphorylase	85684	1p_1730	4.92
A16	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	82090	1p_0693	5.17
A20	Dipeptidase PepV	50767	1p_1321	4.47
A23	Non identifiée			
A24	Phosphoglucomutase	63497	1p_0764_	4.99
A29, 30	Asparagin synthetase	73093	1p_0980	5.62
A31	Non identifiée		-	
B1	Bifunctional GMP synthetase/glutamate amidotransferase	57421	1p_0914	4.97
B2	6-Phospho-Beta- glucosidase	54848	1p_2777	5.10
B3	6-phosphogluconate Déshydrogénase	52949	1p_1541_	5.04
B7	Non identifiée			
B8	Glutamate ammonia ligase	50940	1p_1581	5.35
B9	NADH Dehydrogenase	43932	1p_0313	5.43
B11	Galactokinase	42847	1p_3482	4.83
B12	Non identifiée			
B13, B14	Lactate déshydrogénase	37158	1p_0257	4.89
B15	Cell shape determining protein	35123	1p_2319	4.79
B16	Non identifiée			
B17	Phosphoesterase	44546	1p_1416	4.86
B19	Cyclopropane fatty-acyl-phospholipid Synthetase	45437	1p_3174	6.03

**Tableau III.4 :** (suite)

N° de spot	Protéines de surface identifiées	Masse moléculaire (Da)	N° de locus	pI
B21	Cell shape determining protein MreB	35864	1p_2359	5.15
B23	Catalase	55294	1p_3578	5.31
C2	Non identifiée			
C3	septum site-determining protein MinD	29196	1p_2315	4.98
C5	Non identifiée			
C6	Deoxyguanosine kinase	24918	1p_1329	4.81
C7	Deoxyguanosine kinase	24319	1p_1011	4.76
C8	Phosphoglyceromutase	26071	1p_3170	4.94

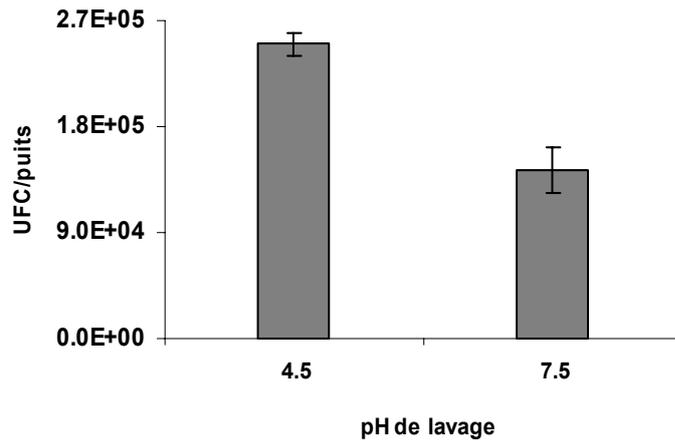
la surface d'autres espèces Gram positif, sont également mises en évidence à la surface de *L. plantarum* 299v (Cf. **Tableau III.4**). Parmi ces dernières, on remarque l'absence de la GAPDH et de l'Enolase. Ces deux enzymes ont été probablement totalement désorbées de la paroi à l'issue du lavage à pH alcalin des cellules bactériennes, qui précède l'étape de marquage par la Cy3. En raison de l'abondance de ces deux enzymes dans le milieu cytoplasmique, leur absence dans la fraction **FII** confirme la spécificité du marquage des protéines associées à la surface de *L. plantarum* 299v.

Dans la littérature, de nombreux travaux font état de la présence de protéines d'origine cytoplasmique à la surface de bactéries Gram positif telles que les Streptocoques du groupe A (Severin *et al.*, 2007), *Listeria monocytogenes* (Schaumburg *et al.*, 2004), *Bacillus subtilis* (Tjalsma *et al.*, 2008) et *Streptococcus pneumoniae* (Ling *et al.*, 2004). Si le constat de la présence de protéines d'origine intracellulaire, associées à la surface de bactéries Gram positif pathogènes et non pathogènes est fréquent, aucune explication rationnelle, étayée expérimentalement n'est avancée à ce jour. A ce niveau de notre travail, nous avons estimé qu'il était intéressant d'essayer d'apporter des éléments de réponse à la question concernant le ou les mécanismes qui peuvent être mis en jeu lors de "l'exportation" vers la paroi bactérienne des « anchorless proteins » identifiées dans les fractions FI et FII. Cette partie de notre étude sera présentée ultérieurement, après la caractérisation de l'affinité des protéines de la paroi de *L. plantarum* 299v pour différentes cibles du tractus intestinal.

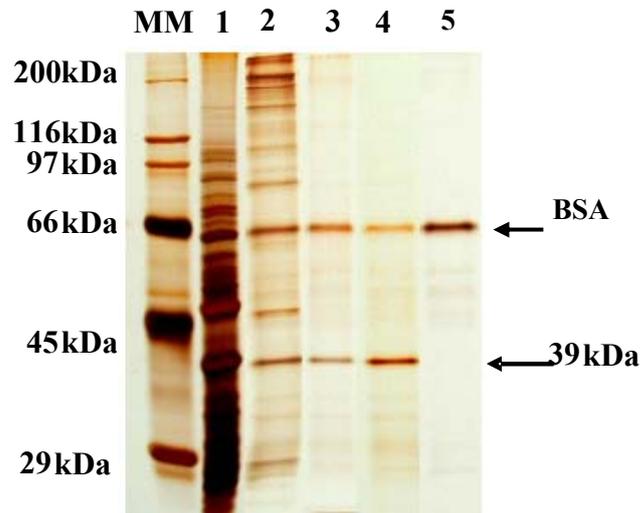
#### **2.2 Evaluation *in vitro* de l'affinité des protéines de la paroi de *L. plantarum* 299v pour différentes cibles du tractus intestinal**

Nous avons mis au point des tests *in vitro* afin d'évaluer l'affinité de protéines extraites de la paroi de *L. plantarum* 299v, pour des éléments de la paroi intestinale, susceptibles d'être en contact avec la bactérie lors de son transit dans le tractus. Deux cibles moléculaires de la paroi intestinale ont été sélectionnées pour réaliser l'étude:

- La mucine qui est une glycoprotéine de haut poids moléculaire constitutive du mucus recouvrant la paroi intestinale ;
- Les protéines de la matrice extracellulaire. Cette matrice est une structure complexe qui recouvre les cellules épithéliales et les relie entre elles. Elle est principalement constituée de collagène, de protéoglycane, d'élastine et de protéines structurales (fibronectine, laminine, vitronectine et entracine).



**Figure III.13** : Capacité d'adhésion de *L. plantarum* 299v sur cible fibronectine en fonction du pH de lavage des cellules bactériennes avant la mise en œuvre dans le test.



**Figure III.14** : Sélection, par test sur microplaque, des protéines de l'extrait FI possédant une affinité pour divers constituants de la matrice extracellulaire. (MM) marqueurs de masses moléculaires, (1) extrait brut FI, protéines adsorbées sur : (2) cible fibronectine, (3) collagène de type I, (4) laminine, et (5) témoin négatif BSA. Le gel SDS-PAGE est révélé au nitrate d'argent.

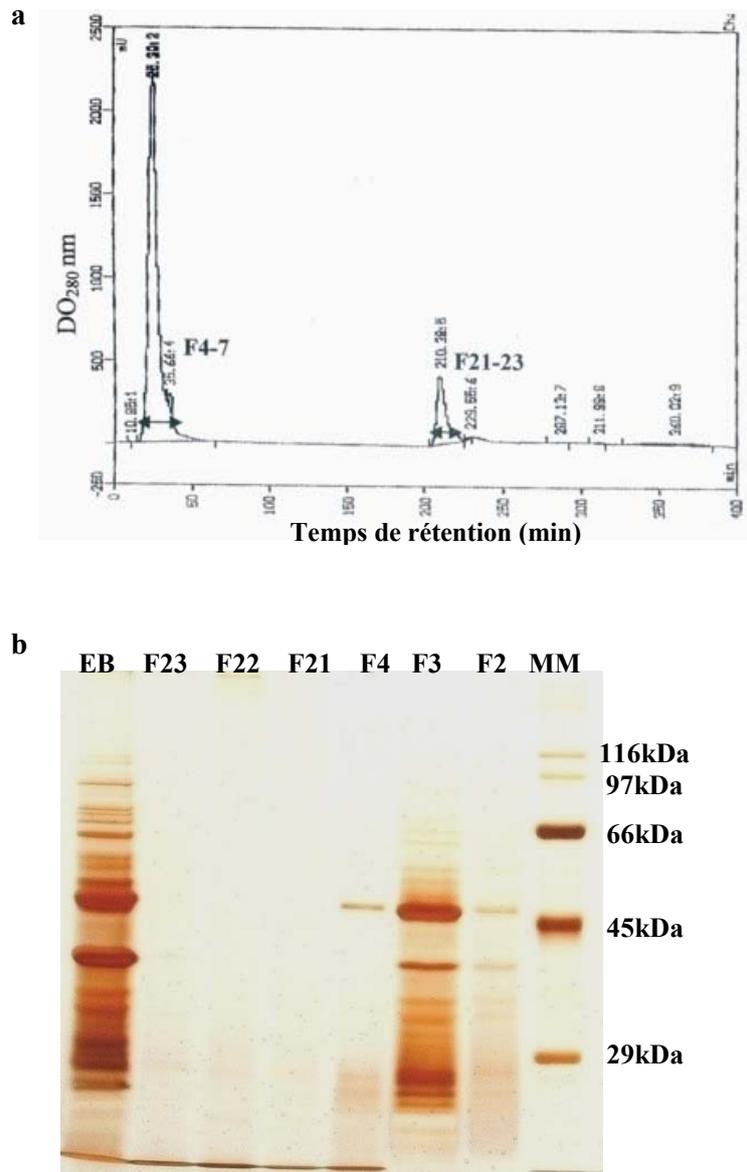
Pour des raisons de faisabilité, nous n'avons pas retenu les cellules épithéliales intestinales Caco-2 en tant que cible pour les tests d'affinité. En effet, il était difficile de contrôler l'adsorption de protéines de la paroi bactérienne sur un tel modèle, sans être confronté à un problème de contamination par les protéines des cellules épithéliales dans les conditions expérimentales que nous avons fixées.

Dans l'approche visant à identifier des protéines de la surface de *L. plantarum* 299v, impliquées dans l'adhésion *in vitro*, nous avons sélectionné celles constituant la fraction FI définie précédemment (section 2.1.1). En effet, nous avons mis en évidence que le lavage des cellules de *L. plantarum* 299v à  $\text{pH} \geq 7$  engendrait conjointement la désorption de l'ensemble des constituants protéiques identifiées dans FI de la paroi bactérienne ainsi qu'un abaissement supérieur à 50% de la capacité d'adhésion de la bactérie probiotique aux protéines de la matrice extracellulaire (**Figure III.13**). Par conséquent, cette observation est compatible avec l'intervention de certains des constituants protéiques de la fraction FI dans l'adsorption de *L. plantarum* 299v sur de telles cibles moléculaires et justifie la recherche d'adhésines potentielles au sein de cette fraction protéique.

#### 2.2.1 Affinité pour les protéines de la matrice extracellulaire

##### 2.2.1.1 Test d'affinité sur microplaques

La préparation des microplaques de 96 puits est réalisée selon le protocole décrit dans le chapitre matériels et méthodes. Les puits sont recouverts avec des protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine humaine, le collagène de type I, ou la laminine de souris. L'extrait protéique identifié FI, initialement à l'état lyophilisé, est solubilisé dans un tampon Tris 0,1M, pH 8 à une concentration finale de 1 mg/mL. 100  $\mu\text{l}$  de cette solution sont mis en contact avec les différentes protéines cibles immobilisées dans les puits. Après 2h de contact, les protéines ne présentant pas d'affinité pour les cibles immobilisées sont éliminées par lavage des puits avec du tampon  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25mM, pH8. Les protéines de l'extrait FI de *L. plantarum* 299v présentant de l'affinité pour chacun des constituants de la matrice extracellulaire testés sont ensuite désorbées à l'aide d'une solution de SDS 2% (p/v) puis séparées par électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Un puits témoin permettant de visualiser l'absence d'adsorption non-spécifique des protéines de la fraction FI sur le support plastique, passivé avec la BSA, est systématiquement réalisé. Les résultats sont présentés **Figure III.14**. Quelle que soit la cible moléculaire mise



**Figure III.15 :** (a) Séparation des protéines de l'extrait FI par chromatographie d'affinité sur Sépharose greffé 4B par le collagène type I. (b) Analyse SDS-PAGE des fractions d'éluat collectées après séparation des protéines de l'extrait FI (EB) par chromatographie d'affinité sur Sépharose greffé par le collagène type I. F2 à F23 correspondent aux numéros des fractions collectées à la sortie de colonne. EB : extrait des protéines FI déposé sur la colonne. MM : marqueurs de masses moléculaires.

en œuvre, on observe l'adsorption spécifique d'une protéine de la fraction **FI**, caractérisée par la présence d'une bande de masse moléculaire estimée à 39 kDa. Toutefois, une protéine supplémentaire, de masse moléculaire estimée à 48-50 kDa s'adsorbe sur la cible fibronectine.

#### *2.2.1.2 Chromatographie d'affinité sur collagène type I*

Parallèlement au test d'affinité sur microplaque, nous avons développé une méthode de chromatographie d'affinité sur colonne afin d'essayer de récupérer des quantités de protéines de l'extrait FI, possédant une affinité pour les cibles choisies, compatible avec une étude structurale.

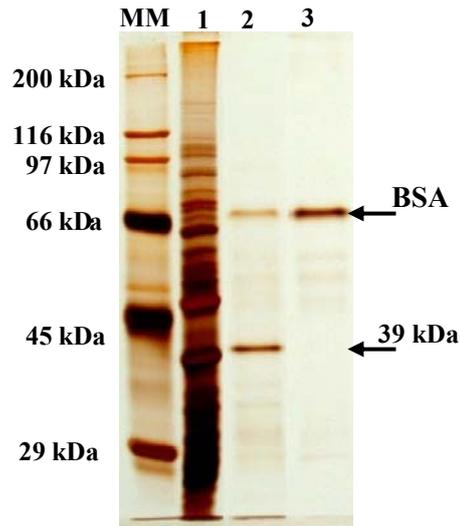
La phase stationnaire Sépharose 4B est greffée par du collagène de type I selon la procédure décrite dans le chapitre matériels et méthodes. Le chromatogramme ainsi que l'analyse par SDS-PAGE des fractions d'éluat sont présentés **Figure III.15**. Les compositions qualitative et quantitative des fractions d'éluat recueillies dans le volume mort de la colonne chromatographique (Fractions 2 à 4) sont différentes de celle de l'extrait FI (EB) déposé sur la colonne, **Figure III.15**. L'intensité de coloration de la bande électrophorétique de masse moléculaire estimée à 39 kDa est fortement réduite dans les Fractions 2 à 4, ce qui témoigne de l'adsorption de cette protéine sur le "ligand" collagène type I. De plus cette même bande protéique est complètement absente dans les fractions éluées ultérieurement (fractions 21 à 23). Cette observation est en accord avec une adsorption irréversible de la protéine de masse moléculaire estimée à 39 kDa, sur la cible collagène type I.

Le comportement de la protéine de masse moléculaire 39kDa vis-à-vis de la cible collagène type I confirme sa forte affinité pour les constituants de la matrice extracellulaire et son implication potentielle dans l'adhésion de *L. plantarum* 299v sur ces derniers.

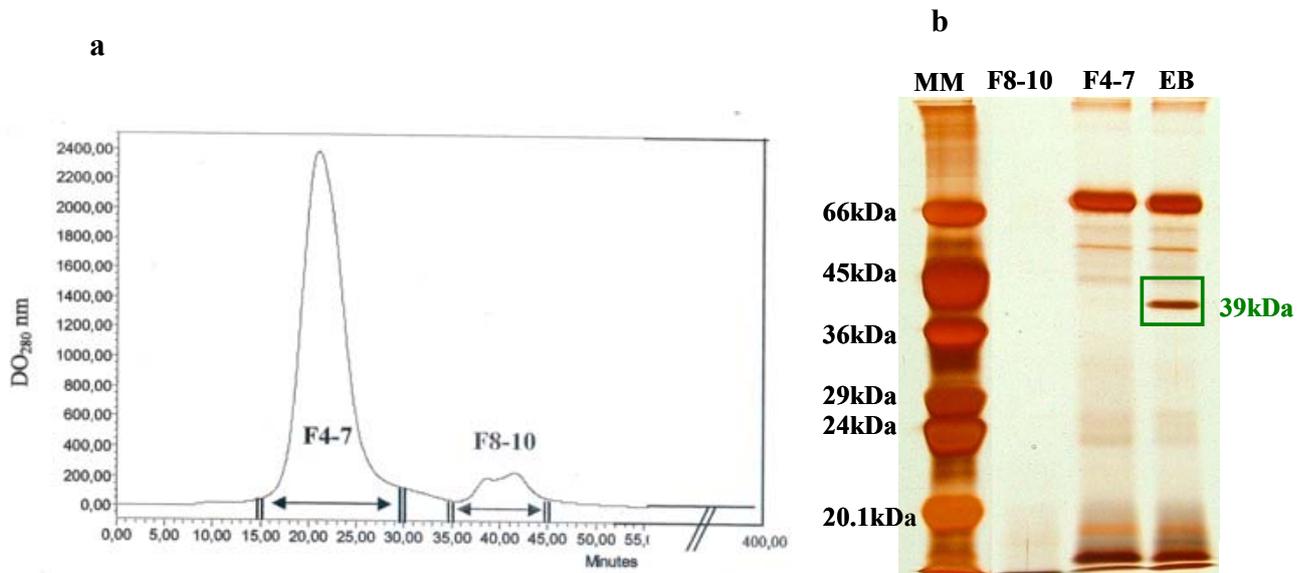
### **2.2.2 Affinité pour la mucine**

#### *2.2.2.1 Test d'affinité sur microplaque*

La mucine gastrique de porc a été immobilisée sur microplaque 96 puits comme décrit précédemment pour les cibles "protéines de la matrice extracellulaire". L'interaction des protéines constitutives de la fraction **FI** avec la cible mucine immobilisée, a été réalisée dans des conditions expérimentales identiques à celles mises en œuvre pour les protéines de la matrice extracellulaire (Cf. section **2.2.1.1**). Les protéines de l'extrait FI possédant une affinité pour la cible mucine sont désorbées à l'aide d'une solution de SDS à 2% (p/v) puis



**Figure III.16 :** Caractérisation par test sur microplaques, de l’affinité des protéines désorbées de la paroi de *L. plantarum* 299v (FI) pour la cible mucine gastrique de porc. (MM) marqueurs de masses moléculaires, (1) extrait brut FI, (2) protéine de l’extrait FI, adsorbée sur la cible mucine, (3) témoin négatif BSA. Les protéines sont révélées par coloration au nitrate d’argent.



**Figure III.17 :** (a) Séparation des protéines de l’extrait FI par chromatographie d’affinité sur Sépharose greffé par la mucine. (b) Analyse SDS-PAGE des fractions d’éluat collectées après séparation des protéines de l’extrait FI par chromatographie d’affinité sur Sépharose greffé par la mucine. F4 à F10 correspondent aux numéros des fractions d’éluat collectées. EB : extrait brut FI déposé sur la colonne. MM : marqueurs de masses moléculaires.

séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les résultats représentés **Figure III.16** témoignent de l'adsorption spécifique de la protéine de masse moléculaire estimée à 39kDa.

#### 2.2.2.2 Chromatographie d'affinité sur mucine

Une colonne de Sepharose greffé par la mucine gastrique a été préparée selon le protocole décrit dans le chapitre matériels et méthodes. Les fractions d'éluat issues de la chromatographie d'affinité sur le support Sepharose greffé par la mucine sont analysées par SDS-PAGE. Les profils des séparations chromatographique et électrophorétique sont illustrés **Figure III.17**. La comparaison du profil électrophorétique des fractions d'éluat recueillies dans le volume mort de la colonne chromatographique (**Fractions 4 à 7**) avec celui de l'extrait brut FI déposé sur la colonne (**Figure III.17b**), révèle l'absence de la bande électrophorétique à environ 39 kDa. Ce résultat confirme sans ambiguïté l'adsorption spécifique de la protéine de masse moléculaire 39kDa sur le ligand mucine. De plus, cette bande protéique est absente dans les fractions d'éluat collectées ultérieurement (**F8 à F10**), ce qui rend compte d'une adsorption irréversible de la protéine sur la cible mucine. A l'issue de cette analyse et en accord avec les résultats des tests sur microplaque, nous confirmons l'affinité de cette protéine pour la mucine gastrique. Dès lors on peut émettre l'hypothèse d'une implication de cette protéine dans l'adhésion de *L. plantarum* 299v sur la mucine.

### **2.3 Identification structurale des protéines possédant une affinité pour les cibles mucine et constituants de la matrice extracellulaire**

#### **2.3.1 Séquençage N-terminal de la protéine de masse moléculaire 39 kDa**

Les protéines associées à la paroi de *L. plantarum* 299v, désorbées à pH  $\geq 7,5$  sont séparées par SDS-PAGE. On réalise ensuite leur électrotransfert sur une membrane de polyvinylidifluorure (PVDF) dans des conditions décrites dans le chapitre matériels et méthodes. Les protéines électro-transférées sont ensuite révélées au bleu de coomassie, la bande protéique correspondant à la masse moléculaire de 39kDa est excisée de la membrane de PVDF et sa séquence N-terminale est établie par la dégradation chimique récurrente d'Edman en collaboration avec le service de séquençage, de l'IBCP (Institut de Biologie et Chimie des Protéines) de Lyon. La séquence N-terminale identifiée à l'aide d'un microséquençeur Applied Biosystem 492A est présentée **Figure III.18** ci-dessous :

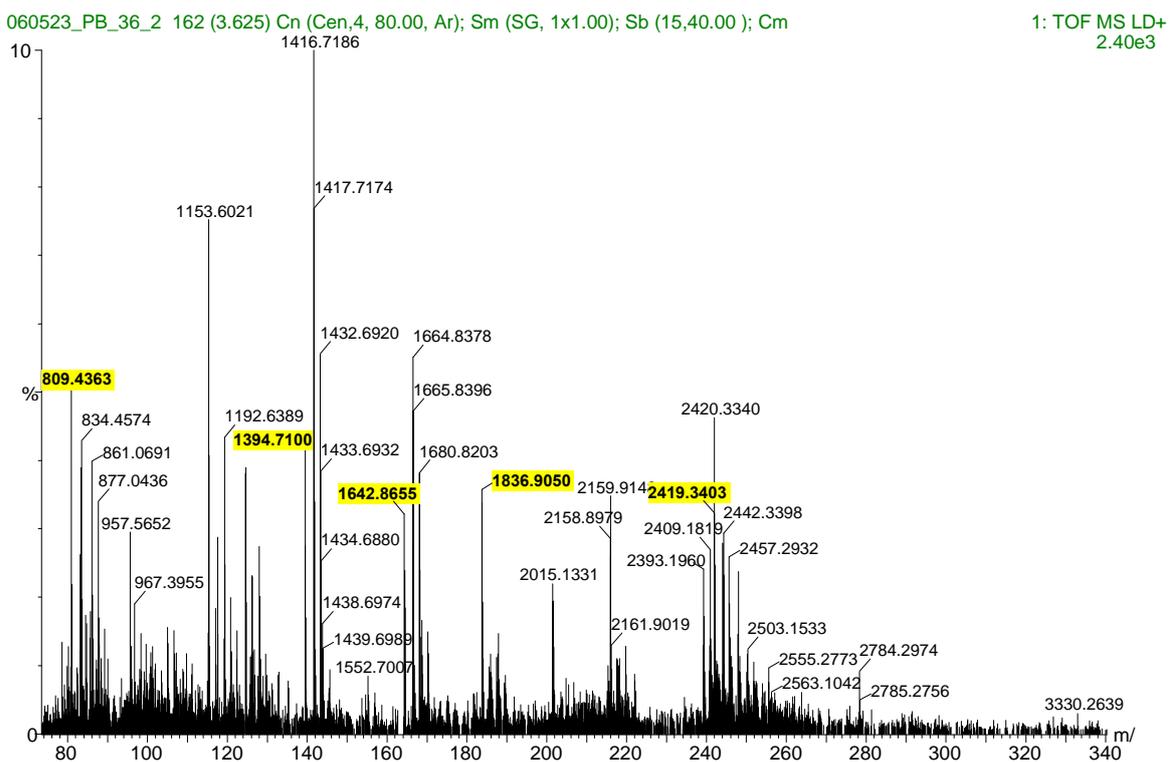
```
L. plantarum 299v NH2- MSVKIGINGFGRIGRLAF 18 ---  
                  :: ::::::::::: ::::::::::: :: ::  
Q88YH6_LCPL    NH2- MSVKIGINGFGRIGRLAF 18 ---
```

**Figure III.18** : Alignement de la séquence N-terminale de la protéine de 39kDa avec celle de la GAPDH Q88YH6\_LCPL codée par le gène de la souche sauvage *L. plantarum* WCFS1.

La séquence N-terminale de la protéine de masse moléculaire de 39 kDa extraite de la surface de *L. plantarum* 299v, a été soumise à un alignement avec les séquences des protéines de *L. plantarum* répertoriées dans la banque de données SwissProt (<http://us.exspasy.org>). Cette étude comparée indique 100% d'homologie entre la séquence N-terminale (18 résidus d'acides aminés) de la protéine à 39 kDa et celle déduite de la séquence du gène codant pour l'enzyme glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) de la souche sauvage *L. plantarum* WCFS1. Afin d'élucider définitivement la structure de la protéine de masse moléculaire 39 kDa, nous avons établi sa carte tryptique par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF puis nous avons comparé celle-ci à la carte tryptique théorique de la GAPDH, déduite de la séquence de son gène codant dans la souche sauvage *L. plantarum* WCFS1.

### 2.3.2 Etablissement, par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF, de la carte tryptique de la protéine de masse moléculaire 39 kDa

La bande correspondant à la protéine de 39 kDa est excisée du gel SDS-PAGE puis soumise à une protéolyse par la trypsine. Après l'hydrolyse enzymatique, les peptides résultants sont extraits puis analysés par spectrométrie de masse en mode MALDI- TOF selon le protocole défini dans la partie matériels et méthodes. La distribution des masses moléculaires des peptides issus de la digestion tryptique de la protéine de 39 kDa est illustrée par le spectre de masses obtenu en mode MALDI-TOF (**Figure III.19**). La comparaison des masses moléculaires des peptides tryptiques ainsi générés à celles des peptides tryptiques prévisibles d'après la séquence de la GAPDH établie sur la base du gène codant est illustrée dans le **Tableau III.5**. Si l'identification de cette protéine n'est pas sujette à caution, sa localisation à la surface de la bactérie *L. plantarum* 299v est assez surprenante au premier abord. En effet, la GAPDH est une enzyme clé de la glycolyse, elle catalyse la

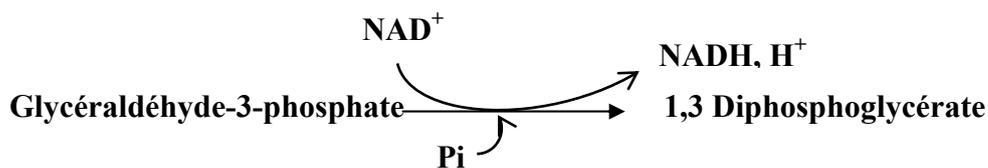


**Figure III.19** : Carte trypsique, établie par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF, de la bande de masse moléculaire 39 kDa de *L. plantarum* 299v.

**Tableau III.5** : Comparaison des masses moléculaires des peptides tryptiques issus de la bande de masse moléculaire 39kDa avec celles des peptides tryptiques théoriques déduits de la séquence de la GAPDH de la souche sauvage *L. plantarum* WCFS1.

(M+H <sup>+</sup> ) des peptides tryptiques de la protéine de 39 kDa	(M+H <sup>+</sup> ) des peptides tryptiques théoriques de la GAPDH de <i>L. plantarum</i> WCFS1	Position des peptides	Séquence du peptide identifié
809,4363	809,4373	233-239	LQGHAQR
1394,7100	1394,7386	206-220	AAGVNTIPHSTGAAK
1642,8655	1642,8587	78-91	VYAEPQAQNIPWVP
1836,9050	1836,8974	134-149	TIVYNVNDDILTADDR
2419,3403	2419,3442	28-50	SSDIEVVAINDLTSPALLAHLK

phosphorylation du glycéraldéhyde-3- phosphate en 1,3 diphosphoglycérate, en présence du coenzyme NAD ( $\beta$ -nicotinamide adénine dinucléotide) et de phosphate inorganique.



Cependant, cette enzyme qui appartient à la famille des « anchorless proteins » a déjà été identifiée à la surface de nombreuses souches de bactéries Gram positif pathogènes et non-pathogènes telles que les Streptocoques du groupe A (Pancholi and Fischetti, 1992), *Staphylococcus aureus* (Modun and Williams, 1999), *Mycoplasma genitalium* (Alvarez et al., 2003), *Listeria monocytogenes* (Schaumburg et al., 2004) et *Saccharomyces cerevisiae* (Delgado et al., 2001). Chez les bactéries pathogènes, la GAPDH contribue à leur virulence en agissant comme récepteur spécifique du plasminogène. Celui-ci est un précurseur de la plasmine, protéase impliquée dans l'hydrolyse des constituants de la matrice extracellulaire, favorisant ainsi le processus d'invasion de l'hôte par le pathogène. De plus, elle confère au microorganisme pathogène une capacité d'adhésion aux constituants du tractus gastro-intestinal. La GAPDH a été détectée également à la surface de bactéries commensales telles que *L. crispatus* ST1, *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* and *L. lactis* (Hurmala et al., 2007). Récemment, l'identification de la GAPDH à la surface de *L. plantarum* a été également rapportée pour les souches de *L. plantarum* LA318 et 423 (Kinoshita et al., 2008 ; Ramiah et al., 2008).

#### 2.4 La GAPDH associée à la paroi de *L. plantarum* 299v : contribution à l'étude de son exportation et de son rôle à la surface de la bactérie

Si la présence de la GAPDH ainsi que celles d'autres « housekeeping enzymes » de la famille des "anchorless proteins" telle que l'énolase, à la surface de bactérie Gram positif, est bien établie, les mécanismes mis en jeu lors de l'exportation de telles protéines du milieu intracellulaire vers la surface de la bactérie ne sont pas élucidés à ce jour. Plusieurs auteurs font référence à une libération de ces enzymes cytoplasmiques dans le milieu de culture consécutivement à la lyse bactérienne pendant la croissance, puis à leur ré-adsorption sur certains constituants de la paroi du microorganisme. Toutefois cette hypothèse n'est étayée par aucune vérification expérimentale.

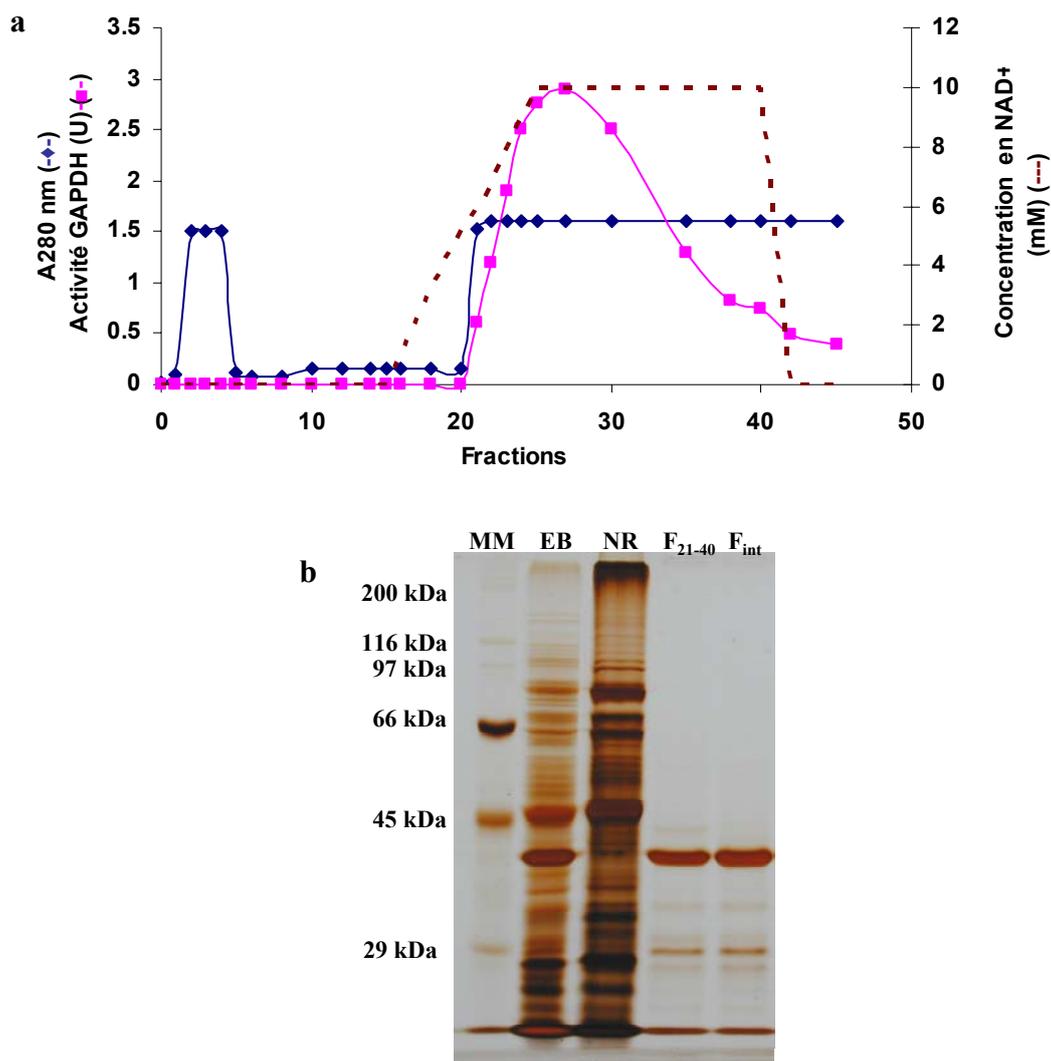
A ce stade de notre travail, nous avons considéré que la GAPDH constituerait un modèle d'étude approprié pour aborder deux questions fondamentales :

- Quels peuvent être le ou les mécanismes mis en jeu lors de l'exportation de ces « housekeeping enzymes » vers la paroi de la bactérie ?
- Quelles fonctions peuvent être associées à la présence de ces enzymes à la surface du lactobacille ?

#### 2.4.1 Extraction et purification des formes pariétale et cytoplasmique de la GAPDH

Les deux formes de GAPDH, intracellulaire et associée à la paroi de *L. plantarum* 299v ont été extraites et purifiées afin de comparer leurs structures primaires, quaternaires ainsi que leurs activités spécifiques. L'accès à ces données est indispensable pour vérifier expérimentalement si l'exportation de l'enzyme cytoplasmique vers la surface bactérienne s'accompagne de modifications structurales.

Le protocole de préparation des extraits bruts de protéines intracellulaires et désorbées de la paroi de *L. plantarum* 299v, contenant chacun une forme de GAPDH, est décrit dans le chapitre matériels et méthodes. La purification de la GAPDH est réalisée en une seule étape par chromatographie de pseudo-affinité sur colonne blue-Sepharose CL6B (GE Health Care). Le ligand bleu cibacron F3G-A possède une structure 3D mimétique de celle du NAD, qui est de ce fait reconnu spécifiquement par des enzymes telle que la GAPDH utilisant le NAD comme coenzyme (Mounaji *et al.*, 2002). Le chromatogramme est présenté **Figure III.20a**. L'élution spécifique de la GAPDH est réalisée à l'aide d'un gradient en NAD. La présence de la GAPDH dans les fractions d'éluat collectées, est détectée grâce à la mesure de l'activité de l'enzyme dans des conditions opératoires décrites dans le chapitre matériels et méthodes. Les fractions contenant l'enzyme (Fraction 21 à 40) sont rassemblées, concentrées par ultrafiltration puis analysées par SDS-PAGE. L'électrophorégramme, **Figure III.20b**, révèle la présence d'une seule bande de masse moléculaire estimée à 39 kDa, quelle que soit l'origine de l'extrait protéique purifié. La grande sensibilité de la révélation au nitrate d'argent permet d'observer l'absence de contaminants protéiques dans les fractions contenant la GAPDH. Cette première analyse par SDS-PAGE ne permet pas de différencier les deux formes de GAPDH, intracellulaire et associée à la paroi. Afin de visualiser d'éventuelles différences



**Figure III.20 :** (a) Purification par chromatographie de pseudo-affinité sur colonne « blue Sepharose CL6B » des formes associée à la paroi et intracellulaire de la GAPDH. Le débit est fixé à 2 mL/min et l'éluat est collecté par fraction de 2 mL. L'élution sélective de l'enzyme est réalisée grâce à un gradient linéaire de NAD et sa présence est détectée par mesure de son activité. Le chromatogramme présenté correspond à celui de la forme pariétale de la GAPDH, celui concernant la forme intracellulaire de l'enzyme est strictement identique.

(b) Analyse par SDS-PAGE des fractions collectées après la chromatographie de pseudo-affinité sur colonne blue Sepharose CL 6B. **MM** : marqueurs de masses moléculaires, **EB** : extrait brut des protéines de paroi de *L. plantarum* déposé sur la colonne, **NR** : protéines non-retenues par la phase stationnaire (volume mort), **F<sub>21-40</sub>** : pool des fractions 21 à 40 éluées par le gradient de NAD et présentant une activité GAPDH, **F<sub>int</sub>** : pool de fractions de la GAPDH intracellulaire purifiée. Le gel est révélé au nitrate d'argent.

structurales entre ces deux formes de l'enzyme, nous avons comparé leurs masses moléculaires ainsi que leurs structures primaires et quaternaires.

## 2.4.2 Caractérisation structurale des deux formes de GAPDH identifiées chez *L.*

### *plantarum* 299v

#### 2.4.2.1 Comparaison des structures primaires des deux formes de GAPDH

##### 2.4.2.1.1 Détermination de la masse moléculaire par LC/ESI/SM

Les masses moléculaires sont mesurées sur la base des spectres de masses obtenus pour chacune des formes de GAPDH purifiées, après leur analyse par chromatographie liquide haute performance en phase inversée sur colonne C4 couplée à la spectrométrie de masse en mode Electrospray (LC/ESI/MS). Avant injection sur la colonne C4, les préparations de GAPDH purifiées sont dialysées contre un tampon  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM, pH 8,8. Les chromatogrammes sont présentés **Figure III.21**.

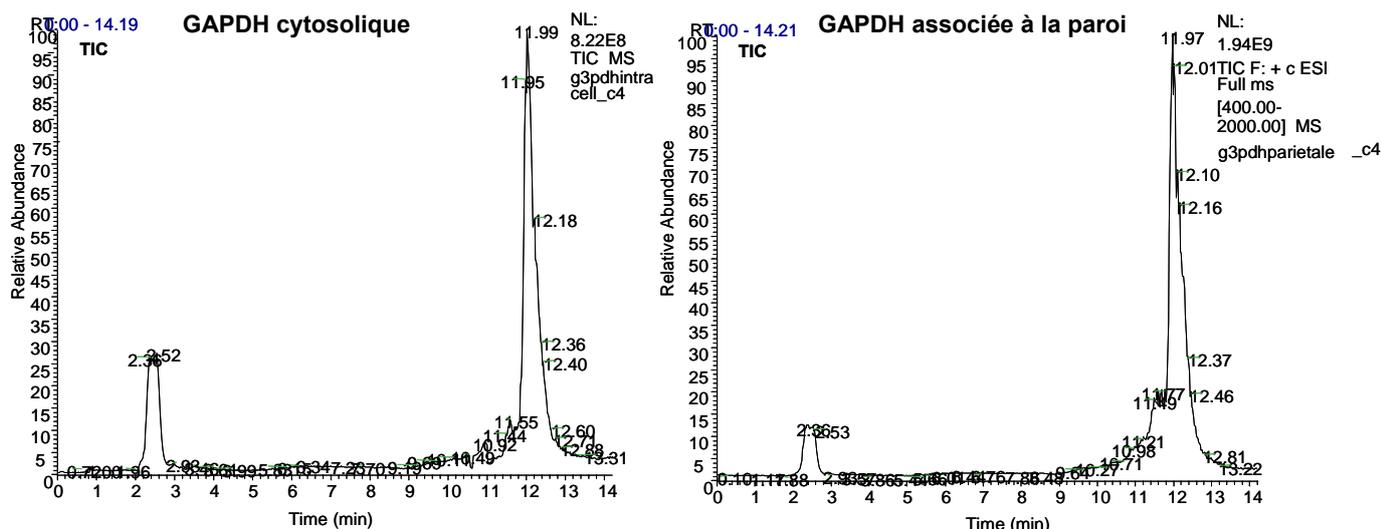
La séquence de la GAPDH de *L. plantarum*, déduite du gène codant et référencée Q88YH6 dans la banque de données SwissProt, prévoit un acide aminé méthionine en position N-terminale précédé d'un résidu sérine. L'excision du résidu méthionine N-terminal lors de la phase de traduction de l'ARNm, consécutivement à l'action d'une méthionine aminopeptidase, est fréquente surtout lorsque l'acide aminé qui précède, possède une chaîne latérale faiblement encombrante tel que le résidu sérine (Hirel *et al.*, 1989). De ce fait la GAPDH peut être présente sous deux formes chez *L. plantarum* :

- L'une de masse moléculaire de 36438 Da, avec une méthionine en position N-terminale, en accord avec la séquence Q88YH6 donnée dans SwissProt
- L'autre, sans le résidu méthionine mais avec un résidu sérine en position N-terminale, présentant ainsi une masse théorique calculée de 36307 Da.

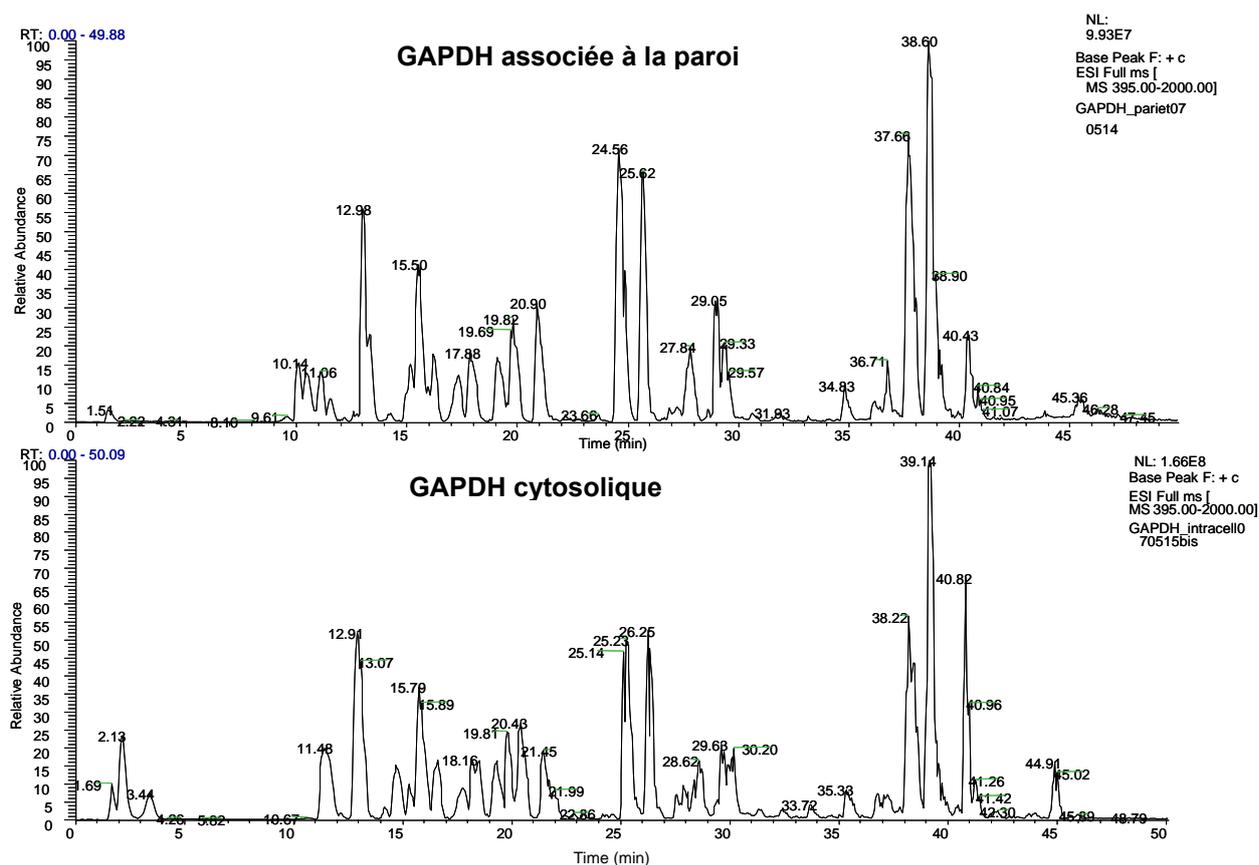
Cette hypothèse est vérifiée expérimentalement puisque les masses moléculaires mesurées par LC/ESI/MS sont de :

- 36430 et 36436  $\pm$  10 Da respectivement pour les formes cytoplasmique et associée à la paroi, présentant un résidu méthionine en position N-terminale.
- 36306 et 36312  $\pm$  10 Da pour les formes sans méthionine

Une telle observation nous permet de conclure d'une part sur l'identité structurale entre les formes pariétale et cytoplasmique de GAPDH et d'autre part sur l'absence de modification post-traductionnelle.



**Figure III.21:** Analyse des formes de GAPDH (Cytosolique et associée à la paroi) par HPLC en phase inversée sur colonne C4 (150 x 4,6 mm) couplée à un détecteur spectromètre de masse en mode LC ESI-SM/SM.



**Figure III.22 :** Séparation des peptides issus de la digestion trypsique de chacune des deux formes de GAPDH (Cytosolique et associée à la paroi), par HPLC en phase inversée sur colonne C18 (150 x 2,1 mm) couplée à un détecteur spectromètre de masse en mode LC ESI-SM/SM.

#### 2.4.2.1.2 Analyse comparée des cartes tryptique par LC/ESI/SM

Afin de confirmer l'identité des structures primaires des deux formes de GAPDH, nous avons établi et comparé leurs cartes tryptiques. La préparation avant l'analyse chromatographique est détaillée dans le chapitre matériels et méthodes. Les hydrolysats tryptiques sont séparés par HPLC sur colonne capillaire C18 couplée à un spectromètre de masse en tandem, équipé d'une source nanospray LC-ESI-MS/MS.

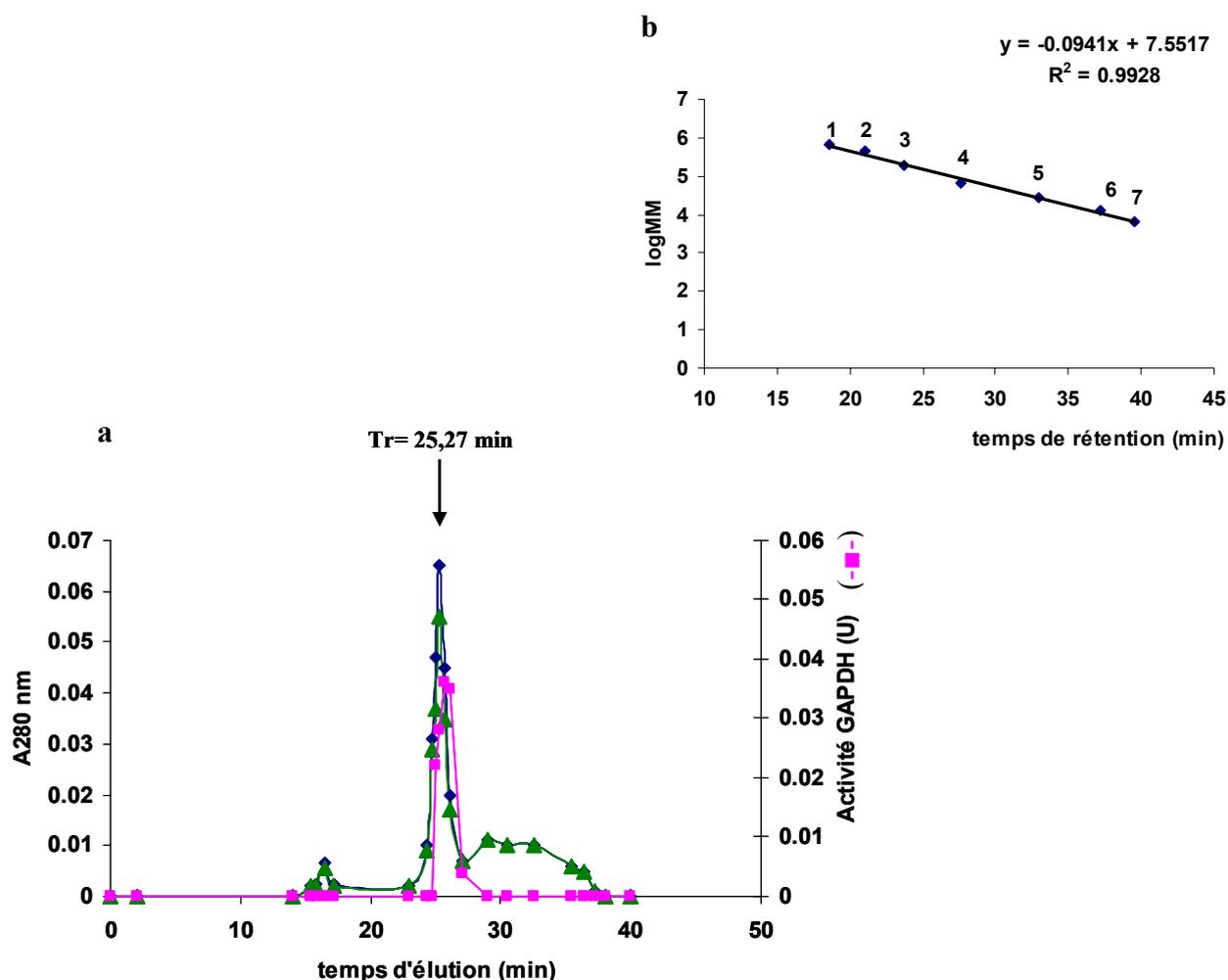
Les chromatogrammes et les cartes tryptiques sont présentés **Figure III.22**. La comparaison des cartes tryptiques de chacune des deux formes de GAPDH révèle une totale homologie. Toutefois, l'identité des profils chromatographiques (**Figure III.22**) des peptides tryptiques séparés sur la colonne C18, confirment sans ambiguïté l'absence de différence entre les structures primaires des formes, associée à la paroi et cytoplasmique de GAPDH chez *L. plantarum* 299v.

#### 2.4.2.2 Comparaison des états oligomériques des deux formes de GAPDH

La GAPDH possède une structure oligomérique qui a été relativement bien conservée au cours de l'évolution (Fothergill-Gilmore and Michels, 1993). L'enzyme cytoplasmique active se présente sous la forme d'un homotétramère constitué de 4 sous-unités de 35 à 37 kDa. Les deux formes purifiées et actives de GAPDH extraites de *L. plantarum* 299v, sont analysées par exclusion moléculaire sur gel Superdex 200. La séparation chromatographique est réalisée en utilisant une phase mobile constituée d'un tampon  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25mM contenant du DTT 5mM, du PMSF 1mM et de l'EDTA 5mM afin de protéger le site actif et de préserver la structure native oligomérique pendant l'élution (Korndörfer *et al.*, 1995 ; Souza and Radi, 1998).

Quelle que soit la localisation de la GAPDH, les deux formes de l'enzyme possèdent le même temps de rétention dans le système chromatographique mis en œuvre (**Figure III.23**) et la masse moléculaire est estimée à 148 kDa sur la base de la courbe d'étalonnage de la colonne Superdex 200. Cette observation confirme l'état tétramérique des deux protéines. La masse calculée du tétramère sur la base de la séquence Q88YH6 répertoriée dans la banque de données SwissProt serait de  $36400 \times 4$  soit 145,6 kDa.

Les activités spécifiques de chacune des deux formes d'enzymes purifiées ont été mesurées. Les valeurs expérimentales sont de  $20 \pm 2$  U/mg et  $10 \pm 2$  U/mg respectivement pour les



**Figure III.23** : Analyse par filtration moléculaire sur gel Superdex 200 des formes natives de GAPDH extraites de *L. plantarum* 299v. GAPDH associée à la paroi (-♦-);GAPDH cytoplasmique (-▲-). L'élution est réalisée à un débit de 0,5 mL/min par un tampon  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50mM, pH 7,5, contenant du DTT 5 mM, de l'EDTA 5 mM et du PMSF 1 mM. Encadré : Courbe d'étalonnage de la colonne Superdex 200, établie à l'aide du mélange de marqueurs de masses moléculaires : (1) Thyroglobuline, 669000 Da, (2) Apoferritine, 443000 Da, (3)  $\beta$ -Amylase, 200000 Da, (4) BSA 67000 Da, (5) Anhydrase carbonique 29000 Da, (6) Cytochrome C 12400 Da, et (7) Aprotinine 6500 Da.

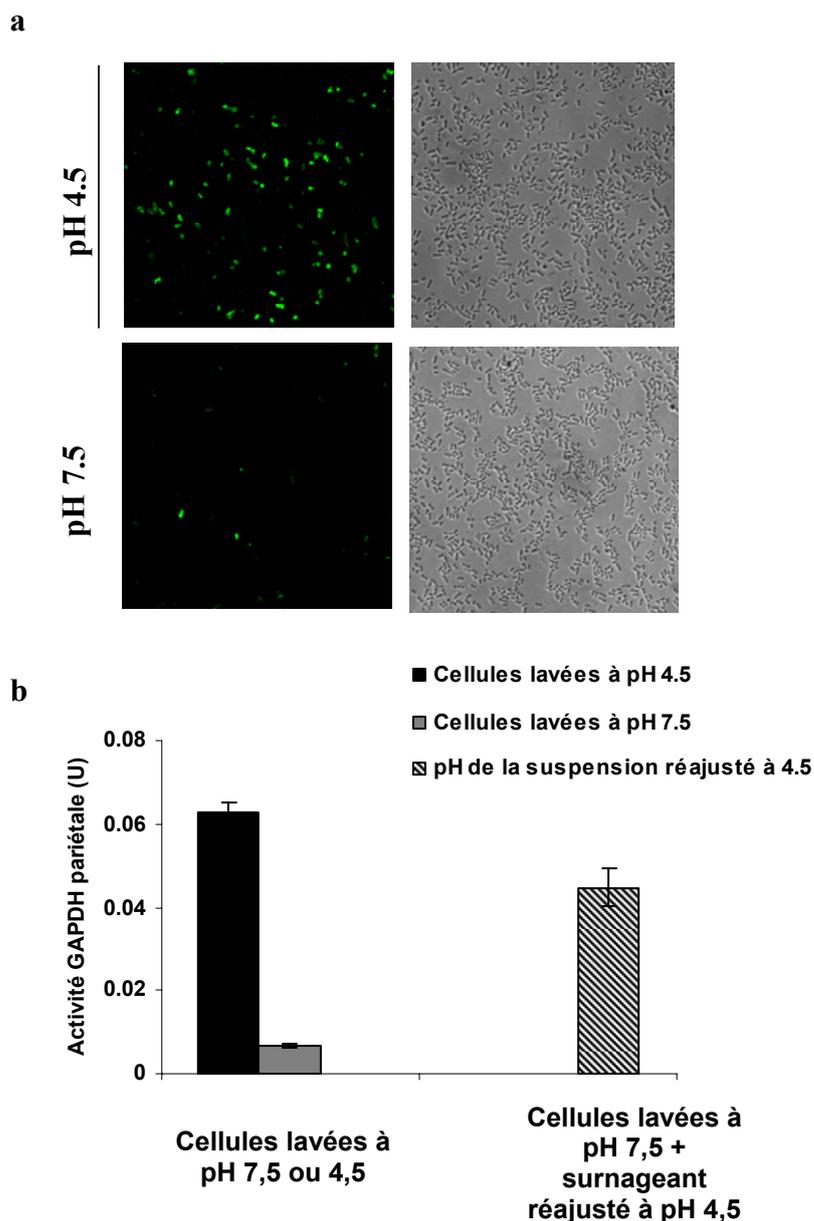
GAPDH pariétale et cytoplasmique. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur et les différences observées pourraient être attribuées à une faible dénaturation de la forme oligomérique de l'enzyme cytoplasmique au cours du protocole de purification et ceci malgré les précautions mises en œuvre.

#### 2.4.3 Effet du pH sur l'association de la GAPDH à la paroi de *L. plantarum* 299v

La présence d'une forme active de la GAPDH, associée à la paroi de *L. plantarum* 299v est établie d'une part sur la base de la mesure de l'activité de l'enzyme, *in situ* à la surface de la bactérie intègre et d'autre part par marquage spécifique avec des anticorps fluorescents. Les cellules bactériennes, collectées en début de phase stationnaire, sont lavées soit à pH 4,5 soit à pH 7,5 puis marquées à l'aide d'anticorps anti-GAPDH de *L. plantarum* 299v, puis avec des anticorps secondaires (anti-IgG de lapin) couplés au fluochrome, alexa-488. Les bactéries ainsi marquées sont observées en microscopie confocale. Les bactéries lavées à pH 4,5 présentent une importante fluorescence, comparativement à celles ayant subi un traitement à pH 7,5, **Figure III.24a**. La fluorescence observée sur les bactéries traitées à pH acide ne peut être attribuée à une internalisation dans le cytoplasme, du complexe anticorps anti-GAPDH-Alexa 488, et d'un marquage de la forme intracellulaire de GAPDH, puisqu'un simple lavage des cellules de *L. plantarum* 299v par un tampon faiblement alcalin (pH 7,5) anéantit la fluorescence (**Figure III.24b**).

Nous pouvons ainsi confirmer que la fluorescence mesurée résulte bien d'un marquage spécifique d'une forme de GAPDH associée à la surface de la bactérie. Une association dépendante du pH, de cette "housekeeping enzyme" à des constituants de la paroi de *L. crispatus* est rapportée par Antikainen *et al.*, (2007b), confortant ainsi nos observations sur *L. plantarum* 299v.

Enfin, nous avons contrôlé que l'enzyme, une fois dissociée de la paroi bactérienne par le lavage à pH faiblement alcalin, pouvait à nouveau s'adsorber à la surface de cette dernière si le pH était à nouveau fixé à une valeur acide. La mise en contact des bactéries préalablement lavées à pH 7,5 avec le surnageant de lavage dont le pH est réajusté à 4,5, permet d'observer une réassociation sur la paroi de *L. plantarum* 299v de plus de 70% de la GAPDH initialement désorbée, (**Figure III.24b**). La réversibilité de l'interaction GAPDH/paroi bactérienne est également rapportée par plusieurs auteurs (Antikainen *et al.*, 2007 ; Kinoshita *et al.*, 2008). L'hypothèse d'une association de l'enzyme par le biais d'interactions ioniques et/ou hydrophobes, avec des constituants de la paroi tels que les acides



**Figure III.24** : Localisation de la GAPDH à la surface des cellules de *L. plantarum* 299v, par marquage spécifique à l'aide d'anticorps fluorescents et par mesure de l'activité enzymatique *in situ*. **(a)** marquage des cellules bactériennes, lavées à pH 7,5 ou à pH 4,5, par le complexe anticorps anti-GAPDH/ anti-IgG couplé à l'Alexa-488 (à gauche), les bactéries sont observées en microscopie confocale. Les images en contraste de phase sont présentées sur la droite. **(b)** Mesure de l'activité GAPDH *in situ* à la surface des cellules de *L. plantarum* 299v. L'activité GAPDH pariétale est quantifiée après lavage à pH 7,5 ou pH 4,5 (à gauche). L'extrait désorbé de la surface de *L. plantarum* 299v à pH 7,5 est à nouveau ajusté à pH 4,5 puis remis en contact avec les bactéries (à droite).

téichoïques ou lipotéichoïques est formulée toutefois sans être démontrée (Antikainen *et al.*, 2007b). A pH acide, inférieur au pHi de la GAPDH (pHi théorique 5,3), l'enzyme posséderait une charge nette positive qui lui conférerait une capacité d'interaction avec des groupes anioniques des chaînes polyglycérophosphates des acides téichoïques ou lipotéichoïques.

#### 2.4.4 Rôle de la GAPDH pariétale dans l'interaction *in vitro* de *L. plantarum* 299v avec des cibles du tractus intestinal

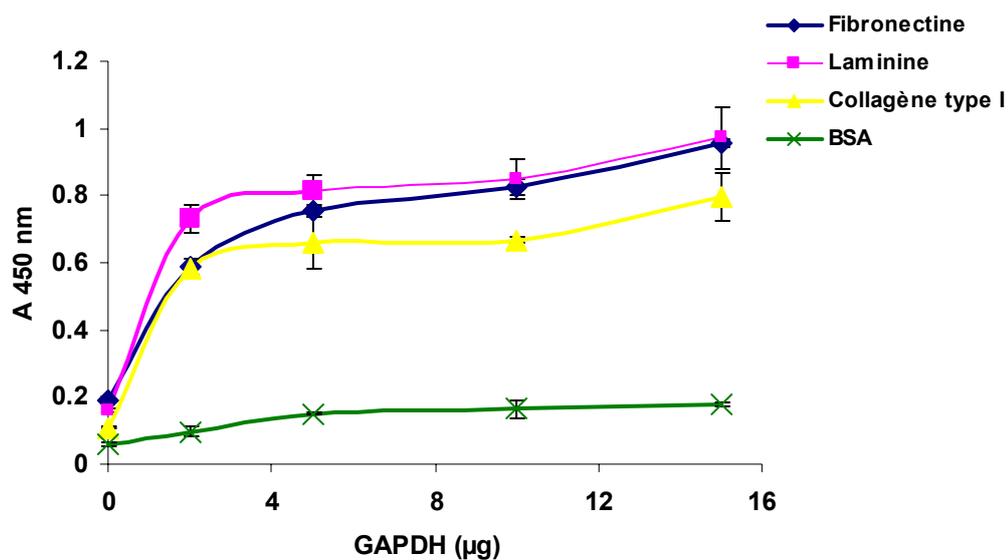
Précédemment, nous avons mis en évidence que la GAPDH, parmi l'ensemble des protéines désorbées de la surface de *L. plantarum* 299v à pH  $\geq 7,5$ , présentait une capacité à interagir avec différentes protéines de la matrice extracellulaire.

Dans l'approche qui suit, avant d'expertiser le rôle potentiel de la GAPDH, *in situ* à la surface de *L. plantarum* 299v, dans l'adhésion de la bactérie, nous avons souhaité mesurer l'affinité de l'enzyme purifiée pour différentes cibles de la paroi intestinale.

##### 2.4.4.1 Mesure de l'affinité de la GAPDH pour les protéines de la matrice extracellulaire

Le test a été réalisé en utilisant la technique ELISA. Les protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine, la laminine, le collagène de type I sont immobilisées sur une microplaque 96 puits. La GAPDH, à l'état purifié, est incubée 1h à 37°C avec les différentes cibles. Après lavage des puits, pour éliminer l'enzyme en excès, la GAPDH adsorbée spécifiquement sur chaque cible est quantifiée selon la procédure décrite dans le chapitre matériels et méthodes. Les résultats sont présentés **Figure III.25**. L'affinité de l'enzyme pour la fibronectine et la laminine est supérieure à celle mesurée pour le collagène type I. Le caractère spécifique de l'interaction est confirmé par l'absence d'adsorption de la GAPDH sur la BSA, qui sert de témoin négatif dans ce test.

Plusieurs auteurs font état de la capacité de la GAPDH associée à la paroi de bactéries pathogènes Gram positif, à se lier aux protéines de la matrice extracellulaire. Chez certains Streptocoques du groupe A, la GAPDH présente une forte affinité pour la fibronectine, le lysozyme et les protéines du cytosquelette (Pancholi and Fischetti, 1992). Gozalbo *et al.*, (1998) dans une étude consacrée à la GAPDH pariétale de *Candida albicans*, indiquent la capacité de l'enzyme à se lier à la fibronectine ainsi qu'à la laminine. Parmi le genre *Lactobacillus*, l'affinité de la GAPDH associée à la paroi de la souche *L. crispatus* ST1 n'est



**Figure III.25** : Evaluation de l'affinité de la GAPDH pour les protéines de la matrice extracellulaire. Les cibles sont immobilisées sur microplaque 96 puits et la GAPDH spécifiquement adsorbée sur chaque cible est quantifiée par la méthode ELISA. Toutes les analyses sont réalisées trois fois et les résultats sont exprimés en tant que moyenne  $\pm$  écart-type.

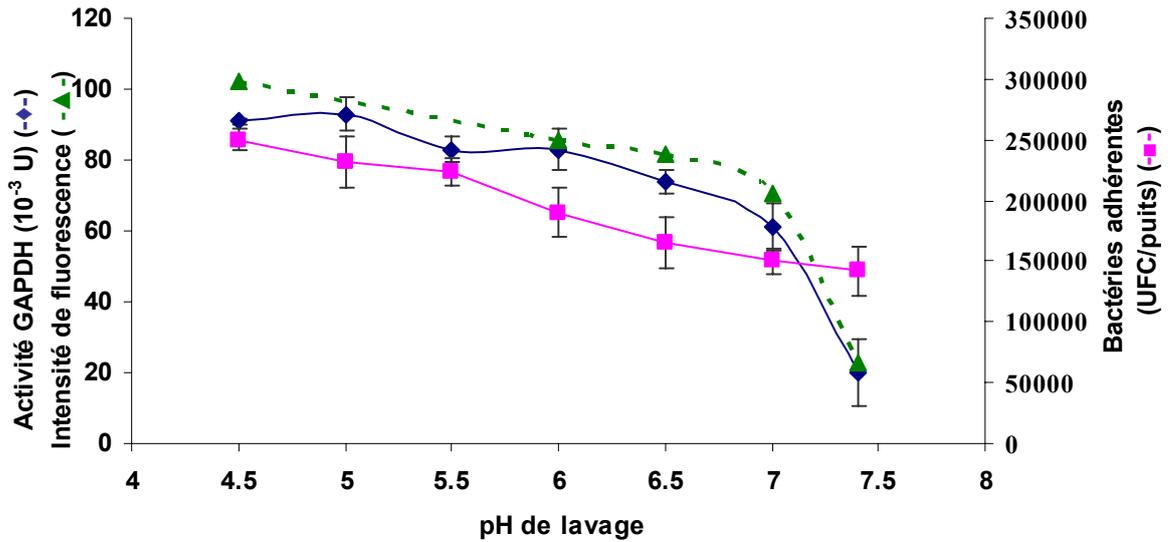
mise en évidence que pour les cibles laminine et collagène de type I (Antikainen *et al.*, 2007b). La GAPDH associée à la paroi de *L. plantarum* 299v, quant à elle, possède une forte affinité pour la fibronectine, ce qui tend à prouver pour le genre *Lactobacillus* que la capacité de la forme pariétale de GAPDH à s'adsorber sur les protéines de la matrice extracellulaire est dépendante de l'espèce.

#### 2.4.4.2 Implication de la GAPDH, in situ à la surface de *L. plantarum* 299v, dans l'adhésion de la souche à la fibronectine

Dans cette étude, nous avons exploité le caractère dépendant du pH de l'association de la GAPDH à la surface de la bactérie (Cf. paragraphe 2.4.3). En effet, le lavage de bactéries, prélevées en début de phase stationnaire (à 12h de culture), à différents pH, compris entre 4,5 et 8, et par incrément de 0,5 unité devrait permettre de désorber de façon plus au moins importante l'enzyme. La capacité résiduelle d'adhésion des bactéries ainsi préparées est ensuite déterminée.

Afin de corrélérer la concentration de l'enzyme associée à la paroi de *L. plantarum* 299v avec l'aptitude de la bactérie à s'adsorber sur sa cible, la GAPDH est quantifiée à la surface du microorganisme de deux manières différentes. On mesure d'une part, l'activité enzymatique *in situ* à la surface des cellules bactériennes lavées et d'autre part la fluorescence de ces dernières après leur marquage spécifique par des anticorps anti-GAPDH couplés à l'Alexa-488. Une représentation graphique des 3 paramètres, activité GAPDH pariétale, fluorescence et capacité d'adhésion sur la cible fibronectine en fonction du pH de lavage des bactéries, est présentée **Figure III.26**.

La quantification de la présence de la GAPDH à la surface de *L. plantarum* 299v par deux méthodes différentes, nous permet de nous affranchir d'un éventuel biais qu'aurait pu induire le seul recours à la mesure de l'activité enzymatique. Nous nous sommes ainsi assurés que la baisse d'activité GAPDH visualisée à l'issue du lavage des cellules à des pH croissants, était bien la seule conséquence d'une désorption de l'enzyme et non de son inactivation. L'observation d'une chute de la fluorescence dans des proportions comparables à celle de l'activité rend bien compte de la corrélation entre activité enzymatique et concentration de la protéine à la surface des cellules bactériennes. La capacité d'adhésion de *L. plantarum* 299v à la fibronectine diminue lorsque le pH de lavage préalable des bactéries augmente. Pour des pH de lavage compris entre 4,5 et 7, nous observons une bonne corrélation entre l'abaissement de la concentration de l'enzyme à la surface de la bactérie et l'aptitude



**Figure III.26 :** Effet du pH, lors de l'étape de lavage des cellules bactériennes qui précède le test d'adhésion, sur la concentration en GAPDH associée à la paroi et la capacité résiduelle de *L. plantarum* 299v à s'adsorber sur la cible fibronectine.

(-♦-), activité enzymatique de la GAPDH associée à la paroi ; (-▲-) moyenne d'intensité de fluorescence après le marquage spécifique avec les anticorps anti-GAPDH couplés à l'Alexa-488 ; (-■-) adhésion de *L. plantarum* 299v sur la fibronectine en UFC/puits.

résiduelle du microorganisme à adhérer à la protéine de la matrice extracellulaire. Au-delà d'une valeur de pH égale à 7,0, la chute de la concentration de l'enzyme liée à la paroi est très importante, alors que l'on n'observe pas de baisse concomitante de la capacité d'adhésion de la bactérie. Cette observation nous permet de formuler 2 hypothèses :

- La GAPDH peut contribuer à l'interaction *in vitro* de *L. plantarum* 299v avec des éléments constitutifs de la matrice extracellulaire, lorsque le pH du milieu est acide (pH 5,0). Ceci est confirmé par les travaux de Greene and Klaenhammer, (1994) et de Blum *et al.*, (1999) qui décrivent l'adhésion de différents lactobacilles probiotiques sur les cibles mucus et cellules épithéliales Caco-2, comme étant plus importante à pH 5 qu'à pH 7,2 ;
- Parmi les constituants présents à la surface de *L. plantarum* 299v, la GAPDH ne fait que contribuer pour partie à l'interaction de la bactérie probiotique avec sa cible. D'autres constituants de la paroi et/ ou des propriétés physico-chimiques de celle-ci, associés à la GAPDH confèrent à *L. plantarum* 299v sa capacité globale d'interaction avec la cible mise en œuvre.

#### **2.4.5 Etude de l'exportation de la GAPDH du milieu intracellulaire vers la paroi de *L. plantarum* 299v**

Afin d'essayer d'apporter des éléments de réponse à la question concernant l'exportation de la GAPDH au niveau de la paroi, nous avons développé une approche expérimentale permettant de vérifier l'existence éventuelle d'un lien entre la présence de l'enzyme à la surface de *L. plantarum* 299v et un événement physiologique survenant au cours de la croissance de la bactérie.

##### 2.4.5.1 Evolution de la concentration de la GAPDH associée à la paroi, en fonction de la phase de croissance

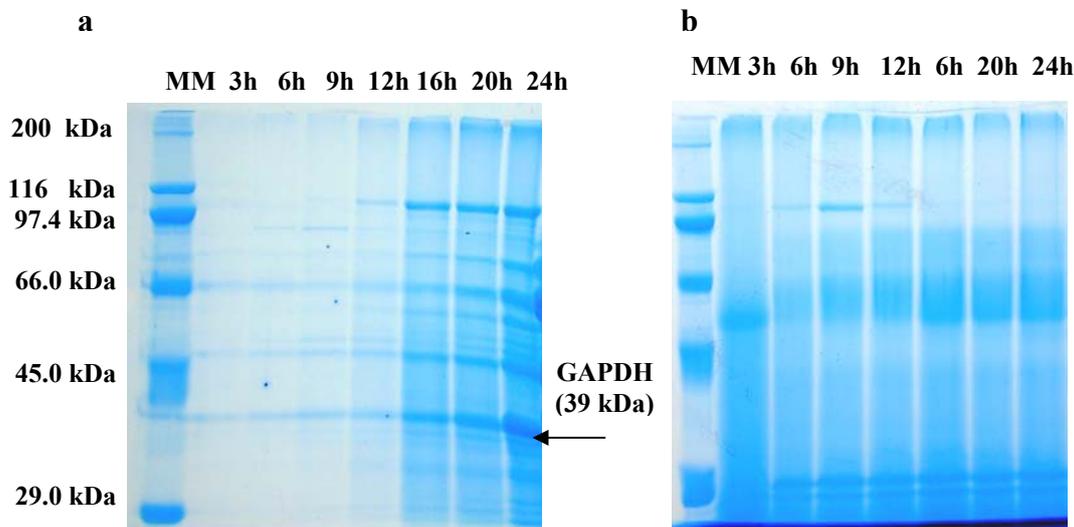
La corrélation entre l'activité et la concentration de la GAPDH associée à la paroi de *L. plantarum* 299v ayant été établie précédemment (Cf. **Figure III.26**), nous avons suivi l'évolution de la concentration de la forme pariétale de l'enzyme au cours de la croissance, grâce à la quantification de son activité, *in situ*, à la surface de la bactérie probiotique.

**Tableau III.6:** Evolution de l'activité GAPDH et de certains paramètres culturaux durant la croissance de *L. plantarum* 299v.

Temps (h)	DO <sub>600</sub> nm	UFC/mL	Glucose (g/l)	pH	Activité GAPDH associée à la paroi (U/CFU)	*GAPDH libérée (U/mL)
3	0.38	(5.30 ± 0.50) x 10 <sup>8</sup>	15.73 ± 1.32	5.86	(11.30 ± 1.93) x 10 <sup>-13</sup>	ND
6	3.98	(2.80 ± 0.10) x 10 <sup>9</sup>	12.07 ± 1.02	4.58	(12.90 ± 0.97) x 10 <sup>-13</sup>	ND
9	6.62	(6.40 ± 1.15) x 10 <sup>9</sup>	5.58 ± 0.21	4.07	(18.90 ± 3.63) x 10 <sup>-13</sup>	ND
12	8.69	(9.00 ± 1.30) x 10 <sup>9</sup>	2.95 ± 0.12	3.86	(33.60 ± 4.91) x 10 <sup>-13</sup>	ND
16	8.8	(7.10 ± 0.73) x 10 <sup>9</sup>	2.50 ± 0.10	3.82	(40.40 ± 4.59) x 10 <sup>-13</sup>	ND
20	8.2	(5.50 ± 1.22) x 10 <sup>9</sup>	2.20 ± 0.11	3.79	(10.60 ± 2.41) x 10 <sup>-12</sup>	ND
24	8.14	(3.46 ± 0.55) x 10 <sup>9</sup>	2.04 ± 0.09	3.75	(9.13 ± 1.46) x 10 <sup>-11</sup>	ND

\*Activité GAPDH libérée dans le milieu de culture durant la croissance de *L. plantarum* 299v

ND: non détectable.



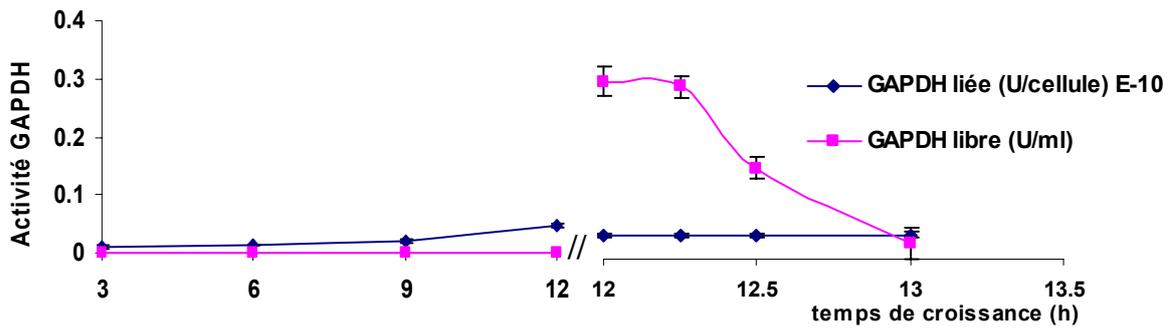
**Figure III.27 :** Analyse par SDS-PAGE : (a) des protéines désorbées à pH 8, de la paroi de *L. plantarum* 299v et (b) des surnageants de culture prélevés au cours de la croissance de la bactérie probiotique. MM : marqueurs moléculaires.

La mesure de l'activité GAPDH à la surface est réalisée selon le protocole expérimental décrit dans le chapitre matériels et méthodes. Les bactéries prélevées sont lavées deux fois avec un tampon PBS-citrate, pH 5 avant de procéder au dosage.

Les évolutions du pH du milieu de culture, de la population bactérienne (exprimée en UFC/mL) ainsi que de la concentration résiduelle en source carbonée (glucose) sont également notées au cours de l'expérience. Les résultats sont présentés dans le **Tableau III.6**. L'activité GAPDH "pariétale" n'est pas constante au cours de la croissance bactérienne. Nous observons un accroissement d'un facteur 3 fois de cette activité entre la phase de latence (3h) et la fin de la phase exponentielle (12h), puis une très forte augmentation d'environ 23 fois pendant la phase stationnaire (de 16h à 24h). Il est à noter que le niveau élevé de l'activité GAPDH n'est pas attribuable à une diffusion du substrat (G-3-P) dans le milieu intracellulaire de la bactérie pendant le dosage, car cette accroissement n'a pas été observé lorsque les cellules bactériennes sont lavées avec du tampon PBS, pH 7,4 préalablement à la mesure de l'activité.

L'augmentation de la concentration de la GAPDH associée à la paroi, en fonction de la phase de croissance *L. plantarum* 299v est confirmée par l'analyse électrophorétique des protéines désorbées de la surface bactérienne par lavage des cellules à pH 8 (**Figure III.27a**). L'intensité de la bande à 39 kDa, caractéristique de la présence de l'enzyme, augmente dans l'extrait désorbé de la surface des cellules bactériennes prélevées à différents stades de la culture. Aucune trace d'activité GAPDH, ni même de la protéine sous sa forme non active n'est détectée dans les surnageants de culture analysés aux mêmes temps de croissance (**Tableau III.6 et Figure III. 27b**).

Nous avons, dans une première approche, pris en considération l'hypothèse formulée par de nombreux auteurs, selon laquelle la présence de la GAPDH associée à la paroi de bactéries Gram positif était la conséquence d'une lyse cellulaire conduisant à la libération de la forme cytoplasmique dans le milieu de culture suivi de sa ré-adsorption sur certains constituants de la surface bactérienne. Afin de vérifier la validité de cette hypothèse, nous avons provoqué une lyse bactérienne puis mesuré la capacité de la GAPDH cytosolique ainsi libérée dans le milieu de culture, à se réassocier aux constituants de la paroi cellulaire. Un lysat cellulaire obtenu par sonication à 90W d'une culture en début de phase stationnaire, contenant de la GAPDH cytosolique, a été additionné à une culture de *L. plantarum* 299v au même stade de croissance. La GAPDH intracellulaire délibérément additionnée dans le milieu de culture est rapidement inactivée (**Figure III.28**). Après une heure d'incubation avec la culture bactérienne à 37°C, l'enzyme a perdu 90% de son activité initiale, sans que l'on



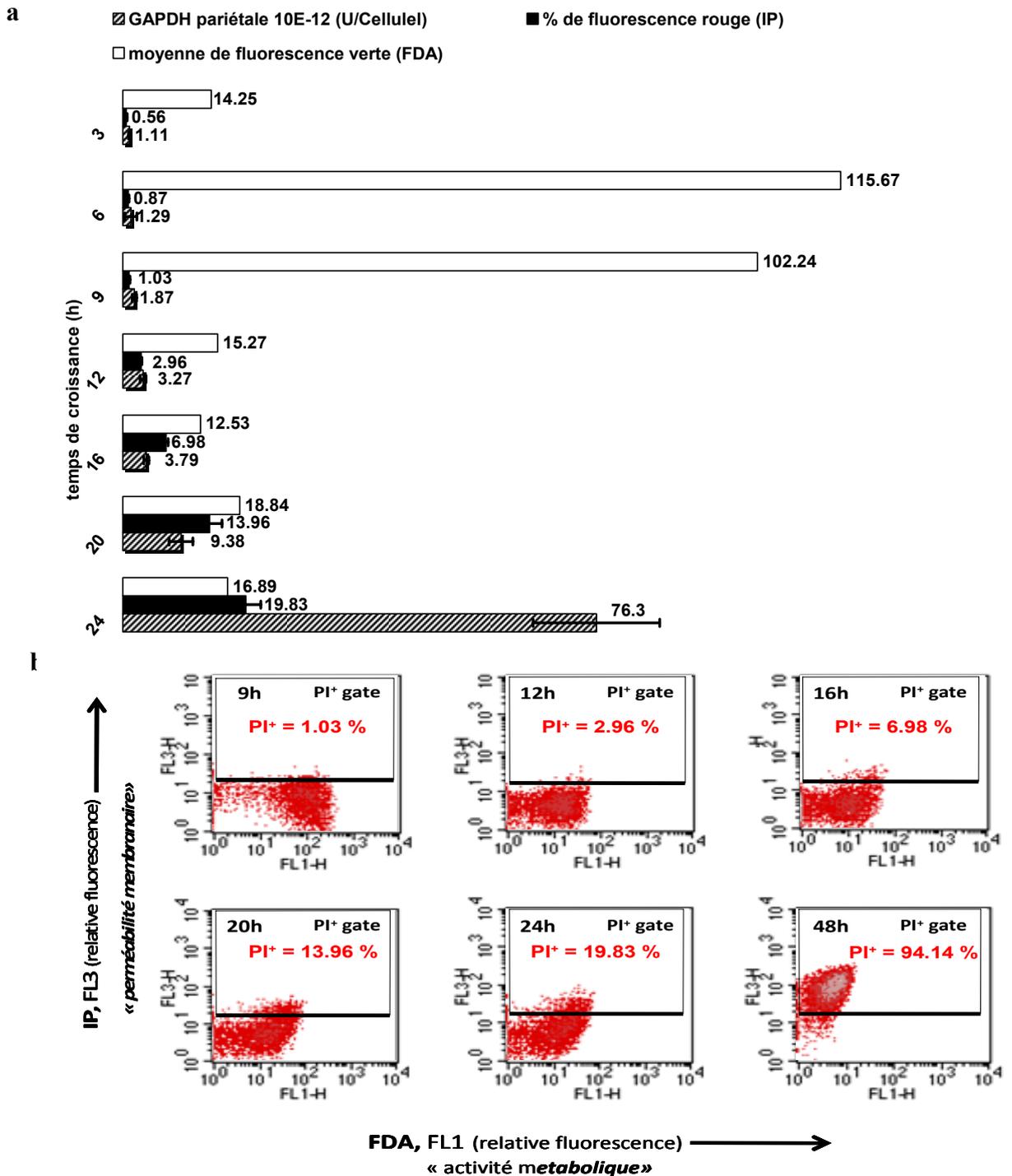
**Figure III.28** : Evolution de l'activité de l'enzyme associée à la paroi et en solution dans le milieu de culture, après addition de GAPDH cytoplasmique à une culture de *L. plantarum* 299v en début de phase stationnaire. Un extrait intracellulaire contenant 2 unités d'activité GAPDH cytoplasmique est ajouté à une culture bactérienne au même stade de la croissance. L'évolution des concentrations des formes de GAPDH associée à la paroi et en solution dans le milieu de culture est suivie en fonction du temps avant et après l'addition de l'enzyme. (-♦-) activité de la GAPDH associée à la paroi de *L. plantarum* 299v, (-■-) activité GAPDH libre dans le surnageant de culture.

observe une augmentation concomitante de l'activité GAPDH associée à la paroi, **Figure III.28**. Il est à noter qu'une inactivation de la GAPDH est observée dans des proportions totalement comparables, lorsque l'enzyme cytoplasmique est ajoutée à un surnageant, d'une culture prélevée en début de phase stationnaire. Par conséquent, on peut affirmer que l'enzyme sous sa forme libre n'est pas stable dans les conditions environnementales du milieu de culture en début de phase stationnaire et que la perte d'activité mesurée dans le surnageant n'est pas liée à une réassociation de la GAPDH sur la paroi et cela même sous une forme inactive.

L'hypothèse d'une réassociation de l'enzyme aux constituants de la paroi de *L. plantarum* 299v, après lyse était invalidée. Il fallait dès lors essayer d'identifier une ou plusieurs modifications survenant au niveau cellulaire pendant la croissance et justifiant l'augmentation de la présence de l'enzyme à la surface de *L. plantarum* 299v. Cette investigation a été conduite en mettant en œuvre la cytométrie en flux.

#### 2.4.5.2 Evolution de la perméabilité membranaire et de la concentration en GAPDH pariétale au cours de la croissance

La technique de cytométrie en flux nous a permis de suivre la perméabilité membranaire et l'activité métabolique des cellules bactériennes à différents stades de la croissance. Deux fluorochromes ont été utilisés : l'Iodure de Propidium ou IP pour mettre en évidence l'altération de la perméabilité membranaire et la Fluoresceine DiAcétate ou FDA pour la mesure de l'activité métabolique des cellules bactériennes. L'IP est un agent intercalant de l'ADN, qui peut être internalisé seulement par des cellules dont la membrane cytoplasmique a perdu une partie de son intégrité. Ce marqueur émet une fluorescence rouge à 610 nm. La FDA, est le substrat d'enzymes cytoplasmiques possédant une activité estérase, elle peut pénétrer librement dans le milieu intracellulaire par diffusion moléculaire. L'hydrolyse de la FDA, par les estérases intracellulaires, libère de la fluorescéine qui émet une fluorescence verte à 530 nm. La fluorescéine est séquestrée dans le milieu intracellulaire, car du fait de son caractère ionisé, elle ne peut diffuser au travers de la membrane plasmique si cette dernière est intègre. L'intensité de la fluorescence verte est donc un marqueur du niveau d'activité métabolique des cellules bactériennes et/ ou de l'altération de la membrane plasmique. Ainsi les cellules viables, non altérées fluorescent dans le vert et celles qui ont une membrane endommagée ou qui sont mortes, fluorescent dans le rouge. Parallèlement au contrôle de ces paramètres cellulaires par cytométrie en flux, nous avons mesuré l'évolution



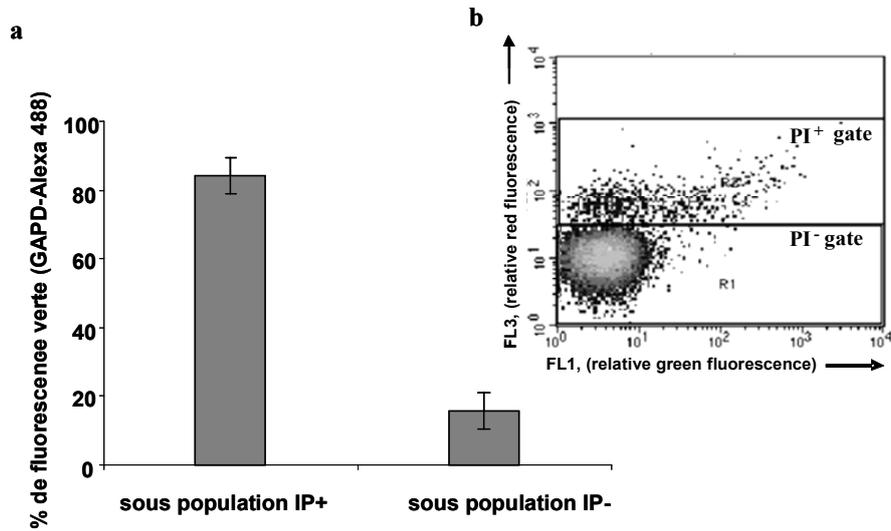
**Figure III.29** : (a) Evolution de l'activité GAPDH associée à la paroi de *L. plantarum* 299v, exprimée en U/Cellule, de la perméabilité membranaire (% de la fluorescence rouge, IP) et de l'activité métabolique (fluorescence moyenne verte, FDA) à différentes étapes de la croissance. Les essais ont été triplés, les barres d'erreurs indiquent l'écart type. (b) Cytogrammes montrant la bi-analyse paramétrique de l'activité métabolique et de l'intégrité membranaire pendant la croissance de *L. plantarum* 299v, après le marquage par l'IP (FL3) et à la FDA (FL1).

de la concentration en GAPDH associée à la paroi de *L. plantarum* 299v. Les résultats obtenus sont illustrés **Figure III.29**.

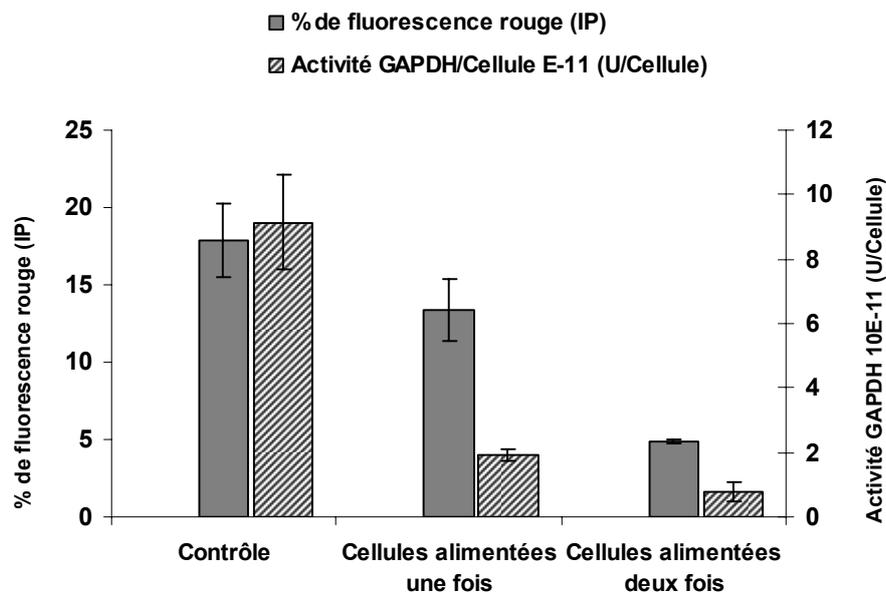
La proportion des cellules possédant une membrane plasmique altérée augmente progressivement entre la phase exponentielle (9h) et la phase stationnaire (24 h). Un accroissement concomitant de l'activité GAPDH associée à la paroi est observé au cours de cette même période (**Figure III.29a**). L'activité estérase quant à elle évolue différemment pendant la croissance, elle présente un niveau élevé pendant la phase exponentielle de 6h à 9h, puis l'activité est réduite et reste sensiblement constante pendant la phase stationnaire (**Figure III.29a**). Les cytogrammes, (**Figure III.29b**) dont sont issus les résultats présentés dans le diagramme **Figure III.29a**, permettent de mieux visualiser l'évolution de la perméabilité membranaire et de l'activité métabolique au cours de la croissance. Après 48h de croissance, la population de cellules de *L. plantarum* 299v a totalement perdu son activité métabolique ainsi que son intégrité membranaire, attestant de la mort de la majeure partie des cellules.

A ce stade de notre investigation concernant l'origine de la forme de GAPDH associée à la paroi de *L. plantarum* 299v, nous pouvons émettre l'hypothèse suivante : dès le début de la phase stationnaire, la GAPDH cytoplasmique est susceptible de diffuser au travers des membranes plasmiques ayant perdu leur intégrité. A ce stade de la croissance, le pH du milieu est acide (Cf. **Tableau III.6**) et inférieur au pHi calculé de la GAPDH (pHi = 5,3). A ce pH, l'enzyme se retrouve dans un environnement, au niveau de la paroi, qui lui confère une charge nette cationique. Sous cette forme, la GAPDH peut s'adsorber par interactions principalement ioniques aux constituants anioniques de la paroi, tels que les acides téichoïques ou lipotéichoïques qui portent de nombreux groupes phosphates.

L'hypothèse de l'adsorption est confortée d'une part par l'observation d'une désorption presque totale de la GAPDH "pariétale" à l'issue d'un simple lavage des cellules bactériennes à  $\text{pH} \geq 7,5$  et d'autre part par les travaux d'Antikainen *et al.*, (2007b) sur la GAPDH associée à la paroi de *L. crispatus*. Les auteurs formulent la possibilité d'une interaction GAPDH/acides téichoïques, sans toutefois aborder le mécanisme lié à l'exportation de l'enzyme au niveau de la paroi du lactobacille. Dès lors, nous suspectons l'existence d'un lien entre la perte d'intégrité de la membrane plasmique et la présence de la GAPDH au niveau de la paroi bactérienne. Cependant, l'approche précédente n'apporte pas une preuve directe de la relation de cause à effet entre ces deux phénomènes. Nous devons nous donner les moyens de vérifier que les cellules bactériennes présentant une membrane plasmique altérée, possèdent une concentration en GAPDH associée à leur paroi significativement supérieure à celle observable à la surface de cellules intègres.



**Figure III.30** : Relation entre l'intégrité de la membrane plasmique et la concentration en GAPDH associée à la paroi de *L. plantarum* 299v. Les cellules bactériennes en début de phase stationnaire, sont soumises à un double marquage : par les anticorps anti-GAPDH couplés au fluorochrome Alexa 488 et par l'iodure de propidium, puis analysées par cytométrie en flux. (a) Le cytogramme de la fluorescence verte (FL1, Alexa-488) en fonction de la fluorescence rouge (FL3, IP), permet de définir deux sous-populations de cellules ; identifiées IP<sup>+</sup> (bactéries possédant une membrane plasmique altérée) et IP<sup>-</sup> (bactéries dont la membrane plasmique est intègre). (b) Diagramme établissant la corrélation entre la concentration de la GAPDH associée à la paroi (fluorescence verte) et le taux d'altération de la membrane plasmique (sous populations IP<sup>-</sup> et IP<sup>+</sup>).



**Figure III.31** : Effet de la disponibilité en source carbonée sur la concentration en GAPDH associée à la paroi et sur la perméabilité de la membrane plasmique des cellules de *L. plantarum* 299v.

2.4.5.3 Etablissement de la relation entre la perte d'intégrité de la membrane plasmique de *L. plantarum* 299v et la présence de la GAPDH associée à la paroi

Les cellules de *L. plantarum* 299v, prélevées en début de phase stationnaire (12h) sont soumises à un double marquage par les anticorps anti-GAPDH/ anticorps secondaires couplés à l'Alexa-488 et par l'iodure de propidium. Cette technique doit nous permettre d'étayer notre hypothèse concernant l'efflux passif de la GAPDH au travers de la membrane plasmique altérée. L'analyse, par cytométrie en flux des cellules de *L. plantarum* 299v doublement marquées est présentée **Figure III.30**. Nous observons deux sous populations de cellules, l'une possédant une membrane endommagée, notée IP<sup>+</sup> et l'autre présentant une membrane intègre, notée IP<sup>-</sup>. La fluorescence verte des cellules marquées avec les anticorps anti-GAPDH-Alexa 488 est 5 fois plus intense dans la sous population IP<sup>+</sup> comparativement à celle mesurée pour la sous population IP<sup>-</sup>. Ces observations indiquent que la concentration de la GAPDH est nettement plus élevée au niveau des parois cellulaires des bactéries présentant une membrane plasmique endommagée.

Grâce au double marquage des cellules bactériennes en début de phase stationnaire, nous apportons une preuve directe de la relation entre l'altération de la membrane plasmique, qui devient perméable à certains solutés intracellulaires, et l'accumulation de l'un d'entre eux, telle que la GAPDH, au niveau de la paroi de la bactérie. L'enzyme subit un efflux passif du cytoplasme vers la paroi où elle est immédiatement piégée compte tenu de sa charge nette positive à pH acide. L'ensemble des résultats expérimentaux que nous avons présentés, rend parfaitement cohérente cette hypothèse. Par contre, la possibilité d'un relargage direct dans le milieu de culture, suivi d'une ré-adsorption à la surface de la bactérie semble une nouvelle fois peu probable. En effet, il est difficilement concevable que l'enzyme qui possède une forte capacité d'interaction avec les constituants de la paroi, puisse diffuser au travers de celle-ci sans être adsorbée au cours de cette étape initiale. Après avoir avancé puis étayé une hypothèse plausible concernant l'exportation de la GAPDH vers la paroi, nous avons souhaité étudier l'existence d'une corrélation entre certains paramètres culturels, l'altération de la membrane plasmique et la concentration de la GAPDH associée à la surface de *L. plantarum* 299v.

2.4.5.4 Disponibilité de la source carbonée et localisation de la GAPDH au niveau de la paroi

Au cours des observations précédentes, nous avons remarqué qu'un doublement de la concentration en GAPDH associée à la paroi était concomitant avec l'épuisement du milieu de culture en glucose et l'atteinte d'une valeur de pH acide, sensiblement constante, en début de phase stationnaire (12h de culture) (**Tableau III.6**). Par la suite, durant toute la phase stationnaire, la concentration en GAPDH pariétale ne cesse de croître (**Tableau III.6**). Afin de vérifier s'il était possible d'établir un lien entre l'accroissement de la présence de l'enzyme au niveau de la paroi et la disponibilité de la source carbonée, nous avons procédé à une complémentation en glucose du milieu de culture de *L. plantraum* 299v. Parallèlement à l'apport de glucose, nous avons suivi l'évolution de la concentration en GAPDH "pariétale" et celle de la perméabilité membranaire de la bactérie. L'apport supplémentaire de glucose est pratiqué soit en une fois en fin de phase exponentielle (T 9h), soit en deux fois successives après 9h et 12h de culture. A l'issue de chaque ajout de glucose, la concentration finale en source carbonée est voisine de 20 g/L dans le milieu. Quel que soit le nombre d'apport en glucose, on observe le même effet sur la croissance, soit une augmentation d'un facteur 1,65 de la population bactérienne après 24h de culture, comparativement au témoin n'ayant reçu aucun apport complémentaire en glucose. Par contre, le maintien sensiblement constant de la disponibilité du glucose pendant la croissance, consécutivement à un ou deux ajouts supplémentaires au cours de la culture, engendre conjointement l'abaissement de la concentration en GAPDH associée à la paroi et la réduction du nombre de cellules bactériennes présentant une membrane plasmique altérée, **Figure III.31**. La concentration en GAPDH associée à la paroi est réduite de 82% et le taux de bactéries non intègres est abaissé de 70% après deux ajouts de glucose comparativement au lot témoin. Une telle observation suggère que la localisation de la GAPDH à la surface de la bactérie, la perte de l'intégrité de la membrane plasmique et la disponibilité de la source carbonée sont trois paramètres interdépendants.

La variation de l'activité GAPDH à la surface de microorganismes tels que *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*, à la suite de stress nutritionnel et thermique a été déjà rapportée par Delgado *et al.*, (2003) et Gozalbo *et al.*, (1998). Toutefois, les auteurs se limitent à un constat et ne font état d'aucune investigation quant à l'existence d'un éventuel lien entre l'altération de la perméabilité membranaire des cellules de levures et la variation de

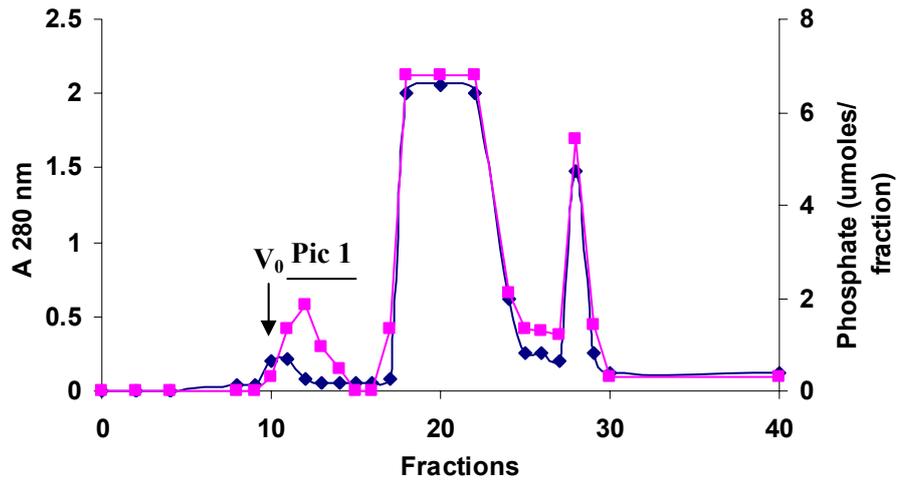
l'activité de l'enzyme associée à leur paroi. L'hypothèse selon laquelle un stress nutritionnel pourrait être à l'origine de la modification de la perméabilité membranaire chez *L. plantarum* 299v, favorisant ainsi l'efflux passif ou l'exportation de protéines cytoplasmiques telles que la GAPDH vers la paroi est séduisante. Toutefois, nous resterons prudents, car l'établissement d'un lien direct entre les effets physiologiques du stress nutritionnel et la perméabilité membranaire d'une part et de la présence de la GAPDH au niveau de la paroi d'autre part, appellerait un complément d'expérimentations qui pourra faire l'objet d'une suite à ce travail au sein du laboratoire.

### **3 Entités moléculaires non-protéiques de la paroi de *L. plantarum* 299v et adhésion *in vitro***

Dans les premières parties de notre travail, nous avons extrait et caractérisé à partir de la paroi de cellules de *L. plantarum* 299v des protéines qui sont impliquées dans le processus d'adhésion *in vitro*. Cette 3<sup>ème</sup> partie de notre approche expérimentale sera consacrée à l'identification et la caractérisation structurale d'entités moléculaires non protéiques associées à la surface de *L. plantarum* 299v ainsi qu'à l'expertise de leur capacité à participer à l'interaction de la bactérie probiotique avec son hôte. Parmi les différents constituants polymériques non-protéiques présents au niveau de la paroi des lactobacilles et d'autres bactéries Gram positif, les acides téichoïques et lipotéichoïques sont décrits comme des structures qui peuvent leur conférer une capacité d'adhésion *in vitro* aux cellules épithéliales intestinales (Sherman *et al.*, 1986 ; Granato *et al.*, 1999 ; Walter *et al.*, 2007). Ainsi, nous avons focalisé notre étude sur cette famille moléculaire associée à la paroi de *L. plantarum* 299v.

#### **3.1 Extraction, purification et caractérisation des acides lipotéichoïques associés à la paroi de *L. plantarum* 299v**

Les acides lipotéichoïques (LTA) sont des polymères de glycérophosphate, substitués par des résidus D-alanine et dans une moindre mesure par des hexoses de type glucose ou galactose. Les acides lipotéichoïques sont largement distribués chez les lactobacilles où ils sont liés de manière covalente à leur membrane cytoplasmique par l'intermédiaire d'un motif d'ancrage glycolipidique. Ces composés ont été mis en évidence pour la première fois chez *L. fermenti* par Wicken and Knox, (1975). Des fractions libres d'acides lipotéichoïques peuvent



**Figure III.32** : Profil chromatographique de la purification par exclusion moléculaire sur colonne Superose HR 6 (300 x10 mm) des LTA extraits de la paroi de *L. plantarum* 299v par la méthode au phénol.  $V_0$  : volume mort de la colonne. (-■-) concentration en phosphate ; (-♦-) absorbance à 280 nm.

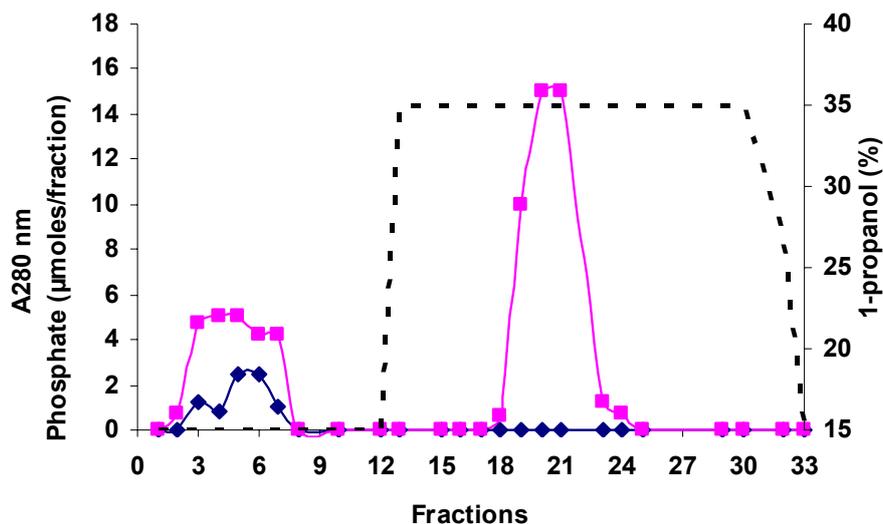
également être relarguées dans le milieu extracellulaire au cours de la croissance (Delcour *et al.*, 1999; Granato *et al.*, 1999).

### 3.1.1 Extraction et purification des LTA

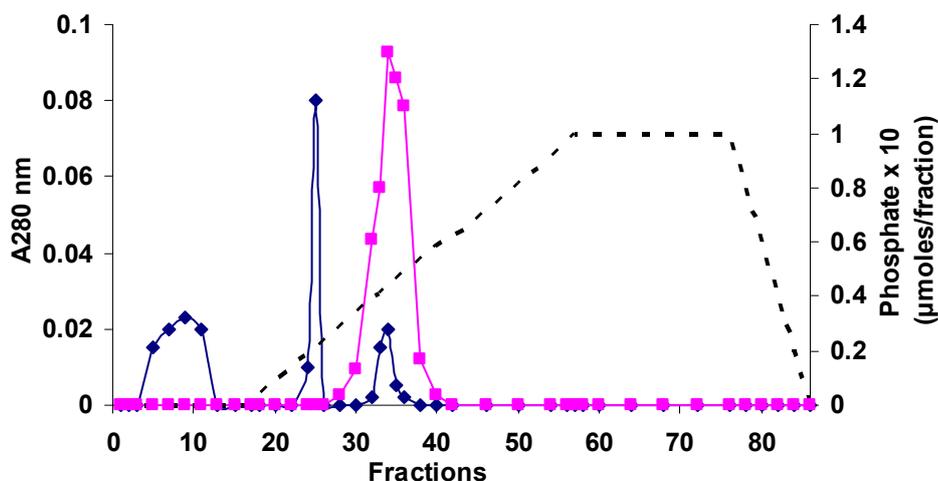
Nous avons extrait les acides lipotéichoïques de la paroi de *L. plantarum* 299v par deux méthodes conventionnelles. La première méthode mise en œuvre implique l'utilisation d'une solution concentrée de phénol (80%, p/v) à chaud à 65°C. Initialement, la procédure a été utilisée pour l'obtention d'extraits, à partir de parois de bactéries Gram négatif, de lipopolysaccharides exempts de contaminants protéiques. Wicken *et al.*, (1973) ont adapté cette méthode à l'extraction des LTA de *Lactobacillus fermenti*. Toutefois, cette méthode est susceptible d'engendrer la destruction des résidus D-alanine substituant les chaînes de polyglycérophosphate. Morath *et al.*, (2001) ont mis au point une méthode alternative, moins destructive, en remplaçant le phénol par du n-butanol et en réalisant une extraction à température ambiante. Nous présentons ci-après une comparaison des compositions de LTA extraits par chacune des deux méthodes, à partir de cellules de *L. plantarum* 299v récoltées en début de phase stationnaire.

Les cellules issues de 4 litres de culture de *L. plantarum* 299v ont été soumises à une extraction :

I) Au phénol à chaud selon le protocole décrit dans le chapitre matériels et méthodes. La fraction d'extraits LTA obtenue est dialysée pendant 48h contre 200 volumes de tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 4,7. Le dialysat est traité par un mélange de DNase/RNase puis purifié par chromatographie de filtration moléculaire sur gel sur colonne Superose HR6 possédant un domaine de fractionnement linéaire compris entre  $4 \times 10^6$  et 30000 Da. La digestion préalable par le mélange de DNase/RNase a pour but d'éviter la co-élution des polymères et micelles d'acides lipotéichoïques avec les acides nucléiques présents dans l'extrait dialysé. La phase stationnaire est éluée avec un tampon acétate de sodium 0,1M, pH 4,7 à un débit de 0,3 mL/min. Le profil chromatographique est illustré **Figure III.32**. Les fractions 17 à 21 présentant un rapport d'absorbance 260/280 nm élevé ainsi qu'un contenu élevé en phosphate, contiennent des acides nucléiques et sont éliminées. Le matériel d'intérêt contenant les LTA est élué à proximité du volume mort de la colonne, de la fraction 12 à 14 et présente un faible rapport d'absorbance 260/280 nm ainsi qu'un rapport phosphate/A260 nm élevé. La présence de LTA dans le volume d'exclusion de la colonne Superose HR6 peut être attribuée à leur association en micelles solubles en milieu aqueux. Ces fractions sont



**Figure III.33** : Profil chromatographique de la purification sur colonne d'interactions hydrophobes Octyl-Sépharose (100 x 16 mm) des LTA extraits de la paroi de *L. plantarum* 299v par la méthode au n-butanol. L'éluat est collecté par fraction de 4 mL. (-■-) concentration en phosphate ; (-◆-) absorbance à 280 nm ; (- - -) gradient 1-propanol.



**Figure III.34** : Profil chromatographique de la purification par chromatographie d'échange d'ions sur colonne DEAE (100 x 10 mm) du pool de fractions 18 à 24 obtenues après la purification sur colonne Octyl-Sépharose des LTA extraits de la paroi de *L. plantarum* 299v par la méthode au n-butanol. L'éluat est collecté par fraction de 4 mL. (-■-) concentration en phosphate ; (-◆-) absorbance à 280 nm, (- - -) gradient de NaCl (0 à 1 M).

rassemblées, dialysées contre de l'eau distillée puis analysées pour une caractérisation chimique complète de leurs différents constituants.

2) Parallèlement, la méthode au n-butanol à température ambiante a été utilisée pour l'extraction de LTA à partir d'un même volume de culture de *L. plantarum* 299v en début de phase stationnaire, selon une procédure adaptée de Ryu *et al.*, (2009) et détaillée dans le chapitre matériels et méthodes. La phase aqueuse de l'extrait est dialysée contre du tampon acétate d'ammonium 0,1 M, pH 4,7 puis purifiée dans une première étape par chromatographie d'interactions hydrophobes sur colonne Octyl-Sepharose. L'élution spécifique des LTA est réalisée par un tampon acétate de sodium 0,1M, pH 4,7, contenant du 1-propanol à 35% (v/v). La **Figure III.33** présente le profil chromatographique obtenu. Le phosphate, constituant majoritaire des LTA, est dosé dans chacune des fractions collectées. Les fractions 18 à 24 présentant une forte concentration en phosphate associée à une faible absorbance à 280nm (contaminants protéiques) sont poolées, dialysées contre 200 volumes de tampon acétate d'ammonium 20 mM, pH 4,7. Le dialysat est concentré par évaporation sous vide puis soumis à une deuxième étape de purification par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Sepharose 4B. Le dialysat concentré est préalablement ajusté à 30 % (v/v) en 1-propanol puis déposé sur une colonne DEAE-Sepharose selon le protocole décrit dans la partie matériels et méthodes. Les LTA sont élués à l'aide d'un gradient linéaire de NaCl de 0 à 1 M en solution dans le tampon d'ammonium 20 mM, pH 4,7- 30% (v/v) en 1-propanol. Le chromatogramme obtenu est illustré **Figure III.34**. Le dosage du phosphate dans les fractions d'éluat fait apparaître un pic majoritaire élué à environ 0,5M NaCl dans la phase mobile, et présentant une faible absorbance à 280 nm. Les fractions d'éluat sous ce pic sont rassemblées, dialysées contre un tampon acétate d'ammonium 20 mM, pH 4,7. Le dialysat est séché sous vide et le résidu sec, constituant la fraction LTA purifiée est analysé afin d'en établir la composition.

#### 3.1.2 Caractérisation de la composition des LTA associés à la paroi de *L. plantarum* 299v

Les LTA de *L. plantarum* 299v, purifiés par chacune des deux méthodes décrites précédemment, sont analysés afin d'établir leur composition. L'analyse de leur contenu en glycérol, hexose et acides gras est effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) selon les procédures décrites dans le chapitre matériels

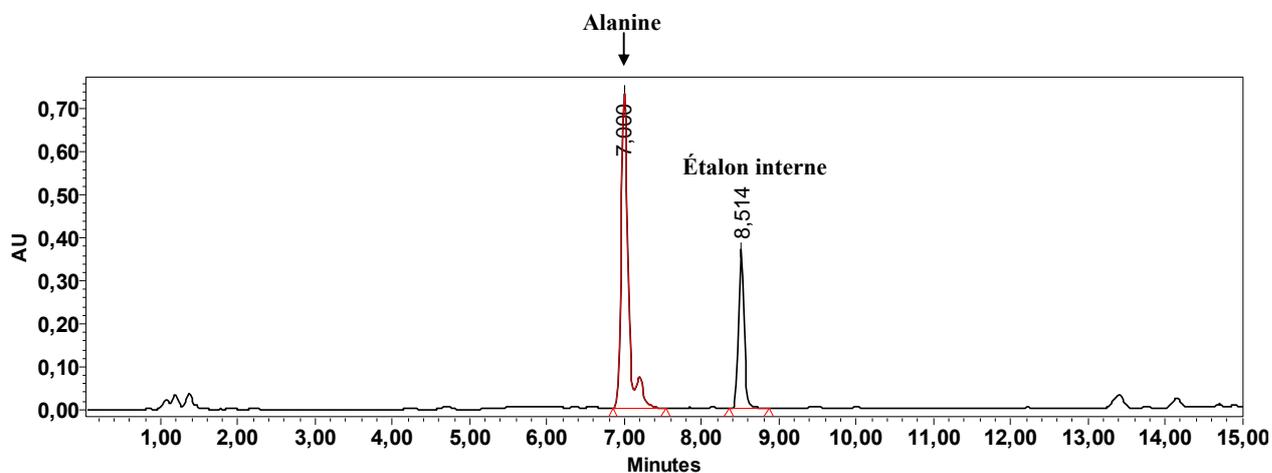
**Tableau III.7** : Analyse comparée de la composition de LTA extraits de la paroi de différentes espèces de lactobacilles. Les résultats sont exprimés en mole de constituants identifiés par mole de phosphate présents dans les LTA purifiés.

	LTA de <i>L. plantarum</i> 299v <sup>a</sup>	LTA de <i>L. plantarum</i> 299v <sup>b</sup>	LTA de <i>L. johnsonii</i> <sup>b</sup>	LTA de <i>L. delbrueckii</i> <sup>b</sup>
<b>Phosphate</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Glycérol</b>	<b>0,35</b>	<b>0,32</b>	<b>0,35</b>	<b>0,98</b>
<b>Alanine</b>	<b>0,35</b>	<b>0,18</b>	<b>0,5</b>	<b>0,11</b>
<b>Glucose</b>	<b>0,2</b>	<b>0,17</b>	<b>0,28</b>	<b>0,08</b>
<b>Acides gras</b>	<b>0,14*</b>	<b>0,14</b>	<b>0,14</b>	<b>ND</b>
<b>Galactose</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>0,18</b>	<b>-</b>

<sup>a</sup> extraction au n-butanol

<sup>b</sup> extraction au phénol

\*Présence de C16, C18, C18:1 avec des ratios molaires au phosphate de 0,06, 0,018 et 0,056 respectivement et des traces de C16 : 1 et C18 : 3.



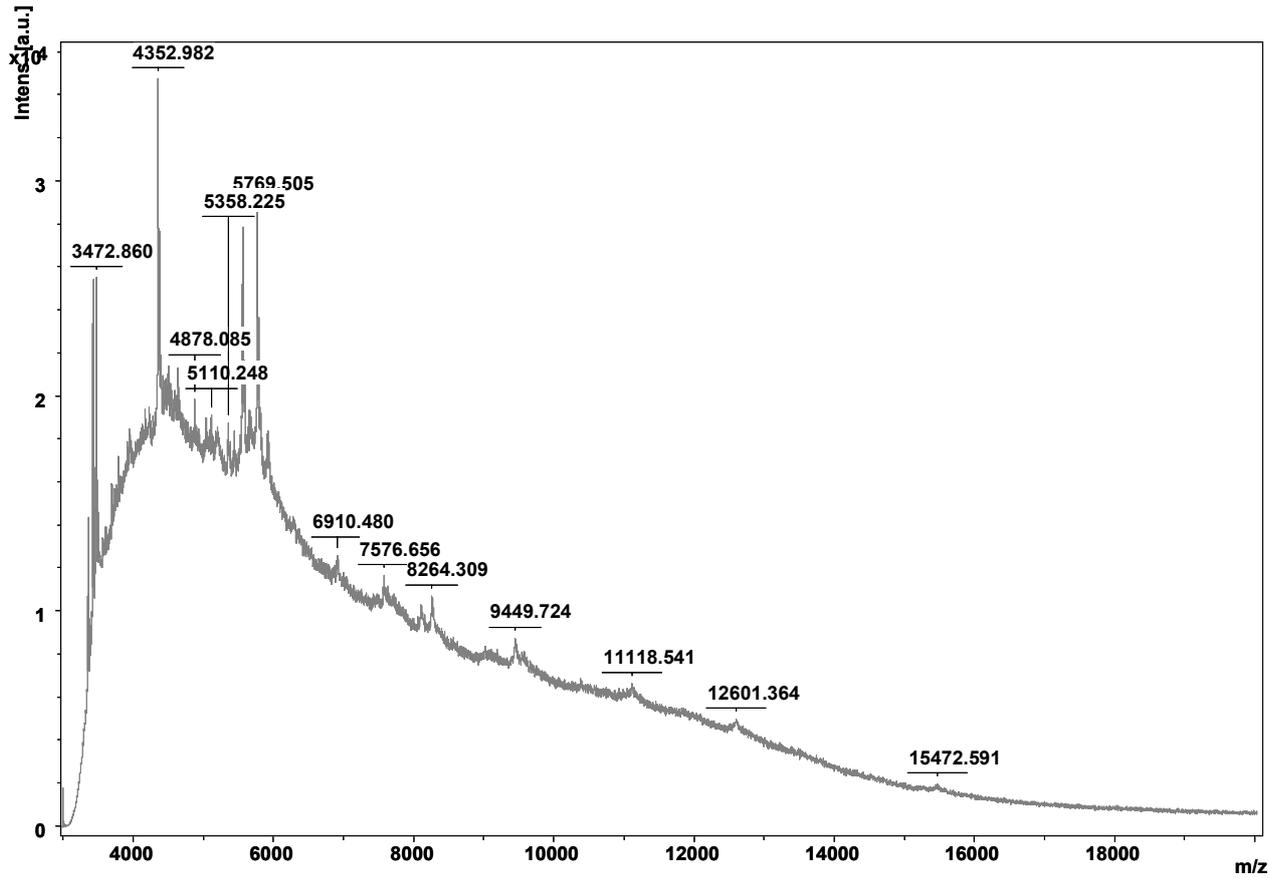
**Figure III.35** : Analyse de la composition en acides aminés des LTA purifiés, par HPLC en phase inversée sur colonne Pico-Tag. C18 (3,9 x 150 mm, Waters). Etalon interne : acide  $\alpha$ -aminobutyrique.

et méthodes. Le contenu en résidu D-alanine est déterminé par HPLC en phase inversée sur colonne C18 (3,9 x 150 mm) par la méthode Pico-Tag<sup>TM</sup> (Waters) dont les détails expérimentaux sont exposés dans la partie matériels et méthodes.

Le **Tableau III.7**, présente la composition comparée des LTA de différentes espèces de lactobacilles. Les concentrations sont exprimées en mole/mole de phosphate présent dans les polymères purifiés soit par la méthode au phénol à 65°C soit à température ambiante en présence de n-butanol.

Les chromatogrammes obtenus en CPG/SM pour la caractérisation de chaque constituant des LTA purifiés sont présentées en **Annexes 1 et 2**, et le chromatogramme obtenu par HPLC en phase inversée pour l'analyse de la D-alanine est présenté **Figure III.35**. La composition qualitative établie pour les LTA extraits de la paroi de *L. plantarum* 299v par chacune des méthodes mises en œuvre, est en accord avec celles précédemment rapportées pour les espèces *L. johnsonii* (Granato *et al.*, 1999) et *L. delbrueckii* (Räisänen *et al.*, 2004). On retrouve les constituants caractéristiques de polymères de glycérophosphate, substitués par un hexose (glucose) et un acide aminé (alanine). La présence d'acides gras, C16, C18 et C18:1 ainsi que des traces de C16 :1 et C18 :3, confirme l'existence d'un motif d'ancrage lipidique, à la membrane plasmique, dans la structure des polymères extraits de la paroi de *L. plantarum* 299v (**Tableau III.7**).

D'un point de vue quantitatif, on observe une variabilité interspèces de la composition des LTA des lactobacilles lorsque ceux-ci sont extraits par la méthode au phénol. Les principales différences concernent les degrés de substitution des unités glycérol par les hexoses et l'alanine (**Tableau III.7**). De plus, la comparaison des compositions quantitatives des LTA de *L. plantarum* 299v, révèle une incidence de la procédure d'extraction (phénol ou n-butanol) sur le taux de substitution en alanine des polymères. Le rapport Ala/phosphate est deux fois plus élevé lorsque les LTA sont obtenus en utilisant la méthode au n-butanol (**Tableau III.7**). Ces résultats sont en accord avec les observations antérieures de Morath *et al.*, (2001), concernant la composition des LTA de la paroi de *Staphylococcus aureus*. En comparant, grâce à l'utilisation de la RMN, les structures de LTA extraits par les deux méthodes, les auteurs mettent en évidence que le traitement au phénol à chaud engendre une modification structurale liée à l'hydrolyse de liaisons ester entre les résidus glycérol et alanine, pouvant atteindre 50%. Alors que l'extraction au n-butanol à température ambiante quant à elle, n'affecte pas la structure native des LTA.



**Figure III.36** : Spectre de masse des LTA extraits de la paroi de *L. plantarum* 299v. Le spectre est établi par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF. Les LTA sont extraits et purifiés selon la procédure décrite dans la section 6.3.2, page 97.

Au vu de ces résultats, la procédure d'extraction au n-butanol sera retenue pour la purification des LTA, préalablement à l'étude de leur implication dans l'interaction de *L. plantarum* 299v avec des cibles du tractus intestinal.

### **3.1.3 Détermination de la masse moléculaire des LTA associés à la paroi de *L. plantarum* 299v**

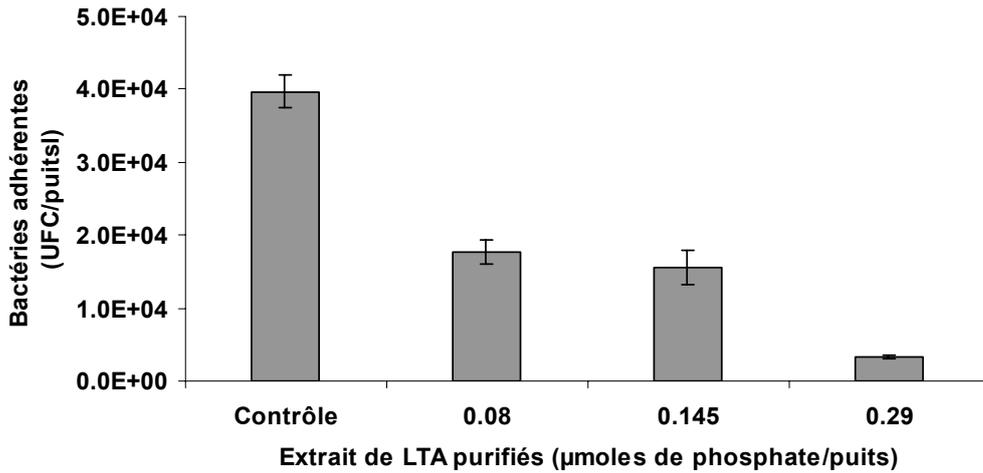
Une première analyse de la distribution des masses moléculaires des LTA extraits de *L. plantarum* 299v a été réalisée par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF. Le spectre de masse obtenu est illustré **Figure III.36**. La distribution des masses moléculaires est comprise entre 3400 et 15400 Da., ceci peut se traduire par la présence de plusieurs fragments et de composés doublement chargés. Une telle distribution des masses moléculaires semble en accord avec celle rapportée pour les LTA extraits de la paroi de bactérie de genre *Pneumococcus* (Seo *et al.*, 2008).

## **3.2 Inhibition de l'adhésion de *L. plantarum* 299v par les LTA**

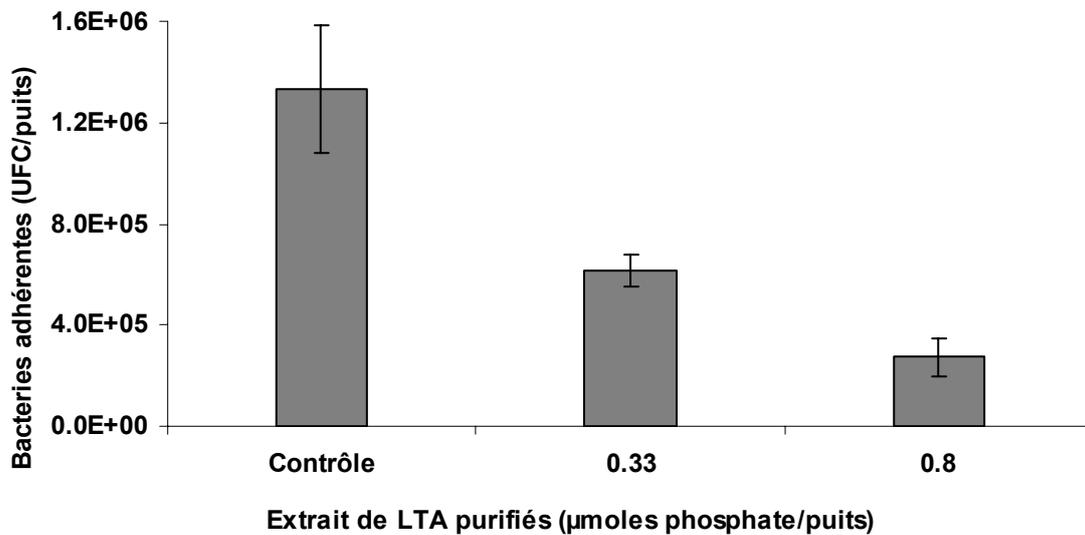
Les LTA extraits au n-butanol puis purifiés comme décrit précédemment, ont été testés sur le critère de leur capacité à inhiber l'adhésion de *L. plantarum* 299v sur deux cibles, cellulaire et moléculaire, de la paroi du tractus intestinal : la mucine et les cellules épithéliales intestinales Caco-2.

### **3.2.1 Test d'inhibition d'adhésion sur mucine**

La mucine est immobilisée sur microplaque à 96 puits. Les puits sont ensuite prétraités avec des quantités croissantes de LTA, exprimées en équivalent phosphate/ puits. Après lavage des puits, les cellules de *L. plantarum* 299v sont additionnées et leur capacité d'adhésion est estimée selon le protocole précédemment décrit. Les résultats sont présentés **Figure III.37**. Les LTA inhibent l'adhésion de *L. plantarum* 299v à la cible mucine de manière dose-dépendante. Ces résultats constituent la première mise en évidence de l'implication potentielle des LTA dans l'interaction d'un lactobacille en général et de *L. plantarum* 299v en particulier, avec la cible mucine gastrique. En effet, aucun rapport dans la littérature n'a fait précédemment état du rôle des LTA dans l'adhésion de ce genre bactérien à la mucine.



**Figure III.37** : Effet d'un prétraitement de la cible mucine par les LTA, sur la capacité d'adhésion de *L. plantarum* 299v. La cible est incubée, avant le test d'adhésion, en présence de concentrations croissantes de LTA purifiés, extraits de la paroi de la bactérie probiotique, avant le test d'adhésion. Chaque essai est répété trois fois, la valeur indiquée correspond à la  $\pm$  l'écart type.



**Figure III.38** : Effet d'un prétraitement de la cible cellules épithéliales intestinales Caco-2 par les LTA, sur la capacité d'adhésion de *L. plantarum* 299v. La cible est incubée, avant le test d'adhésion, en présence de concentrations croissantes de LTA purifiés, extraits de la paroi de la bactérie probiotique, avant le test d'adhésion. Chaque essai est répété trois fois, la valeur indiquée correspond à la  $\pm$  l'écart type.

### 3.2.2 Test d'inhibition d'adhésion aux cellules Caco-2

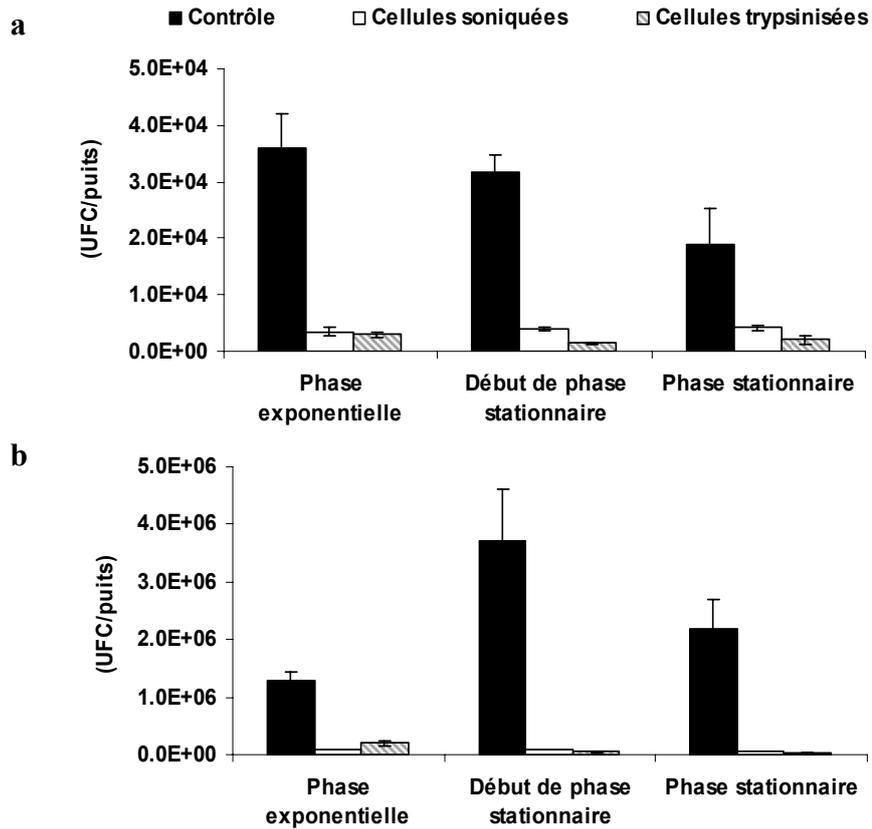
Les cellules Caco-2 sont cultivées sur microplaques de polystyrène 12 puits, puis prétraitées avec des quantités croissantes de LTA purifiés, exprimées en équivalent phosphate/ puits. Les résultats sont illustrés **Figure III.38**. Comme la cible mucine, on observe une inhibition dose-dépendante de l'adhésion de *L. plantarum* 299v aux cellules Caco-2. L'implication des LTA dans l'adhésion de souches probiotiques aux cellules épithéliales intestinales a été rapportée antérieurement pour certaines espèces de lactobacilles telles que *L. johnsonii*, *L. fermentum* et *L. acidophilus* (Granato *et al.*, 1999; Sherman *et al.*, 1986). Chez *L. johnsonii* La1, Granato *et al.*, (1999) indiquent que les LTA extraits de la paroi bactérienne, mais également ceux sécrétés dans le milieu de culture de la bactérie au cours de la croissance, inhibent de manière dose-dépendante l'adhésion de la souche aux cellules Caco-2. Le rôle des LTA dans l'interaction bactérie/ hôte a été également mis en évidence chez certaines espèces pathogènes telles que *Listeria monocytogenes* (Abachin *et al.*, 2002) et *Staphylococcus epidermidis* (Teti *et al.*, 1987; Chugh *et al.*, 1990).

Toutefois ces résultats constituent, seulement une preuve indirecte de l'implication des LTA associés à la paroi de *L. plantarum* 299v, dans le processus d'adhésion *in vitro* de la bactérie à la mucine et aux cellules Caco-2.

La mise en évidence du rôle des LTA, *in situ* à la surface de la bactérie probiotique, dans l'interaction *in vitro* avec différentes cibles de l'épithélium intestinal nécessite une approche expérimentale complémentaire que nous allons développer ci-après.

### 3.3 Modification non-létale de l'état de la paroi de *L. plantarum* 299v : effets sur la capacité d'adhésion *in vitro* de la souche probiotique et sur les LTA associés à sa surface

Au cours de la première partie du travail exposé **section 1.3**, nous avons mis en évidence qu'un prétraitement mécanique, par sonication à faible puissance (< 20 watts), diminuait de manière significative la capacité des cellules de *L. plantarum* à adhérer à la mucine ainsi qu'aux cellules épithéliales Caco-2. Bien que la paroi des lactobacilles soit une structure extrêmement complexe, nous avons essayé de relier la perte de la capacité d'adhésion à l'élimination d'une fraction de LTA associés à la surface de la bactérie, consécutivement au traitement par sonication. Cette démarche est justifiée et confortée d'une part par nos observations citées précédemment et d'autre part, par la mise en évidence chez plusieurs espèces de *Lactobacillus*, de l'existence d'une fraction de LTA relarguée par les



**Figure III.6** : Effet de traitements physique ou biochimique de la bactérie *L. plantarum* 299v, à divers stades de la croissance, sur sa capacité d'adhésion à la mucine (a) et aux cellules épithéliales intestinales Caco-2 (b). Le contrôle est une suspension bactérienne ayant seulement subi un lavage à pH 7,5 dans un tampon Tris 0,1M, avant la mise en œuvre dans le test d'adhésion. Chaque barre d'erreur est le résultat de trois expériences.

bactéries dans le milieu de culture au cours de la croissance (Delcour *et al.*, 1999; Granato *et al.*, 1999), et de ce fait temporairement associés à la paroi de manière non covalente.

### **3.3.1 Effet d'un traitement par sonication à faible puissance sur la capacité d'adhésion de *L. plantarum***

Dans le but de faciliter la lecture du manuscrit, nous avons inséré à ce niveau, la **Figure III.6** déjà présentée dans la **section 1.3**.

### **3.3.2 Préparation de l'extrait de constituants de la paroi par traitement aux ultrasons**

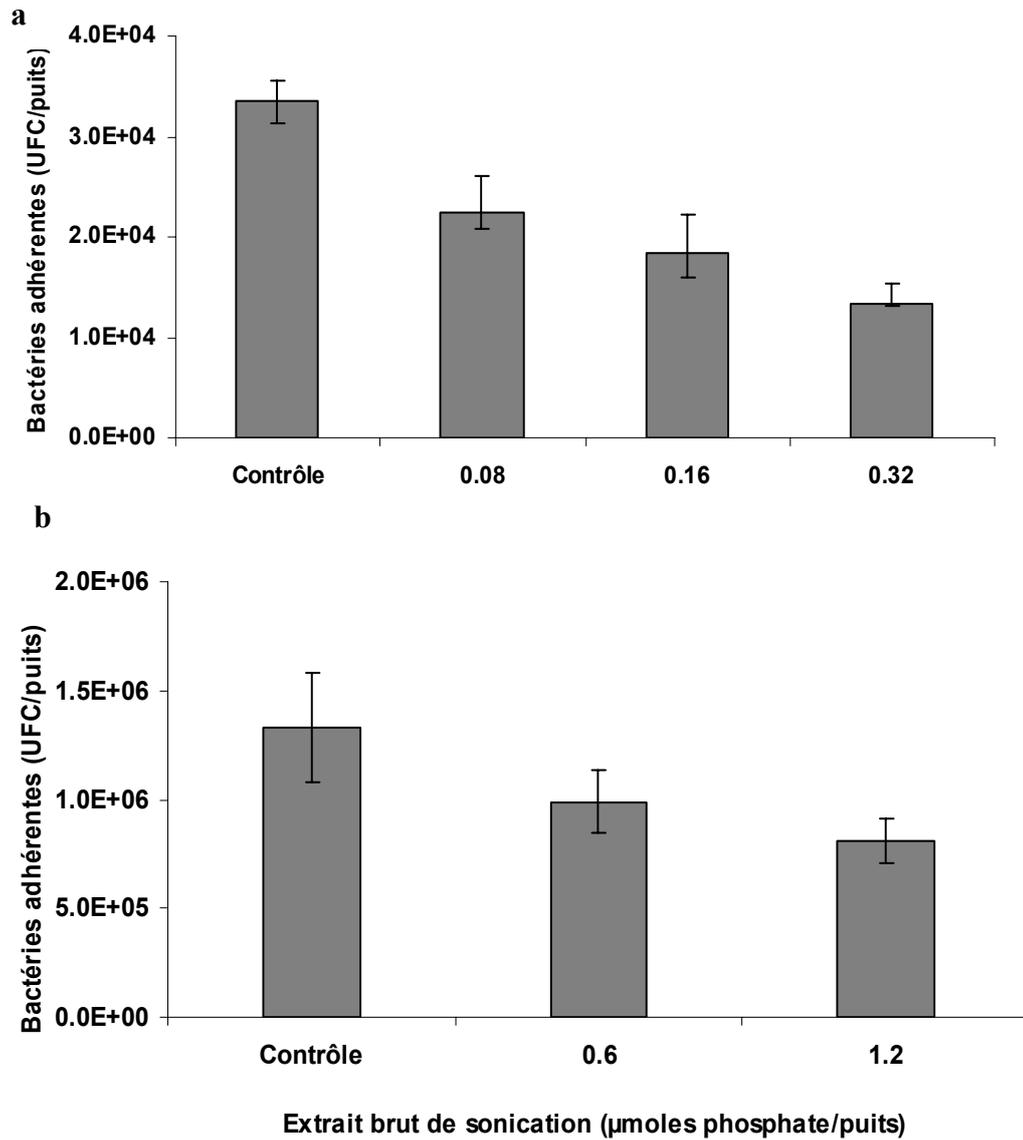
Les cellules bactériennes issues de 4 litres de culture en début de phase stationnaire sont lavées trois fois avec du tampon Tris 0,1M, pH 8 puis resuspendues dans un tampon acétate d'ammonium 0,1M- NaCl 1M, pH 4,7. Les cellules lavées sont soumises à un traitement non létal par sonication à une puissance de 20W, selon le protocole expérimental décrit dans la partie matériels et méthodes. Après dialyse contre un tampon acétate d'ammonium 0,1M pH 4,7, puis concentration par lyophilisation le résidu sec constitue l'extrait brut après sonication (EBS).

#### 3.3.2.1 Aptitude de l'extrait EBS à inhiber l'adhésion de *L. plantarum* 299v

La mucine et les cellules Caco-2 immobilisées sur microplaques, sont incubées avec des concentrations croissantes de l'extrait EBS, dans les conditions citées dans le chapitre matériels et méthodes. Les résultats illustrés **Figure III.39 a et b**, suggèrent que les constituants de la paroi présents dans l'extrait EBS, inhibent de manière dose-dépendante l'adhésion des cellules de *L. plantarum* 299v sur chacune des deux cibles. On note des taux d'inhibition d'adhésion variant de 30 à 60 % pour la cible mucine et de 25 à 40% sur les cellules intestinales Caco-2.

Afin d'attribuer aux LTA, tout ou partie de l'inhibition d'adhésion observée, nous avons mis en place une procédure visant à caractériser la présence de ces entités moléculaires dans l'extrait EBS. Deux approches complémentaires sont réalisées :

- Mise en évidence des LTA dans l'EBS par ELISA et par Dot-blotting ;
- Purification puis caractérisation physico-chimique des LTA présents dans l'EBS.



**Figure III.39** : Inhibition de l'adhésion de *L. plantarum* 299v par l'extrait EBS. (a) sur cible mucine et (b) sur cible cellules épithéliales Caco-2.

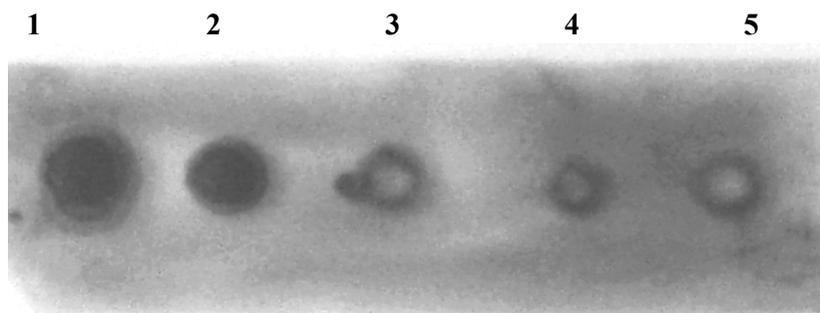
#### 3.3.2.2 Mise en évidence des LTA dans l'EBS par ELISA et Dot-blotting

La présence de LTA dans EBS est détectée grâce à la mise en œuvre des méthodes de Dot-blotting et ELISA, dont les protocoles expérimentaux sont détaillés dans le chapitre matériels et méthodes. Les résultats du Dot-blotting sont présentés **Figure III.40**, les spots 3 et 4 attestent sans ambiguïté de la présence de LTA dans l'extrait de constituants de paroi obtenus après sonication (EBS). Cette observation est confirmée par le test ELISA avec une valeur d'absorbance à 450 nm de 1,2, pour un équivalent de 2 µg phosphate contre une valeur témoin (lait écrémé) de 0,06.

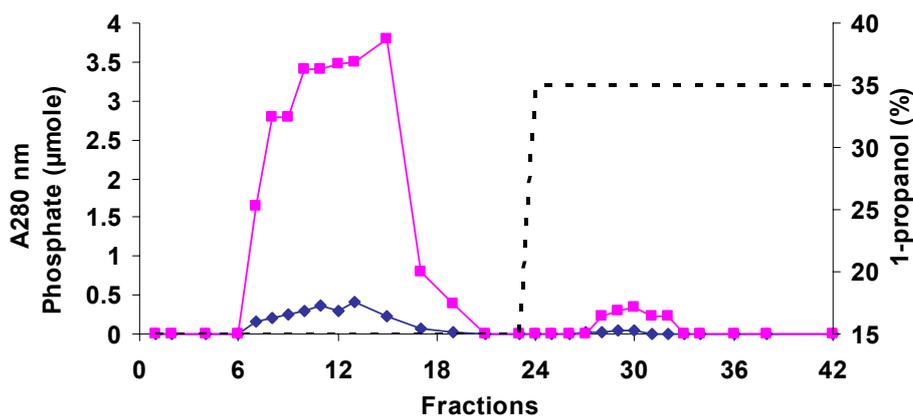
#### 3.3.2.3 Purification et caractérisation des LTA présents dans l'extrait EBS

Les LTA présents dans l'extrait EBS sont purifiés par chromatographie d'interactions hydrophobes sur colonne Octyl-Sépharose dans des conditions expérimentales identiques à celles mises en œuvre pour la purification des LTA extrait au n-butanol. Le chromatogramme est présenté **Figure III.41**. Les fractions d'éluat sont analysées dans un premiers temps sur la base de leur contenu en phosphate. On observe la présence d'un pool de fractions (Fractions 28 à 32) éluées à 35% (v/v) en 1-propanol et qui contiennent du phosphate et présentent une faible absorbance à 280 nm. Sur ce critère, le chromatogramme ressemble à celui obtenu lors de la purification des LTA extraits au n-butanol (**Figure III.33**). Les fractions 28 à 32 sont rassemblées, dialysées contre un tampon acétate d'ammonium 20 mM, pH 4,7 puis concentrées par évaporation sous vide. La présence de LTA dans ce pool de fractions est confirmée par les tests de Dot-blotting (**Figure III.40, spot 5**) et ELISA (A450 nm = 1,2) ; une analyse par spectrométrie de masse en modes MALDI-TOF et ESI est en cours afin d'identifier la "signature" masse moléculaire des LTA, apportant ainsi la preuve complémentaire de leur présence. Les résultats sont en attente et seront communiqués dès leur obtention. L'analyse de la composition chimique nécessite une étape complémentaire de purification par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE Sepharose. A ce jour, le travail est en cours.

En guise de conclusion à ce chapitre sur l'identification d'entités moléculaires non protéiques de surface potentiellement impliquées dans l'interaction *in vitro* de *L. plantarum* 299v avec divers constituants de l'épithélium intestinal, nous avons établi :



**Figure III.40** : Détection, par la technique de Dot-blotting, des LTA dans l'extrait brut (EBS) obtenu après le traitement non léthal des cellules de *L. plantarum* 299v aux ultrasons. Spots 1 et 2 : dépôt de 0,03 et 0,015 équivalent  $\mu$ moles de phosphate issus de la fraction LTA purifiés par la méthode au n-butanol (contrôle positifs). Spots 3 et 4 : 0,5 et 0,25 équivalent  $\mu$ moles phosphate issus de l'extrait EBS. Spot 5, aliquot des fractions (F28 à 32) éluées après Octyl-Sepharose de l'EBS.



**Figure III.41** : Profil chromatographique de la purification, par chromatographie d'interactions hydrophobes sur colonne Octyl-Sepharose (160 x 10 mm), des LTA extraits de la paroi de *L. plantarum* 299v après traitement aux ultrasons. (-■-) concentration en phosphate ; (-◆-) absorbance à 280 nm ; (----) Gradient d'éluion par palier en 1-propanol. L'éluat est collecté par fractions de 4 mL.

- La présence de LTA associés à la paroi de la bactérie probiotique et caractérisé ces derniers d'un point de vue physico-chimique ;
- La capacité des LTA extraits et purifiés, à inhiber l'adhésion de *L. plantarum* 299v sur les cibles mucine et cellules épithéliales Caco-2 ;
- Le traitement, non létal de *L. plantarum* 299v, consécutivement à leur sonication à faible puissance, entraîne une perte de la capacité d'adhésion de la souche ainsi que la désorption de plusieurs constituants de la paroi bactérienne, parmi lesquels nous avons caractérisé la présence de LTA.

Toutes ces observations, nous permettent de formuler l'hypothèse d'une implication des LTA, *in situ* à la surface de *L. plantarum* 299v, dans l'adhésion de la bactérie aux cibles choisies.



## ***CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES***



Les bactéries probiotiques sont actuellement l'objet d'enjeux économiques importants. Leur mise en œuvre dans les aliments fonctionnalisés ou bien dans des préparations en association avec des vitamines et/ou des oligosaccharides prébiotiques, a pris un essor considérable ces dernières années. Aussi, l'étude des modes d'action de tels microorganismes bénéfiques à la santé de l'hôte suscite un intérêt croissant auprès de la communauté scientifique. Pour manifester leurs effets positifs sur le consommateur, les bactéries probiotiques doivent être capables de survivre et de séjourner dans le tractus intestinal. Une telle aptitude dépend entre autres de la capacité de ces microorganismes à interagir avec les constituants de l'épithélium de l'hôte et par conséquent de présenter à leur surface des entités moléculaires qui leur confèrent une affinité pour la paroi intestinale. On comprend dès lors l'intérêt de caractériser de façon plus systématique les éléments structuraux associés à la paroi des bactéries probiotiques. C'est dans ce cadre que s'est inscrit le travail présenté dans ce manuscrit, portant sur l'étude de la surface de *L. plantarum* 299v.

Grâce à la caractérisation des propriétés physico-chimiques globales de la surface de la bactérie, à l'identification d'entités protéiques et non protéiques associées à sa paroi et à la mise en œuvre de tests d'adhésion sur des cibles intestinales, nous souhaitons apporter une contribution à la compréhension de facteurs déterminant la capacité d'interaction du lactobacille avec l'hôte.

Dans une première approche, nous avons caractérisé l'hydrophobie, les propriétés acide-base de Lewis et la charge nette de la surface de *L. plantarum* 299v ainsi que celles de trois autres souches de *L. plantarum* isolées au laboratoire. Nous avons démontré que la perturbation de telles propriétés de la paroi des lactobacilles n'était pas systématiquement corrélable avec la perte de la capacité d'adhésion des bactéries sur des cibles telles que la mucine et les cellules épithéliales intestinales Caco-2.

Dans un second temps, nous avons mis en place une démarche visant à identifier les protéines associées à la paroi de *L. plantarum* 299v. Ces dernières ont été subdivisées en deux sous familles, sur le critère de leur ancrage à la surface de la bactérie :

- les protéines désorbées à l'issue d'un simple lavage des cellules bactériennes à pH faiblement alcalin.
- Les protéines fortement ancrées aux constituants de la paroi ;
- L'utilisation de l'électrophorèse bidimensionnelle pour la séparation des protéines extraites, suivie de leur identification par spectrométrie de masse en mode MALDI TOF, nous a permis de caractériser 47 protéines dans la fraction FI, désorbée à pH faiblement alcalin.

Ces dernières sont toutes d'origine cytoplasmique et parmi elles, on retrouve très majoritairement la GAPDH, l'énolase, le facteur d'élongation Tu, des protéines du métabolisme protéique et glucidique, ainsi que plusieurs protéines de stress (DNak, GroEL...). Ces protéines sont dénommées « anchorless proteins », du fait de l'absence de peptide signal ou de motif spécifique d'ancrage à la paroi ou à la membrane dans leur structure. L'observation de ces protéines à la surface de *L. plantarum* 299v vient conforter un nombre croissant d'études récentes caractérisant la présence de la GAPDH, de l'énolase et d'autres « anchorless proteins » associées à la paroi de plusieurs bactéries Gram positif et Gram négatif pathogènes et non pathogènes.

Pour identifier les protéines fortement associées aux constituants de la paroi de *L. plantarum* 299v, nous avons utilisé un marquage spécifique des bactéries intègres par une cyanine fluorescente (Cy3), préalablement à leur extraction et à leur analyse par électrophorèse 2D/SM MALDI. Seules 6 protéines présentant un motif d'ancrage, dont 5 ABC transporteurs associés à la membrane plasmique, ont été caractérisées pour la première fois en tant que telles chez *L. plantarum* 299v. Toutes les autres protéines identifiées sont d'origine cytosolique et parmi elles on retrouve une majorité « d'anchorless proteins ».

Si la présence de telles protéines « sans ancrage spécifique », à la surface de nombreuses bactéries Gram positif et en particulier du genre *Lactobacillus* est bien établie, leurs fonctions ainsi que le ou les mécanismes impliqués dans leur exportation suscitent beaucoup d'interrogations. Nous avons consacré une partie de la suite du travail à la recherche d'informations pouvant contribuer à l'apport d'éléments de réponse à ces questions fondamentales.

En développant des tests d'affinité sur microplaques « coatées » par de la mucine ou par les différents constituants protéiques de la matrice extracellulaire, nous avons démontré que seule la GAPDH, parmi l'ensemble des protéines désorbées à  $\text{pH} \geq 7.5$ , était capable de se lier à chacune de ces cibles. L'aptitude de la GAPDH à s'adsorber sur des cibles protéiques de la paroi intestinale, a été également confirmée par chromatographie d'affinité sur mucine et collagène de type I. Nous avons exploité le caractère pH-dépendant de l'association de la GAPDH aux constituants de la paroi afin d'apporter une preuve de son implication, *in situ* à la surface de la bactérie probiotique, dans l'adhésion à un élément de la matrice extracellulaire. Une étape de lavage des cellules bactériennes, à des pH compris entre 4,5 et 7, préalablement à leur mise en contact avec la cible fibronectine, s'accompagne d'une baisse concomitante de la concentration de la GAPDH associée à la paroi et de la capacité

d'adhésion de la souche probiotique. Ce résultat est original puisqu'il constitue le premier rapport sur l'implication de la GAPDH dans l'adhésion de *L. plantarum* à la fibronectine.

A ce niveau de notre étude, nous avons estimé que cette enzyme pouvait constituer un bon modèle pour aborder une investigation du ou des mécanismes impliqués dans l'exportation « d'anchorless proteins » vers la paroi bactérienne.

Les formes cytoplasmique et pariétale de la GAPDH ont été purifiées afin de comparer leur structure primaire ainsi que leur structure à l'état oligomérique. L'homologie totale observée entre ces deux formes de l'enzyme nous a permis de conclure sur l'absence de modification structurale consécutive à l'exportation de la protéine intracellulaire vers la surface bactérienne. Après avoir mis en évidence que la concentration de l'enzyme associée à la paroi du lactobacille, augmentait entre les phases exponentielle et stationnaire, nous avons essayé d'identifier une ou plusieurs modifications survenant au niveau cellulaire pendant la croissance, qui justifierait l'accroissement de la présence de la GAPDH à la surface bactérienne. Nous avons, tout d'abord invalidé l'hypothèse d'une ré-adsorption de l'enzyme, consécutivement à sa libération dans le milieu de culture lors de la lyse bactérienne.

Le recours à la cytométrie en flux, CMF, nous a permis d'évaluer simultanément l'évolution de :

- l'intégrité de la membrane plasmique, corrélable à la pénétration du marqueur fluorescent iodure de propidium dans les cellules ;
- l'activité métabolique de *L. plantarum* 299v grâce à l'utilisation de la fluorescéine di-acétate, FDA.

Le constat d'une augmentation conjointe de la perte d'intégrité membranaire et de la concentration en GAPDH pariétale au cours de la croissance de la bactérie nous a amené à soupçonner un lien entre ces deux événements. La mise en œuvre d'un double marquage des cellules bactériennes, en début de phase stationnaire, par des anticorps anti-GAPDH fluorescents et par l'iodure de propidium, suivi de leur analyse par CMF, indique sans ambiguïté que la concentration de l'enzyme liée à la paroi est significativement plus importante à la surface des cellules dont la membrane plasmique est altérée. La présence de la GAPDH à la surface de *L. plantarum* 299v ainsi que le degré d'altération de sa membrane plasmique semblent également dépendants de la disponibilité de la source carbonée.

L'ensemble de ces constats nous a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle un stress nutritionnel, par exemple, pourrait être à l'origine de la modification de la perméabilité membranaire, favorisant ainsi l'efflux passif de protéines intracellulaires telles que la GAPDH mais également celui de nombreuses autres « anchorless proteins ». Chez *L.*

*plantarum* 299v, ces protéines seraient piégées au niveau de la paroi, lors de leur diffusion, du fait de leur capacité d'interaction avec certains constituants polyanioniques tels que les acides teichoïques.

Les compositions qualitative et quantitative de la partie du protéome de *L. plantarum*, associée à sa surface semblent fortement dépendantes des conditions environnementales. Ce « surfacéome » pourrait être considéré comme une structure évolutive dont les modifications, en réponse à divers stress liés au milieu, permettraient à la bactérie de s'adapter aux nouvelles conditions auxquelles elle serait soumise. La capture de protéines intracellulaires au niveau de la paroi représenterait une économie moléculaire pour la bactérie, puisque ces protéines nouvellement localisées assureraient des fonctions différentes de celles qu'elles possédaient au niveau cytoplasmique.

Afin de compléter notre étude sur les biopolymères associés à la surface de *L. plantarum* et susceptibles d'intervenir dans sa relation avec l'hôte, nous avons tout d'abord purifié et établi la composition des acides lipotéichoïques, LTA, de la paroi du probiotique. Par la suite, nous avons mis en évidence que les LTA extraits de la paroi inhibaient l'adhésion de la bactérie sur la mucine et les cellules épithéliales intestinales. Cette observation témoignant de l'affinité des LTA pour ces cibles de la paroi intestinale, nous avons essayé de vérifier si ces polymères, *in situ* à la surface de la bactérie, jouaient un rôle dans l'adhésion. Grâce à la mise en œuvre d'un pré-traitement des cellules bactériennes par ultra-sons dans des conditions non létales, nous avons engendré des modifications de la composition de leur paroi, se traduisant par la perte totale de leur capacité d'adhésion. L'identification de LTA dans l'extrait moléculaire complexe désorbé de la paroi bactérienne après traitement aux ultrasons, apporte un argument supplémentaire de leur participation potentielle à l'interaction de *L. plantarum* avec l'hôte.

Ce travail nous a fait prendre conscience de l'extrême complexité de la paroi bactérienne, de son caractère évolutif et par conséquent de l'immense difficulté à établir un lien entre sa composition et la capacité d'interaction de la bactérie avec son hôte. Il vient de faire l'objet d'une publication intitulée « *L. plantarum* 299v surface-bound GAPDH : a new insight in enzyme cell wall location » à paraître dans *Journal of Microbiology and Biotechnology* (vol.19, N°12, 2009). Un deuxième projet de publication, en cours de rédaction, intitulée « *Lactobacillus plantarum* 299v cell surface bound proteins involved in probiotic/host interaction » (**Annexe 4**) et un 3<sup>ème</sup> projet intitulé « Cell wall-associated lipoteichoic acids involvement in *L. plantarum* 299v adhesion to mucin and Caco-2 epithelial cells » (**Annexe 5**) qui seront soumis à *Journal of Applied Microbiology*. Quatre communications par affiche

et une communication orale ont été également présentées, la liste des résumés est donnée en **Annexe 6**.

Les perspectives qui s'inscrivent logiquement dans la suite de cette étude, sont nombreuses.

- Le développement de nouveaux tests, pour démontrer l'affinité des protéines de la paroi pour des cibles moléculaires de l'épithélium intestinal, constitue une perspective immédiate. A ce titre, la mise au point de tests de type Far Western Blot, après séparation par 2DE des protéines extraites de la paroi, doit permettre d'identifier d'autres adhésines potentielles.
- A court terme, il faudra mettre en place des procédés suffisamment sensibles pour identifier d'autres constituants protéiques discrets, associés à la paroi ou à la membrane plasmique et présentant une capacité d'interaction avec des éléments structuraux de l'épithélium intestinal. Parmi ces procédures, on privilégiera le rasage enzymatique des protéines exposant une partie de leur structure à l'extérieure de la paroi, suivi de leur identification sur la base du séquençage des peptides qui en sont issus, par LC/MS/MS. Les premiers essais infructueux, dont les résultats ne figurent pas dans ce mémoire, nous ont montré que l'approche bien que très séduisante, reste toutefois délicate.
- L'utilisation de la CMF, afin de trier les cellules bactériennes sur le critère de leur intégrité membranaire, permettrait d'obtenir des sous populations dont on pourrait étudier spécifiquement la capacité d'adhésion et la composition du « surfaceome ». Une telle démarche serait un pas supplémentaire dans la compréhension de la relation entre la « structure évolutive » de la paroi et la capacité d'interaction du microorganisme avec son environnement.
- Nous envisageons également d'utiliser la CMF afin d'identifier des protéines de la paroi bactérienne, sur le critère de leur capacité à reconnaître spécifiquement des sites de liaison à la surface de cellules épithéliales intestinales. Les protéines associées à la paroi de *L. plantarum* 299v seront marquées, *in situ*, par une cyanine fluorescente, extraites et mises en contact avec des cellules de la lignée Caco-2. L'analyse par CMF devrait permettre ensuite d'une part de visualiser l'interaction protéines fluorescentes/surface cellulaire et d'autre part de trier et de récupérer les cellules intestinales marquées pour extraire et identifier les protéines de *L. plantarum* présentant une affinité pour des récepteurs présents à leur surface.
- Les entités moléculaires identifiées à la surface de *L. plantarum* 299v ne sont pas simplement impliquées dans le contact avec la cible, certaines d'entre elles tels que les

LTA, vont jouer un rôle déterminant dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte. Dans ce contexte, les perspectives d'étude à moyen terme sont multiples et représentent une suite parfaitement logique à notre travail préalable de chimie et biochimie extractives et de caractérisation structurale.

- Enfin, il est évident que l'ensemble du travail consacré à *L. plantarum* 299v pourra être transposé à d'autres espèces et genres bactériens d'intérêt probiotique isolés au laboratoire.

## ***RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES***



-A-

1. **Abachin E, Poyart C, Pellegrini E, Milohanic E, Fiedler F, Berche P, and Trieu-Cuot P.** 2002. Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* **43**(1), 1-14.
2. **Absolom D.R., Lamberti F.V., Policova Z., Zingg W., van Oss C.J., and Neumann N.W.** 1983. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl. Envir. Microbiol.* **46**, 90-97.
3. **Adlerberth I., Ahrné S., Johansson M.L., Molin G., Hanson L.Å., and Wold A.E.** 1996. A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2244–2251.
4. **Ahrné S., Nobaek S., Jeppsson B., Adlerberth I., Wold A.E., and Molin G.** 1998. The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *J Appl Microbiol.* **85**(1):88-94.
5. **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.
6. **Aleljung P., Shen W., Rozalska B., Hellman U., Ljungh A., and Wadstrom T.** 1994. Purification of collagen-binding proteins of *Lactobacillus reuteri* NCIB 11951. *Curr Microbiol.* **28**, 231–236.
7. **Alvarez R.A, Blaylock M.W., and Baseman J.B.** 2003. Surface localized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Mycoplasma genitalium* binds mucin. *Molecular Microbiology.* **48**(5), 1417–1425.
8. **Anaya C., Church N., and Lewis J.P.** 2007. Detection and identification of bacterial cell surface protein by fluorescent labelling. *Proteomics.* **7**, 215-219.
9. **Andreu A., Stapleton A.E., Fennell C.I., Hillier S.L., and Stamm W.E.** 1995. Hemagglutination, adherence and surface properties of vaginal *Lactobacillus* species. *J. Infect Dis.* **171**, 1237-1243.
10. **Antikainen J., Anton L., Sillanpaa J., and Korhonen T.K.** 2002. Domains in the S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus* involved in adherence to collagens, laminin and lipoteichoic acids and in self-assembly. *Mol Microbiol.* **46**, 381–394.
11. **Antikainen J., Kuparinen V., Lähteenmaki K., and Korhonen T.K.** 2007a. Enolases from Gram-positive bacterial pathogens and commensal lactobacilli share functional similarity in virulence-associated traits. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **51**, 526–534.
12. **Antikainen J., Kuparinen V., Lähteenmaki K., and Korhonen T.K.** 2007b. pH-dependent association of enolase and glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase of *Lactobacillus crispatus* with the cell wall and lipoteichoic acids. *J Bacteriol.* **189**, 4539–4543.
13. **Archibald, A.R., and J. Baddiley.** 1966. The teichoic acids. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **21**:323–375.
14. **Aslanzadeh J., and Paulissen L.J.** 1992. Role of type 1 and type 3 fimbriae on the adherence and pathogenesis of *Salmonella enteritidis* in mice. *Microbiol.Immunol.* **36**, 351-359.
15. **Ävall-Jääskeläinen S., and Palva A.** 2005. *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiol Rev.* **29**, 511–529.
16. **Axelsson L.** 1998. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects (Salminen S. and Von Wright A Editors, Marcel Dekker).
17. **Axelsson L.** 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. *Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects*, 3rd edn (Salminen S, von Wright A & Ouwehand A, eds), pp. 1-66. Marcel Dekker, New York, NY.

**-B-**

18. **Baddiley J.** 1972. Teichoic acids in cell walls and membranes of bacteria. *Essays Biochem* 8: 35- 77.
19. **Bakker-Zierikzee A.M., Tol E.A, Kroes H., Alles M.S., Kok F.J., Bindels J.G.** 2006. Faecal SIgA secretion in infants fed on pre- or probiotic infant formula. *Pediatr. Allerg. Immunol.* **17**, 134 –140.
20. **Basu S., Paul D.K., Ganguly S., Chatterjee M., and Chandra P.K.** 2008. Efficacy of High-dose *Lactobacillus rhamnosus* GG in controlling acute watery diarrhoea in Indian children: A Randomized Controlled Trial. *J. Clin Gastroenterol.* **43**(3), 208-13.
21. **Bath K., Roos S., Wall T., and Jonsson H.** 2005. The cell surface of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 highlighted by identification of 126 extracellular proteins from the genome sequence. *FEMS Microbiol Lett.* **253**, 75–82.
22. **Bell A.E., Sellers L.A., Allen A., Cunliffe W.J., Morris E.R., and Ross-Murphy S.B.** 1985. Properties of gastric and duodenal mucus: effect of proteolysis, disulfide reduction, bile, acid, ethanol, and hypertonicity on mucus gel structure. *Gastroenterol.* **88**, 269-280.
23. **Bellon-Fontaine M.N., Rault J., and van Oss C.J.** 1996. Microbial adhesion to solvents : a novel method to determine the electron-donor / electron acceptor or lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids Surf.* **7**, 47-53.
24. **Bergonzelli G.E., Granato D., Pridmore R.D., Marvin-Guy L.F., Donnicola D., and Cortesy-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*. *Infect Immun.* **74**, 425–434.
25. **Bernet M.F., Brassart D., Neeser J.R., and Servin A.L.** 1994. *Lactobacillus acidophilus* La1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell-attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* **35**, 483–489.
26. **Berzkorovainy A.** 2001. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am. J. Clin. Nutri.* **73**, 399S-405S.
27. **Bhattacharjee J.W., and Srivastava B.S.** 1978. Mannose-sensitive haemagglutinins in adherence of *Vibrio cholerae* eltor to intestine. *J. Gen. Microbiol.* **107**, 407–410.
28. **Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S., and Tarvin, T.L.** 1984. *J. Chromatog.* **366**, 93-104.
29. **Blum S., Reniero R., Schiffrin E.J., Crittenden R., Mattila-Sandholm T., Ouwehand, S. Salminen A.C., von Wright A., Saarela M., Saxelin M., Collins K., and Morelli L.** 1999. Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends Food Sci. Technol.* **10**, 405-410.
30. **Boekhorst J., de Been M.W., Kleerebezem M., and Siezen R.J.** 2005. Genome-wide detection and analysis of cell wall-bound proteins with LPxTG-like sorting motifs. *J Bacteriol* **187**, 4928–4934.
31. **Boekhorst J., Helmer Q., Kleerebezem M., and Siezen R.J.** 2006b. Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiology* **152**, 273–280.
32. **Boekhorst J., Wels M., Kleerebezem M., and Siezen R.J.** 2006a. The predicted secretome of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sheds light on interactions with its environment. *Microbiol.* **152**, 3175-3183.
33. **Bongaerts G.P.A., and Severijnen R.S.V.M.** 2001. The beneficial, antimicrobial effect of probiotics. *Med Hypotheses.* **56**, 174–177.
34. **Boot H.J., Kolen C.P, and Pouwels P.H.** 1995. Identification, cloning, and nucleotide sequence of a silent S-layer protein gene of *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 which has extensive similarity with the S-layer protein gene of this species. *J. Bacteriol.* **177**, 7222-7230.

35. **Boot H.J., Kolen C.P., van Noort J.M., and Pouwels P.H.** 1993. S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356: purification, expression in *Escherichia coli*, and nucleotide sequence of the corresponding gene. *J. Bacteriol.* **175**, 6089-6096.
36. **Botes M., Loos B., van Reenen C.A., and Dick L.M. T.** 2008. Adhesion of the probiotic strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. *Arch. Microbiol.* **190**, 573–584.
37. **Boudeau J., Glasser A.L., Julien S., Colombel J.F., and Darfeuille-Michaud A.** 2003. Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol. Ther.* **18**, 45–56.
38. **Bousvaros A., Guandalini S., Baldassano R.N., Botelho C., Evans J., Ferry G.D., Goldin B., Hartigan L., Kugathasan S., Levy J., Murray K.F., Oliva-Hemker M., Rosh J.R., Tolia V., Zholudev A., Vanderhoof J.A., Hibberd P.L.** 2005. A randomized, double-blind trial of *Lactobacillus* GG versus placebo in addition to standard maintenance therapy for children with Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **11**, 883–9.
39. **Bradford, H.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
40. **Brigidi P., Vitali B., Swennen E., Bazzocchi G., and Matteuzzi D.** 2001. Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhoea. *Res. Microbiol.* **152**, 735–741.
41. **Brinton J.C., and Lauffer M.A.** 1959. The electrophoresis of viruses, bacteria, and cells, and the microscope method of electrophoresis. In: Bier, M. (Ed.), *Electrophoresis Theory, Methods, and Applications*. Academic Press Inc, New York, pp. 427–492.
42. **Bron P.A.** 2004. The molecular response of *Lactobacillus plantarum* to intestinal passage and conditions. Ph.D. thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
43. **Bron P.A., Grangette C., Mercenier A., de Vos W.M., Kleerebezem M.** 2004b. Identification of *Lactobacillus plantarum* genes that are induced in the gastrointestinal tract of mice. *J Bacteriol.* **186** (17), 5721-9.
44. **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.
45. **Buck B.L., Altermann E., Svingerud T., and Klaenhammer T.R.** 2005. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol.* **71**, 8344-8351.
46. **Bukowska H., Pieczul-Mroz J., Jastrzebska M., Chelstowski K., and Naruszewicz M.** 1998. Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with *Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol. *Atherosclerosis* **137**,437–438
47. **Busscher H.J., and Weerkamp A.H.** 1987. Specific and non-specific interaction in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 165-173.

-C-

48. **Caballero-Franco C., Keller K., De Simone C., 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**, 315-322.

49. Cabanes D., Dehoux P., Dussurget O., Frangeul L., and Cossart P. 2002. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.* **10**, 238–245.
  50. Callegari M.L., Riboli B., Sanders J.W., Cocconcelli P.S., Kok J., Venema G., and Morelli L. 1998. The S-layer gene of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 892: cloning, sequence and heterologous expression. *Microbiol.* **144**, 719-726.
  51. Campieri M., Rizzello F., Venturi A. 2000. Combination of antibiotic and probiotic treatment is efficacious in prophylaxis of post-operative recurrence of Crohn's disease: a randomized controlled study vs mesalazine. *Gastroenterol.* **118**,781.
  52. Cebeci A, and Gürakan C. 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbio.* **20**, 511–518.
  53. Chen P.S., Toribara T.Y., and Warner H. 1956. Microdetermination of Phosphorus. *Analytical Chemistry.* **28**, No. 11, November.
  54. Chhatwal G. 2002. Anchorless adhesions and invasines of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors. *Trends Microbiol* **10**, 205-208.
  55. Christie J., McNab R., and Jenkinson H.F. 2002. Expression of fibronectin-binding protein FbpA modulates adhesion in *Streptococcus gordonii*. *Microbiol.* **148**, 1615-1625.
  56. Chugh TD, Burns GJ, Shuhaiber HJ, and Bahr GM. 1990. Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to fibrin-platelet clots *in vitro* mediated by lipoteichoic acid. *Infect Immun.* **58** (2), 315-9.
  57. Claesson M.J., van Sinderen D., and O'Toole P.W. 2007. The genus *Lactobacillus* a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol Lett.* **269**, 22–28.
  58. Cordwell S.J. 2006. Technologies for bacterial surface proteomics. *Current Opinion in Microbiology.* **9**,320–329.
  59. Cui H.H., Chen C.L., Wang J.D., Yang Y.J., Cun Y., Wu J.B., Liu Y.H., Dan H.L., Jian Y.T., Chen X.Q. 2004. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.* **10**, 1521-1525.
  60. Cui H.H., Chen C.L., Wang J.D., Yang Y.J., Sun Y., Wang Y.D., Lai Z.S. 2003. The effects of bifidobacterium on the intestinal mucosa of the patients with ulcerative colitis. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* **42** (8), 554-557.
  61. Cuperus P.L., van der Mei H. C., Reid G., Bruce A.W., Khoury A. H., Rouxhet P. G., and Busscher H.J. 1993. Physicochemical surface characteristics of urogenital and poultry lactobacilli. *J. Colloid. Interface Sci.* **156**, 319–324.
  62. Cuperus P.L., van der Mei H. C., Reid G., Bruce A.W., Khoury A.E., van der Kuijl-Booij M., Noordmans J., and Busscher H.J. 1995. Effect of ciprofloxacin and vancomycin on physicochemical surface properties of *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus*. *Microbios.* **82**, 49-67.
- D-
63. Dal Bello F., Walter J., Hammes W.P. and Hertel C. 2003. Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation condition. *Microb. Ecol.* **45**, 455–463.
  64. De Angelis M., Di Cagno R., Huet C., Crecchio C., Fox P.F., and Gobbetti M. 2004. Heat shock response in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol.* **70**, 1336–1346.
  65. de Leeuw E., Li X., and Lu W. 2006. Binding characteristics of the *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 surface layer to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol Lett.* **260**, 210–215.

66. **de Man J. C., Rogosa M., and Sharpe M. T.** 1960. A medium for cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 130-135.
  67. **De Roissart H.** 1986. Bactérie lactiques, p. 343. *In* F. M. Luquet (ed.), *Laits : vache, brebis, chèvre*, vol. 3. Lavoisier, Paris.
  68. **de veries M.C., Vaughan E.E, Kleerebezem M., De Vos W.M.** 2006. *Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int Dairy. J.* **16**, 1018-1028.
  69. **De Vos M.** 2005. Lipoteichoic acid in lactobacilli: D-Alanine makes the difference. *PNAS.* **112** (31), 10763-10764.
  70. **De Vrese M., Stegelmann A., Richter B., Fenselau S., Laue C., Schrezenmeir J.** 2001. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *Am J. Clin Nutr.* **73**, (Suppl 1) 421-429.
  71. **Delcour J., Ferain T., Deghorain M., Palumbo E., Hols P.** 1999. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **76** (1-4), 159-84.
  72. **Delgado M.L., Gil M.L., Gozalbo D.** 2003. Starvation and temperature upshift cause an increase in the enzymatically cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein in yeast. *FEMS Yeast Res.* **4**, 297-303.
  73. **Delgado M.L., O'Connor J.E., Azorín I., Renau-Piqueras J., Gil M.L., Gozalbo D.** 2001. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TDH1, TDH2 and TDH3 genes are also cell wall proteins. *Microbiol.* **147** (2), 411-417.
  74. **Drossman D.A., Camilleri M., Mayer E.A., Whitehead W.E.** 2002. AGA technical review on irritable bowel syndrome. *Gastroenterol.* **123**, 2108-2131.
  75. **Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chem.* **28**, 350-356.
  76. **Duncker S.C., Wand L., Hols P., and Bienenstock J.** 2008. The D-alanine content of lipoteichoic acid is crucial for *Lactobacillus plantarum*-mediated protection from visceral pain perception in a rat colorectal distension model. *Neurogastroenterol Motil.* **20**, 843–850.
  77. **Dunn B.E., Vakil N.B., Schneider B.G., Miller M.M., Zitzer J.B., Peutz T., and Phadnis S.H.** 1997. Localization of *Helicobacter pylori* urease and heat shock protein in human gastric biopsies. *Infect. Immun.* **65**, 1181-1188.
  78. **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., and Collins J.K.,** 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J. Clin Nutr.* **73** (Suppl2), 386-392.
  79. **Durbin R.E., Krogh A. and Mitchison G.** 1998. *Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids.* Cambridge: Cambridge University Press.
- E-
80. **Eaton T.J., Gasson M.J.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1628–1635.
  81. **Egea L., Aguilera L., Gimenez R., Sorolla M.A, Aguilar M.A., Badia J., and Baldomaa L.** 2007. Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*:

Interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen. *Intern J Biochem Cell Biol.* **39**, 1190–1203.

- 82. Einolf C.W., and Carstensen E.L.** 1976. Bacterial conductivity in the determination of surface charge by microelectrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* **148**,506-516.
- 83. Ehrmann M. A., Kurzak P., Bauer J., and Vogel R. F.** 2002. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J Appl Microbiol.* **92**,966-75.

-F-

- 84. FAO/WHO.** Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, 2001; 1–34.
- 85. Ferain T., Hobbs J.N., Richardson J., Bernard N., Garmyn D., Hols P., Allen N.E., and Delcour J.** 1996. Knockout of the two *ldh* genes has a major impact on peptidoglycan precursor synthesis in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **178**, 5431–5437.
- 86. Ferdinand W.** 1964. The isolation and specific activity of rabbit-muscle glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. *Biochem J.* **92**, 578-585.
- 87. Wicken J. C., Gibbens J. W., and Knox W.** 1973. Comparative Studies on the Isolation of Membrane Lipoteichoic Acid from *Lactobacillus fermenti*. *J. Bacteriol.* **113**, 365-372.
- 88. Fischer W.** 1988. Physiology of lipoteichoic acids in bacteria. *Adv Microb Physiol.* **29**, 233-301.
- 89. Fischer W.** 1994. Lipoteichoic acids and lipoglycans. In: Ghuysen JM and Hakenbeck R (Eds) *Bacterial Cell Wall.* (pp 199–215). Elsevier, Amsterdam.
- 90. 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.
- 91. Forestier C., De Champs C., Vatoux C., and Joly B.** 2001. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res. Microbiol.* **152**, 167-173.
- 92. Fothergill-Gilmore L.A., Michels P.A.** 1993. Evolution of glycosis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **52**, 105-235.
- 93. Francisca A.W., Ruggiero C.E., Koppisch A.T., Dong J., Song J., Brettin T., and Iyer S.** 2005. Proteomic analysis of *Bacillus anthracis* Sterne vegetative cells. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1748**, 191– 200.
- 94. Frece J., Kos B., Svetec I.K., Zgaga Z., Mrsa V., Sus'koviæ J.** 2005. Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* **982**, 285-292.
- 95. Freter R.** 1992 Factors affecting the microecology of the gut. In: Fuller R (ed) *Probiotics. The scientific basis*, Chapman and Hall, London, pp 355–376.
- 96. Fuller R.** 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* **66**, 365–378.

-G-

- 97. G-Alegria E., Lopez I., Ruiz J.I., Saenz J., Fernandez E., Zarazaga M., Dizy M., Torres C., and Ruiz-Larrea F.** 2003. High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiol Lett.* **230**, 53–61.

98. Gao J.J., Xue Q., Zuvanich E.G., Hagi K.R., Morrison D.C. 2001. Commercial preparations of lipoteichoic acid contain endotoxin that contributes to activation of mouse macrophages in vitro, *Infect. Immun.* **69**, 751–757.
99. Garduno R.A., Faulkner G., Trevors M.A., Vats N., and Hoffman P.S. 1998. Immunolocalization of Hsp60 in *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* **180**, 505–513.
100. Geertsema-Doornbusch, G. I., J. Noordmans, A. W. Bruce, G. Reid, A. E. Khoury, H. C. van der Mei, and H. J. Busscher. 1994. Quantitation of microbial cell surface heterogeneity by microelectrophoresis and electron microscopy-application to lactobacilli after serial passaging. *J. Microbiol. Methods.* **19**, 269–277.
101. Giaouris E., Chapot-Chartier M.P., and Briandet R. 2009. Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *Int J Food Microbiol.* **131**(1), 2-9.
102. Gill S.R., Pop M., Deboy R.T., Eckburg P.B., Turnbaugh P.J., Samuel B.S., Gordon J.I., Relman D.A., Fraser-Liggett C.M., and Nelson K.E. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, **312**, 1355–1359.
103. Ginsburg I. 2002. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infect Dis* **2**, 171–179.
104. Gomez A.M., and Malcata F.X. 1999. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sciences and Technol.* **10**, 139-157.
105. Goossens D., Jonkers D., Russel M., Thijs A., van den Bogaard A., Stobberingh E., and Stockbrugger R. 2005. Survival of the probiotic, *Lactobacillus plantarum* 299v and its effects on the faecal bacterial flora, with and without gastric acid inhibition. *Dig Liver Dis.* **37**, 44–50.
106. Gorbach S.L. 1967. Population control in the small bowel. *Gut.* **8**(6), 530-2.
107. Görg A, Weiss W, and Dunn MJ. 2004: Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4:3665-3685.
108. Gosselink M.P., Schouten W.R., van Lieshout L.M. 2004. Delay of the first onset of pouchitis by oral intake of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Dis Colon Rectum.* **47**:876-884.
109. Gozalbo D., Gil-Navarro I., Azorin I., Renau-Piqueras J., Martinez J.P., and M. L. Gil. 1998. The Cell Wall-Associated Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Candida albicans* is also a Fibronectin and Laminin Binding Protein. *Infect. Immun.* **66**: 2052–2059.
110. Granato D., Bergonzelli G.E., Pridmore R.D., Marvin L., Rouvet M., and Corth'esy-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..
111. 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.
112. Grandi G. 2001. Antibacterial vaccine design using genomics and proteomics. *Trends Biotechnol.* **19**, 181-188.
113. Grangette C., Nutten S., Palumbo E., Morath S., Hermann C., Dewulf J., Pot B., Hartung T., Hols P. and Mercenier A. 2005. Enhanced anti-inflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *PNAS* **102**, 10321–10326.
114. Grant WD. 1979. Cell wall teichoic acid as a reserve phosphate source in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **137**, 35-43.

115. Green, J.D., and Klaenhammer T.R. 1994. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4487–4494.
116. Grifantini R., Bartolini E., Muzzi A., Draghi M., Frigimelica E., Berger J., Randazzo F., and Grandi G. 2002. Gene expression profile in *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* upon host-cell contact: from basic research to vaccine development. *Ann N Y Acad Sci.* **975**, 202-216.
117. Guarner F., and Schaafsma G.J. 1998. Probiotics. *Int J Food Microbiol.* **39**, 237-238.
118. Guslandi M., Mezzi G., Sorghi M., Testoni P.A. 2000. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Digestive Dis. Sci.* **45**, 1462–1464.

**-H-**

119. Halpern G. M., Prindiville T., Blankenburg M., Hsia T., and Gershwin M. E. (1996). Treatment of irritable bowel syndrome with Lacteol Fort: a randomized, double-blind, cross-over trial. *American Journal of Gastroenterology*, **91**, 1579-1585.
120. Hamilton-Miller, J. M. T. (2001). Probiotics in the management of irritable bowel syndrome: a review of clinical trials. *Microbiology Ecol. Health Diseases*, **13**, 212-216.
121. Hancock I. C. 1991. Microbial cell surface architecture, p. 21-59. In N. Mozes P., Handley S., Busscher H. J., and Rouxhet P. G. (ed.), *Microbial cell surface analysis: structural and physicochemical methods*. VCH Publishers. Inc., New York, N.Y.
122. Handwerker S., Pucci M.J., Volk K.J., Liu J., and Lee M.S. 1994. Vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* synthesize cytoplasmic peptidoglycan precursors that terminate in lactate. *J. Bacteriol.* **176**, 260–264.
123. Hart A.L., Lammers K., Brigidi P., Vitali B., Rizzello F., Gionchetti P., Campieri M., Kamm MA., Knight S.C., Stagg A.J. 2004. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut*, **53**, 1602-1609.
124. Harty D. W. S., Patrikakis M., and Knox K.W. 1993. Identification of *Lactobacillus* strains isolated from patients with infective endocarditis and comparison of their surface-associated properties with those of other strains of the same species. *Microb. Ecol. Health Dis.* **6**, 191–201.
125. Hashimoto M., Yasuoka J., Suda Y., Takada H., Yoshida T., Kotani S., Kusumoto S. 1997. Structural feature of the major but not cytokine-inducing molecular species of lipoteichoic acid, *J. Biochem.* **121**, 779–786.
126. He F., Morita H., Kubota A., Ouwehand A.C., Hosoda M., Hiramatsu M., Kurisaki J., 2005. Effect of orally administered non-viable *Lactobacillus* cells on murine humoral immune responses. *Microbiol. Immunol.* **49**, 993-997.
127. Henle G., and Deinhardt F. 1957. The establishment of strains of human cells in tissue culture. *J. Immunol.* **79**, 54-59.
128. Hennequin C., Porcheray F., Waligora-Dupriet A., Collignon A., Barc M., Bourlioux P., and Karjalainen T. 2001. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiol.* **147**, 87–96.
129. Hermansson M., Kjelleberg S., Korhonen T.K., and Stenström T.A. 1982. Hydrophobic and electrostatic characterization of surface structures of bacteria and its relationship to adhesion to an air-water interface. *Archives of Microbiology*, **131**, 308-312.
130. Hether N.W., and Jackson L.L. 1983. Lipoteichoic Acid from *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol.* **156** (2), 809-817.
131. Hickson M., D'Souza A.L., Muthu N., Rogers T.R., Want S., Rajkumar C, and Bulpitt C.J., 2007. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea

- associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ*. **335**, 80-83.
- 132. Hiemenz, P.C.** 1977. Electrophoresis and other electrokinetic phenomena. In: Principles of Colloid and Surface Chemistry (Ed. J.J. Lagowski). Marcel Dekker, New York, pp. 452-487.
- 133. Hirel P.H., Schmitter J.M., Dessen P., Fayat G., and Blanquet S.** 1989. Extent of N-terminal methionine excision within *E. coli* proteins is governed by the side chain length of the penultimate amino acid. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. **86**, 8247-8251.
- 134. Holzapfel 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-73S.
- 135. Holzapfel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U. and Huis In't Veld J.H.** 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol*. **41**, 85-101.
- 136. Hooper L.V., and Gordon J.I.** 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, **292**, 1115-1118.
- 137. Huang J.S, Bousvaros A., Lee J.W, Diaz A., Davidson E.J.** 2002. Efficacy of Probiotic Use in Acute Diarrhea in Children A Meta-Analysis. *Digest. Dis. Sci*. **47** (11), 2625-2634.
- 138. Hughes A.H., Hancock I.C., and Baddiley J.** 1970. Teichoic acids in cation control in bacterial membranes. *Biochem. J*. **132**, 83-93.
- 139. Hurmalainen V., Edelman S., Antikainen J., Baumann M., Lähteenmaki K., and Korhonen T.K.** 2007. Extracellular proteins of *Lactobacillus crispatus* enhance activation of human plasminogen. *Microbiology*, **153**, 1112-1122.
- 140. Hynönen U., Westerlund-Wikström B., Palva A., and Korhonen T.K.** 2002. Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin-binding function in the SlpA surface protein of *Lactobacillus brevis*. *J Bacteriol*. **184**(12), 3360-7.

**-I-**

- 141. Imberty A., Wimmerova M., Mitchell E.P., and Gilboa-Garber N.** 2004. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insight into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes Infect*. **6**, 221-228.
- 142. Ishibashi N., Yamazaki S.** 2001. Probiotics and safety. *Am J. Clin Nutr*. **73**, 465S-470S.
- 143. Isolauri E., and Salminen S.** 2008. Probiotics: use in allergic disorders: a Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology, and Intestinal Microbiota (NAMI) Research Group Report. *J Clin Gastroenterol*. **42** (Suppl 2), 91-96.
- 144. Isolauri E., Salminen S., and Ouwehand A.C.** 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. *Probiotics. Best Pract Res Clin Gastroenterol*. **18**(2), 299-313
- 145. Izquierdo E., Horvatovich P., Marchioni E., Aoude-Werner D., Sanz Y., Ennahar S.** 2009. 2-DE and MS analysis of key proteins in the adhesion of *Lactobacillus plantarum*, a first step toward early selection of probiotics based on bacterial biomarkers. *Electrophoresis*. **30**(6), 949-56.

**-J-**

- 146. Jacobs A., Lafolie F., Herry J. M., and Debroux M.** 2007. Kinetic adhesion of bacterial cells to sand: cell surface properties and adhesion rate. *Colloids Surf B Biointerfaces*. **59**(1), 35-45.

147. **Jakava-Viljanen M., and Palva A.** 2007. Isolation of surface (S) layer protein carrying *Lactobacillus* species from porcine intestine and faeces and characterization of their adhesion properties to different host tissues. *Vet Microbiol.* **124** (3-4), 264-73.
148. **Johansson M.L., Molin G., Jeppsson B., Nobaek S., Ahrné S., and Bengmark S.** 1993. Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effects on the indigenous flora. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**,15-20.
149. **Johansson M.L., Nobaek S., Berggren A., Nyman M., Björck I., Ahrné S., Jeppsson B., and Molin G.** 1998. Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v), and effect on the short-chain fatty acid content of faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats. *Internat. J. Food Microbiol.* **42**,(1-2), 29-38.
150. **Johnson-Henry K.C., Hagen K.E., Gordonpour M., Tompkins T.A. and Sherman, P.M.** 2007. Surfacer layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cell Microbiol.* **9**, 356-367.

-K-

151. **Kalliomäki M., Salminen S., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P., and Isolauri E.** 2003. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **357**, 1076–1079.
152. **Kandler O., and Weiss N.** 1986. Regular non sporing Gram positif rods. Genus *Lactobacillus*. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. Vol. 2 Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. and Holt J.G. Ed. Williams and Wilkins, Baltimore. 1209-1234.
153. **Kapczynski D.R., Meinersmann R.J., Lee M.D.** 2000. Adherence of *Lactobacillus* to intestinal 407 cells in culture correlates with fibronectin binding. *Curr Microbiol.* **41** (2), 136-41.
154. **Kim H.G., Gim M.G., Kim J.Y., Hwang H.J., Ham M.S., Lee J.M., Hartung T., Park J.W., Han S.H., Chung D.K.** 2007. Lipoteichoic acid from *Lactobacillus plantarum* elicits both the production of interleukin-23p19 and suppression of pathogen-mediated interleukin-10 in THP-1 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **49**(2), 205-14.
155. **Kinoshita H., Uchida H., Kawai Y., Kawasaki T., Wakahara N., Matsuo H., Watanabe M., Kitazawa H., Ohnuma S., Miura K., Horii A., and Saito T.** 2008. Cell surface *Lactobacillus plantarum* LA 318 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adheres to human colonic mucin. *J Appl Microbiol.* **104**, 1667-1674.
156. **Kleerebezem M., Boekhorst J., Van Kranenburg R., et al.** 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci.* **100**, 1990–1995.
157. **Korndörfer I., Steipe B., Huber R., Tomschy A., and Jaenicke R.** 1995. The crystal structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* at 2.5 Å resolution. *J. Mol Biol.* **246** (4), 511-21.
158. **Kos B.** 2001. Probiotic concept: in vitro Investigations with chosen Lactic Acid Bacteria, PhD Thesis, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Croatia.
159. **Kos B., Susković J., Vuković S., Simpraga M., Frece J., Matosić S.** 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol.* **94** (6), 981-7.
160. **Kotowska M., Albrecht P., and Szajewska H.** 2005. *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol. Ther.* **21**, 583-590.

161. **Krogfelt K.A., Bergmans H., and Klemm P.** 1990. Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infect. Immun.* **58**, 1995-1998.
162. **Kruis W., Fric P., Pokrotnieks J., Lukás M., Fixa B., Kascák M., Kamm M.A., Weismueller J., Beglinger C., Stolte M., Wolff C., Schulze J.** 2004. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*, **53**, 1617-1623.
163. **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**, 509-15.

-L-

164. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
165. **Lambert P.A., Hancock I.C., and Baddiley J.** 1975. The interaction of magnesium ions with teichoic acids. *J. Biochem.* **149**, 519-524.
166. **Larsson K., and Glantz P.** 1981. Microbial Adhesion to Surfaces with Different Surface Charges. *Acta Odontologica Scandinavica*, **39**, 79-82
167. **Latrache H., Mozes N., Pelletier C., and Bourlioux P.** 1994. Chemical and Physicochemical properties of *Escherichia coli*: variations among three strains and influence of culture conditions. *Colloids Surf.* **2**, 47-56.
168. **Latvala S., Pietila T.E., Veckman V., Kekkonen R.A., Tynkkynen S., Korpela R., and Julkunen I.** 2008. Potentially probiotic bacteria induce efficient maturation but differential cytokine production in human monocyte-derived dendritic cells. *World J Gastroenterol.* **14**(36), 5570-83.
169. **Lavermicocca P., Valerio F., Lonigro S.L., De Angelis M., Morelli L., Callegari M.L., Rizzello C.G., Visconti A.** 2005. Study of adhesion and survival of lactobacilli and bifidobacteria on table olives with aim of formulating a new probiotic food. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4233-4240.
170. **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.
171. **Lee Y.K., Salminen S.** 2009. Handbook of probiotics and prebiotics. 2<sup>nd</sup> Ed. A John Wiley and Sons, Inc, Publication.
172. **Lehner M.D., Morath S., Michelsen K.S., Schumann R.R., and Hartung T.** 2001. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different toll-like receptors independent of paracrine mediators, *J. Immunol.* **166**, 5161-5167.
173. **Lepage G., and Roy C.** 1986. Direct transesterification of classes of lipids in a one-step reaction. *J. of Lipid Research.* **27**, 114-120.
174. **Lilly D.M., and Stillwell R.H.** 1965. Probiotics growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science*, **147**, 747-748.
175. **Lin Y.P., Thibodeaux C.H., Peña J.A., Ferry G.D., Versalovic J.** 2008. Probiotic *Lactobacillus reuteri* suppress proinflammatory cytokines via c-Jun. *Inflamm. Bowel Dis.* **14**, 1068-1083.
176. **Ling E., Feldman G., Portnoi M., Dagan R., Overweg K., Mulholland F., Chalifa-Caspi V., Wells J., Mizrahi-Nebenzahl Y.** 2004. Glycolytic enzymes associated with the cell surface of *Streptococcus pneumoniae* are antigenic in humans and elicit protective immune responses in the mouse. *Clin Exp Immunol.* **138**(2), 290-8.

177. Llopis M., Antolin M., Carol M., Borrueal N., Casellas F., Martinez C., Espín-Basany E., Guarner F., Malagelada J.R. 2009. *Lactobacillus casei* downregulates commensals' inflammatory signals in Crohn's disease mucosa. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 275-283.
178. Lorca G., Torino M.I., Fontd V., and Ljungh A.A. 2002. Lactobacilli express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. *FEMS Microbiol Lett.* **206**, 31-37.
179. Lotz S., Aga E., Wilde I., van Zandbergen G., Hartung T., Solbach W., and Laskay T. 2004. Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2, *J. Leukoc. Biol.* **75**, 467-477.

**-M-**

180. Madden J.A., and Hunter J.O. 2002. A review of the role of the gut microflora in irritable bowel syndrome and the effects of probiotics. *Br J. Nutr.* **88** (Suppl. 1), 67-72.
181. Malchow H.A. 1997. Crohn's disease and *Escherichia coli*. *J. Clin. Gastroenterol.* **25**, 653-658.
182. Mangell P., Lennernäs P., Wang M., Olsson C., Ahrné S., Molin G., Thorlacius H., and Jeppsson B. 2006. Adhesive capability of *Lactobacillus plantarum* 299v is important for preventing bacterial translocation in endotoxemic rats. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **114**, 611-618.
183. Mantle M., and Husar S.D. 1994. Binding of *Yersinia enterocolitica* to purified, native small intestinal mucins from rabbits and humans involves interactions with the mucin carbohydrate moiety. *Infect. Immun.* **62**, 1219-1227.
184. Mantle M., Forstner G.G., and Forstner J.F. 1984. Biochemical characterization of the component parts of intestinal mucin from patients with cystic fibrosis. *Biochem. J.* **224**, 345-354.
185. Marco M.L., Pavan S. and Kleerebezem M. 2006. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr Opin Biotechnol.* **17**, 204-210.
186. Marteau P., Lémann M., Seksik P., Laharie D., Colombel J.F., Bouhnik Y., Cadiot G., Soulé J.C., Bourreille A., Metman E., Lerebours E., Carbonnel F., Dupas J.L., Veyrac M., Coffin B., Moreau J., Abitbol V., Blum-Sperisen S., Mary J.Y. 2006. Ineffectiveness of *Lactobacillus johnsonii* Lal for prophylaxis of postoperative recurrence in Crohn's disease: a randomised, double blind, placebo controlled GETAID trial. *Gut*, **55**, 842-847.
187. Masuda K., and Kawata T. 1983. Distribution and chemical characterization of regular arrays in the cell wall of strains of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **20**, 145-150.
188. Matsumoto S., Hara T., Hori T., Mitsuyama K., Nagaoka M., Tomiyasu N., Suzuki K., and Sata M., 2005. Probiotic *Lactobacillus* -induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clin Exp Immunol.* **140**, 417-426.
189. Matsumoto S., Watanabe N., Imaoka A., and Okabe Y. 2001. Preventive effects of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*-fermented milk on the development of inflammatory bowel disease in senescence-accelerated mouse P1/Yit strain mice. *Digestion.* **64**, 92-99.
190. Mattila-Sandholm T., Blum S., Collins J.K., Crittenden R., de Vos W., Dunne C., Fondén R., Grenov G., Isolauri E., Kiely B., Marteau P., Morelli L., Ouwehand A., Reniero R., Saarela M., Salminen S., Saxelin M., Schiffrin E., Shanahan F., Vaughan E., von Wright A., 1999. Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends Food Sci. Technol.* **10**, 393-399.

191. **McFarland L.V., Surawicz C.M., Greenberg R.N., Fekety R., Elmer G.W., Moyer K.A., Melcher S.A., Bowen K.E., Cox J.L., Noorani Z., et al.**, 1994. A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *JAMA*. **271**, 1913-8.
192. **McMillan D.J., and Chhatwal G.S.** 2005. Prospects for a group A streptococcal vaccine. *Curr Opin Mol Ther.* **7**, 11-16.
193. **McNaught CE, Woodcock NP, Anderson ADG & MacFie J** (2005) A prospective randomised trial of probiotics in critically ill patients. *Clin Nutr* **24**: 211–219.
194. **Mesnager S., Fontaine T., Mignot T., Delepierre M., Mock M., and Fouet A.** 2000. Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation. *EMBO J.* **19**, 4473–4484.
195. **Metchnikoff E.** 1907. *The prolongation of life. Optimistic studies.* London: Ed. Butterworth Heinemann.
196. **Mikelsaar M., Türi M., Lencner H., Kolts K., Kirch R., and Lencner A.** 1987. Interrelations between mucosal and luminal microflora of gastrointestinal tract. *Nahrung.* **31**, 449-56, 637-8.
197. **Mimura T., Rizzello F., Helwig U., Poggioli G., Schreiber S., Talbot I.C., Nicholls R.J., Gionchetti P., Campieri M., Kamm M.A.** 2004. Once daily high dose probiotic therapy (VSL #3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut*, **53**, 108-114.
198. **Miörner H., Johansson G., and Kronvall G.** 1983. Lipoteichoic acid is the major cell wall component responsible for surface hydrophobicity of group A streptococci. *Infect. Immun.* **39**, 336–343.
199. **Mitsuoka T.** 1992. Intestinal flora and aging. *Nutr Rev.* **50**(12), 438-46.
200. **Miyoshi Y., Okada S., Uchimura T., and Satoh E.** 2006. A mucus adhesion promoting protein, MapA, mediates the adhesion of *Lactobacillus reuteri* to Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* **70**, 1622–1628.
201. **Modun B., and Williams P.** 1999. The staphylococcal transferring-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect. Immun.* **67**, 1086-1092.
202. **Morales M.L., Gonzalez A.G., and Troncoso A.M.** 1998. Ion-exclusion chromatographic determination of organic acids in vinegars. *J Chromato A.* **822**, 45-51.
203. **Morath S., Geyer A., Hartung T.** 2001. Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*, *J. Exp. Med.* **193**, 393–397.
204. **Morishita T., Deguchi Y., Yajima M., Sakurai T., and Yura T.** 1981. Multiple Nutritional Requirements of Lactobacilli: Genetic Lesions Affecting Amino Acid Biosynthetic Pathways. *J. Bacteriol.* **148**, 64-71.
205. **Mounaji K., Erraiss N.E., Iddar A., Wegnez M., Serrano A., Soukri A.** 2002. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the newt *Pleurodeles waltl*. Protein purification and characterization of a GapC gene. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **131** (3), 411-21.
206. **Moyer L.S.** 1936. A suggested standard method for the investigation of electrophoresis. *J. Bacteriol.* **31**, 531–546.
207. **Mozes N., and Lortal S.** 1995. X-ray photoelectron spectroscopy and biochemical analysis of the surface of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046. *Microbiology* **141**, 11-19.
208. **Mozes N., Handley P.S., Busscher H.J., and Rouxhet P.G** (ed). 1991. *Microbial cell surface analysis: structural and physicochemical methods.* VCH Publisher, Inc., New York, N.Y.

- 209. 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.

-N-

- 210. Nagler-Anderson C.** 2001. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nat Rev Immunol.* **1**, 59–67.
- 211. Nakamura J., Ito D., Nagai K., Umekara Y., Hamachi M., and Kumagai C.** 1997. Rapid and sensitive detection of hiochi bacteria by amplification of hiochi bacterial common antigen gene by PCR method and characterization of the antigen. *J Ferment Bioeng* **83**, 161-167
- 212. Navarre W.W., and Schneewind O.** 1994. Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPxTG motif of surface proteins in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **14**: 115–121.
- 213. Navarre W.W., and Schneewind O.** 1999. Surface proteins of Gram positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**, 174–229.
- 214. Neeser J.R., Granato D., Rouvet M., Servin A., Teneberg S., and Karlsson K.A.** 2000. *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiology.* **10**, 1193–1199.
- 215. Niedzielin, K., Kordecki, H., & Birkenfeld, B.** (2001). A controlled, doubleblind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299v in patients with irritable bowel syndrome. *Eur. J. Gastroenterol and Hepatol.* **13**, 1143-1147.
- 216. Nobaek, S., Johansson, M. L., Molin G., Ahrne, S., Jeppsson B.** (2000). Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Amer. J. Gastroenterol.* **95**, 1231-1238.
- 217. Nousiainen J., and Setälä J.** 1998. Lactic acid bacteria as animal probiotics. *In* Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects. *Edited by* S. Salminen and A. von Wright. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 437–473.

-O-

- 218. Ohman L., Lindmark A.C., Isaksson S., Posserud I, Strid H., Sjövall H., and Simrén M.,** 2009. B-cell activation in patients with irritable bowel syndrome (IBS). *Neurogastroenterol Motil.* In press.
- 219. Okada Y., Tsuzuki Y., Hokari R., Komoto S., Kurihara C., Kawaguchi A., Nagao S., and Miura S.** 2009. Anti-inflammatory effects of the genus *Bifidobacterium* on macrophages by modification of phospho-I kappaB and SOCS gene expression. *Int J. Exp Pathol.* **90**, 131-40.
- 220. Ouwehand A.C., Tuomola E.M., Tölkkö S., and Salminen S.** 2001. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *Int J Food Microbiol.* **64**, 119-126.

-P-

- 221. Palumbo E., Favier C.F., Deghorain M., Cocconcelli P.S., Grangette C., Mercenier A., Vaughan E.E., and Hols P.** 2006. Knockout of the alanine racemase gene in *Lactobacillus plantarum* results in septation defects and cell wall perforation. *FEMS Microbiol. Lett.* **233**, 131–138.

222. **Pancholi V., and Chhatwal G.** 2003. Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int J Med Microbiol.* **293**, 391-401.
223. **Pancholi V., and Fischetti V.A.** 1992. Major surface protein on group A Streptococci Is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med.* **176**, 415-426.
224. **Parker R.** 1974. Probiotics, the other half of antibiotic story. *Anim Nutr Health.* **29**, 4-8.
225. **Pathmakanthan S., Li C.K., Cowie J., Hawkey C.J.** 2004. *Lactobacillus plantarum* 299: beneficial in vitro immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon. *J Gastroenterol Hepatol.* **19** (2), 166-73. pathogenic vibrios. *Lett Appl Microbiol.* **23**, 343-346.
226. **Pavan S., Hols P., Delcour J., Geoffroy M.C., Grangette C., Kleerebezem M., and Mercenier A.** 2000. Adaptation of the nisin controlled expression system in *Lactobacillus plantarum*: a tool to study in vivo biological effects. *Appl Environ Microbiol.* **66**, 4427-4432.
227. **Pelletier C., Bouley C., Cayuela C., Bouttier S., Bourlioux P., and Bellon-Fontaine M. N.** 1997. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei subsp. casei*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl Environ Microbiol.* **63** (5), 1725-31.
228. **Pieterse B., Leer R.J., Schuren F.H., and van der Werf M.J.** 2005. Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. *Microbiol.* **151**, 3881-3894.
229. **Pinto M., Robine-Leon S., Appay M.D., Kedinger M., Triadou N., Dussaulx E., Lacroix B., Simon-Assmann P., Haffen K., Fogh J., and Zweibaum A.** 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell.* **47**, 323-330.
230. **Pinto, M., Appay S., Simon-Assmann P., Chevalier G., Dracopoli N., Fogh J., and Zweibaum A.** 1982. Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer cells by replacement of glucose by galactose in the medium. *Biol. Cell.* **44**, 193-196.
231. **Planchon S., Chambon C., Desvaux M., Chafsey I., Leroy S., Talon R., and Hébraud M.** 2007. Proteomic analysis of cell envelope from *Staphylococcus xylosus* C2a, a coagulase-negative *Staphylococcus*. *J Proteome Res.* **6** (9), 3566-80.
232. **Plummer S., Weaver M.A., Harris J.C., and Hunter P.D.J.** 2004. *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhoea. *Intern J. Microbiol.* **7**, 59-62.
233. **Poortinga A.T., Bos R., Norde W., and Busscher H.J.** 2002. Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. *Surface Science Reports.* **47**, 1-32.
234. **Pouwels PH, Leer RJ, Shaw M, Heijne den Bak-Glashouwer MJ, Tielen FD, Smit E, Martinez B, Jore J & Conway PL.** 1998. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *Int J Food Microbiol* **41**: 155-167.
235. **Prantera C., Scribano M.L., Falasco G., Andreoli A., Luzi C.** 2002. Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus* GG. *Gut*, **51**, 405-409.
236. **Pretzer G., Snel J., Molenaar D., Wiersma A., Bron P.A., Lambert J., de Vos W.M., van der M.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.
237. **Pronio A., Montesani C., Butteroni C., Vecchione S., Mumolo G., Vestri A., Vitolo D., Boirivant M.** 2008. Probiotic administration in patients with ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis is associated with expansion of mucosal regulatory cells. *Inflamm. Bowel. Dis.* **14**, 662-668.

238. **Pum D., and Sleytr U.B.** 1999. The application of bacterial S-layers in molecular nanotechnology. *Trends Biotech.* **17**, 8-12.

-Q-

239. **Quirynen M., and Bellon C.M.** 1995. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* **22** (1), 1-14.

-R-

240. **Räisänen L., Schubert K., Jaakonsaari T., and Alatossava T.** 2004. Characterization of lipoteichoic acids as *Lactobacillus delbrueckii* phage receptor components. *J Bacteriol.* **186**(16), 5529-32.

241. **Ramiah K., Van Reenen C.A., and Dicks M.T.** 2008. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. *Research Microbiol.* **159**, 470-475.

242. **Reid G., Cuperus P.L., Bruce A.W., van der Mei H.C., Tomczek L., Khoury A.H., and Busscher H.J.** 1992. Comparison of contact angles and adhesion to hexadecane of urogenital, dairy, and poultry lactobacilli: effect of serial culture passages. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1549–1553.

243. **Reid G., Lam D., Bruce A.W., van der Mei H.C., and Busscher H. J.** 1994. Adhesion of lactobacilli to urinary catheters and diapers: effect of surface properties. *J. Biomed. Mater. Res.* **28**, 731–734.

244. **Reid G., Sanders M.E., Gaskins H.R., Gibson G.R., Mercenier A., Rastall R., Roberfroid M., Rowland I., Cherbut C., Klaenhammer T.R.** 2003. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J. Clin Gastroenterol.* **37**, 105-118.

245. **Reid, G.** (1999). The scientific basis for probiotics strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3763-3766.

246. **Reid, G., and J. Burton.** 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect.* **4**, 319–324.

247. **René A. Alvarez M., Blaylock W., and Baseman J.B.** 2003 Surface localized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Mycoplasma genitalium* binds mucin. *Molecular Microbiol.* **48** (5), 1417–1425.

248. **Rodríguez-Ortega M.J., Luque I., Tarradas C., and Bárcena J.A.** 2008. Overcoming function annotation errors in the Gram-positive pathogen *Streptococcus suis* by a proteomics-driven approach. *BMC Genomics.* **9**, 588.

249. **Rodríguez-Ortega M.J., Norais N., Bensi G., Liberatori S., Capo S., Mora M., Scarselli M., Doro F., Ferrari G., Garaguso I., Maggi T., Neumann A., Covre A., Telford J.L., and Grandi G.** 2006. Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A *Streptococcus* surface proteome. *Nature Biotechnol.* **24**, 191-197.

250. **Rogers H.** 1984. *Bacterial Cell Structure. Aspects of Microbiology 6.* American Society for Microbiology, Washington D.C.

251. **Rojas M., Ascencio F., and 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. *Appl Environ Microbiol.* **68** (5), 2330-6.

252. **Rolfe RD.** 2002. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.* **130**, 396S–402S.

- 253. Roos S., Aleljung P., Robert N., Lee B., Wadstrom T., Lindberg M., and Jonsson H.** 1996. A collagen binding protein from *Lactobacillus reuteri* is part of an ABC transporter system? FEMS Microbiol Lett. **144**, 33–38.
- 254. Roos S., and Jonsson H.** 2002. A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. Microbiol. **148**,433-442.
- 255. Rosenberg M., Gutnick D., and Rosenberg E.,** 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons and to surface in the oral cavity. FEMS Microbiol. lett. **20**, 1-5.
- 256. Rosenberg, M., and Doyle R.J.** 1990. Microbial cell surface hydrophobicity: history, measurement, and significance. In Doyle, R. J. and Rosenberg, M. (Ed.), Microbial Cell Surface Hydrophobicity, pp. 1-38, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- 257. Rosenfeldt V., Michaelsen K.F., Jakobsen M., Larsen C.N., Moller P.L., Tvede M., Weyrehter H., Valerius N.H., and Paerregaard A.** 2002. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains on acute diarrhoea in a cohort of non hospitalized children attending day-care centers. Pediatr Infect Dis J. **21**, 417-9.
- 258. Ruas-Madiedo P., and de los Reyes-Gavilan C.G.** 2005. Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. J Dairy Sci. **88**, 843–856.
- 259. Rutter P.R., and Vincent B.** 1984. Physicochemical interactions of the substratum, microorganisms, and the fluid phase. In K.C. Marshall, Microbial adhesion and aggregation. (Ed) Springer -Verlag, Berlin. pp 21-38.
- 260. Ryu Y.H., Baik J.E., Yang J.S., Kang S.S., Im J., Yun C.H., Kim D.W., Lee K., Chung D.K., Ju H.R., Han S.H.** 2009. Differential immunostimulatory effects of Gram-positive bacteria due to their lipoteichoic acids. Int Immunopharmacol. **9**(1), 127-33.

-S-

- 261. Saavedra J.M., Bauman N.A., Oung I., Perman J.A., Yolken R.H.,** 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. Lancet **344**, 1046–1049.
- 262. Sanchez B., Bressollier P., and Urdaci M.C.** 2008. Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **54**, 1–17.
- 263. Sarem-Damerджи L.O., Sarem F., Marchal L. and Nicolas J.P.** 1996. 'In Vitro Colonization Ability of Human Colon Mucosa by Exogenous *Lactobacillus* Strains' in FEMS Microbiol. Lett. 1-4.
- 264. Sartor R.B.** 2004. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics and prebiotics. Gastroenterology, **126**, 1620-1633.
- 265. Sartor R.B.** 2005. Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. Curr Opin. Gastroenterol. **21**, 44-50.
- 266. Satoh E., Leer R.J., Conway P.L., and Pouwels P.H.** 1999. Mucus adhesion promoting protein of *Lacobacillus reuteri* 104R. In: 6th symposium on lactic acid bacteria, Veldhoven, The Netherlands.
- 267. Savage D.C.** 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. Annu Rev Microbiol. **31**,107- 33.
- 268. Savage D.C.** 1992 Growth phase, cellular hydrophobicity, and adhesion in vitro of lactobacilli colonizing the keratinizing gastric epithelium in the mouse. Appl. Environ. Microbiol. **58**,1992-1995.

269. **Saxelin M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm T., de Vos W.M.** 2005. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr Opin. Biotechnol.* **16**,204-211.
270. **Schäffer C., and Messner P.** 2005. The structure of secondary cell wall polymers: how Grampositive bacteria stick their cell walls together. *Microbiology*, **151**, 643-651.
271. **Schär-Zammaretti P., and Ubbink J.** 2003. The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. *Biophys. J.* **85**, 4076-4092.
272. **Schaumburg J., Diekmann O., Hagendorff P., Bergmann S., Rohde M., Hammerschmidt S., Jänsch L., Wehland J., and Kärst U.** 2004. The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. *Proteomics*, **4**, 2991-3006.
273. **Schillinger U., Guigas C., and Holzapfel WH.** 2005. In vitro adherence and other properties of Lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *Int Dairy J.* **15**, 1289-1297.
274. **Schneitz C., Nuotio L., and Lounatma K.** 1993. Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer). *J Appl Bacteriol.* **74** (3), 290-4.
275. **Schultz M., Timmer A., Herfath H., Sartor B.R., Vanderhoof J.A., Rath H.C.** 2004. *Lactobacillus* GG in inducing and maintaining remission of Crohn's disease. *BMC Gastroenterol.* **4**, 5.
276. **Schultz M., Veltkamp C., Dieleman L.A., Grenther W.B., Wyrick P.B., Tonkonogy S.L., and Sartor R.B.** 2002. *Lactobacillus plantarum* 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis.* **8** (2), 71-80.
277. **Sefa-Dedeh S., Cornelius B., Amoa-Awua W., Sakyi-Dawson E., and Afoakwa E.O.** 2004. The microflora of fermented nixtamalized corn. *Int J Food Microbiol* **96**: 97–102.
278. **Seo H.S., Cartee R.T, Pritchard D.G., and Nahm M.H.** 2008. A New Model of Pneumococcal Lipoteichoic Acid Structure Resolves Biochemical, Biosynthetic, and Serologic Inconsistencies of the Current Model. *J. Bact.* **190**, p. 2379–2387
279. **Servin A.L.** 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* **28**, 405–440.
280. **Severin A., Nickbarg E., Wooters J., Quazi S.A., Matsuka Y.V., Murphy E., Moutsatsos I.K., Zagursky R.J., and Olmsted S.B.** 2007. Proteomic Analysis and Identification of *Streptococcus pyogenes* Surface-Associated Proteins *J. Bacteriol.* **189**, 1514-1522.
281. **Shapiro M. H.** 2008. Flow cytometry of bacterial membrane potential and permeability. *Method Molecul Med.* **142**: 175-186. In W. Scott Champney (ed), *New antibiotic targets*. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
282. **Sherman L.A., and Savage D.C.** 1986. Lipoteichoic acids in *Lactobacillus* strains that colonize the mouse gastric epithelium. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 302–304.
283. **Shida K., and Masanobu N.** 2008. Probiotics and immunology: separating the wheat from the chaff. *Trends Immunol.* **29**, 565-573
284. **Shornikova A.V., Casas I., Mykkänen H., Salo E. and Vesikari T.** 1997. Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. *Ped. Infect. Dis. J.* **16**, 1103–1107.
285. **Sillanpää J., Martinez B., Antikainen J., Toba T., Kalkkinen N., Tankka S., Lounatmaa K., Keränen J., Höök M., Westerlund-Wikström B., Pouwels P.H., and Korhonen T.K.** 2000. Characterization of the collagen-binding S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus*. *J. Bacteriol.* **182**, 6440–6450.

- 286. Sillanpää, J., J. Antikainen, P. Sigvart, M. Mannerström, R. Virkola, and T. Toba.** 2001. Cell- and matrix-binding by isolates in the *Lactobacillus acidophilus* homology groups A1-B2. (manuscript).
- 287. Simon K., and Fuller S.D.** 1985. Cell surface polarity in epithelia. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**, 242-288.
- 288. Sleytr U.B., and Beveridge T.J.** 1999. Bacterial S-layers. *Trends. Microbiol.* **7**, 253-260.
- 289. Sleytr U.B., Messner P., and Sára M.** 1993. Crystalline bacterial cell surface layers: general principles and application potential. *J. Appl. Bact.* **74** (Suppl), 21-32.
- 290. Souza J.M., and Radi R.** 1998. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxyxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* **360** (2), 187-94.
- 291. Steen A., Buist G., Leenhouts K.J., El Khattabi M., Grijpstra F., Zomer A.L., Venema G., Kuipers O. P. and Kok J.** 2003. Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents. *J Biol Chem.* **278**, 23874–23881.
- 292. Stiles M.E, and Holzappel W.H.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol.* **36**(1), 1-29.
- 293. Sturn A., Rilling K., Baumgart D.C., Gargas K., Abou-Ghazalé T., Raupach B., Eckert J., Schumann R.R., Enders C., Sonnenborn U., Wiedenmann B., Dignass A.U.** 2005. *Escherichia coli* Nissle 1917 distinctively modulates T-cell cycling and expansion via toll-like receptor 2 signaling. *Infect. Immun.* **73**, 1452-1465.
- 294. Styriak I., Demeckova V., and Nemcova R.** 1999. Collagen (Cn-I) binding by gut lactobacilli. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* **112**, 301–304.
- 295. Styriak I., Nemcova R., Chang Y.H., and Ljungh A.** 2003. Binding of extracellular matrix molecules by probiotic bacteria. *Lett Appl Microbiol.* **37**, 329–333.
- 296. Sugita T., and Togawa, M.** 1994. Efficacy of *Lactobacillus* preparation Biolactis powder in children with rotavirus enteritis. *Jpn. J. Pediatr.* **47**, 2755–2762.
- 297. Sutcliffe I.C., and Harrington D.J.** 2002. Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in Gram-positive bacterial genomes. *Microbiology*, **148**, 2065-2077.
- 298. Symersky J., Patti J.M., Carson M., House-Pompeo K., Teale M., Moore D., Jin L., Schneider A., DeLucas L.J., Höök M., Narayana S.V.** 1997. Structure of the collagen-binding domain from a *Staphylococcus aureus* adhesin. *Nat Struct Biol.* **4**, 833–838.
- 299. Szymański H., Armańska M., Kowalska-Duplaga K., Szajewska H.** 2008. *Bifidobacterium longum* PL03, *Lactobacillus rhamnosus* KL53A, and *Lactobacillus plantarum* PL02 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized controlled pilot trial. *Dig.* **78**, 13-7.

-T-

- 300. Takahashi N., Kitazawa H., Iwabuchi N., Xiao J.Z., Miyaji K., Iwatsuki K., and Saito T.** 2006. Immunostimulatory oligodeoxynucleotide from *Bifidobacterium longum* suppresses Th2 immune responses in a murine model. *Clin Exp. Immunol.* **145**, 130-8.
- 301. Takeda K., Suzuki T., Shimada S.I., Shida K., Nanno M., Okumura K.** 2006. Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota. *Clin. Exp. Immunol.* **146**, 109-115.
- 302. Tallon R., Arias S., Bressollier P., and Urdaci M.C.** 2007. Strain- and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds. *J Appl Microbiol.* **102**, 442–451.

- 303. Tannock G.W.** 1999. Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **76**:265-78.
- 304. Tannock G.W.** 2005. *Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects*. Caister Academic Press, Wymondham.
- 305. Tannock G.W., McConnell M.A., and Fuller R.** 1992. A note on the use of a plasmid as a DNA probe in the detection of a *Lactobacillus fermentum* strain in porcine stomach contents. *J Appl Bacteriol.* **73**(1), 60-2.
- 306. Teti G., Tomasello F., Chiofalo M.S., Orefici G., and Mastroeni P.** 1987. Adherence of group B streptococci to adult and neonatal epithelial cells mediated by lipoteichoic acid. *Infect. Immun.* **55**, 3057-3064.
- 307. Tien M.T., Girardin S.E., Regnault B., Le Bourhis L., Dillies M.A., Coppée J.Y., Bourdet-Sicard R., Sansonetti P.J., Pédrón T.** 2006. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on Shigella-infected human intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* **176**, 1228–1237.
- 308. Tjalsma H., Lambooy L., Hermans P.W., and Swinkels D.W.** 2008. Shedding and shaving: Disclosure of proteomic expressions on a bacterial face. *Proteomics*, **8**, 1415–1428.
- 309. Toba T., Virkola R., Westerlund B., Bjorkman Y., Sillanpaa J., Vartio T., Kalkkinen N., and Korhonen T.K.** 1995. A Collagen-Binding S-Layer Protein in *Lactobacillus crispatus*. *Appl Environ Microbiol.* **61**, 2467–2471.
- 310. Ton-That H., Marraffini L.A., Schneewind O.** 2004. Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta.* **1694** (1-3), 269-78.
- 311. Tuomola E.M., Ouwehand A.C., and Salminen S.J.** 2000. Chemical, physical and enzymatic pre-treatments of probiotic lactobacilli alter their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins. *Int J. Food Microbiol.* **60**, 75-81.
- V-
- 312. Valeur N., Engel P., Carbajal N., Connolly E., and Ladefoged K.** 2004. Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol.* **70**, 1176–1181.
- 313. van Loosdrecht M.C.M., Lyklema J., Norde W., Schraa G., and Zehnder A.J.B.** 1987a. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1893-1897.
- 314. van Loosdrecht M.C., Lyklema J., Norde W., Schraa G., and Zehnder A.J.** 1987b. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl. Envir. Microbiol.* **53**, 1898-1901.
- 315. van Oss C.J.** 1996. *Forces interfaciales en milieux aqueux*. Ed Masson, Paris.
- 316. van Pijkeren J.P., Canchaya C., Ryan K.A., Claesson M.J, Sheil B., Steidler L., O'Mahony L., Fitzgerald G.F., van Sinderen D., O'Toole P.W.** 2006. Comparative and functional analysis of sortase-dependent proteins in the predicted secretome of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl Environ Microbiol.* **72**, 4143–4153.
- 317. van Wely K.H., Swaving J., Freudl R. and Driessen A.J.** 2001. Translocation of proteins across the cell envelope of Gram positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* **25**, 437–454.
- 318. Vandamme P., Vancanneyt M., van Belkum A., Segers P., Quint W.G., Kersters K., Paster B.J., Dewhirst F.E.** 1996. Polyphasic analysis of strains of the genus *Capnocytophaga* and Centers for Disease Control group DF-3. *Int J Syst Bacteriol.* **46**(3), 782-91.

319. **Vanet A., and Labigne A.** 1998. Evidence for specific secretion rather than autolysis in the release of some *Helicobacter pylori* proteins. *Infect. Immun.* **66**, 1023–1027.
320. **Ventura M., Callegari M.L., and Morelli L.** 2000. S-layer gene as a molecular marker for identification of *Lactobacillus helveticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**, 275-279.
321. **Vesa T., Pochart P., and Marteau P.** 2000. Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **14**, 823–828.
322. **Vesterlund S., Paltta J., Karp M., and Ouwehand A.C.** 2005. Measurement of bacterial adhesion-in vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods* **60**, 225-233.
323. **Vidal K., Donnet-Hughes A., and Granato D.** 2002. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus johnsonii* strain La1 and *Lactobacillus acidophilus* strain La10 antagonize the responsiveness of human intestinal epithelial HT29 cells to lipopolisaccharide and gram negative bacteria. *Infect. Immun.* **70**, 2057-2064.
324. **Vidgrén G, Palva I, Pakkanen R, Lounatmaa K, Palva A.** 1992. S-layer protein gene of *Lactobacillus brevis*: cloning by polymerase chain reaction and determination of the nucleotide sequence. *J Bacteriol.* **174**(22),7419-27.
325. **Villamon E., Villalba V., Mercedes-Nogueras M., Tomas J.M., Gozalbo D., and Gil L.** 2003. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a glycolytic enzyme present in the periplasm of *Aeromonas hydrophila*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **84**, 31–38.
326. **Vinderola, C. G., Medici, M., and Perdigon, G.** 2004. Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, **96**, 230–243.
327. **Visser P.** 1976. Adhesion of colloid particles. *Journal of Colloid Interface Science.* **3**, 714.
- W-
328. **Wadström T., Andersson K., Sydow M., Axelsson L., Lindgren S., and Gullmar B.** 1987. Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J Appl. Bacteriol.* **62**, 513-520.
329. **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.
330. **Wang K.Y., Li S.N., Liu C.S., Perng D.S., Su Y.C., Wu D.C., Jan C.M., Lai C.H., Wang T.N., Wang W.M.** 2005. Effects of ingesting *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *Am J Clin Nutr.* **81**, 939-40.
331. **Wicken A.J. and Knox K.W.** 1970. Studies in the group F antigen of lactobacilli: isolation of a teichoic acid-lipid complex from *Lactobacillus fermenti* NCTC6991. *J. Gen. Microbiol.* **60**, 293-301.
332. **Wicken A. J., Gibbens J. W., and Knox K.W.** 1973. Comparative Studies on the Isolation of Membrane Lipoteichoic Acid from *Lactobacillus fermenti*. *J. bacterial.* **113**, 365-372.
333. **Wicken A.J., and Knox K.W.** (1980) Bacterial cell surface amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta.* **604**, 1–26.
334. **Wicken A.J., and Knox K.W.** 1975. Lipoteichoic acids: a new class of bacterial antigen. *Science.* **187**, 1161–1167.

- 335. Wold A.E., Thorssén M., Hull S., and Edén C.S.** 1988. Attachment of *Escherichia coli* via mannose- or Gal<sub>134</sub>Gal<sub>1</sub>-containing receptors to human colonic epithelial cells. *Infect. Immun.* **56**, 2531–2537.
- 336. Wullt M., Hagslatt M.L., and Odenholt I.** 2003. *Lactobacillus plantarum* 299v for the treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a double-blind, placebo-controlled trial. *Scand J. Infect Dis.* **35**, 365-7.

**-Y-**

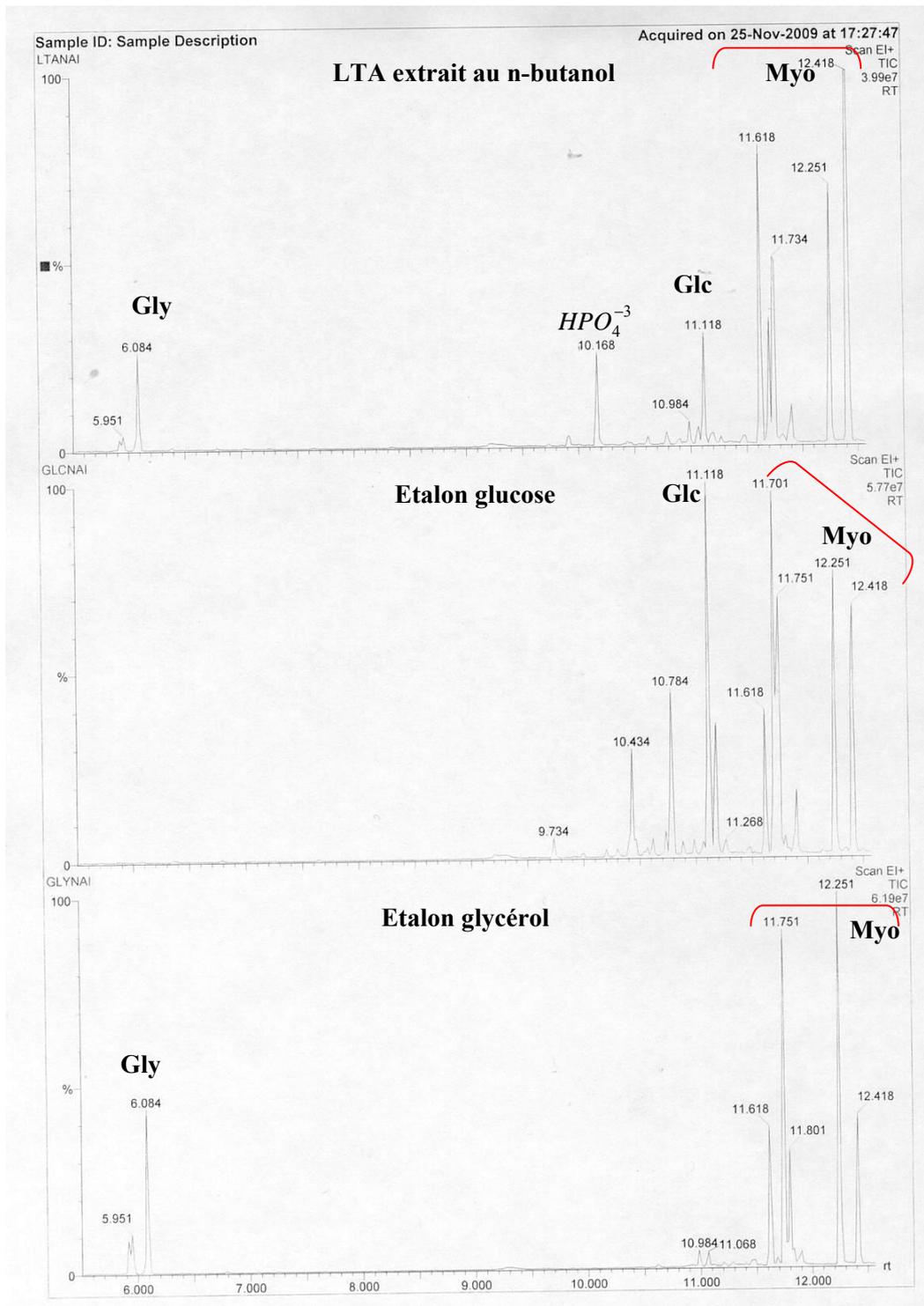
- 337. Yan, F., Polk, D.B.,** 2002. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 50959–50965.
- 338. Yon K.Y., Woodams E.E., and Hang Y.D.** 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresour. Technol.* **97**, 1427-1430.
- 339. Yother J., and White J.M.** 1994. Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA. *J. Bacteriol.* **176**, 2976–2985.
- 340. Yuehwei H.An., and Friedman R.J.** 1997. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *Journal of Microbiological Methods.* **30**, 141-152.
- 341. Yuen L., Dionne J., Arif B., and Richardson C.** 1990. Identification and sequencing of the spheroidin gene of *Choristoneura biennis entomopoxvirus*. *Virology.* **175**, 427–433.

**-Z-**

- 342. Zhang, L., Li, N., Caicedo, R., Neu, J.,** 2005. Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J. Nutr.* **135**, 1752-1756.

# ***ANNEXES***

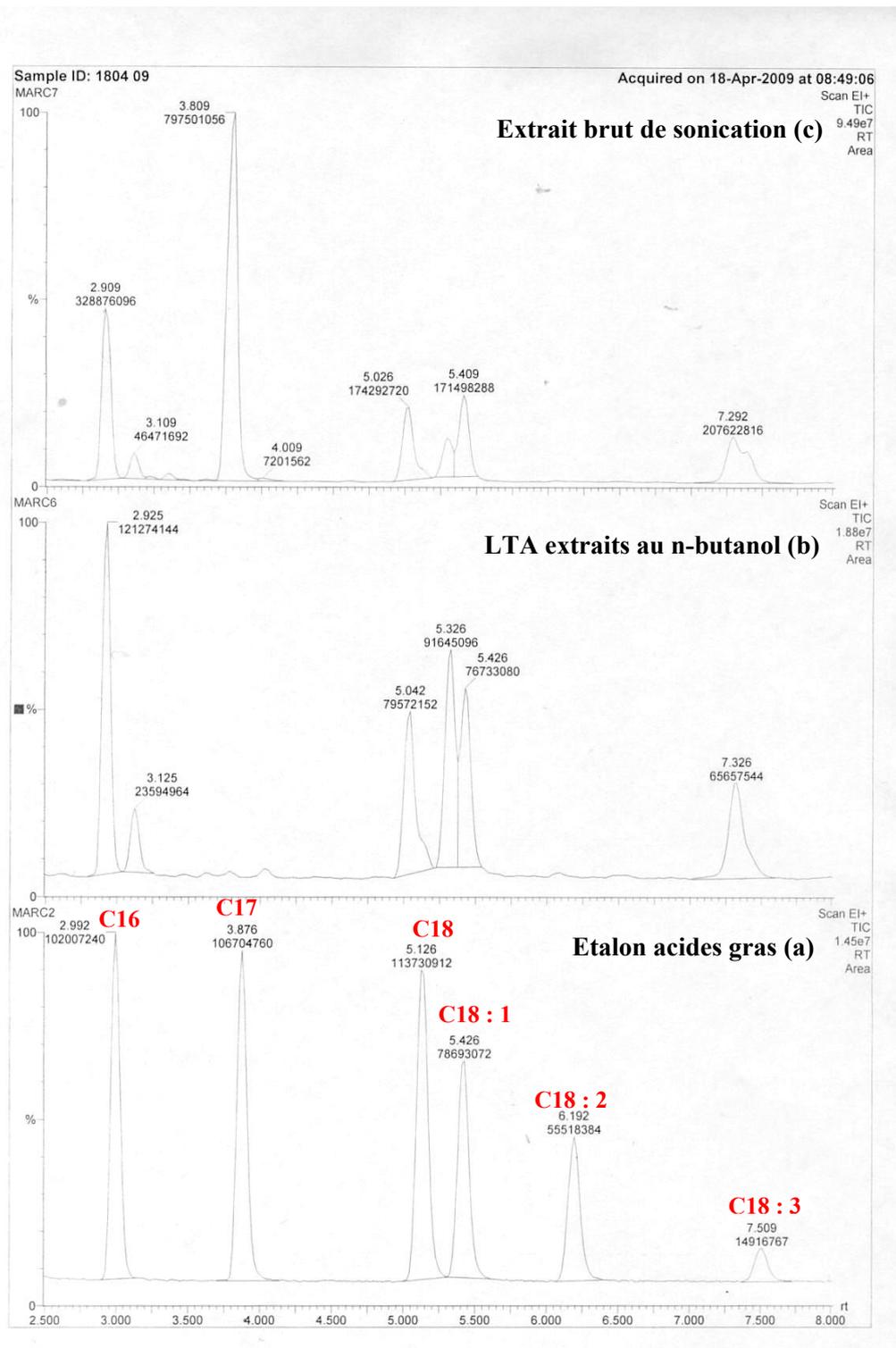
-Annexe 1-



**Chromatogramme obtenu par CPG/SM après dérivation au BSTFA :**

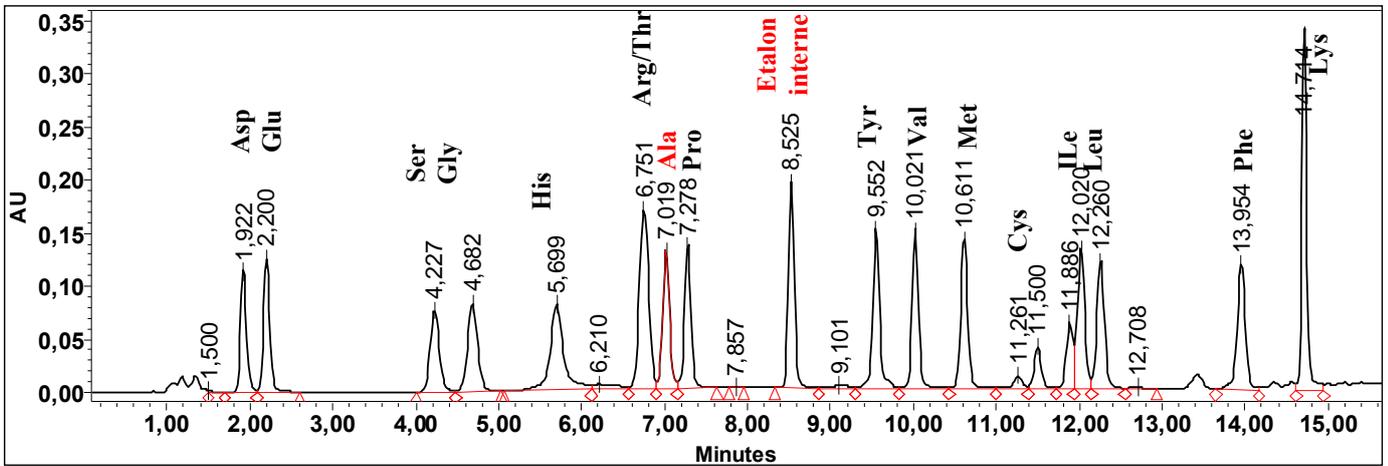
- LTA extraits au n-butanol puis purifiés par HIC et CIE ;
- Etalon Glucose, ( $T_R = 11,18$  min) ;
- Etalon glycérol ( $T_R = 6,08$  min)
- Myoinositol : étalon interne (pics majoritaires :  $T_R = 11,73$  ;  $12,25$  et  $12,48$  min).

## -Annexe 2-



Chromatogrammes CPG/SM des échantillons : (a) mélange étalon d'acides gras contenant du C16, C18, C18 : 1, C18 : 2, C18 : 3 (20 µg de chaque acide gras) et du C17 comme étalon interne, (b) LTA purifiés et (c) extrait brut de sonication (EBS).

## -Annexe 3-



Chromatogramme du mélange étalon d'acides aminés analysé par HPLC en phase inversée colonne C18 (3,9 x 150 mm) par la méthode Pico-Tag<sup>TM</sup> (Waters). Etalon interne : acide  $\alpha$ -aminobutyrique.

**-Annexe 4-**

***Lactobacillus plantarum* 299v cell surface bound proteins involved in probiotic/host interaction**

**N. Saad<sup>1</sup>, M. Urdaci<sup>2</sup>, Ouk S.T<sup>1</sup>, G. Bégaud<sup>1</sup>, S. Chaignepain<sup>3</sup>, J.M. Schmitter<sup>3</sup> and P. Bressollier<sup>1,2\*</sup>.**

*1 Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, EA 1069, Antenne IUT, Département Génie Biologique, U. Limoges, France*

*2 LMBA, UMR 5248 CNRS -U. Bordeaux 1- ENITAB, 1, cours du Général de Gaulle 33140 Gradignan, France*

*3 University of Bordeaux, Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB), UMR 5248 CNRS -U. Bordeaux 1- ENITAB, 33607 Pessac Cedex, France*

**\* Corresponding author:**

Philippe Bressollier, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, EA 1069, Antenne IUT, Département Génie Biologique, allée André Maurois- 87065, Limoges, France.

Tel.: +33-5-55-43-44-02. Fax: +33-5-55-43-43-93.

E-mail address: [philippe.bressollier@unilim.fr](mailto:philippe.bressollier@unilim.fr)

**-Annexe 5-**

**Cell wall-associated lipoteichoic acids involvement in *Lactobacillus plantarum* 299v  
adhesion to mucin and Caco-2 epithelial cells**

**N. Saad<sup>1</sup>, M. Urdaci<sup>2</sup>, Ouk S.T, G. Bégaud<sup>1</sup>, J.M. Schmitter<sup>3</sup> and P. Bressollier<sup>1,2\*</sup>.**

*1 Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, EA 1069, Antenne IUT, Département  
Génie Biologique, U. Limoges, France*

*2 LMBA, UMR 5248 CNRS -U. Bordeaux I- ENITAB, 1, cours du Général de Gaulle 33140  
Gradignan, France*

*3 University of Bordeaux, Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB), UMR 5248 CNRS  
-U. Bordeaux I- ENITAB, 33607 Pessac Cedex, France*

**\* Corresponding author:**

Philippe Bressollier, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, EA 1069, Antenne  
IUT, Département Génie Biologique, allée André Maurois- 87065, Limoges, France.

Tel.: +33-5-55-43-44-02. Fax: +33-5-55-43-43-93.

E-mail address: [philippe.bressollier@unilim.fr](mailto:philippe.bressollier@unilim.fr)

-Annexe 6-

- 1) **N. Saad, M. Urdaci, J.M Schmitter, C. Di primo, B. Verneuil, P. Krausz, Ph. Bressollier.** La glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) associée à la paroi de *Lactobacillus plantarum* 299v : une protéine impliquée dans l'interaction bactérie/hôte.  
*15<sup>ème</sup> Colloque du Club des Bactéries Lactiques. CBL 2007, Rennes, France. 13-15 Novembre 2007*
  
- 2) **N. Saad, M. Urdaci, C. Vignoles, S. Chaignepain, R. Tallon, JM. Schmitter, P. Krausz, P. Bressollier.** *Lactobacillus plantarum* 299v cell surface protein: a new insight into the origin of cell wall associated GAPDH.  
*Journée Scientifique CBMN, Institut Européen de Chimie et de Biologie, Bordeaux, France. 13 Novembre 2008.*
  
- 3) **N. Saad, M. Urdaci, C. Vignoles, S. Chaignepain, R. Tallon, JM. Schmitter, P. Krausz, P. Bressollier.** *Lactobacillus plantarum* 299v cell surface protein: a new insight into the origin of cell wall associated GAPDH.  
*16<sup>ème</sup> Colloque du Club des Bactéries Lactiques. CBL2009, Toulouse, France. 27-29 Mai 2009.*
  
- 4) **N. Saad, M. Urdaci, G. Bégau, P. Krausz, J. M. Schmitter, P. Bressollier.**  
Cell wall-associated lipoteichoic acids are involved in *Lactobacillus plantarum* 299v adhesion to mucin and Caco-2 cells.  
*3<sup>rd</sup> Congress of European Microbiology, FEMS 2009, Göteborg, Sweden, June 28-July 2, 2009.*
  
- 5) **Naima Saad, M. Urdaci, C. vignoles, S. Chaignepain, J.M Schmitter, P. Bressollier.** La GAPDH associée à la paroi de *Lactobacillus plantarum* 299v : origine et fonctions.  
*15<sup>ème</sup> Colloque National de la Recherche dans les IUT, Angers, France. 9-11 juin 2010.*

## Résumé :

Les microorganismes probiotiques mis en œuvre dans les aliments fonctionnalisés, sont capables de produire des effets bénéfiques sur la santé du consommateur. Ces effets dépendent entre autres de la capacité d'adhésion des probiotiques aux constituants de l'épithélium intestinal. L'adhésion, est un phénomène complexe dépendant des propriétés physico-chimiques de la surface bactérienne ainsi que de la présence d'entités protéiques et/ou non protéiques possédant une affinité pour les constituants de la muqueuse intestinale de l'hôte. Au travers de l'étude de l'hydrophobie/hydrophilie et de la charge électrique de la surface de la souche probiotique *Lactobacillus plantarum* 299v ainsi que de celles d'autres souches adhérentes de *L. plantarum*, une absence de corrélation entre de telles propriétés et la capacité d'adhésion des souches sur les cibles mucine et cellules épithéliales intestinales Caco-2 a été établie. La caractérisation systématique des protéines associées à la paroi de *L. plantarum* 299v suivie de l'estimation de leur affinité pour des cibles de la surface intestinale, ont conduit à l'identification de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) en tant qu'adhésine potentielle. L'analyse, par cytométrie en flux, des cellules de *L. plantarum* 299 v marquées par des anticorps anti-GAPDH et par l'iodure de propidium a permis d'établir un lien entre la perte d'intégrité de la membrane plasmique et la présence de cette « anchorless protein » associée à la paroi bactérienne. Cette observation conduit à la proposition d'un mécanisme original concernant l'exportation de l'enzyme cytoplasmique à la surface de la bactérie. D'autres polymères non protéiques de type acides lipoteichoïques associés à la paroi, ont été caractérisés et leur implication dans l'interaction de *L. plantarum* 299v avec la mucine et les cellules épithéliales intestinales Caco-2 a été démontrée.

**Mots clés :** *L. plantarum* 299v, propriétés physico-chimiques de surface, protéines de la paroi, GAPDH, acides lipoteichoïques.

## Abstract

The probiotic microorganisms implemented in functionalized foods can produce beneficial effects on consumer health. These effects depend on the adhesion ability of probiotics to the constituents of the intestinal tract. The phenomenon of bacterial adhesion is a complex process which is mediated by the physico-chemical properties of the bacterial surface and by a set of proteinaceous and non-proteinaceous molecular entities with specific binding abilities to constituents of the host intestinal mucosa. Through the study of the hydrophobic/hydrophilic character and electric charge of the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* 299v and those of other adherent strains of *L. plantarum*, no correlation between such properties and their adhesion ability to mucin and Caco-2 epithelial cells was established. The systematic characterization of the cell wall associated proteins of *L. plantarum* 299v followed by the estimation of their affinities for targets of the intestinal surface, led to the identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a potential adhesin. Flow cytometry analysis of *L. plantarum* 299v cells labelled with anti-GAPDH and propidium iodide unambiguously confirmed a relationship between the loss of the plasma membrane integrity and location on cell wall of GAPDH and probably of other "anchorless protein". This observation led to us the proposal of an original mechanism on the export of this cytoplasmic enzyme to the bacterial cell wall surface. Other non-proteinaceous polymers like lipoteichoic acids have been characterized and their involvement in the interaction of *L. plantarum* 299v to mucin and Caco-2 monolayer cells was demonstrated.

**Keywords:** *L. plantarum* 299v, surface physico-chemical properties, cell wall proteins, GAPDH, lipoteichoic acids